

5. VAJA: Toksikologija

1. Opredelitev toksikologije

Toksikologija (gr.: toksikon - pomeni strup, ki ga uporabimo na puščici) je veda, ki preučuje škodljive učinke kemikalij na biološke sisteme. Začetki toksikologije so povezani z uporabo naravnih strupov ali toksinov že v času pred antiko. Izraz strup predstavlja kvantitativni koncept, ki ga je postavil Paracelsus (1493-1541) z izjavo: "Vse je strup in nič ni neškodljivo, samo odmerek loči zdravilo od strupa." S to izjavo je postavil tudi temelj toksikologije kot znanstvene vede. Strup je lahko katerakoli snov, ki škodljivo vpliva na organizem. Za strupene snovi, ki so danes na tržišču in imajo oznako mrtvaške glave na embalaži, je postavljena mejna vrednost oz. kriterij, ki jih opredeljuje. Če gre za zaužitje, mora snov, ki je označena kot strup, povzročiti smrt pri polovici poskusnih živali pri odmerku ≤ 300 mg/kg telesne teže.

Zastrupitev ali intoksikacija je lahko nenamerna (akcidentna) ali namerna (suicidna, homocidna oz. kriminalna) zastrupitev ne glede na vrsto strupa. Mnoge zastrupitve potekajo dokaj tipično v obliki t.i. toksikoloških sindromov (toksindromov) po Mofensenu (tabela 1). Blage in zelo hude zastrupitve lahko potekajo atipično in pomenijo resen diagnostičen problem. Nekatero zastrupitve pa lahko skoraj popolnoma posnemajo določena internistična in nevrološka obolenja oziroma njihove bolezenske simptome in znake (akutna jetrna odpoved, komatozna stanja, pljučni edem, ipd.).

Pri zdravilih pa moramo ločiti predvsem med pojmom predoziranje in škodljivi neželeni učinki zdravil (NUZ). Predoziranje je nenamerna, zmotna prekoračitev terapevtskega odmerka zdravil, ki se kaže s toksikološko simptomatiko. NUZ so po opredelitvi Svetovne zdravstvene organizacije tisti škodljivi učinki zdravil, ki so bila dana lege artis – t.j.: 1) v pravem odmerku; 2) na pravilen način; 3) upoštevajoč pravo indikacijo ter vse kontraindikacije. S toksikologijo pa se pri zdravilih srečamo tudi v neklinični fazi razvoja novega zdravila.

Toksikologija je kot multidisciplinarna veda razdeljena na različna področja. Klinična toksikologija obravnava zastrupitve pri ljudeh. Pri zastrupitvah na delovnem mestu se vključi industrijska oziroma poklicna toksikologija. Ta se ukvarja tudi s kroničnimi učinki, kot je rakotvornost. Če gre za izpostavljenost človeka preko okolja (voda, zrak, tla) snovem kot so npr. pesticidi, pa gre za okoljsko toksikologijo. Druga delitev toksikologije je na eksperimentalno in epidemiološko, ki se med seboj dopolnjujeta. Pri eksperimentalni toksikologiji, ki jo izvajamo na poskusnih živalih, so jasno določeni parametri kot so preskusna in kontrolna skupina, pot izpostavljenosti (zaužitje, vdihavanje, absorpcija preko kože) in odmerek. Po drugi strani pa je lahko med človekom in preskusnimi živalmi bistvena razlika v fiziologiji, anatomiji, farmakokinetiki in farmakodinamiki, kar otežuje prenos rezultatov iz živali na človeka. Zato si pomagamo z varnostnimi faktorji. Epidemiologije pa preučuje samega človeka, razmere izpostavljenosti so sicer slabo definirane, a odgovarjajo resničnemu scenariju. Obstajajo pa še razne druga področja in razdelitev toksikologije (npr. toksikologija tarčnih organov, molekularna in celična toksikologija, rakotvornost, ekotoksikologija, regulatorna toksikologija itd.).

Tabela 1: Nekateri toksindromi (povzeto po seminarju iz Klinične toksikologije; CZ KCLJ)

TOKSIČNA SNOV	SIMPTOMI IN ZNAKI
ANTIHOOLINERGIKI (atropin in derivati, triciklični antidepresivi, fenotiazini, antihistaminiki)	tahikardija, midriaza, rdeča in suha koža, hipertermija, delirij, psihoza, hipertenzija/hipotenzija, konvulzije, koma
SIMPATIKOMIMETIKI	tahikardija, hipertenzija, znojenje, hipertermija, hiperaktivnost, midriaza, tremor, delirij, konvulzije, psihoza
OPIOIDI	mioza, bradikardija, hipotenzija, bradipneja, hipotermija, eforija, hiporefleksija, hipoventilacija, koma
ORGANOFOSFORNI INSEKTICIDI	mioza, motnje vida, hipersalivacija, hiperlakrimacija, hiperbronhosekrecija, bronhospazem, znojenje, abdominalni krči, driska, polakisurija, bradikardija/tahikardija, tahipneja, zmedenost, motnje zavesti do kome, acidoza
BARBITURATI, SEDATIVI	hipotenzija, bradipneja, apneja, zmedenost, motnje zavesti do kome, midriaza/mioza, nistagmus, hiporefleksija, kožne bulozne spremembe
SALICILATI	hiperventilacija, bruhanje, hipertermija, letargija, tinitus, delirij, sopor, koma, krvavitev, acidoza

2. Izpostavljenosti

Kemikalija ima škodljiv učinek če, če doseže ciljno mesto v ustrezni koncentraciji in je trajanje izpostavljenosti ustrezno dolgo.

Izpostavljenost glede na trajanje in frekvenco:

- enkratna: akutna
- ponavljajoča se: subakutna subkronična, kronična.

Za eno in isto kemikalijo je lahko toksičen učinek po enkratni izpostavljenosti različen od toksičnega učinka po ponavljajoči se izpostavljenosti (kronična izpostavljenosti majhnemu odmerku). Primer je benzen: enkratna izpostavljenost – depresija CŽŠ; ponavljajoča se izpostavljenosti - levkemija. Pri današnjih varnostnih standardih je največja pozornost namenjena kroničnim učinkom.

Tabela 2: Trajanje in frekvenca izpostavljenosti.

Izpostavljenost / FREKVENCA	TRAJANJE poskusne živali	TRAJANJE človek (slabše definirano)*
<u>akutna</u> / ENKRATEN ODMEREK	do 24 ur	enkratni vnos ali epizoda
<u>subakutna</u> / PONAVLJAJOČI SE ODMEREK	do 1 meseca	
<u>subkronična</u> / PONAVLJAJOČI SE ODMEREK	nekaj mesecev	nekaj tednov – nekaj mesecev
<u>kronična</u> / PONAVLJAJOČI SE ODMEREK	celo življenjsko obdobje	nekaj mesecev – nekaj let

*nenamerna izpostavljenost človeka preko okolja, kot potrošnika in na delovnem mestu

2.1 Biomarkerji v toksikologiji

Pri oceni izpostavljenosti kemikalijam in oceni toksičnih učinkov si pomagamo z različnimi biomarkerji. Uporabo biomarkerjev pri oceni izpostavljenosti imenujemo biomonitoring. Ločimo tri osnovne skupine biomarkerjev:

- markerji izpostavljenosti
je sama spojina ali njen metabolit, ki ga merimo v telesu (kri) ali po njegovem izločanju iz telesa (urin, solze,...). Npr. svinec v krvi.
- markerji toksičnega odziva
kvantitativna sprememba v telesu iz katere sklepamo na izpostavljenost in na učinek na zdravje. Npr. neplodnost pri moških pri izpostavljenosti anorganskemu svincu.
- markerji občutljivosti
so pokazatelji naravnih značilnosti organizma zaradi katerih je odziv na izpostavljenost kemikaliji bolj občutljiv. Pomagajo določiti katere značilnosti so bolj občutljive in določiti čas, ko je izpostavljenost najbolj škodljiva. Pri astmatikih moč izdiha pomaga oceniti občutljivost posameznika na brevetoksin (toksična snov, ki nastane med cvetenjem morske alge *Karenia brevis*).

3. Odnos med odmerkom in toksičnim učinkom

Kadar je toksičen učinek odvisen od odmerka lahko meritve izvajamo na dva načina:

- obravnavamo celotno populacijo (odgovor vse ali nič)
- obravnavamo odziv pri posamezniku (postopen odziv)

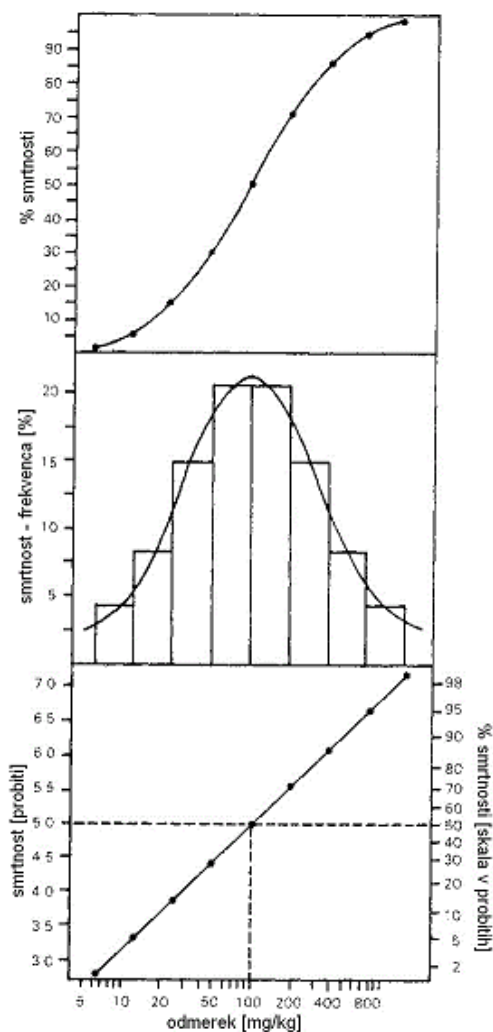
Kriteriji za toksičen učinek so različni:

- Letalnost – velika variabilnost, ker je končni učinek odvisen od mnogih procesov. Preskusi na živalih, ki vključujejo letalnost kot kriterij, se ukinjajo.
- Biokemični, fiziološki in patološki učinki kot kriteriji za toksičnost so bolj natančni.

3.1 Odgovor vse ali nič

- **LD₅₀** (angl.: lethal dose)

Je parameter, ki ga uporabljamo za akutno toksičnost (slika 1). LD₅₀ [mg/kg telesne teže] je odmerek, ki povzroči smrt pri 50 % izpostavljenih osebkov. LC₅₀ uporabljamo pri vdihavanju. Testiranje na živalih za določanje LD₅₀ pri zaužitju je ukinjeno.



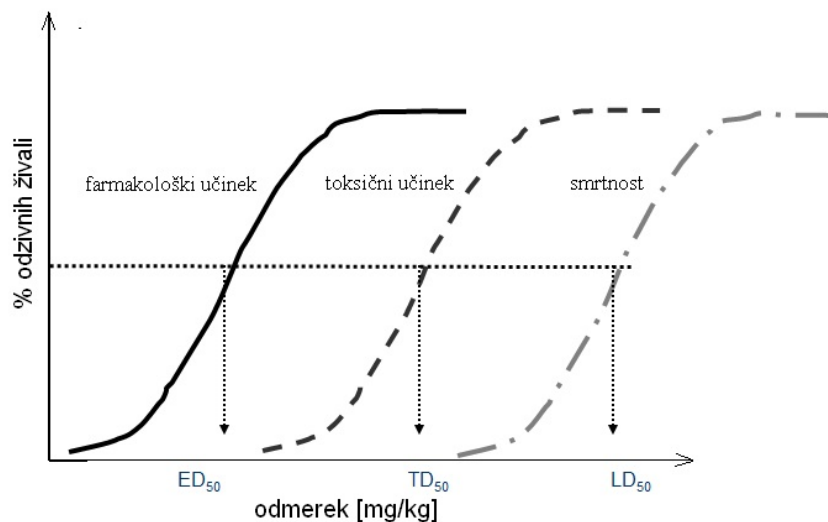
Slika 1: Grafični prikaz LD₅₀. Na abscisni osi je za odmerek logaritemska skala. Na ordinatni osi je smrtnost izražena na tri načine: pri zgornjem grafu je smrtnost v procentih, pri srednjem grafu je frekvenca smrtnosti in pri spodnjem grafu je smrtnost v probitih.

- **TD₅₀ (angl.: toxic dose)**

TD₅₀ [mg/kg telesne teže] je odmerek, ki povzroči toksičen odziv pri 50 % izpostavljenih osebkov. Toksični odziv moramo opredeliti in ne sme biti smrtnost (letalnost).

- **TI (angl.: therapeutic index) = LD₅₀ /ED₅₀ (TD₅₀ /ED₅₀)**

V najširšem smislu terapevtski indeks predstavlja razmerje med odmerkom, ki izzove smrt in odmerkom, ki izzove zaželen farmakološki učinek. Pri sedanjih varnostnih kriterijih je uporaben predvsem pri predoziranju.



Slika 2: Graf predstavlja primerjavo med odnosom vse ali nič za farmakološki učinek (ED; npr. anestezija), toksični učinek (TD; npr. poškodba jeter) in letalni odmerek (LD).

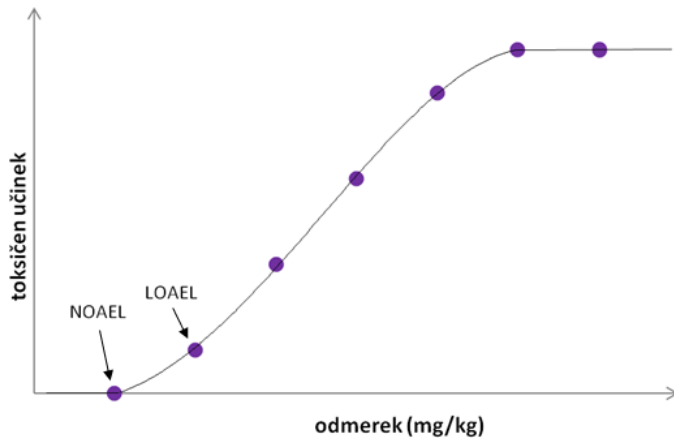
3.2 Postopen odgovor

NO(A)EL (angl.: No Observed (Adverse) Effect Level)

Je parameter ki ga uporabljamo pri ponavljajočih se odmerkih. NO(A)EL [mg/kg telesne teže/dan] je najvišji testni odmerek pri kateri nismo opazili nobenih (negativnih) učinkov.

LO(A)EL (angl.: Low Observed (Adverse) Effect Level)

Je parameter ki ga uporabljamo pri ponavljajočih se odmerkih, če ni na voljo NOAEL. LO(A)EL [mg/kg telesne teže/dan] je najnižji testni odmerek pri kateri smo opazili (negativen) učinek.



Slika 3: Grafični prikaz odnosa med koncentracijo kemikalije in toksičnim učinkom z NOAEL in LOAEL.

4. Pesticidi

Pesticid je vsaka spojina ali zmes različnih spojin, ki je namenjena preprečevanju, uničevanju, odvracanju ali zmanjšanju škode, ki jo povzroča neželeni organizem. Uporabnik nikoli ne prihaja v stik s čistimi aktivnimi snovmi, ampak z različno formuliranimi pripravki, ki se jih prodaja pod komercialnim imenom. Pripravki so sestavljeni iz aktivne snovi (ene ali več), pomožnih snovi (polnila, stabilizatorji, ...) in nečistoč. Včasih je lahko nečistoča ali pomožna snov bolj toksična kot aktivna snov. V zvezi s pesticidi želimo doseči selektivno toksičnost. To pomeni, da mora biti pesticid toksičen za ciljni skupino organizmov in netoksičen za človeka. Torej morajo izkoristiti neko posebno metabolno, biološko (rodenticidi: podgane ne morejo bruhati) ali drugo lastnost ciljnega organizma. Absolutna selektivnost pa je izredno redka. Pesticide delimo glede na ciljno skupino organizmov, ki jih uničujejo (tabele 3).

Tabela 3: Razdelitev pesticidov glede na ciljno skupino, ki jo uničujejo

<i>Ciljna skupina organizmov</i>	<i>Skupina pesticidov</i>
Glive	fungicidi
Žuželke	insekticidi
Pršice	akaracidi
Pleveli	herbicidi
Drevje	arbocidi
Nematodi	nematocidi
Polži	limacidi
Glodalci	rodenticidi

Glede na področje uporabe delimo pesticide na *fitofarmaceutska sredstva* (uporaba v kmetijstvu za zaščito rastlin, ki jih gojimo za prehrano, krmo ali v okrasne namene) in *biocide* (uporaba v zaprtih prostorih; npr. razkužila, sredstva za konzerviranje).

4.1 Mehanizem delovanja in znaki zastrupitve ter načela zdravljenja pri posameznih skupinah pesticidov

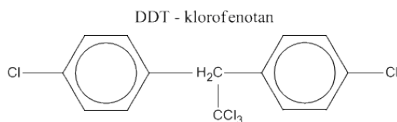
4.1.1 INSEKTICIDI

Insekticidi so *nevrotoksični*. Osnovni mehanizem delovanja je enak za sesalce in žuželke. Na CZS delujejo ekscitatorno.

4.1.1.1 ORGANOKLORNI INSEKTICIDI

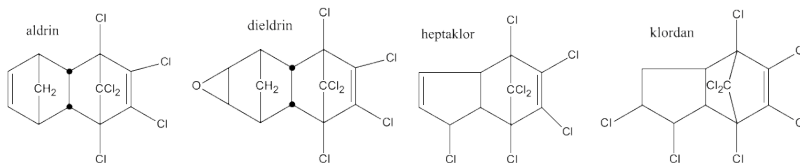
Organoklorni insekticidi so kemijsko klorirani ogljikovodiki, kovalentno imajo vezanega enega ali več klorovih atomov na alkilnem ali cikličnem ogrodju ogljikovodikov. Razdeljeni so v tri skupine:

- KLOORIRANI DERIVATI ETANA (npr.: DDT)



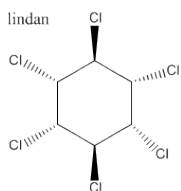
Slika 4: Strukturna formula DDT-ja

- CIKLODIENI (npr.: aldrin, dieldrin, heptaklor, endrin)



Slika 5: Strukturne formule nekaterih ciklodienov

- HEKSAKLOOROCIKLOHEKSANI (npr.: lindan)



Slika 6: Strukturna formula lindana

V štiridesetih letih prejšnjega stoletja so DDT široko uporabljali za zatiranje malarije v Afriki in na drugih epidemičnih območjih, saj je bil cenovno najbolj ugoden in učinkovit sintetični insekticid tistega časa. Danes je uporaba organoklornih insekticidov močno omejena. Z Stockholmsko konvencijo iz leta 2004 je omejena uporaba DDT-ja ter prepovedana aldrina, dieldrina, heptaklora, mireksa, klordekona in klordana. Lindan je pri nas prepovedan z Rotterdamsko konvencijo, vendar je v nekaterih državah še dovoljen, a je uporaba omejena (npr. ZDA).

Mehanizem delovanja: mehanizem delovanje DDT-ja na CZS ni povsem poznan. Je modulator Na⁺ kanalov na membrani aksona, in sicer prepreči njihovo zaprtje. S tem podaljša

depolarizacijo in tako omogoči proženje zaporednih akcijskih potencialov na enem aksonu po enem samem dražljaju, kar vodi v tremor (T-sindrom). Ostali mehanizmi so blokada K^+ kanalov, zaviranje Na^+/K^+ -ATP-aze in sproščanja acetiholina (ACh). Ciklodieni in heksaklorocikloheksani so kompetitivni antagonisti ionotropnih GABA receptorjev, zmanjša se prepustnost Cl^- kanalov, sledi le delna repolarizacija. Zmanjšajo postsinaptično inhibitorno delovanje GABA. Poleg tega zavirajo Ca^{2+}/Mg^{2+} -ATP-azo in tako zvišajo koncentracijo Ca^{2+} v celici posledica česar je sproščanje ACh.

Farmakokinetika: organoklorni insekticidi so lipidofilni. Dobro se absorbirajo pri zaužitju, v stiku s kožo in pri vdihavanju, prehajajo tudi skozi posteljico. Majhni odmerki DDT-ja, kloriranih ciklodienov in lindana inducirajo citohrom P450 v hepatocitih in s tem vplivajo na metabolizem steroidnih hormonov (predvsem estrogena) in zdravil. Metabolizem je počasen. Izločijo se predvsem s fecesom. V telesu se ob daljši izpostavljenosti kopičijo v maščobnem tkivu, CŽS in materinem mleku.

Akutna toksičnost: ciklodieni in lindan lahko pri akutnih zastrupitvah pri človeku povzročijo smrt. Po strupenost pri zaužitju pri poskusnih živalih so si zelo različni:

- Strupena pri zaužitju: lindan ($LD_{50} = 88$ mg/kg); DDT ($LD_{50} = 250$ mg/kg).
- Ni strupen pri zaužitju: metoksiklor ($LD_{50} = 6000$ mg/kg).

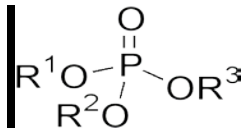
Simptomi in znaki zastrupitve: prvi simptomi in znaki se pojavijo od 45 min do več ur po zaužitju. Kažejo se kot nevrološke motnje: pareze obraznih mišic in jezika, omotičnost, ataksija, tremor in v resnih primerih napredujejo v stupor, komo ter konvulzije. Lahko nastopijo vedenjske spremembe kot je zaskrbljenost in razdražljivost. Izpostavljenost velikim količinam DDT-ja vodi v motnje srčnega ritma, respiratorno odpoved in smrt. Zastrupitev s ciklodieni se kaže kot nenadni epileptiformni napad.

Zdravljenje: zdravljenje je simptomatsko, predvsem dajemo kisik, konvulzije pa kontroliramo z benzodiazepini. Reabsorpcijo iz GIT zmanjšujemo s holestiraminom in aktivnim ogljem. Protistrupa ni.

Kronična toksičnost: zaradi kopičenja v telesu so kronični učinki pogostejši kot akutni. Tarčni organi so živčevje (npr. polinevritis), kri (npr. anemija, agranulocitoza) in kardiovaskularni sistem (npr. tahikardija preko delovanja na CŽS, sklerotične in distrofične poškodbe miokarda). Njihovi predstavniki so na listi motilcev hormonskega ravnotežja. Metoksiklor zmanjša število spermijev. Po IARC-ovi lestvici (International Agency of Research on Cancer) spadajo lindan, DDT, klordan, heptaklor v skupino 2b (možni kancerogeni za človeka). Dokazi, da DDT povzroča neoplazije limfatičnega sistema, CŽS, pljuč, jeter in dojke pri človeku so zaenkrat nezadostni ali pa so nekonsistentni.

4.1.1.2 ORGANOFOSFORNI INSEKTICIDI

Prvo organofosforno spojine so razvili v Nemčiji med 2. svetovno vojno, in sicer je bil to tetraetil pirofosfat (TEPP), ki je zamenjal insekticid nikotin. Kmalu zatem so sintetizirali dimefoks, sarin, tabun in paration.



Slika 7: Osnovna strukturna formula organofosfornih pesticidov

Mehanizem delovanja: organofosfati ireverzibilno zavirajo acetilholinesterazo (AChE) in tako povzročijo kopičenje ACh, ki je agonist muskarinskih in nikotinske receptorjev. Po začetni stimulaciji pride do izčrpanja holinergične sinapse. GABA in dopamin kot inhibitorna prenašalca v CŽS omogočata začasno kompenzacijo ekscitatornih učinkov ACh. Glavna mesta delovanja ACh so: postganglijske sinapse parasimpatika, motorične ploščice skeletnih mišic, avtonomni gangliji ter CŽS.

Farmakokinetika: organofosfati so lipidotopni, dobro se absorbirajo pri zaužitju, v stiku s kožo in pri vdihavanju. Metabolizem poteka s pomočjo citohroma P450. Nekateri metaboliti so bolj toksični kot izhodna snov. Večinoma se izločajo v urinu kot produkti hidrolize.

Akutna toksičnost: večinoma so predvsem akutno toksični. Po strupenosti pri zaužitju jih delimo na:

- *malo toksične:* bromofos, malation ($LD_{50} > 1000 \text{ mg/kg}$)
- *zmerno toksične:* diazinon, kvinalfos, diklorvos, dimetoat ($LD_{50} = 50 - 1000 \text{ mg/kg}$)
- *zelo toksične:* paration, (bojni strupi: soman, sarin, VX) ($LD_{50} < 50 \text{ mg/kg}$)

Toksično lahko dodatno deluje tudi organsko topilo (toluen, ksilen), v katerem je raztopljena aktivna snov.

Simptomi in znaki zastrupitve: razvijejo se nekaj ur po akutni izpostavljenosti. Pri zaužitju velikih količin se lahko pojavijo že po 5 min. Včasih začetnim neizrazitim simptomom sledi holinergična kriza šele po 48 urah. Nevrološki simptomi so odvisni od ravnotežja med učinki na muskarinskih in nikotinskih receptorjih ter od vpletenosti CŽS. Čeprav je mioza najbolj stalen znak, pa njena odsotnost ne izključuje zastrupitve z organofosfati.

- **Akutni:** spodbujanje muskarinskih receptorjev se kaže kot slabost, bruhanje, driska, znojenje, slinjenje, čezmerno izločanje bronhialne sluzi, bronhospazem, mioza, bradikardija in abdominalne kolike. Za znake prekomernega delovanja holinergičnega sistema uporabljamo kratico DUMBELS (angl.: Diarrhea, Urination, Miosis, Bronchospasm, Emesis, Lacrimation, Salivation). Spodbujanje nikotinskih receptorjev povzroča mišične fascikulacije, tremor, v hujših primerih tudi paralizo mišic. Klinično je pomembna paraliza dihalnih mišic, ki ob bronhialni hipersekreciji in bronhospazmu vodi v hudo dihalno stisko. Spodbujanje receptorjev CŽS povzroča sprva agitacijo in konvulzije, v hujših primerih komo in zastoj dihanja ter srca.

- **Subakutni:** ko znaki akutne zastrupitve že izzvenijo, se lahko pojavijo znaki periferne polinevropatije, ki pa niso posledica zaviranja AChE, ampak nevrotoksične esterase. Sprva je zanjo značilna mišična šibkost, zmanjšanje kitnih refleksov, občutljivost na dotik, ki se kasneje izrazi preko flacidne paralize s spastično paralizo s hiperaktivnimi kitnimi refleksi in atrofijo mišic. Okrevanje po več letih ni vedno popolno.

Diagnoza: zastrupitev potrdimo z anamnestičnimi podatki in razmeroma tipično klinično sliko. Večinoma imajo značilen grenkoben vonj. Najzanesljivejši dokaz zastrupitve je znižanje aktivnosti AChE v eritrocitih za več kot 25 %. V eritrocitih in živčnem sistemu je encim enak. Obstaja tudi plazemska (pseudo) holinesteraza, za katero pa je značilno veliko nihanje tekom dneva, aktivnost se hitro zmanjša in hitro obnovi in je zato manj primerna za dokazovanje zastrupitve.

Zdravljenje: Zastrupljenca moramo kar se da hitro umakniti iz kontaminiranega prostora. Nato poskrbimo za odstranitev obleke in spiranje strupa s površine telesa. Pomembno je vzdrževanje prostih dihalnih poti in podpora dihanja s kisikom ter nadzorovanje ostalih vitalnih funkcij. Protistrup je *atropin*, ki je antagonist muskarinskih receptorjev. Na nivoju živčnomišičnega stika, kjer je nikotinski receptor, atropin ne ublaži paralize. Ravno tako ne prepreči dihalne odpovedi. Za reaktivacijo AChE dajemo *pralidoksim* in *obidoksim*. Učinkujeta na mišično šibkost, fascikulacije in spremembe zavesti. Zdravljenje z njima pa lahko traja več dni, zlasti pri zastrupitvi z bolj lipofilnimi oblikami organofosfatov.

4.1.1.3 KARBAMATNI INSEKTICIDI

Mehanizem delovanja: osnovno delovanje je enako kot pri organofosfatih, le da karbamati kratkotrajno in reverzibilno zavirajo AChE.

Primeri karbamatnih insekticidov: aldikarb, karbaril, primikarb, propoksur ipd.

Farmakokinetika: krvnomožgansko pregrado slabo prehajajo in slabše se absorbirajo skozi kožo kot organofosfati.

Simptomi in znaki zastrupitve: klinična slika je podobna blažji zastrupitvi z organofosfati, pojavi se že 30 minut do 2 uri po zaužitju. Sprva nekoliko znižana aktivnost plazemske AChE se hitro normalizira, medtem ko je pri zastrupitvi z organofosfornimi insekticidi lahko znižana več dni ali celo tednov. Znaki zastrupitve pa so lahko kljub normalni aktivnosti AChE še prisotni.

Zdravljenje: zastrupitev zdravimo z *atropinom*.

4.1.1.4 PIRETRINI IN PIRETROIDI

Piretrini so naravni insekticidi, pridobljeni iz krizantem (*Chrysanthemum cinerariaefolium*). Zaradi njihove slabe obstojnosti in široke potrošnje se že nekaj časa uporabljajo predvsem sintetični analogi imenovani piretroidi, ki so bolj obstojni, vendar tudi bolj strupeni.

Uporabljajo se v obliki aerosolov v razpršilcih, zato je tudi pot zastrupitve najpogosteje z vdihavanjem. So pogosta komponenta "hišnih" insekticidov (biocidi). Zamenjali so organofosforne insekticide, ker so manj akutno toksični.

Mehanizem delovanja: piretroidi tipa I delujejo enako kot DDT. So modulator Na^+ kanalov na membrani aksona, in sicer prepreči njihovo zaprtje. S tem podaljšajo depolarizacijo in tako omogoči proženje zaporednih akcijskih potencialov na enem aksonu po enem samem dražljaju, kar vodi v tremor (T-sindrom). Piretroidi tipa II (imajo ciano skupino) so tudi modulatorji Na^+ kanalov; v primerjavi s tipom I, še bolj podaljšajo njihovo odprtost. S tem omogočijo dolgotrajno depolarizacijo z blokado prevajanja dražljajev kar vodi v horeoatetozo. Pri visokih koncentracijah naj bi delovali tudi kot antagonisti GABA receptorjev.

Farmakokinetika: absorbirajo se pri zaužitju, z vdihavanjem prahu in razpršene meglice, v manjši meri tudi v stiku s kožo. Porazdelijo se po vsem telesu vključno z možgani. Izločijo se z žolčem in urinom.

Selektivna toksičnost: piretroidi so mnogo bolj toksični za insekte kot za sesalce zaradi razlik v natrijevih kanalčkih med vrstami. Poleg tega so sesalci zmožni hitre biotransformacije piretroidov z estersko hidrolizo in/ali hidroksilacijo. Za razliko od sesalcev so vodni organizmi izrazito občutljivi na piretrine.

Toksičnost: Piretrini in piretroidi se smatrajo za zmerno toksične. Piretrini so izraziti alergeni v primerjavi z drugimi insekticidi. Pri astmatikih in drugih atopikih lahko povzročijo preobčutljivostno reakcijo. Ta se pri vdihavanju piretrinov lahko kaže kot lokalno draženje kože, oči in sluznic zgornjih dihal, pa tudi spodnjih dihal: kašljanje, dispneja, bolečina v prsih, napad podoben astmatičnemu. Obstaja navzkrižna reaktivnost pri ljudeh, ki so alergični na žvrkljo (plevel, ki raste predvsem v vzhodni in južni Sloveniji; žvrklje in krizanteme so v isti botanični skupini). Za razliko od piretrinov, piretroidi ne povzročajo alergijskih reakcij.

Simptomi in znaki zastrupitve: po zaužitju večje količine piretroidov se pojavi: slabost, bruhanje, driske, parestezije, glavobol in omotica, v hujših primerih pa zaradi prizadetosti živčnega sistema (vpliv na GABA receptorje) tudi nemir, tremor, ataksija, konvulzije, nezavest in depresija dihanja.

Zdravljenje: zdravljenje je simptomatsko. V primeru stika s kožo in sluznicami se opravi lokalna dekontaminacija. Pri zaužitju uporabimo aktivno oglje in odvajalo. Želodec izpiramo le v primeru zaužitja večje količine koncentriranega pripravka.

Kronična toksičnost: pri kronični izpostavljenosti piretrinom se lahko pojavi preobčutljivostni pnevmonitis. Nekateri piretroidi so na listi motilcev hormonskega ravnotežja, vendar njihove učinke še preučujejo. Ravno tako pa je sporna nevrotoksičnost nekaterih predstavnikov.

4.1.2 HERBICIDI

Selektivni herbicidi delujejo na določeno rastlinsko vrsto in so za ostale relativno neškodljivi, uporabljajo se predvsem v kmetijstvu in na domačih vrtov. Neselektivni herbicidi so v

uporabi za čiščenje industrijskih območij, železniških prog ipd. Kontaktni herbicidi uničijo le tisti del rastline na katerega ga nanese, medtem ko se sistemski absorbirajo preko korenin ali listov in se po žilnem sistemu razporedijo po rastlini. Glede na mesto delovanja na rastlini ločimo več skupin: 1) inhibitorji sinteze aminokislin; 2) inhibitorji sinteze lipidov, 3) regulatorje rasti; 4) inhibitorji fotosinteze; 5) inhibitorji pigmentov; itd. Herbicidi so za človeka različno toksični. V strokovni javnosti skrb zaradi toksičnosti herbicidov narašča zaradi vse več primerov pronicanja teh spojin v podtalnico.

4.1.2.1 DERIVATI FENOKSIOCETNE KISLINE

- 2, 4- D (2, 4- diklorofenoksiocetna kislina) je bil eden prvih znanih herbicidov in je v širši uporabi pri gojenju žita še danes. Posnema rastlinski rastni hormon auksin, povzroči nekontrolirano rast in odmrtnje rastline.
- 2, 4, 5- T (2, 4, 5-triklorofenoksiocetna kislina) je malo toksičen, vendar je bila uporaba ukinjena zaradi kontaminacije z 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksinom (TCDD), do katere pride med proizvodnji. TCDD je kancerogen, teratogen, imunotoksičen in hepatotoksičen.

2,4 – D:

Mehanizem delovanja: poruši strukturo in funkcijo celične membrane; moti celični metabolizem; je odklopnik oksidativne fosforilacije. Strukturno je podoben očetni kislini in je sposoben tvoriti analog acetil-koencima A. Le-ta je nujen za metabolizem glukoze in za sintezo holesterola, steroidnih hormonov in ACh. Motnje teh poti so v skladu z mnogimi toksičnimi učinki, ki so jih opazili pri sesalcih, npr. spremenjen profil holesterola, miotonija, srčne aritmije, mišični krči, imunotoksičnost in nevrotoksičnost. Ugotovili so tudi, da povzroča apoptozo.

Farmakokinetika: dobro se absorbira pri zaužitju, slabše skozi kožo in pri vdihavanju. Veže se na serumski albumin. Izloči se večinoma nespremenjen z urinom.

Akutna toksičnost: strupenost pri zaužitju, LD₅₀ (podgane) = 639 mg/kg.

Simptomi in znaki zastrupitve: draži oči in kožo (ne v obliki estrov). Povzroča slabost, šibkost, utrujenost, glavobol in v nekaterih primerih nevrotoksičnost vključno z vnetjem živčnih končičev. Lahko pride do poškodb skeletnih mišic in odpovedi ledvic. Opazili so tudi vedenjske motnje (zmedenost, agresivnost).

Zdravljenje: simptomatsko.

Kronična toksičnost: ni trdnih dokazov, vendar ga povezujejo z ne-Hodgkinovimi limfomi in amiotrofično lateralno sklerozo (degenerativna bolezen motoričnih nevronov CŽS) pri delavcih v fitofarmaceutskih tovarnah. IARC (2008) 2,4-D ni razvrstil kot za človeka rakotvorno snov. Obstaja zaskrbljenost, da deluje kot motilec hormonskega ravnotežja, predvsem zaradi učinkov na ščitnico.

4.1.2.2 DERIVATI BIPIRIDILA

Najpomembnejši predstavnik je parakvat. Je neselektivni herbicid. Zaradi akutne toksičnosti je njegova uporaba v Slovenije prepovedana. Parakvat v rastlini veže proste elektrone, ki nastanejo med fotosintezo v klorofilu. Pri tem nastanejo prosti kisikovi radikali, ki poškodujejo celično membrano.

Mehanizem delovanja: glavni tarčni organ parakvata so pljuča. Alveolarne epiteljske celice tipa I in II imajo na svoji membrani specifični transporterje za beljakovino spermin, ki je po strukturi in velikosti podobna parakvatu, zato lahko prehaja v omenjene celice. Parakvat kot induktor nastanka prostih kisikovih radikalov (predvsem superoksidnega aniona) poškoduje celično membrano alveolarnih epiteljskih celic, čemur sledi proliferacija fibroblastov in razvoj pljučne fibroze. Čeprav poteka privzem hitro (V_{max} je 300 nmol/g pljučnega tkiva/h), se začne proliferacija fibroblastov šele več dni po zaužitju, simptomi in smrt zaradi kardiorespiratorne odpovedi pa lahko tudi po več tednih. Čeprav ima dikvat enak mehanizem delovanja kot parakvat, je njegova afiniteta za pljučno tkivo manjša.

Farmakokinetika: pri vdihavanju se parakvat slabo absorbira, ker je premer delcev prevelik, ad bi dosegli alveolarno pregrado. Zato so primeri sistemske toksičnosti zelo redki. Absorpcija skozi kožo in z zaužitjem je majhna. Ne glede na pot vnosa, so glavni tarčni organ pljuča. Nalaga se tudi v mišicah, zato lahko parakvat najdemo več tednov v krvi in urinu. Se ne razgradi, ampak se reducira v nestabilne proste radikale. Skoraj 100% se ga izloči z urinom v 24 urah.

Akutna toksičnost: parakvat je akutno najbolj toksični med herbicidi, smrtni odmerek parakvata za človeka je 4 mg/kg telesne mase. Dikvat je manj toksičen od parakvata.

Simptomi in znaki zastrupitve: pri zaužitju parakvata nastanejo jedke poškodbe prebavnega trakta, spremljajo jih bolečine v žrelu, vzdolž požiralnika in v želodcu. Povzroča slabost, bruhanje, driska in bolečine v trebuhu (akutni gastroenteritis). Poškodbe sluznice so površinske, redkeje pride do perforacije želodca in obsežnih gastrointestinalnih krvavitev. Dva do pet dni po zaužitju lahko pride do ledvične odpovedi in hepatocelularne nekroze. Parakvat je za ledvica direktno toksičen in povzroči tubulopatijo, ki je reverzibilna. Nekroza jeter je centrilobularna in v večini primerov zmerna. Zapolnel razvoj ireverzibilne pljučne fibroze je odgovoren za slabo prognozo zastrupitve. Tudi umetna ventilacija ne upočasni tega procesa.

Zdravljenje: ukrepi morajo biti hitri. Pomembna je temeljita odstranitev strupa iz prebavil z izpiranjem želodca in črevesja, absorpcija na aktivno oglje in bentonit. Zaradi akutnega gastroenteritisa je pomembno nadomeščati tekočino. Kljub hipoksemiji se moramo izogibati dajanju kisika v visokih koncentracijah, ker lahko pospeši nastanek pljučne fibroze.

Kronična toksičnost: izpostavljenosti parakvatu lahko sledi parkinsonizem. Parakvat je po kemijski strukturi podoben MPTM (metil-g-fenil-tetrahidropiridin) za katerega je znano, da povzroči parkinsonizem pri človeku.

4.1.2.3 FOSFOMETILNE AMINOKISLINE

Fosfometilne aminokisliline so neselektivni herbicidi s širokim spektrom delovanja. Najbolj znana predstavnika sta glifosat in glufosinat.

Glifosat

Je strukturni analog glicina in inhibitor sinteze aromatskih aminokislin, kar povzroči odmrtnje rastline.

Farmakokinetika: pri zaužitju je absorpcija majhna, skozi kožo je absorpcija zanemarljiva. Večinoma se izloči z urinom v nespremenjeni obliki.

Akutna toksičnost: ni akutno toksičen pri zaužitju LD_{50} (podgana) > 5000 mg/kg. Kljub temu so poznani smrtni primeri pri zastrupitvi. Menijo, da so razlog zanje pomožne snovi v pripravku in ne sam glifosat,

Simptomi in znaki zastrupitve: v stiku z očmi povzroči konjunktivitis, če oči ne speremo pa tudi reverzibilne poškodbe roženice. Pri zastrupitvi z nizkim odmerkom: želodčni krči, bruhanje, slabost, driska, bolečine v ustih in grlu. Pri zmerni zastrupitvi: ulceracije prebavil, hipotenzija, poškodbe jeter in ledvic. Resna zastrupitev: respiratorna in ledvična odpoved, konvulzije, koma in smrt.

Zdravljenje: simptomatsko.

4.1.3 RODENTICIDI

Prvi rodenticid je bil strihnin, ki so ga uporabili v 16. st. v Nemčiji. Zaradi njihovega načina uporabe (v obliki vab na težko dosegljivih mestih) so manj ekološko obremenilni, vendar lahko pride do nenamernega zaužitja.

4.1.3.1 ANTIKOAGULANTI

Med antikoagulate spadajo:

- Hidroksikumarini 1. generacije: varfarin
- Hidroksikumarini 2. generacije: brodifakum, bromadiolon, difenakum, flokumafen, ipd.
- Derivati indandionov: npr. klorofacinon.

Mehanizem delovanja: so kompetitivni inhibitorji encima *vitamin K epoksid reduktaze*, ki vitamin K epoksid reducira v njegovo aktivno obliko hidrokinona.

Farmakokinetika: dobro se absorbirajo pri zaužitju, v stiku s kožo in pri vdihavanju. Razgradnja varfarina in indandionov poteka preko hidroksilacije. Antikoagulanti 2. generacije se izločijo v nespremenjeni obliki, razen difenakum kjer prevladujejo metaboliti. Akumulirajo se v jetrih in maščevju. Izločajo se predvsem s fecesom.

Tabela 4: Akutna toksičnost antikoagulantov pri zaužitju (podgane):

AKTIVNA SNOV	LD ₅₀ [mg/kg]
varfarin	58
brodifakum	0.26
bromadiolon	1.13
difenakum	1.8
flukomafen	0.46
klorofacinon	20.5

Simptomi in znaki zastrupitve: znaki se razvijejo z zakasnitvijo, in sicer en ali več dni po zastrupitvi. Simptomatsko se zastrupitev kaže v obsežnih krvavitvah (hemoptiza, krvavitev iz dlesni in nosu, kri v urinu,...), ki vodijo v hipovolemični šok.

Zdravljenje: ob znižanju protrombinskega časa pod 50 % je indicirano dajanje vitamina K₁ s čimer omogočimo sintezo koagulacijskih faktorjev. V nujnih primerih ga dajemo intravensko. Pri hujših krvavitvah so potrebne krvne transfuzije in dodatno nadomeščanje koagulacijskih faktorjev. Ker se indandioni in antikoagulanti 2. generacije dalj časa zadržujejo v telesu, poteka tudi zdravljenje z vitaminom K₁ dalj časa.

Teratogenost varfarina: je dokazano teratogen za človeka. Učinki: aksialne in apendikularne deformacije skeleta, hipoplastičen nos, nenormalnosti oči, brahidaktilija, skolioza in nepravilnosti CZS.

4.1.3.2 ALFAKLORALOZA

Mehanizem delovanja: je centralni depresor. Njegov metabolit kloralhidrat se uporablja v terapevtske namene kot hipnotik, čeprav njegovo uporabo več ne priporočajo. Točen mehanizem delovanja ni poznan. Verjeten mehanizem je modulacija receptorjev GABA.

Farmakokinetika: hitra absorpcija pri zaužitju. Metabolizem poteka preko kloralhidrata v trikloroetilen. Prehaja čez posteljico, nahaja se tudi v materinem mleku. Izloča se z urinom in žolčem.

Akutna toksičnost: strupenost pri zaužitju, LD₅₀ (podgane) = 300-400 mg/kg.

Simptomi in znaki zastrupitve: depresija CŽS, mišične fascikulacije. Smrt nastop zaradi zastoja dihanja, hipotermije in motenj srčnega ritma. Neželeni učinki pri terapevtski uporabi kloralhidrata so bruhanje, tremor, ataksija, zmedenost ter redko levkopenia in eozinofilija.

Zdravljenje: zdravimo s kisikom, včasih je potrebna umetna ventilacija. Zaradi senzitivizacije miokarda za kateholamine je učinkovit propranolol. Nadomestiti moramo tekočino in elektrolite ob ustreznem odvajanju urina.

4.1.3.3 ALUMINIJEV FOSFID

Mehanizem: kovinski fosfidi (npr. Al, Mg, Zn) takoj reagirajo z vodo (in/ali s HCl v želodcu) da nastane plin fosfin (PH₃) (IUPAC: fosfan), ki močno draži sluznico. Fosfin je zelo reaktiven in povzroči oksidativen stres, ki vodi v različne nespecifične citotoksične učinke. S svojo vezavo inhibira različne encime vključno z encimi celičnega dihanja (npr. inhibira oksidativno fosforilacijo). Močno inhibira katalazo kar vodi v akumulacijo H₂O₂ in s tem lipidno preroksidacijo in denaturacijo proteinov celične membrane. Redko inhibira citohrom oksidazo za več kot 50%, zato klinični znaki niso podobni zastrupitvi s cianidi ali H₂S. Posledica spremenjene permeabilnosti celične membrane so spremembe v koncentraciji plazemskih elektrolitov. Spremembe EKG in aritmije so verjetno posledica spremenjenim plazemskih koncentracij K, Mg in Ca ali pa spremenjenih intracelularnih ionskih koncentracij. Povečano nastajanje prostih kisikovih radikalov lahko vodi v methemoglobinemijo. Multiorganska odpoved nastopi verjetno zaradi direktnega citotoksičnega učinka. Posledici okvare srca, pljuč in ožilja sta hipoksija in hipoperfuzija. Zaradi poškodbe prebavil in pljuč lahko pride do infekcije.

Farmakokinetika: hitra absorpcija pri zaužitju ali vdihavanju. Skozi kožo je absorpcija zanemarljivo majhna. Okoli 40% absorbiranega fosfina se izloči z urinom kot fosfit ali hipofosfit.

Akutna toksičnost: LD₅₀ (zaužitje, podgane) = 11.5 mg/kg. Zelo strupen pri vdihavanju, LC₅₀ (podgane, 4h) = 0.014 mg/L.

Simptomi in znaki zastrupitve: običajno se pojavijo v nekaj urah, vendar se stanje močno poslabša v prvih 24 ur. Lokalni gastrointestinalni učinki so retrosternalna bolečina, bruhanje, driska in abdominalne bolečine. Multiorganska odpoved z akutno srčno odpovedjo, šok, ARDS (sindrom dihalne stiske pri odraslem), akutna ledvična in jetrna odpoved vodijo v smrt. Centralni učinki (krči, koma) se pojavijo samo pri resnih zastrupitvah in se lahko pojavijo sekundarno zaradi multiorganske odpovedi. Direktna toksičnost za kardiomiocite v kombinaciji z acidozo in nenormalnimi koncentracijami elektrolitov (predvsem K, Ca in Mg) vodijo v aritmije, ki so pogosto letalna komplikacija. Pojavijo se lahko bradiaritmije in tahiaritmije (atrijska in ventrikularna). Pri zastrupitvah s plinom fosfinom se pojavijo podobni simptomi kot so opisani zgoraj, le da so bolj izraziti respiratorni učinki. Izpostavljenost majhnim količinam fosfina lahko povzroči draženje nosne in očne sluznice, kašljanje, glavobol, utrujenost, slabost, bruhanje in abdominalne bolečine. Pri resni izpostavljenosti se pojavi dispneja, pljučni edem, srčne aritmije in hipotenzija.

Zdravljenje: podporno zdravljenje z intenzivno kardiovaskularno in respiratorno podporo in korekcijo elektrolitov. Dajanje kisika močno poveča toksičnost fosfina, zato ga dajemo samo močno hipoksemičnemu bolniku z zelo slabo prognozo ali paliativno. Izpiranje želodca naredimo pri bolniku, ki je zaužil potencialno toksičen odmerek. Specifičnega antidota ni. Acilcistein je v živalskih modelih zmanjšal toksičnost. Optimalen odmerek naj bi bil podoben tistemu pri zastrupitvi s paracetamolom.

PRAKTIČNI DEL

Cilji vaje

- Spoznati osnove eksperimentalne toksikologije.
- Ugotoviti razliko med odgovorom vse ali nič in postopnim odgovorom.
- Spoznati zastrupitev z organofosfornimi insekticidi in karbamati.

1. naloga: Organofosforni pesticidi in odnos med toksičnim učinkom in odmerkom

V tabeli so podatki za organofosforni pesticid. Organofosforni pesticide inhibirajo acetilholinesterazo v eritrocitih kar lahko uporabimo kot kvantitativni učinek pri delavcih, ki so bili izpostavljeni tej vrsti pesticidov. Drug učinek je mioza.

Spodnji podatki predstavljajo oba tipa učinkov izmerjena pri delavcih, ki so škropili poljščine.

Podatki so podani kot:

- % delavcev z miozo (kolona A)
- % inhibicije acetilholinesteraze v eritrocitih (kolona B)

Izpostavljenost oz. odmerek je ocenjen s pomočjo razgradnega produkta v urinu.

Narišite 1. graf kjer na absciso nanašate koncentracijo metabolita v urinu, na ordinato pa oba učinka. Skozi točke potegnite krivuljo. Na grafu označite TD_{50} in NOAEL. Nato narišite 2. graf, kjer na ordinato nanesete frekvenco mioze da ugotovite ali je učinek normalno porazdeljen v populaciji delavcev.

Nato odgovorite na naslednja vprašanja:

1. Kaj je TD_{50} za to kemikalijo?

2. Kaj je NOAEL?
3. Pri katerem nivoju metabolitov v urinu bi morali zaustaviti izpostavljenost?
4. Kateri od obeh učinkov je bolj občutljiv?
5. Ali obstaja nivo pri katerem je izpostavljenost varna?
6. Ali obstaja temeljna razlika med obema odnosoma med odmerkom in učinkom?
7. Ali ste pri grafu uporabili biomarkerje in če ste, katerega tipa?
8. Ali je mioza v populaciji delavcev normalno porazdeljena?
9. Kaj je pri zastrupitvi z organofosfati toksikološko relevanten učinek?
10. Kateri toksindrom spremlja zastrupitev z organofosfornimi pesticide? Kateri so njegovi najpomembnejši simptomi in znaki?
11. Zdravljenje zastrupitve z organofosfornimi pesticidi!

Tabela: Učinki organofosfatnih (OP) insekticidov na delavce

Izpostavljenost nM OP/nM kreatinina	A	B
	% delavcev z miozo	povprečen % inhibicije encima pri vsakem delavcu
0	0	0
10	0	0
20	0	0
30	0	2
40	1	3
50	10	4
60	40	5
70	80	10
80	90	18
90	97	30
100	100	43
110	100	55
120	100	68
130	100	81
140	100	90
150	100	95
160	100	98
170	100	100
180	100	100

2. naloga: Nevrotoksičnost karbamatov in biomarkerji.

Podgane so dobile 3 različne odmerke karbamata X z zaužitjem. Za vsak odmerek je bilo v skupini 10 samcev. V tabeli so navedeni rezultati holinesterazne aktivnosti v % od kontrole po treh urah po zaužitju.

Tabela: Učinek karbamata X na holinesterazno aktivnost pri samcih podgan.

Skupina podgan	Nizek N=10	Srednji N=10	Visok N=10
odmerek (mg/kg telesne teže)	5	50	200
<i>holinesterazna aktivnost</i> (% od kontrole)			
eritrociti	81	86	78
plazma	75*	63*	63*
možgani	92	77*	69*

*statistično značilna razlika

Odgovorite na naslednja vprašanja:

1. Kakšna je relevantnost podatkov za vse tri vrste encimov?
2. Kaj je NOAEL pri tej študiji?
3. Ali je študija pravilno načrtovana, če vemo, da se snov X hitro izloči iz telesa (vrh koncentracije v plazmi je po 1 h)?

3. naloga: Rezultati 90-dnevne standardne študije (subkronična) na psih.

V vsaki skupini je bilo 8 živali (4 samci in 4 samice). V študiji morajo biti vsaj trije različni odmerki snovi. Zato imamo tri skupine živali in kontrolno skupino. Učinki, ki jih pri standardni študiji spremljamo, so predpisani v njenem protokolu.

Tabela: Rezultati standardne subkronične študije na psih

Odmerek (mg/kg hrane)	0 N=8		50 N=8		5000 N=8		50000 N=8	
	<i>m</i>	<i>ž</i>	<i>m</i>	<i>ž</i>	<i>m</i>	<i>ž</i>	<i>m</i>	<i>ž</i>
spol								
UČINEK								
umrljivost	Ni toksikološko relevantnega učinka							
klinični znaki: - salivacija					+	+		
telesna teža (%)			-15*	-13*	-7	+4	+6	-3
poraba hrane	Ni toksikološko relevantnega učinka							
poraba vode	Ni toksikološko relevantnega učinka							
oftalmoskopija	Ni toksikološko relevantnega učinka							
hematologija	Ni toksikološko relevantnega učinka							
klinična kemija	Ni toksikološko relevantnega učinka							
makroskopski znaki	Ni toksikološko relevantnega učinka							
teža organov: - jetra (%)			-2	+3	+8*	+9	+17*	+21*
holinestrazna aktivnost (%) - eritrociti			5	0	-6	-5	-23	-22

*statistično značilna razlika

Odgovorite na naslednja vprašanja:

1. Kaj je NOAEL pri tej študiji? Izrazite v pravih enotah! Katere podatke zato še potrebujemo?
2. Ali lahko to študijo uporabimo tudi kot referenčno študijo za akutno toksičnost?
3. Kaj je/so kliničen/no relevantni znak/i pri tej študiji?