

Toksikodinamika herbicida prometrina u slezeni miša

Majer, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2008

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:283081>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Marija Majer

Toksikodinamika herbicida prometrina u slezeni miša

Diplomski rad

Zagreb, 2008. godine

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Toksikodinamika herbicida prometrina u slezeni miša

Marija Majer
Zavod za animalnu fiziologiju
Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb

SAŽETAK

U ekološkim sustavima antropogenim su djelovanjem unešeni raznoliki herbicidi, u pravilu štetni i za zdravlje ljudi. Prometrin se ubraja u metiltiotriazinske herbicide, malo je do umjereno toksičan spoj i selektivni pesticid opće namjene. Njegovi su imunotoksični učinci do sada nedovoljno istraženi, a toksikodinamika nejasna. Slezena je kao dio imunološkog sustava meta imunotoksičnog djelovanja pesticida i nekih karcinogena, i stoga često ciljani organ u toksikološkim studijama. Kako bi se utvrdila koncentracija prometrina, nakon žrtvovanja i razudbe tretiranih životinja uzorci slezene analizirani su metodom vezanog sustava plinske kromatografije-spektrometrije masa. Utvrđena je realna bioraspoloživa koncentracija prometrina kojoj su izloženi splenociti tijekom 1, 6, 24 i 48 sati. Zaključak je da slezena s obzirom na akutnu unešenu dozu od 375 mg kg^{-1} ($1/10 \text{ LD}_{50}$) nema bioakumulativni potencijal za prometrin. Razlike među spolovima nisu vidljive u svim kinetičkim fazama, no upućuju na razlike u metaboliziranju prometrina ovisno o spolu. Rezultati toksikodinamike prometrina u slezeni mogu se neposredno koristiti za procjenu rizika alometrijskim metodama usporedbom na drugim vrstama i čovjeku.

(40 stranica, 15 slika, 8 tablica, 31 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: herbicidi, toksikodinamika prometrina, slezena, alometrijske metode, procjena rizika

Voditelj: Prof. Dr. sc. Oskar Petar, Springer

Ocjenitelji: Prof. Dr. sc. Oskar Petar Springer; Prof. Dr. sc. Mirjana, Kalafatić; Doc.dr. sc. Sven Jelaska

Rad prihvaćen: 3. 12. 2008.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

Toxicodynamics of promethryne herbicide in mouse spleen

Marija Majer
Department of Animal Physiology
Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb

ABSTRACT

A variety of herbicides is discharged into ecological systems as a consequence of human activity. Promethryne is one of the methiltiothiazine herbicides. This selective pesticide of common use is slightly to moderately toxic. Its immunotoxic effects and toxicodynamics have been poorly studied so far. Spleen is one of the target sites of immunotoxic effects caused by pesticides or some carcinogens. Gas chromatography-mass spectrometry assay was applied to detect promethryne concentrations in spleen samples of acutely treated mice after 1st, 6th, 24th and 48th hour post exposure. Bioavailable concentrations of promethryne in spleen were identified. The spleen bioaccumulation potential was not significant after single oral 375 mg kg⁻¹ (1/10 LD₅₀) dose. Sex differences could not be detected during each kinetic phase, but do indicate sex dependent differences in promethryne metabolic processing. Results of promethryne toxicodynamics analysis in spleen can be applied to risk assessment via allometric scaling from animal to humans.

(40 pages, 15 figures, 8 tables, 31 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central biological library

Key words: herbicides, toxicodynamics of promethryne, spleen, allometric scaling, risk assessment

Supervisor: Prof. Oskar Petar Springer, Ph.D.

Reviewers: Prof. Oskar Petar Springer, Ph.D.; Prof. Dr. Mirjana Kalafatić, Ph.D.; Asst. Prof. Sven Jelaska, Ph.D.

Thesis accepted: December 3rd 2008

Ovaj rad, izrađen u Zavodu za animalnu fiziologiju pod vodstvom Dr. sc. Oskara Petra Springera, doc., uz suvoditeljstvo Dr. sc. Domagoja Đikića, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dipl. ing. biologije, smjer ekologija.

ZAHVALA

Zahvaljem Dr. sc. Domagoju Đikiću na svoj pomoći, velikom strpljenju i razumijevanju tijekom izrade ovog diplomskog rada. Velika hvala gđi. Gordani Žakman, gđi. Mariji Potočić i gđinu. Ninu Vukmaniću za velikodušnu pomoć tijekom laboratorijskog rada. Prof. dr. sc. Oskaru Springeru velika hvala na savjetima i dopuštenju za izradu ovog diplomskog rada.

Posebno zahvaljem gđi. Lani Sajli za nesebičnu suradnju i strpljenje tijekom provedenog istraživanja.

Mojim roditeljima iskreno zahvaljem na velikoj podršci i još većem razumijevanju! Mojim kolegama također hvala na pomoći.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. HERBICIDI	1
1.2. TOKSIKODINAMIKA I TOKSIKOKINETIKA KSENOBIOTIKA	2
<u>1.2.1. Utvrđivanje stupnja toksičnosti neke tvari</u>	4
<u>1.2.2. Interspecijske razlike, ekstrapolacije i alometrijske metode</u>	6
1.3. PROMETRIN	8
1.4. SLEZENA	10
<u>1.4.1 Morfologija i fiziologija slezene</u>	10
<u>1.4.2. Toksični učinci ksenobiotika na slezenu i imunotoksikološke posledice za organizam</u>	13
1.5. CILJ ISTRAŽIVANJA	16
2. MATERIJALI I METODE	17
2.1. POKUSNE ŽIVOTINJE	17
2.2. PLAN POKUSA I NAČIN APLIKACIJE ISPITIVANOG HERBICIDA PROMETRINA	17
2.3. RAZUDBA POKUSNIH ŽIVOTINJA I UZIMANJE UZORAKA SLEZENE	18
2.4. PRIPREMA HOMOGENIZATA SLEZENE	18
2.5. PLINSKA KROMATOGRAFIJA (GC)	18
2.6. MASENI SPEKTROMETAR	20
2.7. KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE PRISTUNOSTI PROMETRINA U UZORCIMA SLEZENE POKUSNIH ŽIVOTINJA GC/MS METODOM	21
<u>2.7.1. Kemikalije</u>	21
<u>2.7.2. Otopina internog standarda</u>	22
<u>2.7.3. Standardni uzorak slezene</u>	22
2.8. OPREMA	22
<u>2.8.1. Plinska kromatografija</u>	22
<u>2.8.2. Ekstrakcija prometrina iz uzoraka</u>	23
<u>2.8.3. Određivanje koncentracije prometrina u uzorcima slezene</u>	23
2.9. PROVJERA GC/MS METODE	24
2.10. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	24
3. REZULTATI	25
4. RASPRAVA	34
5. ZAKLJUČAK	36
6. LITERATURA	37

Kratice

EPA – Environmental Protection Agency

RES – retikuloendotelni sustav

AUC – Area Under Curve

SŽS – središnji živčani sustav

UF - Uncertainty Factors

RfD - Reference Dose

ADI – Acceptable Daily Intake

1.UVOD

1.1. HERBICIDI

Civilizacija se od svojih najranijih početaka u poljoprivrednoj aktivnosti, osim sa biljnim vrstama koje kultivira, susreće i sa drugim biljnim vrstama, čija ekološka niša remeti čovjekove agronomske koncepte – korovima. U ekološkim sustavima antropogenim su djelovanjem unešeni raznoliki herbicidi, u pravilu štetni i za zdravlje ljudi. Pesticidi, uključujući herbicide, fungicide i insekticide, jedina su skupina kemijskih spojeva koju čovjek namjerno ispušta u okoliš zbog njihove toksičnosti (Blakley i sur. 1999), usmjerene prema populacijama za čovjeka štetnih mikroorganizama, gljivica, kukaca, grinja, puževa, glodavaca, ptica, korova, algi, lišajeva te njihovom suzbijanju. Prije prirodni, a danas i mnogobrojni sintetski spojevi, pesticidi su veliko i unosno tržište primijenjene kemije (Altieri 2001); pogotovo u današnje vrijeme, kada kontinuirani rast ljudske populacije te industrijalizacija povećavaju onečišćenje okoliša i prirodnih staništa (Biser i sur. 2004).

Herbicidi su pesticidi koji se primjenjuju u cilju suzbijanja korova, parazitnih cvjetnica i drugih biljaka koje rastu na neželjenim mjestima. Mogu biti neselektivni (totalni), koji suzbijaju sve tretirane biljke, ili selektivni, koji suzbijaju određene vrste korova. Danas su to gotovo u potpunosti organski spojevi, a s obzirom na velik broj herbicida u upotrebi javlja se zabrinutost zbog potencijalnih posljedica na zdravlje. Djeluju prodirući u unutrašnjost biljke gdje ometaju životne procese stanice (stanično disanje- djelovanje na mitohondrije; fotosintezu- djelovanje na kloroplaste; staničnu diobu- djelovanje na staničnu jezgru). Na procese fotosinteze utječe skupina spojeva triazina. Oni sprečavaju sintezu glukoze, u odsutnosti koje dolazi do fotooksidacije enzima katalaze koji regulira aktivnost klorofila (Schmitt-Jansen i Altenburger 2005). Herbicidi kod ljudi uzrokuju niz zdravstvenih posljedica, od kožnih osipa pa do smrti. Putevi intoksikacije su direktni dodir kod radnika na poljima, udisanjem iz zraka, kontaminiranom hranom i u dodiru sa zemljom u kojoj ima herbicida. Može doći i do prijenosa herbicida sa površine zemlje u vode, pa su moguća oboljenja uzrokovana konzumiranjem vode za piće (Jadhav i sur. 2007). Neke od tvari u uporabi su mutagene, kancerogene ili teratogene.

Na ekosustav djeluju klima, svjetlost, temperatura, zračenja i dr. Onečišćeni ekosustav ima utjecaj na žive organizme. Za promjene brojnosti populacija korovnih trava poznato je da

putem promjena dostupnih izvora hrane i mikroklimе utječu na beskralješnjake (Chiverton i Sotherton 1991; Honek 1988); a herbicidi posreduju u takvim reakcijskim odgovorima ekosustava (Ewald i Aebischer 2000). Unos herbicida predstavlja stoga za ekosustav onečišćenje.

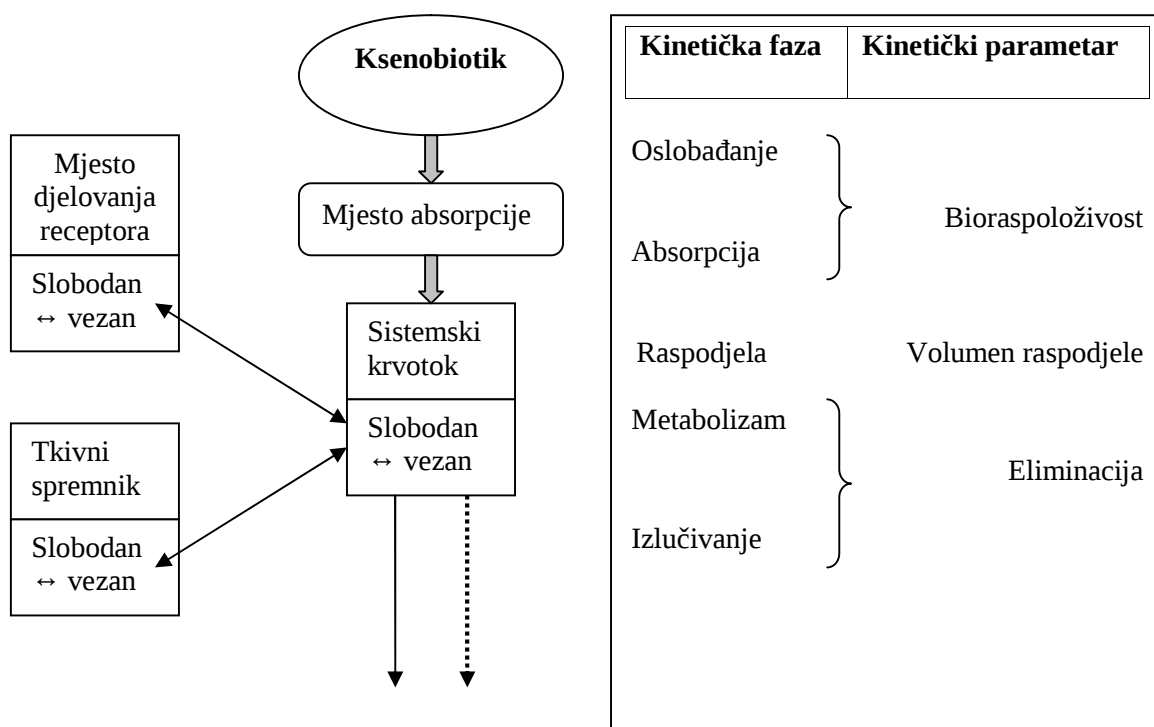
1.2. TOKSIKODINAMIKA I TOKSIKOKINETIKA KSENOBIOTIKA

Učinci ksenobiotika u nekom organizmu ovise o njegovim toksikodinamičkim i toksikokinetičkim svojstvima. Toksikodinamika opisuje djelovanje otrova na tijelo. Egzogeni intoksikacija (uzrokovana trovanjem izvana) može dovesti do oštećenja fizioloških sustava (imunohematopoetski, kardiovaskularni, probavni, egzokrini, endokrini, živčani, reproduktivni). Pritom su bitna sljedeća dva čimbenika: **(1)** vrijeme izloženosti otrovu, pri čemu toksikacija na duži rok ima ozbiljnije posljedice i **(2)** doza (koncentracijska vrijednost otrova). Sljedeći su pojmovi također bitni u terminologiji:

- Akutni učinak - **akutno trovanje** događa se kod jednokratnog izlaganja tijela otrovu.
- Kronični učinak - **kronično trovanje** posljedica je duge izloženosti organizma nekom otrovu.
- Učinci koji ovise o dozi, te o vremenu izloženosti: zbroj ta dva čimbenika rezultira stupnjem otrovanosti organizma.
- Za ostale učinke vrijedi princip „Sve ili ništa“.

Znanstveno područje toksikokinetike bavi se kvalitativnim i kvantitativnim promjenama koncentracije otrova u organizmu, tj. kinetikom resorpcije (biotransformacija → povećanje ili smanjenje toksičnosti). Nadalje, toksikokinetika proučava promet otrova u tijelu. Proces se prikazuje LADME shemom (slika 1), a njegove su faze:

- Oslobođanje otrova u tijelo (L - engl. *liberation*).
- Absorpcija (A).
- Raspodjela u tijelu (D - engl. *distribution*).
- Metabolizam/biotransformacija toksičnih supstanci (M).
- Putevi izlučivanja toksičnih supstanci/ njihovih metabolita (E - engl. *elimination*).



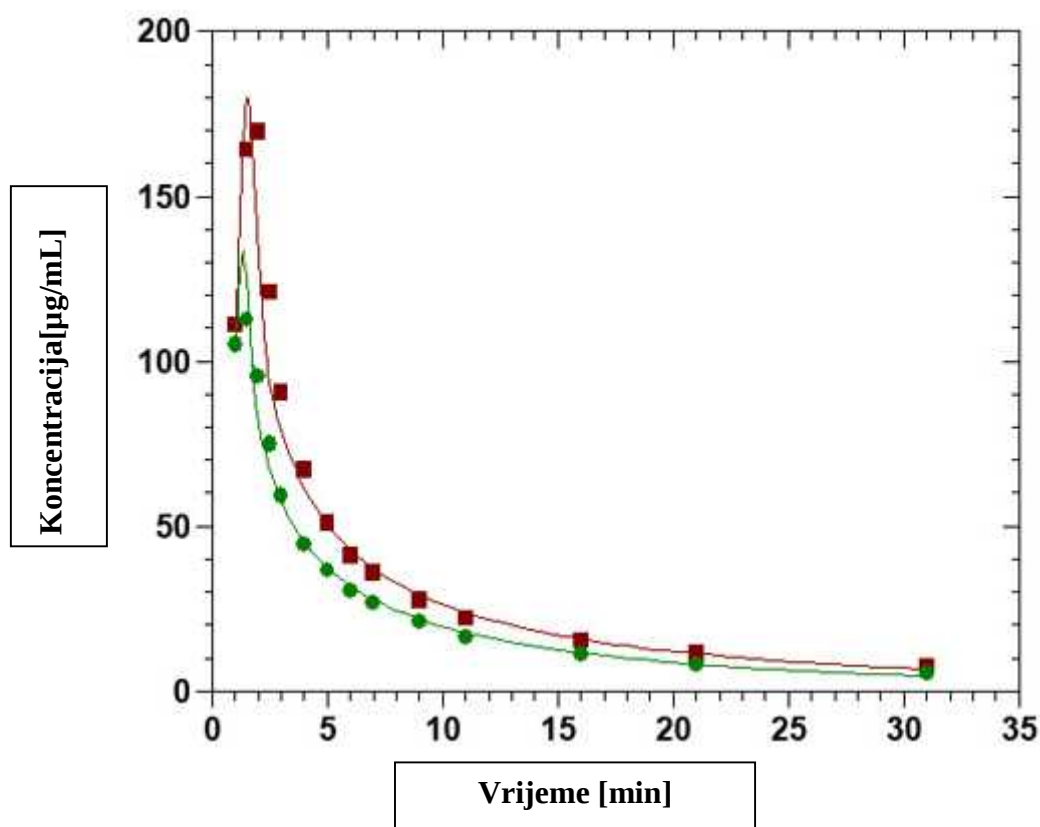
Slika 1. Shema LADME prikazuje glavne faze toksikokinetike ksenobiotika u tijelu: oslobađanje (*L*), absorpciju (*A*), raspodjelu (*D*), metabolizam (*M*) i izlučivanje (*E*)

Glavni kinetički parametri koji opisuju navedenih pet faza su bioraspoloživost, volumen raspodjele i klirens. Bioraspoloživost jest brzina i stupanj apsorpcije ksenobiotika iz kemijskog pripravka definirana krivuljom odnosa koncentracije i vremena u sistemske cirkulaciji ili izlučivanjem u urin. Klirens (engl. *clearanse*, jačina izlaznog protoka) je mjera sposobnosti tijela da u potpunosti izluči neku tvar. Izlučivanje podrazumijeva izbacivanje same tvari kao i njenu pretvorbu u druge metabolite u metabolizmu. Vremenski slijed prometa otrova kroz tijelo prikazuje se krivuljom koncentracije ksenobiotika u plazmi u ovisnosti o vremenu (slika 2). Iz krivulje se ovisno o nagibu može iščitati koja se faza odvija u kojem vremenu: početni strmiji dio (α -faza) odnosi se na raspodjelu ksenobiotika u tkiva, a sljedeći (β -faza) na izlučivanje. Ukupni klirens tvari također se može odrediti iz te krivulje, pomoću procjene površine ispod krivulje (AUC – Area Under Curve). Veličina AUC (od nule do beskonačnosti) ovisi o količini tvari koja je ušla u tijelo, pa veća doza rezultira većom koncentracijom. AUC ovisi o klirensu (CL), pa je uz pretpostavku linearne kinetike:

$$AUC = \frac{F * D}{CL},$$

gdje je D doza, a F apsorbirani dio doze.

Poluživot je najčešće korišteni kinetički parametar, koji ovisi o uspješnosti procesa izlučivanja (npr. klirens) te o volumenu raspodjele danog ksenobiotika.



Slika 2. Koncentracijsko-vremenska krivulja sorbitola. Uočljiva su dva dijela krivulje: α -faza početne brze raspodjele, potom β -faza eliminacije čiji je nagib manji pošto se odvija sporije (preuzeto iz Weiss i sur. 2000).

1.2.1. Utvrđivanje stupnja toksičnosti neke tvari

Ksenobiotik je svaka strana tvar koju nalazimo unutar organizma, koju on ne proizvodi. To mogu biti i prirodne tvari prisutne u mnogo višim koncentracijama od uobičajenih. Prirodni spojevi iz jedne vrste organizama mogu također postati ksenobiotici u organizmu druge vrste. **Otrov (toksikant)** je otrovni ksenobiotik.

LD50 je vrlo bitna oznaka u ispitivanju **otrovnosti ili toksičnosti**, kao svojstva neke kemijske tvari da izazove učinak u organizmu. LD50 je ona doza tvari koja ubija polovicu (50%) ciljane populacije, te zavisno o prirodi otrova može ili ne mora biti koncentracijski visoka. Pri izražavanju vrijednosti LD50 koristi se relativan pojam **toksičnosti**, stupnja toksičnosti neke tvari u odnosu na neku drugu. Uz koncentraciju otrova treba naglasiti i vrstu životinja na kojima je određivana smrtonosna doza, te njihov spol i dob.

Prema hrvatskom *Pravilniku o razvrstavanju, označavanju, obilježavanju i pakiranju opasnih kemikalija* (NN 703/08), otrovi se dijele u 3 skupine:

- Skupina I (T+) - vrlo otrovna kemikalija (LD50 do 25 mg/kg štakora *per os*)
- Skupina II (T) -otrovna kemikalija (LD50 od 25 do 200 mg/kg štakora *per os*)
- Skupina III (Kn) - štetna kemikalija (LD50 > 200 mg/kg štakora *per os*)

Pri određivanju stupnja toksičnosti posebna se briga vodi o mogućoj kancerogenosti, mutagenosti, genotoksičnosti i teratogenosti. Bez obzira na koncentraciju koja uzrokuje jednu od tih posljedica, otrov se automatski svrstava u prvu skupinu po stupnju otrovnosti.

U ekotoksikologiji se otrovi prema stupnju opasnosti za okoliš svrstavaju u sljedeće tri skupine:

1. skupina – visokotoksične tvari, do 1 mg na litru vode
2. skupina – toksične tvari , od 1 do 10 mg na litru vode
3. skupina – štetne tvari, od 10 do 100 mg na litru vode.

Navedene podjele u skupine imaju samo relativnu vrijednost jer se temelje na podacima koji su dobiveni na pojedinim životinjskim vrstama, uglavnom laboratorijskim štakorima, aplikacijom otrova kroz usta (*per os*). Važno je pri tom da toksičnosti nekog otrova ovisi o veličini, metabolizmu, dobi, spolu i mjestu unosa otrova u tijelo životinjske vrste (Springer i Springer 2008).

Koeficijent nakupljanja, Kn, predstavlja omjer LD50 doze pri kroničnom prema LD50 dozi pri akutnom trovanju.

$$K_n = \frac{LD50_{kronicno}}{LD50_{akutno}}$$

Kako velik broj otrovnih spojeva djeluje u malim količinama, koncentracija tih spojeva u tkivima i tjelesnim tekućinama organizma te u hrani i vodi izražava se u sljedećim jedinicama:

1 ppm (parts per million) – odnosi se na omjer dijelova u 1 milijunu = 1 mg/kg ili mg/L = 10^{-3} g/kg

1 ppb (parts per billion) – 1 dio na na bilijun = 1 µg/kg ili µg/L = 10^{-3} ppm

1 ppt (parts per trillion) – 1 dio na trilijun = 1 ng/kg ili ng/L = 10^{-6} ppm.

1.2.2. Interspecijske razlike, ekstrapolacije i alometrijske metode

Učinci ksenobiotika mogu se u pojedinim vrsta razlikovati, kako kvalitativno tako i kvantitativno. Među sisavcima kvalitativne su razlike u toksikodinamici rijetke. Osnovna anatomska građa, fiziologija i ključni biokemijski putevi uglavnom se među njima malo razlikuju. Važna je iznimka biotransformacija stranih tvari, ksenobiotika. Često je interspecijska razlika toksikodinamičkog učinka posljedica razlike u biotransformaciji tog ksenobiotika u pojedinim vrsta. Kvantitativne razlike djelovanja ksenobiotika mogu biti posljedica različite osjetljivosti ciljanih stanica, pa iste koncentracije mogu imati drukčiji učinak. One ipak često odražavaju kinetičke razlike metaboliziranja u pojedinim vrsta. Interspecijske razlike mogu se osim u procesu metaboliziranja pratiti i kroz sve faze sheme LADME.

Građa probavnog sustava i fiziologija mogu značajno utjecati na absorpciju. Prehrambene navike mogu pak mijenjati uvjete poput pH vrijednosti, te brzinu pražnjenja različitih dijelova probavnog sustava. U obzir treba uzeti i različit sastav crijevne bakterijske flore. U štakora velik se broj bakterija nalazi u ždrijelu i gornjim dijelovima tankog crijeva. U čovjeka i zvijeri crijevna se flora nalazi uglavnom u debelom crijevu

Različit volumen raspodjele među vrstama očigledna je posljedica različitih veličina tijela. Kako je volumen organa povezan sa tjelesnom težinom, navedena razlika nestaje ako se volumen raspodjele izrazi u ovisnosti o tjelesnoj težini. Standardiziranjem težinom, volumeni raspodjele u čovjeka i drugih vrsta, koje se često koriste i u toksikološkim studijama, uglavnom su u granicama vrijednosti iste potencije. Veće su razlike uglavnom posljedica interspecijskih razlika vezanja proteina plazme. Prividni volumen raspodjele ovisi ne samo o ksenobiotiku dostupnom stvarnom volumenu, već i o stupnju vezanja u krvnoj plazmi i tkivima. Smatra se da je nespecifično vezanje u tkivima manje varijabilno od vezanja u krvnoj

plazmi. Pri usporedbi toksičnih koncentracija na osnovu sveukupnih koncentracija ksenobiotika u krvi, potrebno je uzeti u obzir interspecijske razlike u vezanju proteina.

Klirens također ovisi o veličini tijela. U ovisnosti o tjelesnoj težini, veći je u manjih životinja. Površina kože još je bolji čimbenik koji korelira s klirensom. S obzirom na bubrežni klirens, interspecijska varijabilnost uzrokovana je veličinom tijela. Razlike u tubularnoj filtraciji mogu također utjecati na varijabilnost. Za ksenobiotik koji se uglavnom izlučuje filtracijom, bubrežni je klirens lako procijeniti na osnovu alometrije. Metabolički se pak klirens može znatno razlikovati među vrstama, pa i kad se u obzir uzme veličina tijela.

Ekstrapolacija s vrste na vrstu, i procjene toksikokinetičkih parametara za čovjeka iz istih za životinje od velike je važnosti u toksikologiji, te farmaceutskoj industriji. Najjednostavniji je pristup ekstrapolacije dijeljenje sa faktorima nesigurnosti (UF, *Uncertainty factors*), što se primjerice koristi pri izračunu RfD i ADI. Jedan od pristupa problemu je uporaba fizioloških modela. No njihova je praktičnost ograničena zbog rijetko dostupnih potpunih podataka za analizu modela. Drugi je pristup primjena alometrije. Alometrijski odnos označava različit omjer veličina. Ustanovljena je međuovisnost težine mnogih organa i brojnih fizioloških varijabli sa tjelesnom težinom, prema jednadžbi:

$$X = a * Tt^b$$

gdje su a i b konstante, a X parametar ovisan o tjelesnoj težini (Tt). Vrijednosti X i Tt odnose se na prosječne vrijednosti u populaciji vrste. Omjer X/Tt je konstantan i neovisan o tjelesnoj težini, pošto je za većinu organa alometrijski eksponencijalni faktor b po vrijednosti vrlo blizu 1. Mnogi parametri poput protoka krvi, potrošnje kisika, brzine glomerularne filtracije ovisni su o tjelesnoj težini s alometrijskim eksponentom vrijednosti od 0.66 do 0.8. On je pak u ovisnosti volumena distribucije o težini tijela često vrlo blizu 1, a za klirens iznosi oko 0.66. Iz toga slijedi kako klirens bolje korelira s veličinom površine kože nego težinom.

Pretpostavivši „tipične“ alometrijske eksponente 1 i 0.66 za volumen raspodjele i klirens, alometrijski je izraz za ovisnost poluživota o tjelesnoj težini:

$$t_{1/2} \approx \frac{V}{CL} \approx Tt^{1-0.7}$$

$$t_{1/2} \approx Tt^{0.3}.$$

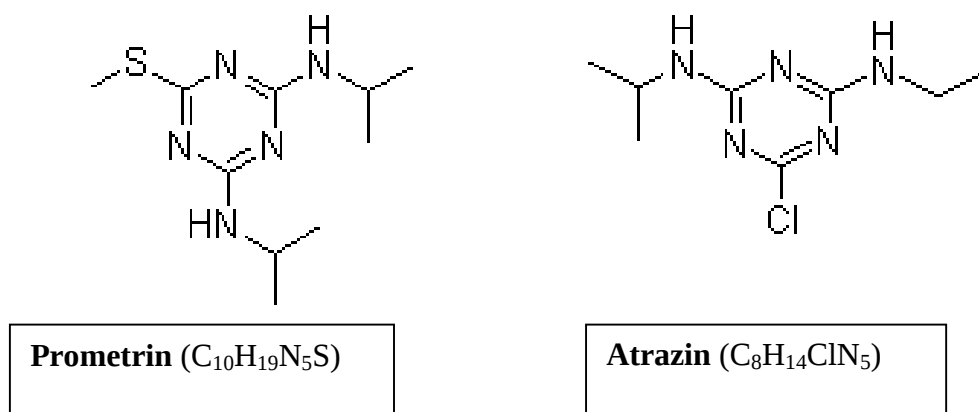
Alometrijski koeficijent približne vrijednosti 0.3 primjenjiv je i na biološke periode poput kucanja srca i trajanja ciklusa disanja (Fichtl 1999).

1. 3. PROMETRIN

Triazini su kao organski herbicidi vrlo efikasni u različitim biljnim kulturama. Selektivno djelovanje rezultira vrlo uspješnim suzbijanjem sjemenskih širokolisnih i nekih uskolisnih korova. U nižim dozama nedovoljno djeluju na višegodišnje korove. U većim dozama djeluju kao totalni herbicidi pa se primjenjuju za uništavanje biljnog pokrova na željezničkim nasipima, putovima, u industrijskim objektima.

Iako je za triazinske spojeve uglavnom uvriježeno mišljenje kako su to industrijske kemikalije, triazinski je antibiotik ferverulin prirodni spoj (Jackel i Stamm 1988). Triazinski su herbicidi sintetizirani i na tržište stavljeni tijekom 1950ih. No, osim herbicida, potrebno je spomenuti i sintetski proizveden triazinski spoj kao eksploziv RDX (hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine).

Triazinski herbicid prometrin potječe iz SAD-a, a danas se izvozi i koristi širom svijeta. Prema IUPAC-ovoj nomenklaturi puni je naziv ovog spoja: N^2, N^4 -diisopropil-6-methyltio-1,3,5-triazin-2,4-diamin; molekulske formule $C_{10}H_{19}N_5S$ a struktura je prikazana na slici 3. Prometrin se ubraja u metiltiotriazinske herbicide, malo je do umjereno toksičan spoj i selektivni pesticid opće namjene. Rabi se za suzbijanje jednogodišnjih trava i širokolisnog korovnog bilja u nasadima pamuka, lana, graška, kukuruza, soje, krumpira, suncokreta, ali i mrkve, celera, peršina i komorača. Danas postoje 23 pripravka herbicidnog djelovanja koji u sebi sadrže prometrin. Registracijski standard za ovaj herbicid postoji u EPA – i od 1986. godine.



Slika 3. Strukturne formule prometrina i atrazina

Iz skupine triazinskih herbicida najčešće se koristi atrazin ($C_8H_{14}ClN_5$) koji za razliku od prometrina pripada klorotriazinskim herbicidima. Poput njega, prometrin je sistemski herbicid koji blokira fotosintezu u širokolisnim i nekim travnatim korovima, inhibirajući fotosustav II (Schmitt-Jansen i Altenburger 2005). Dokazano je da djeluje kao inhibitor Hillove reakcije u fotosintezi (Kamrin 1997). Vežući se na kinon-vezni protein u fotosustavu II, inhibira fotosintetski transportni lanac elektrona (Wackett i sur. 2002). Dobro je topiv u mastima i organskim otapalima.

Učinci prometrina u kopnenim ekosustavima do sada su nisu dovoljno istraženi, no za vodene organizme postoji cijeli niz podataka. Prometrin tako od fitoplanktona, zooplanktona, cijelog niza beskralješnjaka do riba i vodozemaca uzrokuje različite histološke, biokemijske, fiziološke, etiološke učinke, u konačnici i smrtnost (Chen i sur. 2002). Također utječe i na populacije vodenih biljaka, uzrokujući fiziološke promjene i ugibanje (Ma i sur. 2006). U okolišu osim abiotičkih čimbenika koji utječu na degradaciju i razgradnju prometrina, važnu ulogu imaju i mikroorganizmi, najviše bakterije. Smatra se da su presudne za sudbinu prometrina, kao i ostalih triazinskih herbicida u okolišu (Wackett i sur. 2002). Za pesticide je utvrđen i broj relativno otpornih vrsta korova na iste; skupina triazinskih herbicida ima ih najviše (Altieri 2001).

Osim u slučaju unosa velikih količina prometrina u probavilo, akutna sistemska toksičnost malo je vjerojatna (tablica 1). Suprotno prometrinu, za atrazin postoji cijeli niz podataka o toksičnim efektima, pošto su istovremeno sa masovnom primjenom u poljoprivredi provedena i znanstvena istraživanja. Tako je dokazano da djeluje kao endokrini ometač (prema engleskom pojmu: *endocrine disruptor*) (Sanderson i sur. 2000, Stoker i sur. 2000). Nizom pokusa, brojni autori pokazali su da prometrin jako djeluje na endokrine funkcije odnosno također djeluje kao endokrini ometač. Simptomi trovanja svim triazinskim herbicidima su iritacija očiju, kože i dišnog sustava.

Tablica 1. Opći podaci toksičnosti prometrina

Akutna toksičnost	slaba
Karcinogenost	malo vjerojatna
Inhibicija kolinesteraze	ne
Kontaminacija podzemnih voda	potencijalno
Toksičnost za reproduktivni sustav/embrionalna tkiva	visoko toksičan
Endokrini ometač	da

Oralno aplicirana LD50 vrijednost prometrina za miša je 3750 – 3800 mg/kg tjelesne težine životinje (EPA 1996, Kamrin i sur. 1997). Relativno je postojan u okolišu (od sedamdesetdva dana a ponekad i do tri godine ovisno o uvjetima okoliša) i može se detektirati u značajnijim koncentracijama u okolišu i hrani.

1.4. SLEZENA

Bez slezene organizam ne bi bio u stanju preživjeti napade brojnih i raznoликih vanjskih živih i neživih opasnih štetnika. Slezena je limfni i krvotvorni organ uključen samo u optok krvi, dok su ostali limfni organi uključeni i u limfni optok. Kao dio imunološkog sustava meta je imunotoksičnog djelovanja pesticida i nekih karcinogena, i stoga često ciljani organ u toksikološkim studijama. (Suttie 2006, Chu i sur. 2005).

1.4.1 Morfologija i fiziologija slezene

Slezena je najveći organ koji nastaje iz mezenhima, a smještena je u mezenteriju ispod lijevog svoda ošita. U slučaju svake infekcije u organizmu, slezena kao glavni sastavni dio retikuloendotelnog sustava (RES) preuzima na sebe ulogu branioca. RES obuhvaća različite i po čitavom tijelu raštrkane stanice mezenhimskog podrijetla koje imaju važnu ulogu u mijeni tvari i obrambenim reakcijama organizma. Pojedine vrste stanica svrstavaju se u retikuloendotelni sustav po određenim kriterijima: mezenhimsko podrijetlo, sposobnost primanja i zadržavanja koloidnih čestica i vitalno injiciranih boja, te izrazita sposobnost

fagocitoze. Retikularne stanice u sastavu retikularnog vezivnog tkiva zadovoljavaju sve gore navedene kriterije; to su stanice s brojnim izdancima koji su povezani s izdancima susjednih stanica, tako da čine prostornu mrežu (*reticulum*). Neke od tih stanica imaju malo citoplazme i relativno su nediferencirane, pa sliče mezenhimskim stanicama; nazivaju se primitivne retikularne stanice. Neke pak imaju više citoplazme i sposobnost fagocitoze, te se zbog toga nazivaju makrofagi. Retikularne stanice koje se općenito svrstavaju u RES nalaze se u koštanoj moždini, limfnom tkivu i svim limfnim organima. Jedan od tih je i slezena. Unutar nje nalazimo i morfološki obične retikuloendotelne stanice koje imaju ulogu endotelnih stanica. One oblažu lumen venskih sinusa u slezeni (Cesta 2006).

Po građi slezena je donekle slična limfnom čvoru, ali za razliku od njega nije uključena u tok limfe, nego u tok krvi. Na površini je pokriva čvrsta i elastična, relativno tanka čahura, koja se sastoji od gustih vezivnih vlakana i nešto glatkih mišićnih stanica, te peritoneuma koji joj daje glatkoću i sjaj. Od vezivnog tkiva čahure ulaze u unutrašnjost slezene brojni nastavci (*trabeculae*) u obliku listića ili končića koji se razgranjuju i međusobno anastomoziraju, te tako zajedno s čahurom čine okosnicu za meko tkivo slezene. Slezena se sastoji od nakupina limfoidnog tkiva zrnatog izgleda, smještenih oko finih završnih grananja vena i arterija. Ove su žile povezane modificiranim kapilarama koje se nazivaju sinusi slezene.

Interspecijske varijacije strukture i morfologije venskih sinusa temelj su klasifikacije slezena u dvije grupe, sinusoidne i nesinusoidne slezene. Sinusoidne slezene imaju psi i štakori, dok nesinusoidne nalazimo u miševa. Venski su sinusi sinusoidnih slezena veći, brojniji, stvaraju brojne anastomoze, sa karakterističnim struktorom stijenke naspram venskih sinusa nesinusoidnih slezena. Potonji su toliko različiti da ih neki stručnjaci nazivaju venulima pulpe umjesto venskim sinusima (Schmidt i sur. 1985).

Prostor između čahure i trabekula ispunjava meko tkivo slezene, koje se zbog mekoće i kašasta izgleda naziva **pulpa**. Pulpa je građena od retikularnog tkiva s mnogo slobodnih stanica i gustog spleta krvnih žila, ali je diferencirana u dvije morfološki i funkcionalno različite vrste, koje se razlikuju po boji pa se nazivaju crvena i bijela pulpa. Njihov je međusobni odnos uvjetovan raspodjelom krvnih žila. Arterije su usko povezane sa bijelom, a vene sa crvenom pulpom.

Crvena pulpa čini najveći dio mekog tkiva slezene. Retikularno tkivo u njoj ispunjavaju limfociti, eritrociti, granularni leukociti, monociti, plazma-stanice i slobodni makrofagi. Osim toga, u crvenoj se pulpi nalaze široki sinusi slezene koje ispunjava krv, pa je zato taj dio pulpe crvene boje.

Bijela pulpa građena je od limfnog tkiva koje je u obliku brojnih limfnih čvorića, nazvanih Malpighijeva tjelešca, razasuto posvuda po crvenoj pulpi. Limfni čvorići u slezeni, odnosno Malpighijeva tjelešca, razlikuju se od limfnih čvorića u drugim organima samo po tome što kroz njih prolazi jedna mala arterija (*a. centralis*). Zametni centri u njima pojavljuju se i iščezavaju u vezi s općim stanjem organizma.

Krvne žile imaju vrlo važnu ulogu u građi slezene, budući da ona predstavlja filter za krv (Suttie 2006). U venama slezene ima mnogo više limfocita nego u arterijama (do 70 puta) stoga što limfociti nastaju u bijeloj pulpi. Limfne žile čine mrežu u čahuri i većim trabekulama. Živčana vlakna su u slezeni uglavnom siva. Razgranjuju se duž arterija i stvaraju ogranke koji inerviraju njihovu muskulaturu i trabekule.

Tablica 2. Građa i funkcije pulpe slezene

PODRUČJE	FUNKCIJA	SASTAV
Crvena pulpa	Mehanička filtracija. Uklanja neželjene materijale iz krvi, uključujući dotrajale eritrocite.	• Sinusi ispunjeni krvlju • Retikularna vlakna • Granične zone prema bijeloj pulpi
Bijela pulpa	Pomaže obrani od infekcija.	Sastavljena od tzv. Malpighijevih tjelešaca, čiji su dijelovi: • Limfni čvorići, bogati B-limfocitima • Periarterijska limfoidna mreža, bogata T-limfocitima

Uloga slezene je mnogostruka; dvije su najvažnije: hematopoetski je organ, te predstavlja rezervoar krvi u organizmu budući da može primiti i filtrirati veliku količinu krvi (Suttie 2006). Kao hematopoetski organ pomaže u obrani od infekcija (tablica 2). Za vrijeme fetalnog razvoja u njoj se stvaraju sve krvne stanice a tu sposobnost može zadržati i kasnije u patološkim prilikama (Cesta 2006; Suttie 2006; Rosenthal i Snyder 1984). Nakon rođenja u slezeni nastaju samo limfociti. Osim toga, u njoj se razaraju stari i istrošeni eritrociti, leukociti i trombociti.

Ostale uloge slezene manje su značajne, osobito u zdravih odraslih pojedinaca (jedinki):

- Proizvodnja opsonina, properdina i tuftsina.
- Stvaranje eritrocita. Dok je koštana srž primarno mjesto hematopoeze u odraslih, do petog mjeseca trudnoće slezena ima važne hematopoetske funkcije. Nakon rođenja eritropoetske se funkcije obustavljaju, osim u slučaju hematoloških poremećaja. Kao glavni limfni organ i središte retikuloendotelnog sustava, slezena zadržava mogućnost proizvodnje limfocita te ostaje i dalje hematopoetski organ.
- Pohranjivanje crvenih krvnih stanica i ostalih formiranih elemenata, samo u određenih vrsta sisavaca, poput pasa i konja. Slezena u slučaju potrebe može osloboditi eritrocite.

1.4.2. Toksični učinci ksenobiotika na slezenu i imunotoksikološke posljedice za organizam

Slezena je najveći sekundarni limfni organ te je, kao mjesto drenaže intravenski unesenih ksenobiotika, važan organ u procjeni lezija uslijed intoksikacije. Zbog prisutnosti B i T limfocita, imunotoksični efekti ksenobiotika ili njihovih metabolita na populacije ovih stanica mogu se odraziti u slezeni. Stoga je pri procjeni moderne histopatologije imunološkog sustava slezena jedan od ključnih organa. Laboratorijska istraživanja, prvenstveno na glodavcima, dokazuju veliku osjetljivost imunološkog sustava na kemijska oštećenja. Ova je osjetljivost posljedica bioraspoložive koncentracije ksenobiotika u slezeni, svojstava samog ksenobiotika (npr. reaktivnost sa makromolekulama), a također i osjetljive ravnoteže funkcioniranja imunološkog sustava, kao što je složeni proces antigenskog prepoznavanja i obrade (Mücketer 2003).

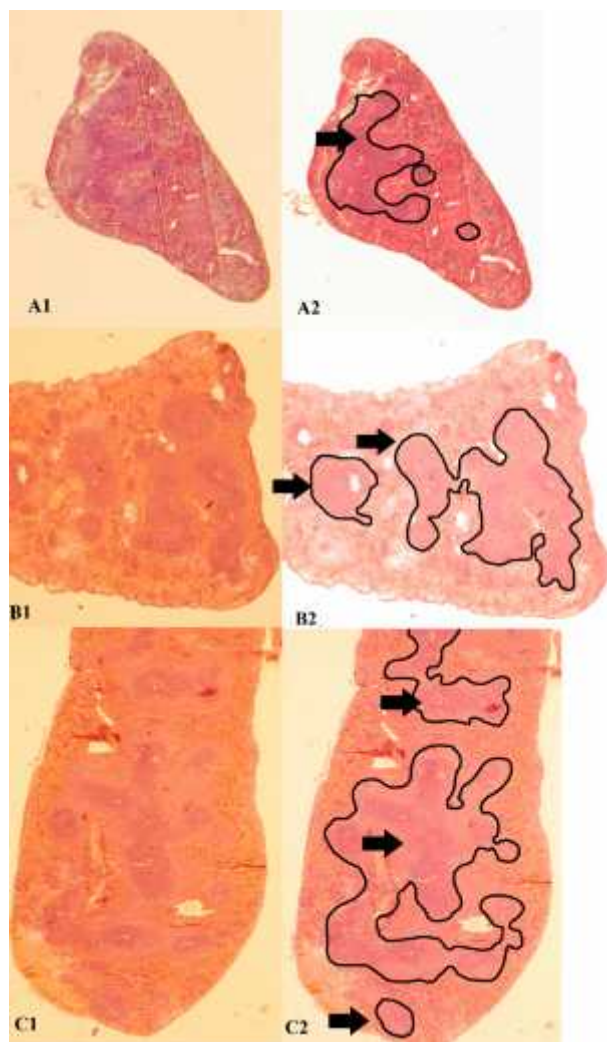
Zbog specifične građe i sadržaja stanica, svaki bi se od dijelova crvene i bijele pulpe prema literaturi o rutinskim patološkim procjenama trebao procjenjivati zasebno. Stoga se periarterijalna limfna ploča, zametni mjehurići, rubna zona bijele pulpe, kao i crvena pulpa deskriptivno opisuju zasebno s obzirom na promjene veličine i staničnosti. Karakteristične stanične promjene nakon izloženosti imunomodulacijskom ksenobiotiku su promjene veličine i gustoće stanica periarterijalne limfne ploče i rubne zone bijele pulpe, te promjene u broju mjehurića sa zametnim središtima. Mjerenja staničnosti mjehurića i razvoja zametnih mjehurića najosjetljiviji su pokazatelji moguće imunotoksičnosti, dok je suptilne promjene u crvenoj pulpi često teško otkriti (Elmore 2006).

Smanjena staničnost periarterijalne limfne ploče unutar bijele pulpe može se pojaviti uslijed izloženosti zračenju, virusima ili ksenobioticima, koji mogu uzrokovati nekrozu ili apoptozu T-limfocita. Životinje bez timusa također pokazuju smanjenu staničnost u T-

limfocitnom području. Moguća je i pojava specifično smanjene staničnosti u B-limfocitnom području rubne zone, uslijed izloženosti novim ksenobiotičkim imunomodulacijskim proizvodima. Takva promjena mogući je pokazatelj oslabljenog odgovora humoralne imunosti u organizmu. Ovisno o kemikaliji, smanjuje se ili povećava staničnost i opseg cijele bijele pulpe, a u slučaju limfoma i leukemija događa se smanjivanje istih. Akutni imunološki odgovor na antigene može uzrokovati smanjenje staničnosti područja B-limfocita i broja mjehurića sa postojećim zametnim centrima. Nezreli B-limfociti, imunoblasti, proliferiraju na odgovarajući na stimulans antigenom. Ove su stanice veće i tamnije od zrelih limfocita, a jezgra im je pravilno okrugla. Sazrijevaju u plazma stanice koje proizvode imunoglobuline i migriraju u crvenu pulpu. Smanjenje staničnosti bijele pulpe ponekad je teško razlučiti od neoplazije.

Broj limfocita važno je provjeriti i u crvenoj pulpi. U slučaju značajnog sistemskog pada broja limfocita također je moguće primijetiti smanjenu staničnost limfocita crvene pulpe. Iako ona sadrži limfocite i makrofage, prevladavaju crvene krvne stanice. Stoga su promjene veličine i težine slezene, kao i histološke promjene veličine crvene pulpe i staničnosti eritrocita, ovisne o metodi eutanazije i učinkovitosti uzorkovanja. Do danas se smatra da težina slezene nije pouzdano osjetljiv pokazatelj imunotoksičnosti. Kako bi bile toksikološki pouzdan podatak, promjene težine slezene treba povezati sa apliciranom dozom i histopatološki potvrditi. Nakupine makrofaga, fibrozu i nekrozu također vrijedi zabilježiti.

Najčešći su toksični učinci ksenobiotika na slezenu hiperplazija njena limfoidnog tkiva (slika 4), te atrofija tj. pad celulariteta zbog iscrpljivanja splenocita i smanjivanja mase slezene. Dolazi i do inhibicije proliferacije T-limfocita (Prater i sur. 2002), što može imati teške posljedice u radu imunološkog sustava.



Slika 4. Hiperplazija limfoidnog tkiva unutar slezene miša (A, B, C); crno podvučene granice na fotografijama označenima brojem 2 predstavljaju granice hiperplazijskog tkiva (Preuzeto iz Đikić 2006.)

1.5. CILJ ISTRAŽIVANJA

Svrha je ovog diplomskog rada prikazati i razjasniti bioakumulaciju i toksikodinamku triazinskog herbicida prometrina u slezeni. Prometrin se uz atrazin ubraja u skupinu vrlo često upotrebljavanih i masovno raširenih triazinskih herbicida (Brooks i sur. 2005). Brojni su dokazi imunotoksičnog učinka atrazina, dok je prometrin, iako slične molekularne strukture, nedovoljno istražen, osobito u imunotoksikologiji. Slezena, kao organ prisutan u svih sisavaca, jedno je od središta retikuloendotelnog dijela imunološkog sustava. Imunološki sustav sisavaca važan je za očuvanje zdravlja i osjetljivosti prema toksinima (Biser i sur. 2004). Herbicid, kao i bilo koja kemikalija (ksenobiotik), može poremetiti osjetljivu ravnotežu funkcioniranja imunološkog sustava, uzrokujući strukturalne i funkcionalne promjene poput alergija i sl. (Blakley i sur. 1999).

Rad je nadopuna postojećih podataka o eksperimentalnom radu sa prometrinom (Đikić 2006). Dobiveni rezultati:

1. Izravno prikazuju realnu bioraspoloživu koncentraciju prometina kojoj su izloženi splenociti.
2. Izravno prikazuju dinamiku eliminacije prometrina iz slezene tijekom 48 sati.
3. Izravno prikazuju razlike između spolova s obzirom na eliminaciju prometrina u važnom limfoidnom organu kao što je slezena.
4. Izravno ukazuju na bioakumulativni potencijal prometrina u slezeni.
5. Predstavljaju model prema kojem se, prema postotku od unešene doze, može procijeniti teoretska bioraspoloživa koncentracija prometrina u slezeni za bilo koju unešenu dozu.
6. Rezultati na posredan način predstavljaju smjernice za forenzičku toksikologiju koja, s obzirom na koncentraciju ksenobiotika u tkivu, ima za cilj pretpostaviti vrijeme kada je uslijedio unos otrova u organizam.
7. Rezultati toksikodinamike prometrina u slezeni mogu se neposredno koristiti za procjenu rizika alometrijskim metodama usporedbom na drugim vrstama i čovjeku.

Ovakvi su pokusi tipičan način ispitivanja bioakumulativnosti različitih molekula (Chen i sur. 2002), te danas prijeko potrebni u održavanju ljudske civilizacije kao niše čovjeka u prirodi, koja uključuje razvoj različitih industrija sa štetnim djelovanjem na brojne organizme, donoseći relativnu korist samo jednom – čovjeku.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. POKUSNE ŽIVOTINJE

Pokus je proveden na singeničnim miševima soja CBA T6T6, uzgojenima u uzgajalištu laboratorijskih životinja Zavoda za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Životinje korištene za pokus bile su u dobi od 60 ± 5 dana, i tjelesne mase $\sigma = 23,37 \pm 1,99$ g; $\varphi = 22,25 \pm 1,14$ g u trenutku apliciranja herbicida. Životinje su okoćene i uzgojene u standardnim uvjetima propisanim za uzgoj laboratorijskih životinja (glodavaca), odnosno pri temperaturi od 25°C, dnevnom ritmu svjetla i tame 12/12 sati, s ponuđenom hranom i vodom *ad libitum*.

Kontrolne i tretirane životinje držane su pod istim uvjetima. Životinje su nasumičnim uzorkovanjem raspoređene u četiri skupine, s po dvije podskupine s obzirom na spol životinja. U svakoj je skupini bilo dvanaest životinja, odnosno šest u podskupini (m-mužjaci, f-ženke). Prema spolu skupine su razdvojene tako što su ženkama dodijeljeni parni, a mužjacima neparni brojevi, stotice u jedinstvenoj troznamenkastoj šifri. Svakom mišu unutar skupine pridružen je broj od 1 do 6, desetice u troznamenkastoj šifri. Jedinice od 1-7 označavale su organe svake jedinke; slezena pod brojem dva. Tako je svaki organ svake jedinke u pokusu dobio jedinstvenu troznamenkastu šifru s obzirom na raspored u pokusu.

Ovakvo označavanje omogućilo je praćenje pojedinih jedinki tijekom čitavog pokusa i podjelu skupina prema pripadajućim dozama:

K= kontrolna skupina= 0 mg/kg prometrina;

S1h, S6h, S24h, S48h = skupine koje su primile 375 mg/kg prometrina (1/10 LD 50) i nakon odgovarajućeg vremena od intoksikacije žrtvovane.

2.2. PLAN POKUSA I NAČIN APLIKACIJE ISPITIVANOG HERBICIDA PROMETRINA

Za potrebe praćenja prolaska prometrina kroz krvno-moždanu barijeru, njegovog ulaska i zadržavanja u SŽS-u, te prolaska kroz organe trbušne šupljine proveden je test akutne toksičnosti.

Doza ispitivanog herbicida prometrina u pokusu je iznosila 1/10 LD₅₀ doze, 375 mg/kg prometrina. Prometrin je životinjama apliciran gastičkom kanilom, *per os*, u ukupnom

volumenu od 0.5 ml. Praškasti tehnički prometrin (95%) je suspendiran u vodi na potrebni volumen planirane doze. Kontrolna skupina dobila je jednak volumen vode bez prometrina. Ovakav način aplikacije najbolje simulira izlaganje organizama okolišno prisutnom prometrinu.

2.3. RAZUDBA POKUSNIH ŽIVOTINJA I UZIMANJE UZORAKA SLEZENE

Svaka grupa miševa bila je nakon odgovarajućeg vremena žrtvovana. Svaka jedinka uspavljivana je eterom, i odmah potom iz pazušne joj je arterije uzeta krv. Nakon uzimanja krvi žrtvovanoj bi se jedinki izvadio mozak, a zatim organi trbušne šupljine.

Svaki je pojedinačni organ nakon vađenja a prije zamrzavanja vagan na analitičkoj vagi „Kern“, model ABS 220-4 s točnošću od 0,1 mg.

2.4. PRIPREMA HOMOGENIZATA SLEZENE

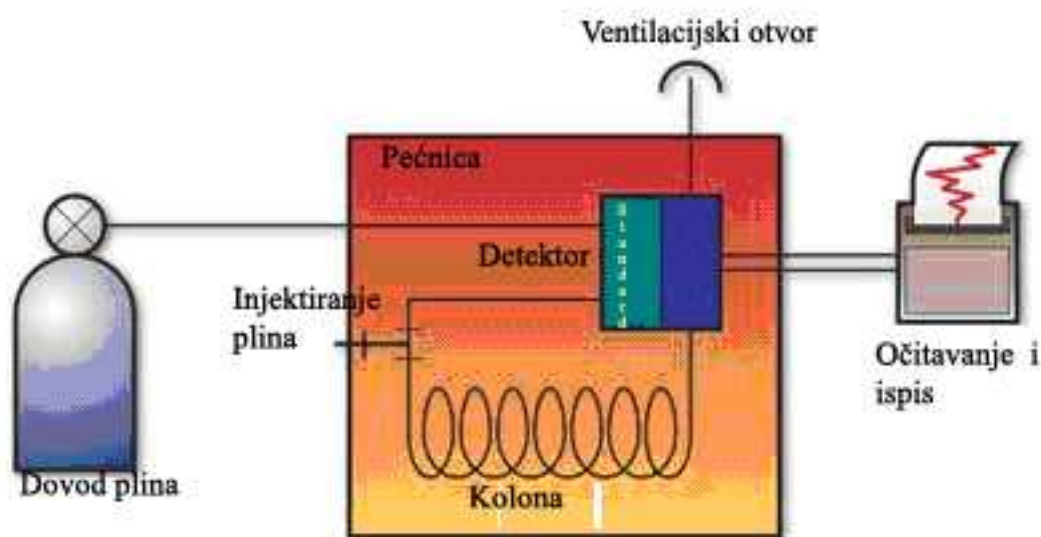
U postupku homogenizacije zamrznutoj je slezeni dodan 1 mL destilirane vode, kako bi homogenizacija bila uspješnija. Homogeniziranje je obavljeno upotrebom teflonskog nastavka za homogenizaciju promjera 1,5 cm, u epruveti od 15 mL. Prije, u tijeku, i nakon postupka epruvete s uzorcima držane su na ledu kako se u tkivu ne bi obnovila aktivnost enzima. Nakon homogeniziranja pojedinog organa, sav pribor i posuđe oprani su deterđžentom i isprani destiliranom vodom i alkoholom, kako bi koncentracija hebicida u pojedinom organu ostala na prvotnoj vrijednosti.

2.5. PLINSKA KROMATOGRAFIJA (GC)

Pod plinskom kromatografijom (GC) porazumjevamo sve kromatografske metode u kojima je mobilna faza plin. Ovisno o stacionarnoj fazi, razlikujemo plinsku razdijelnu (plin-tekuće) kromatografiju, gdje je stacionarna faza tekućina; i plinsku adsorpcijsku (plin-čvrsto) kromatografiju, gdje je stacionarna faza čvrsta tvar.

Plinska kromatografija (slika 5) primjenjuje se za analizu plinovitih tvari ili tvari koje mogu lako ispariti na radnoj temperaturi kolone (do 300°C ili nešto više), a da pri tome ne

dođe do njihove razgradnje. Broj takvih tvari je vrlo velik (mnoge masne kiseline, aldehidi, alkoholi, amini, esteri, ketoni, ugljikovodici, halogenirani ugljikovodici, fenoli, sumporne tvari, metalni kompleksi, inertni plinovi i dr.), pa je plinska kromatografija vjerojatno najviše primjenjivani oblik kromatografije prilikom analize niza prirodnih i sintetskih spojeva.



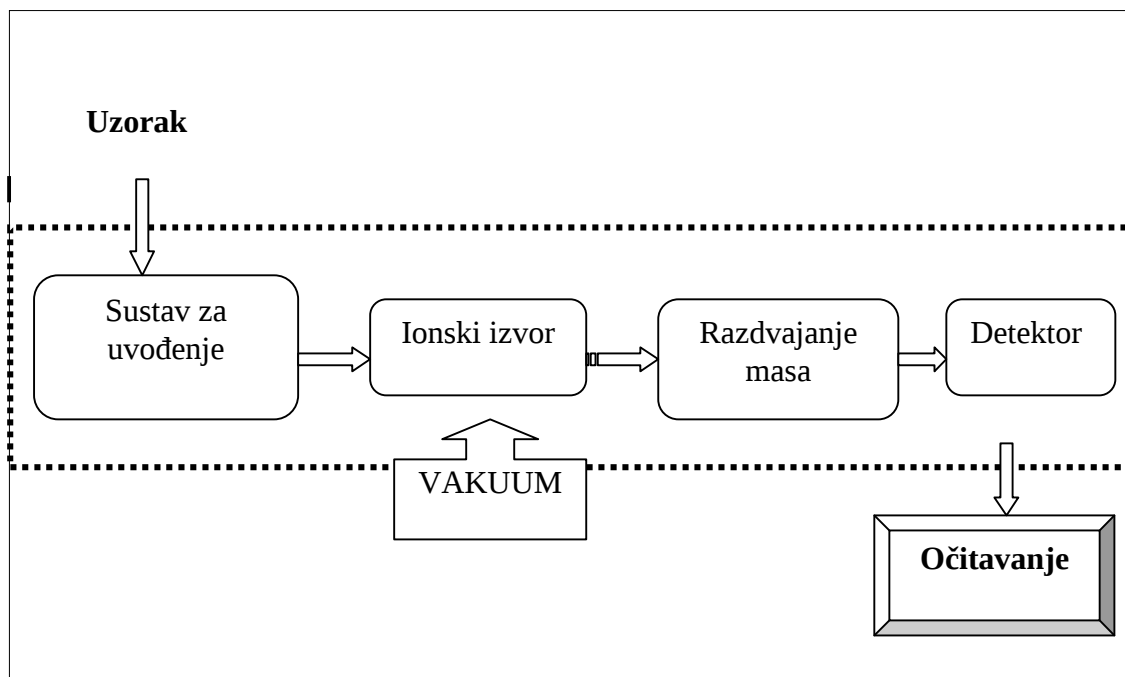
Slika 5. Shematski prikaz plinske kromatografije: dovod plina, protok kroz cijev u izoliranom sustavu (pećnica), očitavanje i ispis rezultata razdvajanja

Neke prednosti plinske kromatografije proizlaze iz činjenice da koristi plin kao mobilnu fazu. Plinovi, u odnosu na tekućine, imaju malu viskoznost, što omogućuje korištenje dugih kromatografskih kolona, kao i postizanje velike brzine mobilne faze uz umjerene tlakove. Pored toga, koeficijenti difuzije u plinovima znatno su veći nego u tekućinama, pa je optimalna brzina plinovite mobilne faze (u smislu širenja kromatografskih pikova) dosta visoka, tako da se razdvajanja i analize mogu provesti vrlo brzo. Budući da plin kao mobilna faza (plin nosilac) mora biti kemijski inertan, kod ove je kromatografije izbor stacionarne faze vrlo važan, dok je izbor plinske faze od manjeg značenja i obično ovisi o vrsti detektora koji je upotrijebljen. Kao mobilna faza uobičajeni su plinovi: helij, dušik, argon i ugljik(IV) oksid.

2.6. MASENI SPEKTROMETAR

Spektrometrija masa upotrebljava se u analitičke svrhe od ranih četrdesetih godina prošlog stoljeća, kada je korištena u petrokemijskoj industriji za kvantitativno određivanje smjese ugljikovodika. Veliki procvat doživljava povezivanjem sa plinskom kromatografijom, čime je unaprijeđena analiza hlapljivih spojeva; te s tekućinskom kromatografijom, čime je omogućena i analiza nehlapljivih spojeva kao što su peptidi, oligosaharidi, fosfolipidi i dr. Stalnim unapređivanjem tehnike i instrumentalizacije postignuti su gotovo nevjerojatni rezultati s obzirom na granicu osjetljivosti mjerljivih masa, osjetljivosti i točnosti. Granica detekcije spuštena je na razinu piko-, femto- i atomola, točnost u određivanju atomske mase bolja je od 10^{-9} u, dok je rezolucija s $13 \text{ m}/\Delta m$ povećana na $8 \cdot 10^6 \text{ m}/\Delta m$.

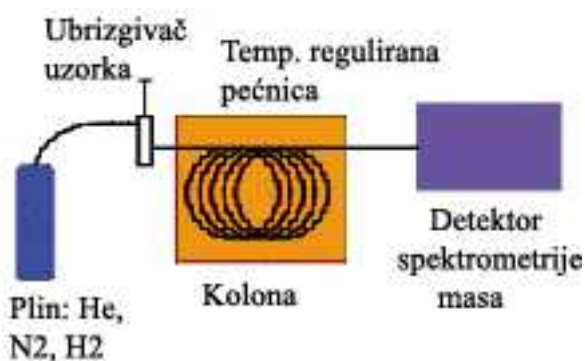
Spektrometrija masa (MS) analitička je tehnika u kojoj se molekula analita ionizira, pa se nastali ioni u plinskoj fazi razdvajaju i detektiraju prema omjeru njihove mase i naboja (slika 6). Sustav za uvođenje uzorka služi za dovođenje uzorka u ionizacijsku komoru uz minimalno narušavanje vakuumu, što je omogućeno sustavom ventila koji parcijalno prekidaju i uspostavljaju određeni tlak. U ionizacijskoj komori (ionskom izvoru) molekule analita se ioniziraju, a nastali ioni usmjeravaju se u analizator masa gdje se odjeljuju u vremenu ili prostoru na temelju njihovog omjera m/z , te detektiraju.



Slika 6. Glavni dijelovi spektrometra masa

2.7. KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE PRISUTNOSTI PROMETRINA U UZORCIMA SLEZENE POKUSNIH ŽIVOTINJA GC/MS METODOM

Kako bi se utvrdila koncentracija prometrina, nakon žrtvovanja i razudbe tretiranih životinja uzorci slezene analizirani su metodom vezanog sustava plinske kromatografije-spektrometrije masa (GC/MS; slika 7).



Slika 7. Shematski prikaz veznog sustava plinske kromatografije-spektrometrije masa

2.7.1. Kemikalije

1. standard - prometrin (čistoća 99,5 %, Dr. Ehrenstorfen GmbH, Njemačka)
2. interni standard – atrazin (čistoća 99,5 %, Dr. Ehrenstorfen GmbH, Njemačka)
3. aceton (čistoća 99,8 %, Merck, Njemačka)
4. n-heksan (čistoća 99,8 %, Merck, Njemačka)
5. etilacetat (čistoća 99,8 %, Merck, Njemačka)
6. diklormetan (čistoća 99,8 %, Merck, Njemačka)
7. natrij-volftamat-2-hidrat ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (čistoća p.a., Kemika, Hrvatska)

2.7.2. Otopina internog standarda

Pripremljena je izvorna otopina atrazina 3,5mg/mL u acetonu i dalje razrijeđena deioniziranom vodom do 3500ng/mL.

2.7.3. Standardni uzorak slezene

Za potrebe baždarnog pravca priređeno je osam koncentracije prometrina od 4 do 1500 ng/mg na sljedeći način:

1. priređena je izvorna otopina prometrina u acetonu koncentracije 1mg/mL i dalje je razrijeđena do željenih ng/mL koncentracija u deioniziranoj vodi.
2. netretirani homogenizirani uzorci slezene su prethodno analizirani GC/MS metodom kako bi se utvrdilo da ne sadrže tragove analiziranog herbicida prometrina, ili atrazina, koji je korišten kao interni standard.
3. određeni volumeni pripremljenih otopina prometrina dodavani su u netretirane uzorke pune tkiva slezene kako bi se dobile sljedeće koncentracije: 4, 15, 25, 50, 100, 500, 1000, 1500 ng/mg.
4. u 200 mg tako pripremljenog uzorka dodano je 0.2 mL otopine internog standarda.

2.8. OPREMA

2.8.1. Plinska kromatografija

Kromatografska ispitivanja provedena su na Shimadzu GCMS-QP2010S plinskom kromatografu uz primjenu detektora spektrofotometra masa (MS) i HP-5ms kapilarne kolone duljine 30 m, unutarnjeg promjera 0,25 mm, debljine filma 0,25 µm.

Primijenjen je temperaturni program početne temperature 90°C tijekom 6 minuta, potom brzinom od 15°C/minuti temperatura raste do 280°C, na toj temperaturi ostaje sljedećih 11 minuta.

- Temperatura peći: 90°C
- Temperatura injektora: 275°C
- Način injektiranja: bez odvajanja
- Kontrola protoka: linearna brzina
- Linerana brzina: 45,3 cm/s

- Tlak: 107,2 kPa
- Ukupni protok: 19,5 mL/min
- Temperatura detektora: 300°C
- Vrijeme trajanja metode: 30 minuta
- Kvantifikacija prometrina i atrazina provedena je praćenjem karakterističnih omjera mase i naboja (m/z je bezdimenzijska veličina). Karakteristična m/z vrijednost za prometrin je 241, a za atrazin 200. Kao potvrdni m/z brojevi, za prometrin su praćeni i 184 i 226; za atrazin 215 i 58.

2.8.2. Ekstrakcija prometrina iz uzoraka

Prometrin je iz homogeniziranih standardnih i stvarnih uzoraka slezene ekstrahiran na sljedeći način: na određenu masu slezene (oko 200 mg) je dodano 0,2 mL internog standarda i 0,15 g natrij-volframata. Nakon što se natrij-volframat otopio, u otopinu je dodano 2 mL smjese otapala etilacetat:diklormetan 1:3. Smjesa uzorka i otapala miješana je na vorteks mješalici 5 minuta, nakon čega je 10 minuta centrifugirana brzinom od 6000 okretaja/minuti. Nakon centrifugiranja tj. razdvajanja faza, uzet je 1 mL gornjeg, organskog sloja; prebačen u staklenu bočicu i uparen do suha u struji dušika. Nakon uparavanja ekstrakt je pročišćen u dva navrata s 1 mL n-heksana te ponovo uparen do suha u struji dušika. Kada se uzorak upario do suha u njega je dodan 0,1mL n-heksana te je 1 μ L takve otopine unešeno u kromatograf. Svaki je uzorak unešen tri puta.

2.8.3. Određivanje koncentracije prometrina u uzorcima slezene

Nakon ekstrakcije, svaki je pojedini standardni uzorak (u području linearnosti) unešen u kromatograf. Za svaku je pojedinu otopinu izračunat relativan odziv pika prometrina prema piku internog standarda. Jednadžba baždarnog pravca te kvadrat koeficijenta korelacije R^2 izračunati su softverskim programom GCMS solutions.

Koncentracija prometrina u uzorcima slezene izračunata je prema jednadžbi:

$$Y = 4,5962X + 0,0358$$

2.9. PROVJERA GC/MS METODE

Potvrda metode provedena je praćenjem sljedećih parametara: selektivnosti, granice kvantifikacije, linearnosti, preciznosi uz zadane kriterije prihvatljivosti.

2.10. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Studentovim t-testom analizirane su spolne razlike u svakoj pojedinoj uzorkovanoj grupi. Upotrebom t-testa sparenih uzoraka za srednje vrijednosti, koji ne pretpostavlja jednake varijance u populacijama dva uzorka, odredila sam koliko su njihove vrijednosti različite. Nul hipoteza korištena u testu: srednja vrijednost sparenih razlika iz dvije populacije uzoraka jednaka je nuli.

3. REZULTATI

Metodom vezanog sustava plinske kromatografije-spektrometrije masa (GC/MS) nakon žrtvovanja i razudbe tretiranih životinja, u uzorcima slezene utvrđene su koncentracije prometrina. Rezultati izmjerenih koncentracija prometrina preračunati su obzirom na masu organa, kako bi se dobili rezultati u ng/mg slezene. Rezultati GC/MS analize i mase uzoraka slezene prikazani su u tablicama 3, 4, 5 i 6.

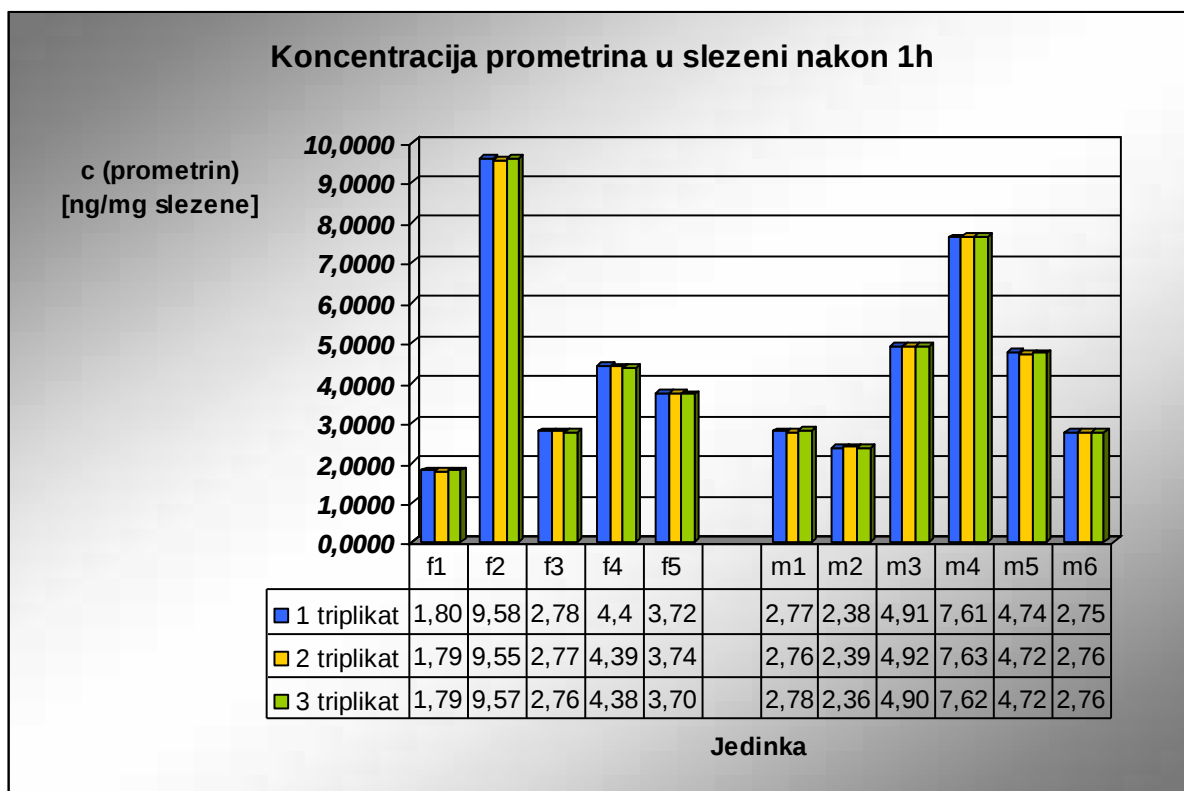
Vrijednosti koncentracija prometrina u ng/mg u uzorcima slezene 1 sat nakon aplikacije 375 mg/kg tjelesne težine prometrina *per os* prikazane su u tablici 3. Za uzorke organa izračunata je srednja vrijednost i standardna devijacija, a za koncentraciju prometrina, izračunatu iz mase određene GC/MS sustavom, uz prethodne dvije izračunata je i vrijednost aritmetičke sredine. Koncentracije prometrina u slezenama mužjaka i ženki statistički su uspoređene, no analizom nije utvrđena značajnost razlike. Slika 8 predstavlja grafički i numerički prikaz vrijednosti prometrina u slezeni sat vremena nakon aplikacije po svakom triplicatu. Slika 9 prikazuje kromatografski prikaz (sirovi podatak) koncentracije prometrina u slezeni mužjaka (m4).

Tablica 3. Masa slezene životinja žrtvovanih 1 sat nakon aplikacije 375 mg/kg (1/10 LD₅₀) prometrina *per os* i koncentracija prometrina određena GC/MS metodom

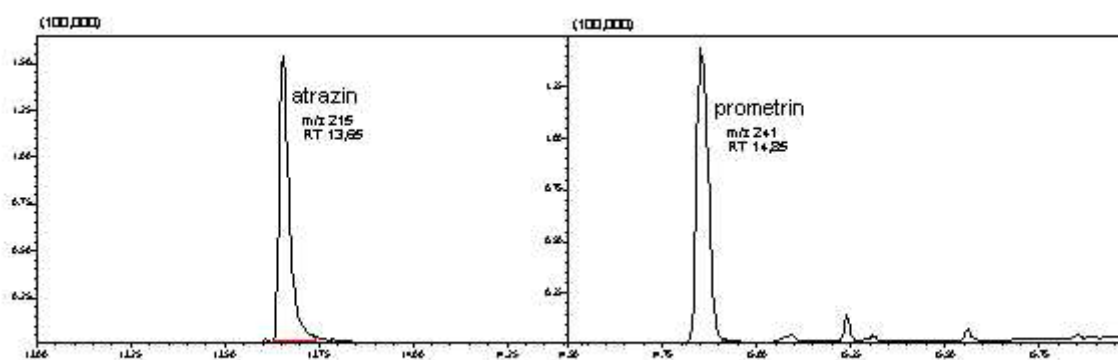
1h nakon unosa prometrina	Masa slezene [mg]		Koncentracija prometrina [ng/mg slezene]			
Skupina	Srednja vrijednost	SD	Srednja vrijednost	SD	Median	Značajnost razlika
m	70,47	13,03	4,195	1,876	3,754	nz*
f	70,06	9,94	4,449	2,801	3,717	
m+f	70,28	11,15	4,310	2,306	3,717	

*nz – razlika nije statistički značajna ($p \geq 0.05$). SD – standardna devijacija.

m – mužjaci; f - ženke



Slika 8. Grafički i numerički prikaz izmjerenih vrijednosti koncentracije prometrina u slezeni životinja po svakom triplikatu nakon 1 sata izloženosti prometrinu.



Slika 9. Kromatogramski prikaz koncentracije prometrina u slezeni životinja 1 sat nakon aplikacije (uzorak 242; m4). RT prometrin 14,85 min; RT za atrazin 13,65.

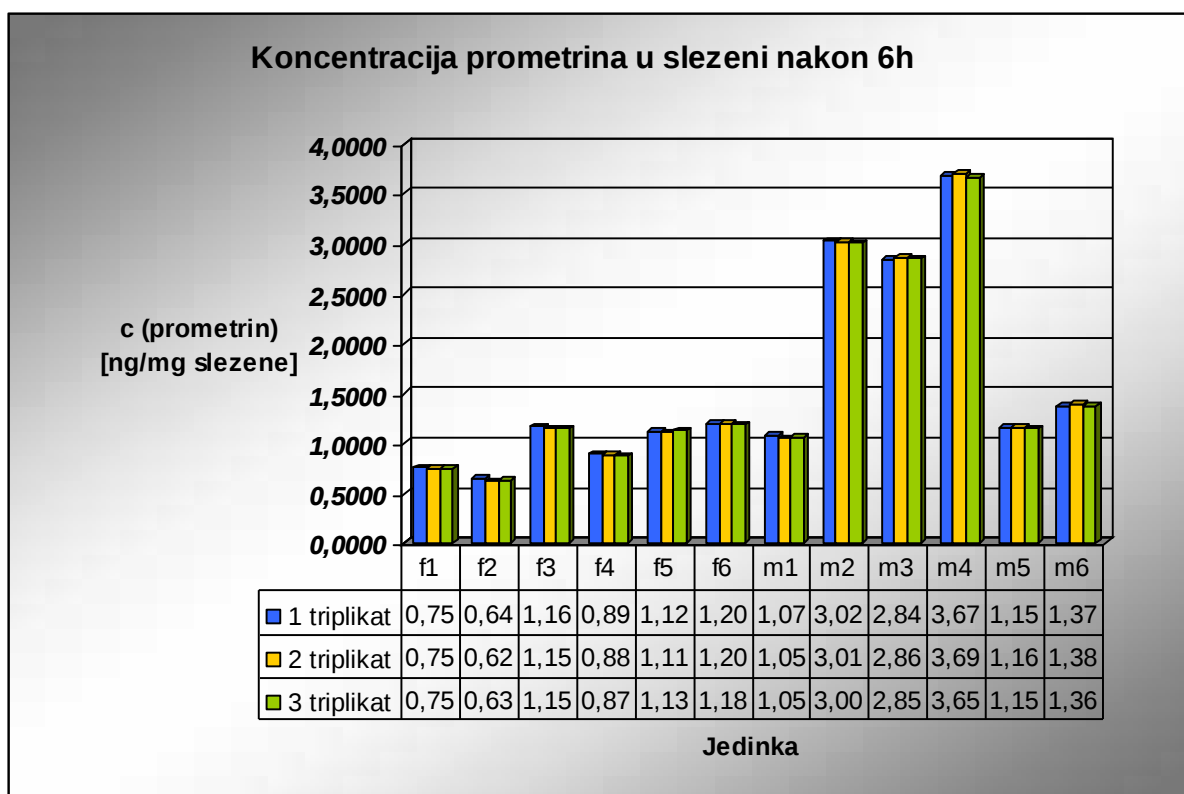
Vrijednosti koncentracija prometrina u ng/mg u uzorcima slezene 6 sati nakon aplikacije 375mg/kg tjelesne težine prometrina *per os* prikazane su u tablici 4. Za uzorke organa izračunata je srednja vrijednost i standardna devijacija, a za koncentraciju prometrina, izračunatu iz mase određene GC/MS sustavom, uz prethodne dvije izračunata je i vrijednost aritmetičke sredine. Koncentracije prometrina u slezenama mužjaka i ženki statistički su uspoređene, dobivena je razlika statistički značajna. Slika 10 predstavlja grafički i numerički prikaz vrijednosti prometrina u slezeni šest sati nakon aplikacije po svakom triplikatu. Slika 11 prikazuje kromatografski prikaz (sirovi podatak) koncentracije prometrina u slezeni mužjaka (m4).

Tablica 4. Masa slezene životinja žrtvovanih 6 sati nakon aplikacije 375 mg/kg (1/10 LD₅₀) prometrina *per os* i koncentracija prometrina određena GC/MS metodom.

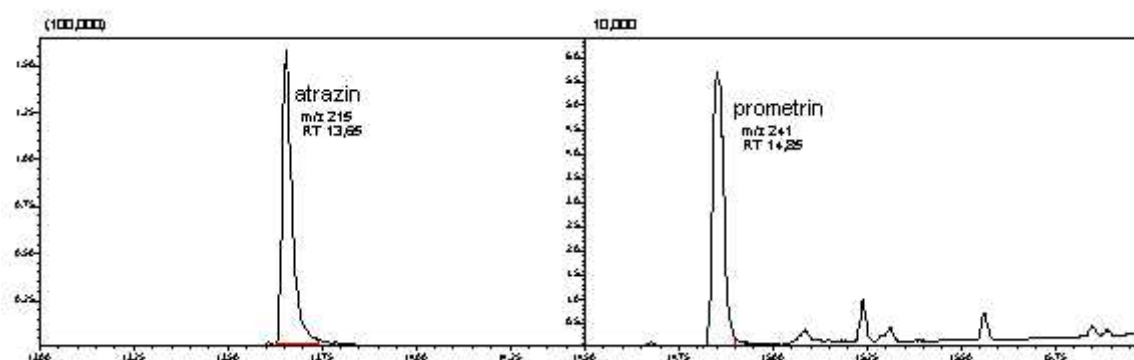
6h nakon unosa prometrina	Masa slezene [mg]		Koncentracija prometrina [ng/mg slezene]			
	Srednja vrijednost	SD	Srednja vrijednost	SD	Median	Značajnost razlika
m	73,75	16,75	2,189	1,056	2,115	**
f	70,92	14,06	0,959	0,221	1,005	
m+f	72,33	14,82	1,574	0,977	1,153	

** razlika je statistički značajna ($p \leq 0.05$). SD – standardna devijacija.

m – mužjaci; f - ženke



Slika 10. Grafički i numerički prikaz izmjerenih vrijednosti koncentracije prometrina u slezeni životinja po svakom triplikatu nakon 6 sati izloženosti prometrinu.



Slika 11. Kromatogramski prikaz koncentracije prometrina u slezeni životinja 6 sati nakon aplikacije (uzorak 442; m4). RT prometrin 14,85 min; RT za atrazin 13,65.

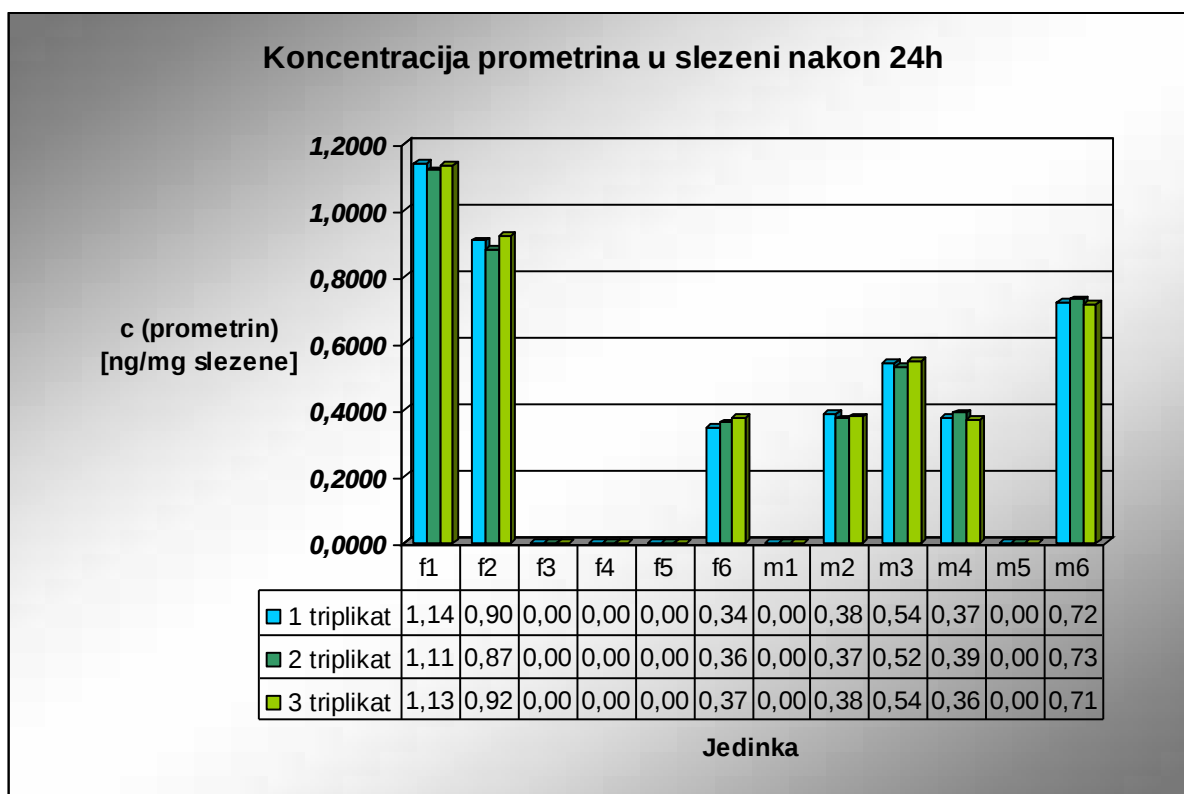
Vrijednosti koncentracija prometrina u ng/mg u uzorcima slezene dvadeset i četiri sata nakon aplikacije prometrina 375 mg/kg tjelesne težine *per os* prikazane su u tablici 5. Za uzorke organa izračunata je srednja vrijednost i standardna devijacija, a za koncentraciju prometrina, izračunatu iz mase određene GC/MS sustavom, uz prethodne dvije izračunata je i vrijednost aritmetičke sredine. Koncentracije prometrina u slezenama mužjaka i ženki nisu statistički uspoređene, pošto je prometrin zabilježen u malom broju jedinki (Slika 12). Slika 13 prikazuje kromatografski prikaz (sirovi podatak) koncentracije prometrina u slezeni mužjaka (m4).

Tablica 5. Masa slezene životinja žrtvovanih 24 sata nakon aplikacije 375 mg/kg (1/10 LD₅₀) prometrina *per os* i koncentracija prometrina određena GC/MS metodom. Broj uzoraka bio je premali za statističku analizu.

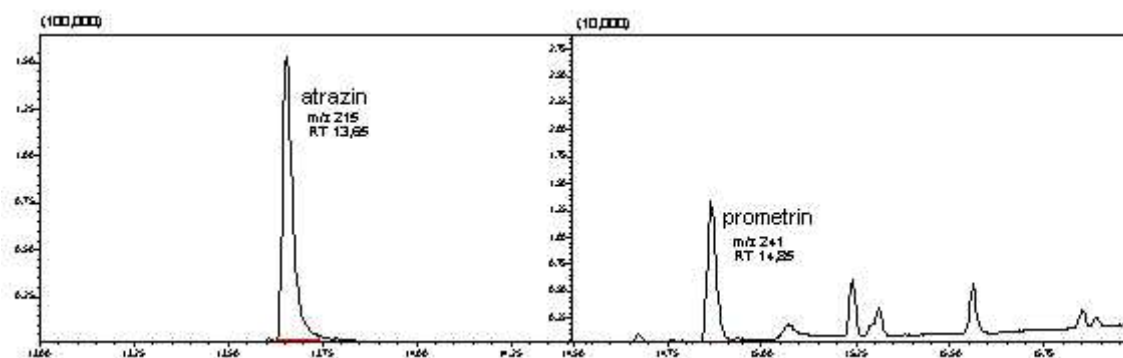
24h nakon unosa prometrina	Masa slezene [mg]		Koncentracija prometrina [ng/mg slezene]			
Skupina	Srednja vrijednost	SD	Srednja vrijednost	SD	Median	Značajnost razlika
m	86,32	22,96	0,337	0,273	0,378	#Bez testiranja.
f	50,48	16,49	0,400	0,474	0,174	
m+f	68,40	26,71	0,368	0,382	0,372	

SD – standardna devijacija. m – mužjaci; f – ženke

Koncentracije prometrina u slezenama mužjaka i ženki nisu statistički uspoređene, pošto je prometrin zabilježen u polovici jedinki.



Slika 12. Grafički i numerički prikaz izmjerenih vrijednosti koncentracije prometrina u slezeni životinja po svakom triplikatu nakon 24 sata izloženosti prometrinu



Slika 13. Kromatogramski prikaz koncentracije prometrina u slezeni životinja 24 sata nakon aplikacije (uzorak 642; m4). RT prometrin 14,85 min; RT za atrazin 13,65.

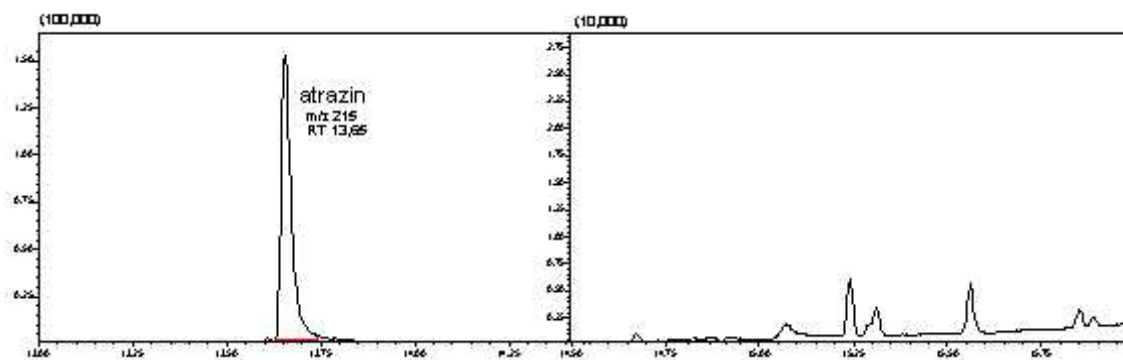
Koncentracija prometrina u ng/mg u uzorcima slezene četrdeset i osam sati nakon aplikacije prometrina 375m g/kg tjelesne težine *per os* iznosile su nula ng/mg slezene. Težine organa

prikazane su u tablici 6. Za uzorke organa izračunata je srednja vrijednost i standardna devijacija. Ni u jednom uzorku iz obje skupine nije utvrđena prisutnost prometrina, stoga skupine nisu statistički analizirane. Slika 14 prikazuje kromatografski prikaz (sirovi podatak) koncentracije prometrina u slezeni mužjaka (m4).

Tablica 6. Masa slezene životinja žrtvovanih 48 sati nakon aplikacije 375 mg/kg (1/10 LD₅₀) prometrina *per os* i koncentracija prometrina određena GC/MS metodom

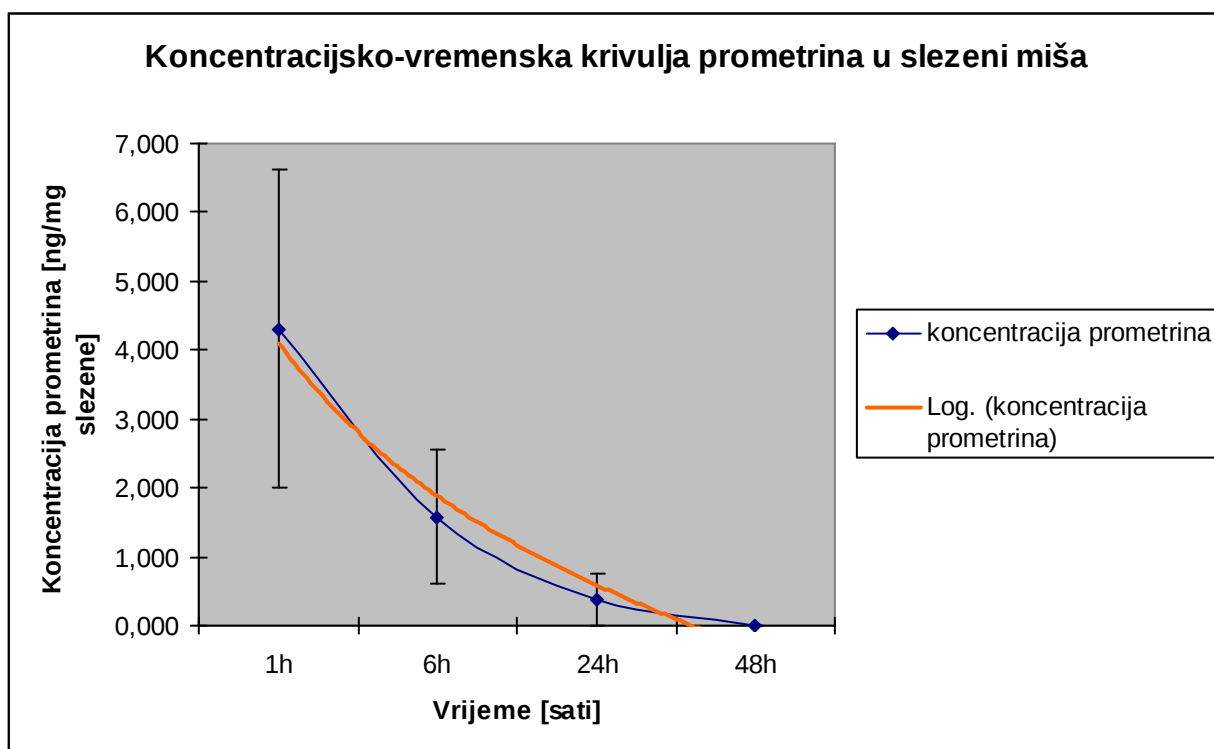
48h nakon unosa prometrina	Masa slezene [mg]		Koncentracija prometrina [ng/mg slezene]			
Skupina	Srednja vrijednost	SD	Srednja vrijednost	SD	Median	Značajnost razlika
m	64,80	11,50	0,00	n*	n	Bez testiranja.
f	55,43	15,20	0,00	n	n	
m+f	60,12	13,75	0,00	n	n	

*n- neodređeno. SD – standardna devijacija. m – mužjaci; f – ženke.



Slika 14. Kromatografski prikaz koncentracije prometrina u slezeni životinja 48 sati nakon aplikacije (uzorak 842; m4). RT za atrazin 13,65; prometrin nije zabilježen u uzorcima.

Nakon obrade podataka za svaku pojedinu skupinu, napravljena je kumulativna koncentracijsko vremenska krivulja prometrina u slezeni analiziranih jedinki, te je logaritmiranjem pokazana linearna ovisnost koncentracije kao funkcije vremena (slika 16).



Slika 16. Koncentracijsko-vremenska krivulja prometrina u svim uzorkovanim skupinama (aplicirana doza: 375 mg/kg) uz logaritamsku funkciju koncentracije u ovisnosti o vremenu

Srednje su vrijednosti koncentracija prometrina (tablice 3-5) u svakoj analiziranoj skupini podijeljene istima za druge skupine, kako bi se dobili relativni vremenski koeficijenti omjera koncentracija prometrina (tablice 7 i 8). Za ženke je omjer skupina 1 i 6 sati veći nego u mužjaka, dok su omjeri skupina 1 i 24 sata te 6 i 24 sata manji.

Tablica 7. Koeficijenti zabilježenih koncentracija prometrina u vremenski podijeljenim skupinama mužjaka (m)

Skupine (m)	Koeficijenti koncentracija prometrina
(S1h) : (S6h)	1,91
(S1h) : (S24h)	12,43
(S6h): (S24h)	6,49

Tablica 8. Koeficijenti zabilježenih koncentracija prometrina u vremenski podijeljenim skupinama ženki (f)

Skupine (f)	Koeficijenti koncentracija prometrina
(S1h) : (S6h)	4,64
(S1h) : (S24h)	11,13
(S6h): (S24h)	2,40

4. RASPRAVA

Istraživanje je provedeno kao simulacija oralnog unosa okolišno prisutnog prometrina, slično istraživanju koje su Maynard i sur. (1999) proveli na štakorima. Prometrin je utvrđen u uzorcima slezene miševa, u vremenu jedan, šest i dvadeset i četiri sata nakon aplikacije.

Iako su koncentracije prometrina izmjerene u slezeni niske (tablice 3-6), ukazuju na njegovo ponašanje u skladu sa LADME shemom, što se očituje na koncentracijsko-vremenskoj krivulji (slika 15). Tijekom prvog sata krivulja je vrlo strma, jer se u α -fazi prometrin ubrzano izlučuje iz slezene. Nakon šest sati od aplikacije na krivulji se primjećuje prelazak u β -fazu eliminacije, kada dolazi do izlučivanja ksenobiotika ali sporijim intenzitetom nego u α -fazi opisano prema Fichtlu (1999).

Ova je postdistributivna faza vidljiva u dijelu krivulje s blažim nagibom. Ona traje i dan nakon aplikacije, iako je s obzirom na broj jedinki u čijoj je slezeni utvrđen (slika 6), moguće govoriti o potencijalu potpunog izlučivanja prometrina iz slezene nakon 24 sata ovisno o individualnim razlikama unutar vrste. Mehanizam eliminacije prometrina iz slezene zasad je nedovoljno poznat i ne postoje literaturni navodi o toj problematici, no pretpostavlja se aktivna eliminacija transportnim proteinima poput primjerice P-glikoproteina i biotransformacija sulfotransferazama i sulfonacijom, slično mehanizmu u jetri kojeg je predložio Maynard i sur. (1999) utvrdivši više od 30 metabolita biotransformacije. Zasad je pokazano da se prometrin u apsorbiranom i distribuiranom obliku zbog lipidima bogate strukture najlakše veže u masnom tkivu (Đikić 2006). Sudeći prema krivulji koncentracije prometrina u slezeni, apsorpcija je faza koja ne prevladava u njegovoj toksikokinetici po organizmu, te je postotak doze koji ulazi u sistemski krvotok do slezene relativno mali. Slično je pokazao i Maynard i sur. (1999) na štakorima gdje je utvrdio da se 1-2 % prometrina zadržava u krvi a 0.4-0.6 % prometrina iz prvotne doze apsorbira u različita tkiva tijekom prva 24 sata od unosa.

Spolne su razlike zamjetljive u jednoj od dvije skupine koje je bilo moguće statistički analizirati (tablice 3 i 4). Slezene mužjaka i ženki nakon sat vremena od intoksikacije statistički se ne razlikuju značajno. Značajnost razlike među spolovima druge skupine jedinki (tablica 4), žrtvovane 6 sati nakon intoksikacije, ukazuje na to da je nasumičan odabir jedinki mogao imati utjecaja na rezultate; kao i njihovo opće metaboličko stanje prilikom uzorkovanja (unos vode u organizam i sl.). Osim toga, metoda ekstrakcije prometrina iz

organa mogla je za svaki pojedini uzorak imati različitu učinkovitost, na to ukazuju i standardne devijacije svake pojedine uzorkovane skupine (tablice 3-5). Statističku analizu potvrđuje i izgled koncentracijsko-vremenske krivulje u tom dijelu grafa. Dok se za ženke može pretpostaviti prelazak iz faze raspodjele po organima (te izlučivanja iz krvi) u eliminacijsku fazu, kod mužjaka se nakon šest sati još uvijek događa raspodjela (tablice 7 i 8). Nakon 24 sata proces eliminacije već je značajno napredovao, a spolni dimorfizam više nije uočljiv. Prema Maynardu su u tkivima ženki veće vrijednosti zaostale koncentracije prometrina nego u mužjaka, no s obzirom da su te koncentracije ovisne o dozi, 1/10 LD₅₀ primijenjena u ovom pokusu nije to potvrdila.

Koeficijenti koncentracija prometrina (tablice 7, 8), uzevši u obzir standardne devijacije za vremenske skupine (slika 15), ukazuju da nakon 6 sati u slezeni još postoji početna koncentracija apsorbirana u tkivo, dakle potvrđuju iz krivulje pretpostavljenu fazu apsorpcije, prije nego je počela detoksikacija. Zanimljiv je više od tri puta veći koeficijent koncentracija prometrina za skupine S1h i S6h u ženki, stoga je detoksikacija brža nego u mužjaka. Omjer S1h: S24 h ne razlikuje se u mužjaka i ženki, dok se iz većeg koeficijenta za mužjake skupina S6h i S24h može pretpostaviti ubrzanje procesa detoksikacije, za razliku od početnog zaostajanja za metabolizmom u ženki. Pošto su u metaboliziranju prometrina u mužjaka i ženki utvrđeni kvalitativno i kvantitativno isti metaboliti (Maynard i sur.1999), razlika je očito u početnoj fazi raspodjele u organe zbog različite brzine apsorpcije uzrokovane drukčijim omjerom masti u tjelesnoj građi.

5. ZAKLJUČAK

1. Utvrđeno je da slezena s obzirom na unešenu dozu u iznosu $1/10 LD_{50}$ nema bioakumulativni potencijal za prometrin.
2. Dinamika eliminacije prometrina nakon početne faze apsorpcije pokazuje da je izlučivanje prometrina iz slezene intenzivno unutar prvih 6 sati od unosa.
3. Razlike među spolovima nisu vidljive u svim kinetičkim fazama, no statistički su značajne u vremenskom razdoblju 6 sati od intoksikacije, što upućuje na razlike u metaboliziranju prometrina ovisne o spolu.
4. Prema postotku unešene doze dobivenom se koncentracijsko-vremenskom krivuljom prometrina u slezeni (slika 16), uz pretpostavku alometrijskog koeficijenta, može procijeniti teoretska bioraspoloživa koncentracija prometrina u slezeni za bilo koju unešenu dozu.
5. Rezultati na posredan način predstavljaju smjernice za forenzičku toksikologiju, koja s obzirom na koncentraciju ksenobiotika u tkivu ima za cilj pretpostaviti vrijeme kada je uslijedio unos otrova u organizam.
6. Procjenom i ekstrapolacijom iz dobivene koncentracijsko-vremenske krivulje prometrina u slezeni miša, rezultati se mogu neposredno koristiti za procjenu rizika alometrijskim metodama usporedbom na drugim vrstama i čovjeku.

6. LITERATURA

Altieri , M.A. 2001. Genetically engineered crops: Separating the myths from the reality. Bulletin of Science Technology Society **21**, 130-146.

Biser, J.A., Vogel, L.A., Berger, J., Hjelle, B., Loew, S.S.2004. Effects of heavy metals on immunocompetence of white-footed mice (*Peromyscus leucopus*). Wildl. Dis. **40**, 173-184.

Blakley, B., Brousseau, P., Fournier, M., Voccia, I., 1999. Immunotoxicity of pesticides: a review. Toxicol. Ind. Health. **15**, 119-132.

Brooks, D.R., Clark, S.J., Perry, J.N., Bohan, D.A., Champion, G.T., Firbank, L.G., Haughton, A.J., Hawes, C., Heard M.S., Woiwod, I.P. 2005. Invertebrate biodiversity in maize following withdrawal of triazine herbicides. Proc. Biol. Sci. **272**, 1497–1502.

Cesta, M.F., 2006. Normal strucure, function, and histology of the spleen. Toxicol. and Ind. Health. **34**, 455-465.

Chen, H., Quin, T., Zhao, L., Xu, X.. 2002. Effects of lead on 4-aminobiphenyl pharmacokinetics in liver, kidney, spleen, testes, heart, lung and hemoglobin adduct for rat model. Ecotox. **11**, 255-264.

Chiverton, P. A., Sotherton. N. W. 1991. The effects on beneficial arthropods of the exclusion of herbicides from cereal crop edges. J. Appl. Ecol. **28**, 1027-1039.

Chu, I., Bowers, W.J., Caldwell, D., Nakai, J., Pulido, O., Yagminas, A., Wade, M.G., Moir, D., Gill, S., Mueller, R. 2005. Toxicological effects of gestational and lactational exposure to a mixture of persistent organochlorines in rats: systemic effects. Toxicol.Sci. **88**, 645-655.

Đikić, D. 2006. Učinak prometrina na odnose serumskih i tkivnih enzimskih biomarkera u miša. Doktorska disertacija. PMF, Zagreb.

- Elmore, S.A. 2006. Enhanced histopathology of the spleen. *Toxicol Pathol.* **34**, 648-655.
- Ewald, J.A, Aebischer, N.J. 2000. Trends in pesticide use and efficacy during 26 years of changing agriculture in southern England. *Environ. Monit. Assess.* **64**, 493–529.
- Fichtl, B. 1999. Principles of toxicology. U: Wexler, P., Hakkinen, P.J., Mohapatra, A., Gilbert, S.G. Information resources in Toxicology. New York, Academic Press, str. 43-82.
- Honek, A. 1988. The effect of crop density and microclimate on pitfall trap catches of Carabidae, Staphylinidae (Coleoptera) and Lycosidae (Araneae) in cereal fields. *Pedobiologia.* **32**, 233–234.
- Jackel, H., Stamm, H. 1988. Molecular complexes, 9. Arene complexes of fervenulin, an antibiotic structurally related to caffeine. Formation constants and complex topologies determined by the refined ¹H-NMR shift method. *Arch Pharm.* **321**, 213-219.
- Jadhav, S.H., Sarkar, S.N., Ram, G.C., Tripathi, H.C. 2007. Immunosuppressive effect of subchronic exposure to a mixture of eight heavy metals, found as groundwater contaminants in different areas of India, through drinking water in male rats. *Environ. Contam. Toxicol.* **53**, 450-458.
- Kamrin, M.A. (1997): Pesticide profiles; toxicity, environmental impact, and fate , Lewis, Boca Raton, Florida.
- Ma, J., Wang, S., Wang, P., Ma, L., Chen, X., Xu, R. 2006. Toxicity assessment of 40 herbicides to the green alga *Raphidocelis subcapitata*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **63**, 456-462.
- Maynard, M.S., Brumback, D., Itterly, W., Capps, T., Rose, R. 1999. Metabolism of [(1)(4)C] prometryn in rats. *J Agric. Food Chem.* **47**, 3858-3865.
- Mücketer, H. 2003. What is toxicology and how does toxicity occur? *Clin. Anaest.* **17**, 5-27.

Prater, M.R., Gogal, R.M. Jr., Blaylock, B.L., Longstreth, J., Holladay, S.D. 2002. Single-dose topical exposure to the pyrethroid insecticide permethrin in C57BL/6N mice: effects on thymus and spleen. *Food Chem Toxicol.* **40**, 1863-1873.

Rosenthal, G.J., Snyder, C.A. 1984. The effects of ethanol and the role of the spleen during benzene-induced hematotoxicity. *Toxicol.* **30**, 283-295.

Sanderson, J.T., Seinen, W., Giesy, J.P., Van den Berg, M. 2000. 2-Chloro-S-triazine herbicides induce aromatase (CYP-19) activity in H295R human adrenocortical carcinoma cells: a novel mechanism for estrogenicity. *Toxicol Sci.* **54**, 121–127.

Schmidt, E.E, MacDonald, I.C, Groom, A.C. 1985. Microcirculation in mouse spleen (nonsinusal) studied by means of corrosion casts. *J. Morphol.* **186**, 17-29.

Schmitt-Jansen, M., Altenburger, R. 2005. Predicting and observing responses of algal communities to photosystem II-herbicide exposure using pollution-induced community tolerance and species-sensitivity distributions. *Environ. Toxicol. Chem.* **24**, 304-312.

Springer, O.P., Springer, D. 2008. *Otrovani modrozeleni planet.* Meridijani, Zagreb.

Stoker, T.E., Laws, S.C., Guidici, D.L., Cooper, R.L. 2000. The effect of atrazine on puberty in male wistar rats: an evaluation in the protocol for the assessment of pubertal development and thyroid function. *Toxicol Sci.* **58**, 50-59.

Suttie, A.W., 2006. Histopathology of the spleen. *Toxicol. Pat.* **34**, 455-465.

US Environmental Protection Agency (1996):EPA draft final list of recommendations for chemicals in the National Survey for Pesticides in Groundwater. *Chem. Regul. Rep.* **9**, 1033.

Wackett, L.P., Sadowsky, M.J., Martinez, B., Shapir, N. 2002. Biodegradation of atrazine and related s-triazine compounds: from enzymes to field studies. *Appl. Microbio. and Biotech.* **58**, 39-45.

Weiss, M., Kuhlmann, O., Hung, D.Y., Roberts, M.S. 2000. Cytoplasmic binding and disposition kinetics of diclofenac in the isolated perfused rat liver. *Brit. Journ. Pharmac.* **130**, 1331–1338