
ZVLÁŠTNÍ RUBRIKA

PŮVODNÍ ZAHRANIČNÍ PŘÍSPĚVKY S ČESKÝM PŘEKLADEM

V této nepravidelné rubrice budou otiskovány články zahraničních autorů v angličtině, němčině a francouzštině spolu s českým překladem.

615.777:576.8.097:615.9-092.9

615.777:576.8.097:615.9-092.9

**IMMUNOTOXIC ASSESSMENT OF A
COMMERCIAL INSECTICIDE, CONTAINING
40% DIMETHOAT IN RATS**

¹Ivan SAMNALIEV, ²Plamen PADESHKY,
²Konstantin MLADENOV
¹Laboratory of Experimental Toxicology
²Immunology Center
Military Medical Academy, Sofia, BULGARIA

Introduction

BY-58 EC containing 40% Dimethoat is a widely used organophosphorus insecticide in Bulgaria. As it is applied in large quantities, the risk of direct human exposure is high, especially for farmers.

Extensive investigations on the adverse effects of organophosphorous (OP) compounds shown that, besides other toxic effects, they may have an immunotoxic potential (1-5). There are many experimental evidences that OP pesticides are able direct or indirect to affect different components of humoral or cellular immunity. As consequence of this, host resistance against infectious agent, neoplasia, allergic or autoimmune reactions may be altered (6, 7).

In the present experiment, the immunotoxic effects of a large single and multiple small doses of BY-58EC were studied in rats.

Materials and Methods

The following materials were used:

BY-58EC - a commercial product, containing 40% Dimethoat-0,0 dimethyl-S (N-methylcarbamoylmethyl-dithiophosphat, (Beterfeld - Germany).

Animals: 136 out bred "Wistar" feminine rats, 7 weeks of age were kept under conventional conditions:

**IMUNOLOGICKÉ HODNOCENÍ
KOMERČNÍHO INSEKTICIDU OBSAHUJÍCÍHO
40 % DIMETHOATU U KRYŠ**

¹Ivan SAMNALIEV, ²Plamen PADESHKY,
²Konstantin MLADENOV
¹Laborator experimentální toxikologie
²Centrum imunologie
Vojenská lékařská akademie, Sofie, Bulharsko

Úvod

BY-58EC obsahující 40 % dimethoatu je organofosforový insekticid, který je v Bulharsku značně rozšířený. Protože se používá ve velkém množství, je riziko jeho přímého působení na člověka, především pro farmáře, velké.

Rozsáhlé studie vedlejších účinků organofosforových (OF) sloučenin ukázaly, že vedle jiných toxických účinků mohou mít i imunotoxický efekt (1-5). Existuje řada experimentálních důkazů, že OF pesticidy jsou schopné přímo, nebo nepřímo ovlivňovat různé komponenty humorální nebo celulární imunity. Důsledkem je změna obranyschopnosti hostitele vůči infekčním původcům, novotvarům, mohou vznikat alergické nebo autoimunní reakce (6, 7).

V tomto experimentu byly na kryších sledovány imunotoxické účinky BY-58EC po jednorázovém podání vysoké dávky nebo po opakovaném podávání malých dávek.

Materiál a metodika

Byl použit následující materiál:

BY-58EC - komerční výrobek obsahující 40 % dimethoatu-00 dimethyl-S(N-methylkarbamoylmethyl-dithiofosfát) (Beterfeld - Německo).

Zvířata: 136 kryš (samic) kmene Wistar ve stáří 7 týdnů bylo chováno ve standardních podmínkách:

up to 10 rats per cage, 12 light/dark cycle, $T=20\pm 2^{\circ}\text{C}$; they received compressed rodent food and water ad libitum.

SRBC (sheep red blood cells) were received from whole sheep blood after three times centrifugation and washing with PBS (phosphate buffer saline) before use; *Listeria monocytogenes* serovar 4b; *Pseudomonas aeruginosa* 5875 and bacterial nutritious media were purchased from National Center for Infectious and Parasitic Diseases - Sofia, Bulgaria.

The acute oral LD_{50} of BY-58EC determined by the method of Litchfield and Wilcoxon (8) as 136 (110-168) mg/kg.

Experimental groups and observed parameters

In the subacute experiment 50 rats were treated p.o. 21 days with $1/10 \text{ LD}_{50}$ (14 mg/kg) of BY-58EC (group 1).

In the acute experiment 36 rats were treated with a single $1/2 \text{ LD}_{50}$ dose (group 2).

Other 50 rats were treated p.o. with 0.15M solution of NaCl. also 21 days (group 3).

The body weight prior and after treatment were determined for all rats.

The spleen index (spleen weight [mg]/100 g body weight), count of erythrocytes, leukocytes from peripheral blood and peritoneal lavage macrophages were determined on day 1st and 6th after the last BY-58EC administration.

Skin necrotic reaction after intracutaneous inoculation of *Ps.aeruginosa* (1.10^9 cells) one day after the last intoxication was measured (on 1, 2, 3, 4 and 6th day).

The bacterial clearance of *L.monocytogenes* from the spleen and peritoneum after i.p.application ($7, 2.10^8$ cells) was determined in four terms-1,2,3 and 6 day. The peritoneal lavage was separated by centrifugation and the count of colonyformig units od sediment and supernatant were enumerated.

The number of splenic suspension plaque forming cells (IgM-antibody anti-SRBC forming cells) was determined according to the method of Cunningham and Szenberg (9). The immunization with SRBC was performed after the last treatment with the intoxicant. Five days later the reaction was made.

Results

Under the experimental conditions all the animals treated with $1/10 \text{ LD}_{50}/21\text{d}$ were in normal life rythm and good physiological status. Body weight gain in the period of investigation was approximately 33.0 ± 13.4 (starting body w.- 140.9 ± 11.18). Control group body weight gain was 33.4 ± 13.0 (starting body w.- 139.4 ± 12.69).

Rats treated with $1/2\text{LD}_{50}$ did not show signs of any intoxication.

Relative spleen weight in groups, treated with BY-58

v jedné kleci až 10 krys, světlo/tma v intervalu 12 hodin, teplota $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, krmené granulovanou potravou pro hlodavce a vodou ad libitum.

SRBC (ovčí erytrocyty) byly získány z plné ovčí krve trojnásobnou centrifugací a před použitím byly promývány pomocí PBS (fyziologický roztok tlumený fosfátem). Z Národního centra pro infekce a parazitární nemoci (Sofie) byly zakoupeny *Listeria monocytogenes* serovar 4b, *Pseudomonas aeruginosa* 5875 a bakteriální nutriční médium.

Akutní LD_{50} perorálně podané látky BY-58EC byla stanovena metodou Litchfielda a Wilcoxon (8) v dávce 136 (110-168) mg/kg.

Experimentální skupiny a sledované parametry:

V subakutním experimentu byla 50 krysám perorálně podávána látka BY-58EC v dávce $1/10 \text{ LD}_{50}$ (14 mg/kg) po dobu 21 dní (skupina 1).

V akutním experimentu byla 36 krysám jednorázově podána dávka odpovídající $1/2 \text{ LD}_{50}$ (skupina 2).

Dalším 50 krysám byl perorálně podáván 0,15 M roztok NaCl rovněž po dobu 21 dnů (skupina 3).

Před pokusem a po něm byla zjišťována tělesná hmotnost všech krys.

První a šestý den po posledním podání BY-58EC byly stanoveny index sleziny (váha sleziny v mg/100 g hmotnosti), počet erytrocytů, leukocytů v periferní krvi a peritoneální laváž makrofágů.

Den po poslední intoxikaci byla měřena (1., 2., 3., 4. a 6. den) nekrotická reakce kůže po intrakutánní inokulaci *Ps. aeruginosa* (1.10^9 buněk).

Bakteriální clearance *C. monocytogenes* ze sleziny a peritonea po intraperitoneální aplikaci ($7,2.10^8$ buněk) byl určován ve 4 intervalech: 1., 2., 3. a 6. den. Peritoneální laváž byla centrifugována a bylo vy počítáno množství CFU v sedimentu a supernatantu.

Počet buněk tvořících plaky (PFC) ve slezině suspenzi (IgM-protilátky proti ovčím erytrocytům) byl určován metodou Cunninghama a Szenberga (9). Imunizace ovčími erytrocyty byla prováděna po posledním podání otravné látky. Reakce se projevila po 5 dnech.

Výsledky

V experimentu se všechna zvířata intoxikovaná 21 dnů $1/10 \text{ LD}_{50}$ nacházela v normálním životním rytmu a dobrém fyziologickém stavu. Tělesná hmotnost během sledování dosáhla v intervalech asi $33,0\pm 13,4$ (počáteční hmotnost byla $140,9\pm 11,18$). Tělesná hmotnost v kontrolní skupině byla v intervalech $33,4\pm 13,0$ (počáteční hmotnost byla $139,4\pm 12,69$).

U krys, kterým byl podán OF v dávce $1/2\text{LD}_{50}$ se neprojevily žádné příznaky intoxikace.

Poměrná váha sleziny ve skupinách, kterým byl

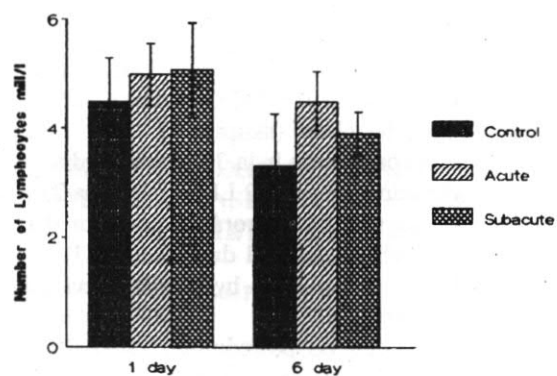
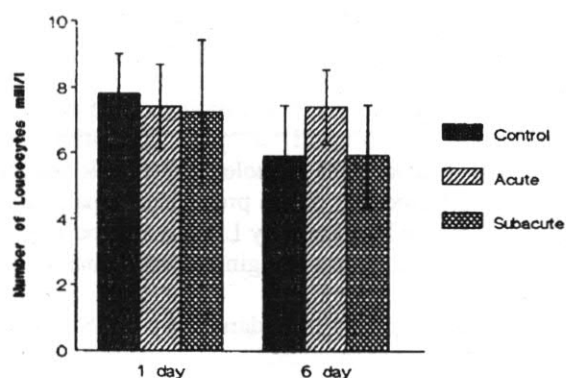


Fig. 1. Differential blood count after treatment with BY-58 EC.

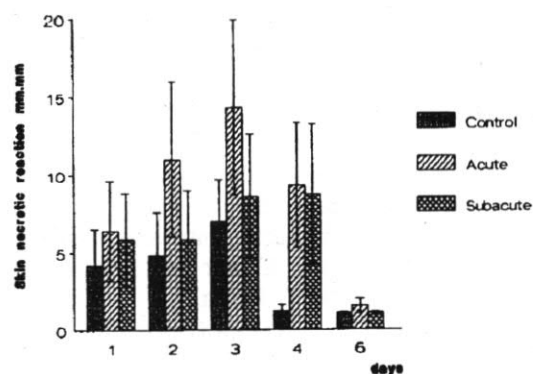


Fig. 2. Skin necrotic reaction after treatment with BY-58 EC.

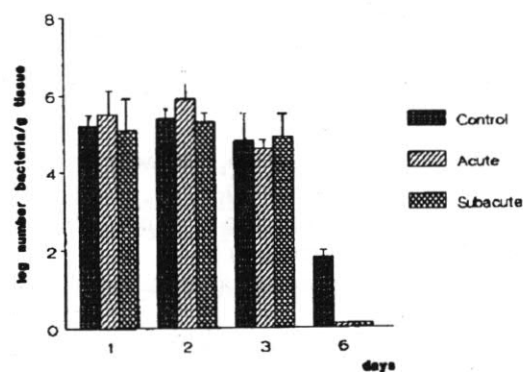


Fig. 3. Clearance of *Leimonocytoenes* from spleen.

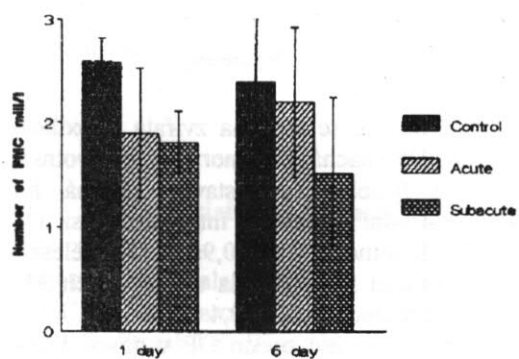
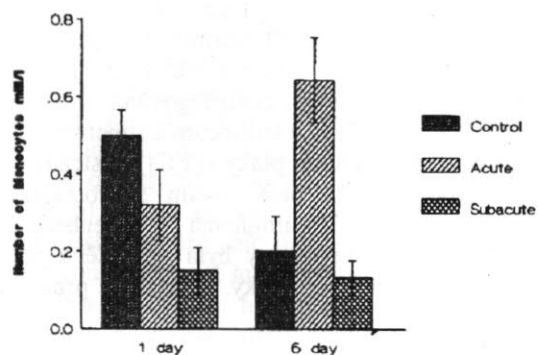


Fig. 1. Differential blood count after treatment with BY-58 EC - continuation.

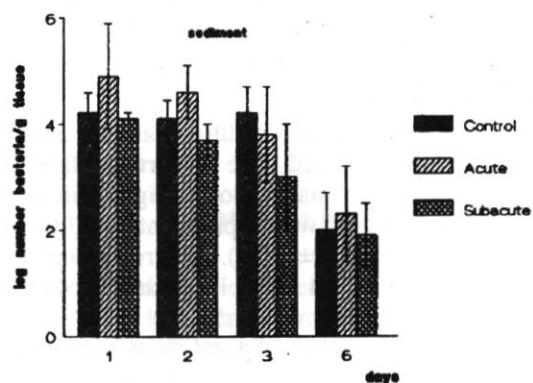
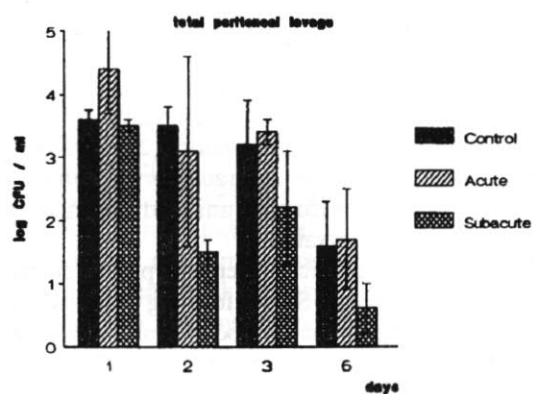


Fig. 4. Clearance of *Leimonocytoenes* from peritoneal lavage.

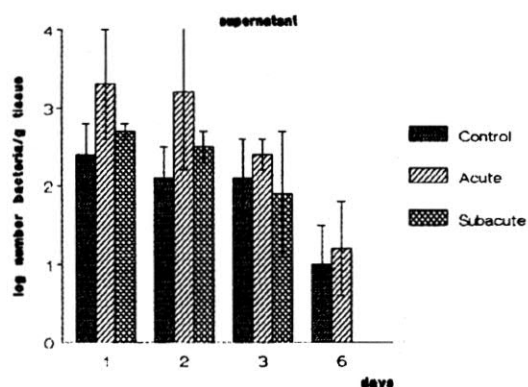
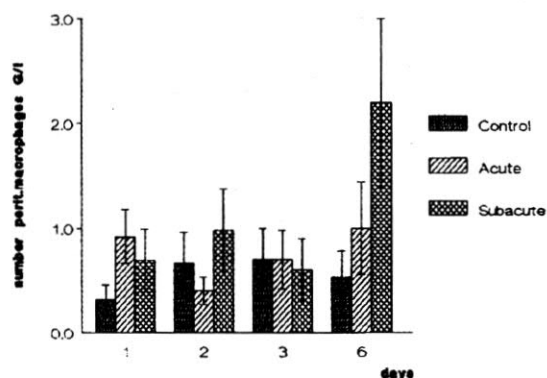
Fig. 4. Clearance of *L. monocytogenes* from peritoneal lavage-continuation.Fig. 5. Number of peritoneal macrophages after *L. monocytogenes* inoculation.

Table 1

Spleen index in BY-58 treated rats

Day of treatment	Group 1	Group 2	Group 3
1st	3.78±0.84 (n=5)	4.52±0.35 (n=5)	4.93±0.57 (n=3)
6th	4.45±0.27 (n=5)	5.65±1.5 (n=5)	4.76±1.0 (n=5)

Table 2

Spleen index in BY-58 + *L. monocytogenes* rats

Day after infection	Group 1	Group 2	Group 3
1st	4.38±1.40	4.52±0.35	4.9±0.57
2nd	10.6±1.5	7.3±2.6	9.1±1.7
3rd	11.1±1.0	8.6±1.9	10.7±1.4
6th	14.4±1.7	8.2±1.3	10.6±1.6

* - In all terms the number of animals was: group 1 and 2 $n = 3$, group 3 $n = 5$.

Table 3

Total Leu count after BY-58 treatment

Term (days)	Group 1	Group 2	Group 3
1	7.2±2.1.10 ⁶ L ⁻¹	7.4±1.3.10 ⁶ L ⁻¹	7.8±1.2.10 ⁶ L ⁻¹
6	5.9±1.6.10 ⁶ L ⁻¹	7.4±1.1.10 ⁶ L ⁻¹	5.9±1.5.10 ⁶ L ⁻¹

* - number of animals - 5 per group

Table 4

Er number after BY-58 treatment

Term (days)	Group 1	Group 2	Group 3
1	2.88±0.85	3.65±0.44	3.64±0.37
6	3.36±0.85	2.97±0.65	3.3±0.40

* - number of animals - 5 per group; the results are given in 10⁹L⁻¹

Table 5

Number PFC (5.10⁶ spleen cells)

Term	Group 1	Group 2	Group 3
SRBC	153.8±40.6	490.0±200.1	225.0±79.3
id after last adm.	(n=5)	(n=5)	(n=5)

EC and in the groups, which after that were inoculated with *L.monocytogenes* are given in Tables 1 and 2.

The data comparison did not show significant differences. Most excessive increase of spleen index after infecting with *L.monocytogenes* was found in subacute intoxicated animals on d6.

Leukocyte and erythrocyte numbers are given on tables 3 and 4 and the differential blood counts (Fig. 1).

A reduction of Sg was found in subacute group.

Total peritoneal cell number did not show significant differences between groups (data not shown). Comparison of the slight decrease on d6 with the differential counting lavage cells testified that it is a sequence of macrophages level change.

Dynamical follow up of SNR is given on Fig. 2. The strongest reaction is in acute intoxicated group. Rats from subacute and control group are with similar inflammatory-necrotic reactions. The differences on d4 are for the factor clearance of local processes in control group.

Persistence of *L.monocytogenes* in spleen after i.p. inoculation of $7.3.10^8$ microbe cells is given on Fig. 3 and dynamic changes of colony forming units after seeding peritoneal lavage-on Fig. 4.

Data comparison indicates that there are no significant differences in persistence of *L.monocytogenes* between groups till d3. From d3 to d6 a total infection elimination proceeds in subacute and acute animal group.

Number of CFU in supernatant is an indicator for nonphagocytated bacteria and vice versa. Existing CFU in sediment are related to the process of phagocytosis and microbicidia. In such regard it could be said that phagocytic activity in subacute intoxicated animals is strongest. This data are in good correlation with the number of peritoneal macrophages - at 6 day (Fig. 5).

Significant difference was found between the number of PFC with the Cunningham method in the groups ($p < 0.05$). The effect of single administration was stimulation and just the opposite was the effect of multiple doses.

Discussion

From obtained data it could be assumed that like other organophosphorous compounds, BY-58 manifests immunomodulating properties. This assumption follows from changes in macrophage number, infectious agent elimination, plaque forming cells (PFC). Doses applied do not cause signs of poisoning. This indicates that the changes are not from toxic stress origin.

Humoral immunity is largely affected. In the case of single dose, the effect is an increase in specific PFC on the 5th day after priming with SRBC.

Immunotoxic mechanism is not clear but this observation for OP compounds is already described (4).

podáván BY-58EC, a ve skupinách, které byly následně inokulovány *L. monocytogenes*, je uvedena v tabulkách 1 a 2.

Při porovnávání údajů nebyly zjištěny významné rozdíly. Nejvýraznější nárůst indexu sleziny byl zjištěn 6. den po infikování *L. monocytogenes* u subakutně intoxikovaných zvířat.

Počet leukocytů a erytrocytů je uveden v tabulkách 3 a 4, diferenciální počet krvinek na obr. 1.

Pokles Sg byl zjištěn v subakutní skupině zvířat.

Celkový počet peritoneálních buněk neukázal významné rozdíly mezi skupinami (údaje nejsou uvedeny). Porovnání mírného poklesu 6. den s diferenciálním počtem lavážovaných buněk potvrdilo souvislost se změnou hladiny makrofágů.

Dynamický nárůst nekrotické reakce na kůži je uveden na obr. 2. K nejvýraznější reakci dochází v akutně intoxikované skupině. Potkani ze subakutní a kontrolní skupiny mají podobné zánětlivé a nekrotické reakce. Rozdíly byly zaznamenány 4. den pro faktor clearance místních procesů v kontrolní skupině.

Perzistence *L. monocytogenes* ve slezině po intra-peritoneální inokulaci $7.3.10^8$ buněk mikrobů je uvedena na obr. 3 a dynamické změny CFU po peritoneální laváži na obr. 4.

Porovnání údajů ukazuje, že do 3. dne se neprojevují žádné významné rozdíly v perzistenci *L. monocytogenes* mezi skupinami. Od 3. dne do 6. dne dochází k úplné eliminaci infekce v subakutní a akutní skupině zvířat.

Počet CFU v supernatantu je ukazatelem nefagocytovaných bakterií a naopak. Přítomnost CFU v sedimentu má vztah k procesu fagocytózy a mikrobicidie. S ohledem na to by se mohlo říci, že fagocytární aktivita je nejsilnější v subakutně intoxikované skupině zvířat. Tyto údaje dobře korelují s počtem peritoneálních makrofágů - 6. den (obr. 5).

Byl zjištěn signifikantní rozdíl mezi počtem PFC metodou Cunninghama ve skupinách ($p < 0.05$). Jednorázové podání noxy mělo účinek stimulační a opakované podávání noxy (OF) mělo opačný efekt.

Diskuse

Ze získaných údajů by se mohlo předpokládat, že jako jiné organofosforové sloučeniny BY-58 vykazuje imunomodulační vlastnosti. Tato domněnka vyplývá ze změn v počtu makrofágů, eliminace infekčního agens a PFC. Podané dávky nevyvolávají žádné klinické příznaky intoxikace. To znamená, že změny nejsou toxického stresového původu.

Humorální imunita je značně ovlivněna. V případě jednorázové dávky je výsledkem vzestup specifického PFC 5. den po počátečním kontaktu s ovčím erytrocyty.

Imunotoxický mechanismus není jasný, ale také sledování OF sloučenin bylo již popsáno (4).

It seems that multiple low doses do not change the humoral answer against T-dependent antigen.

Skin necrotic reaction is a reflection of local defense including immune and non-specific mechanisms. Localization of necroses healing in experimental groups is retarded. It indicates that local defense is suppressed.

It is known, that *L. monocytogenes* is an intracellular microorganism, elimination of which requires involving of cellular immunity and macrophages. In this regard the data obtained do not show suppressive effect if BY-58. Even the opposite- macrophages phagocyte function and number is elevated.

The possibility for similar effects of BY-58EC in cases of human poisoning could not be excluded.

Zdá se, že opakované podání nízké dávky nemění humorální odpověď na dependentní T-závislý antigen.

Nekrotická reakce kůže je projevem místní obrany, včetně imunitních a nespecifických mechanismů. Lokální hojení nekrózy v experimentálních skupinách je zpomalené. Ukazuje se, že místní obrana je potlačena.

Je známo, že *L. monocytogenes* je intracelulárním mikroorganismem, jehož eliminace zahrnuje celulární imunitu a makrofágy. V tomto směru získané údaje neukazují na supresivní účinek při podání BY-58. Dokonce se naopak zvyšuje fagocytární funkce a počet makrofágů.

Možnost podobných účinků látky BY-58EC v případě otrav u člověka se nedá vyloučit.

References

1. DESI, I., VARGA, L., FARKAS, I.: Arch. Toxicol., Suppl. 4., 1980, s. 171-174.
2. THOMAS, I., IMAMURA, T.: Toxicology, 39, 1986, s. 1-12.
3. ESA, A., VARR, G., NEWCOMBE, D.: Clinical immunology and Immunopathology, 49, 1988, s. 41-52.
4. INSTITORIS, L. - et al.: Human and experimental Toxicology, 11, 1992, s. 11-16.
5. NIKOLAEV, A. - et al.: Pesticides and immunity, edd. Medicine UzSSR, 1988.
6. LUSTER, M. - et al.: Environmental Health Perspectives, 81, 1989, s. 157-162.
7. BROWN, L. - et al.: Cancer Research, 50, oct. 15, 1990, s. 6585-6591.
8. LITCHFIELD, J., WILCOXON, F.: J. Pharmac. Exp. Therap., 140, 1963, s. 405.
9. CUNNINGHAM, SZENBERG, A.: Immunology, 14, 1968, s. 599.

Key words: Dimethoate; Immunotoxicology; Erythrocytes; Leucocytes; Rats; Spleen index.

Klíčová slova: Dimethoat; Immunotoxikologie; Erytrocyty; Leukocyty; Krysy; Index sleziny.

Do redakce došlo 25. 5. 1993