Procjena genotoksičnog učinka karbofurana u miša primjenom alkalnog komet-testa

Bajić, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2009

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:564873

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Ana Bajić

Procjena genotoksičnog učinka karbofurana u miša primjenom alkalnog komet-testa

Diplomski rad

Zagreb, 2009.

Ovaj rad je izrađen u Jedinici za mutagenezu Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu pod vodstvom dr.sc. Davora Želježića, v.znan.sur. i pomoćnim vodstvom Marina Mladinića, dipl.ing.biol., te na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod suvoditeljstvom doc.dr.sc. Vesne Benkoviuć.

Predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno–matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dipl. ing. biologije, smjer ekologija.

Zahvaljujem se neposrednom voditelju, dr.sc. Davoru Želježiću, v.znan.sur., na stručnom vođenju, neizmjernom strpljenju i danim savjetima tijekom izrade ovoga rada. Zahvaljujem se i Marinu Mladiniću, dipl.ing.biol. na prijateljstvu, te na stručnoj i tehničkoj pomoći u izvođenju eksperimenta. Također bih željela zahvaliti doc.dr.sc. Vesni Benković, na pruženom povjerenju i pomoći.

Posebno zahvaljujem roditeljima, sestri i cijeloj obitelji, te svim prijateljima na pruženoj ljubavi, razumijevanju i potpori tijekom studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno–matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

PROCJENA GENOTOKSIČNOG UČINKA KARBOFURANA U MIŠA PRIMJENOM ALKALNOG KOMET-TESTA

Ana Bajić

Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada
Ksaverska cesta 2, Zagreb
Zavod za animalnu fiziologiju
Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta
Rooseveltov trg 6, Zagreb

SAŽETAK

Cilj istraživanja bio je istražiti genotoksični učinak insekticida karbofurana (2, 3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-il-metilkarbamata) i njegove formulacije Geocid ST 35 (350g/l) primjenom alkalnog komet testa na stanicama organa soja miševa Swiss albino u uvjetima *in vivo*. Procjena genotoksičnosti provedena je u stanicama bubrega, jetre, koštane srži i leukocitima primjenom dvaju parametara komet testa: dužine repa i intenziteta repa. Karbofuranom i Geocidom ST 35, svakodnevno tijekom 14 dana, obrađivane su četiri skupine životinja s dozama aktivne tvari u vrijednostima ADI i $1/100LD_{50}$ i uspoređene s kontrolnom skupinom. Utvrđeno je znatno veće oštećenje DNA u stanicama svih organa skupina obrađenih formulacijom Geocidom ST 35 za vrijednosti ADI i $1/100LD_{50}$ u odnosu na stanice životinja obrađenih čistom aktivnom tvari karbofuran u istim dozama. I za aktivnu tvar i za formulaciju intenzitet oštećenja bio je proporcionalan dozi pesticida.U stanicama bubrega, jetre i koštane srži utvrđena su podjednaka oštećenja molecule DNA, dok je razina genomskim oštećenja u leukocitima bila nešto niža. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da karbofuran i formulacija Geocid ST 35 genotoksično djeluju na stanice svih ispitivanih organa miševa, ali ni karbofuran ni formulacija nisu pokazali specifičnost genotoksičnog učinka prema nijednom organu. Oštećenja utvrđena u stanicama jetre, bubrega i koštane srži, osim genotoksičnog djelovanja karbofurana rezultat su i fizioloških procesa u tim tkivima.

(59 stranica, 11 slika, 3 tablice, 83 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Centralnoj biblioteci Biološkog odsjeka, Rooseveltov trg 6.
Ključne riječi: karbofuran/Geocid ST 35 /komet-test / genotoksičnost/miš
Neposredni voditelj: Dr. sc. Davor Želježić, v.znan.sur.
Suvoditelj: Doc.dr. sc. Vesna Benković
Ocjenitelji: Doc.dr. sc. Vesna Benković
Dr. sc. Davor Želježić, v.znan.sur., IMI
Prof. dr. sc. Mirjana Pavlica
Doc. dr. sc. Renata Šoštarić
Rad prihvaćen: 02. prosinca 2009

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

GENOTOXIC CARBOFURAN EFFECT EVALUATION IN MICE BY ALKALINE COMET ASSAY USSAGE

Ana Bajić

Institute of Medical Research and Occupational Health
Ksaverska 2, Zagreb
Department of Animal physiology
Faculty of Science, University of Zagreb
Rooseveltov trg 6, Zagreb

ABSTRACT

The aim of research was to explore the genotoxic impact of carbofouran pesticide (2,3-dihydro-2,2-dimethyl-7-benzofuranol methylcarbamate) and its formulation Geocid ST 35 (350g/l) by alkali comet assay usage on four organs´ cells of mice strain swiss albino in conditions *in vivo*. The genotoxic evaluation was made on kidney, liver, bone marrow cells and leukocytes using two comet assay parameters: tail length and tail intensity. During fourteen day period, four groups of animals were treated by carbofouran and Geocid ST 35 with an active substance doses in values of ADI i $1/100LD_{50}$ and were compared with the control group. Both active supstance and formulation have shown damage intensity proportional to pesticide doses. Kidney, liver and bone marrow cells have shown similar DNA damage while genom level was slightly lower in leukocytes. Based on given results it can be concluded that carbofuran and Geocid ST 35 have genotoxic effect on all treated murine organs, but niether carbofuran nor its formulation have shown specificy of genotoxic effect on niether of organs. Demage detected in all organ cells exept lukocytes is a result of both carbofuran genotoxity impact and physiological proceses in those tissues.

(57 pages, 11 figures, 3 tables, 83 references, original in Croatian language)

Thesis deposit in: Central Library of Department of Biology, Rooseveltov trg 6.
Key words: carbofuran/Geocid ST 35/comet assay /genotoxicity/mice
Supervisor: Ph.D. Davor Željžić, Senior Scientific Associate (sSc.Ass.)
Cosupervisor: Ph.D. Vesna Benković, Asst.Prof.
Reviewers: Ph.D. Vesna Benković, Asst.Prof.
Ph.D. Davor Željžić, Senior Scientific Associate (sSc.Ass.)
Ph. D. Mirjana Pavlica, Prof.
Ph. D. Renata Šoštarić, Asst.Prof.
Thesis accepted: December 02, 2009.

SADRŽAJ

UVOD.....8
1.1. Pesticidi.....9
1.2. Podjela pesticida.....10
1.3. Isekticidi.....11
1.3.1. Organoklorni insekticidi.....12
1.3.2. Sintetički piretroidi.....12
1.3.3. Dinitrofenoli.....12
1.3.4. Organofosforni insekticidi.....13
1.3.5. Karbamati.....13
1.4. Karbofuran.....13
1.4.1. Putovi unosa karbofurana u organizam.....15
1.4.2. Metabolička promjena karbofurana.....15
1.5. Toksičnost.....17
1.5.1. Toksikološki učinci karbofurana..... 18
1.6. Procjena genotoksičnosti.....19
1.6.1. Metode u genetičkoj toksikologiji.....20
1.6.2. Komet-test.....21
1.7. Cilj istraživanja.....24
2. MATERIJALI I METODE.....25
2.1. Pokusne životinje.....26
2. 2. Priprema otopina pesticida.....27
2.3. Obrada životinja.....27
2.4. Uzorkovanje tkiva i organa.....28
2.5. Komet-test.....28
2.6. Statistička obrada rezultata……...29

3. REZULTATI.....31
3.1. Učinak karbofurana na dužinu repa kometa u stanicama
tkiva obrađenih životinja.....32

3.2. Učinak karbofurana na postotak DNA u repu kometa stanica tkiva obrađenih životinja.....35
3.3. Broj jezgara u analiziranim organima miševa s velikom dužinom repa kao posljedica genotoksičnog učinka karbofurana.....39
3.4. Broj jezgara u analiziranim organima miševa s visokim udjelom DNA u repu kao posljedica genotoksičnog učinka karbofurana.....40

4. RASPRAVA.....41

5. ZAKLJUČAK.....47

6. LITERATURA.....50

1. UVOD

1.1. PESTICIDI

Organizacija za hranu i agronomiju pri Ujedinjenim narodima (FAO) određuje pesticide kao kemijske spojeve (čiste tvari ili smjese) sintetskog ili biološkog podrijetla koji se koriste za suzbijanje, uništavanje i ublažavanje utjecaja štetočina (insekata, glodavaca, korova, gljivica, mikroorganizama), na poljoprivrednim nasadima te u skladištenju i transportu poljoprivrednih proizvoda, prijenosnika zaraznih bolesti na ljude i životinje te parazita (Maceljski i sur., 1997).

Zbog svoje biološke aktivnosti u ekosustavu i dugog vremena poluraspada, već duži niz godina pesticidi predstavljaju jedan od glavnih zagađivača okoliša. Posljednjih nekoliko desetljeća pesticidi su postali sveprisutni u ljudskom životu. Njihovo korištenje nije ograničeno samo na organiziranu proizvodnju hrane, već se svakodnevno koriste u vrtovima, okućnicama, cvjetnjacima, travnjacima, kućanstvu i radnim prostorijama u svrhu dezinsekcije. Početkom 20. stoljeća započela je intenzivnija primjena pesticida u poljoprivredne svrhe. Zakonska regulativa vezana uz njihovo korištenje počinje se donositi tek krajem 40-tih godina prošlog stoljeća. Organofosfati su bili jedni od prvih pesticida. Njihovo neurotoksično djelovanje na ljude otkriveno je 1932. godine, zbog čega su u Drugom svjetskom ratu korišteni kao živčani bojni otrovi (Pang, 2007).

Jedna od posljedica dugoročnog intenzivnog korištenja pesticida je razvijanje otpornosti određenih štetočina na već poznate aktivne tvari, zbog čega industrija pesticida na tržište ubrzano uvodi nove aktivne tvari s izraženijim pesticidnim djelovanjem koje istovremeno predstavlja i veću opasnost po zdravlje čovjeka i okoliš (Anwar, 1997; Goldman, 1998; Guzzella i sur., 2005; Pohl i sur., 2008; Borchers i sur., 2007).

Iako u svijetu postoji trend smanjenja uporabe kemijskih zaštitnih sredstava uvođenjem integrirane i organsko-biološke proizvodnje hrane prema podacima američke organizacije Environmentel Protection Agency (EPA), 2006. godine u svijetu je utrošeno više od 2,8 milijuna tona aktivnih tvari (Hicks, 2008).

Osim kemijski sintetiziranih pesticida sve veću upotrebu u svijetu imaju biopesticidi. To su proizvodi izolirani iz biljaka, životinja, mikroorganizama ili određeni minerali (npr. ulje kanole, natrijev hidrogenkarbonat). Zbog prirodnog podrijetla biopesticidi nisu zagađivači okoliša, djeluju na niže organizme razarajući im probavni sustav, a budući da su uglavnom fotosenzibilni primjenjuju se u večernjim satima (EPA, 2007).

Porastom potrebe za hranom, razvojem poljoprivrede i kemijske industrije, sredinom 20-tog stoljeća, porasla je upotreba pesticida, ali i broj trovanja među poljoprivrednim radnicima i korisnicima proizvoda s polja tretiranih pesticidima. Takav razvoj događaja nametnuo je nužnost testiranja toksičnosti pesticida prije stavljanja u promet (Ecobichon, 1991).

Kada govorimo o pesticidima potrebno je razlučiti aktivnu tvar s pesticidnim učinkom od formulacije (pripravka pesticida). Aktivna tvar je kemijski spoj koji u ciljnom organizmu ispoljava toksični učinak. Na tržištu i u primjeni ne koriste se čiste aktivne tvari, već pripravci. Pripravak osim aktivne sadrži i inertne tvari. Inertne tvari poboljšavaju učinkovitost same aktivne tvari, olakšavajući njezinu primjenu, adsorpciju i unos u ciljni organizam te transport u organizmu do ciljnog organa ili stanica. Inertne tvari daju pesticidu jedinstvenu fizikalnu formu i specifične karakteristike (Maceljski i sur., 1997). Formulacije se mogu naći u obliku prašiva (P), emulzija (E), močiva (WP), suspenzija (S), kristala (K), granula (G), tekućeg sredstva za otopinu (SC). U novije vrijeme sve je više znanstvenih radova koji ukazuju na činjenicu da naziv inertne tvari nije u potpunosti primjeren jer iako ti spojevi ne posjeduju pesticidni učinak nisu biološki neaktivni, te sami mogu djelovati izrazito toksično ili u kombinaciji s aktivnom tvari dovesti do neželjenih posljedica po zdravlje čovjeka. Danas postoji oko 21 000 registriranih formulacija pesticida s oko 1100 različitih aktivnih sastojaka koji se koriste u agrokulturi, kućanstvu i industriji. Environmental Protection Agency (EPA) i International Agency for Research on Cancer (IARC) klasificirali su 160 aktivnih tvari kao potencijalne karcinogene (Martin i sur., 2001).

1.2. PODJELA PESTICIDA

Postoji nekoliko načina podjele pesticida. S obzirom na ciljnim organizam njihova djelovanja, pesticidi se dijele na (Maceljski i sur., 1997):

- akaricide (sredstva za suzbijanje grinja)
- algicide (sredstva za suzbijanje algi)
- avicide (sredstva za suzbijanje ptica)
- baktericide (sredstva za suzbijanje bakterija)
- fungicide (sredstva za suzbijanje gljivica)
- herbicide (sredstva za suzbijanje korova i drugih nepoželjnih biljaka)
- insekticide (sredstva za suzbijanje kukaca)
- moluskicide (sredstva za suzbijanje puževa)

- nematocide (sredstva za suzbijanje oblića)
- regulatore rasta (sredstva za regulaciju rasta biljke)
- repelente (sredstva za odbijanje kukaca i divljači)
- rodenticide (sredstva za suzbijanje glodavaca)

Drugi, također često primjenjivan, način podjele pesticida jest s obzirom na kemijsku strukturu aktivne tvari. Prema toj podjeli postoji više od 40 skupina pesticida, a neke od najvažnijih su (Anwar 1997):

- fenoksi herbicidi
- karbamatni pesticidi
- organofosforni pesticidi
- organokloridni pesticidi
- triazinski pesticidi

1.3. INSEKTICIDI

Insekticidi su tvari kemijskog ili biološkog podrijetla koje se primjenjuju za uništavanje insekata na poljoprivrednim površinama, travnjacima, okućnicama i kućanstvu, u uzgoju gospodarski iskoristivih životinja i njezi kućnih ljubimaca. Njihov značaj očituje se u sprečavanju širenja oboljenja koja se prenose kukcima i osiguravanju hrane rastućoj ljudskoj populaciji (EPA, 2000).

Nadzor nad populacijama kukaca kemikalijama započeo je već prije 2000 godina upotrebom prirodnih spojeva poput vodenog ekstrakta kopriva i buhača. Puštanjem diklor-difenil-trikloretan-a (DDT-a) na slobodno tržište 1940-tih godina započelo je doba sintetički dobivenih insekticida (EXTOXNET, 1996).

Insekticidi predstavljaju drugu najveću skupinu pesticida s obzirom na broj aktivnih tvari i količinu godišnje potrošnje. Globalno je, u 2001. godini, potrošeno 137 056 t insekticida, a samo u Europi 21 234 t insekticida (FAOSTAT, 2001). Za razliku od herbicida insekticidi bilježe veću potrošnju u razvijenijim zemljama. Od zabrane korištenja DDT-a, zbog jeftine radne snage u siromašnijem dijelu svijeta kontrola kukaca obavlja se njihovim fizičkim uklanjanjem s nasada i životinja, bez primjene kemijskih spojeva (EXTOXNET, 1996).

Najveću skupinu insekticida predstavljaju organski insekticidi koji se dijele u nekoliko velikih podskupina (Reigare i Roberts, 1999).

1.3.1. Organoklorni insekticidi

Organoklorni insekticidi su skupina sintetičkih insekticida otporna na razgradnju u organizmu i okolišu, kontaktni su otrovi, a ulaze u organizam preko dišnog i probavnog sustava. Nalaze se na popisu obveznog utvrđivanja higijenske ispravnosti namirnica životinjskog podrijetla. Većina insekticida iz ove skupine povučena je iz primjene u mnogim zemljama. Međutim, zbog dugog vremena polurazgradnje ostaci ovih spojeva i dalje su prisutni u okolišu. Postoji nekoliko različitih kemijskih tipova organoklornih insekticida, no svi sadrže atome klora i svi su topivi u mastima (nepolarni). Ciljno tkivo djelovanja je živčano tkivo. Najpoznatiji predstavnik ove grupe insekticida je DDT (Reigare i Roberts, 1999).

1.3.2. Sintetički piretroidi

Piretroidni insekticidi su razvijeni kao sintetički, a oblik prirodnog pesticida piretroida izoliran je iz biljke *Chrysanthemum cinerariifoliu Vis.* Permetrin, bifentrin i fenvalerat primjeri su iz ove skupine aktivnih tvari. Neznatno su polarniji u odnosu na organoklorne insekticide. Ovi spojevi su živčani ili nervni otrovi i insekticidi u jako niskim dozama. Djeluju na središnji i periferni živčani sustav. Zakonski maksimalna dozvoljena koncentracija (MDK) piretroida u biljnim i animalnim namirnicama iznosi 1μg/g (Reigare i Roberts, 1999).

1.3.3. Dinitrofenoli

Dinitrospojevi, žuta ulja ili žuta sredstva su liposolubilni spojevi koji u organizam ulaze preko probavnog sustava, inhalacijom i preko kože. U organizmu djeluju povećavajući razinu endogenog metabolizma aktivirajući oksidativnu fosforilaciju uz istovremenu inhibiciju oksidacije pri čemu se ne stvara ATP, već se oslobađa toplinska energija.Primjeri ovih insekticida su binapakril (Morocide ®) i dinokap (Karathan ®) (Whare i Whitacre, 2004).

1.3.4. Organofosforni insekticidi

U ovu skupinu ubrajaju se sintetički organski esteri fosforne kiseline s insekticidnim djelovanjem. Kontaktni su otrovi koji se u prirodnim supstratima razlažu te se za razliku od kloriranih ugljikovodika ne zadržavaju u ekosustavu. Najčešće primjenjivani organofosforni pesticidi su diklorvos, malation i paration. U organizmu djeluju neurotoksično inhibirajući enzim acetilkolinesterazu te na taj način onemogućavaju prijenos živčanih signala i dovode do paralize (Reigare i Roberts, 1999).

1.3.5. Karbamati

Karbamati koji se danas koriste kao insekticidi sintetitički su spojevi, po strukturi su esteri N-metil (ili N,N-dimetil) karbamatne kiseline s fenolom ili oksimom. Prirodna aktivna tvar iz skupine karbamata može se ekstrahirati iz vrte mahunarki *Physostigma venenosum Balf,* koja sadrži metilkarbonatni ester fizostigmin. Upotreba karbamata započela je 50-tih godina prošlog stoljeća, a danas su najčešće korištena skupina insekticida u kućanstvima, vrtovima i poljoprivredi (Reigare i Roberts, 1999).

Karbamati u organizmu dovode do reverzibilne inhibicije enzima acetilkolinesteraze te akumulacije neuroprijenosnika acetilkolina u parasimpatičkim neuroefektornim spojevima, na neuromuskularnim vezama skeletnih mišića, autonomnim živcima, te u CNS-u. Na taj način onemogućavaju prijenos živčanih impulsa. Respiratorna depresija zajedno s plućnim edemom najčešći je uzrok smrti izazvane karbamatnim insekticidima (EPA, 2000). Karbamati se apsorbiraju inhalacijom, ingestijom i rjeđe penetracijom preko kože. Enzimi jetre hidroliziraju N-metil karbamate, a metabolički produkti izlučuju se putem jetre i bubrega. Najzastupljeniji insekticid iz skupine karbamata je karbofuran.

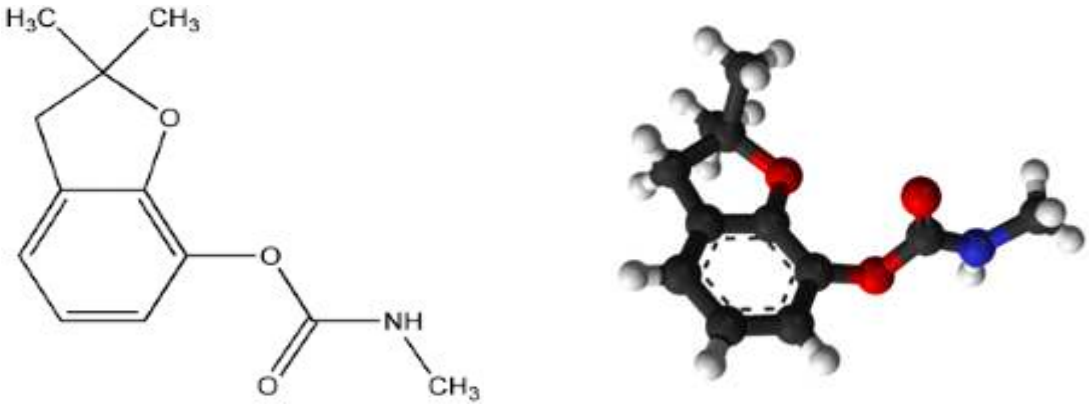
1.4. KARBOFURAN

Karbofuran (2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-il-metilkarbamat) je insekticid koji pripada skupini N-metilkarbamata. Bezmirisni je, bijeli kristalični čvrsti spoj izrazito slabe topivosti u vodi od 320 mg/L. Na tržištu je prisutan u obliku tekućih formulacija i granula. Neke od najzastupljenijih formulacija karbofurana su Furadan, Karbodan, Karbosip, Chinofur, Kuraterr, Furakarb, Kenafuran (EXTOXNET, 1996).

Karbofuran je pušten u slobodnu prodaju 1967. godine, a prvi proizvođač bili su Korporacija MC i Bayer AG (BCPC, 2003). Primjenjuje se u poljoprivredi za suzbijanje insekata, kolutićavaca i nematoda na nasadima povrća, uljane repice, kukuruza, soje, krumpira, riže, kave, bundeva, banana i gljiva. U organizam ulazi ingestijom ili inhalacijom (BCPC, 2003). Izrazito je neurotoksičan, karbamilacijom u katalitičkom centru dovodi do reverzibilne inhibicije acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze u uvjetima *in vivo* i *in vitro* i na taj način onemogućava prijenos živčanih signala (Maroni i sur., 2000).

Karbofuran je topiv u vodi i umjereno perzistentan u tlu s vremenom poluraspada 30-120 dana. U ljudskom tijelu vrijeme poluraspada mu je 6 do 12 sati i ne akumulira se u tkivima (Gupta, 1994). U tlu se razgrađuje kemijskim hidrolizama (mnogo brže u alkalnim tlima) i mikrobiološkim procesima. Razgrađuje ga sunčeva svjetlost, a spoj ima visoki potencijal kontaminacije podzemnih voda.

Zbog svoje široke primjene u poljoprivredi i kućanstvima karbofuran je postao ozbiljan problem za očuvanje zdravlja ljudi i životinja. Epidemiološka istraživanja pokazuju da produženo izlaganje karbofuranu uzrokuje povećani rizik od gastrointestinalnih, neuroloških i srčanih smetnji (Peter i Cherian, 2000). Do 1991. godine više od 80 % ukupnog karbofurana je bilo u granularnoj formi, no zbog pomora ptica nakon ingestije granula karbofurana 1994. godine EPA je inicirala zabranu granularne formulacije karbofurana u SAD-u. 2006. godine EPA predlaže zabranu korištenja karbofurana, međutim ona iz ekonomskih razloga do danas nije uvedena (EPA, 2000). U gospodarski razvijenim zemljama prati se trend smanjenja upotrebe karbofurana zbog njegove toksičnosti za životinje i čovjeka (EPA, 2000). Oko 20 000 tona karbofurana 2002. godine utrošeno je u svijetu. S godišnjom potrošnjom od 500 tona u Hrvatskoj karbofuran je jedna od najčešće primjenjivanih aktivnih tvari (FAOSTAT, 2001).



Slika 1. Strukturna formula karbofurana

1.4.1. Putovi unosa karbofurana u organizam

Absorpcija je proces prijelaza molekule pesticida kroz barijeru koja dijeli organizam od okolnog prostora i ulaska u sistemsku cirkulaciju (Anwar, 1997; Rozman i Klaasen, 1996).

Glavni način unosa karbofurana u organizam je putem probavnog sustava. Kod profesionalne izloženosti karbofuranu, vjerojatnost intoksikacije ingestijom vrlo je mala. Međutim, ukoliko se ne provode dostatne mjere opreza, karbofuran se može unijeti u organizam oralno, prinošenjem i stavljanjem kontaminiranih predmeta u usnu šupljinu. Također može ući u organizam kao posljedica gutanja mukusa kojim se odstranjuju čestice karbofurana zaostale na stijenkama dišnih putova, a koje su primarno unešene inhalacijom. Najčešći oblik unosa karbofurana ingestijom dešava se prilikom konzumiranja svježih namirnica obrađenih pesticidom, a da nije poštivano vrijeme koje mora proći od posljednje obrade do stavljanja namirnica u promet (karenca) te u slučajevima trovanja u kojima dolazi do konzumacije samog pesticida (Anwar, 1997; Rozman i Klaasen, 1996).

Unos preko dišnog sustava je drugi način unosa karbofurana u organizam. Do inhalacije može doći u slučajevima nepoštivanja propisanih mjera zaštite prilikom pripreme i primjene pripravaka s karbofuranom. Pri tom, veliku ulogu o određivanju intenziteta absorpcije igraju veličina aerosolnih čestica i njihova topivost u mukusu dišnih putova (Anwar, 1997; Rozman i Klaasen, 1996).

Zbog fizikalno-kemijskih karakteristika molekule karbofurana absorpcija preko kože je zanemariva (Gosselin i sur., 1984).

1.4.2. Metabolička promjena karbofurana

Nakon unosa karbofurana ingestijom ili inhalacijom, u organizmu se odvija proces biotransformacije u različitim organima putem specifičnih enzima. Biotransformacijom se molekula izvornog spoja mijenja kemijski s ciljem smanjenja njezine toksičnosti, ali i povećanja topljivosti radi učinkovitog izlučivanja iz organizma. Ukoliko biotransformacijom nastanu spojevi manje toksičnosti od izvorne molekule spoja govori se o inaktivaciji ili detoksikaciji. Kada metabolički produkti pokazuju veću toksičnost od izvornih molekule karbofurana riječ je o aktivaciji ili letalnoj sintezi. U trećem slučaju moguće je da nakon biotransformacije spoj promijeni svoju biološku aktivnost, ali nije niti više niti manje toksičan po organizam od izvorne molekule. U tom slučaju govori se o promjeni aktivnosti (Parkinson,

1996; Williams, 1971). Proces biotransformacije odvija se u dvije faze. U prvoj fazi biotransformacije odvijaju se reakcije hidrolize, redukcije i oksidacije karbofurana s ciljem smanjenja njegove toksičnosti (Parkinson, 1996; Williams, 1971). Druga faza biotransformacije odvija se u istim staničnim strukturama kao i prva faza. U njoj dolazi do stavaranja konjugata između metabolita karbofurana i neke od makromolekula nosača, najčešće glukuronske kiseline. Kao rezultat druge faze nastaju spojevi daleko veće hidrofilnosti od izvornih molekula karbofurana (Parkinson, 1996; Williams, 1971).

Nakon oralnog unosa karbofuran ima biološko vrijeme poluraspada od nekoliko sati do nekoliko dana, prilikom čega ne cirkulira krvotokom dugo vremena i ne akumulira se u tkivima. Metabolizam i ekskrecija karbofurana je dobro proučena u štakorima, miševima, kukcima, kravama i kozama (Usmani i sur., 2004; Krieger i sur., 1976; Knaak i sur., 1970).

Utvrđeno je da se u ljudskom organizmu karbofuran metabolički mijenja na više načina. Primarni organ metaboličke pretvorbe karbofurana je jetra (Gupta, 1994). Dominantni metabolit je 3-hidrokskikarbofuran glukuronid. Osim njega, primarni mataboliti kod sisavaca su još i 3-ketokarbofuran, 3-ketokarbofuran-7-fenol i karbofuranfenol (Usmani i sur., 2003). Svi metaboliti su nađeni u slobodnom obliku i u obliku konjuganata sa sulfatima i glukuronskom kiselinom (Gupta, 1994). Putevi metabolizma karbofurana obuhvaćaju oksidacijski put u kojem se benzil karbon prevodi u 3-hidroksikarbofuran, koji se zatim prevodi u 3-hidroksikarbofuran fenol i 3-keto karbofuran 7-fenol nakon hidroliza. Drugi put metabolizma, najčešći u sisavaca i kukaca, je direktna hidroliza karbofurana u karbofuranfenol (CAEPA, 1999).

Istraživanja su pokazala da metaboličkom transformacijom karbofurana, primjerice, nastaje hidroksikarbofuran koji posjeduje veću neurotoksičnost od izvorne molekule. Stoga ovdje govorimo o metaboličkoj aktivaciji spoja (Gupta, 1994).

1.5. TOKSIČNOST

Toksičnost je skup štetnih utjecaja određenih tvari na ljude i životinje. Toksični agens je kemijski spoj koji pri određenim okolnostima izloženosti može uzrokovati štetne učinke u živim organizmima (EXTOXNET, 1996).

Osnovni principi testiranja toksičnosti su (Hayes, 2001):

- testovi na eksperimentalnim životinjama ili biljkama
- epidemiološke studije - utvrđivanje odnosa izloženosti i učinaka ksenobiotika na zdravlje pojedinih populacija
- ekotoksikološke studije - primjena preciznih analitičkih metoda u određivanju ostataka ksenobiotika u okolišu
- ispitivanje perzistentnosti i ponašanja ksenobiotika kao kontaminanata unutar prehrambenog lanaca.

Nakon unošenja jednokratne doze toksikanta u organizam javlja se akutna toksičnost. Kronična toksičnost je posljedica učestale izloženosti određenom toksikantu tijekom dužeg perioda (ponavljane doze od 3 mjeseca kod čovjeka i 2 godine kod glodavaca) (Benford, 2000).

Postoji nekoliko opće prihvaćenih parametara kojima se definira toksičnost spoja.

Uobičajena mjera akutne i kronične toksičnosti otrovnih tvari je letalna doza (LD). LD_{50} predstavlja količinu ispitivanog spoja koja je pod određenim uvjetima obrade izazvala smrtnost u 50% obrađenih životinja (Maceljski i sur., 1997).

Prihvatljivi dnevni unos (*engl. Acceptable Daily Intake* - ADI) je parametar definiran kao procijenjena ona količina spoja koja se može dnevno unositi u organizam tijekom života bez rizika po zdravlje (Benford, 2000).

Razina kod koje se neće ispoljiti nikakav štetan učinak *(engl. No Observed Effect Level*-NOEL) je parametar koji definira najmanju količinu spoja koja kod određene vrste organizma (Benford, 2000).

Maksimalna zaostatna razina *(engl. Maximum Residue Level* - MRL) je najveća dopuštena količina ostatka pesticida izražena u miligramima po kilogramu hrane, koja se smije prema principima dobre poljoprivredne prakse (GAP) pojaviti u ili na hrani nakon upotrebe pesticida. Ustanovljena od strane nacionalnih regulatornih agencija kako bi se pesticidni ostaci u hrani održali u što manjim vrijednostima (Benford, 2000).

1.5.1. Toksikološki učinci karbofurana

Prema EPA klasifikaciji pesticida karbofuran spada u klasu II toksičnosti kao umjereno toksičan (EPA, 2000).

Karbofuran inhibira acetilkolinesterazu (AChE) i butirilkolinesterazu (BChE) u uvjetima *in vivo i in vitro.* Glavni toksikološki učinak karbofurana se odnosi na reakciju karbamilacije katalitičkog centra AChE u živčanom sustavu čime dolazi do nakupljanja neuroprijenosnika acetilkolina u sinaptičkoj pukotini, što za posljedicu ima zaustavljanje neuroprijenosa (Karczmar, 1998). Kumulativni učinak inhibicije AChE aktivnosti kod uzastopne izloženosti karbofuranu nije utvrđen (Maroni i sur., 2000).

Od ostalih parametara koji određuju toksičnost karbofurana valja spomenuti ADI koji za karbofuran iznosi 0,01 mg/kg/dan (Kidd i James, 1991). Referentna doza, (*engl. Reference dose* - RfD) je procjena dnevne izoženosti ljudske populacije određenoj tvari bez značajnog rizika od štetnih učinaka tijekom života (Harp, 1999) i za karbofuran iznosi 0,005 mg/kg/dan (EPA, 1994). Nadalje, granična doza (*engl. Treshold limit values* - TLV) je koncentracija određene tvari u zraku, mjerena u promilima (1/1000) ili mg/m^3, koja se smatra prihvatljivom pri dnevnoj izloženosti radnika u proizvodnji i primjeni pesticida te nema štetnih učinaka po zdravlje (ATSDR, 2009). TLV za karbofuran iznosi 0,1 mg/m^3 (period od 8 sati) (EPA, 1989).

U uvjetima akutne toksičnosti karbofuran uzrokuje kratkotrajnu i reverzibilnu inhibiciju AChE. Klasični simptomi trovanja karbamatnim komponentama su vrtoglavica, slabost, mučnina, znojenje i zamagljen vid. Uslijed izoženosti karbofuranu, dokazano je i bljedilo, pritisak u prsima i epigastrička bol. Karbofuran narušava i imunološki sustav miševa u uvjetima akutne toksičnosti (Barnett i sur., 1980) i ljudi (Fiore i sur., 1986). Potpuni oporavak od akutnog trovanja karbofuranom je moguć samo ako se izloženost toksinu odmah prekine čime se omogućava reaktivacija AChE. Akutni oralni LD_{50} je 5-13 mg/kg za štakora, 2 mg/kg za miša i 19 mg/kg kod pasa (Baron, 1991).

U uvjetima kronične toksičnosti kod štakora kojima su davane doze od 5 mg/kg/dan tijekom 2 godine zamijećen je značajan gubitak tjelesne mase (Baron, 1991). Jednak učinak subletalne kronične izloženosti karbofuranu uočen je i na miševima (Baron, 1991).

Reproduktivni učinci uočeni su samo kod pasa kod kojih je dugotrajno izlaganje karbofuranu dovelo do morfoloških oštećenja testisa. Međutim, isti učinak nije zabilježen u ispitivanjima na drugim životinjama (Baron, 1991).

Istraživanja mutagenosti karbofurana dala su različite rezultate. Utvrđen je relativno slab mutageni učinak karbofurana u bakterije *Escherichia coli* (Saxena i sur., 1997). Karbofuran je djelovao na izmjenu sestrinskih kromatida u stanicama jajnika kineskog hrčka (Lin i sur., 1997), kod miša (Gentile i sur., 1982) i štakora (Aly, 1998) u uvjetima *in vivo.* Kromosomske aberacije utvrđene su u humanim limfocitima *in vitro* (Naravaneni i Jamil, 2005), te kod miševa *in vivo*. Kod miševa su, također, utvrđene i abnormalnosti spermija prilikom izloženosti karbofuranu u uvjetima *in vivo* (Chauhan i sur., 2000). Kod štakora je dokazana fragmentacija molekule DNA u neuronima kore mozga *in vitro* (Kim i sur. 2004), no isti učinak karbofurana nije dokzan u fibroblastima pluća kineskog hrčka *in vitro* (Yoon i sur., 2001).

Prema podacima dobivenim u brojnim studijama na životinjama karbofuran ne djeluje karcinogeno (Baron, 1991), no utvrđen je njegov teratogeni i embriotoksični učinak (Gupta, 1994).

Epidemiološke analize utvrdile se moguće povećanje rizika od gastrointestinalnih, srčanih i neuroloških smetnji prilikom dugoročnog izlaganja karbofuranu (Peter i Cherian, 2000; Kamel i sur., 2000). Utvrđeno je također i povečanje rizika od raka pluća (Usmani i sur., 2004) i ne-Hodgkin-ovog limfoma (Zheng i sur., 2001).

Poznat je mali broj smrtnih slučajeva uslijed trovanja karbofuranom (Pinakini i Kumar, 2006). Smrt 26-godišnjeg muškarca uzrokovana je slučajnim unošenjem 155g karbofurana (Ferslew i sur., 2006) kao i ingestija karbofurana kod pokušaja samoubojstva 17-godišnje trudnice (Klys, 1989). Izloženost karbofuranu može dovodi do neprestanog podraživanja postsinaptičkih vlakana te samim time grčenja mišića i blokade respiratornog sustava i srčanog mišića što neminovno uzrokuje smrt (Maroni i sur., 2000).

1.6. PROCJENA GENOTOKSIČNOSTI

Grana toksikologije koja se bavi proučavanjem oštećenja genoma, kao i posljedica koje ono ima po zdravlje čovjeka, naziva se genetička toksikologija. Kemijski spojevi koji posjeduju sposobnost induciranja oštećenja u molekuli DNA su genotoksični agensi, a njihovo djelovanje naziva se genotoksičnost. S obzirom na mehanizam djelovanja, genotoksične tvari mogu se podijeliti u dvije osnovne skupine. Prvu čine mutageni i klastogeni koji dovode do oštećenja genoma izravnom interakcijom s molekulom DNA. Mutageni dovode do nastanka oštećenja na razini gena dok oštećenja uzrokovana klastogenima zahvaćaju čitave kromosome. Drugu skupinu čine aneugeni koji ne djeluju izravno na DNA i nisu u

mogućnosti dovesti do nastanka mutacija gena niti promjena u strukturi kromosoma, ali svojim djelovanjem oštećuju mikrotubule diobenog vretena i na taj način uzrokuju promjene broja kromosoma u stanici. Oštećenja molekule DNA uzrokovana kemijskim agensima mogu se podijeliti u tri skupine: mutacije gena, strukturne promjene kromosoma i numeričke promjene kromosoma. Mutacije gena dijele se na točkaste (istomislene - samesence, pogrešne - missence i besmislene - nonsence) i mutacije koje dovode do pomaka okvira čitanja (frame shift mutacije). Strukturne promjene kromosoma odnose se na kromosomski (translokacija, kromosomski lom, inverzija i delecija) i kromatidni tip (kromatidni lom, kromatidni "gap" i intrakromatidna izmjena) (Hoffmann, 1996; IAEA, 2001).

1.6.1. Metode u genetičkoj toksikologiji

Danas se u procjeni citogenetičkog učinka fizikalnih i kemijskih agenasa koriste četiri osnovne metode:

- analiza strukturnih aberacija kromosoma
- analiza učestalosti izmjena sestrinskih kromatida
- mikronukleus-test
- komet-test

Analizom strukturnih aberacija kromosoma utvrđuju se kvntitativne i kvalitativne promjene u strukturi kromosoma detekcijom ukupnog broja kromosomskih lomova, kromatidnih lomova i acentričnih fragmenata, kao posljedica klastogenog genotoksičnog djelovanja. U analizi se koriste stanice sisavaca u kulturi kao i kulture limfocita periferne krvi kratkoročno stimuliranih mitogenom (Koehavong i Grant, 2005).

Analiza učestalosti izmjena sestrinskih kromatida vrlo je osjetljiva citogenetička metoda koja se koristi u procjeni genotoksičnosti isključivo kemijskih spojeva. Iako sam mehanizam nastanka izmjena nije poznat, smatra se da je na neki način povezan s rekombinacijskim popravkom dvostrukih lomova u DNA. Procjena se najčešće izvodi na limfocitima periferne krvi čovjeka (Cheng i sur., 1995).

Mikronukleus-test pripada skupini citogenetičkih testova (Mersch i sur., 1997) i za razliku od prije spomenutih metoda primjenjuje se kao osjetljiva tehnika u detekciji učinka obiju skupina genotoksičnih agenasa: klastogena i aneugena. Tehnikom se detektira gubitak genetičkog materijala koji se nakon diobe stanice izdvaja od jezgre u vidu kromatinske strukture zvane mikronukleus (Nüsse i sur., 1996). Mikronukleus može sadržavati čitavi kromosom ili njegov

odlomljeni dio temeljem čega se razlikuje klastogeno djelovanje od aneugenog (Norpa i Falck, 2003).

Komet-test je elektroforeza molekule DNA iz jezgara pojedinačnih stanica (*eng*. *single cell gel electrophoresis*). Metoda se temelji na putovanju dijelova molekule DNA relaksirane strukture uslijed induciranih oštećenja kroz agarozni gel, te njihovoj detekciji i kvantifikaciji pomoću određenih boja koje se vežu na DNA. Zbog svoje jednostavne izvedbe, ali izrazito visoke osjetljivosti, komet-test je našao široku primjenu u procjeni genotoksičnosti (Collins, 2004).

1.6.2. Komet-test

U posljednjem desetljću komet tehnika je jedna od standardnih metoda određivanja oštećenja DNA, s primjenom u genotoksičnom testiranju, biomonitoringu ljudi i molekularnoj epidemologiji, ekogenotoksikologiji, kao i temeljnom istraživanju oštećenja i popravka molekule DNA (Collins, 2004).

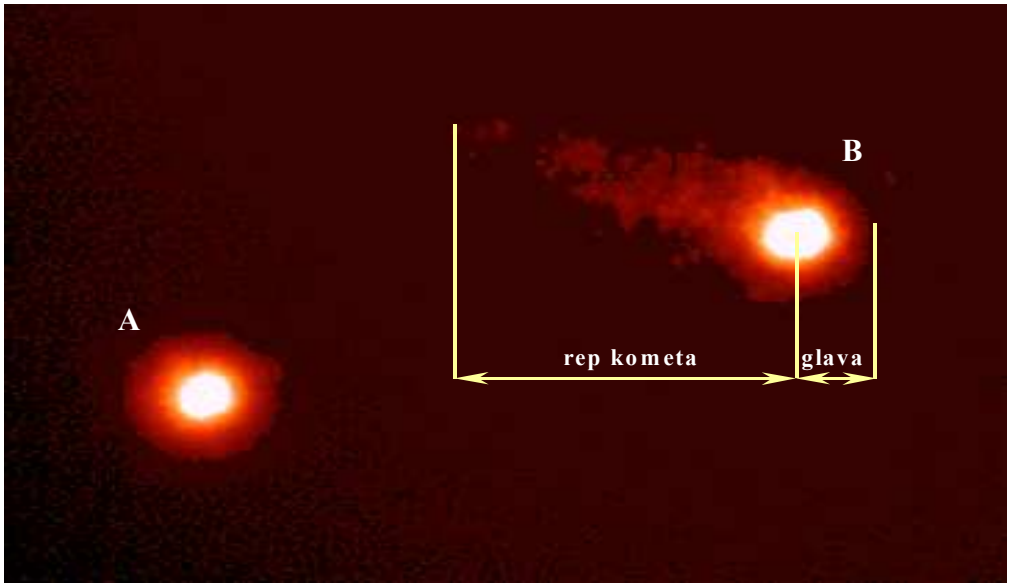
Komet tehnika ili tehnika elektroforeze pojedinačnih stanica u mikrogelu, prvi puta je opisana od strane Östlinga i Johansona, 1984. godine. Olive (1989) te Singh i sur. (1988) objavili su dvije različite inačice izvorne metode, kojima je znatno povećana osjetljivost u detekciji oštećenja molekule DNA i time je učinili jednim od najosjetljivijih tehnika citogenetike. Danas se primjenjuje kao alkalna ili neutralna komet tehnika. Razlika između njih temelji se na pH vrijednosti pufera u kojem se provodi elektroforeza ukupne genomske molekule DNA. Alkalna komet tehnika češće se primijenjuje u citogenetičkim istraživanjima zbog toga što omogućava detekciju velikog broja različitih oštećenja genoma (jednolančani i dvolančani lomovi DNA, nepotpuni ekscizijski popravak, međulančane veze u molekuli DNA, DNA-adukti, apurinska i apirimidinska mjesta, te mjesta DNA-protein veza). Neutralna komet tehnika detektira isključivo dvolančane lomove (Fairbairn i sur., 1995). Obje modifikacije komet tehnike detektiraju oštećenja u pojedinačnoj stanici, čime je moguće utvrditi postojanje razlika u osjetljivosti pojedinih stanica na djelovanje određenog spoja, a što je od velikog značaja u predviđanju odgovora tumorskih stanica na tretman citostaticima (Møller, 2006).

Komet tehnika zasniva se na uklapanju stanica u agarozni gel, njihovoj lizi, denaturaciji genomske DNA (ukoliko se radi o alkalnoj komet tehnici) te elektroforezi, bojanju i analiziranju mikrogelova (Angelis i sur., 1999). Postoji niz različitih načina na koji je moguće stanice uklopiti u agarozni gel. Najčešće se primijenjuje tzv. "sandwich" princip u kojem se na brušeno predmetno staklo nanose slojevi agaroze različitih koncentracija (Møller, 2006).

Preparati se potom uranjaju u pufer za lizu stanica. U sastavu pufera nalazi se etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA), koja će vezati ione metala važne ze stabilizaciju ovojničastih tvorevina stanice. Na taj način olakšat će se razbijanje ovojnica pomoću detergenata, koji su također sastavni dio pufera za lizu (Triton-x). EDTA će ujedno kelirati ione kalcija nužne za aktivnost DNAza i na taj način spriječit će oštećenje stanične DNA do kojeg bi moglo doći oslobađanjem tih enzima. Nakon obrade preparata puferom za lizu, na mjestu na kojem se u gelu nalazila svaka pojedinačna stanica ostat će samo njezina ukupna genomska DNA (Collins i sur., 2001). U alkalnoj inačici komet tehnike, prije elektroforeze preparati se uranjaju u pufer pH vrijednosti 12. Uloga alkalnog pufera je trojaka. Naime, njime se iz gela ispiru ioni i makromolekularni kompleksi nastali lizom stanica koji bi mogli utjecati na migraciju DNA tijekom elektroforeze. Nadalje, u alkalnoj sredini dolazi do induciranja jednolančanih lomova u molekuli DNA i to na mjestima osjetljivim na lužnatu sredinu (međulančane veze u molekuli DNA, DNA-adukti, apurinska i apirimidinska mjesta, mjesta DNA-protein veza). Na taj se način omogućava detekcija tih vrsta oštećenja. Naposlijetku, u lužnatoj sredini dolazi do denaturacije DNA tj. razdvajanja njezinih lanaca čime se omogućava migracija fragmenata nastalih indukcijom jednolančanih lomova. U neutralnoj inačici metode, elektroforezi prethodi ispiranje preparata u destiliranoj vodi radi uklanjanja dijelova liziranih stanica (Fairbairn i sur., 1995).

Pufer za elektroforezu jednak je puferu za denaturaciju (pH 12). Djelovanjem električnog polja dolazi do migracije odlomljenih lanaca denaturirane DNA kroz pore gela prema anodi, dok ukupna DNA, zbog svoje veličine, ostaje na mjestu (Collins i sur., 2001). Ukoliko su u stanici bila prisutna oštećenja molekule DNA, u vidnom polju mikroskopa pojavit će se struktura koja svojim oblikom podsjeća na komet. Naime, odlomljeni fragmenti putovat će kroz gel u električnom polju i nakon bojanja pojavit će se u obliku fluorescirajućeg repa. Preostala genomska DNA neće putovati, a nakon bojanja bit će vidljiva kao glava kometa (Slika 2B). Ukoliko u stanici nisu postojala oštećenja, njezina genomska DNA izgledat će poput fluorescirajućeg kruga (Slika 2A) (Rojas i sur., 1999).

Dva su osnovna parametra koja se mjere ovom tehnikom prilikom procjene intenziteta oštećenja genomske DNA. To su dužina repa, mjerenog od sredine glave kometa do kraja repa, i intenzitet njegove fluorescencije. Kao konačan rezultat tehnike navodi se i treći parametar nazvan repni moment koji se izračunava množenjem dužine i intenziteta repa te dijeljenjem umnoška sa 100 (Collins, 2002).



Slika 2. Shematski prikaz mikrografije komet: (A) stanica bez genomskih oštećenja, (B) stanica s oštećenjima DNA, uz prikaz dužine glave i repa.

Sama izvedba tehnike je jednostavna, a vrijeme trajanja eksperimenta značajno kraće u odnosu na ostale metode. Tako je kod standardnih citogenetičkih tehnika limfocite potrebno uzgajati u kulturi 48, odnosno 72 sata, čime se vrijeme trajanja analize produžava na dva, odnosno tri dana od uzimanja uzorka. Rezultati analize genomskih oštećenja primjenom komet tehnike mogu se dobiti samo nekoliko sati nakon uzimanja uzorka (Møller, 2006).
Komet tehniku je moguće primijeniti i u onim slučajevima kada nam je dostupan samo mali broj stanica jer je za dobivanje reproducibilnih rezultata dovoljno analizirati 50 stanica. Kod klasičnih metoda potrebno je analizirati nekoliko stotina (kod analize kromosomskih aberacija) pa i do tisuću limfocita (kod mikronukleus tehnike).

Komet tehnika se može podjednako uspješno primijeniti i za stanice sisavaca, stanice beskralježnjaka (Salagovic i sur., 1996) i biljaka (Koppen i Verschaeve, 1996), neovisno o tome jesu li izolirane neposredno iz živog organizma ili su uzgojene u kulturi.
Budući da sama izvedba komet tehnike ne zahtijeva uzgoj stanica u kulturi, prilikom izrade preparata nije potrebno osigurati sterilne uvjete rada, što dodatno pojednostavljuje rad i značajno pojeftinjuje analizu genomskih oštećenja. Naime, kod klasičnih citogenetičkih metoda zbog kultivacije stanica uvijek postoji opasnost od virusnih ili bakterijskih zagađenja, koje mogu dovesti do dodatnih oštećenja makromolekule DNA i na taj način utjecati na rezultate analize (IAEA, 2001).

Dodatna prednost komet tehnike je da se u izvedbi ne koriste tvari koje posjeduju mutageni učinak i mogu izazvati dodatna oštećenja DNA. Naime, ukoliko se kolhicin kod analize kromosomskih aberacija, citohalazin B kod mikronukleus tehnike i 5'-bromo-deoksiuridin kod analize izmjene sestrinskih kromatida ne dodaju u pravilnim koncentracijama, mogu dovesti do dodatnih oštećenja DNA, a time i do pogrešnih rezultata. Na temlju tih činjenica, moglo bi se reći da su rezultati dobiveni primjenom komet tehnike vjerodostojniji od onih dobivenih standardnim citogenetičkim metodama (Møller, 2006).

Upravo zbog tih značajki komet tehnika bi mogla biti od velikog značaja u procjeni genotoksičnog učinka pesticida na genom somatskih stanica različitih organizama i procjeni specifičnosti djelovanja na pojedine organe.

1.7. Cilj istraživanja

Karbofuran je jedan od najviše upotrebljavanih insekticida u Hrvatskoj s godišnjom proizvodnjom od otprilike 500 t (Zeljzic i sur., 2008). Svrstan je u II. skupinu pesticida prema toksičnosti (EPA, 2000). Učinci karbofurana dokazani su kao primarno neurotoksični (Maroni i sur., 2000), no poznati su i genotoksični (Yoon i sur., 2001), teratogeni i embriotoksični učinci (Gupta, 1994).

Cilj ovog istraživanja je utvrđivanje genotoksičnog učinka karbofurana na bubreg, jetru, koštanu srž i leukocite, moguće razlike genotoksičnog učinka aktivne tvari karbofurana i njegove formulacije Geocid ST 35, te eventualne specifičnosti karbofurana prema nekom od istraživanih organa miša.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Pokusne životinje

U ovom istraživanju koristili smo miševe muškog spola visokosrodnog soja Swiss albino, starosti 2-3 mjeseca, mase 20-25 g iz uzgoja Zavoda za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Po pet životinja smo držali u istom kavezu, te hranili standardnom hranom za laboratorijske životinje (Standard Diet GLP, 4RF 1, Mucedola, Settimo Milanese MI, Italija), uz stalnu dostupnost vode *ad libitum*. Koristili smo 12-satni režim izmjene dana i noći. Istraživanje smo proveli u skladu sa Zakonom o zaštiti laboratorijskih životinja (NN 19/99) i prema Vodiču za držanje i korištenje laboratorijskuh životinja (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals,* DHHS (NIH) Publ # 86-23).



Slika 2. Laboratorijski miš soja Swiss albino

2.2. Priprema otopina pesticida

U ovom istraživanju koristili smo insekticid karbfuran (2,2-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-il-metilkarbamat) (Sigma-Aldrich) u obliku čiste tvari i formulaciju Geocid ST 35 (Chromos Agro) u tekućem stanju koja sadrži 350 g kabofurana u 1 L.
Miševe smo obrađivali otopinom karbofurana u vrijednosti ADI (0,005 mg/kg/dan) i 1/100 LD_{50} (0,05 mg/kg/dan), te otopinom Geocida ST 35 u dozama ADI i 1/100 LD_{50}.

2.3. Obrada životinja

Miševe soja Swiss albino podijelili smo u 5 skupina sa po 5 jedinki. Životinje smo obrađivali otopinama pesticida peritonealno, svakodnevno tijekom 14 dana uštrcavanjem volumena određene otopine od 0,5 ml. Prvu skupinu miševa obrađivali smo svakodnevno dozom karbofurana u obliku čiste aktivne tvari u vrijednosti dnevno prihvatljivog unosa (ADI – 0,0001 mg/dan. Drugu skupinu miševa obrađivali smo svakodnevno dozom karbofurana u obliku čiste aktivne tvari u vrijednosti 1/100 letalne doze LD_{50} (0,001 mg/dan). Treću skupinu miševa obrađivali je svakodnevno dozom formulacije karbofurana Geocid ST35 koja sadrži aktivnu tvar u vrijednosti dnevno privatljivog unosa za karbofuran (ADI – 0,0001 mg/dan). Četvrtu skupinu miševa obrađivli smo svakodnevno dozom formulacije karbofurana Geocid ST35 koja sadrži aktivnu tvar u vrijednosti 1/100 letalne doze LD_{50} za karbofuran (0,001 mg). U isto vrijeme kontrolnoj skupini svakodnevno smo davali 0,5 ml fiziološke otopine (0,9 % NaCl). Shema obrade životinja prikazana je u Tablici 1.

Tablica 1. Prikaz koncentracija korištenih pesticida u ispitivanjima *in vivo* za miševe u trajanju tretmana od 14 dana.

Pesticidi	Koncentracija mg/kg/dan	Dnevna doza / miš	Ukupna doza (miš /14 dana)
Karbofuran	0.0005 (ADI)	0.0001 mg	0.0014 mg
	0.005 (1/100 LD_{50})	0.001 mg	0.014 mg
Geocid	0.0005 (ADI)	0.0001 mg	0.0014 mg
	0.005 (1/100 LD_{50})	0.001 mg	0.014 mg

2.4. Uzorkovanje tkiva i organa

Petnaestog dana od početka obrade, životinje smo uspavali injekcijom Narketana (3 mg / miš ketamina u 1,5 ml narketana) (Vetocuinol). Uzorke krvi uzeli smo Pasteurovom pipetom nakon presijecanja aksilarnog spleta žila i prenijeli ih u heparinizirani vacutainer (Becton Dickenson). Bubreg i jetru, mehanički smo usitnili u puferu za homogenizaciju pH 7,5 [0,075 M NaCl (Kemika) i 0,024 M Na_2EDTA (Sigma)] ohlađenom na +4 ^{O}C i to u omjeru 1 g tkiva na 1ml pufera. Za vrijeme homogenizacije tkivo smo držali na ledu (Sasaki i sur., 1997a; 1997b; 1977c).

Koštanu srž izolirali smo iz bedrene kosti miša metodom proštrcavanja uz korištenje 2 ml pufera za homogenizaciju pH 7,5 [0,075 M NaCl (Kemika) i 0,024 M Na_2EDTA (Sigma)] ohlađenog na +4 ^{O}C (Sasaki i sur., 1997a; 1997b; 1997c).

2.5. Komet - test

U ovom istraživanju koristili smo metodu alkalnog komet testa (Singh i sur., 1988) uz prilagodbu za procjenu genotoksičnosti u uzorcima organa (Sasaki i sur., 1997).

Neposredno nakon homogenizacije organa izradili smo preparate. Na polimerizirani sloj 0,6%-tne NMP agaroze (Sigma) nanjeli smo suspenziju 4 µl krvi u 100 µl 0,5%-tne LMP agaroze (Sigma). Prilikom izrade preparata za stanice jetre, bubrega i koštane srži, 8 µl homogenata tih organa resuspendirali smo u 100 µl 0,5%-tne LMP agaroze.

Dobivene preparate uronili smo u ohlađeni (4^0C) pufer za lizu [1% natrijev sarkozinat (Sigma), 2,5 M NaCl (Kemika), 100 mM Na_2EDTA (Sigma), 10 mM Tris-HCl (Sigma), 1% Triton X-100 (Sigma) i 10% dimetil sulfoksid (Sigma)] pH 10, te držali na 4^0C jedan sat.

Nakon lize stanica preparati smo stavili u pufer za denaturaciju [0,3 M NaOH (Kemika), 1 mM Na_2EDTA (Sigma)], pH 12 i držali na sobnoj temperaturi kako bi došlo do razdvajanja lanaca DNA. Preparate krvi držali smo u puferu za denaturaciju dvadeset minuta, a preparate stanica jetre, bubrega i koštane srži deset minuta na 0 ^{O}C.

Elektroforezu smo proveli u vodoravnoj kadici za elektroforezu (LifeTechnologies Ltd) u puferu za denaturaciju [0,3 M NaOH (Kemika), 1 mM Na_2EDTA (Sigma)], istosmjernom strujom stalne jakosti 300 mA i napona 19 V u trajanju od 20 minuta za preparate krvi, a 15 minuta za preparate stanica jetre, bubrega i koštane srži.

Nakon neutralizacije i bojanja etidijevim bromidom prema standardnom protokolu, preparate smo analizirali epifluorescentnim mikroskopom Orthoplan (Leitz), uz korištenje pobudne svjetlosti valne dužine 510-560 nm. CCD (Cohu) kamerom snimane su mikrografije svakog pojedinog kometa i kvantitativno analizirane pomoću programa za analizu slike Comet assay II (Perceptive Instruments Ltd., Suffolk, Halstead, UK).

Za svaku pojedinu koncentraciju pesticida, te za svaki promatrani organ, analizirali smo 100 kometa, određujući pri tom dužinu repa u μm i intenzitet repa u postocima DNA koji su migrirali iz genomske DNA u rep.

Kao dodatna dva parametra u procjeni genotoksičnosti karbofurana primjenom komet-testa koristili smo broj jezgara s velikom dužinom repa i broj jezgara s visokim udjelom DNA u repu (Betti i sur., 1994; Moretti i sur., 2000).

2.6. Statistička obrada rezultata

Za statističku obradu rezultata koristili smo program STATISTICA 7,0 (STATsoft).

Rezultate za dužinu i intenzitet repa pojedinih organa prikazali smo kao srednje vrijednosti i standardne devijacije za svaku pojedinu skupinu miševa.

Rezultate za udio jezgara s velikom dužinom repa i udio visokog postotka DNA u repu, pesticidom obrađivanih skupina, prikazali smo kao postotak istih unutar ukupnog broja jezgara analiziranih za pojedini organ unutar skupine. Za svaki pojedini organ životinja iz kontrolne skupine izračunali smo 95. percentilu od izmjerenih vrijednosti dužina repa čime smo dobili graničnu vrijednost dužine repa za jezgre tog organa. Sve jezgre s vrijednostima dužine repa većima od 95. percentile (bilo u kontrolnoj skupini, bilo u obrađenih životinja) označili su kao jezgre s velikom dužinom repa za određeni organ. Jednak princip primijenili smo za određivanje broja jezgara s visokim udjelom DNA u repu. Za svaki organ životinja iz kontrolne skupine izračunali smo 95. percentilu od izmjerenih vrijednosti postotka DNA u repu čime smo dobili graničnu vrijednost za jezgre tog organa. Sve jezgre istog organa u kontrolnih i obrađenih životinja s većim postotkom DNA u repu od graničnog smatrali smo jezgrama s visokim udjelom DNA u repu.

Za utvrđivanje statistički značajne razlike u vrijednostima dužine i intenziteta repa kometa između kontrolne skupine i skupina obrađivanih karbofuranom i Geocidom ST 35 koristili smo Mann-Whitney U-test. Isti test koristili smo za procjenu značajnosti razlika u dužinama i

intenzitetima repova kometa između skupina životinja obrađivanih čistom aktivnom tvari i formulacijom.

Za procjenu statističke značajnosti razlika u broju jezgara s velikom dužinom repa i s visokim postotkom DNA u repu između kontrolne skupine i skupina obrađivanih pesticidom, kao i između skupina obrađivanih aktivnom tvari i formulacijom koristili smo χ^2 –test. Za Mann-Whitney U-test i χ^2 –test statistički značajnom razlikom smatrali smo onu za koju je utvrđen $p<0,05$.

3. REZULTATI

Procjena genotoksičnosti karbofurana provedena je na 5 skupina od po 5 miševa soja Swiss albino. Svakodnevno tijekom 14 dana kontrolna skupina obrađivana je fiziološkom otopinom i.p.. U istom vremenskom periodu prva skupina miševa svakodnevno je obrađivana s 0,0001 mg/kg karbofurana (ADI). Druga skupina svakodnevno obrađivana je karbofurana u dozi od 0,001 mg/kg ($1/100LD_{50}$). Trećoj skupini svakodnevno je injicirano razrijeđenje formulacije Geocid ST 35 u dozi aktivne tvari karbofurana koja odsgovara vrijednosti ADI, a četvrtoj skupini u vrijednosti $1/100LD_{50}$. Petnaestog dana životinje su žrtvovane, a uzorci bubrega, jetre, krvi i koštane srži analizirani su komet testom.

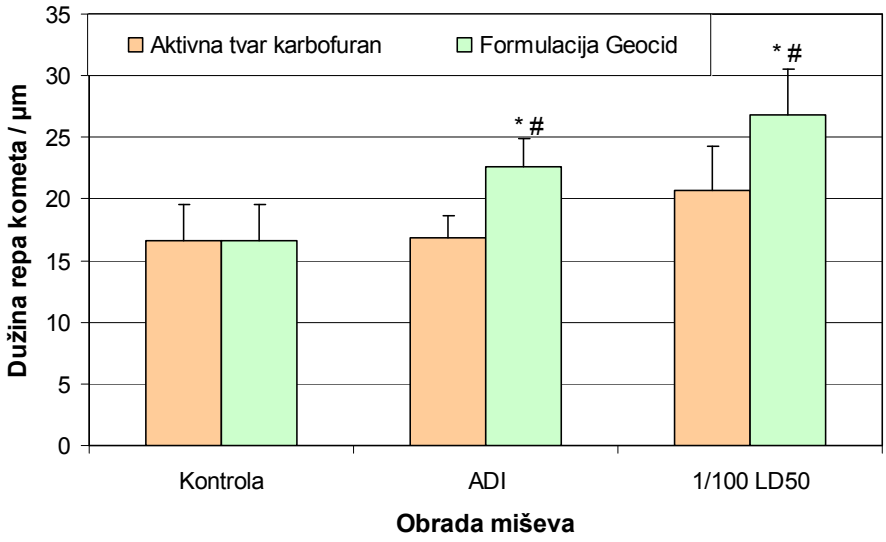
Nakon dvotjedne obrade životinja, u drugoj skupini preživjela je samo jedna jedinka zbog čega ti rezultati nisu u potpunosti relevantni.

3.1. UČINAK KARBOFURANA NA DUŽINU REPA KOMETA U STANICAMA TKIVA OBRAĐENIH ŽIVOTINJA

Na slikama 4-7 prikazane su srednje vrijednosti dužine repa za stanice bubrega, jetre, koštane srži i leukocita životinja obrađivanih karbofuranom i Geocidom ST 35, te kontrolnih životinja.

U stanicama bubrega statistički značajno povećanje ($p<0,05$) vrijednosti dužine repa uočeno je nakon 14-dnevne obrade Geocidom ST 35 u vrijednosti ADI i $1/100\ LD_{50}$ u odnosu na kontrolnu skupinu. Također vrijednosti dužine repa u stanicama bubrega životinja obrađivanih formulacijom značajno su veće ($p<0,05$) u odnosu na stanice bubrega životinja obrađivanih aktivnom tvari (Slika 4).

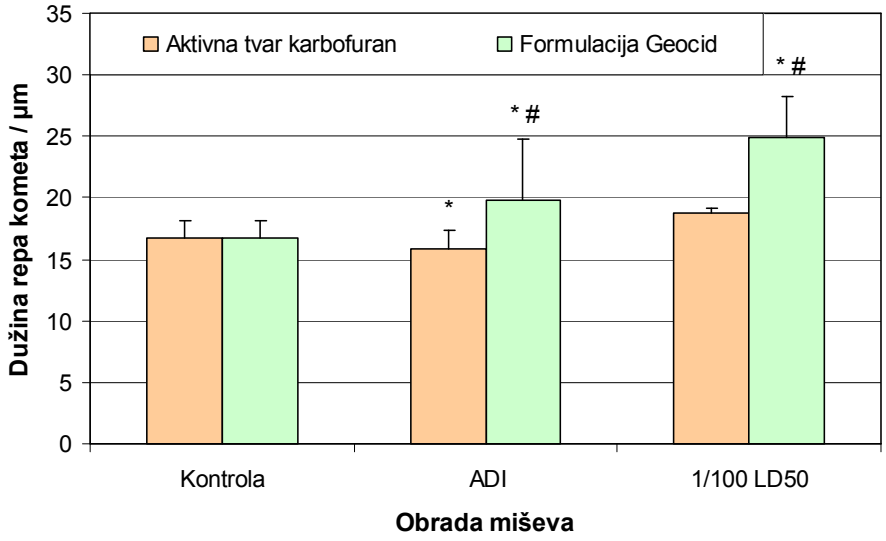
U stanicama jetre statistički značajno povećanje ($p<0,05$) vrijednosti dužine repa u odnosu na kontrolnu skupinu uočeno je nakon 14-dnevne obrade karbofuranom u dozi koja odgovara vrijednosti ADI. Obrada Geocidom ST 35 značajno je povisila vrijednosti repa kometa za obje promatrane doze (ADI i $1/100\ LD_{50}$) u odnosu na kontrolu. Također, vrijednosti dužine repa u stanicama jetre životinja obrađivanih Geocidom ST 35 značajno su veće ($p<0,05$) u odnosu na stanice bubrega životinja obrađivanih aktivnom tvari (Slika 5).



Slika 4. Vrijednosti dužine repa kometa u stanicama bubrega miševa svakodnevno obrađivanih tijekom 14 dana i.p. aktivnom tvari karbofuranom i njezinom formulacijom Geocid ST 35.

* statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu ($p<0,05$)

statistički značajna razlika rezultata dobivenih formulacijom u odnosu na aktivnu tvar ($p<0,05$)



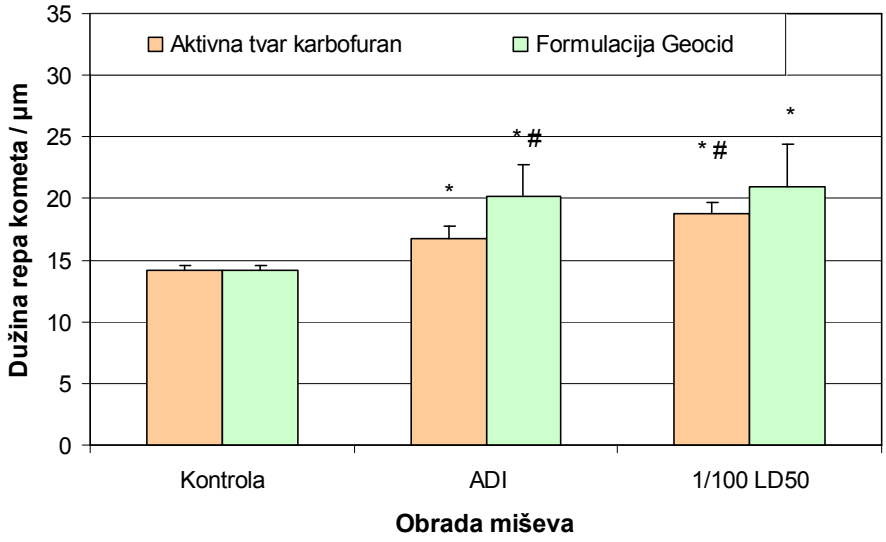
Slika 5. Vrijednosti dužine repa kometa u stanicama jetre miševa svakodnevno obrađivanih tijekom 14 dana i.p. aktivnom tvari karbofuranom i njezinom formulacijom Geocid ST 35.

* statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu ($p<0,05$)

statistički značajna razlika rezultata dobivenih formulacijom u odnosu na aktivnu tvar ($p<0,05$)

U leukocitima su i obrada karbofuranom i obrada Geocidom ST 35, neovisno o dozi, dovele do statistički značajnog povećanja ($p<0,05$) vrijednosti dužine repa u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 6). Ponovno, uzrokovana genetička oštećenja nakon obrade formulacijom Geocid ST 35 značajno su viša ($p<0,05$) od onih za čistu aktivnu tvar.

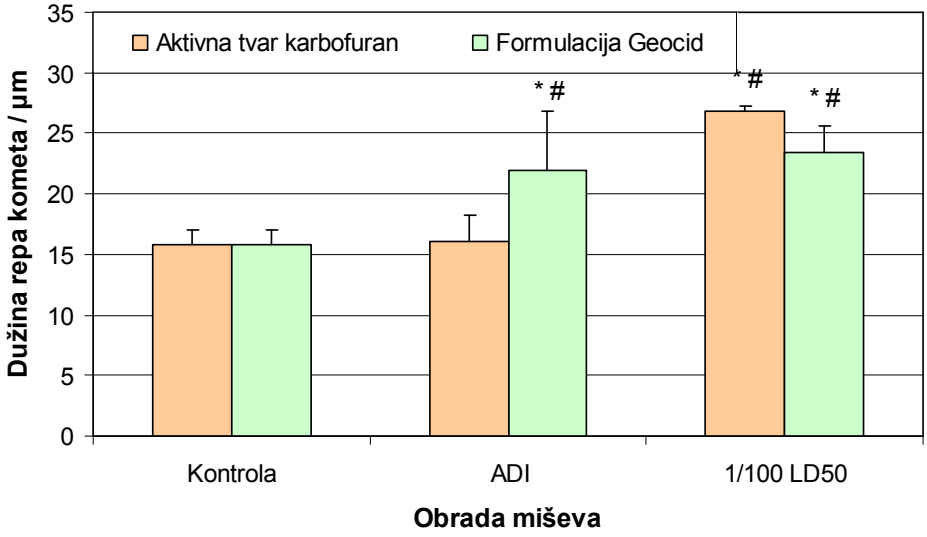
U stanicama koštane srži statistički značajno povećanje vrijednosti dužine repa u odnosu na kontrolnu skupinu uočeno je nakon 14-dnevne obrade aktivnom tvari u u dozi od 1/100 LD_{50} te Geocidom ST 35 u dozama koje odgovaraju vrijednostima ADI i 1/100 LD_{50} ($p<0,05$). Vrijednosti dužine repa u stanicama koštane srži životinja obrađivanih formulacijom značajno su veće ($p<0,05$) u odnosu na stanice koštane srži životinja obrađivanih aktivnom tvari (Slika 7).



Slika 6. Vrijednosti dužine repa kometa u leukocitima miševa svakodnevno obrađivanih tijekom 14 dana i.p. aktivnom tvari karbofuranom i njezinom formulacijom Geocid ST 35.

* statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu ($p<0,05$)

statistički značajna razlika rezultata dobivenih formulacijom u odnosu na aktivnu tvar ($p<0,05$)



Slika 7. Vrijednosti dužine repa kometa u stanicama koštane srži miševa svakodnevno obrađivanih tijekom 14 dana i.p. aktivnom tvari karbofuranom i njezinom formulacijom Geocid ST 35.

* statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu ($p<0,05$)

statistički značajna razlika rezultata dobivenih formulacijom u odnosu na aktivnu tvar ($p<0,05$)

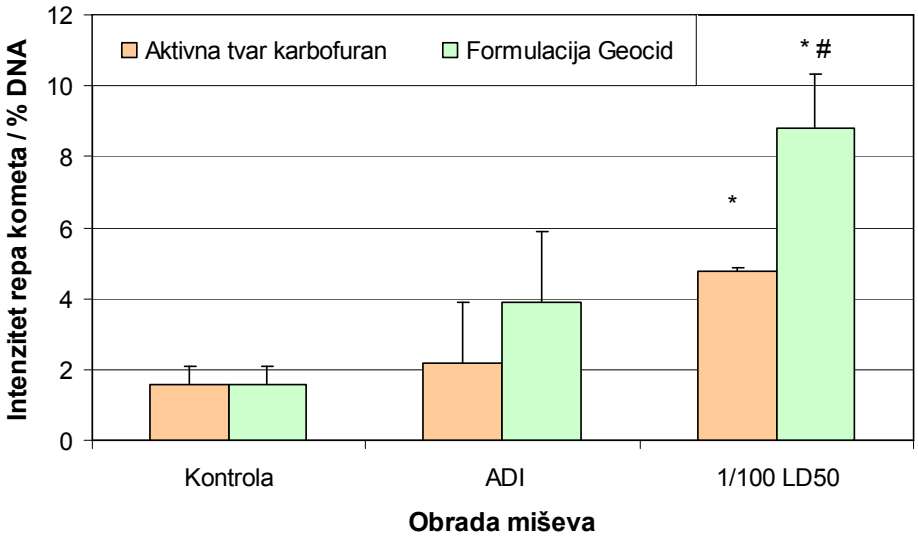
3.2. UČINAK KARBOFURANA NA POSTOTAK DNA U REPU KOMETA U STANICAMA TKIVA OBRAĐENIH ŽIVOTINJA

Na slikama 8-11 prikazane su srednje vrijednosti intenzitetaa repa za stanice bubrega, jetre, koštane srži i leukocita životinja obrađivanih karbofuranom i Geocidom ST 35 i kontrolnih životinja.

U stanicama bubrega statistički značajno povećanje ($p<0,05$) vrijednosti intenziteta repa u odnosu na kontrolnu skupinu uočeno je i za obradu karbofuranom i za obradu Geocidom ST 35obrade u dozi 1/100 LD_{50}. Obrada formulacijom u dozi vrijednosti 1/100 LD_{50} značajno je povisila ($p<0,05$) udio DNA u repu kometa u odnosu na stanice bubrega životinja obrađivanih aktivnom tvari (Slika 8).

U stanicama jetre statistički značajno povećanje ($p<0,05$) vrijednosti intenziteta repa u odnosu na kontrolnu skupinu uočeno je nakon 14-dnevne obrade aktivnom tvari u vrijednosti 1/100 LD_{50} te Geocidoom ST 35 u vrijednosti ADI i1/100 LD_{50}. Vrijednosti intenziteta repa nakon

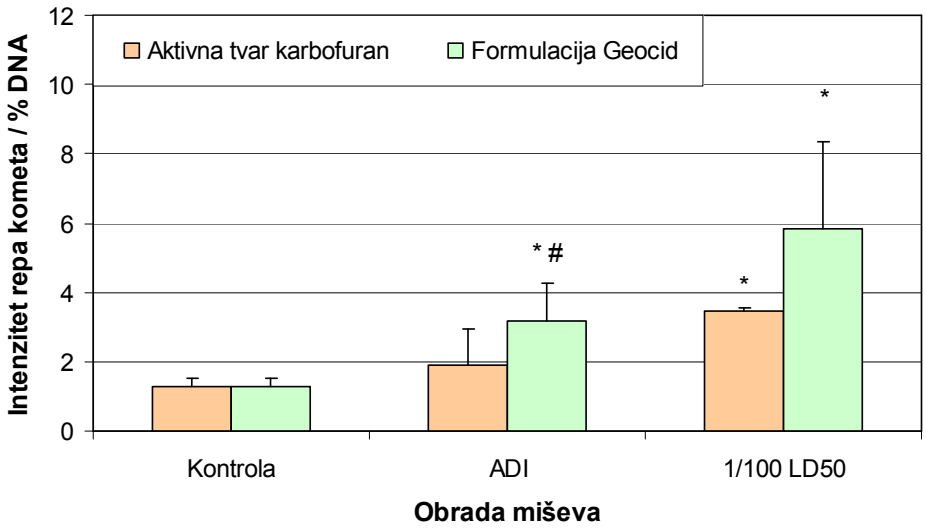
obrade formulacijom bile su značajno veće ($p<0,05$) u odnosu na stanice bubrega životinja obrađivanih aktivnom tvari samo za dozu u vrijednosti ADI (Slika 9).



Slika 8. Vrijednosti intenziteta repa kometa u stanicama bubrega miševa svakodnevno obrađivanih tijekom 14 dana i.p. aktivnom tvari karbofuranom i njezinom formulacijom Geocid ST 35.

* statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu ($p<0,05$)

statistički značajna razlika rezultata dobivenih formulacijom u odnosu na aktivnu tvar ($p<0,05$)

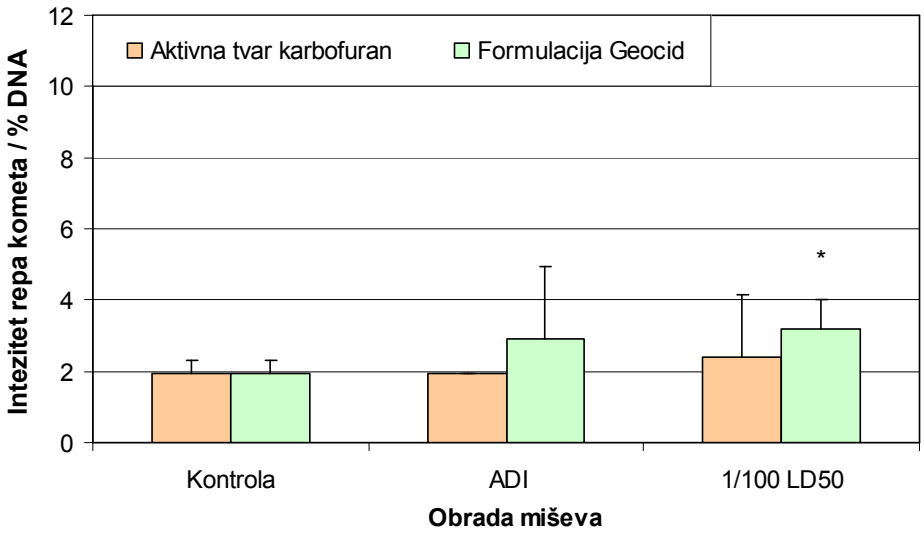


Slika 9. Vrijednosti intenziteta repa kometa u stanicama jetre miševa svakodnevno obrađivanih tijekom 14 dana i.p. aktivnom tvari karbofuranom i njezinom formulacijom Geocid ST 35.

* statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu ($p<0,05$)

statistički značajna razlika rezultata dobivenih formulacijom u odnosu na aktivnu tvar ($p<0,05$)

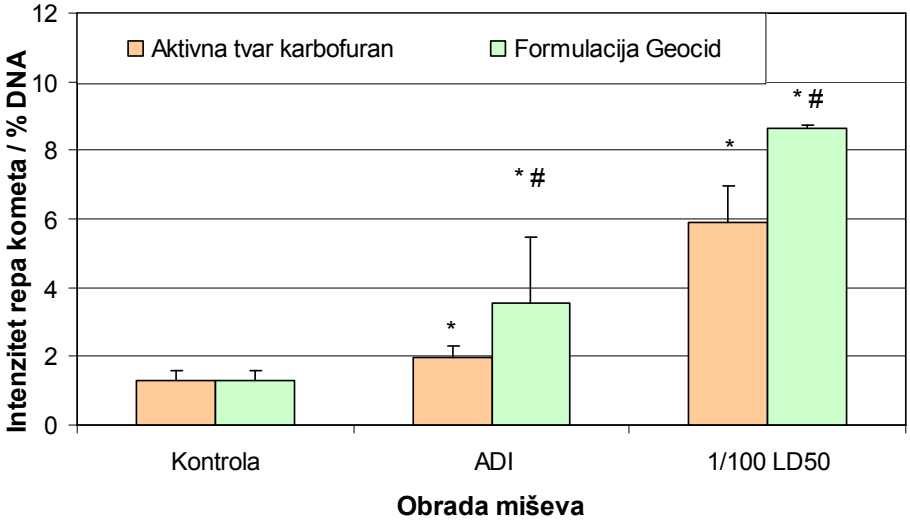
U leukocitima statistički je u odnosu na kontrolnu skupinu jedino obrada Geocidom ST 35 značajno povisila ($p<0,05$) vrijednosti intenzitea repa i to samo u dozi 1/100 LD_{50} (Slika 10). U stanicama koštane srži statistički značajno povećanje ($p<0,05$) vrijednosti intenziteta repa u odnosu na kontrolnu skupinu uočeno je i za karbofuran i za Geocid ST 35 za obje korištene doze (ADI, 1/100 LD_{50}). Udio DNA u repu stanicama koštane srži životinja obrađivanih formulacijom značajno su veće ($p<0,05$) u odnosu na stanice koštane srži životinja obrađivanih aktivnom tvari (Slika 11).



Slika 10. Vrijednosti intenziteta repa kometa u leukocitima miševa svakodnevno obrađivanih tijekom 14 dana i.p. aktivnom tvari karbofuranom i njezinom formulacijom Geocid ST 35.

* statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu ($p<0,05$)

statistički značajna razlika rezultata dobivenih formulacijom u odnosu na aktivnu tvar ($p<0,05$)



Slika 11. Vrijednosti intenziteta repa kometa u stanicama koštane srži miševa svakodnevno obrađivanih tijekom 14 dana i.p. aktivnom tvari karbofuranom i njezinom formulacijom Geocid ST 35.

* statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu ($p<0,05$)

statistički značajna razlika rezultata dobivenih formulacijom u odnosu na aktivnu tvar ($p<0,05$)

3.3. BROJ JEZGARA U ANALIZIRANIM ORGANIMA MIŠEVA S VELIKOM DUŽINOM REPA KAO POSLJEDICA GENOTOKSIČNOG UČINKA KARBOFURANA

Tablica 2 prikazuje postotke jezgara s velikom dužinom repa u stanicama bubrega, jetre, koštane srži i leukocita, s obzirom na graničnu vrijednost 95. percentile u kontrolnoj skupini za taj isti organ.

U stanicama bubrega statistički značajno povećan ($p<0,05$) udio jezgara s velikom dužinom repa u odnosu na kontrolnu skupinu zabilježen je za aktivnu tvar u dozi 1/100 LD_{50}, te za Geocid ST 35 u dozama ADI i 1/100 LD_{50}.

U stanicama jetre udio jezgara s velikom dužinom repa u odnosu na kontrolnu skupinu bio je statistički značajno viši ($p<0,05$) u skupinama obrađenima aktivnom tvari u dozi 1/100 LD_{50} i Geocidom ST 35 u dozama ADI i 1/100LD_{50}.

Statistički značajno povećanje udjela jezgara s velikom dužinom repa u stanicama koštane srži u odnosu na kontrolnu skupinu utvrđeno je pri obradi karbofuranom u dozi 1/100LD_{50}, te Geocidom ST 35 u dozama ADI i 1/100LD_{50}.

U leukocitima je statistički značajno povećanje ($p<0,05$) udjela jezgara s velikom dužinom repa u odnosu na kontrolnu skupinu uočeno samo pri obradi Geocidom ST 35 i to za obje korištene doze formulacije ADI i 1/100LD_{50}.

Tablica 2. Udio jezgara s dužinom repa većom od vrijednosti 95. percentile za dužine repa kontrolnih mjerenja (jezgre s dugim repom) u stanicama bubrega, jetre, koštane srži i leukocita miševa svakodnevno obrađivanih tijekom 14 dana i.p. aktivnom tvari karbofuranom i njezinom formulacijom Geocid ST 35.

Obrada	Doza	Bubreg	Jetra	Koštana srž	Leukociti
Kontrola		4,98	4,75	4,95	4,49
Karbofuran	ADI	0,18	8,95	9,98	11,44
	1/100 LD_{50}	29,47*	27,48*	28,52*	N.O.
Geocid ST 35	ADI	16,82*	24,49*	59,41*	16,81*
	1/100 LD_{50}	36,03*	31,97*	38,34*	29,92*

* statistički značajna ($p<0,05$) razlika u odnosu na kontrolnu skupinu

3.4. BROJ JEZGARA U ANALIZIRANIM ORGANIMA MIŠEVA S VISOKIM UDJELOM DNA U REPU KAO POSLJEDICA GENOTOKSIČNOG UČINKA KARBOFURANA

Tablica 3 prikazuje udjele jezgara s visokim postotkom DNA u repu u stanicama bubrega, jetre, koštane srži i leukocitima miševa, s obzirom na graničnu vrijednost 95. percentile u kontrolnoj skupini za svaki pojedini organ.

U stanicama bubrega, statistički značajno povećanje ($p<0,05$) udjela jezgara s visokim postotkom DNA u repu u odnosu na kontrolnu skupinu uočeno je samo nakon obrade Geocidom ST 35 i to u dozama ADI i $1/100LD_{50}$.

U stanicama jetre, obrada karbofuranom u dozi u vrijednosti $1/100LD_{50}$ i Geocidom ST 35 u dozama ADI i $1/100LD_{50}$ dovela je do statistički značajnog povećanja ($p<0,05$) udjela jezgara s visokim postotkom DNA u repu u odnosu na kontrolne vrijednosti.

Statistički značajno povećanje ($p<0,05$) broja jezgara s visokim postotkom DNA u repu stanica koštane srži zabilježeno je nakon obrade karbofuranom u dozi $1/100LD_{50}$, te Geocidom ST 35 u dozama ADI i $1/100LD_{50}$.

U leukocitima je statistički značajno povećanje ($p<0,05$) udjela jezgara s visokim postotkom DNA u repu u odnosu kontrolu zabilježeno nakon obrade životinja karbofuranom i Geocidom ST 35 za obje korištene doze.

Tablica 3. Udio jezgara s intenzitetom većim od vrijednosti 95. percentile za intenzitet repa kontrolnih mjerenja stanicama u bubrega, jetre, koštane srži i leukocitima miševa svakodnevno obrađivanih tijekom 14 dana i.p. aktivnom tvari karbofuranom i njezinom formulacijom Geocid ST 35.

Obrada	Doza	Bubreg	Jetra	Koštana srž	Leukociti
Kontrola		5,01	4,75	4,96	4,94
Karbofuran	ADI	9,61	9,14	3,44	11,47*
	$1/100\ LD_{50}$	9,63	18,48*	25,14*	10*
Geocid ST 35	ADI	24,15*	19,19*	13,59*	8,29*
	$1/100\ LD_{50}$	29,09*	28,59*	28,91*	12,13*

* statistički značajna ($p<0,05$) razlika u odnosu na kontrolnu skupinu

4. RASPRAVA

Zbog potreba razvoja moderne civilizacije, u nekoliko posljednjih desetljeća uporaba pesticida u poljoprivredi i kućanstvima uvelike se povećava, a s njom raste i zabrinutost zbog mogućeg štetnog utjecaja pesticida na ljudsko zdravlje. Od sredine prošlog stoljeća pesticidi su bili jedan od pokretača gospodarskog razvoja i populacijske eksplozije jer su omogućili proizvodnju čak i prekomjernih količina hrane po niskim cjenama. Međutim, nedovoljna pozornost posvećivala se mogućim nuspojavama njihove primjene jer njihova osnovna karakteristika i namjera je da djeluju toksično. Mnoga citogenetička i epidemiološka istraživanja ukazala su na potencijalnu opasnost pesticida po zdravlje ljudi, posebno osoba koje su u izravnom doticaju s njima, kao i krajnjh korisnika poljoprivrednih proizvoda (Guzzella i sur., 2005; Pohl i sur., 2008).

Istraživanje u okviru ovog diplomskog rada proveli smo s ciljem procjene genotoksičnog djelovanja karbofurana. Prvi cilj nam je bio ispitati moguću razliku genotoksičnog djelovanja karbofurana kao aktivne tvari i njegove formulacije Geocid ST 35. Karbofuran danas postoji u obliku velikog broja formulacija koje sadrže različite „inertne tvari" koje mogu pojačavati, smanjivati ili mijenjati mehanizam djelovanja aktivne tvari (Gupta, 1994). U Republici Hrvatskoj su zakonom dozvoljene vrijednosti koncentracija pesticida u hrani, vodi i zraku radnih prostora regulirane temeljem toksikoloških spoznaja dobivenih procjenama učinka čiste aktivne tvari, međutim, u doticaju s pesticidom čovjek je izložen formulaciji sa svim njezinim sastavnicama. Točan sastav tekuće fiormulacije Geocid ST 35 je nepoznat budući je on poslovna tajna proizvođača. Poznata je jedino koncentracija karbofurana u formulaciji (350 g/l). Za procjenu genotoksičnog učinka karbofurana pojedinačno ili u formulaciji koristili smo koncentracije koje odgovaraju vrijednostima 1/100 LD_{50} i dopuštenom dnevnom unosu (ADI). Ujedno, željeli smo ispitati genotoksični učinak ovog insekticida na četiri različita organa (bubregu, jetri, leukocitinma u krvi i koštanoj srži) miševa, kako bismo vidjeli postoji li specifičnost aktivne tvari za neki od njih. Također nas je zanimalo ispoljavaju li aktivna tvar i njezina formulacija razlike u specifičnosti učinka. U procjeni smo koristili metodu alkalnog komet-testa (Singh i sur., 1988) kojom smo detektirali primarna oštećenja u molekuli DNA (jednostruki i dvostruki lomovi, mjesta nepostojana u lužnatoj sredini, mjesta nepotpunog ekscizijskog popravka i mjesta s ukriženo povezanim lancima).

Naši rezultati pokazali su da se genotoksični potencijal karbofurana i Geocida razlikuju u intenzitetu. Značajno veća oštećenja DNA utvrđena su u skupinama obrađenim Geocidom u

odnosu na skupine obrađene istim dozama karbofurana. Ovakva razlika u učinku zabilježena je analizom oba promatrana parametra komet-testa (dužina repa i intenzitet repa) za jetru, bubreg i koštanu srž, dok u leukocitima nije utvrđena značajna razlika za dužine repa uzrokovanih karbofuranom i Geocidim (Slika 10, Tablica 3). Solenovski i sur. (2008) su na stanicama ovarija kineskog hrčka (CHO_{K1}) u uvjetima *in vitro* također dokazali značajnu razliku u citotoksičnom i genostoksičnom učinku karbofurana i njegove formulacije Furadan, te je pokazana veća citotoksičnost i genotoksičnost formulacije.

U ranije objavljenim istraživanjima drugih autora ukazano je na postojanje različitih mogućih genotoksičnih učinaka karbofurana. Na bakteriji *Escherichia coli* (Saxena i sur., 1997) uočeno je povećano mutageno djelovanje karbofurana, ali ono nije bilo statistički značajno. U stanicama ovarija kineskog hrčka obrada karbofuranom u uvjetima *in vitro* dovela je do statistički značajne pojave mikronukleusa (Soloneski i sur., 2008). Pokusima *in vitro* je, također, utvrđeno da karbofuran inducira primarna oštećenja DNA koja se detektiraju komet testom (Naravaneni i Jamil, 2005). Primjenom komet testa ujedno je dokazano da karbofuran dovodi do stvaranja adukata na molekuli DNA (Zhou i sur., 2005). Rezultati navedenih autora u istraživanjima *in vitro* u suglasju su s rezultatima dobivenim našim istraživanjem. Nadalje, u uvjetima *in vitro*, u neuronima štakora dokazano je da pesticid dovodi do povećane fragmentacije DNA (Kim i sur., 2004). Međutim, ista nije utvrđena na fibroblastima pluća kineskog hrčka (Yoon i sur., 2001). Yoon i sur. (2001) nisu uspjeli pokazati apoptotičku aktivnost karbofurana, dok su Kim i sur. (2004) pokazali da karbofuran inducira fragmentaciju DNA kao i apoptozu u kulturi stanica kore mozga štakora. Genotoksično djelovanje karbofurana potvrđeno je i analizom kromosomskih aberacija. Naravaneni i Jamil (2005) utvrdili su da karbofuran inducira kromatidne lomove u limfocitima čovjeka *in vitro.*

Povećanje kromosomskih aberacija djelovanjem karbofurana utvrđeno je u leukocitima miševa *in vivo* (Chauhan i sur., 2000). Ujedno zabilježeno je značajno povečanje učestalosti izmjene sestrinskih kromatida (Gentile i sur., 1982), kao i abnormalnosti spermija (Chauhan i sur., 2000). Porast učestalosti izmjene sestrinskih kromatida pokazan je i u stanicama jajnika kineskog hrčka (Lin i sur., 2007), te u šatakora (Aly, 1998) u uvjetima *in vivo.* Djelić i sur. (2006) i Tichmenko (1995) dokazali su da izloženost karboforanu kod domaćih životinja može dovesti do povećanja frekvencije kromosomskih aberacija, ali iako sam mehanizam tog djelovanja nije jasan, autori smatraju da je oštećenje genoma uzrokovano disbalansom androgenih hormona i tiroksina uslijed djelovanja pesticida.

Moguća genotoksičnost karbofurana procijenjena je i provođenjem epidemioloških studija na ljudskim populacijama koje su profesionalno izložene pesticidima s karbofuranom kao

aktivnom tvari tijekom proizvodnje i primjene. Bhalli i sur. (2006) su metodom komet-testa detektirali značajno duže repove kometa u limfocitima radnika zaposlenih u proizvodnji pesticida, no nisu uspjeli dokazati povezanost intenziteta oštećenja DNA s duljinom zaposlenosti. Želježić i sur. (2009) su dokazali da formulacija karbofurana zajedno s klorpirifom, metalaksilom i dodinom inducira značajno povečanje učestalosti translokacija u limfocitima radnika industrijskih postrojenja dugoročno izloženih malim dozama pesticida. Isti autori već su ranije utvrdili značajno povećanje učestalosti broja mikronukleusa u limfocitima radnika u postrojenjima za proizvodnju karbofurana (Želježić i sur., 2007). Provedene epidemiološke studije ukazale su na povećani rizik od raka pluća (Usmani i sur., 2004) i ne-Hodgkins-ovog limfoma (Zheng i sur., 2001) kod osoba izloženih karbofuranu.

Rezultati našeg istraživanja ukazali su na najveću razinu oštećenja genoma djelovanjem karbofurana u stanicama bubrega. Karbofuran ima eliminacijski poluživot od 20 minuta do 8 sati, te se u tom vremenu 89 % karbofurana iz organizma izluči urinom (Ferguson, 1984). U bubrezima, ujedno, dolazi do koncentriranja spojeva iz plazme koji se izlučuju mokraćom. Samim tim koncentracija karbofurana i njegovih produkata je veća, nego u krvi. Stoga su stanice bubrega izložene povećanom riziku od oštećenja genoma. To bi mogao biti glavni razlog veće razine lezija u stanicama bubrega nakon obrade karbofuranom i Geocidom. Na to ukazuju i rezultati komet testa na kontrolnim životinjama. U tih miševa bazalna razina oštećenja DNA najveća je u stanicama bubrega. Ti rezultati u suglasju su s istraživanjem koje su proveli Fairbairn i sur. (1994), a kojim je pokazano da, u usporedbi s ostalim organima, molekula DNA stanica bubrega sadrži veći broj područja osjetljivih na lužnatu sredinu koja se detektiraju komet testom.

Zbog središnje uloge jetre u metabolizmu karbofurana pretpostavili smo da će u hepatocitama genotoksični učinak karbofurana biti najizraženiji. Međutim, početna pretpostavka nije potvrđena dobivenim rezultatima jer se genom stanica jetre nije pokazao najosjetljivijim (Slika 9; Tablica 3). Iako je značajno povećanje oštećenja DNA izraženo parametrima dužina i intenzitet repa utvrđeno u stanicama jetre svih skupina miševa obrađivanih karbofuranom i Geocidom, ono je bilo niže od onih detektiranih u stanicama bubrega za oba parametra (Slika 4, 5, 8, 9). U stanicama jetre dobili smo veću dužinu, ali manji intenzitet repa od stanica koštane srži (Slika 5, 7, 9, 11). Ranijim istraživanjima utvrđeno je da se u jetri čovjeka i sisavaca karbofuran prevodi u metabolite 3-hidroksikarbofuran i 3-ketokarbofurana te u konačnici nastaje 3-ketokarbofuran-7-fenol (Usmani i sur., 2004). Zhou i sur. (2005) dokazali su da metaboliti 3-hidroksikarbofurana i 3-ketokarbofurana posjeduju genotoksičan učinak. Međutim, druga istraživanja metabolizma karbofurana u hepatocitama čovjeka *in vitro*

pokazala su da je zbog razlike u aktivnosti metaboličkih enzima metabolizam karbofurana u čovjeka manjeg je intenziteta nego u glodavaca. Kvalitativno se metaboliti karbofurana kod čovjeka i glodavaca ne razlikuju, ali su pokazane značajne kvantitativne razlike, prema kojima u humanim hepatocitama nastaje puno manji broj matabolita (Usmani i sur., 2004). Nadalje, pokazano je da, iako su međuprodukti metaboličke transformacije karbofurana genotoksični (Pilinskaia i Stepanova, 1984), konačan metabolit 3-ketokarbofuran-7-fenol ne djeluje na genom. Navedenim spoznajama moguće je objasniti dobivene rezultate koji nisu ukazali na najvišu razinu genotoksičnog učinka karbofurana i Geocida u stanicama jetre.

Značajna oštećenja molekule DNA utvrdili smo i u stanicama koštane srži. Karbofuran kao aktivna tvar ispoljio je značajan genotoksični učinak samo u dozi 1/100 LD_{50} dok je formulacija djelovala genotoksično i u dozi koja odgovara vrijednosti ADI (Slika 11). Ranijim istraživanjima koja su proveli Georges-Gridelet i sur. (1982), te Chauchan i sur. (2000) također je pokazano da karbofuran posjeduje genotoksični učinak u stanicama koštane srži miša inducirajući nastanak kromosomskih aberacija i formaciju mikronuklea. Jedan od mogućih razloga za izrazito visoku razinu oštećenja u genomu stanica koštane srži mogao bi biti visoka mitotička aktivnost stanica koštane srži kao krvotvornog organa. Dokazano je da su mitotički aktivna tkiva, s visokim udjelom matičnih stanica, osjetljivija na genotoksičan učinak od diferenciranih tkiva (Sekihash i sur., 2002). Iako postoje istraživanja na miševima koja potvrđuju genotoksičnost karbofurana na stanice koštane srži, dodatnu potvrdu naših rezultata nije moguće naći u epidemiološkim studijama, jer ni jedna od njih nije pokazala značajnu korelaciju između izlaganja karbofuranu i razvoja leukemije (Bonner i sur., 2005). Međutim, dokazani su različiti negativni učinci karbofurana na krvotvorno tkivo. Hoogduijn i sur. (2006) ispitivali su utjecaj karbofurana na preživljavanje, proliferaciju i diferencijaciju humanih mezenhimalnih matičnih stanica (MSC) koštane srži u uvjetima *in vitro*. Dokazali su da izloženost mikromolarnim vrijednostima karbofurana u stanicama značajno reducira aktivnost enzima AChE i značajno smanjuje sposobnost njihove diferencijacije. Istraživanje na miševima obrađenim formulacijom karbofurana Furadamom pokazalo je da karbofuran uzrokuje smanjenje razine hemoglobina, ukupnog broja eritrocita, razine sedimentacije i vrijednost hemoglobina (Gupta i sur., 1982).

Rezultati dobiveni za leukocite ukazuju na relativno nisku razinu oštećenja DNA u usporedbi s ostalim ispitivanim organima. Ranija istraživanja drugih autora na limfocitima čovjeka u uvjetima *in vitro* ukazala su na predominantni aneugeni učinak karbofurana koji je uočen već pri koncentraciji ekvivalentnoj dozi dnevno prihvatljivog unosa (Mladinic i sur., 2009). Das i

sur. (2007), kao i Naravaneni i Jamil (2005) pokazali su da limfocitima čovjeka u uvjetima *in vitro* karbofuran dovodi do strukturnih oštećenja kromosoma.

Naši rezultati ukazali su na značajne razlike u genotoksičnom potencijalu karbofurana i njegove formulacije Geocid ST 35. Značajno veća razina oštećenja genoma, primjenom alkalnog komet-testa, uočena je u svim ispitivanim organima nakon obrade formulacijom u odnosu na aktivnu tvar. Bitno je istaknuti da smo nakon obrade Geocidom već pri dozi jednakoj vrijednosti ADI uočili značajan porast dužine i intenziteta repa, čak i kada on nije bio uočen za karbofuran (Slika 4-11; Tablica 2-3). Dobiveni rezultati ukazuju da kemijski spojevi sadržani u formulaciji ili sami posjeduju genotoksičan učinak ili pojačavaju genotoksičnost aktivne tvari. Nažalost, točan sastav fromulacije nije moguće saznati tako da ne možemo točno odrediti doprinos „inertnih tvari" dobivenim rezultatima. Nedavna istraživanja toksičnih učinaka pesticida sve više ističu razlike u intenzitetu učinka aktivnih tvari i njihovih formulacija. Moreno i sur. (2008) upravo zbog problema toksičnosti „inertnih" tvari istaknuli su potrebu ispitivanja toksičnosti čitavih formulacija, prije registracije određenog pesticida i stavljanja na tržište. Istražujući učinkovitost deset različitih formulacija istog piretroidnog insekticida autori su dokazali da različite formulacije pojedinog pesticida s istim sadržajem aktivne tvari imaju značajne razlike u toksičnosti. Sobrero i sur. (2007) su također dokazali veću fitotoksičnost formulacije RoundupMax herbicida glifosata, od samog pesticida pri istim koncentracijama aktivne tvari. Brojne su i studije koje ukazuju na toksično djelovanje samih „inertnih" tvari (Reigart i Roberts, 2006). Temeljem takvih istraživanja došlo se do spoznaja da „inertne tvari" iako ne posjeduju pesticidno djelovanje nisu biološki inaktivne te mogu predstavljati rizik po zdravlje čovjeka i okoliš (Moreno i sur., 2008).

5. ZAKLJUČAK

Rezultati procjene genotoksičnosti karbofurana i Geocida ST 35 primjenom alkalnog komet testa na stanicama bubrega, jetre, koštane srži i leukocitima miševa upućuju na sljedeće zaključke:

- U uvjetima *in vivo* u kojima je provedeno ovo istraživanje i karbofuran i Geocid ST 35 doveli su do nastanka oštećenja molekule DNA u organima miševa u razini koju je moguće detektirati primjenom komet-testa.

- Formulacija karbofurana Geocid ST 35 u svim je ispitivanim organima pokazala veći genotoksični učinak od samog pesticida za jednaku dozu aktivne tvari.

- Značajno povećanje dužine i intenziteta repa kometa u stanicama jetre, koštane srži i leukocitima u dozi od 1/100 LD_{50} ukazuje na genotoksičan učinak karbofurana kao aktivne tvari u uvjetima *in vivo* u tim organima.

- Budući da je nakon obrade karbofuranom u stanicama bubrega značajan porast vrijednosti uočen samo za parametar intenziteta repa kometa i to isključivo za dozu od 1/100 LD_{50} možemo reći da karbofuran u stanicama bubrega ispoljava ograničeni genotoksičan učinak.

- Značajno povećanje dužine i intenziteta repa kometa u stanicama bubrega, jetre, koštane srži i leukocitima u dozi od 1/100 LD_{50} ukazuje na genotoksičan učinak formulacije Geocid ST 35 u uvjetima *in vivo* u svim ispitivanim organima.

- Visoka razina genomskih oštećenja koja je dovela do istovremenog značajnog porasta vrijednosti oba parametra komet-testa pri obradi Geocidom ST 35 u vrijednosti prihvatljivog dnevnog unosa karbofurana (ADI) uočena je u stanicama jetre i koštane srži.

- Primjenom doze u vrijednosti ADI kabofuran nije ni u jednom od ispitivanih organa doveo do toliko visoke razine oštećenja DNA da bi ono rezultiralo istovremenim značajnim povišenjem vrijednosti dužine i intenziteta repa.

- Niža razina genomskih oštećenja nakon obrade u vrijednosti ADI koja je rezultirala značajnim porastom jednog od parametara komet testa za Geocid ST 35 uočena je u stanicama bubrega i leukocitima, a za karbofuran u stanicama jetre, koštane srži i leukocitima.

- Budući su u stanicama ni jednog od ispitivanih organa nije utvrđena značajno povećana razina genomskih oštećenja u odnosu na ostale organe možemo reći da karbofuran ni Geocid ST 35 nisu pokazali specifičnost učinka s obzirom na ispitivane organe.

6. LITERATURA

1. Aly M. S. (1998): Chromosomal damage induced in adult mice by carbofuran. Egyptian German Society of Zoology **26C:** 1-10.
2. Angelis K. J., Dušinska M., Collins A. R. (1999): Single cell gel electrophoresis: detection of DNA damage at different levels of sensitivity. Electrophoresis **20:** 1923-1933.
3. Anwar W. A. (1997): Biomarkers of Human Exposure to Pesticides. Environmental Health Perspectives **105:** 801-806.
4. Barnet J. B., Spyker-Cramner J.M., Avery D.L., Hoberman A. M. (1980): Immunocompetence over the life span of mice exposedin utero to carbofuran or diazinom. I. Changesin serum immunoglobulin concentracions. Journal of Environmental Pathology and Toxicology **4:** 53-63.
5. Baron R. L. (1991): Carbamate insecticides. U: Hayes, W. J., Laws, E. R., (ur.) Handbook of Pesticide Toxicology. New York, Academic Press, str. 3-6.
6. Benford D. (2000): The acceptable daily intake. Internacional. Life Sciencific Institute Press, Washington DC.
7. Betti C., Davini T., Giannessi L., Loprieno N., Barale R. (1994): Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. Mutation research **307:** 323-33.
8. Bonner M. R., Lee W. J., Sandler D. P., Hoppin J. A., Dosemeci M., Alavanja M. C. R. (2005): Occupational exposure to carbofuran and the incidence of cancer in the agricultural health study. Environmental Health Perspectives **113:** 285–289.
9. Borchers A. T., Chang C., Carl L., Gershwin M. E. (2007): Airborne environmental injuries and human health. Clinical Reviews in Allergy and Immunology **31:** 1-100.
10. Chauhan L. K., Pant N., Gupta S. K., Srivastava S. P. (2000): Induction of chromosome aberrations, micronucleus formation and sperm abnormalities in mouse following carbofuran exposure. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis **465:** 123-129.
11. Cheng T., Christiani D. C., Wiencke J. K., WainXiping Xu J. C., Kelsey K. T. (1995): Comparison of sister chromatid exchange frequency in peripheral lymphocytes in lung cancer cases and controls. Mutation Research Letters **348:** 75-82.
12. Collins A. R. (2004): The comet assay for DNA damage and repair. Reviews in Molecular Biotechnology **26:** 249-261.

13. Collins A. R., Dušinská M. (2002): Oxidation of cellular DNA measured with comet assay. U: Armstrong, D. (ur.) Methods in molecular biology, vol. 186, Oxidative stress biomarkers and antioxidant protocols. Totowa, Humana Press, str. 224-268.
14. Collins A. R., Dušinská M., Horská, A. (2001): Detection of alkylation damage in human lymphocyte DNA with the comet assay. Acta Biochimica Polonica **48:** 611-614.
15. Das P. P., Shaik A. P., Jamil K. (2007): Genotoxicity induced by pesticide mixtures: in vitro studiues on human peripheral blood lymphocytes. Toxicology and Industrial Health **7:** 449-458.
16. Djelić N., Spremo-Potparević B., Bajić V., Djelić D. (2006): Sister chromatide exchange and micronuclei in human peripheral blopd lymphocytes treared with thyroxine *in vitro.* Mutation Research **604:** 1-7.
17. Ecobichon D. J. (1991): Toxic effects of pesticides. U: Amdur, M. O., Doull, J. i Klaassen, C. D. (ur.) Casarett and Doull's Toxicology. New York, Pergamon Press, str. 218.
18. Fairbairn D. W., Olive P. L., O'Neill K. L. (1995): The comet assay: a comprehensive review. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis **339:** 37-59.
19. Fairbairn D.W., Reyes W.A, O'Neill K.L. (1994): Alkali-labile sites are prevalent in kidney tissue DNA. Cancer Letters **81:** 67-76.
20. Ferguson P. W., Dey M. S., Jewell S. A., Krieger R. I. (1984): Carbofuran Metabolism and Toxicity in the Rat. Toxicological sciences **4:** 14-21.
21. Ferslew K. E., Hagardorn A. N., McCormick W. F. (1992): Poisoning from oral ingestion of carbofuran (Furadan 4F), a cholinesterase inhibiting carbamate insecticide, and its effects on cholinesterase activity in various biological fluids. Journal of Forensic Sciences **7:** 337-344.
22. Fiore M. C., Anderson H. A., Hong R., Golubjatnikov R., Seiser J. E., Nordstrom D. I sur. (1986): Chronic exposure to aldicarb contaminated groundwater and human immune function. Environmental Research **41:** 633-645.
23. Gentile J. M., Gentile G. J., Bultman J., Sechriest R., Wagner E. D., Plewa M. J. (1982): An evaluation of the genotoxic properties of insecticides following plant and animal activation. Mutation research **101:** 19-29.

24. Georges-Gridelet D., Leonard A., Lebrin P. (1982): Cytogenetic effects of carbofuran in mammals. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis **97:** 244–245.
25. Goldman L. R. (1998): Chemicals and children's environment: what we don't know about risk. Environmental Health Perspective **106:** 885-880.
26. Gosselin R. E., Smith R. P., Hodge H. C. (1984). Clinical toxicology of commercial products. 5th edition.Williams and Wilkins Company, Baltimore.
27. Gupta R. C. (1994**)**: Carbofuran toxicity. Journal of Toxicology and Environmental Health **43:** 383-418.
28. Guzella L., Pozzoni F., Giuliano G. (2005): Herbicide contamination of surficial groundwater in Northern Italy. Environmental Pollution **142:** 344-353.
29. Hayes W. A. (2001): Principles and Methods in Toxicology. Taylor & Francis, Philadelphia.
30. Hicks B. R. (2008): Agrow Reports: Generic Pesticides - The Products and Markets. PJB Publications Ltd, Surrey.
31. Hoffmann G. R., Deschênes S. M., Manyin T., Fuchs R. P. P. (1996): Mutagenicity of acridines in a reversion assay based on tetracycline resistance in plasmid pBR322 in *Escherichia coli.* Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis **351:** 33-43.
32. Hoogduijn M. J., Rakonczay Z., Genever P. G. (2006): Effects of anticholinergic insecticides on human mesenhymal stem cells. The Journal of toxicological sciences **94:** 342-50.
33. Kamel F., Boyes W. K., Gladen B. C., Rowland A. S., Alavanja M. C., Blair A., Sandler D. P. (2000): Retinal deganeration in licensed pesticide applicators. American Journal of Industrial Medicine **37:** 618-628.
34. Kidd H., James D. R. (1991): The Agrochemicals Handbook. Third edition. Cambridge, Royal Society of Chemistry Information Services str. 3-11.
35. Kim S. J., Kim J. E., Ko B. H., Moon I. S. (2004): Carbofuran induces apoptosis of rat cortical neurons and down-regulates surface alpha7 subunit of acetylcholine receptors. Molecules and Cells **17:** 242-247.
36. Klys M. (1989)*:* Carbofuran poisoning of pregnant woman and fetus per ingestion. Journal of Forensic Sciences **34:** 1413-1421.
37. Knaak J. B., Munger D. C., McCarthy J. F., Slater L.D. (1970): Journal of Agricultural Food and Chemistry **18:** 832-837.

38. Koppen G., Verschaeve L. (1996): The alkaline comet test on plant cells: a new genotoxicity test for DNA strand breaks in *Vicia faba* root cells. Mutation research **360:** 193-200.
39. Krieger R. I., Lee P. W., Fahmy A. H., Chen M., Fukuto T. R. (1976): Pesticide Biochemistry and Physiology **6:** 1-9.
40. Lin C. M., Wei L. Y., Wang T. C. (2007): The delayed genotoxic effect of N-nitroso N-propoxur insecticide in mammalian cells. Food and Chemical Toxicology **45:** 928-934.
41. Maceljski M., Cvjetković B., Igrc Barčić J., Ostojić Z. (1997): Zaštita bilja – opći dio. U: Priručnik iz zaštite bilja: za zaposlenike u poljoprivrednim ljekarnama. Zagreb, Tiskara MD, str. 27-34.
42. Maroni M., Colosio C., Ferioli A., Fait A. (2000): Carbamates. Toxicology **143:** 39-46.
43. Mersch J., Beauvais M.-N. (1997): The micronucleus assay in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, to *in situ* monitor genotoxicity in freshwater environments. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis **393:** 141-149.
44. Mladinić M., Perković P., Željžić D. (2009): Characterization of chromatin instabilities induced by glyphosate, terbuthylasine and carbofuran using cytome FISH assay. Toxicology Letters **189:** 130-137.
45. Møller P. (2006): The alkaline comet assay: Towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. Basic & clinical pharmacology & toxicology **98:** 336-345.
46. Moreno J., Falcó J. V., Oltra M. T., Jiménez R. (2008): The requirement for the inclusion of formulation efficacy trials in pesticide preregistration evaluations. Pest Management science **64:** 527-35.
47. Moretti M.,Villarini M., Scassellati-Sforzolini G., Pasquini R. (2000): In vitro genotoxicity of terbutryn evaluated by the alkaline single-cell microgel-electrophoresis "comet" assay. Cell biology and toxicology **16:** 285-92.
48. Naravani R., Jamil K. (2005): Cytogenetic biomarkers of carbofuran toxicity utilizing human lymphocyte cultures *in vitro*. Drug and Chemical Toxicology **28:** 359-372.
49. Norppa H., Falck G. C. G. (2003): What do human micronuclei contain? Mutagenesis **18:** 221-233.
50. Nüsse M., Miller B. M., Viaggi S., Grawé J. (1996): Analysis of the DNA content distribution of micronuclei using flow sorting and fluorescent in situ hybridization with a centromeric DNA probe. Mutagenesis **11:** 405-413.

51. Olive P. L. (1989): Cell proliferation as a requirement for development of the contact effectin Chinese hamster V79 spheroids. Radiation research **117:** 79-92.
52. Pang Y. P. (2007): Species marker for developing novel and safe pesticides. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **17:** 197-199.
53. Parkinson A. (1996): Biotransformation of xenobiotics. U: Klaassen, C. D. (ur.) Casarett & Doull´s toxicology: the basic science of poisons, 5th edition. New York, McGraw-Hill, str. 133-218.
54. Peter J. V., Cherian A. M. (2000): Organic insecticides. Anaesthesia and Intensive Care **28:** 11-21.
55. Pilinskaia M. A., Stepanova L. S. (1984): Effect of the biotransformation of the insecticide furadan on in vivo and in vitro manifestations of its cytogenetic activity. Citology and geneticts. **18:** 17-20.
56. Pinakini K. S., Kumar M. T. S. (2006): Serial cholinesterase estimation in carbamate poisoning. Journal of Clinical Forensic Medicine **13:** 274-276.
57. Pohl H. R., Abadin H. G. (2008): Chemical mixtures: Evaluation of risk for child-specific exposures in a multi-stressor environment. Toxicology and Applied Pharmacology **42:** 10-15.
58. Prasanna P. G. S., Blakely W. F. (2005): Premature chromosome condensation in human resting peripheral blood lymphpcytes for chromosome aberration analysis using specific whole-chromosome DNA hybridization probes. U: Keohavong P., Grant S. G. (ur.) Molecular toxicology protocols. New Jersey, Humana Press, str. 49-59.
59. Reigare J. R., Roberts J. R. (1999): Regognition and management of pesticide poisonings. Washington DC, U.S. Environmental Protection Agency, fifth edition. Section II, str. 48-55.
60. Rojas E., Lopez M. C., Valverde M. (1999): Single sell gel electrophoresis assay: methodology and applications. The Journal of Chromatography B **722:** 225-254.
61. Rozman K. R., Klaassen C. D. (1996): Absorption, distribution and excretion of toxicants. U: Klaassen, C. D. (ur.) Casarett & Doull´s toxicology : the basic science of poisons, 5th edition. New York, McGraw-Hill, str. 91-112.
62. Sasaki Y. F., Tsuda S., Izumiyama F., Nishidate E. (1997): Detection of chemically induced DNA lesions in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow) using the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay. Mutation research **388:** 33-44.

63. Saxena S., Ashok B. T., Musarrat J. (1997): Mutagenic genotoxic activities of four pesticides. Captan, foltaf, phosphamidon and furadan. Biochemistry and molecular biology international **41:** 1125-1136.
64. Sekihashi K., Yamamoto A., Matsumura Y., Ueno S., Watanabe-Akanuma M., Kassie F., Knasmüller S., Tsuda S., Sasaki Y. F. (2002): Comparative investigation of multiple organs of mice and rats in the comet assay. Mutation Research **517:** 53–74.
65. Selagović J., Gilles J., Verschaeve L., Kalina I. (1996): The comet assay for the detection of genotoxic damage in the earthworms: a promising tool for assesing the biological hazards of polluted sites. Folia biologica **42:** 17-21.
66. Singh N. P., McCoy M. T., Tice R. R., Schneider E. L. (1988): A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Experimental Cell Research **175:** 184-191.
67. Solenski S., Reigosa M. A., Molinari G. N., González V., Larramendy M. L. (2008): Genotoxic and cytotoxic effects of carbofuran and furadan on Chinese hamster ovary (CHO_{K1}) cells. Mutation Research **656:** 68-73.
68. Timchenko O.I., (1995): The effect of thyroid and gonadal hormones on the chromosomal integrity of liver cells. Citology and geneticts **29:** 41-45.
69. Usmani K. A., Rose R. L., Hodgson L. (2003.): Inhibition and activation of the human liver microsomal and human cytochrome P4503A4 metabolism of testosteroe by deployment-related chemicals. Drug metabolism and Dsposition **31:** 384-391.
70. Usmani K. A., Hodgson E., Rose R. L. (2004): In vitro metabolism of carbofuran by human, mouse, and rat cytochrome P450 and interactions with chlorpyrifos, testosterone, and estradiol. Chemico-Biological Interactions **150:** 221-232.
71. Ware G. W., Whitacre D. M. (2004): An Introduction to Insecticides. U: The Pesticide Book, 6th edition. Willoughby, MeisterPro Information Resources, str. 47-85.
72. Williams R.T. (1971): Detoxification Mechanisms. U: Klaassen, C. D. (ur.) Casarett & Doull´s toxicology: the basic science of poisons, 5th edition. New York, McGraw-Hill, str. 133-218.
73. Yoon J. Y., Oh S. H., Yoo S. M., Lee S. J., Lee H.S., Choi S. J., Moon C. H., Lee B. H. (2001): *N*-Nitrosocarbofuran, but not carbofuran, induces apoptosis and cell cycle arrest in CHL cells. Toxicology **169:** 153-161.
74. Želježić D., Vrdoljak A. L., Kopjar N., Radić B., Milković Kraus S. (2008): Cholinesteraseae-inhibiting and genotoxic effects of acute carbofuran intoxication in man: a case report. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology **103:** 329-335.

75. Želježić D., Vrdoljak Lucić A., Lucas J. N., Lasan R., Fucić A., Kopjar N., Katić J., Mladinić M., Radić B. (2009): Effect of occupational exposure to multiple pesticides on translocation yield and chromosomal aberrations in lymphocytes of plant workers. Enviromental Science & Technology **43:** 6370-6377.
76. Želježić D., Vrdoljak Lucić A., Radić B., Fuchs N., Berend S.. (2007): Comparative evaluation of acetylcholinesterase status and genome damage in blood cells of industrial workers exposed to carbofuran. Food and Chemical Toxicology **45:** 2488-2498.
77. Zheng T., Zahm S. H., Cantor K. P., Weisenburger D. D., Zhang Y., Blair A. (2001): Agricultural exposure to carbamate pesticides and risk of non-hodgkin lymphoma. Journal of Occupational and Environmental Medicine **43:** 641-649.
78. Zhou P., Liu B., Lu Y. (2005): DNA damaging effects of carbofuran and its main metabolites on mice by micronucleus test and single cell gel electrophoresis. Science in China Series C: Life Sciences **48:** 40-47.
79. http://www.epa.gov/ebtpages/emerpoisoningpesticides.html
80. http://www.epa.gov/pesticides/about/index.htm
81. http://www.gulflink.osd.mil/library/randrep/pesticides_paper/mr1018.8.ch7.html
82. http://extoxnet.orst.edu/pips/carbofur.htm
83. http://faostat.fao.org/