

# Promjene biomarkera oksidativnog stresa u imunskim organima miševa izloženih imazalilu, cipermetrinu i karbendazimu

---

**Cvitanović, Antonija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2012**

*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:217:178727>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-22**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu**

**Prirodoslovno-matematički fakultet**

**Biološki odsjek**

**Antonija Cvitanović**

**Promjene biomarkera oksidativnog stresa u imunskim  
organima miševa izloženih imazalilu, cipermetrinu i  
karbendazimu**

**Diplomski rad**

**Zagreb, 2012. godina**

Ovaj rad, izrađen na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom doc.dr.sc. Domagoja Đikića, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja profesor biologije.

Zahvaljujem svom mentoru doc.dr.sc. Domagoju Đikiću na stručnom vodstvu i pomoći pri izradi ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem dr.sc. Duji Lisičiću.

Hvala kolegama studentima koji su obogatili moje iskustvo studiranja te roditeljima na podršci i razumijevanju.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

### **PROMJENE BIOMARKERA OKSIDATIVNOG STRESA U IMUNOSNIM ORGANIMA MIŠEVA IZLOŽENIH IMAZALILU, CIPERMETRINU I KARBENDAZIMU**

Antonija Cvitanović

Rooseveltov trg 6, Zagreb

Imazalil, cipermetrin i karbendazim su detektirani u biljkama za ljudsku prehranu. Kako bi istražili da li njihove kombinacije, primijenjivane oralno u niskim dozama, izazivaju imunotoksičnost, proveden je *in vivo* eksperiment. Doze od 10 mg/kg imazalila i cipermetrina te 20 mg/kg karbendazima i njihove kombinacije davane su miševima dnevno tijekom 28 dana. Nakon 24 sata od zadnje doze, biomarkeri oksidativnog stresa su mjereni u imunološkim organima: aktivnost katalaze i superoksid dismutaze te koncentracije reduciranog glutationa, malonildialdehida i 8-iso prostaglandina F<sub>2α</sub>. U usporedbi s kontrolnom skupinom, ovi markeri su promijenili aktivnost i koncentracije. Naši rezultati sugeriraju da pesticidi imaju potencijal izazvati oksidativni stres u imunološkim organima. Smanjenje koncentracija reduciranog glutationa utvrđene su u svim skupinama, osim kod skupine izložene karbendazimu u timusu i limfnim čvorovima. Opće povećanje koncentracije malonildialdehida je zabilježeno u svim skupinama, što ukazuje na to da se toksični učinak ovih pesticida vjerojatno vrši putem stvaranja slobodnih radikala. Povećanje aktivnosti superoksid dismutaze i katalaze u slezeni ukazuje na prekomjernu proizvodnju reaktivnih kisikovih vrsta.

(67 stranica, 23 slike, 20 tablica, 67 literaturnih navoda, jezik izvornika:hrvatski)

Rad je pohranjen u Centralnoj biblioteci Biološkog odsjeka, Rooseveltov trg 6.

**Ključne riječi:** katalaza/superoksid dismutaza/malonildialdehid/8-iso prostaglandin F<sub>2α</sub>/glutation/imunotoksičnost

**Voditelj:** Doc.dr.sc. Domagoj Đikić

**Ocjenjitelji:**

**Rad prihvaćen:**

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation Thesis

### **CHANGES OF OXIDATIVE STRESS BIOMARKERS IN ORGANS OF IMMUNE SYSTEM IN MICE EXPOSED TO IMAZALIL, CYPERMETHRIN AND CARBENDAZIM**

Antonija Cvitanović

Rooseveltovo trg 6, Zagreb

Imazalil, cypermethrin and carbendazim are detected in plants for human nutrition. To explore whether their combinations, applied orally in low doses, would induce immunotoxicity, a subchronic *in vivo* experiment was conducted. Doses of 10 mg/kg of imazalil and cypermethrin and 20 mg/kg of carbendazim and their combinations were given to Swiss mice daily during 28 days. After 24 hours from the last dose, oxidative stress biomarkers in immune system organs were analysed: catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activities, malonaldehyde (MDA), 8-iso prostaglandin F<sub>2α</sub> and glutathione (GSH) concentrations. Compared to control group these markers changed their activities and concentrations. Our results suggested that these pesticides have the potential to induce oxidative stress of the immune system. Decreases in GSH concentrations were determined in all groups except for groups with carbendazim in thymus and lymph node. A general increase in malonaldehyde (MDA) concentration was observed in all test groups, which suggested that the toxic effects of these pesticides were probably exerted through free radical generation. Increases in superoxide dismutase and catalase activities in spleen point to the excessive production of reactive oxygen species.

(67 pages, 23 figures, 20 tables, 67 references, original in Croatian language)

**Thesis deposit in:** Central Library of Department of Biology, Rooseveltovo trg 6.

**Key words:** catalase/superoxid dismutase/malonilaldehyd/8-iso prostaglandin F<sub>2α</sub>/glutathion/immunotoxicity

**Supervisor:** Ph.D. Domagoj Đikić, Asst.Prof

**Reviewers:**

**Thesis accepted:**

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1.</b>
<b>2. LITERATURNI PREGLED</b> .....	<b>3.</b>
2.1. Kako pesticidi narušavaju imunološki sustav .....	3.
2.2. Imazalil .....	7.
2.3. Cipermetrin .....	11.
2.4. Karbendazim .....	16.
2.5. Fiziologija antioksidativnih enzima .....	20.
2.6. Utjecaj pesticida na antioksidativne enzime .....	30.
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>33.</b>
3.1. Pokusne životinje .....	33.
3.2. Plan pokusa i način aplikacije pojedinih doza ispitivanih pesticida.....	34.
3.3. Određivanje oksidativnog stresa timusa, slezene i limfnog čvora .....	35.
3.3.1. Određivanje superoksid dismutaze (SOD) u timusu, slezeni i limfnom čvoru .....	35.
3.3.2. Određivanje katalaze u timusu, slezeni i limfnom čvoru .....	37.
3.3.3. Određivanje glutationa u timusu, slezeni i limfnom čvoru .....	38.
3.3.4. Određivanje lipidne peroksidacije mjerenjem količine 8-iso- prostaglandina F <sub>2</sub> α u timusu, slezeni i limfnom čvoru .....	39.
3.3.5. Određivanje lipidne peroksidacije mjerenjem količine malonilaldehida (MDA) u timusu, slezeni i limfnom čvoru .....	40.
3.4. Statistička obrada podataka .....	41.
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>42.</b>
4.1. Učinak imazalila, cipermetrina, karbendazima i njihovih kombinacija na aktivnost katalaze u timusu, slezeni i poplitealnom limfnom čvoru.....	42.

4.2.	Učinak imazalila, cipermetrina, karbendazima i njihovih kombinacija na koncentraciju reduciranog glutationa (GSH) u timusu, slezeni i poplitealnom limfnom čvoru .....	45.
4.3.	Učinak imazalila, cipermetrina, karbendazima i njihovih kombinacija na aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u timusu, slezeni i poplitealnom limfnom čvoru .....	48.
4.4.	Učinak imazalila, cipermetrina, karbendazima i njihovih kombinacija na lipidnu peroksidaciju mjerenjem koncentracije 8-iso-prostaglandina F2 $\alpha$ u timusu, slezeni i poplitealnom limfnom čvoru .....	51.
4.5.	Učinak imazalila, cipermetrina, karbendazima i njihovih kombinacija na lipidnu peroksidaciju mjerenjem količine malonilaldehida (MDA) u timusu, slezeni i poplitealnom limfnom čvoru .....	54.
5.	RASPRAVA .....	57.
6.	ZAKLJUČCI .....	60.
7.	LITERATURA .....	61.



# 1. UVOD

Pesticidi su velika skupina otrova koji se koriste u agrosferi. To su tvari ili mješavina tvari namijenjena sprječavanju, uništavanju, ubijanju ili ublažavanju štetočina (US Environmental 2007). Pesticid može biti kemijska tvar, biološki agens (virus ili bakterija), antimikrobno, dezinfekcijsko sredstvo ili uređaj koji se koristi protiv štetnika. Štetnici su insekti, biljni patogeni, korov, mekušci, ptice, sisavci, ribe, nematoda i mikrobi koji uništavaju imovinu, šire bolesti ili uzrokuju neugodnosti.

Iako postoje prednosti uporabe pesticida, postoje i nedostaci kao što su potencijalna toksičnost za ljude i druge životinje. Prema Stockholmskoj konvenciji (2005) o postojećim organskim onečišćujućim tvarima, 9 od 12 najopasnijih i najpostojanijih organskih kemikalija su pesticidi.

Pri ocjeni ZA ili PROTIV uporabe pesticida treba znati da pesticidi pomažu u suzbijanju malarije, tifusa, žute groznice i dr. bolesti gdje su prenosioci kukci; bez pesticida nezamisliva je proizvodnja hrane potrebna da se prehrani današnji broj ljudi na Zemlji; bez pesticida je nemoguće održati današnji higijenski standard života. Ali opasnost od zagađenosti prirodne sredine, svih živih organizama i čovjeka je ogromna, stoga je potrebna stroga kontrola uporabe i prisutnosti.

U R. Hrvatskoj zakonski je propisano testiranje uzoraka namirnica koje se uvoze, proizvode i prodaju u Hrvatskoj. Sustavnim testiranjem prehrambenih proizvoda na ostatke pojedinih pesticida koje provode hrvatski Zavodi za javno zdravstvo (republički, županijski, gradski) utvrđeno je da se oko dvadesetak pesticida (čak i onih koji su zabranjeni za uporabu u RH) nalazi u svakodnevnim namirnicama u detektibilnim a ponekad i prekomjernim koncentracijama. Imazalil, cipermetrin i karbendazim su samo neki od najčešćih. Zbog svoje biološke aktivnosti u ekosustavu i dugog vremena poluraspada, već duži niz godina ovi pesticidi predstavljaju jedan od glavnih zagađivala voća i povrća za ljudsku uporabu. Njihovo korištenje nije ograničeno samo za organiziranu proizvodnju hrane, nego

se svakodnevno koriste u vrtovima, okućnicama, cvjetnjacima, kućanstvu te radnim prostorima u svrhu dezinsekcije.

Laboratorijske studije pokazuju da pesticidi mogu prouzrokovati zdravstvene probleme poput urođenih mana, oštećenja živaca, raka i drugih bolesti koje se mogu pojaviti tijekom dužeg vremenskog perioda.

Pesticidi mogu biti i imunotoksični. Željeli smo istražiti mogu li tri najčešće detektirana pesticida u voću i povrću (imazalil, cipermetrin i karbendazim) i njihove kombinacije uzrokovati oštećenje stanica imunoloških organa povećanom razinom oksidacijskog stresa.

## 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Kako pesticidi narušavaju imunološki sustav

Veliki broj dokaza ukazuje da izloženost mnogim pesticidima oštećuje ljudski imunološki sustav slabljenjem otpornosti tijela na zarazne bolesti i određene vrste raka. Dokazano je da pesticidi smanjuju broj bijelih krvnih stanica i smanjuju njihovu sposobnost da reagiraju i ubijaju bakterije i viruse. Također mijenjaju razvoj timusa i slezene, ključnih imunoloških organa (Repetto i Baliga 1996).

Studije su dokumentirale te učinke za mnoge pesticide koji se koriste širom svijeta: organoklorirani, organofosforirani i drugi.

Jako veliki postotak pesticida primijenjenih u poljoprivredi nikada ne dođu do organizama kojima su namijenjeni, već se raspršuju u zrak, tlo i vodu, te u tijela životinja i ljudi. Poljoprivrednici i stanovnici ruralnih sredina su direktno izloženi, ali potrošači poljoprivrednih proizvoda i ribe su također u opasnosti.

Mjerenja u krvi, masti, majčinom mlijeku kod ljudi koji su daleko od agrikulturnih područja, često pokazuju značajne ostatke pesticida i propadanje enzima uzrokovano određenim pesticidima.

Repetto i Baliga (1996) su u svojoj knjizi o štetnom utjecaju pesticida na imunološki sustav naveli brojne primjere iz svijeta:

- Kanadski Inuiti koji žive izolirano i jedu uglavnom ribu i morske sisavce koji su jako zagađeni akumuliranim pesticidima, pokazuju izraženije nedostatke imunološkog sustava, osobito dojenčad i djeca. Meningitis i upala unutarnjeg uha javljaju se u stopama 30 puta većim nego kod američke djece. Mnoge Inuitske bebe ne mogu biti cijepljene jer ne proizvode antitijela kao odgovor.

- Tuberkuloza je porasla dramatično u Srednjoj Europi i bivšem Sovjetskom Savezu gdje je zagađenje široko rasprostranjeno. Tuberkuloza je česta kod ljudi kojima je imunološki sustav supresiran.
- Ljudi koji rade na pamuku u Uzbekistanu imaju oštećen stanični imunitet i trpe veće stope respiratornih, bubrežnih i crijevnih infekcija nego stanovnici drugih područja s manjim brojem pesticida.
- Djeca su posebno osjetljiva na učinke pesticida na imunološki sustav. U poljoprivrednim područjima središnje Moldavije, gdje se mnogo koriste pesticidi, 80 posto djece ima potisnut imunitet. Djeca ovog područja imaju 3 puta veću mogućnost da dobiju infekciju probavnog sustava i 2 do 5 puta veću mogućnost da dobiju zarazne bolesti dišnih puteva.
- Radnici u tvornicama pesticida i na farmama pokazuju povišene stope zaraznih bolesti probavnog, urinarnog i ženskih spolnih puteva.
- Indijski tvornički radnici kronično izloženi pesticidima pokazuju pad razine limfocita na 66 posto, testirani nakon 3 mjeseca odmora.
- Ispostavilo se da je kuga koja je ubila dupine na Mediteranu, u Sjevernom moru i Sjevernom Atlantiku uzrokovana zajedničkim virusima na koje su životinje inače otporne. Uzorci krvi dupina s Floride pokazali su da su životinje imale velike razine ostataka pesticida, viralne infekcije i slab imunski sustav.
- Štenci tuljana iz relativno nezagađene sjeverozapadne obale Škotske hranjeni su netaknutom ribom godinu dana. Polovica njih su hranjeni haringama iz zagađenog Baltičkog mora. Ovi tuljani su razvili visoke tjelesne koncentracije organokloriranih pesticida i imunološki sustav trećinu snažan kao kod onih iz kontrolne grupe. Haringe su kupljene na lokalnim tržnicama i bile su namijenjene za ljudsku prehranu.
- Autopsijom mrtvih kitova iz kontaminiranog St. Lawrence morskog prolaza, pronađena je visoka koncentracija određenih pesticida kao i teških bakterijskih infekcija i mnogi tumori.
- Poljoprivrednici obično imaju niži rizik od raka od drugih ljudi, ali povećan rizik za vrste raka koji su nađeni kod pacijenata sa imunološkom deficijencijom (oni s AIDSom i oni koji uzimaju imunosupresivne lijekove kao što su bolesnici koji boluju od Hodgkinsove bolesti, melanoma, leukemije, raka želudca i prostate).

- Ruski istraživači u regijama gdje se uzgaja pamuk, duhan i povrće su otkrili da ljudi izloženi organokloriranim i organofosforim pesticidima imaju autoimuna antitijela. Radnici u tvornicama drugdje u Rusiji su pokazali slične simptome.

Voccia i suradnici (1999) u svojoj knjizi ustanovljuju da s obzirom na rezultate dotadašnjih studija, postoje tri važna koncepta utjecaja pesticida na imunološki sustav laboratorijskih životinja, divljih životinja i ljudi.

1. Tri komponentne imunološkog sustava: humoralna, stanična i nespecifična imunost djeluju tako da se međusobno reguliraju pa promjena u jednom dijelu sustava može uzrokovati kompenzacijske promjene u drugom. Tako imunoposredovana bolest uzrokovana pesticidima može biti rezultat direktne imunotoksikacije ili kompenzatornog odgovora.
2. Imunološki sustav može biti stimuliran ili potisnut pesticidima. Isti pesticid može imati oba efekta ovisno o dozi.
3. Akutna toksičnost nije direktno povezana s imunomodulirajućim svojstvima pesticida. Npr. karbamat aldicarb je najviše akutno toksičan u svojoj grupi, ali je najmanje potentan inhibitor proliferacije T stanica kroz mehanizam redukcije produkcije interleukina-1.

Chauhan i Singhal (2006) u svojoj knjizi objašnjavaju imunopatološke efekte pesticida na životinje i čovjeka. To su imunodeficijencija ili imunosupresija, autoimunost i hipersenzibilnost.

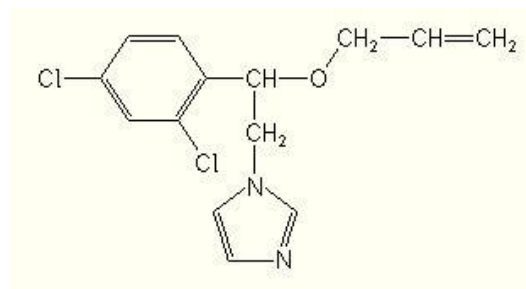
Imunodeficijencija: Većina pesticida istraživanih tijekom zadnja dva desetljeća imaju imunosupresivan efekt na humoralnu i staničnu imunost. Organoklorini, organofosfati, karbamati i sintetički piretroidni pesticidi su imunotoksični i u „dozama koje nemaju negativnih učinaka“ kod peradi, ovaca i goveda. Međutim, organoklorini su u usporedbi s drugima mnogo štetniji za imunološki sustav. Oni se smatraju uzrokom neuspješnih cijepljenja i pojavljivanja epidemija kod životinja zbog smanjenje imunokompetencije. Također je utvrđeno da imunosupresija koja postoji duže vrijeme može voditi do razvoja neoplazmi kao i do razvoja raka jer je obrambeni nadzorni mehanizam defektan. Takve životinje također mogu imati i bakterijske infekcije zbog

defektne fagocitne mašinerije u tijelu. Kako pesticidi negativno utječu na imunološki sustav specifično i paraspecifično, imunološki nadzorni sustav u tijelu postaje neispravan. Iako nema direktne korelacije, na primjer, pojavnost spolnih tumora kod pasa se povećala tijekom zadnjeg desetljeća. To je indikacija štetnih efekata zagađenog okoliša koji mogu biti povezani sa imunosupresijom.

**Autoimunost:** Pesticidi mogu inicirati autoimune reakcije u tijelu, posebno organoklorna skupina pesticida koji se vežu sa određenim proteinima i postaju antigeni, što vodi do iniciranja autoimunog odgovora u tijelu. Takve manifestacije kod životinja i ljudi su npr. autoimuni glomerulonefritis, autoimuna hemolitička anemija, autoimuni reumatoidni artritis.

**Hipersenzitivnost:** Hipersenzibilne reakcije su povezane s potrošnjom hrane koja je kontaminirana pesticidima. Pesticidi mogu djelovati kao hapteni (Hapten je naziv za malu molekulu koja pobuđuje imunološki odgovor u tijelu samo kada se nalazi vezana za veće molekule nosače kao što su proteini.) ali su zabilježena antitijela protiv njih u tijelu. Prašina s pesticidima je uzrok alergijskih respiratornih poremećaja poput astme. Kožne alergije se mogu dogoditi u doticaju s hranom kontaminiranom pesticidima. Međutim, korištenjem kemijskih alergena, studije su pokazale usporeni stanični imunološki odgovor u zakašnjelom tipu hipersenzibilnih reakcija.

## 2.2. Imazalil



Slika 1. Strukturna formula imazalila

Imazalil je imidazolni fungicid koji se upotrebljava za suzbijanje širokog spektra gljivica na voću i povrću. Imazalil se koristi na sjemenkama i za tretiranje citrusa, banana i drugog voća poslije berbe kako bi se kontroliralo propadanje u skladištu. U prirodnim uvjetima je manje vjerojatno da će tretiranje imazalilom dovesti do nastanka rezistentnih sojeva gljivica nego kod upotrebe drugih fungicida.

**Akutna toksičnost:** Imazalil je umjereno otrovan kod gutanja, LD<sub>50</sub> je 227 - 343 mg/kg kod štakora (Kidd i James 1991). LD<sub>50</sub> kod pasa je viši od 640 mg/kg (Food and Agriculture Organization of the United Nations 1977). Kožni LD<sub>50</sub> je 4200 - 4880 mg/kg kod štakora, što ukazuje na blagu toksičnost (Kidd i James 1991). Pokusne životinje su imale simptome poput ekscitacije dlačnih folikula, mišićne nekoordinacije, smanjenja napetosti arterija, drhtanja i povraćanja (Food and Agriculture Organization of the United Nations 1977). Kontaktni dermatitis je naveden u nekim slučajevima kod osjetljivijih individua (Food and Agriculture Organization of the United Nations 1977).

**Kronična toksičnost:** štakori kojima je u hrani bila dnevna doza do 0,4 mg/kg imazalil nitrata tijekom 14 tjedana nisu pokazali promjene u izgledu, ponašanju, preživljavanju, konzumaciji hrane, analizi urina ili sastava tkiva. Bilo je malih promjena u jetri, tjelesnoj težini i bilirubinu kod većih doza (Food and Agriculture Organization of the United Nations 1977). Grupe štakora koje su hranjene s do 0,4 mg/kg dnevno tijekom 6, 12 i 24 mjeseca nisu pokazali učinke na tjelesnu težinu, konzumaciju hrane, izgled, ponašanje i preživljavanje koji bi se mogli dovesti u vezu s ovom tvari ili dozom. Slični rezultati su dobiveni u studiji s psima gdje su psi dobivali doze od 0,5 mg/kg dnevno tijekom 2 godine. Na jetri su nađeni slabi efekti kod viših

doza, ali svi ostali mjereni i promatrani parametri su bili unutar normalnih granica (Food and Agriculture Organization of the United Nations 1977).

**Reproduktivni učinci:** U tri odvojene studije sa tri generacije štakora s niskim do umjerenim dozama od 0,4 mg/kg dnevno, postojao je trend smanjenja broja živorođenih na najvišoj dozi. Nisu navedene razlike u postotku trudnoća ili trajanju trudnoće (Edwards i sur. 1991; Food and Agriculture Organization of the United Nations 1977 ). Ti podaci pokazuju da imazalil vjerojatno neće imati reproduktivne učinke u normalnim uvjetima.

**Teratogeni učinci:** Nijedna od spomenutih studija sa štakorima nije rezultirala abnormalnostima fetusa. Studija na miševima kod doza do 4,8 mg/kg dnevno je također bila negativna. Malo je vjerojatno da je imazalil teratogen. (Edwards i sur. 1991; Food and Agriculture Organization of the United Nations 1977 ).

**Mutageni učinci:** Dominantno smrtonosno mutageno djelovanje nije bilo vidljivo kod ženskih i muških miševa (Edwards i sur. 1991). Na temelju tih podataka čini se da imazalil nije mutagen.

**Kancerogeni učinci:** U grupi štakora kojima je davan imazalil tijekom 30 mjeseci u dozi od 5,0 mg/kg dnevno, nije bilo povećanja nastanka tumora u usporedbi s kontrolom (Food and Agriculture Organization of the United Nations 1977). To sugerira da imazalil nije kancerogen.

**Toksičnost za organe:** Na temelju ispitivanja na životinjama, imazalil utječe na živčani sustav i jetru.

**Sudbina u ljudi i životinja:** štakori brzo apsorbiraju, distribuiraju, metaboliziraju i izlučuju imazalil. Nakon jedne doze imazalil sulfata, 90 posto je izlučeno u metaboliziranoj formi u roku od 96 sati (Kidd i James 1991). Samo 3 posto je eliminirano putem izmeta u nemetaboliziranom obliku, što ukazuje na gotovo potpunu apsorpciju iz probavnog trakta. Najmanje četiri metabolita nastaju 48 sati nakon primjene. Do akumulacije u masnom tkivu nije došlo (Food and Agriculture Organization of the United Nations 1977).

**Učinci na ptice:** I divlje patke i japanske prepelice su relativno neosjetljive na ovaj fungicid. Osmerodnevna LC<sub>50</sub> vrijednost ovih ptica je između 5500 - 6300 mg/kg



(Kidd i James 1991). Ove vrijednosti pokazuju da je spoj praktički netoksičan za ptice.

**Učinci na organizme u vodi:** Imazalil je umjereno toksičan za ribe.  $LC_{50}$  za imazalil u pastrve je 2,5 mg/L (Kidd i James 1991).

**Učinci na druge organizme:** Nije toksičan za pčele (Kidd i James 1991).

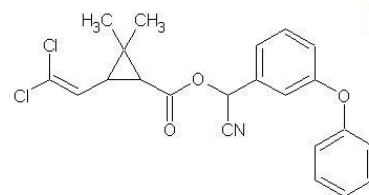
**Raspad u tlu i podzemnim vodama:** Imazalil je visoko trajan u tlu, sa poluraspadom u tlu između 120 i 190 dana (Wauchope i sur. 1992). Reprezentativna vrijednost je procijenjena na 150 dana za većinu tala (Wauchope i sur. 1992). Topljiv je u vodi ali je snažno vezan za tlo, prema tome je vjerojatno da ne predstavlja rizik za podzemne vode (Wauchope i sur. 1992). Na zemljištu gdje se aplicirao u intervalima od 14 dana, ispiranje je praktički bilo nepostojeće, a akumulacija nije bila problem (Food and Agriculture Organization of the United Nations 1985).

**Raspad u vodi:** U kiselim do neutralnim vodenim otopinama, imazalil je stabilan najmanje 8 tjedana na 40°C. Dekompozicija se pojavljuje na povišenim temperaturama i pod utjecajem svjetlosti (Food and Agriculture Organization of the United Nations 1977).

**Raspad u vegetaciji:** Tjedan dana nakon što je tretirano sjeme ječama posijano u tlo, oko 76 posto imazalila je bilo u susjednom tlu, a oko 29 posto u ljuski sjemenke. Nakon tri tjedna, samo 6 posto je bilo u zelenim dijelovima biljke. Pod normalnim uvjetima korištenja, naranče umočene i pohranjene u 2000 mg aktivnog sastojka po litri su imale ostatke (89 posto) u obliku roditeljskog spoja. Samo mala količina imazalila je bila prisutna u pulpi, a dio ovog može biti rezultat rukovanja tijekom pilinga. Studije s jabukama su dale slične rezultate (Food and Agriculture Organization of the United Nations 1977).

**Tablica 1. Kemijska i fizikalna svojstva imazalila.**

Molekularna formula	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O
Kemijsko ime	(+/-)alil-1-(2,4-diklor-fenil)-2-imidazol-1-il- etil-eter
Vrsta pesticida	Organoklorirani
Molekularna masa	297,18
Točka tališta	51,5 °C
Točka vrelišta	319 °C
Relativna topivost	1,348 na 26 °C
Topivost u vodi na 30 °C	pH 4,9 - 1,0 g/L
	pH 7,6 - 0,18 g/L
	pH 10 - 1,8 g/L
Topivost u organskim otapalima na 25 °C	Metanol - > 500 g/L
	Etil acetat - > 500 g/L
	Heksan - 52,1 G/L
Razgradnja u tlu	9% za 115 dana



## 2.3. Cipermetrin

Slika 2. Strukturna formula cipermetrina

Cipermetrin je sintetički piretroidni insekticid koji se koristi za kontrolu mnogih štetočina, uključujući moljce na pamuku, voću i usjevima povrća. Također se koristi za kontrolu kukaca štetnika u trgovinama, skladištima, industrijskim zgradama, kućama, stambenim zgradama, staklenicima, laboratorijima, te na brodovima, autobusima, kamionima i zrakoplovima. Koristi se i u područjima gdje nema hrane u školama, staračkim domovima, bolnicama, hotelima. Tehnički cipermetrin je mješavina 8 različitih izomera, od kojih svaki može imati vlastita biološka i kemijska svojstva. Cipermetrin je lagano stabilan, dostupan je kao koncentrat u obliku emulzije ili u prahu.

Cipermetrin je prvi put sintetiziran 1974.

Cipermetrin ubija kukce koji ga pojedu ili dođu u kontakt s njim. Djeluje tako da brzo pogađa kukčev centralni živčani sustav.

**Akutna toksičnost:** Cipermetrin je umjereno toksičan pri kožnoj apsorpciji ili gutanju (Ray 1991; U.S. Environmental Protection Agency 1989). Simptomi visoke izloženosti kože uključuju utrnulost, peckanje, svrbež, žarenje, gubitak kontrole mjehura, nekoordinacija, napadaji i moguće smrt. Piretroidi poput cipermetrina mogu negativno djelovati na središnji živčani sustav (Ray 1991; U.S. Environmental Protection Agency 1989). Simptomi kod visoke doze gutanja uključuju mučninu, povraćanje, bolove u trbuhu, proljev koji napreduje do konvulzije, nesvjesticu, komu. Cipermetrin je blago iritantan za kožu i oči i može uzrokovati alergijske reakcije kože (U.S. Environmental Protection Agency 1989). Oralni LD<sub>50</sub> za cipermetrin kod štakora je 250 mg/kg (u kukuruznom ulju) ili 4123 mg/kg (u vodi) (Ray 1991; U.S. Environmental Protection Agency 1989). U EPA-inom izvješću je oralni LD<sub>50</sub> 187 - 326 mg/kg kod mužjaka štakora i 150 - 500 mg/kg kod ženki štakora (U.S. Environmental Protection Agency

1989). Oralni LD<sub>50</sub> varira od 367 do 2000 mg/kg kod ženki štakora i od 82 do 779 mg/kg kod miševa, ovisno o omjeru prisutnih cis/trans izomera (Ray 1991). Ova široka varijacija u toksičnosti može odražavati različite mješavine izomera u testiranim materijalima. Kožni LD<sub>50</sub> kod štakora je 1600 mg/kg a kod zečeva je veći od 2000 mg/kg (Ray 1991; U.S. Environmental Protection Agency 1989).

**Kronična toksičnost:** nema podataka

**Reproduktivni efekti:** Nema štetnih učinaka na reprodukciju u studiji koja obuhvaća tri generacije štakora kojima je davano 37,5 mg/kg dnevno (U.S. Environmental Protection Agency 1989).

**Teratogeni učinci:** Cipermetrin nije teratogen (Ray 1991). Nema porođajnih defekata kod potomaka štakora kojima su davane doze od 70 mg/kg dnevno niti kod potomaka kunića kojima su davane doze od 30 mg/kg dnevno (U.S. Environmental Protection Agency 1989) .

**Mutageno djelovanje:** Cipermetrin nije mutagen, ali testovi s visokim dozama na miševima su uzrokovali privremeno povećanje broja stanica koštane srži s mikronukleusima. Drugi testovi za mutageno djelovanje na ljudske, bakterijske, hrčkove stanične kulture i na žive miševе su negativni (Ray 1991).

**Kancerogeni učinci:** EPA je klasificirala cipermetrin kao moguće kancerogen za ljude jer su dostupne informacije neuvjerljive. Uzrokovao je benigne tumore puća kod ženki miševa kod najviše testirane doze (229 mg/kg/dnevno). Međutim, tumori se nisu pojavili kod štakora kod doza do 75 mg/kg dnevno (U.S. Environmental Protection Agency 1989) .

**Toksičnost za organe:** Piretroidi poput cipermetrina mogu uzrokovati negativne učinke na središnji živčani sustav. Štakori hranjeni dozama od 37,5 mg/kg cis izomera cipermetrina tijekom pet tjedana su doživjeli tešku motornu nekoordinaciju, dok je 20 do 30 posto štakora hranjenih s 85 mg/kg uginulo 4 do 17 dana nakon što je tretman počeo (Ray 1991). Studije s dugotrajnim hranjenjem su pokazale povećanje težine jetre i bubrega i nepovoljne promjene u tkivu jetre kod pokusnih životinja (U.S. Environmental Protection Agency 1989). Patološke promjene na kori timusa, jetri, nadbubrežnim žlijezdama, plućima, koži su zabilježene kod kunića koji

su u više navrata hranjeni visokim dozama cipermetrina (U.S. National Library of Medicine 1995).

**Imunotoksičnost:** Cipermetrin može inducirati apoptozu stanica i uzrokovati poremetnju imunološkog sustava u zebrice (*Danio rerio*) tijekom embrionalne faze (Jin i sur. 2011). Institoris i suradnici (1999) su ispitivali imunotoksične učinke u mužjaka Wistar štakora starih pet tjedana nakon oralne izloženosti različitim koncentracijama cipermetrina, samog i u kombinaciji s kadmijem ili olovom. I visoke i niske doze cipermetrina su određene kao imunotoksične.

**Sudbina u ljudi i životinja:** Kod ljudi je izlučivanje metabolita cipermetrina bilo potpuno 48 sati nakon zadnje od 5 doza od 1,5 mg/kg dnevno (Ray 1991). Studije na štakorima su pokazale da se cipermetrin brzo metabolizira hidrosilacijom i preko 99 posto ga je eliminirano u par sati. Preostalih 1 posto ostaje pohranjeno u tjelesnim mastima. Ovaj dio se eliminira sporo, s poluživotom cis izomera od 18 dana i 3,4 dana za trans izomer (Ray 1991).

**Učinci na ptice:** Cipermetrin je praktički netoksičan za ptice. Njegov akutni oralni LD<sub>50</sub> kod divljih pataka je veći od 4640 mg/kg. Nema štetnih reproduktivnih učinaka kod divljih pataka i prepelica kojima je davano 50 ppm, najviša testirana doza (U.S. Environmental Protection Agency 1989).

**Učinci na organizme u vodi:** Cipermetrin je vrlo visoko toksičan za ribe i vodene beskralježnjake. LC<sub>50</sub> (96 sati) za cipermetrin kod kalifornijske pastrve je 0,0082 mg/L (Bradbury i Coats 1989). Akutna LC<sub>50</sub> kod vrste *Daphnia magna*, malog slatkovodnog raka, je 0,0002 mg/L (Bradbury i Coats 1989). Cipermetrin se metabolizira i eliminira znatno sporije kod riba nego kod sisavaca i ptica, što može objasniti višu toksičnost ovog spoja na ribe u usporedbi s drugim organizmima (Bradbury i Coats 1989). Poluživoti za eliminaciju nekoliko piretroida kod pastrve su veći od 48 sati, dok je eliminacijski poluživot kod ptica i sisavaca u rasponu od 6-12 sati (Bradbury i Coats 1989; U.S. National Library of Medicine 1995). Faktor biokoncentracije za cipermetrin kod kalifornijske pastrve je 1200 puta koncentracija vode u kojoj se nalazi, što znači da postoji umjereni potencijal da se akumulira u vodene organizme (U.S. Environmental Protection Agency 1989). Eliminacija polovice akumuliranog iznosa spoja je gotovo 8 dana. Nakon 14 dana 70-80 posto materijala je eliminirano iz organizma (U.S. Environmental Protection Agency 1989).

**Učinci na druge organizme:** Cipermetrin je visoko toksičan za pčele (U.S. Environmental Protection Agency 1989; Waller 1988).

**Raspad u tlu i podzemnim vodama:** Cipermetrin je umjereno ustrajan u tlima. U laboratorijskim uvjetima, cipermetrin se degradira brže na pješćanoj glini i pjeskovitim tlima od ilovače nego na glinenim tlima, a brže u tlima s manje organskog materijala (U.S. Environmental Protection Agency 1989). U aerobnim uvjetima, njegov poluživot u tlu iznosi 4 dana do 8 tjedana (U.S. Environmental Protection Agency 1989; Kidd i James 1991; Wauchope i sur. 1992). Kada se nanosi na pjeskovito tlo u laboratorijskim uvjetima, poluživot je 2,5 tjedana (Harris 1981). Cipermetrin je više trajan u anaerobnim uvjetima. On se fotodegradira brzo s poluživotom od 8-16 dana. Cipermetrin također podliježe mikrobnoj razgradnji u aerobnim uvjetima (U.S. Environmental Protection Agency 1989). Nije topljiv u vodi i ima snažnu tendenciju da se adsorbira na čestice tla. Stoga je malo vjerojatno da će uzrokovati onečišćenje podzemnih voda (Kidd i James 1991).

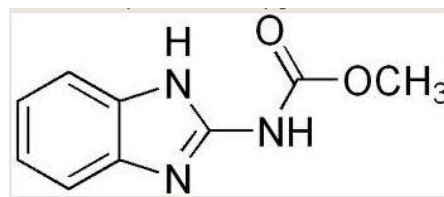
**Raspad u vodi:** U neutralnim ili kiselim vodenim otopinama, cipermetrin se hidrolizira polako, dok je hidroliza mnogo brža na pH 9. Pod normalnim okolišnim temperaturama i pH, cipermetrin je stabilan na hidrolizu s poluživotom većim od 50 dana i fotodegradacijom s poluživotom većim od 100 dana (U.S. Environmental Protection Agency 1989). U vodama ribnjaka i u laboratorijskim studijama degradacije, koncentracije piretroida se brzo smanjuju zbog adsorpcije na sediment, suspendirane čestice i biljke. Mikrobna razgradnja i fotorazgradnja se također javljaju (Muir i sur. 1985; Agnihotri 1986).

**Raspad u vegetaciji:** Kad se primjenjuje na jagode, 40 posto primijenjenog cipermetrina ostaje nakon jednog dana, 12 posto nakon tri dana, a 0,5 posto nakon sedam dana, sa slabom kišom koja se pojavila 3. dan (Belanger 1990). Kad je cipermetrin primijenjen na pšenicu, ostaci na pšenici su bili 4 ppm odmah nakon prskanja i 0,2 ppm 27 dana poslije. Slični obrasci gubitka ostataka su promatrani na tretiranoj salati i usjevima celera (Westcott i Reichle 1987).

**Tablica 2. Kemijska i fizikalna svojstva cipermetrina.**

Molekularna formula	$C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$
Kemijsko ime	(RS)- $\alpha$ -cijano-3-fenoksilbenzil-(1R)-cis-3-(2,2-diklorvinil-2,2-dimetil)-ciklopropan karbosilikat (racemat)
Vrsta pesticida	Organoklorirani
Molekularna masa	416,3
Točka tališta	41,2 °C
Relativna topivost	1,303 na 20 °C
Topivost u vodi na 20 °C	< 9 $\mu$ g/l
Topivost u organskim otapalima na 20 °C	Metanol 450 g/L
	Etanol 450 g/L
	Kloroform 450 g/L
	Aceton 450 g/L
	Heksan 142 g/L
Razgradnja u tlu	20-47 % za 168 dana

## 2.4. Karbendazim



Slika 3. Strukturna formula karbendazima

Karbendazim je benzimidazolni fungicid (Advisory Committee on Pesticides 1992) koji igra važnu ulogu u kontroli biljnih bolesti (Quian 1996). Prvi put je prijavljen 1973 (Hicks 1998). Karbendazim se koristi za kontrolu širokog spektra bolesti na ratarskim usjevima (žitarice, uljana repica), voću, povrću (Hicks 1998). Također se koristi za čuvanje hrane nakon žetve i za obradu sjemena prije sadnje (Advisory Committee on Pesticides 1992). Često se prodaje u kombinaciji s drugim fungicidima (Hicks 1998). Karbendazim inhibira razvoj gljivica vjerojatno tako što smeta u formiranju diobenog vretena u mitozu (diobi stanica) (Advisory Committee on Pesticides 1992).

**Akutna toksičnost:** Karbendazim je klasificiran od strane Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) (1999) kao tvar koja „malo vjerojatno predstavlja opasnost u normalnoj uporabi“. Akutni oralni LD<sub>50</sub> za štakore je >15000 mg/kg, a za pse je >2500 mg/kg (Tomlin 2000). Na temelju analize studija na štakorima, psima i kunićima, Savjetodavni odbor za procjenu pesticida (1992) je zaključio da je karbendazim nisko toksičan za glodavce i neglodavce preko oralnog, kožnog, inhalacionog i intraperitonealnog puta.

**Kancerogenost:** Istraživanja na miševima su pokazala povećanje tumora u dvije od tri studije (Scientific Committee on Plants 2001). Međutim, u reviziji podataka, Znanstveni odbor za biljke (2001) je pokazao da nema učinka na DNA pa su zaključili da se ti mišji tumori jetre ne mogu tumačiti kao predviđanje kancerogene opasnosti za ljude. Do ovog zaključka su također došli u ACPu (1992).

**Reproduktivni učinci:** Za karbendazim se sumnja da je endokrini disruptor (Friends of the Earth 2001). To je zaključak Europske komisije (1999) koja ga je stavila na popis kemikalija za koje se vjeruje da utječu na hormone. *Friends of the Earth* su našli dokaze da karbendazim može oštetiti razvoj sisavaca u maternici. Studija koju je napravio Mantovani sa suradnicima (1998) je pokazala da životinje izložene



karbendazimu u maternici mogu imati ozbiljne deformacije poput nedostatka očiju i hidrocefalusa. Karbendazim može poremetiti razvoj spermija i oštetiti razvoj testisa u odraslih štakora (European Commission 1991). Međutim, unatoč poznatim učincima ovih kemikalija koje remete hormone (Friends of the Earth 2000), Znanstveni odbor o biljkama je ocijenio da postoje samo manji znakovi reproduktivne toksičnosti pri visokim dozama.

**Mutageni učinci:** Nedavna istraživanja koja su ispitivala učinak karbendazima na kulturu ljudskih limfocita su pokazala da je karbendazim moćan aneugen tj. da utječe na broj kromosoma čak i pri niskoj izloženosti (Mahmood i Parry 2001). To je zbog inhibicije polimerizacije tubulina, proteina koji je esencijalan za segregaciju kromosoma tijekom stanične diobe (European Commission 1991). Osim aneuploidije, mišljenje Znanstvenog odbora za biljke je da nema dokaza da je bilo koji drugi oblik oštećenja genetskog materijala izazvan karbendazimom (European Commission 1991).

**Imunotoksični učinci:** u toksikološkim testovima s karbendazimom doze od 300 do 600 mg/kg su izazvale smanjenje broja leukocita i limfocita (Selmanoglu i sur. 2001). Značajno smanjenje broja leukocita zabilježeno je i u Wistar štakora nakon tretiranja s kombinacijom pet pesticida (0,3 mg/kg /dan) među kojima je bio karbendazim (Jacobsen i sur. 2004).

**Učinci na divlje životinje i okoliš:** Karbendazim je štetan za ribe i druge vodene životinje (Pesticide Safety Directorate 2001). Laboratorijska ispitivanja su pokazala visoku toksičnost za vodene organizme, npr.  $LC_{50}$  za kalifornijske pastrve je 0,36 mg/L (WHO 1999), a 0,098 mg/L za vodene beskralježnjake (JMPR 1995). Međutim, vjerojatno se ova visoka toksičnost ne vidi na terenu jer se karbendazim snažno adsorbira na sediment (WHO 1999). Dakle, živi organizmi koji žive u sedimentu su vjerojatno visoko izloženi (WHO 1999). Kako je karbendazim snažno adsorbiran za organske tvari u tlu (Moser i Rombke 2002), ne iznenađuje da može umanjiti populacije glista (WHO 1999). U studiji o učincima karbendazima na tri roda glista, rod koji je živio blizu tankog sloja gdje je karbendazim vezan, pokazao je smanjenje broja jedinki, dok su druga dva roda koja su živjeli dublje u tlu pokazali povećanje broja (Moser i Rombke 2002). Karbendazim ima vrijeme poluraspada od 6-12 mjeseci na golom tlu i 3-6 mjeseci na terenu (JMPR 1995) i uglavnom ga razgrađuju

mikroorganizmi (Tomlin 2000). Jedna studija je pokazala da karbendazim ima neki utjecaj na mikrofloru tla, ali učinci nikad nisu dugotrajni i zaključeno je da je karbendazim nisko toksičan za mikrobe (Helweg 1983). Biljke lako apsorbiraju karbendazim (Tomlin 2000), što dovodi do zabrinutosti zbog fototoksičnosti. Jedna studija na duhanu je pronašla dokaze za slabu fototoksičnost, što znači da bi mogao biti štetan za zdrave, neciljne biljke, osobito pri višim dozama (Garcia 2002). Karbendazim ima nisku akutnu toksičnost za ptice (JMPR 1995): oralni LD<sub>50</sub> za prepelice je 5828 - 15595 mg/kg (Tomlin 2000). WHO (1999) navodi da karbendazim nije toksičan za pčele.

**Otpornost:** Otpornost je veoma ozbiljan problem. Za borbu protiv otpornosti, karbendazim se često kombinira s drugim fungicidima sa različitim načinima djelovanja (JMPR 1995) i razvijene su integrirane strategije upravljanja biljnim bolestima. Istraživači u Kini su razvili soj za biološku kontrolu, *Trichoderma harzianum*, koja preživi mnogo veće doze karbendazima od preporučenih (Quian 1996).

**Ostaci u hrani:** Karbendazim je jedan od 12 najčešće pronađenih pesticida u EU programu praćenja (1997). U 2000. god je pronađen u dječjoj hrani. Osim toga, te godine, jedna trećina svih krušaka, 16 posto testiranih jabuka i 27 posto uzoraka soka od jabuke su sadržavali ostatke karbendazima (Friends of the Earth 2000). Iako je karbendazim pronađen samo u malim dozama u svim uzorcima, to je problem jer su mala djeca posebno osjetljiva, a kruške i jabuke su među prehrambenim proizvodima koje oni često jedu (Friends of the Earth 2001).

**Tablica 3. Kemijska i fizikalna svojstva karbendazima.**

Molekularna formula	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> .
Kemijsko ime	Metil-(1H)-benzimidazol-2-il-karbamat
Vrsta pesticida	Karbamat
Molekularna masa	191,21
Točka tališta	302 – 307 °C
Relativna topivost	1,45 na 20 °C
Topivost u vodi na 20 °C	pH 4 – 28-36 mg/L
	pH 7-8 – 5-7 mg/L
Topivost u organskim otapalima 24 °C	Metanol – 359 -480 mg/L
	Etanol – 300 mg/L
	Aceton – 166 – 300 mg/L
	Kloroform – 100 mg/L
	Benzen – 36 mg/L
Razgradnja u tlu	30-36 % za 100 dana

## 2.5. Fiziologija antioksidativnih enzima

**Oksidacijski stres** definira se kao pomak ravnoteže u staničnim oksidativno-redukcijskim reakcijama u smjeru oksidacije. Riječ je o stanju prekomjernog stvaranja slobodnih radikala kisika, pri čemu dolazi do gubitka ravnoteže stvaranja slobodnih radikala i mogućnosti neke stanice da ih razgradi, a rezultira promjenama vezanim uz oštećenje stanica. Drugim riječima, oksidacijski stres može se definirati kao oštećenje tkiva uvjetovano poremećajem ravnoteže pro- i anti-oksidativnoga sustava. Oksidacijsko oštećenje može utjecati na strukturu i funkciju brojnih biomolekula (polinezasićenih lipida, ugljikohidrata, proteina i nukleinskih kiselina), što konačno rezultira promjenama u strukturi i funkciji stanica, tkiva i organa. Tako nastala oštećenja mogu narušiti homeostazu iona, prijenos signala u stanici, gensku transkripciju i dovesti do drugih poremećaja.

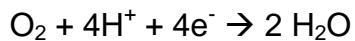
U normalnim biološkim uvjetima, molekula kisika neenzimatskom oksidacijom povremeno oduzima elektrone drugim molekulama, što uzrokuje nastanak slobodnih radikala. Slobodni radikali su štetni spojevi koji prirodno nastaju od životnih procesa, primjerice od kisika kojeg udišemo, a u čijoj je prirodi da nanese štetu tkivu i stanici u kojima nastaje. Također, slobodni radikali nastaju od raznih onečišćenja koje unosimo u organizam hranom ili drugim putevima. Što neka osoba živi u zagađenijem okolišu i hrani se nezdravije, to je izložena većem broju slobodnih radikala i potencijalnoj šteti po organizam.

**Slobodni radikali** jesu vrlo nestabilne kemijske čestice koje u vanjskoj ljusci imaju nespareni elektron. Slobodni radikali nastaju homolitičkim cijepanjem kovalentne veze, pri čemu svaki elektron ostaje vezan u susjednom atomu. Zbog nesparenoga elektrona, slobodni su radikali vrlo reaktivni. Stvaranje slobodnih radikala u uskoj je sprezi s nedovoljno učinkovitim uklanjanjem ROS-a, posljeduje oksidacijskim stresom koji može oštetiti biološke makromolekule i uzrokovati metaboličke poremećaje.

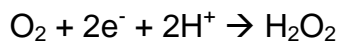
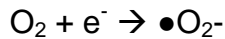
### **Reaktivni spojevi kisika i dušika:**

Kisik je snažno oksidacijsko sredstvo. Reakcija potpune redukcije kisika ima veliki redukcijski potencijal (približno 0,8 V), premda je za nju potrebna i velika energija

aktivacije. Stoga je reakciju poput one u respiratornome lancu u mitohondrijima relativno teško postići:



Molekula kisika u osnovnome stanju ima dva nesparena elektrona. Primanjem jednog elektrona nastaje superoksidni radikal ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), a primanjem sljedećeg elektrona nastaje  $\text{O}_2^{2-}$  koji protoniranjem prelazi u vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ):



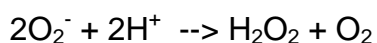
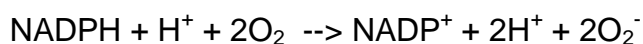
**Superoksidni radikal** ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) u vodenim je medijima poput citoplazme slab oksidans, a mnogo je snažnije redukcijsko sredstvo koje može reducirati željezne komplekse poput citokroma c.

**Hidroperoksilni radikal** ( $\bullet\text{HO}_2$ ) jači je reducens i oksidans od superoksidnog radikala.

**Vodikov peroksid** ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) nastaje kao proizvod djelovanja urat oksidaze, glukoza oksidaze, D-aminokiselinske oksidaze, ili superoksid dismutaze (SOD). Vodikov peroksid lako može prolaziti kroz staničnu membranu, a u prisutnosti iona prijelaznih metala stvara vrlo reaktivne slobodne radikale. Razgrađuje se djelovanjem katalaze (CAT), glutation peroksidaze (GPx), te pojedinih drugih peroksidaza.

Unutar stanice slobodni kisikovi radikali mogu nastati tijekom uobičajenih staničnih procesa ili mogu biti inducirani određenim egzogenim tvarima. Stoga izvore superoksidnoga radikala možemo podijeliti na enzimске (tijekom katalitičkih reakcija NADPH oksidaze, NADPH-P450 reduktaze, ksantin oksidaze, superoksid dismutaze), stanične (radom makrofaga, leukocita, u respiratornome lancu, djelovanjem mikrosomalne oksigenaze), te na izvore nastale djelovanjem okruženja (UV-svjetlo, X-zrake, toksične kemikalije, aromatski nitro spojevi i drugo). NADPH oksidaza jest membransko vezani višeenzimski sklop koji ima izrazitu važnost u stvaranju ROS-a. Budući da taj sklop nije jednako izražen u svim stanicama, u pojedinim su stanicama za njegovu aktivaciju potrebni medijatori (kemokini, te kemoatraktivni peptidi), a djelovanje enzima veže se uz neutrofile koji tijekom

stvaranja ROS-a troše velike količine kisika (povećana respiracija neutrofila). NADPH stvara superoksidni radikal koji dismutacijom prelazi u vodikov peroksid:



Nastali vodikov peroksid u prisutnosti iona željeza i bakra daje reaktivne **hidroksilne radikale** (OH●) i/ili **hipokloritnu kiselinu** (HOCl) u prisutnosti Cl<sup>-</sup> iona, čije nastajanje katalizira enzim mijeloperoksidaza. Stoga određivanje aktivnosti mijeloperoksidaze može poslužiti kao pokazatelj infiltracije leukocita na mjestu upale. Stvaranje radikala unutar mitohondrija nastaje kao posljedica nedostatka elektrona koji prelaze na kisik, reducirajući se pritom do ●O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Hidroksilni radikali nastaju enzimatski (neradikaliskim putem, odnosno djelovanjem glikolat oksidaze, acetil-Co oksidaze, NADPH oksidaze, urat oksidaze i drugim), te dismutacijom superoksidnoga radikala (radikaliski put).

**Singletni kisik** (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) nema svojstva radikala, međutim vrlo je reaktivan zbog spinskih osobitosti (ima dva nesparena elektrona usporednoga spina).

Uz reaktivne kisikove spojeve, veliku važnost imaju i reaktivni dušikovi spojevi od kojih su najvažniji NO● i NO<sub>2</sub>●. NO● jest relaksacijski čimbenik krvožilnoga sustava, koji kao radikal može reagirati s endogenim radikalima, primjerice sa superoksidnim radikalom, stvarajući peroksinitrite (ONOO<sup>-</sup>) koji su izrazito jaki oksidansi, a pri kiselome pH razgrađuju se do hidroksilnih radikala (neovisno o prisutnosti prijelaznih metala).

Tablica 4. Reaktivni kisikovi spojevi

Slobodni radikali	Čestice koje nisu slobodni radikali
superoksidni, ●O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	vodikov peroksid, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
hidroksilni, OH●	hipokloritna kiselina, HClO
peroksilni, ROO●	ozon, O <sub>3</sub>
alkoksilni, RO●	singletni kisik, <sup>1</sup> O <sub>2</sub>
hidroperoksilni, ●HO <sub>2</sub>	

Tablica 5. Reaktivni dušikovi spojevi

Slobodni radikali	Čestice koje nisu slobodni radikali
dušikov (II) oksid, $\text{NO}^\bullet$ dušikov (IV) oksid, $\text{NO}_2^\bullet$	nitrozil, $\text{NO}^+$ nitritna kiselina, $\text{HNO}_2$ dušikov (III) oksid, $\text{N}_2\text{O}_3$ peroksinitrit, $\text{ONOO}^-$ alkilperoksinitrit, $\text{ROONO}$

**ROS** (reaktivni kisikovi spojevi) ima veliku važnost u mnogobrojnim procesima, primjerice u unutarstaničnoj signalizaciji, proliferaciji, apoptozi, te imunološkom odgovoru. Aktivirane fagocitotičke stanice poput monocita, neutrofila, eozinofila i makrofaga, proizvode ROS kao dio mehanizma uništavanja mikroorganizama nakon fagocitoze. S druge strane pak, kisikovi radikali mogu uzrokovati lipidnu peroksidaciju, oštećenje DNA i proteina, te oksidirati gotovo svaku organsku molekulu. Također, prisutnost slobodnih radikala može polučiti i citotoksično djelovanje, što posljedi staničnom smrti, induciranjem mutacija i kromosomskih aberacija, te kancerogenezom.

**LIPIDNA PEROKSIDACIJA:** Oksidativna degradacija lipida. To je proces u kojem slobodni radikali „krađu“ elektrone od lipida koji čine stanične membrane i to vodi do oštećivanja stanice. Dolazi do lančane reakcije. Najčešće su zahvaćene polinezasićene masne kiseline jer one sadrže mnogo dvostrukih veza između kojih su metilne grupe ( $-\text{CH}_2$ ) koje imaju jako reaktivne vodike. Kao kod svake reakcije s radikalima, i ova reakcija se sastoji od tri glavna koraka: inicijacije, propagacije i terminacije.

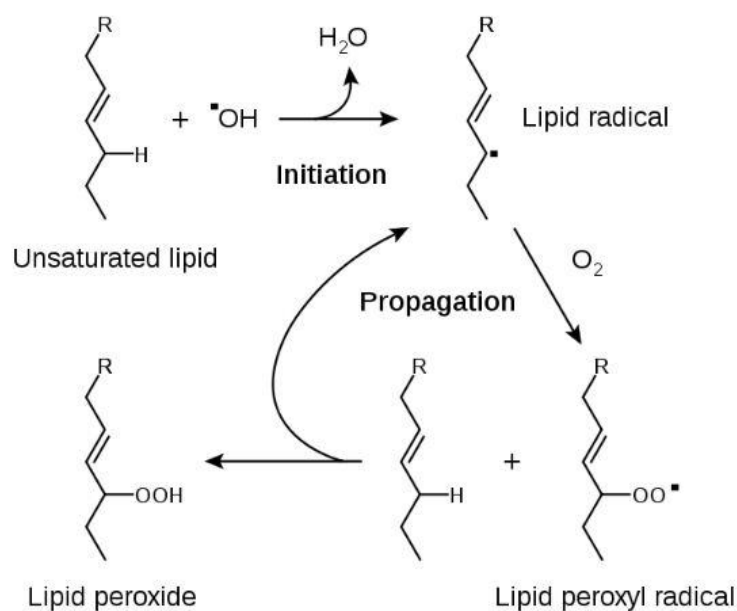
**Inicijacija** je korak u kojem nastaje radikal masne kiseline, najčešće zbog djelovanja ROS-a poput  $\text{OH}^-$  i  $\text{HO}_2$  koji se vežu na vodikov atom pri čemu nastaje voda.

**Propagacija:** Radikal masne kiseline nije stabilna molekula tako da ona brzo reagira sa molekularnim kisikom, stvarajući lipidni peroksil radikal. Ovo je također nestabilna molekula koja reagira s drugom slobodnom masnom kiselinom stvarajući drugačiji

radikal masne kiseline i lipidni peroksid ili ciklički peroksid ukoliko reagira sam sa sobom. Ciklus se nastavlja kada novi radikali masnih kiselina reagiraju isto.

**Terminacija:** Kada radikal reagira s neradikalom uvijek nastaje drugi radikal zbog čega se proces i naziva lančana reakcija. Reakcija radikala prestaje kada reagiraju dva radikala i stvore molekulu koja nije radikal. Ovo se događa kada je koncentracija radikala toliko velika da bude velika vjerojatnost da će se naći dva radikala i reagirati međusobno. Živi organizmi su razvili različite molekule koje ubrzavaju fazu terminacije tako što hvataju slobodne radikale i tako štite stanične membrane. Jedan takav važan antioksidans je vitamin E. Drugi antioksidansi stvoreni u tijelu su enzimi superoksid dismutaza, katalaza i peroksidaza.

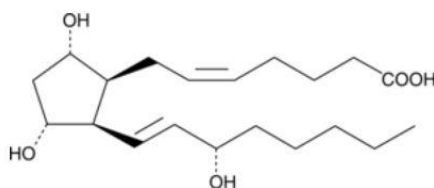
Reaktivne kisikove vrste degradiraju polinezasićene masne kiseline i stvaraju malonildialdehid (**MDA**) (Pryor i Stanley 1975). Molekulska formula je  $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$ . Ovaj spoj je reaktivni aldehid, jedan je od mnogih reaktivnih elektrofilnih vrsta koje nastaju lipidnom peroksidacijom i uzrokuju toksični stres u stanicama te je u usporedbi s drugima najviše mutagen i kancerogen (Marnett 1999). Proizvodnja ovog aldehida se koristi kao biomarker za mjerenje razine oksidativnog stresa u organizmu (Moore i Roberts 1998; Del Rio i sur. 2005).



**Slika 4. Faza inicijacije i propagacije lipidne peroksidacije**



**8-iso-prostaglandin F2 $\alpha$**  je jedan od glavnih izoprostana koji nastaje uglavnom neenzimatskom, slobodnim radikalima induciranom peroksidacijom arahidonske kiseline (AA) koja je prisutna u fosfolipidima (Zeldin 2001; Reilly i sur. 1998; Funk 2001). 8-iso-prostaglandin F2 $\alpha$  također nastaje kao manji produkt COX-1 enzima u ljudskim trombocitima (Pratico i sur. 1995) i COX-2 izoforme u ljudskim monocitima (Pratico i Fitzgerald 1996). Utvrđeno je da je 8-iso-prostaglandin F2 $\alpha$  jak vazokonstriktor (Takahashi i sur. 1992; Kang i sur. 1993) i mogući patofiziološki medijator koji može mijenjati integritet membrane (Yura i sur. 1995). Cirkulira plazmom i izlučuje se urinom (Helmersson i Basu 2001). Cirkulira kao esterificirani LDL fosfolipid i kao slobodna kiselina. Povišene razine 8-iso-prostaglandin F2 $\alpha$  u plazmi, serumu i urinu su povezane s kardiovaskularnim čimbenicima rizika poput pušenja cigareta, hiperkolesterolemijom (Reilly i sur. 1998) i hiperhomocisteinemijom (Voutilainen i sur. 1999).



**Slika 5. Strukturna formula 8-iso-prostaglandina F2 $\alpha$**

Veliki broj znanstvenih radova tijekom proteklih nekoliko godina je implicirao reakcije slobodnih radikala u patologiji više od 50 ljudskih bolesti. Zapravo, oksidativni stres kao rezultat velike proizvodnje slobodnih radikala se danas vjeruje da je svojstvo većine, ako ne i svih ljudskih kroničnih bolesti, uključujući AIDS, rak, artritis, kardiovaskularne bolesti, sindrom kroničnog zamora, psorijazu, astmu. Lijekovi koji se upotrebljavaju za liječenje tih bolesti mogu i sami doprinijeti povećanju oksidativnog stresa. Zračenje i kemoterapija karcinoma oštećuju zdrave stanice i proizvode reaktivni kisik.

**Antioksidansi** su raznorodna skupina molekula koje, ako su prisutne u niskim koncentracijama u usporedbi s koncentracijama oksidativnog supstrata, značajno zadržavaju ili priječe oksidaciju tog supstrata, kontroliraju odnos između stanja reduciranja ili oksidiranja u biološkom sustavu. Antioksidansi nastaju u stanici ili se u organizam najčešće unose hranom ili u obliku vitaminskih i sličnih suplemenata, a

djeluju na nekoliko načina: onemogućuju stvaranje novih slobodnih radikala u organizmu, uništavaju u organizmu stvorene radikale (engl. *scavengers* – “čistači”) ili popravljaju oštećenja u stanici nastala djelovanjem radikala.

Podjela antioksidansa:

#### 1.) ENDOGENI ANTIOKSIDANSI

a) ENZIMSKI ( superoksid dismutaza, katalaza, glutacion peroksidaza, glutacion oksidoreduktaza)

b) NEENZIMSKI (metabolički: lipoična kiselina, glutacion, L-arginin, koenzim Q10, melatonin, mokraćna kiselina, bilirubin, transferin...)

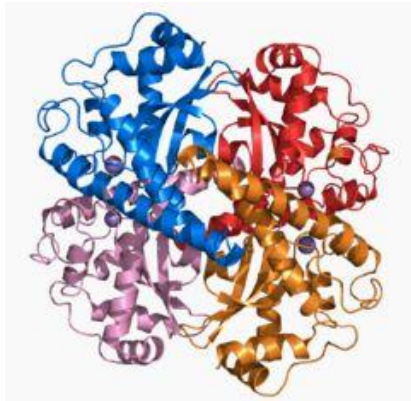
2.) EGZOGENI (neenzimski antioksidativni nutrijensi: vitamin E, vitamin C, karotenoidi, elementi u tragovima Se, Mn, Zn, flavonoidi,  $\omega$ -3 i  $\omega$ -6 masne kiseline...)

Općenito, antioksidansi topljivi u vodi reagiraju s oksidansima u staničnom citosolu i u krvnoj plazmi, dok antioksidansi topljivi u mastima štite stanične membrane od lipidne peroksidacije (Sies i Helmut 1997). Različiti antioksidansi su prisutni u širokim rasponima koncentracija u tjelesnim tkivima i tekućinama. Glutacion i ubikinon su uglavnom prisutni u stanicama dok su ostali ravnomjerno raspoređeni. Djelovanje antioksidansa može ovisiti o pravilnom funkcioniranju drugih članova antioksidativnog sustava (Vertuani i sur. 2004). Iznos zaštite koju osigurava antioksidans ovisi o njegovoj koncentraciji, njegovoj reaktivnosti s ROS-om i o antioksidansu s kojim zajedno djeluje (Vertuani i sur. 2004).

U „prvu liniju obrane" enzimatskoga zaštitnog sustava ubraja se enzim **SOD** (superoksid dismutaza). Spomenuti atribut pripisuje se tom enzimu stoga što on katalizira uklanjanje superoksidnog radikala, prvog produkta jednovalentne redukcije molekule kisika, ujedno i izvora spojeva reaktivnijih od njega samog. Enzim SOD katalizira dismutaciju superoksidnog radikala na molekulu kisika (oksidacija) i  $H_2O_2$  (redukcija).

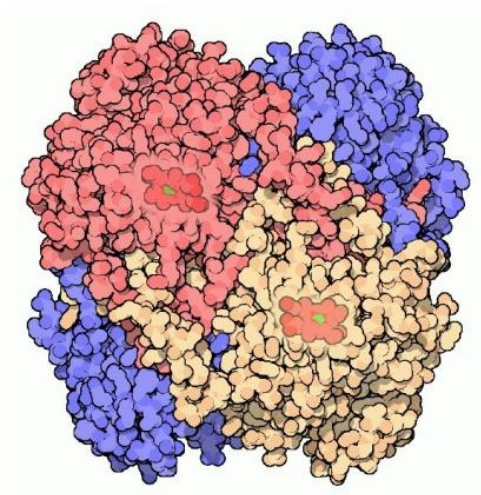
SOD je prisutna u tri izoforme koje se međusobno razlikuju prema smještaju u stanici i vrsti metalnog iona koji sadrže u svom aktivnom centru. Izoenzim CuZn-SOD se nalazi u citosolu (peroksisomi), po građi je dimer, a u aktivnom središtu sadrži ione Cu ili Zn. Mn-SOD se nalazi u matriksu mitohondrija, a svaka od četiri podjedinice

tetramera sadrži jedan atom Mn. Ec-SOD (ekstracelularna-SOD), izoenzim koji štiti izvanstanični prostor od štetnog učinka superoksidnog radikala, građen je od četiri podjedinice, a sadrži ione Cu i Zn. Ovakvom raspodjelom izoenzima unutar stanice i izvan nje omogućeno je brzo i djelotvorno uklanjanje superoksidnog radikala na mjestu njegova nastanka. Aktivnost SOD je regulirana obimom njene biosinteze koja je osjetljiva na obim tkivne oksigenacije.



**Slika 6. Struktura ljudske Mn-SOD**

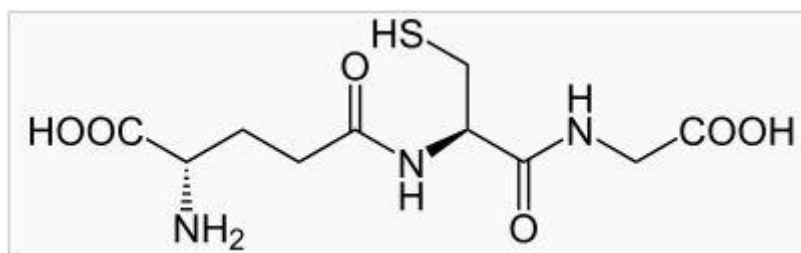
**CAT (katalaza)** je enzim koji brzo reducira  $H_2O_2$  do  $H_2O$ . Nalazi se u citosolu stanice (peroksisomi), a osobito je aktivan u hepatocitima i eritrocitima. Enzim je građen od četiri podjedinice, od kojih svaka u aktivnom centru posjeduje hem skupinu.



**Slika 7. Katalaza**

**GPx (glutation peroksidaza)** katalizira redukciju  $H_2O_2$  i organskih hidroperoksida u prisutnosti reduciranog oblika glutaciona koji služi kao donor vodika. Prisutna je u citosolu stanice kao i u mitohondrijima (do 40% ukupne enzimске aktivnosti), te uz katalazu značajno doprinosi uklanjanju  $H_2O_2$ . Postoji pet izoenzima, koji se razlikuju po smještaju unutar stanice, te afinitetu prema supstratu. GPx se ubraja u selenoenzime, budući da u svom aktivnom centru sadrži atom Se, čija je količina istodobno faktor regulacije aktivnosti spomenutog enzima.

**Glutation** je neenzimatski antioksidans, tripeptid, tj. molekula formirana od tri aminokiseline: glutamina, cisteina i glicina. Glutation igra središnju ulogu u gluten peroksid sustavu enzima koji je ključan za stanični metabolizam, regulaciju stanica, detoksifikaciju, DNK sintezu i oporavak, imunološku funkciju, metabolizam prostaglandina i reguliranje stanične proliferacije apoptozom (programirano odumiranje stanica). GSH je djelomično koristan u zaštiti jetre od štete nakon izlaganju toksinima (Bray 1994). GSH razine su uglavnom smanjene u slučaju većine bolesti, neplodnosti, starenja, opterećenja toksinima i drugim nepovoljnim zdravstvenim stanjima (De Leve 1991). Niže razine GSH u krvi se povezuju s više bolesti: povišenim krvnim tlakom, povišenim postotkom tjelesnih masnoća i generalno smanjenim zdravstvenim stanjem (Bray 1994). Oboljeli od raka imaju manje GSH u svojoj krvi nego zdravi ljudi (Julius 1994).



**Slika 8. Strukturna formula glutaciona (GSH)**

Glutation nije esencijalni nutrijent tj. ne mora se unositi u organizam hranom, jer se sintetizira unutar tijela (Meister 1988). Tiolna grupa cisteina služi kao proton donor i odgovorna je za biološku aktivnost glutaciona. Opskrba ovom aminokiselinom je

ograničavajući faktor u sintezi glutaciona u stanicama jer je cistein relativno rijedak u hrani.

Glutation postoji u reduciranom (GSH) i oksidiranom (GSSG) stanju. U reduciranom stanju tiolna grupa cisteina može donirati reducirajući ekvivalent ( $H^+ + e^-$ ) nestabilnoj molekuli poput reaktivne kisikove vrste. Kada donira elektron, glutacion postaje reaktivan, ali reagira sa drugim reaktivnim glutationom i formira glutacion disulfid (GSSG). Takva reakcija je moguća zbog relativno visoke koncentracije glutaciona u stanici (do 5 mM u jetri). GSH se može regenerirati iz GSSG pomoću enzima glutacion reduktaze.

U zdravim stanicama i tkivima, više od 90 posto ukupnog glutaciona je u reduciranoj formi (GSH), a manje od 10 posto u disulfidnoj formi (GSSG). Povećan omjer GSSG/GSH je znak oksidativnog stresa.

## 2.6. Utjecaj pesticida na antioksidativne enzime

Mnoge kemikalije utječu na aktivnost enzima *in vitro* i *in vivo* (Coban i sur. 2008). Pesticidi općenito inhibiraju enzime pri vrlo niskim koncentracijama (Ekinci i Baydemir 2010). Mnogi zagađivači okoliša, uključujući pesticide mogu uzrokovati oksidativni stres kod životinja i ljudi. Ribe se žele prilagoditi oksidativnim uvjetima kada su izložene pesticidima pa su u mišićima, jetri, bubrezima i škragama relativno visoke koncentracije enzima glutation reduktaze (GR), glukoza-6-fosfat-dehidrogenaze (G6PD) i 6-fosfoglukonat dehidrogenaze (6PGD) (Stephensen i sur. 2000). Ti enzimi imaju velik direktan i indirektan utjecaj na antioksidativne sustave i korisni su biomarkeri jer su uključeni u regeneriranje reduciranog glutaciona (GSH). Ipak, zbog kompleksnih interakcija i međudnosa između pojedinih komponenti, fiziološka uloga ovih enzima u stanicama je slabo razumljiva. S druge strane, aktivnost enzima zbog izloženosti pesticidima može biti inhibirana zbog nekoliko razloga: produkcije superoksidnog radikala ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) (Bagnasco i sur. 1991), zbog direktnog utjecaja pesticida na sintezu enzima (Oruc i Uner 2000) i zbog direktne inhibicije aktivnosti enzima *in vivo* i *in vitro*.

Postoje studije koje razmatraju utjecaj cipermerina i karbendazima na antioksidativne enzime.

Wang i sur. (2011) su napravili studiju o fiziološkim odgovorima triju morskih mikroalgi koje su bile izložene cipermetrinu.

Kada su stanice bile izložene cipermetrinu, dogodili su se brzi i značajni fiziološki odgovori i svi su se promatrani biokemijski parametri značajno promijenili unutar 6-12 sati od izlaganja. Cipermetrin je utjecao na rast algi, sadržaj proteina i aktivnost superoksid dismutaze tako što ih je stimulirao pri niskim koncentracijama (1,5  $\mu\text{g/L}$ ) a inhibirao pri višim koncentracijama (>50  $\mu\text{g/L}$ ). Razina MDA se povećala kod svih promatranih skupina, što pokazuje da je toksični efekt cipermetrina ostvaren preko slobodnih radikala. Ovi rezultati pokazuju da je aktivacija SOD i potpomaganje proteina u ranoj izloženosti važno za suzbijanje oksidativnog stresa izazvanog cipermetrinom, a inaktivacija superoksid dismutaze može biti presudna za inhibiciju rasta algi izloženih cipermetrinu.

Jin i sur. (2011) su u svojoj studiji utvrdili da kod muških miševa u pubertetu cipermetrin izaziva oksidacijski stres i remećenje endokrinog sustava. Aktivacija antioksidativnih enzima u jetri (SOD, GPx, CAT) se značajno povećala nakon tri tjedna oralne primjene 20 mg/kg cipermetrina.

Jin (2011) je u drugoj studiji zajedno sa suradnicima utvrdio da cipermetrin može inducirati oksidativni stres, oštećenje DNA i apoptozu kod odrasle zebrice (*Danio rerio*). Razine mRNA u jetri za gene koji kodiraju antioksidativne proteine poput CuZnSOD, CAT i GPx su značajno porasle nakon što su zebrice bile izložene različitim koncentracijama cipermetrina tijekom 4 ili 8 tjedana.

Manna i sur. (2003) zaključuju da aktivnost SOD i CAT te razine GSH i MDA u jetri reflektiraju oksidativni status, a enzimi poput AST, ALT i ALP funkcionalni status jetre. Povećanje ili smanjenje enzimске aktivnosti je povezano s intenzitetom štete na stanicima. Smanjena aktivnost CAT i SOD te povećanje MDA u jetri, kao i povećanje serumskih AST, ALT i ALP razina, upućuju na to da cipermetrin uzrokuje štetu na jetri preko slobodnih radikala.

Manna i sur. (2006) su u svojoj studiji proučavali subkroničnu toksičnost  $\alpha$ -cipermetrina na štakorima. Alfa-cipermetrin otopljen u dimetil-sulfoksidu je davan štakorima uzastopno svaki dan tijekom 60 dana u dozi 1/10 LD<sub>50</sub> (14,5 mg/kg). Značajno se povećala razina MDA i smanjila aktivnost CAT i SOD te razina glikogena u jetri.

Sangeetha (2010) je analizirao učinak karbendazima u različitim koncentracijama na klijanje sjemena piskavice (*Trigonella foenum graecum*). Sjeme je oprano od prašine i isprano s 1% živinog klorida za sterilizaciju. Jedan uzorak sjemena je natopljen u destiliranoj vodi za kontrolu, a ostali uzorci su namočeni u 0,05%, 0,1% i 0,3% karbendazim preko noći. Sjemenke su zatim isprane destiliranom vodom i stavljene u petrijevu zdjelicu s navlaženim papirnatim ručnicima kako bi se potaknula klijavost sjemena. Aktivnost SOD i CAT je bila značajno veća kod sjemena tretiranog s 0,05% karbendazimom u usporedbi s kontrolnom skupinom. Sjeme izloženo većim koncentracijama karbendazima je imalo značajno nižu aktivnost SOD i CAT. Fungicid u većoj koncentraciji štiti biljku ali i uzrokuje oksidativni stres. Smanjenje aktivnosti SOD i CAT u prisutnosti 0,1% i 0,3% karbendazima moglo bi se pripisati povećanoj uporabi tih antioksidansa u borbi protiv reaktivnih kisikovih vrsta koje su stvorene

tijekom oksidacijskog stresa u prevelikim količinama. Ova studija pokazuje da karbendazim može poboljšati obrambeni mehanizam biljke pri niskim koncentracijama, a time poboljšava i kvalitetu sjemena i biljke koji se koriste u prehrani za prevladavanje oksidativnog stresa koji je povezan s poremećajima poput dijabetesa. Ukratko, karbendazim koji uzrokuje stres pri visokim koncentracijama, pri niskim koncentracijama može poboljšati snagu sjemena.



## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Pokusne životinje

Istraživanje je provedeno na mužjacima i ženkaama Swiss albino miševa, uzgojenima u uzgajalištu laboratorijskih životinja Zavoda za animalnu fiziologiju, Prirodoslovno matematičkog fakulteta u Zagrebu. Istraživanje smo proveli u skladu sa Zakonom o dobrobiti laboratorijskih životinja (NN 19/99) i prema Vodiču za držanje i korištenje laboratorijskih životinja (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, DHHS (NIH) Publ # 86-23.). Pokus je dobio dozvolu etičkog povjerenstva Prirodoslovno matematičkog fakulteta.

Životinje korištene za istraživanje bile su u dobi od  $60 \pm 5$  dana na početku apliciranja pesticida. Životinje su okoćene i uzgojene u standardnim uvjetima propisanim za uzgoj laboratorijskih životinja (glodavaca), odnosno pri temperaturi od  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , dnevnog ritma svjetla i tame 12/12 sati, s ponuđenom formuliranom hranom (Pliva d.d.) i vodom *ad libitum*. Kontrolne i tretirane životinje držane su pod istim uvjetima. Životinje su raspoređene u skupine sa statistički značajnim brojem jedinki (14 po skupini), u šest skupina s obzirom na pojedini pesticid i kombinaciju pesticida odnosno još šest podskupina s obzirom na spol (7 mužjaka i 7 ženki), te kontrolnu skupinu koja ne dobiva pesticide.

Životinje smo označili radi praćenja svake pojedine jedinke i bilježenja mase. Označavali smo ih crticama na repu. Na taj se način pratila pojedina životinja i lakše uočavalo potencijalno ekstremno odstupanje od ostatka skupine u praćenim parametrima. Nadalje, unutar svake skupine životinji je pripisan redni broj jedinke. Tako bi svaka jedinka dobivala jedinstvenu šifru s obzirom na raspored u pokusu, primjerice 1.0 M, 1.1 M, 1.2 M, itd, pri čemu prvi broj označava broj skupine s obzirom na tretiranje pesticida, drugi broj označava broj životinje unutar skupine (što također odgovara broju crtica na repu), te slova M i F koja označavaju mužjake (M) odnosno ženke (F).

## 3.2. Plan pokusa i način aplikacije pojedinih doza ispitivanih pesticida

Životinje su u skupinama od 1 do 6 dobivale pripadajuću NOAEL dozu (EPA; EXTOTNET) imazalila, cipermetrina, karbendazima kao i njihovih kombinacija, otopljenih u 0,2 ml suncokretovog ulja (Zvijezda, Zagreb), oralnim putem odnosno kaniliranjem, dnevno, tijekom 28 dana. Kontrolna skupina je dobivala samo suncokretovo ulje, 0,2 ml po danu.

Svaka jedinka iz prve skupine dnevno je dobila 10 mg/kg imazalila, tijekom 28 dana, tako da je npr. miš od 25 g dobio 0,25 g imazalila po danu. Druga skupina je dobivala 10 mg/kg cipermetrina po mišu, tijekom 28 dana. Treća skupina je dobivala 20 mg/kg karbendazima po mišu tijekom 28 dana, tako da je npr. miš od 25 g dobio 0,5 mg karbendazim po danu. Četvrta skupina dobivala je kombinaciju imazalila 10 mg/kg i cipermetrina 10 mg/kg, tijekom 28 dana. Peta skupina dobivala je kombinaciju cipermetrina 10 mg/kg i karbendazima 20 mg/kg tijekom 28 dana. Šesta skupina dobivala je kombinaciju imazalila 10 mg/kg i karbendazima 20 mg/kg tijekom 28 dana. Svaki puta prije aplikacije suspenzije, životinjama je izmjerena težina, radi praćenja kliničkog stanja kao i korekcije volumena suspenzije, kako bi svaka životinja dobila jednaku predviđenu dozu određenu na početku pokusa. Kontrolna skupina dobivala je uvijek jednaki volumen (0,2 ml) ulja bez pesticida.

Prije davanja otopina gastričnom kanilom, pesticidi su suspendirani u suncokretovom ulju na potrebni volumen (0,2 ml, tj. optimalni volumen za želudac miša i aplikaciju *per os*) planirane doze. Ovakav način aplikacije najbolje simulira ekspoziciju organizama okolišno prisutnim pesticidima, a također toksikokinetički tvar ne zaobilazi želudac, crijeva (pH) i jetru s jetrenim detoksikacijskim enzimima koji bi potencijalno mogli detoksicirati otrov, odnosno toksicirati otrov stvarivši još toksičnije metabolite prethodno navedenih pesticida.

Također bi se u slučaju smanjenja populacije crijevne mikroflore mogle pojaviti druge kliničko-patološke promjene (Wallace-Hayes 2001).

Plan pokusa sukladan je s propisanim standardnim toksikološkim modelima. Same metode koje se primjenjuju tijekom izrade diplomskog u skladu su s modernim pristupom u biološkim istraživanjima. Nadalje, plan pokusa u skladu je s odredbom

407 OECD-a /OECD Guideline 407/ i US EPA testiranja (Descotes 1988; Wallace-Hayes 2001). Pokus je postavljen na temelju literaturnih prikaza iz direktive 91/414/EEC koju je propisala EU na temelju prikaza dobivenih iz rada zdravlje i zaštita potrošača. Pojedinačne i kombinirane doze pesticida su prema ovim propisima bile aplicirane 28 puta (svaka 24 sata) tijekom 28 dana, radi održavanja konstantne koncentracije pesticida u organizmu.

Tijekom 28 dana kaniliranja životinja i davanja NOAEL doze za svaki navedeni pesticid, znatno smo se približili LD<sub>50</sub> dozi, koja je propisana posebno za svaki pesticid s kojim smo tretirali životinje. Za imazalil LD<sub>50</sub> iznosi 227 mg/kg, za cipermetrin 287 mg/kg, a za karbendazim 10000 mg/kg. (EU 2006). Žrtvovanje je obavljeno nakon 28. dana tretiranja životinja pesticidima.

### **3.3. Određivanje oksidativnog stresa timusa, slezene i limfnog čvora**

Oksidativni stres u timusu, slezeni i limfnom čvoru određivan je na dva načina; mjerenjem nastanka antioksidativnih enzima (superoksid dismutaze, katalaze i glutationa) u tkivima kao i putem nastanka produkata lipidne peroksidacije kao posljedice oksidativnog stresa, kao što su malonilaldehid (MDA) i 8-iso-prostaglandin F<sub>2α</sub>.

#### **3.3.1. Određivanje superoksid dismutaze (SOD) u timusu, slezeni i limfnom čvoru**

Aktivnost superoksid dismutaze odredili smo u uzorcima timusa, slezene i limfnog čvora pokusnih životinja pomoću kompleta RANSOD za određivanje SOD (RANDOX, Velika Britanija, kataloški broj SD 124, 125 i 126).

Metoda se bazira na reakciji ksantina i ksantin-oksidge (XOD) koji stvaraju radikale superoksida i koji ulaze u reakciju s 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolium (I.N.T.) formirajući formazan kao crvenu boju.

Aktivnost SOD-a se tada mjeri stupnjem aktivnosti ove reakcije. Jedna jedinica SOD-a je ona koja uzrokuje 50%-tnu inhibiciju stope reakcije I.N.T.-a.

Ksantin  $\rightarrow$  mokraćna kiselina +  $O_2\bullet$  (XOD)

I.N.T.  $\rightarrow$  formazan (boja) ( $O_2\bullet$ )

Ili

$O_2\bullet + O_2\bullet + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$  (SOD)

Svakom organu (timus, slezena, limfni čvor), dodan je 50 mM fosfatni pufer u omjeru razrjeđenja 1:10. Organi su potom homogenizirani te centrifugirani 15 minuta na 15000 okretaja u minuti.

U ependorfice se dodaje supernatant (u volumenu jednakom masi svakog organa) i 1000  $\mu$ l supstrata R1 (ksantin 0,05 mmol/l). Nakon miješanja, uzorci se prebace u kivete (Plastibrand UV-Cuvette semi-mikro, kat.br. 7951 50, dimenzija 12,5x12,5x45mm) i neposredno prije mjerenja dodaje se 150  $\mu$ l ksantin oksidge (supstrat R2). Apsorbancija uzoraka mjerena je na spektrofotometru Biochrom libra S22 pri valnoj duljini 505 nm, nakon 30 sekundi i ponovo nakon tri minute.

Izračun jedinica SODa proveden je prema sljedećoj formuli:

$$A(3 \text{ min}) - A(30 \text{ sek})/3 = x$$

$$100 - (x \cdot 100)/0,023 = \% \text{ inhibicije reakcije}$$

Iz baždarne krivulje standarda određena je formula jednadžbe pravca, čije su vrijednosti uvrštene u završni izračun:

$$(\% \text{ inhibicije} - 7,47)/44,9 = \text{SOD jedinica (U)}$$

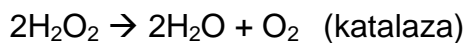
$$\text{SOD (U)} \cdot \text{razrjeđenje (10x)} = \text{SOD U/ml}$$

Baždarna krivulja određena je pomoću uzoraka standarda različitih koncentracija, istom metodom kao i uzorci timusa, slezene i limfnog čvora.

### 3.3.2. Određivanje katalaze u timusu, slezeni i limfnom čvoru

Aktivnost katalaze odredili smo u uzorcima timusa, slezene i limfnog čvora pomoću kita za određivanje aktivnosti katalaze (OxiSelect Catalase Activity Assay Kit, Cell Biolabs, San Diego, CA, SAD, kataloški broj STA-341).

Navedeni protokol uključuje dvije reakcije. U prvoj reakciji katalaza je inducirana razgradnjom vodikovog peroksida na vodu i kisik. Brzina raspadanja vodikovog peroksida na vodu i kisik je proporcionalna koncentraciji katalaze.



Uzorci koji sadrže katalazu mogu biti inkubirani u poznatoj količini vodik-peroksida. Reakcija traje točno jednu minutu u kojem vremenu je katalaza inhibirana s natrijevim azidom. Preostali vodikov peroksid u reakcijskoj smjesi olakšava reakciju spajanja kromogena DHBS (3,5-diklor-2-hidroksi benzensulfonska kiselina) i AAP (4-aminoantipirin) zajedno s HRP (engl. *Horseradish peroxidase*) katalizatorom.



Produkt spajanja, crveno obojeni kinonimin se mjeri na 520 nm, što je u korelaciji s količinom preostalog vodikovog peroksida u reakcijskoj smjesi.

Na početku pokusa potrebno je odrediti baždarnu krivulju katalaze, putem standardnih otopina. Standardi se razrjeđuju u fosfatnom puferu te se prema protokolu priredi 8 otopina različitih koncentracija katalaze (U/ml): 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,5625; 0.

Protokol za određivanje aktivnosti katalaze u uzorcima standarda kao i uzorcima ispitivanih organa je isti, a uključuje sljedeće korake:

- Uzeti 20  $\mu\text{l}$  uzorka i dodati u za to priloženu pločicu s jažicama (eng. *96-well microtiter plate*);
- Dodati 50  $\mu\text{l}$  otopine vodikovog peroksida (12 mM), dobro promiješati i inkubirati jednu minutu;

- Zaustaviti reakciju dodavanjem 50 µl inhibitora katalaze;
- Prbaciti 5 µl svih uzoraka u novu pločicu s jažicama;
- Dodati 250 µl kromogene otopine u svaku jažicu i inkubirati 50 minuta u miješalici.

Po završetku protokola, uzorcima se određuje apsorbancija na 520 nm. Od svakog uzorka rađen je triplikat te je konačna apsorbancija izražena kao srednja vrijednost triju mjerenja.

Konačni rezultati za aktivnost katalaze izračunavaju se preko formule:

$$A_{520} = ax^2 + bx + c$$

Pri čemu je „ $A_{520}$ “ apsorbancija uzorka, „ $x$ “ je aktivnost katalaze u U/ml, a vrijednosti  $a$ ,  $b$  i  $c$  su koeficijenti kvadratne jednadžbe koji se određuju preko vrijednosti jednadžbe baždarnog pravca.

### 3.3.3. Određivanje glutaciona u timusu, slezeni i limfnom čvoru

Baždarna krivulja određivanja je mjerenjem apsorbancije različitih razrjeđenja glutaciona od 0,5 do 20 µM, pri valnoj duljini od 412 nm.

Za određivanje GSH u uzorcima timusa, slezene i limfnog čvora uzimano je po 30 µl homogenata. U epruvete s homogenatima tkiva smo potom dodavali 700 µl 0,01 N klorovodične kiseline (HCl) i 200 µl 3 mM Ellmanovog reagensa (TBA u 0,1 M natrij-fosfatu, 12,6 ml 0,05 M EDTA). Mješavinu smo potom vorteksirali te prebacili u kivete.

Prije samog mjerenja, u kivetu s uzorkom smo dodavali 100 µl 2 mM NADPH koji pokreće enzimsku reakciju. Apsorbanciju nastale 2-nitro-5-tiobenzolne kiseline mjerili smo spektrofotometrijski nakon 15, 30 i 45 sekundi, a konačna apsorbancija je izražena kao srednja vrijednost ova tri mjerenja.

Koncentracija glutaciona je izražena u ml/mg tkiva timusa, slezene i limfnog čvora.

### 3.3.4. Određivanje lipidne peroksidacije mjerenjem količine 8-iso-prostaglandina F2 $\alpha$ u timusu, slezeni i limfnom čvoru

Lipidna peroksidacija određivana je u timusu, slezeni i limfnom čvoru pomoću kita za određivanje 8-iso-prostaglandina F2 $\alpha$ .

Kit za određivanje 8-iso-prostaglandina F2 $\alpha$  je ELISA test za određivanje razine 8-iso-PGF2 $\alpha$  u različitim biološkim uzorcima kao što su plazma, urin, serum i tkiva. Protutijelo na 8-iso-PGF2 $\alpha$  inkubira se u jažicama mikrotitarske pločice. Nakon ispiranja, 8-iso-PGF2 $\alpha$  standardi ili tretirani uzorci su pomiješani s 8-iso-PGF2 $\alpha$ -HRP konjugatom i istovremeno dodani u jažice. Nekonjugirani ili slobodni 8-iso-PGF2 $\alpha$  i konjugirani 8-iso-PGF2 $\alpha$ -HRP se natječu za vezanje na protutijelo vezano na pločicu. Nakon kratke inkubacije i ispiranja, dodaje se supstrat na HRP. Aktivnost HRPa rezultira razvojem boje što je direktno proporcionalno količini 8-iso-PGF2 $\alpha$  konjugata vezanih na pločicu i obrnuto proporcionalno količini slobodnih 8-iso-PGF2 $\alpha$  u uzorcima i standardima.

Količina 8-iso-PGF2 $\alpha$  u ispitivanim uzorcima određuje se usporedbom s poznatom, prethodno određenom baždarenom krivuljom.

Za određivanje baždarne krivulje pripremili smo svježe otopine standarda, različitih razrjeđenja, s krajnjim razrjeđenjem 1:1000.

U daljnim koracima prema protokolu bilo je potrebno:

- Dodati 100  $\mu$ l razrijeđenog anti-8-iso-PGF2 $\alpha$  protutijela u pločicu s kozjim antizečjim protutijelom, nakon čega slijedi inkubacija na miješalici u trajanju od jednog sata.
- Odstraniti otopinu protutijela iz jažica. Isprati jažice pet puta s 300  $\mu$ l pufera za ispiranje po jažici.
- Pomiješati 55  $\mu$ l uzorka i 55  $\mu$ l 8-iso-PGF2 $\alpha$ -HRP konjugata i dobro promiješati.
- Premjestiti 100  $\mu$ l prethodno pomiješane otopine u jažicu i inkubirati na miješalici 1 sat na 25 °C.
- Odstraniti pomiješanu otopinu iz jažica. Isprati pet puta s 300  $\mu$ l pufera za ispiranje po jažici.

- Dodati 100 µl otopine supstrata u svaku jažicu. Inkubirati na sobnoj temperaturi od 20 minuta na miješalici.
- Zaustaviti enzimsku reakciju dodavanjem 100 µl otopine za zaustavljanje u svaku jažicu.

Rezultati su potom odmah očitani jer boja s vremenom izbledi. Apsorbancija svake jažice očitana je na čitaču mikrotitarskih pločica (Biorad) na 450 nm. Za svaki uzorak tri puta je određivana apsorbancija, a konačna vrijednost iskazana je kao srednja vrijednost triju mjerenja.

### **3.3.5. Određivanje lipidne peroksidacije mjerenjem količine malonildialdehida (MDA) u timusu, slezeni i limfnom čvoru**

Lipidna peroksidacija određivana je mjerenjem količine MDA u timusu, slezeni i limfnom čvoru. Princip metode je da MDA, završni produkt lipidne peroksidacije ulazi u reakciju s tiobarbiturnom kiselinom (TBA) i formira kromogen ružičaste boje.

Prema protokolu, 0,1 ml 8,1%-tnog natrij dodecilsulfata, 0,75 ml 20%-tne octene kiseline pH 3,5 i 0,75 ml 0,75%-tne vodene otopine TBA je dodano u epruvetu. U tu reakcijsku smjesu dodano je 40 µl homogenata timusa, odnosno 20 µl homogenata slezene i limfnog čvora. Mješavina je tada zagrijavana sat vremena u vodenoj kupelji na 100 °C te potom ohlađena do sobne temperature. Smjesi je tada dodano 2,5 ml butanol : piridin, u omjeru 15:1, te je centrifugirana 15 minuta na 5000 okretaja/minuti.

Nakon centrifugiranja, iz supernatanta odnosno gornjeg sloja spektrofotometrijski se mjeri apsorbancija na 532 nm.

Svakom uzorku dva puta je određivana apsorbancija te je konačna apsorbancija izražena kao srednja vrijednost dvaju mjerenja. Razina lipidne peroksidacije (MDA) izražena je kao nmol/mg tkiva.



### 3.4. Statistička obrada podataka

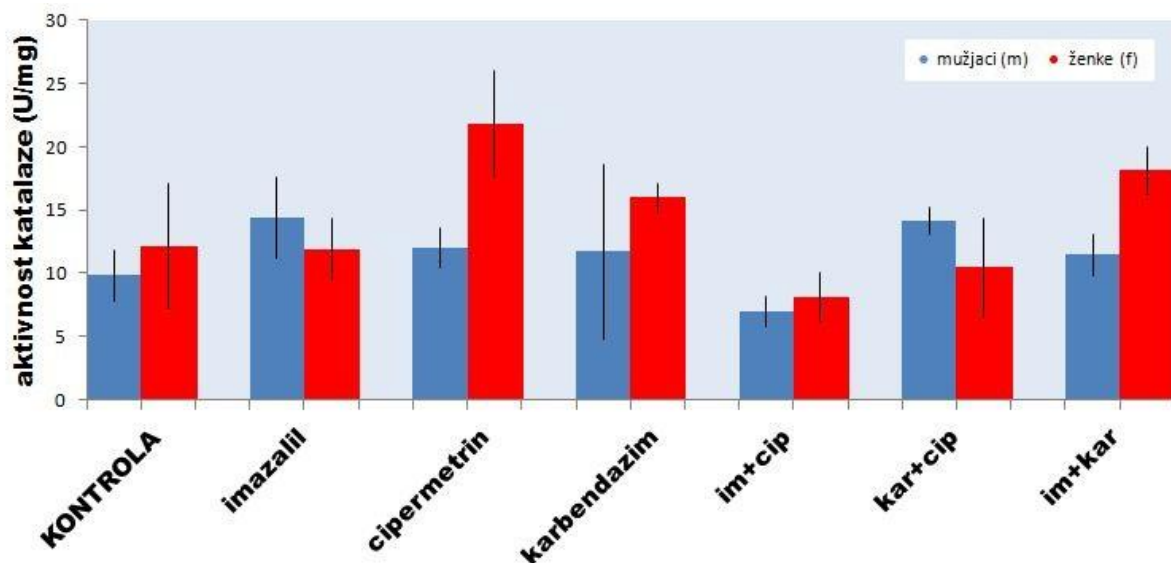
Statistička obrada dobivenih numeričkih podataka obavljena je metodama (Zar 1999) deskriptivne statistike i analizom varijance (ANOVA), korištenjem programa Statistica i Excel for Windows.

Analiza post-hoc testa provedena je Fisher-exact testom. U svih mjerenih parametara statističkom je analizom utvrđeno postojanje razlika u skupina testiranih pojedinačnim pesticidima kao i različitim kombinacijama pesticida u odnosu na kontrolnu skupinu te postojanje razlika između spolova unutar svake skupine. Granica statističke značajnosti postavljena je na  $p \leq 0,05$ .

## 4. REZULTATI

### 4.1. Učinak imazalila, cipermetrina, karbendazima i njihovih kombinacija na aktivnost katalaze u timusu, slezeni i poplitealnom limfnom čvoru.

Slika 9 prikazuje učinak imazalila, cipermetrina, karbendazima i njihovih kombinacija na aktivnost katalaze u timusu. Kod muških miševa, u odnosu na kontrolnu skupinu, nije došlo do statistički značajnih ( $p \leq 0,05$ ) razlika u aktivnosti enzima katalaze u timusu. Kod ženskih miševa je kod skupine izložene cipermetrinu došlo do statistički značajnog ( $p \leq 0,05$ ) povećanja aktivnosti enzima katalaze u timusu u odnosu na kontrolnu skupinu. Sve ostale statistički značajne razlike između pokusnih skupina prikazane su u Tablici 6 i na Slici 9.



Slika 9. Aktivnost katalaze u timusu po spolovima u pokusnih skupina miševa.

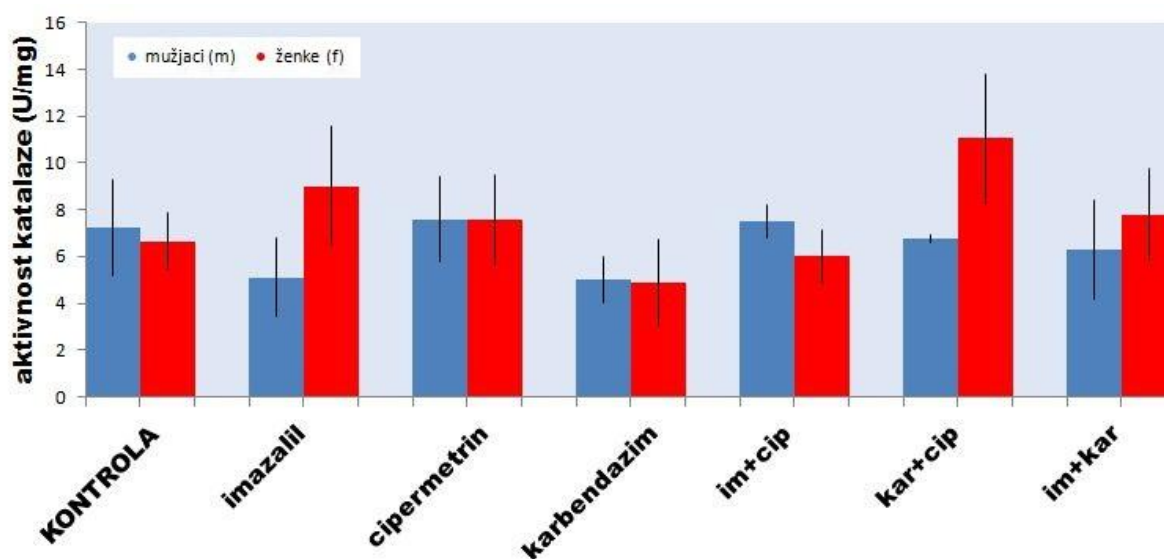
Tablica 6. Učinak imazalila, cipermetrina, karbendazima i njihovih kombinacija na aktivnost katalaze u timusu po spolovima u pokusnih skupina miševa.

	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f
	KONTROLA		imazalil		cipermetrin		karbendazim		im+cip		kar+cip		im+kar	
srednja vrijednost	9,8	12,1	14,35	11,9	12	21,8	11,7	16	6,95	8,1	14,15	10,45	11,45	18,1
standardna devijacija	1,98	4,95	3,18	2,4	1,56	4,24	6,93	1,13	1,2	1,98	1,06	3,89	1,63	1,84
statistički različito	-	c	e	c	-	a,b,e,f	-	e	b	c,d,g	e	c,g	-	a,e,f

\*Slova prikazuju tretirane skupine; a-kontrola, b-imazalil, c-cipermetrin, d-karbendazim, e-

imazalil+cipermetrin, f-cipermetrin+karbendazim, g-imazalil+karbendazim. Pokusne skupine koje se statistički značajno razlikuju ( $p \leq 0,05$ ) jedna od druge označene su u posljednjem redu slovima od a- g.

Slika 10 prikazuje učinak imazalila, cipermetrina, karbendazima i njihovih kombinacija na aktivnost katalaze u slezeni. Ni kod muških ni kod ženskih miševa nije došlo do statistički značajnih ( $p \leq 0,05$ ) promjena aktivnosti katalaze u slezeni u odnosu na kontrolnu grupu. Sve ostale statistički značajne razlike između pokusnih skupina prikazane su u Tablici 7 i na Slici 10.



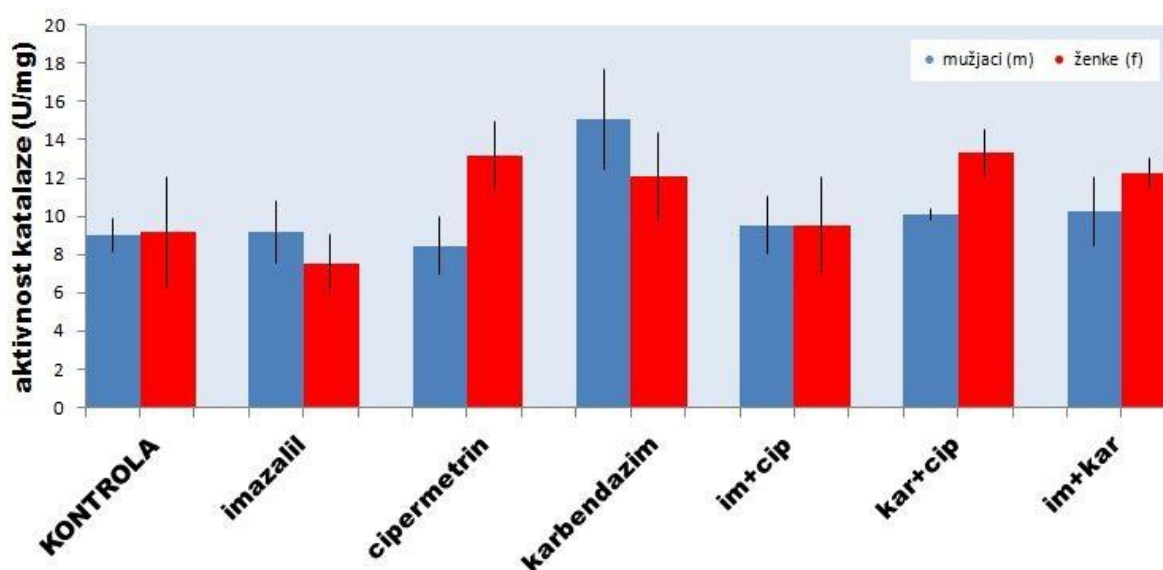
Slika 10. Aktivnost katalaze u slezeni po spolovima u pokusnih skupina miševa.

Tablica 7. Učinak imazalila, cipermetrina, karbendazima i njihovih kombinacija na aktivnost katalaze u slezeni po spolovima u pokusnih skupina miševa.

	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f
	KONTROLA		imazalil		cipermetrin		karbendazim		im+cip		kar+cip		im+kar	
srednja vrijednost	7,25	6,65	5,1	9	7,6	7,55	5	4,85	7,5	6	6,75	11,05	6,3	7,8
standardna devijacija	2,05	1,2	1,7	2,55	1,84	1,91	0,99	1,85	0,71	1,13	0,17	2,74	2,12	1,98
statistički različito	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d,e	-	-

\*Slova prikazuju tretirane skupine; a-kontrola, b-imazalil, c-cipermetrin, d-karbendazim, e-imazalil+cipermetrin, f-cipermetrin+karbendazim, g-imazalil+karbendazim. Pokusne skupine koje se statistički značajno razlikuju ( $p \leq 0,05$ ) jedna od druge označene su u posljednjem redu slovima od a- g.

Slika 12 prikazuje učinak imazalila, cipermetrina, karbendazima i njihovih kombinacija na aktivnost katalaze u poplitealnom limfnom čvoru. Kod muških miševa je kod skupine izložene karbendazimu došlo do statistički značajnog ( $p \leq 0,05$ ) povećanja aktivnosti enzima katalaze u poplitealnom limfnom čvoru u odnosu na kontrolnu skupinu. Kod ženskih miševa je došlo do statistički značajnog ( $p \leq 0,05$ ) povećanja aktivnosti enzima katalaze u poplitealnom limfnom čvoru u skupina izloženih cipermetrinu i kombinaciji karbendazima i cipermetrina u odnosu na kontrolnu skupinu. Sve ostale statistički značajne razlike između pokusnih skupina prikazane su u Tablici 8 i na Slici 11.



Slika 11. Aktivnost katalaze u poplitealnom limfnom čvoru po spolovima u pokusnim skupina miševa

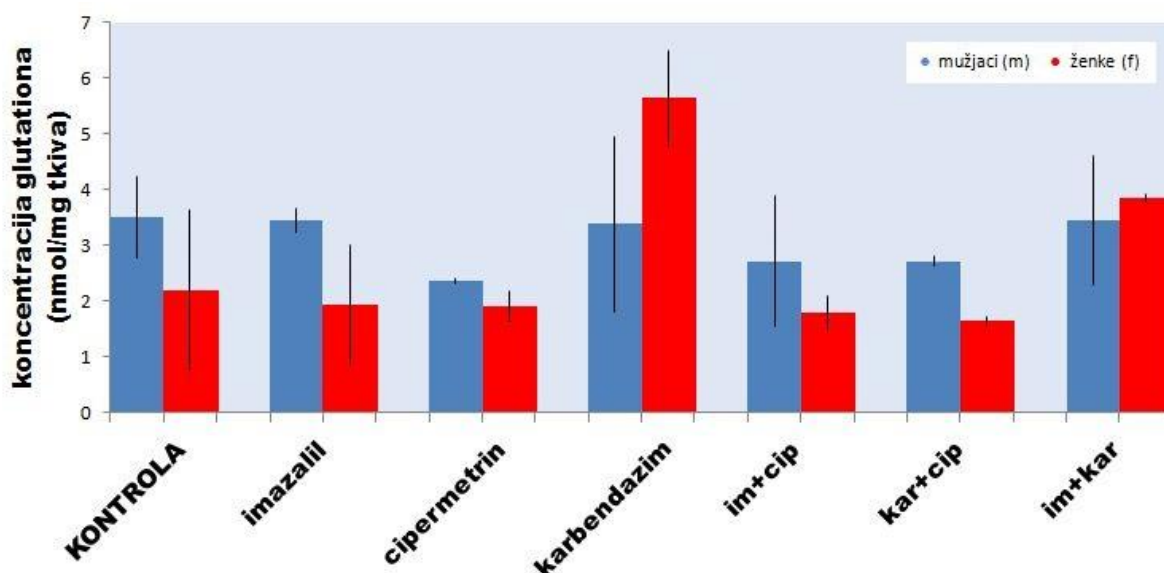
Tablica 8. Učinak imazalila, cipermetrina, karbendazima i njihovih kombinacija na aktivnost katalaze u poplitealnom limfnom čvoru po spolovima u pokusnim skupina miševa.

	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f
	KONTROLA		imazalil		cipermetrin		karbendazim		im+cip		kar+cip		im+kar	
srednja vrijednost	9	9,15	9,15	7,5	8,45	13,15	15,05	12,1	9,55	9,55	10,1	13,35	10,25	12,25
standardna devijacija	0,85	2,9	1,63	1,56	1,48	1,77	2,62	2,26	1,48	2,47	0,28	1,2	1,77	0,78
statistički različito	d	c,f	d	c,d,f,g	d	a,b	a,b,c,e,g	b	d	-	d	a,b	d	b

\*Slova prikazuju tretirane skupine; a-kontrola, b-imazalil, c-cipermetrin, d-karbendazim, e-imazalil+cipermetrin, f-cipermetrin+karbendazim, g-imazalil+karbendazim. Pokusne skupine koje se statistički značajno razlikuju ( $p \leq 0,05$ ) jedna od druge označene su u posljednjem redu slovima od a- g.

## 4.2. Učinak imazalila, cipermetrina, karbendazima i njihovih kombinacija na koncentraciju reduciranog glutaciona (GSH) u timusu, slezeni i poplitealnom limfnom čvoru.

Slika 12 prikazuje učinak imazalila, cipermetrina, karbendazima i njihovih kombinacija na koncentraciju reduciranog glutaciona (GSH) u timusu. Kod muških miševa u nijednoj pokusnoj skupini u odnosu na kontrolnu skupinu nije došlo do statistički značajne ( $p \leq 0,05$ ) promjene koncentracije reduciranog glutaciona u timusu. Kod ženskih miševa je u skupini izloženoj karbendazimu došlo do statistički značajnog ( $p \leq 0,05$ ) porasta koncentracije reduciranog glutaciona u timusu u odnosu na kontrolnu skupinu. Sve ostale statistički značajne razlike između pokusnih skupina prikazane su u Tablici 9 i na Slici 12.



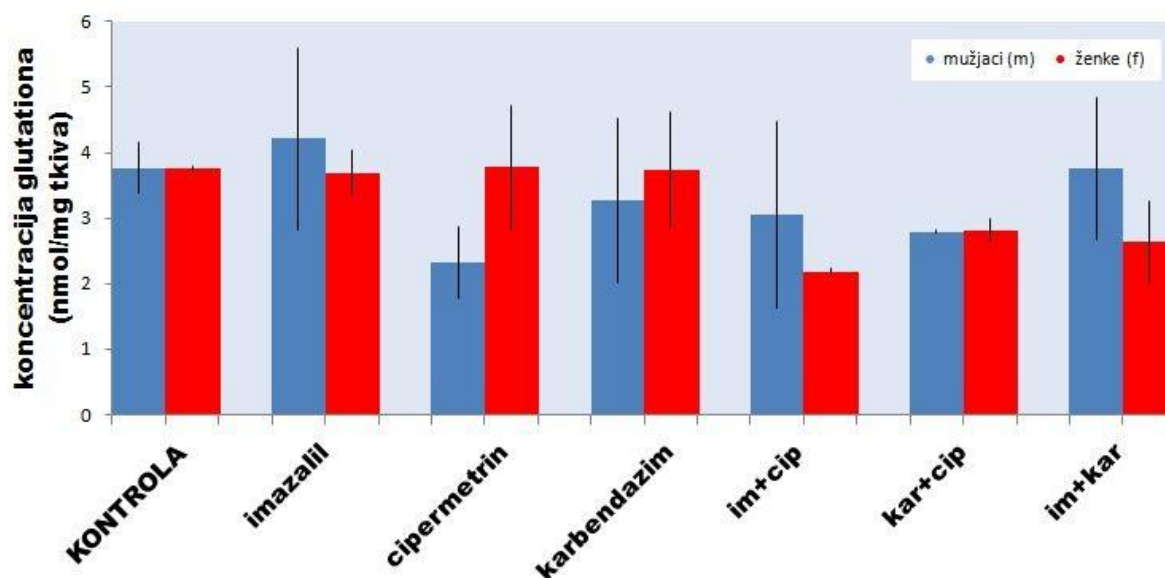
Slika 12. Koncentracija reduciranog glutaciona (GSH) u timusu po spolovima u pokusnih skupina miševa

Tablica 9. Učinak imazalila, cipermetrina, karbendazima i njihovih kombinacija na koncentraciju reduciranog glutaciona (GSH) u timusu po spolovima u pokusnih skupina miševa.

	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f
	KONTROLA		imazalil		cipermetrin		karbendazim		im+cip		kar+cip		im+kar	
srednja vrijednost	3,5	2,19	3,45	1,93	2,35	1,9	3,38	5,64	2,71	1,78	2,71	1,63	3,44	3,85
standardna devijacija	0,74	1,43	0,22	1,07	0,04	0,26	1,57	0,86	1,18	0,3	0,08	0,08	1,16	0,08
statistički različito	—	d	—	d	—	d	—	a,b,c,e,f	—	d	—	d	—	—

\*Slova prikazuju tretirane skupine; a-kontrola, b-imazalil, c-cipermetrin, d-karbendazim, e-imazalil+cipermetrin, f-cipermetrin+karbendazim, g-imazalil+karbendazim. Pokusne skupine koje se statistički značajno razlikuju ( $p \leq 0,05$ ) jedna od druge označene su u posljednjem redu slovima od a- g.

Slika 13 prikazuje učinak imazalila, cipermetrina, karbendazima i njihovih kombinacija na koncentraciju reduciranog glutaciona (GSH) u slezeni. Ni u jednoj pokusnoj skupini u odnosu na kontrolnu skupinu i kod muških i kod ženskih miševa nije došlo do statistički značajne ( $p \leq 0,05$ ) promjene koncentracije reduciranog glutaciona u slezeni. Sve ostale statistički značajne razlike između pokusnih skupina prikazane su u Tablici 10 i na Slici 13.



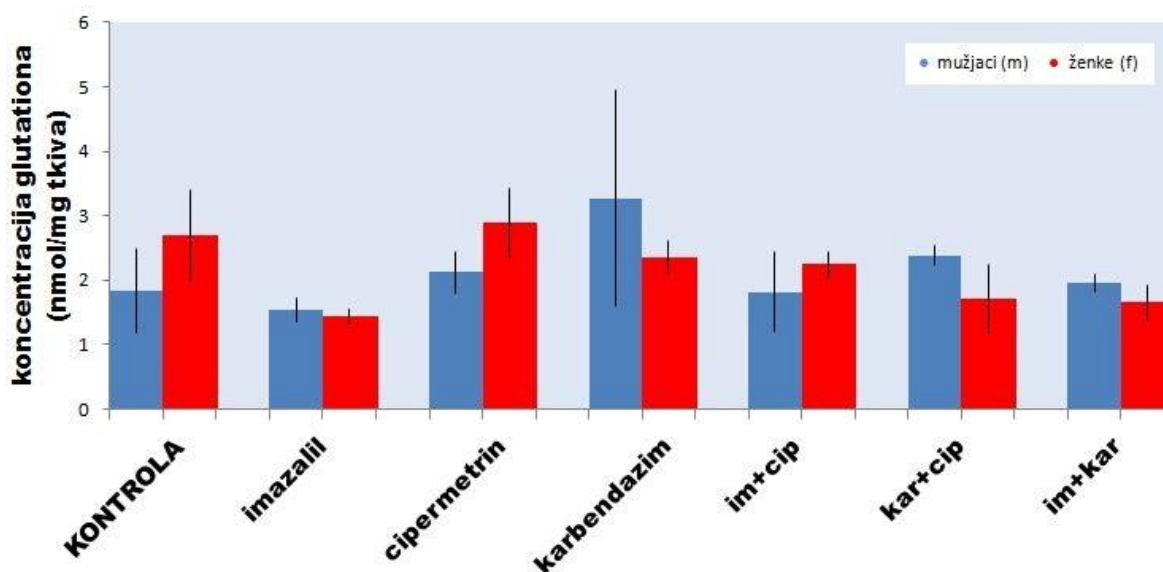
Slika 13. Koncentracija reduciranog glutaciona (GSH) u slezeni po spolovima u pokusnih skupina miševa.

Tablica 10. Učinak imazalila, cipermetrina, karbendazima i njihovih kombinacija na koncentraciju reduciranog glutaciona (GSH) u slezeni po spolovima u pokusnih skupina miševa.

	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f
	KONTROLA		imazalil		cipermetrin		karbendazim		im+cip		kar+cip		im+kar	
srednja vrijednost	3,76	3,75	4,21	3,69	2,32	3,78	3,27	3,74	3,05	2,18	2,79	2,82	3,76	2,63
standardna devijacija	0,39	0,05	1,39	0,34	0,54	0,95	1,25	0,87	1,43	0,06	0,03	0,18	1,08	0,64
statistički različito	-	-	c	-	b	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\*Slova prikazuju tretirane skupine; a-kontrola, b-imazalil, c-cipermetrin, d-karbendazim, e-imazalil+cipermetrin, f-cipermetrin+karbendazim, g-imazalil+karbendazim. Pokusne skupine koje se statistički značajno razlikuju ( $p \leq 0,05$ ) jedna od druge označene su u posljednjem redu slovima od a- g.

Slika 14 prikazuje učinak imazalila, cipermetrina, karbendazima i njihovih kombinacija na koncentraciju reduciranog glutaciona (GSH) u poplitealnom limfnom čvoru. Kod muških miševa je u skupini izloženoj karbendazimu došlo do statistički značajnog ( $p \leq 0,05$ ) povećanja koncentracije reduciranog glutaciona u poplitealnom limfnom čvoru u odnosu na kontrolnu skupinu. Kod ženskih miševa nije došlo do statistički značajnih ( $p \leq 0,05$ ) promjena koncentracije glutaciona u poplitealnom limfnom čvoru u odnosu na kontrolnu skupinu. Sve ostale statistički značajne razlike između pokusnih skupina su prikazane u Tablici 11 i na Slici 14.



Slika 14. Koncentracija reduciranog glutaciona (GSH) u poplitealnom limfnom čvoru po spolovima u pokusnih skupina miševa.

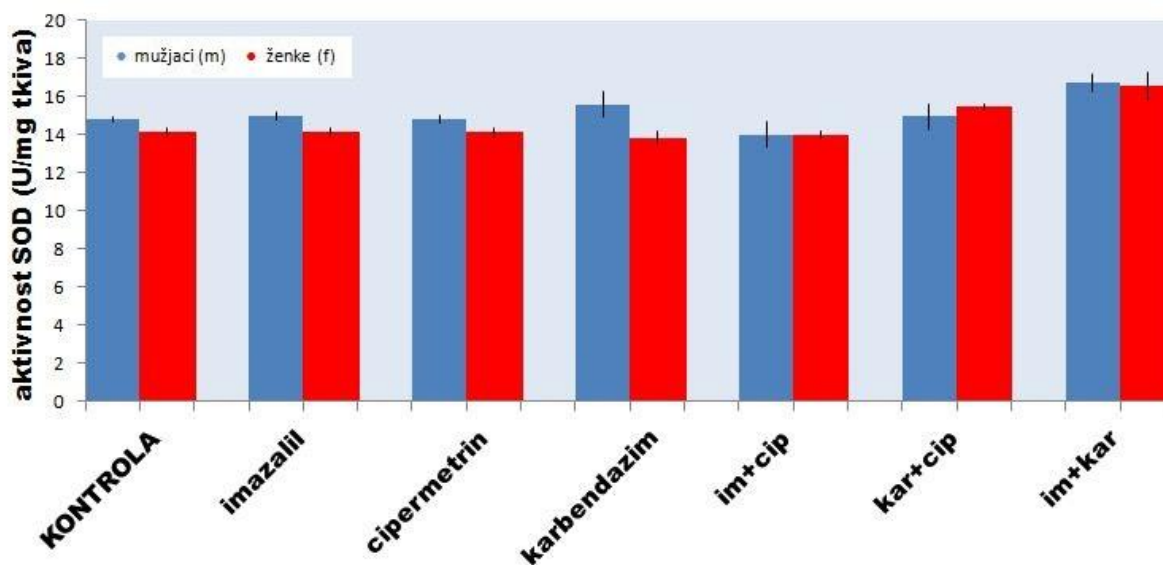
Tablica 11. Učinak imazalila, cipermetrina, karbendazima i njihovih kombinacija na koncentraciju reduciranog glutaciona (GSH) u poplitealnom limfnom čvoru po spolovima u pokusnih skupina miševa.

	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f
	KONTROLA		imazalil		cipermetrin		karbendazim		im+cip		kar+cip		im+kar	
srednja vrijednost	1,83	2,69	1,53	1,45	2,12	2,9	3,27	2,35	1,82	2,24	2,38	1,72	1,96	1,65
standardna devijacija	0,66	0,7	0,18	0,11	0,32	0,53	1,68	0,26	0,61	0,19	0,15	0,53	0,14	0,27
statistički različito	d	—	d	c	—	b	a,b,e,g	—	d	—	—	—	d	—

\*Slova prikazuju tretirane skupine; a-kontrola, b-imazalil, c-cipermetrin, d-karbendazim, e-imazalil+cipermetrin, f-cipermetrin+karbendazim, g-imazalil+karbendazim. Pokusne skupine koje se statistički značajno razlikuju ( $p \leq 0,05$ ) jedna od druge označene su u posljednjem redu slovima od a- g.

### 4.3. Učinak imazalila, cipermetrina, karbendazima i njihovih kombinacija na aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u timusu, slezeni i poplitealnom limfnom čvoru.

Slika 15 prikazuje učinak imazalila, cipermetrina, karbendazima i njihovih kombinacija na aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u timusu. Ni u jednoj pokusnoj skupini u odnosu na kontrolnu ni kod muških ni kod ženskih miševa nije došlo do statistički značajnih ( $p \leq 0,05$ ) promjena u aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) u timusu.



Slika 15. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u timusu po spolovima u pokusnih skupina miševa.

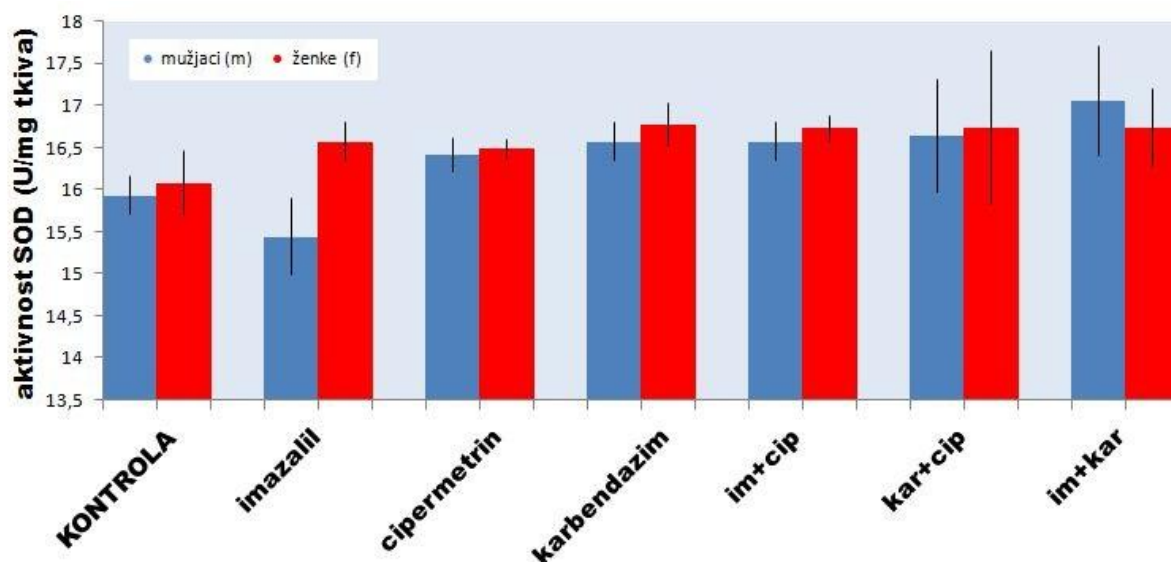
Tablica 12. Učinak imazalila, cipermetrina, karbendazima i njihovih kombinacija na aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u timusu po spolovima u pokusnih skupina miševa.

	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f
	KONTROLA		imazalil		cipermetrin		karbendazim		im+cip		kar+cip		im+kar	
srednja vrijednost	14,8	14,15	14,96	14,15	14,8	14,15	15,6	13,83	13,99	13,99	14,96	15,44	16,73	16,57
standardna devijacija	0,15	0,21	0,23	0,2	0,22	0,18	0,68	0,32	0,68	0,23	0,68	0,2	0,46	0,68
statistički različito	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\*Slova prikazuju tretirane skupine; a-kontrola, b-imazalil, c-cipermetrin, d-karbendazim, e-imazalil+cipermetrin, f-cipermetrin+karbendazim, g-imazalil+karbendazim. Pokusne skupine koje se statistički značajno razlikuju ( $p \leq 0,05$ ) jedna od druge označene su u posljednjem redu slovima od a- g.



Slika 16 prikazuje učinak imazalila, cipermetrina, karbendazima i njihovih kombinacija na aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u slezeni. Ni u jednoj pokusnoj skupini u odnosu na kontrolnu ni kod muških ni kod ženskih miševa nije došlo do statistički značajnih ( $p \leq 0,05$ ) promjena u aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) u slezeni. Sve ostale statistički značajne razlike između pokusnih skupina prikazane su u Tablici 13 i na Slici 16.



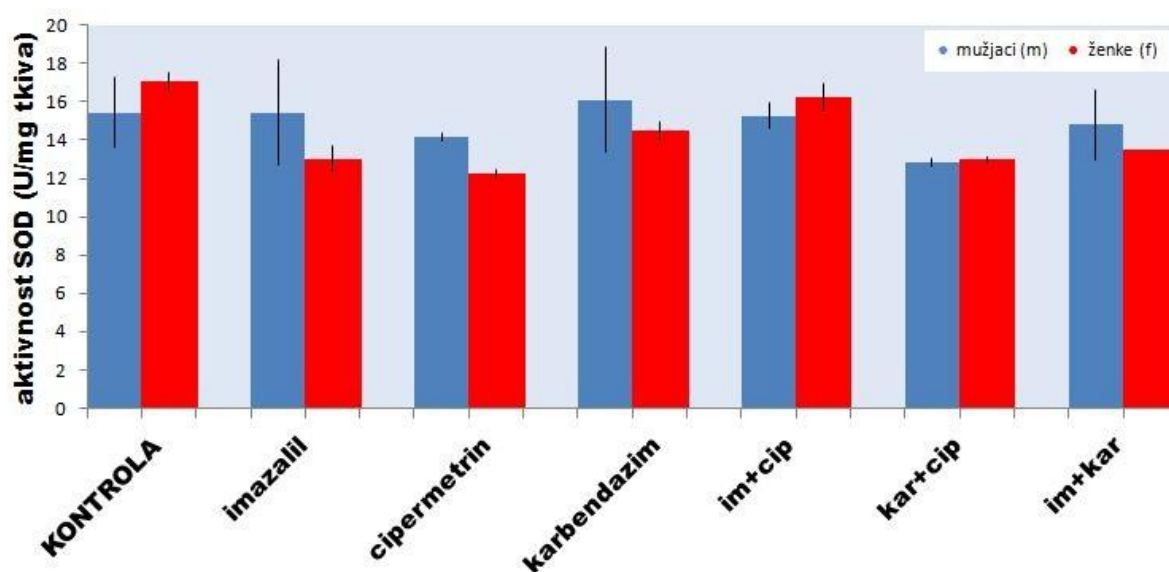
Slika 16. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u slezeni po spolovima u pokusnih skupina miševa.

Tablica 13. Učinak imazalila, cipermetrina, karbendazima i njihovih kombinacija na aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u slezeni po spolovima u pokusnih skupina miševa.

	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f
	KONTROLA		imazalil		cipermetrin		karbendazim		im+cip		kar+cip		im+kar	
srednja vrijednost	15,93	16,08	15,44	16,57	16,41	16,48	16,57	16,77	16,57	16,73	16,63	16,73	17,06	16,73
standardna devijacija	0,23	0,38	0,46	0,23	0,2	0,12	0,23	0,25	0,23	0,15	0,67	0,91	0,65	0,46
statistički različito	-	-	d,g	-	-	-	b	-	-	-	g	-	a,b,f	-

\*Slova prikazuju tretirane skupine; a-kontrola, b-imazalil, c-cipermetrin, d-karbendazim, e-imazalil+cipermetrin, f-cipermetrin+karbendazim, g-imazalil+karbendazim. Pokusne skupine koje se statistički značajno razlikuju ( $p \leq 0,05$ ) jedna od druge označene su u posljednjem redu slovima od a- g.

Slika 17 prikazuje učinak imazalila, cipermetrina, karbendazima i njihovih kombinacija na aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u poplitealnom limfnom čvoru. Kod muških miševa ni u jednoj pokusnoj skupini u odnosu na kontrolnu nije došlo do statistički značajne ( $p \leq 0,05$ ) razlike u aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) u poplitealnom limfnom čvoru. Kod ženskih miševa je u skupinama izloženim imazalilu i cipermetrinu u odnosu na kontrolnu skupinu došlo do statistički značajnog ( $p \leq 0,05$ ) smanjenja aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) u poplitealnom limfnom čvoru. Sve ostale statistički značajne razlike između pokusnih skupina prikazane su u Tablici 14 i na Slici 17.



Slika 17. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u poplitealnom limfnom čvoru po spolovima u pokusnih skupina miševa.

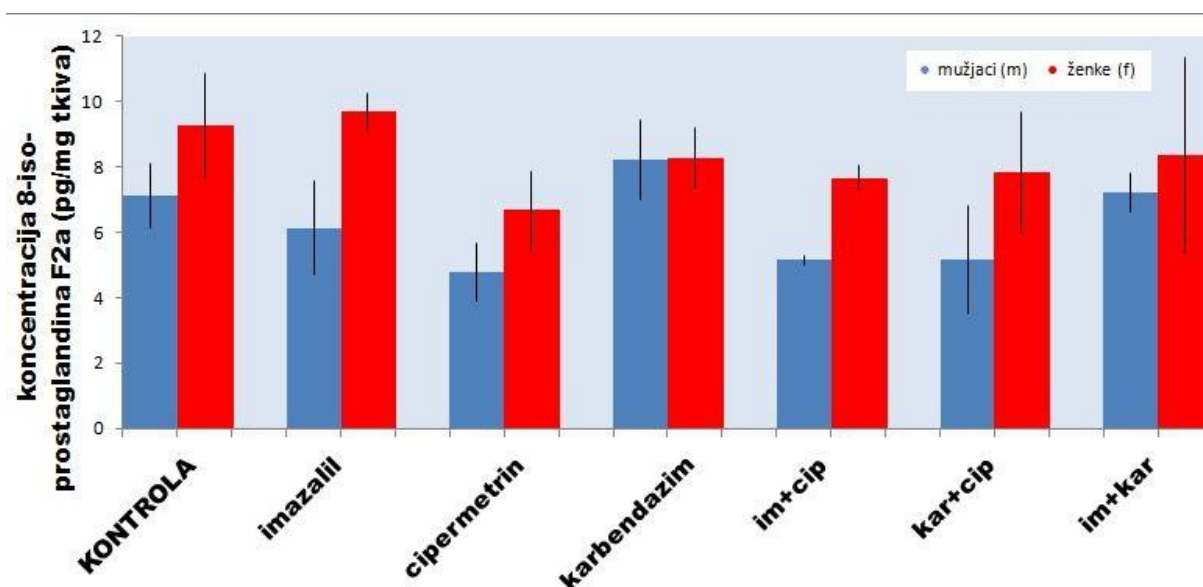
Tablica 14. Učinak imazalila, cipermetrina, karbendazima i njihovih kombinacija na aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u poplitealnom limfnom čvoru po spolovima u pokusnih skupina miševa.

	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f
	KONTROLA		imazalil		cipermetrin		karbendazim		im+cip		kar+cip		im+kar	
srednja vrijednost	15,44	17,06	15,44	13,02	14,15	12,22	16,09	14,48	15,28	16,25	12,86	12,96	14,8	13,51
standardna devijacija	1,83	0,46	2,74	0,68	0,19	0,2	2,74	0,46	0,68	0,68	0,2	0,18	1,83	0
statistički različito	—	b,c	—	a,e	—	a,e	f	—	f	b,c,f,g	d,e	e	—	e

\*Slova prikazuju tretirane skupine; a-kontrola, b-imazalil, c-cipermetrin, d-karbendazim, e-imazalil+cipermetrin, f-cipermetrin+karbendazim, g-imazalil+karbendazim. Pokusne skupine koje se statistički značajno razlikuju ( $p \leq 0,05$ ) jedna od druge označene su u posljednjem redu slovima od a- g.

#### 4.4. Učinak imazalila, cipermetrina, karbendazima i njihovih kombinacija na lipidnu peroksidaciju mjerenjem koncentracije 8-iso-prostaglandina F2 $\alpha$ u timusu, slezeni i poplitealnom limfnom čvoru.

Slika 18 prikazuje učinak imazalila, cipermetrina, karbendazima i njihovih kombinacija na lipidnu peroksidaciju mjerenjem koncentracije 8-iso-prostaglandina F2 $\alpha$  u timusu. Ni u jednoj pokusnoj skupini u odnosu na kontrolnu, i kod muških i kod ženskih miševa, nije došlo do statistički značajne ( $p \leq 0,05$ ) promjene koncentracije 8-iso-prostaglandina F2 $\alpha$  u timusu. Sve ostale statistički značajne razlike među skupinama prikazane su u Tablici 15 i na Slici 18



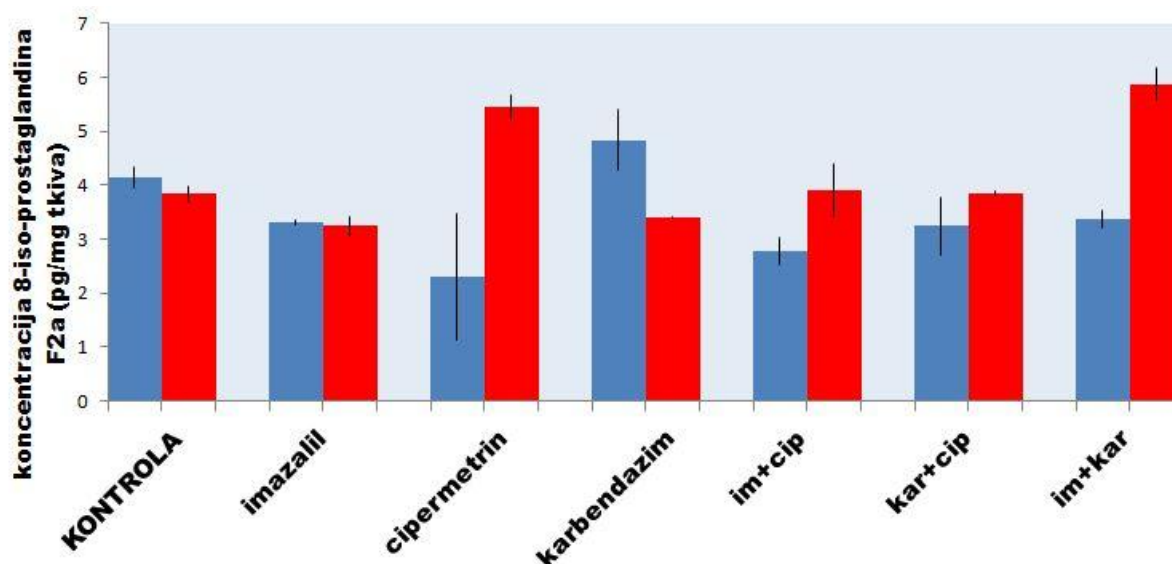
Slika 18. Lipidna peroksidacija mjerena koncentracijom 8-iso-prostaglandina F2 $\alpha$  u timusu po spolovima u pokusnih skupina miševa.

Tablica 15. Učinak imazalila, cipermetrina, karbendazima i njihovih kombinacija na lipidnu peroksidaciju mjerenjem koncentracije 8-iso-prostaglandina F2 $\alpha$  u timusu po spolovima u pokusnih skupina miševa.

	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f
	KONTROLA		imazalil		cipermetrin		karbendazim		im+cip		kar+cip		im+kar	
srednja vrijednost	7,1	9,27	6,13	9,68	4,78	6,67	8,22	8,27	5,16	7,66	5,16	7,82	7,21	8,36
standardna devijacija	0,98	1,61	1,43	0,58	0,88	1,21	1,21	0,95	0,14	0,39	1,64	1,84	0,6	2,97
statistički različito	—	—	—	b	a	b	c,e	—	d	—	—	—	—	c,e

\*Slova prikazuju tretirane skupine; a-kontrola, b-imazalil, c-cipermetrin, d-karbendazim, e-imazalil+cipermetrin, f-cipermetrin+karbendazim, g-imazalil+karbendazim. Pokusne skupine koje se statistički značajno razlikuju ( $p \leq 0,05$ ) jedna od druge označene su u posljednjem redu slovima od a- g.

Slika 19 prikazuje učinak imazalila, cipermetrina, karbendazima i njihovih kombinacija na lipidnu peroksidaciju mjerenjem koncentracije 8-iso-prostaglandina F2 $\alpha$  u slezeni. Kod muških miševa u pokusnim skupinama izloženim cipermetrinu, kombinaciji imazalila i cipermetrina te kombinaciji cipermetrina i karbendazima, u odnosu na kontrolnu skupinu, došlo je do statistički značajnog ( $p \leq 0,05$ ) smanjenja koncentracije 8-iso-prostaglandina F2 $\alpha$  u slezeni. Kod ženskih miševa u pokusnim skupinama izloženim cipermetrinu i kombinaciji imazalila i karbendazima, u odnosu na kontrolnu skupinu, došlo je do statistički značajnog ( $p \leq 0,05$ ) povećanja koncentracije 8-iso-prostaglandina F2 $\alpha$  u slezeni. Sve ostale statistički značajne razlike između pokusnih skupina prikazane su u Tablici 16 i na Slici 19.



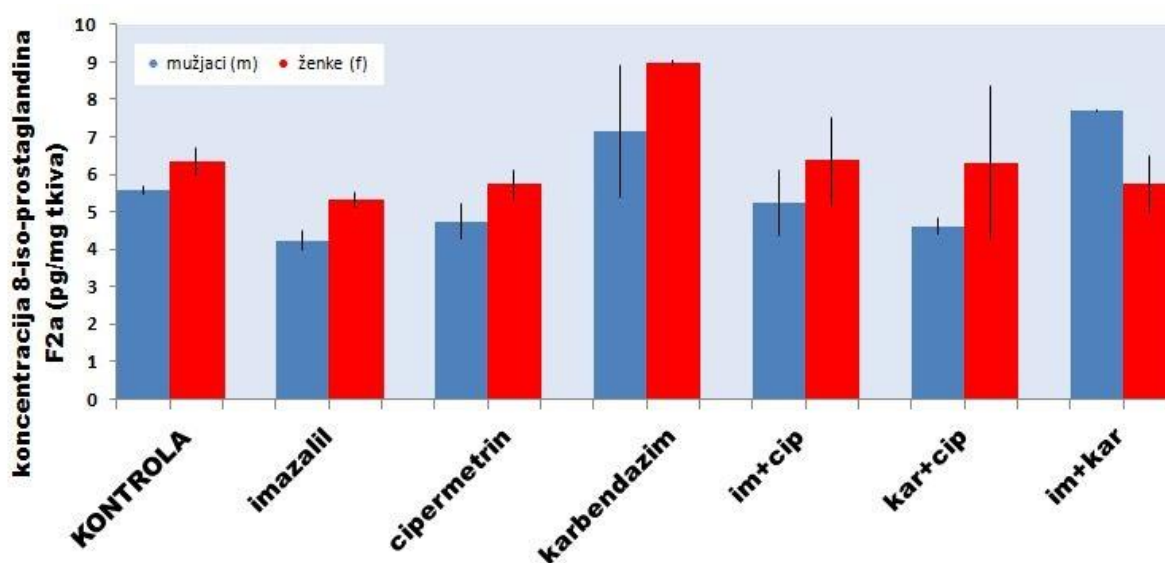
Slika 19. Lipidna peroksidacija mjerena koncentracijom 8-iso-prostaglandina F2 $\alpha$  u slezeni po spolovima u pokusnim skupina miševa.

Tablica 16. Učinak imazalila, cipermetrina, karbendazima i njihovih kombinacija na lipidnu peroksidaciju mjerenjem koncentracije 8-iso-prostaglandina F2 $\alpha$  u slezeni po spolovima u pokusnih skupina miševa.

	m		f		m		f		m		f		m		f	
	KONTROLA		imazalil		cipermetrin		karbendazim		im+cip		kar+cip		im+kar			
srednja vrijednost	4,14	3,84	3,31	3,24	2,3	5,46	4,84	3,4	2,77	3,9	3,24	3,85	3,37	5,88		
standardna devijacija	0,19	0,15	0,05	0,18	1,17	0,21	0,55	0,02	0,25	0,48	0,54	0,04	0,16	0,3		
statistički različito	c,e,f	c,g	c,d	c	a,b,d,f,g	a,b,d,e,f	b,c,e,f,g	c,g	a,d	c,g	a,c,d	c,g	c,d	a,b,d,e,f		

\*Slova prikazuju tretirane skupine; a-kontrola, b-imazalil, c-cipermetrin, d-karbendazim, e-imazalil+cipermetrin, f-cipermetrin+karbendazim, g-imazalil+karbendazim. Pokusne skupine koje se statistički značajno razlikuju ( $p \leq 0,05$ ) jedna od druge označene su u posljednjem redu slovima od a- g.

Slika 20 prikazuje učinak imazalila, cipermetrina, karbendazima i njihovih kombinacija na lipidnu peroksidaciju mjerenjem koncentracije 8-iso-prostaglandina F2 $\alpha$  u poplitealnom limfnom čvoru. Kod muških miševa, skupina koja je izložena kombinaciji imazalila i karbendazima, u odnosu na kontrolnu skupinu, imala je statistički značajno ( $p \leq 0,05$ ) višu koncentraciju 8-iso-prostaglandina F2 $\alpha$  u poplitealnom limfnom čvoru. Kod ženskih miševa, u odnosu na kontrolnu skupinu, došlo je do statistički značajnog ( $p \leq 0,05$ ) povećanja koncentracije 8-iso-prostaglandina F2 $\alpha$  u poplitealnom limfnom čvoru u pokusnoj skupini izloženoj karbendazimu. Sve ostale statistički značajne razlike između pokusnih skupina prikazane su u Tablici 17 i na Slici 20.



Slika 20. Lipidna peroksidacija mjerena koncentracijom 8-iso-prostaglandina F2 $\alpha$  u poplitealnom limfnom čvoru po spolovima u pokusnih skupina miševa.

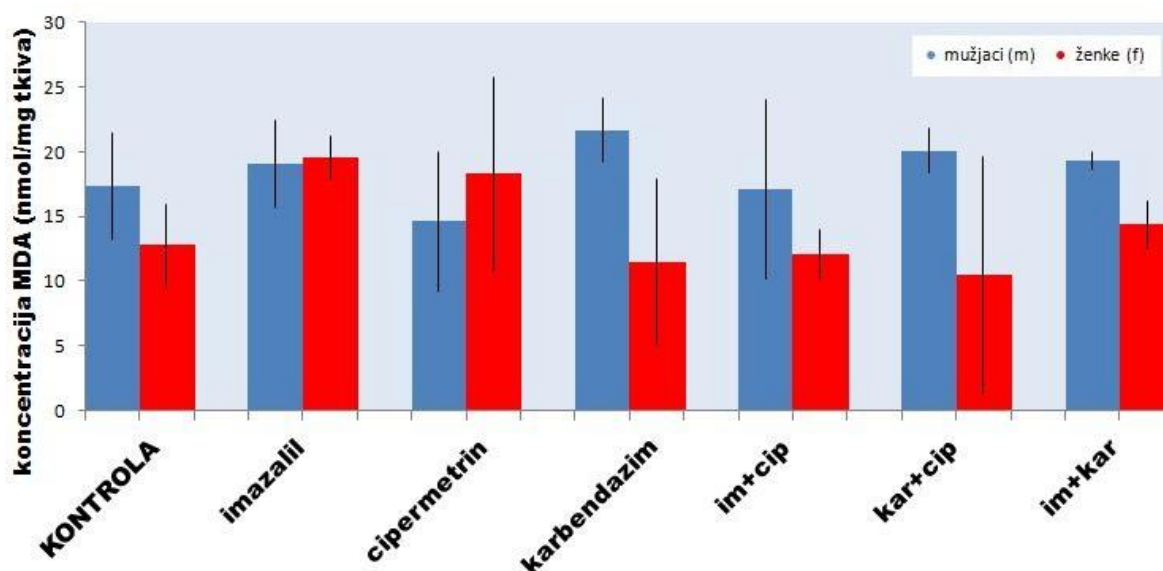
Tablica 17. Učinak imazalila, cipermetrina, karbendazima i njihovih kombinacija na lipidnu peroksidaciju mjerenjem koncentracije 8-iso-prostaglandina F2 $\alpha$  u poplitealnom limfnom čvoru po spolovima u pokusnih skupina miševa.

	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f
	KONTROLA		imazalil		cipermetrin		karbendazim		im+cip		kar+cip		im+kar	
srednja vrijednost	5,59	6,34	4,24	5,31	4,75	5,73	7,14	8,97	5,24	6,37	4,61	6,32	7,7	5,76
standardna devijacija	0,11	0,36	0,25	0,2	0,47	0,37	1,77	0,06	0,87	1,14	0,21	2,02	0,02	0,74
statistički različito	g	d	d,g	d	d,g	d	b,c,e,f	a,b,c,e,f,g	d,g	d	d,g	b	a,b,c,e	d

\*Slova prikazuju tretirane skupine; a-kontrola, b-imazalil, c-cipermetrin, d-karbendazim, e-imazalil+cipermetrin, f-cipermetrin+karbendazim, g-imazalil+karbendazim. Pokusne skupine koje se statistički značajno razlikuju ( $p \leq 0,05$ ) jedna od druge označene su u posljednjem redu slovima od a- g.

## 4.5. Učinak imazalila, cipermetrina, karbendazima i njihovih kombinacija na lipidnu peroksidaciju mjerenjem količine malonildialdehida (MDA) u timusu, slezeni i poplitealnom limfnom čvoru.

Slika 21 prikazuje učinak imazalila, cipermetrina, karbendazima i njihovih kombinacija na lipidnu peroksidaciju mjerenjem količine malonildialdehida (MDA) u timusu. U svim pokusnim skupinama, u usporedbi s kontrolnom skupinom, i kod muških i kod ženskih miševa, nije došlo do statistički značajnih ( $p \leq 0,05$ ) razlika u količini malonildialdehida (MDA) u timusu.



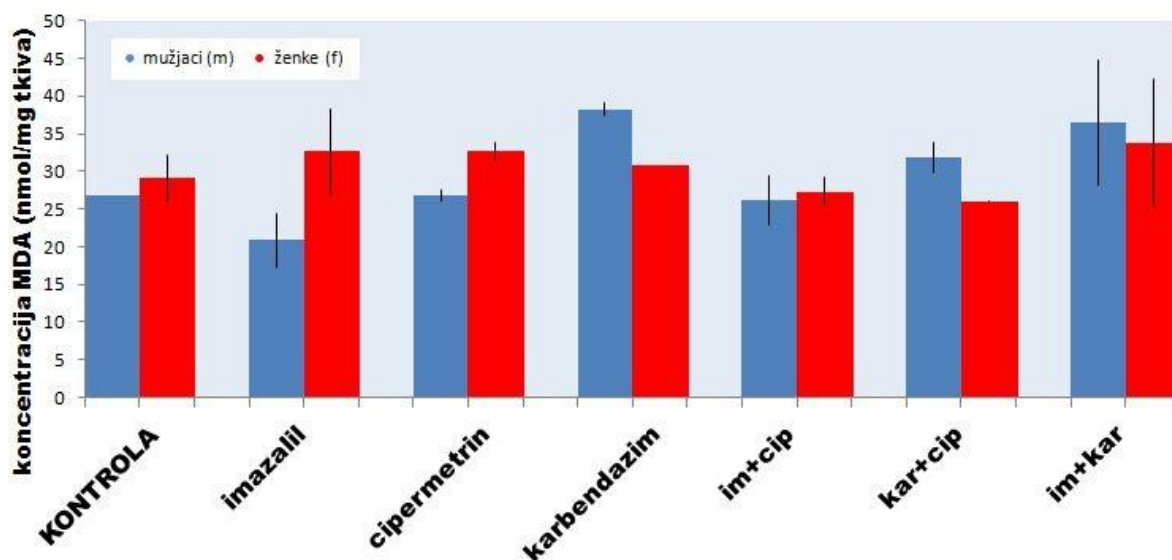
Slika 21. Lipidna peroksidacija mjerena količinom malonildialdehida (MDA) u timusu po spolovima u pokusnih skupina miševa.

Tablica 18. Učinak imazalila, cipermetrina, karbendazima i njihovih kombinacija na lipidnu peroksidaciju mjerenjem količine malonildialdehida (MDA) u timusu po spolovima u pokusnih skupina miševa.

	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f
	KONTROLA		imazalil		cipermetrin		karbendazim		im+cip		kar+cip		im+kar	
srednja vrijednost	17,31	12,79	19,08	19,52	14,59	18,3	21,69	11,45	17,1	12,04	20,1	10,48	19,28	14,35
standardna devijacija	4,1	3,2	3,4	1,7	5,4	7,5	2,4	6,4	6,9	1,9	1,7	9,1	0,7	1,8
statistički različito	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\*Slova prikazuju tretirane skupine; a-kontrola, b-imazalil, c-cipermetrin, d-karbendazim, e-imazalil+cipermetrin, f-cipermetrin+karbendazim, g-imazalil+karbendazim. Pokusne skupine koje se statistički značajno razlikuju ( $p \leq 0,05$ ) jedna od druge označene su u posljednjem redu slovima od a- g.

Slika 22 prikazuje učinak imazalila, cipermetrina, karbendazima i njihovih kombinacija na lipidnu peroksidaciju mjerenjem količine malonildialdehida (MDA) u slezeni. Kod muških miševa je u odnosu na kontrolnu skupinu došlo do statistički značajnog ( $p \leq 0,05$ ) smanjenja količine malonildialdehida (MDA) u slezeni kod skupina izloženih cipermetrinu, kombinaciji imazalila i cipermetrina te kombinaciji karbendazima i cipermetrina. Kod ženskih miševa je u odnosu na kontrolnu skupinu došlo do statistički značajnog ( $p \leq 0,05$ ) povećanja količine malonildialdehida (MDA) u slezeni kod skupina izloženih cipermetrinu i kombinaciji imazalila i karbendazima. Sve ostale statistički značajne razlike između pokusnih skupina prikazane su u Tablici 19 i na Slici 22.



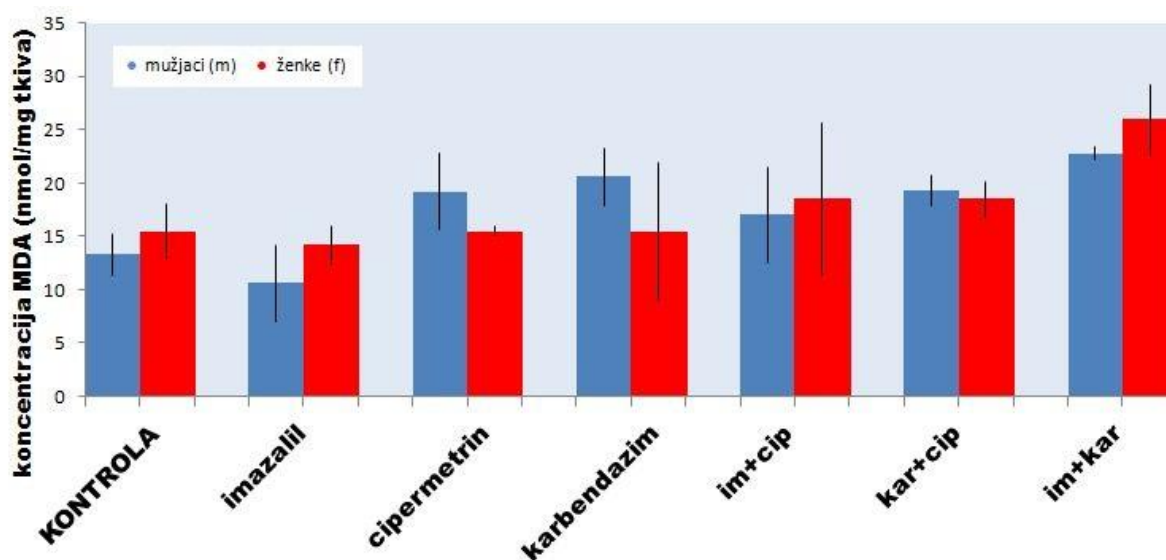
Slika 22. Lipidna peroksidacija mjerena količinom malonildialdehida (MDA) u slezeni po spolovima u pokusnih skupina miševa.

Tablica 19. Učinak imazalila, cipermetrina, karbendazima i njihovih kombinacija na lipidnu peroksidaciju mjerenjem količine malonildialdehida (MDA) u slezeni po spolovima u pokusnih skupina miševa.

	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f
	KONTROLA		imazalil		cipermetrin		karbendazim		im+cip		kar+cip		im+kar	
srednja vrijednost	26,91	29,06	20,82	32,65	26,74	32,67	38,2	30,84	26,25	27,3	31,83	25,91	36,53	33,76
standardna devijacija	0	3,04	3,65	5,68	0,71	1,19	0,83	0	3,28	1,91	1,93	0,07	8,31	8,48
statistički različito	—	—	c	e	b,c,f,g	e	c	—	f	b,c,g	c,e	c	c	e

\*Slova prikazuju tretirane skupine; a-kontrola, b-imazalil, c-cipermetrin, d-karbendazim, e-imazalil+cipermetrin, f-cipermetrin+karbendazim, g-imazalil+karbendazim. Pokusne skupine koje se statistički značajno razlikuju ( $p \leq 0,05$ ) jedna od druge označene su u posljednjem redu slovima od a- g.

Slika 23 prikazuje učinak imazalila, cipermetrina, karbendazima i njihovih kombinacija na lipidnu peroksidaciju mjerenjem količine malonildialdehida (MDA) u poplitealnom limfnom čvoru. Kod muških miševa je u odnosu na kontrolnu skupinu došlo do statistički značajnog ( $p \leq 0,05$ ) povećanja količine malonildialdehida (MDA) u poplitealnom limfnom čvoru kod skupine izložene kombinaciji imazalila i karbendazima. Kod ženskih miševa je u odnosu na kontrolnu skupinu došlo do statistički značajnog ( $p \leq 0,05$ ) povećanja količine malonildialdehida (MDA) u poplitealnom limfnom čvoru kod skupine izložene karbendazimu. Sve ostale statistički značajne razlike između pokusnih skupina prikazane su u Tablici 20 i na Slici 23.



Slika 23. Lipidna peroksidacija mjerena količinom malonildialdehida (MDA) u poplitealnom limfnom čvoru po spolovima u pokusnih skupina miševa.

Tablica 20. Učinak imazalila, cipermetrina, karbendazima i njihovih kombinacija na lipidnu peroksidaciju mjerenjem količine malonildialdehida (MDA) u poplitealnom limfnom čvoru po spolovima u pokusnih skupina miševa.

	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f
	KONTROLA		imazalil		cipermetrin		karbendazim		im+cip		kar+cip		im+kar	
srednja vrijednost	13,3	15,5	10,6	14,2	19,2	15,5	20,6	15,4	17	18,5	19,3	18,5	22,8	26
standardna devijacija	1,9	2,6	3,6	1,8	3,6	0,5	2,7	6,5	4,5	7,1	1,4	1,6	0,6	3,3
statistički različito	d	—	d	—	d	—	a,b,c,e,f,g	—	d	—	d	—	d	—

\*Slova prikazuju tretirane skupine; a-kontrola, b-imazalil, c-cipermetrin, d-karbendazim, e-imazalil+cipermetrin, f-cipermetrin+karbendazim, g-imazalil+karbendazim. Pokusne skupine koje se statistički značajno razlikuju ( $p \leq 0,05$ ) jedna od druge označene su u posljednjem redu slovima od a- g.



## 5. RASPRAVA

Na osnovu provedenog pokusa utvrđeno je da postoji razlika u promjeni koncentracije i aktivnosti promatranih biomarkera između tretiranih i kontrolnih životinja.

Timus i limfni čvor pokazuju sličan opći trend promjena analiziranih biomarkera. Navedene razlike su posljedica različitih vrsta imunskih stanica zastupljenih u pojedinom organu.

Zabilježeni porast aktivnosti SOD-a u slezeni mogao bi se tumačiti tako da u slezeni ima više fagocitnih stanica koje prirodno nakon pobuđivanja patogenom proizvode reaktivne kisikove vrste (npr. vodikov peroksid) kao mehanizam uništavanja patogena nakon fagocitoze. Povećanje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) u stanicama slezene, ukazuje na moguće djelovanje pesticida na način da aktiviraju biokemijske putove za sintezu reaktivnih kisikovih vrsta (npr. superoksid radikal).

Obrnuto, u limfnim čvorovima i timusu gdje se nalaze uglavnom limfociti, zabilježen je trend smanjenja aktivnosti superoksid dismutaze pod utjecajem pesticida, što znači da djelovanjem ova tri otrova i njihovih kombinacija najvjerojatnije dolazi do izravne inhibicije ovog enzima. Iako je u limfnom čvoru uočen trend smanjenja aktivnosti superoksid dismutaze u odnosu na kontrolu pod utjecajem pesticida, dok se aktivnost katalaze povećava, što ukazuje na to da se vodikov peroksid u stanicama ne stvara radom superoksid dismutaze već najvjerojatnije nekim drugim biosintetskim putevima za što bi trebalo provesti daljnja istraživanja.

U skoro svim tretiranim skupinama dolazi do smanjenja koncentracije reduciranog glutaciona u odnosu na kontrolu. Može se pretpostaviti da je to posljedica oksidacije raspoloživog reduciranog glutaciona (GSH) u svrhu detoksikacije i obrane od oksidativnih radikala. Naime poznato je da glutacion sudjeluje u procesima FAZE II biotransformacije ksenobiotika u organizmu. U tom se biokemijskom procesu molekula ksenobiotika veže na –SH skupinu aminokiseline cisteina u glutationu

najčešće u hepatocitima u jetri ali i u svim drugim stanicama u organizmu. Takav kompleks glutaciona i molekule ksenobiotika izlučuje se u krv i odlazi u bubrege. U bubregu se u nizu reakcija odvajaju aminokiseline glicin i glutamin, a kompleks cisteina i ksenobiotika izlučuje se mokraćom u obliku merkapturnih kiselina (kompleksi sa cisteinom) (Cooper i Hanigan 2010).

Budući da se konjugirani glutation izlučuje iz stanica njegova se koncentracija u stanicama i tkivima smanjuje. Na temelju rezultata pretpostavljamo da se ovaj proces zbiva i u stanicama analiziranih tkiva. Međutim poznato je da određeni ksenobiotici mogu inducirati transkripciju i sintezu pojedinih detoksikacijskih i antioksidativnih molekula *de novo* u stanici (Bucheli i Fent 1995).

Od svih tretiranih skupina, u timusu i limfnom čvoru u skupini tretiranoj karbendazimom dolazi do statistički značajnog povećanja koncentracije reduciranog glutaciona u odnosu na kontrolu što upućuje na to da karbendazim pojačano inducira biosintezu reduciranog glutaciona. Slično je zabilježeno i za koncentraciju malonildialdehida (MDA), markera lipidne peroksidacije, koji uglavnom blago raste, ali se ne mijenja značajno ni u jednoj skupini, osim u skupini izloženoj karbendazimu gdje u limfnom čvoru kod mužjaka dolazi do statistički značajnog porasta koncentracije malonildialdehida u odnosu na kontrolu što ukazuje na vrlo pojačan proces lipidne peroksidacije tj. većeg oštećenja membrane nego kod ostalih skupina. Koncentracija 8-iso prostaglandin F<sub>2α</sub> se statistički značajno smanjuje u odnosu na kontrolu u slezeni kod mužjaka u skupinama izloženim cipermetrinu i kombinacijama s cipermetrinom (imazalil+cipermetrin i karbendazim+cipermetrin).

Moguće je da cipermetrin sam i u kombinacijama uzrokuje pojačano izlučivanje ovog markera u urin jer u tim skupinama dolazi do smanjenja koncentracije ovog spoja. U slezeni cipermetrin kod mužjaka statistički značajno smanjuje, a kod ženki statistički značajno povećava koncentracija prostaglandina. S obzirom da je ova molekula prostaglandina ujedno i signalna molekula u imunomodulaciji ali i u fiziologiji reproduktivnog sustava pogotovo u fiziološkim mehanizmima kontrakcije maternice (Romero-Salinas i sur. 1974), ovaj podatak ukazuje na potrebu za daljnjim istraživanjima procesa endokrine disrupcije ovih pesticida.

Generalno možemo reći da pesticidi korišteni u ovom radu uzrokuju promjene koncentracije i aktivnosti promatranih biomarkera koje upućuju na oksidacijski stres.

Karbendazim se među ostalim pesticidima i kombinacijama pesticida ističe po sposobnosti indukcije oksidativnog stresa u imunosnim organima.

## 6. ZAKLJUČCI

---

1. Pesticidi korišteni u ovom radu uzrokuju promjene koncentracije i aktivnosti promatranih biomarkera koje upućuju na oksidacijski stres.
2. Timus i limfni čvorovi pokazuju sličan trend promjene biomarkera u odnosu na slezenu. To je posljedica zastupljenosti sličnih vrsta stanica u timusu i limfnom čvoru.
3. Imazalil u timusu gotovo uopće ne utječe na promjene koncentracije i aktivnosti promatranih biomarkera.
4. Karbendazim se među ostalim pesticidima i kombinacijama pesticida ističe pojačanom indukcijom sinteze reduciranog glutationa u timusu i limfnom čvoru, te statistički značajnim povećanjem aktivnosti katalaze u limfnom čvoru koja ukazuje na pojačano stvaranje reaktivne kisikove vrste vodikovog peroksida. Osim toga karbendazim statistički značajno u odnosu na kontrolu u limfnom čvoru povećava koncentracije biomarkera lipidne peroksidacije, što ukazuje na oštećenje membrana.

## 7. LITERATURA

Advisory Committee on Pesticides (1992): Evaluation of Fully Approved or Provisionally Approved Products, No 58. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food.

Agnihotri N. P., Jain H. K., Gajbhiye V. T. (1986): Persistence of some synthetic pyrethroid insecticides in soil, water and sediment, Part I. Journal of the Entomological Research 10(2): 147-151.

Bagnasco M., Camoirano A., De Flora S., Melodia F., Arillo A. (1991): Enhanced liver metabolism of mutagens and carcinogens in fish living in polluted seawater. Mutation Research. 262: 129-137.

Belanger A., Vincent C., de Oliveira D. (1990): A field study on residues of four insecticides used in strawberry protection. Journal of Environmental Science and Health. 25(5): 615-625

Bradbury S. P., Coats J. R. (1989): Toxicokinetics and toxicodynamics of pyrethroid insecticides in fish. Environmental Toxicology and Chemistry. 8: 373-380.

Bucheli T. D., Fent K. (1995): Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. Critical Reviews in Environmental Science and Technology. 25: 201-268.

Chauhan R. S., Singhal L. (2006): Harmful effects of pesticides and their control through cowpathy. International Journal of Cow Science. 2(1): 61-70.

Coban T. A., Beydemir S., Gulcin I., Ekinici D. (2008): The inhibitory effect of ethanol on Carbonic Anhydrase isoenzymes: an in vivo and in vitro study. Journal of Enzyme Inhibition and Medical Chemistry. 23: 266-270.

Commission of the European Communities (1999): Community strategy for endocrine disruptors, a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife. COM 706.

Cooper A. J. L., Hanigan M. H. (2010): Enzymes involved in processing glutathione conjugates. Comprehensive toxicology. 4: 323-366

Descotes J. (1988): Immunotoxicology of drugs and chemicals. Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division) Int. 189.

Edwards I. R., Ferry D. G., Temple W. A. (1991): Fungicides & related compounds. Handbook of Pesticide Toxicology. 3(21): 1409-1470

Ekinci D., Beydemir S. (2010): Risk assessment of pesticides and fungicides for acid-base regulation and salt transport in rainbow trout tissues. Pesticide Biochemistry and Physiology. 97: 66-70.

EPA - Health effects test guidelines OPPTS 870.7800. Immunotoxicity. Public Draft EPA 712-C-96-351, USA, 1996.

European Commission (1991): Preliminary opinion of the scientific committee on plants regarding the evaluation of benomyl, carbendazim and the thiophanate-methyl in the context of council directive 91/414/EEC concerning the placing of the plant protection products on the market. Scientific Committee on Plants.

EXTOXNET (2006;1996): The Extension Toxicology Network, <http://extoxnet.orst.edu/pips/carbofuran.htm>

Food and agriculture organization of the United Nations (1977): Pesticide residues in food. FAO Plant Production and Protection Paper 10. 10-42.

Food and agriculture organization of United Nations (1985): Pesticide residues in food. FAO Plant Production and Protection Paper 72/2. 10-43.

Friends of the Earth (2000): Press release: Hormone disrupting chemicals found in baby food.

Friends of the Earth (2001): Endocrine disrupting pesticides – European priority list. [www.foe.co.uk/resource/briefings/endocrine\\_european\\_list.pdf](http://www.foe.co.uk/resource/briefings/endocrine_european_list.pdf)

Friends of the Earth (2001): Press release 28 February 2001 and Pesticide Residues Committee First Quarterly report 2001

Friends of the Earth (2001): Press release 01 July 2001 and Pesticide Residues Committee Quarterly reports 2000.

Friends of the Earth (2001): Press release: National Diet Survey

Garcia P. C., Ruiz J. M., Rivero R. M., Lopez-Levebre L. R., Sanchez E., Romero L. (2002): Is the application of carbendazim harmful to healthy plants? Evidence of weak phytotoxicity in tobacco. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(2): 279-283.

Harris C. R., Chapman R. A., Harris C. (1981): Laboratory studies on the persistence and behavior in soil of four pyrethroid insecticides. *Canadian Entomologist*. 113: 685-94.

Helweg A. (1983): Mikrobiologisk Nedbrydning og effekt af maleinhydrazid, carbendazim og 2-aminobenzimidazol i jord. Statens planteavisforog plantevaernscentret.

Hicks B. (1998): Generic pesticides – the products and markets. Agrow Reports. PJB Publications.

Institoris L., Siroko O., Undeger U., Desi I., Nagymajtanyi L. (1999): Immunotoxicological effects of repeated combined exposure by cypermethrin and the heavy metals lead and cadmium in rats. *International Journal of Immunoharmacology*. 21: 735-743.

Jacobsen H., Ostergaard G., Lam H. R., Poulsen M. E., Frandsen H., Ladefoged O., Meyer O. (2004): Repeated dose 28-day oral toxicity study in Wistar rats with a mixture of five pesticides often found as residues in food: alphacypermethrin, bromopropylate, carbendazim, chlorpyrifos and mancozeb. *Food and Chemical Toxicology* . 42(8): 1269-1277.

Jin Y., Wang L., Ruan M., Liu J., Yang Y., Zhou C., Xu B., Fu Z. (2011): Cypermethrin exposure during puberty induces oxidative stress and endocrine disruption in male mice. *Chemosphere*. 84(1): 124-30.

Jin Y., Zheng S., Fu Z. (2011): Embryonic exposure to cypermethrin induces apoptosis and immunotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*. 82(3): 398-404.

Journal of Medicinal Plants Research (1995): Monographs, Carbendazim. Pesticides residues in food. Evaluations Part II Toxicological and Environmental. <http://www.pan-uk.org/pestnews/Actives/www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v95pr.19.htm>

Kidd H., James D. R. (1991): The Agrochemicals Handbook, Third Edition. Royal Society of Chemistry Information Services, Cambridge, UK.

Krishna G., Hayashi M. (2000): *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. Mutation Research. 455: 155-166.

Mahmood R., Parry J. M. (2001): Induction of micronuclei and chromosome non-disjunction after short-term exposure to carbendazim in cultured human lymphocytes. 31st annual meeting of the EEMS. Ghent, Belgium.

Manna S., Bhattacharyya D., Basak D. K., Mandal T. K. (2003): Single oral dose toxicity study of  $\alpha$ -cypermethrin in rats. Indian Journal of Pharmacology. 36(1): 25-8.

Manna S., Bhattacharyya D., Mandal T. K., Das S. (2006): Sub-Chronic Toxicity Study of Alfa-Cypermethrin in Rats. Iranian journal of Pharmacology & Therapeutics. 5(2): 163-166.

Mantovani A., Maranghi F., Ricciardi C., Macri C., Stazi A. V., Attias L., Zapponi G. A. (1998): Developmental toxicity of carbendazim: Comparison of no-observed-adverse-effect level and benchmark dose approach. Food and Chemical Toxicology. 36: 37-45.

Marnett L. J. (1999): Chemistry and biology of DNA damage by malondialdehyde. IARC Sci. Publ. 150: 17-27.

Monitoring of Pesticide Residues in Products of Plant Origin in the European Union and Norway Report 1997.

[http://europa.eu.int/comm/food/fs/inspections/fnaoi/reports/annual\\_eu/fnaoi\\_rep\\_norw\\_1996\\_en.html](http://europa.eu.int/comm/food/fs/inspections/fnaoi/reports/annual_eu/fnaoi_rep_norw_1996_en.html).

Moser T., Rombke R. (2002): Effects of Carbendazim on the abundance of the Encytraeid genera Achaeta; Enchytraeus and Fridericia in Terrestrial Model Systems and in the field. Fifth International Colloquium on Enchytraedicae, Wageningen. [www.dow.wau.nl/soil\\_quality/enchycol/moser.htm](http://www.dow.wau.nl/soil_quality/enchycol/moser.htm)

Muir D. C. G., Rawn G. P., Townsend B. E., Lockhart W. L., Greenhalgh R. (1985): Bioconcentration of cypermethrin, deltamethrin, fenvalerate and permethrin by



Chironomus tentans larvae in sediment and water. Environmental Toxicology and Chemistry. 4: 51-61.

Oruc E. O., Uner N. (2000): Combined effects of 2,4-D and azinophosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of Oreochromis niloticus. Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology Pharmacology. 127(3): 291-296.

Paglia D. E., Valentine W. N. (1967): Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathion peroxidase. Journal of Laboratory and Clinical Medicine. 70: 158-169.

Quian Y. (1996): Transformation and expression of the resistance gene to carbendazim in *Trichoderma harzianum*. Resistant Pest Management, Vol.8.

Ray D. E. (1991): Pesticides derived from plants and other organisms. U: Hayes Jr., Wayland, Laws E. R.(ur.) Handbook of Pesticide Toxicology. Academic Press, Inc. New York, NY 2-3

Repetto R., Baliga S. S. (1996): Pesticides and the Immune System: The Public Health Risk. World Resources Inst. 4, 9-15, 18-21, 36-37, 40-49, 56.

Romero-Salinas G., Ramirez-Jimenez D., Garcia-Pena J., Ruiz-Velasco V., Bravo-Sandoval J. (1974): Effect of prostaglandin F2a on the contractility of the pregnant human uterus. Ginecologia y Obstetricia de Mexico. 35(212): 627-656

Sangeetha R. (2010): Activity of superoxide dismutase and catalase in fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) in response to carbendazim. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences. 72(1): 116-118.

Scientific Committee on Plants (2001) Preliminary opinion of the scientific committee on plants regarding the evaluation of benomyl, carbendazim and thiophanate-methylin in the context of council directive 91/414/EEC concerning the placing of the plant protection products on the market.

[http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scp/out98\\_ppp\\_en.html](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scp/out98_ppp_en.html)

Selmanoglu G., Barlas N., Songur S., Kockaya E. A. (2001): Carbendazim induced haematological, biochemical and histopathological changes to the liver and kidney of male rats. *Human and Experimental Toxicology*. 20: 625-30.

Stephensen E., Svavarsson J., Sturve J., Ericson G., Adolfsson-Erici M., Forlin L. (2000): Biochemical indicators of pollution exposure in shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*) caught in four harbours on the southwest coast of Iceland. *Aquatic Toxicology*. 48: 431-442.

Stockholmska konvencija o postojanim organskim onečišćujućim tvarima. M.U. 11/06, 2/07. [http://narodne-novine.nn.hr/clanci/medunarodni/2006\\_12\\_11\\_138.html](http://narodne-novine.nn.hr/clanci/medunarodni/2006_12_11_138.html)

Tomlin C. D. S. (2000): The Pesticide Manual 12th Edition. British Crop Protection Council.

US Environmental Protection Agency (1989) Pesticide Fact Sheet Number 199: Cypermethrin. Office of Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC. 2-9.

US Environmental protection Agency (2007) What is a pesticide?  
<http://www.epa.gov/pesticides/about/index.htm>

US National Library of Medicine (1995) Hazardous Substances DataBank. Bethesda, MD. 2-24.

Voccia I., Blakley B., Brousseau P., Fournier M. (1999): Immunotoxicity of pesticides: a review. *Toxicology and Industrial Health*. 15: 119-132.

Wallace-Hayes A. (2001): Principles and methods of toxicology. Taylor & Francis Inc. 77-137, 243-285, 285-365, 917-959, 1415-1415.

Waller G. D. (1988): Pyrethroid residues and toxicity to honeybees of selected pyrethroid formulations applied to cotton in Arizona. *Journal of Economic Entomology*. 81(4): 1022-6.

Wauchope R. D., Buttler T. M., Hornsby A. G., Augustijn Beckers P. W. M., Burt J. P. (1992): SCS/ARS/CES Pesticide properties database for environmental decisionmaking. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 123: 1-157.

Westcott N. D., Reichle R. A. (1987): Persistence of deltamethrin and cypermethrin on wheat and sweet clover, Part B. Journal of Environmental Science and Health. 22(1): 91-101.

Whang Z. H., Nie X. P., Yue W. J., Li X. (2011): Physiological responses of three marine microalgae exposed to cypermethrin. Wiley Periodicals Inc.

WHO (1999) Recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 1998-1999. International Programme on Chemical Safety.

Zakon o dobrobiti laboratorijskih žvotinja . NN 19/99.

Zar HJ (1999) Biostatistical Analysis. Prentice Hall, New Jersey. 368.