

GENOTOKSIČNOST PESTICIDOV, VKLJUČENIH V SPREMLJANJE STANJA PITNE VODE V SLOVENIJI

GENOTOXICITY OF PESTICIDES INVOLVED IN MONITORING OF DRINKING WATER IN SLOVENIA

Tanja Fatur¹, Lucija Perharič¹, Ada Hočvar-Grom¹

Prispelo: 20.12.2005 - Sprejeto: 10.5.2006

Izvirni znanstveni članek
UDK 628.1.033

Izvleček

Pesticidi, ki se uporabljajo za zatiranje bolezni in škodljivcev rastlin, lahko vplivajo tudi na zdravje ljudi. Med potencialno škodljive učinke pesticidov na zdravje ljudi sodi tudi genotoksično delovanje – nastanek trajnih sprememb na deoksiribonukleinski kislini (DNK), t.i. mutacij. Posledica mutacije v telesni celici je lahko razvoj raka, mutacija v spolni celici pa se lahko prenese na potomce in sproži razvoj dedne bolezni ali povzroči splav. Genotoksični potencial snovi določamo s sklopom predpisanih testov. V okviru spremljanja stanja pitne vode v Sloveniji se določa prisotnost 55 pesticidov. Rezultati študij genotoksičnosti so znani za 23 od 55 pesticidov in nobeden od teh 23 nima genotoksičnega potenciala. V sklopu z zakonsko predpisanimi testi se določa tudi genotoksičnost nekaterih presnovkov pesticidov, ki nastajajo v organizmih in okolju. Ni pa znano, kako je z genotoksičnostjo pesticidov, ki so že dolgo v uporabi, kako se presnavljajo in kako delujejo na DNK v kombinaciji z drugimi pesticidi in kemikalijami v pitni vodi. Zaradi nepredvidljivih in za zdaj še nepoznatih dogajanj v organizmih in okolju je za zdravje ljudi najbolj pomembno, da je vsebnost pesticidov v pitni vodi čim nižja.

Ključne besede: DNK, genotoksičnost, mutagen, pesticidi, pitna voda

Original scientific article
UDC 628.1.033

Abstract

Pesticides used to suppress plant disease and control pest may affect human health. One of the potential adverse health effects of pesticides is their genotoxicity, which leads to permanent changes in deoxyribonucleic acid (DNA), i.e. the so-called mutations. Mutations formed in somatic cells may result in cancer, and those in germ cells can be transmitted to the offspring. They can trigger processes involved in the development of genetically transmitted disease or may cause abortion. The genotoxic potential of pesticides is evaluated by a battery of assays. Drinking water in Slovenia is monitored for the presence of 55 pesticides. The results hitherto obtained for 23 pesticides showed no genotoxic potential. Genotoxicity is also assessed for some pesticide metabolites, formed in organisms or in the environment.

Very little is known, however, about genotoxicity of pesticides used for a long time, as well as about their metabolites, possible interaction between DNA and multiple pesticides or pesticides and other chemicals in drinking water. In view of the yet unclear and unpredictable processes occurring in the organism and the environment, it is crucial to protect human health by keeping concentrations of pesticides in drinking water as low as possible.

Key words: DNA, genotoxicity, mutagen, pesticides, drinking water

¹Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije, Trubarjeva 2, 1000 Ljubljana
Kontaktne naslov:e-pošta: tanja.fatur@ivz-rs.si

Uvod

Pesticidi so snovi, ki se uporabljajo predvsem v kmetijstvu za zatiranje škodljivcev, plevelov in rastlinskih bolezni. Nekmetijski pesticidi ali biocidi pa se uporabljajo v gradbeništvu, ladjedelništvu, tekstilni industriji, industriji barv in lakov, predelavi lesa in nenazadnje v domači uporabi. Ne učinkujejo samo na tarčne organizme, ampak vplivajo tudi na zdravje ljudi in živali ter na okolje. Vpliv posameznega pesticida na zdravje ljudi je odvisen od njegovih toksikoloških lastnosti, količine pesticida v okolju, načina uporabe, sposobnosti akumulacije v okolju ali organizmih, ostankov v živilih in tudi od drugih dejavnikov. Nekateri pesticidi se ne vežejo na delce zgornjih plasti zemlje in se spirajo v podtalnico, zato so prisotni tudi v pitni vodi. V okviru spremljanja stanja pitne vode v Sloveniji določamo prisotnost in koncentracijo posameznih pesticidov in presnovkov (razgradnih produktov) v pitni vodi (1). Program določa mesta vzorčenja, pogostost vzorčenja, vzorčevalce in laboratorije, ki izvajajo preskušanje vzorcev. Glede parametrov mora biti izdelan v skladu s pogoji iz Pravilnika o pitni vodi (2). Vzorci iz posameznega sistema za oskrbo s pitno vodo morajo biti reprezentativni za pitno vodo, ki se uporablja vse leto.

Genotoksično in mutageno delovanje snovi

Genotoksično delovanje je le eden od možnih škodljivih učinkov pesticidov na zdravje ljudi. **Genotoksičnost** vključuje nastanek sprememb deoksiribonukleinske kisline (DNK) – mutacij, kot tudi poškodb DNK in vezavo snovi ali njihovih presnovnih produktov na DNK. DNK nosi zapis za vrsto in obliko celice ter njeno delovanje in funkcijo v organizmu in je v jedru vseh celic, ki sestavljajo tkiva in organe organizma. Genotoksičen dejavnik reagira z DNK ali s celičnimi mehanizmi, ki zagotavljajo natančno podvajanje celičnega genoma (3).

Mutacija je trajna sprememba strukture ali količine genskega materiala celice. Mutacija pomeni spremembo gena ali skupine genov, spremembo strukture kromosoma (strukturne kromosomske aberacije) ali števila kromosomov (numerične kromosomske aberacije) (3).

Različne snovi povzročijo nastanek mutacij, ker se vežejo neposredno na DNK ali na beljakovine, ki sodelujejo pri popravljanju nastalih poškodb DNK (v organizmu nenehno spontano nastajajo mutacije, ki se večinoma popravijo brez škode za organizem). Lahko pa mutagena snov vpliva na proteine, ki zagotavljajo pravilno podvajanje DNK in tako povzroči nastanek

mutacij. Če se veže na delitveno vreteno celice, se po celični delitvi kromosomi ne razdelijo pravilno med hčerinskima celicama, zaradi česar je število kromosomov v eni novo nastali celici premajhno, število kromosomov v drugi pa povečano (aneuploidija) (4). Posledica mutagenega delovanja snovi v telesnih celicah je lahko transformacija normalne celice v rakavo in pojav tumorjev, saj je mutacija prvi korak v procesu razvoja raka (5). Tudi proces staranja je delno posledica kopičenja mutacij v telesnih celicah. Mutacije v spolnih celicah se lahko prenesejo na potomce (6). Včasih te mutacije ne omogočajo preživetja zarodka, zato ta odmre. Lahko pa mutacija pri potomcih povzroči pojav različnih bolezni - fenilketonurijo, sivo mreno in cistično fibrozo ali mozaicizem organizma (npr. Downov sindrom). Aneuploidijo (spremenjeno število kromosomov) povezujejo s spontanimi splavi, prirojenimi napakami, transformacijo celic in rastjo tumorjev (7).

Določanje genotoksičnega delovanja pesticidov

Zaradi posledic nastanka mutacij za organizem določamo genotoksičen potencial pesticidov. Za vsak pesticid je potrebno oceniti njegov genotoksični potencial, to je, ali povzroča **mutacije genov** in **strukturne ali številčne spremembe kromosomov**. Z enim samim testom ne moremo zajeti vseh naštetih učinkov genotoksičnega delovanja snovi, zato je potrebno opraviti z zakonom določen sklop testov, s katerimi lahko zaznamo čim več potencialnih genotoksičnih učinkov (8,9). Testi za določanje genotoksičnega potenciala snovi vključujejo uporabo bakterij in kvasovk, večcelične mikroorganizme in sesalske celice *in vitro* ter glodalce *in vivo*.

Testiranje genotoksičnosti oziroma mutagenosti poteka v treh stopnjah (10).

1. stopnja: *in vitro* študije

V prvi fazi je potrebno izvesti 3 *in vitro* študije: študijo, v kateri opazujemo pojav genskih mutacij v bakterijskih celicah (Amesov test), študijo, v kateri določamo nastanek mutacij v sesalskih celicah in tretjo študijo na sesalskih celicah, s katero določimo, ali preiskovana snov povzroči strukturne ali številčne spremembe kromosomov. Da bi bilo dogajanje v testnih sistemih čim bolj podobno tistemu v človeškem organizmu, je teste genotoksičnosti potrebno izvesti v prisotnosti sistema za metabolno aktivacijo. Metabolna aktivacija je proces, ki poteka predvsem v jetrih, kjer se organizmu tuje snovi pretvorijo v tako obliko, da se čim lažje in s čim manj škodljivimi učinki izločijo iz organizma (11). V procesu metabolne razgradnje

večkrat nastajajo snovi, ki so bolj genotoksične kot izhodiščna snov. Iz tega razloga je potrebno testiranje genotoksičnosti izvesti v prisotnosti in brez metabolnega aktivatorja. Pogosto se za to uporabljajo encimi mikrosomalne frakcije iz podganjih jeter.

2. stopnja: *in vivo* študije na somatskih (telesnih) sesalskih celicah

V drugi stopnji testiranja se določa, ali snov, ki deluje genotoksično v *in vitro* sistemih, deluje genotoksično tudi v telesnih celicah poskusnih živali (*in vivo*), najpogosteje z določanjem pojava mikrojedrov v kostnem mozgu izpostavljenih glodalcev. V primeru, ko snov deluje genotoksično v *in vitro* sistemu, ni nujno, da tako deluje tudi v organizmu, kajti snov sama lahko v celico vstopa v manjšem obsegu. Presnovki snovi so morda tako veliki, da v jedro celice sploh ne pridejo in se ne vežejo na DNK, ali pa imajo tako kratko razpolovno dobo, da razpadejo, še preden bi lahko učinkovali na DNK. Nasprotno pa lahko snov, ki v *in vitro* študijah ne deluje mutageno, povzroči nastanek mutacij v somatskih celicah poskusnih živali, čeprav je to dokaj redko. Na tej stopnji testiranja se lahko določi genotoksičnost in reaktivnost DNK s testom komet. Test komet temelji na tem, da poškodovana DNK v električnem polju potuje hitreje kot nepoškodovana. Zato imajo po izpostavitvi električnemu polju jedra v agarozo vključenih in liziranih celic značilno obliko kometov, a to razliko, da pri nebesnem telesu kometu potuje jedro, torej glava komete, v primeru poškodovanih celic pa potuje t.i. rep komete (12). Poleg tega genotoksičnost *in vitro* lahko določamo tudi z označevanjem aduktov DNK z radioaktivnim fosforjem (P^{32}), z določanjem kovalentne vezave snovi na DNK, neplanirane sinteze DNK v jetrih in z določanjem kromosomskih aberacij (10).

3. stopnja: *in vivo* metode na spolnih celicah (jajčecih, spermijih)

Ta stopnja testiranja se izvaja le za snovi, ki so mutagene v somatskih celicah *in vivo* in sicer se določa, ali je snov mutagena za zarodne celice poskusnih živali, kar pomeni, da se bodo škodljivi učinki potencialno prenesli na potomce. *In vivo* določamo, ali preiskovana snov povzroča prelome kromosomov spermatogonijskih celic ali spermatocitov in deluje klastogeno, ali pa spremeni število kromosomov spermatogonijev in spermatocitov ter tako deluje anevgeno. Omenjena učinka opazujemo z analizo celic v metafazi ali z določanjem števila nastalih mikrojedrov, dominantnim letalnim testom in ostalimi metodami, s katerimi

dokazujemo poškodovanost DNK (metode opisane pri drugi stopnji testiranja) (10).

Testi za določanje genotoksičnosti morajo biti izvedeni v skladu z dobro laboratorijsko prakso in veljavnimi smernicami, če te obstajajo, ali vsaj z mednarodno priznanimi protokoli (9).

Podatki o genotoksičnosti pesticidov

V okviru spremljanja stanja pitne vode v Sloveniji se pri občasnih pregledih pitne vode ugotavlja prisotnost in določa koncentracija 55 pesticidov in njihovih presnovkov (1). Podatke o genotoksičnem delovanju teh pesticidov smo zbrali v monografijah posameznih pesticidov in poročilih Direktorata za zdravje in varstvo potrošnikov Evropske komisije (CIRCA) ter Svetovne zdravstvene organizacije (13,14). Pridobili smo podatke o 23 od 55 izbranih pesticidov in njihovih presnovkov. Podatki o genotoksičnem delovanju so poznani za naslednje aktivne snovi: alaklor, atrazin, bentazon, desetilatrazin, diazinon, dimetenamid, diuron, endosulfan, izoproturon, klorpirifos-metil, klorotoluron, linadan, linuron, malation, MCPA, metolaklor, metribuzin, monolinuron, pendimetalin, simazin, terbutilazin, trifluralin in vinklozolin (podatki so v navedeni v monografijah posameznih aktivnih snovi, ki so zbrane v viru, navedenem pod številko 13).

Za leto 2004 smo pridobili podatke o genotoksičnem delovanju 4 izmed 8 pesticidov, zaznanih v vzorcih pitne vode, in za 3 od 3 pesticidov, ki so presegli v Pravilniku za pitno vodo Republike Slovenije določeno mejno vrednost (0,10 µg/l) (2) (Tabela 1). V nasprotju z mnenjem širše javnosti niti eden od pesticidov, za katerega so dostopni podatki, ne deluje genotoksično v testnih sistemih, ki so bili uporabljeni za določanje genotoksičnega potenciala snovi. Torej ne povzročajo mutacij.

Po podatkih enega največjih proizvajalcev fitofarmaceutskih sredstev na svetu (Bayer CropScience AG) proizvajalec že v procesu razvijanja novega pripravka z opisanim sklopom testov, ki naj bi zajel vse možne posledice genotoksičnega delovanja snovi, izloči genotoksične pesticide (osebna komunikacija). Evropska komisija za zdravje in varstvo potrošnikov že obravnava predlog zakona, ki bo prepovedal registracijo snovi, ki so razvrščene kot mutagene.

Kaj pa genotoksičnost presnovnih produktov pesticidov, ki nastajajo v organizmu? Organizmi so za izločanje tujih snovi razvili različne mehanizme. Včasih ob tem nastanejo presnovki, ki so bolj škodljivi kot snov, iz katere so nastali. Tako je lahko tudi v primeru pesticidov. S študijami presnove pesticidov, ki jih opravijo na

Tabela 1. Genotoksično delovanje pesticidov prisotnih v vzorcih pitne vode, analizirane v okviru spremljanja stanja pitnih vod v Sloveniji za leto 2004, v koncentracijah, večjih od meje zaznavanja in nižjih od 0,10 µg/l in pesticidov, ki so občasno preseglji mejno vrednost 0,10 µg/l.

Table 1. Genotoxicity of pesticides present in drinking water samples at concentrations over of 0,10 µg/l, analysed in the programme of Monitoring of drinking water in Slovenia in year 2004.

PESTICID	OBČASNA PRESEŽENA MEJNA VREDNOST	GENOTOKSIČNO DELOVANJE
PESTICIDE	OCCASIONALLY ABOVE MAC VALUES	GENOTOXIC ACTIVITY
Atrazin Atrazine	Da Yes	Ne (15) No (15)
Desetilatrazin Desetilatrazine	Da Yes	Ne (15) No (15)
Heksazinon Hexazinone	Ne No	Ni podatka No data
Klorotoluen Chlorotoluene	Ne No	Ni podatka No data
Dimetenamid Dimetenamide	Da Yes	Ne (16) No (16)
Napropamid Napropamide	Ne No	Ni podatka No data
Metolaklor Metolachlor	Ne No	Ne (17) No (17)
2,6-diklorobenzamide 2,6-dichlorobenzamide	Ne No	Ni podatka No data

poskusnih živalih, določijo, kateri presnovki nastajajo in v kakšni meri. Če za katerega od njih na podlagi kemijske strukture sodijo, da deluje genotoksično, je potrebno tudi zanj izdelati študije genotoksičnosti, da izključijo morebitni mutagi učinek presnovka.

Tudi v okolju nastajajo razgradni produkti pesticidov, ki niso nujno enaki kot pri živih bitjih. Če ti presnovki v podtalnici presegajo vrednost 0,10 mg/l vode, je treba oceniti njihov toksikološki potencial, kar vključuje tudi testiranje genotoksičnosti (18).

Podatki o genotoksičnem delovanju, presnovkih in rakotvornosti obstajajo predvsem za novejšje pesticide. Direktiva Evropske komisije 91/414/EGS, izdana leta 1991, določa toksikološke študije aktivne snovi, ki jih proizvajalci pesticidnega pripravka morajo predložiti pri vlogi za registracijo pripravka (19). Za pesticide, ki so že dolgo v uporabi, je zelo težko pridobiti rezultate toksikoloških študij. V nekaterih primerih te sploh niso

bile izvedene, če pa so bile, pogoji testiranja niso znani. Znano je tudi, da lahko kombinacija dveh snovi, ki sami sicer ne delujeta mutageno, povzroči nastanek mutacij. O skupnem genotoksičnem delovanju kombinacij različnih pesticidov ali pesticidov in drugih snovi pa ni podatkov. V pitni vodi se lahko poleg pesticidov pojavljajo tudi težke kovine, železo in policiklični aromatski ogjikovodiki. Skupnega učinka teh kemikalij na DNK ne moremo predvideti (12). Menimo, da bi bilo v prihodnje smiselno testirati tudi skupno delovanje več pesticidov na DNK.

Zaključek

Za nekatere pesticide, katerih prisotnost določamo v okviru spremljanja stanja pitne vode v Sloveniji in za večinske produkte njihove razgradnje v okolju in živalih

je znano, da ne delujejo genotoksično v predpisanem sklopu testov. Ni pa popolnoma znano, kako na DNK vplivajo kombinacije različnih pesticidov oz. njihovi razgradni produkti. Tudi o skupnem genotoksičnem delovanju pesticidov in kemikalij, prisotnih v pitni vodi, ni znano skoraj nič. In ravno zaradi nepredvidljivih in zaenkrat še nepoznanih dogajanj v organizmih in okolju, si je potrebno prizadevati za čim nižje vsebnosti pesticidov v pitni vodi, ker jo uživamo dan za dnevno, vse življenje.

Literatura

- Monitoring pitne vode 2004. Poročilo o pitni vodi v Republiki Sloveniji. Center za zdravstveno ekologijo, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije, Ljubljana, 2005.
- Uradni list Republike Slovenije 19/04. Pravilnik o pitni vodi.
- Tweats DJ. Mutagenicity. In Ballantyne B, Marrs T, Turner P, eds. *General and Applied Toxicology*. New York: Stockton Press, 1995: 807-872.
- Palus J, Rydzynski K, Dziubaltowska E, Wyszynska K, Natarajan AT, Nilsson R. Genotoxic effects of occupational exposure to lead and cadmium. *Mut Res* 2003; 540: 19-28.
- Tannock IF, Hill RP. *The Basic Science of Oncology*. New York: Pergamon Press USA, 1999, 32-35.
- Timbrell JA. *Introduction to Toxicology*. London: Taylor and Francis Ltd, 1992: 52-53.
- Güerci A, Seoane A, Dulout FN. Aneugenic effects of some metal compounds assessed by chromosome counting in MRC-5 human cells. *Mut Res* 2000; 469: 35-40.
- Uradni list Republike Slovenije 31/02. Pravilnik o zahtevani dokumentaciji za registracijo in oceno fitofarmacevtskih sredstev.
- Evropska smernica 67/548/EEC, Priloga 5: Standardne priekusne metode za ugotavljanje fizikalno-kemijskih, toksikoloških in ekotoksikoloških lastnosti snovi in pripravkov.
- Guidance on a Strategy for Testing of Chemicals for Mutagenicity. Committee on mutagenicity of chemicals in food, consumer products and the environment (COM), Chair Jim M Parry. 2000. Pridobljeno 5.4.2005 s spletne strani: http://www.dh.gov.uk/PublicationsAndStatistics/Publications/PublicationsPolicyAndGuidance/PublicationsPolicyAndGuidanceArticle/fs/en?CONTENT_ID=4005790&chk=09hwJA.
- Mersch-Sundermann V, Knasmüller S, Wu XJ, Darroudi F, Kassie F. Use of a human derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and co-genotoxic agents. *Toxicology* 2004; 198: 329-340.
- Fatur T. Genotoksično in kogenotoksično delovanje nizkih koncentracij kadmija in njegov vpliv na metabolno aktivacijo promotagenov pri celicah HepG2. Doktorska dizertacija. Ljubljana, Medicinska fakulteta, 2005.
- Communication and Information Resource Centre Administrator (CIRCA), Health and Consumer Protection, Plant Protection Products and their residues. Pridobljeno 1-14.9.2005 s spletne strani: <https://forum.europa.int>.
- World Health Organization, Drinking Water Quality, Chemical Fact Sheets. Pridobljeno 10.10.2005 s spletne strani: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwg/en/gdwq3_12.pdf.
- EC Monograph for inclusion of atrazin to Annex 1 to Council Directive 91/414/EEC (Nemčija, 1998).
- EC Monograph for inclusion of dimethenamid-P to Annex 1 to Council Directive 91/414/EEC (Nemčija, 2000).
- EC Monograph for inclusion of S-metolachlor to Annex 1 to Council Directive 91/414/EEC (Belgija, 2001).
- Guidance document on the assessment of the relevance of metabolites in ground water of substances regulated under council directive 91/414/EEC (Draft). European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General. 2003.
- Direktiva sveta z dne 15. julija 1991 o dajanju fitofarmacevtskih sredstev v promet (91/414/EGS). Uradni list Evropske unije, L 230/1.