

# Utjecaj alfa-cipermetrina i imidakloprida na oksidacijski stres u testisu i epididimisu štakora Wistar

---

Jančec, Antonija

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:217:824319>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-11**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

**Antonija Jančec**

**UTJECAJ  $\alpha$ -CIPERMETRINA I IMIDAKLOPRIDA NA  
OKSIDACIJSKI STRES U TESTISU I EPIDIDIMISU  
ŠTAKORA WISTAR**

**Diplomski rad**

Zagreb, 2020.

Ovaj rad, izrađen u Jedinici za analitičku toksikologiju i mineralni metabolizam Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Blanke Tariba Lovaković i pod suvoditeljstvom prof. dr. sc. Domagoja Đikića sa Zavoda za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar/magistra edukacije biologije i kemije.

Rezultati ovoga rada dio su znanstveno-istraživačkog projekta OPENTOX (Organska zagađivala u okolišu – markeri i biomarkeri toksičnosti, HrZZ IP-2013-11-8366).

## ZAHVALA

---

*Iskreno se i od srca zahvaljujem mentorici dr. sc. Blanki Tariba Lovaković na velikodušnoj i nesebičnoj pomoći, savjetima, uputama i motivaciji tijekom provođenja eksperimentalnog dijela te tijekom pisanja diplomskog rada. Zahvaljujući Vama proces izrade diplomskog rada bio mi je ugodno iskustvo koje će mi ostati u lijepom sjećanju!*

*Zahvaljujem suvoditelju prof. dr. sc. Domagoju Đikiću na pomoći i suradnji.*

*Zahvaljujem se svim djelatnicima Jedinice za analitičku toksikologiju i mineralni metabolizam Instituta za medicinska istraživanja na gostoprimstvu, poticajnoj radnoj atmosferi i pomoći.*

*Hvala mojoj profesorici i mentorici doc. dr. sc. Žaklin Lukša zahvaljujući čijem sam entuzijazmu i pristupu zavoljela i odabrala nastavničku profesiju za svoje zvanje.*

*Hvala svim mojim prijateljima i kolegama s kojima sam dijelila suze i smijeh i koji su svojim društvom i podrškom obogatili ove nezaboravne studentske dane.*

*Veliko hvala mojoj obitelji na strpljenju, razumijevanju i potpori kroz cijelo moje obrazovanje i izvan njega, bez vas sve ovo što sam dosad postigla ne bi bilo moguće.*

*Hvala mom Luki na ljubavi, podršci i razumijevanju koje mi pruža svakoga dana.*

---

***„Tvoj pravi protivnik si ti sam. Jedina se stvarna pobjeda zbiva u tvome srcu.“***

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## UTJECAJ $\alpha$ -CIPERMETRINA I IMIDAKLOPRIDA NA OKSIDACIJSKI STRES U TESTISU I EPIDIDIMISU ŠTAKORA WISTAR

Antonija Jančec  
Rooseveltove trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

U današnje vrijeme raste potrošnja novih vrsta insekticida, razvijenih kao zamjena konvencionalnim organofosfatnim insekticidima, kao što su piretroidi ili "zeleni" insekticidi poput  $\alpha$ -cipermetrina i neonikotinoidne tvari poput imidakloprida. Dostupni podaci o njihovom utjecaju na reprodukcijski sustav su oskudni ili preliminarni, a toksičnost niskih koncentracija navedenih insekticida do danas nije detaljno proučena. U ovom je istraživanju ispitan utjecaj  $\alpha$ -cipermetrina i imidakloprida na parametre oksidacijskog stresa primjenom pristupa s više biomarkera na uzorcima tkiva testisa i epididimisa odraslih štakora soja Wistar. Životinje su oralnim putem uzastopno tijekom 28 dana tretirane koncentracijskim razinama insekticida koje se mogu susresti u svakodnevnom životu, izračunatim na temelju nekoliko toksikološki referentnih vrijednosti (0,02 (ADI); 0,15 (OEL); 0,80 (5×OEL); 2,20 (REL) mg  $\alpha$ -cipermetrina/kg t.m./dan i 0,06 (ADI); 0,80 (10×AOEL); 2,25 (1/200 LD<sub>50</sub>) mg imidakloprida/kg t.m./dan). Oba su insekticida uzrokovala značajno smanjenje prirasta mase tretiranih životinja u odnosu na kontrolnu skupinu, ali je manji prosječan prirast mase uočen kod životinja tretiranih  $\alpha$ -cipermetrinom u odnosu na one tretirane imidaklopidom. Životinje tretirane najvišom dozom imidakloprida imale su značajno manju masu testisa u odnosu na kontrolnu skupinu životinja dok tretman  $\alpha$ -cipermetrinom nije utjecao na promjenu mase testisa i epididimisa. Značajan porast aktivnosti enzima glutation peroksidaze (GPx) u testisu uzrokovao je  $\alpha$ -cipermetrin pri najvišoj primijenjenoj dozi. Tretman  $\alpha$ -cipermetrinom ili imidaklopidom rezultirao je značajnim porastom koncentracije glutationa (GSH) i aktivnosti antioksidacijskih enzima GPx-a i bakar, cink-ovisne superoksid dismutaze (CuZnSOD) u epididimisu. Tretman  $\alpha$ -cipermetrinom uzrokovao je veći porast koncentracije GSH u tretiranih životinja u usporedbi s imidaklopidom, ali je porast aktivnosti GPx-a bio znatno manji nego kod tretmana imidaklopidom. Aktivnost CuZnSOD-a imala je sličan porast u odnosu na kontrolnu skupinu kod oba tretmana.

(62 stranice, 22 slike, 5 tablica, 5 priloga, 131 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: pesticidi, piretroidi, neonikotinoidi, antioksidansi

Voditelj rada: Dr. sc. Blanka Tariba Lovaković, znan. sur.

Suvoditelj rada: Dr. sc. Domagoj Đikić, red. prof.

Ocjenitelji: 1. Dr. sc. Domagoj Đikić, red. prof.  
2. Dr. sc. Ines Radanović, red. prof.  
3. Dr. sc. Iva Juranović Cindrić, red. prof.  
4. Dr. sc. Nenad Judaš, izv. prof.

Rad prihvaćen: 18. lipnja 2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Graduation Thesis

### **EFFECTS OF $\alpha$ -CYPERMETHRINE AND IMIDACLOPRID ON OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IN TESTES AND EPIDIDYMISS OF WISTAR RATS**

Antonija Jančec  
Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The use of pyrethroids such as  $\alpha$ -cypermethrine, and neonicotinoid insecticides like imidacloprid has been increasing during the past decade accompanied by the decline in use of organophosphate pesticides. There are several reports indicating adverse health effects of  $\alpha$ -cypermethrine and imidacloprid. However, data on their effect on the reproductive system are scarce or preliminary, and the toxicity of low concentrations of these insecticides has not been studied to date. The effects of  $\alpha$ -cypermethrine and imidacloprid exposure on oxidative stress biomarkers in testes and epididymis were studied in adult male Wistar rats treated with doses comparable to currently proposed health-based reference values. Rats were orally administered with  $\alpha$ -cypermethrine (0,02 (ADI); 0,15 (OEL); 0,80 (5 $\times$ OEL); 2,20 (REL) mg/kg b.w./day) or imidacloprid (0,06 (ADI); 0,80 (10 $\times$ AOEL); 2,25 (1/200 LD<sub>50</sub>) mg/kg b.w./day) for 28 consecutive days. The results revealed that exposure to  $\alpha$ -cypermethrine or imidacloprid significantly decreased body weight gain in treated groups compared to the control group. However, the average decrease was lesser in animals treated with  $\alpha$ -cypermethrine, in comparison with those treated with imidacloprid. The weight of testes was significantly lower in animals treated with the highest dose of imidacloprid compared to controls, while treatment with  $\alpha$ -cypermethrine had no effect on testicular/epididymal weight. Present results revealed that treatment with  $\alpha$ -cypermethrine resulted in a statistically significant increase of glutathione peroxidase (GPx) activity in testes at the highest applied dose. Treatment with  $\alpha$ -cypermethrine or imidacloprid resulted in a significant increase in the level of reduced glutathione (GSH) in epididymis and in the activities of epididymal GPx and Cu, Zn superoxide dismutase (CuZnSOD). When compared to the treatment with imidacloprid, treatment with  $\alpha$ -cypermethrine caused a greater increase of the GSH concentration in treated animals. Nevertheless, the increase of the GPx activity was lesser in the treatment with  $\alpha$ -cypermethrine, than in the treatment with imidacloprid. The CuZnSOD activity had a similar increase in comparison with the control group in both treatments.

(62 pages, 22 figures, 5 tables, 5 supplementary tables, 131 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: pesticides, pyrethroids, neonicotinoids, antioxidants

Supervisor: Dr. Blanka Tariba Lovaković, Sci. Assoc.

Cosupervisor: Dr. Domagoj Đikić, Prof.

Reviewers: 1. Dr. Domagoj Đikić, Prof.  
2. Dr. Ines Radanović, Prof.  
3. Dr. Iva Juranović Cindrić, Prof.  
4. Dr. Nenad Judaš, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 18<sup>th</sup> June 2020

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Pesticidi.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Piretroidi (<math>\alpha</math>-cipermetrin) .....</b>	<b>2</b>
1.2.1. Osnovne karakteristike.....	2
1.2.2. Mehanizam djelovanja .....	3
1.2.3. Toksični učinci .....	3
<b>1.3. Neonikotinoidi (Imidakloprid).....</b>	<b>4</b>
1.3.1. Osnovne karakteristike.....	4
1.3.2. Mehanizam djelovanja .....	5
1.3.3. Toksični učinci .....	5
<b>1.4. Oksidacijski stres .....</b>	<b>6</b>
<b>1.5. Učinci oksidacijskog stresa na muški spolni sustav .....</b>	<b>8</b>
<b>1.6. Antioksidacijski obrambeni sustav .....</b>	<b>9</b>
1.6.1. Glutation (GSH).....	10
1.6.2. Glutation peroksidaza (GPx) .....	11
1.6.3. Superoksid dismutaza (SOD) .....	13
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>15</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>16</b>
<b>3.1. Popis upotrijebljenih kemikalija .....</b>	<b>16</b>
<b>3.2. Uređaji i oprema rabljeni u eksperimentalnom radu.....</b>	<b>17</b>
<b>3.3. Pokusne životinje .....</b>	<b>17</b>
3.3.1. Tretman .....	18
3.3.2. Prikupljanje tkiva testisa i epididimisa .....	19
3.3.3. Homogenizacija tkiva testisa i epididimisa.....	19
<b>3.4. Analiza parametara oksidacijskog stresa .....</b>	<b>19</b>
3.4.1. Analiza ukupnog antioksidacijskog kapaciteta (TAC) .....	19
3.4.2. Određivanje koncentracije reduciranog glutaciona (GSH).....	22
3.4.3. Određivanje katalitičke aktivnosti glutacion peroksidaze (GPx) .....	24
3.4.4. Određivanje katalitičke aktivnosti Cu, Zn-ovisne superoksid dismutaze (CuZnSOD).....	26
<b>3.5. Određivanje ukupnih proteina .....</b>	<b>28</b>
<b>3.6. Statistička obrada podataka .....</b>	<b>30</b>
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>31</b>
<b>4.1. Utjecaj tretmana <math>\alpha</math>-cipermetrinom i imidaklopridom na prirast mase životinja .....</b>	<b>31</b>
<b>4.2. Utjecaj tretmana <math>\alpha</math>-cipermetrinom i imidaklopridom na masu testisa i epididimisa.....</b>	<b>32</b>

4.3. Utjecaj tretmana $\alpha$ -cipermetrinom i imidaklopidom na ukupni antioksidacijski kapacitet (TAC) u testisu i epididimisu .....	33
4.4. Utjecaj tretmana $\alpha$ -cipermetrinom i imidaklopidom na koncentraciju reduciranog glutationa (GSH) u testisu i epididimisu .....	35
4.5. Utjecaj tretmana $\alpha$ -cipermetrinom i imidaklopidom na katalitičku aktivnost glutacione peroksidaze (GPx) u testisu i epididimisu.....	36
4.6. Utjecaj tretmana $\alpha$ -cipermetrinom i imidaklopidom na katalitičku aktivnost Cu, Zn-ovisne superoksid dismutaze (CuZnSOD) u testisu i epididimisu .....	38
4.7. Usporedba intenziteta učinaka $\alpha$ -cipermetrina i imidakloprida na prosječan prirast mase životinja, koncentracijsku razinu reduciranog glutationa (GSH) i katalitičku aktivnost antioksidacijskih enzima glutacione peroksidaze (GPx) i Cu, Zn-ovisne superoksid dismutaze (CuZnSOD) .....	40
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>42</b>
5.1. Utjecaj tretmana $\alpha$ -cipermetrinom i imidaklopidom na prirast mase životinja te masu testisa i epididimisa.....	43
5.2. Utjecaj tretmana $\alpha$ -cipermetrinom i imidaklopidom na parametre oksidacijskog stresa u testisu i epididimisu .....	44
<b>6. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>49</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>50</b>
<b>8. PRILOZI.....</b>	<b>57</b>
<b>9. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>62</b>



## POPIS KRATICA

<b>ABTS</b>	2,2'-azino-di-[3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat]
<b>AChE</b>	acetilkolinesteraza
<b><math>\alpha</math>-CIP</b>	$\alpha$ -cipermetrin ([ <i>(S)</i> -cijano-(3-fenoksifenil)metil] (1 <i>R</i> ,3 <i>R</i> )-3-(2,2-dikloroetenil)-2,2-dimetilciklopropan-1-karboksilat)
<b>ADI</b>	prihvatljiv dnevni unos (engl. <i>Acceptable Daily Intake</i> )
<b>AOEL</b>	dopuštena razina izloženosti primjenitelja (engl. <i>Acceptable Operator Exposure Level</i> )
<b>ATP</b>	adenozin trifosfat
<b>BSA</b>	goveđi serumski albumin
<b>CAT</b>	katalaza
<b>cGPx ili GSHPx-1</b>	citosolna glutation peroksidaza
<b>CuZnSOD ili SOD1</b>	citosolna ili bakar, cink-ovisna superoksid dismutaza
<b>DNA</b>	deoksiribonukleinska kiselina
<b>DTNB</b>	5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoična kiselina
<b>ECSOD ili SOD3</b>	ekstracelularna superoksid dismutaza
<b>EDTA</b>	etilendiamintetraoctena kiselina
<b>E-Se-</b>	selenolat
<b>E-SeOH</b>	selenenska kiselina
<b>E-Se-S-G</b>	selenosulfidni adukt
<b>FAD</b>	flavin adenin dinukleotid
<b>FSH</b>	folikulostimulirajući hormon
<b>GGT</b>	$\gamma$ -glutamiltranspeptidaza
<b>GI-GSH-Px ili GPx2</b>	gastrointestinalna glutation peroksidaza
<b>GPx</b>	glutation peroksidaza
<b>GR</b>	glutation reduktaza
<b>GSH</b>	glutation
<b>GSSG</b>	glutation disulfid
<b>GST</b>	glutation-S-transferaza
<b>IMI</b>	imidakloprid (1-[(6-kloro-3-piridinil)metil]-N-nitro-4,5-dihidro-1H-imidazol-2-amin)
<b>INT</b>	2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5 feniltetrazolium klorid

<b><i>i.p.</i></b>	intraperitonealna primjena (engl. <i>intraperitoneal</i> )
<b>LD<sub>50</sub></b>	letalna doza 50 %
<b>LH</b>	luteinizirajući hormon
<b>LOAEL</b>	najniža razina kod koje je uočen štetan učinak (engl. <i>Lowest Observed Adverse Effect Level</i> )
<b>LPO</b>	lipidna peroksidacija
<b>MDA</b>	malondialdehid
<b>MnSOD ili SOD2</b>	mitohondrijska ili mangan-ovisna superoksid dismutaza
<b>nAChR</b>	nikotin acetilkolinski receptor
<b>NADPH</b>	nikotinamin adenin dinukleotid fosfat
<b>NOAEL</b>	razina bez uočenog štetnog učinka (engl. <i>No Observed Adverse Effect Level</i> )
<b>OEL</b>	granična vrijednost izloženosti na radu (engl. <i>Occupational Exposure Limit</i> )
<b>pGSH-Px ili GPx3</b>	plazmatska glutation peroksidaza
<b>PH-GSH-Px ili GPx4</b>	fosfolipid-hidroperoksidna glutation peroksidaza
<b><i>p.o.</i></b>	oralna primjena (lat. <i>per os</i> )
<b>REL</b>	razina izloženosti stanovništva (engl. <i>Residential Exposure Level</i> )
<b>RNA</b>	ribonukleinska kiselina
<b>RNS</b>	reaktivni dušikovi spojevi (engl. <i>Reactive Nitrogen Species</i> )
<b>ROS</b>	reaktivni kisikovi spojevi (engl. <i>Reactive Oxygen Species</i> )
<b>SOD</b>	superoksid dismutaza
<b>T</b>	testosteron
<b>TAC</b>	ukupni antioksidacijski kapacitet
<b>TCA</b>	trikloroetena kiselina
<b>t.m.</b>	tjelesna masa
<b>TNB</b>	2-nitro-5-tiobenzat

## 1. UVOD

### 1.1. Pesticidi

S porastom broja svjetskog stanovništva javila se i razmjerno veća potreba za proizvodnjom hrane, stoga se u suvremenoj poljoprivredi nužno koriste kemijska sredstva namijenjena zaštiti bilja nakon čega njihovi ostaci završavaju u okolišu i hrani, štetno djelujući na neželjene organizme, uključujući i ljude. Pesticidi su glavna skupina spojeva proizvedenih s ciljem namjernog oslobađanja u okoliš, a namijenjeni su suzbijanju nepoželjnih biljnih, životinjskih i mikrobioloških vrsta u proizvodnji hrane (FAO 2014). Procjenjuje se da bi bez primjene pesticida svjetska proizvodnja hrane pala za 30 % (Biswas i sur. 2010). S obzirom na ciljani organizam, pesticidi se dijele na insekticide (sredstva za uništavanje insekata), herbicide (sredstva za zaštitu od korova), rodenticide (sredstva za uništavanje glodavaca) i fungicide (sredstva za suzbijanje fitopatogenih gljiva), a djeluju tako da u štetnim vrstama ometaju osnovne biokemijske procese, izazivajući pritom poremećaj rasta i razvoja te smrt štetnika (Pleadin i sur. 2017).

Djelovanje pesticida intenzivno se proučava zbog prepoznatog negativnog djelovanja na neželjene biološke sustave (Abdollahi i sur. 2004; Lee i sur. 2004). Opća populacija izložena je dugotrajnom djelovanju niskih doza pesticida prisutnih u svim dijelovima okoliša (hrani, vodi, zraku), a u organizam ih je moguće unijeti putem kože (dermalno), hranom i vodom (ingestijom) ili udisanjem (inhalacijom). Ogroman broj epidemioloških istraživanja ukazuje na korelaciju između izloženosti pesticidima i povišene stope kroničnih bolesti, tumora, neuroloških poremećaja, poremećaja pri rođenju te reproduktivnih poremećaja (McCauley i sur. 2006; Mostafalou i Abdollah 2013). Kronična izloženost niskim dozama pesticida u ljudi može rezultirati toksičnim učincima od kojih su najčešći neurotoksični, imunotoksični i genotoksični učinci kao i toksično djelovanje na reproduktivni sustav (Murati i sur. 2014). Pesticidi uzrokuju brojne biokemijske promjene na molekularnoj, staničnoj i tkivnoj razini. Nastale biokemijske promjene mogu se koristiti kao biološki markeri u epidemiološkim i toksikološkim istraživanjima. Najčešći biološki markeri korišteni za procjenu djelovanja pesticida povezani su s oštećenjima DNA i RNA, promjenama u genskoj ekspresiji i oksidacijskim stresom (McCauley i sur. 2006).

U posljednjih nekoliko desetljeća među korištenim insekticidima dominirali su organofosfati koji djeluju kao neurotoksini i karbamati koji djeluju kao inhibitori enzima

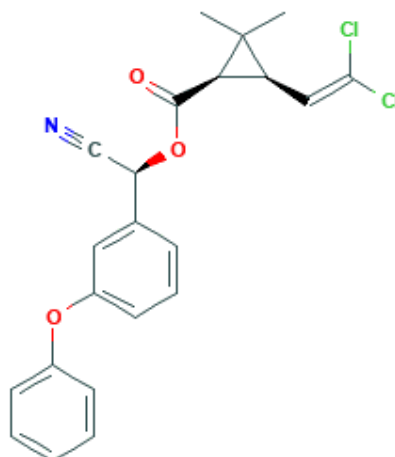
acetilkolinesteraze (AChE). Otpornost koju su štetnici razvili prema ovim insekticidima dovela je do njihove ograničene uporabe te potrebe za sintezom novih efikasnijih tvari za suzbijanje štetnika koje su pritom netoksične za okoliš i neciljane organizme. Održiva upotreba pesticida podrazumijeva suzbijanje štetočina upotrebom tvari prirodnog podrijetla ili barem onih koje se sintetiziraju na osnovi prirodnih tvari i koje pokazuju svojstva pesticida. Nadalje, održivi razvoj poljoprivrede zahtijeva korištenje insekticida koji su manje toksični za neciljane organizme i okoliš, koji su biorazgradivi, ali ipak učinkoviti u suzbijanju štetočina (Casida 2012; EU 2009). U današnje vrijeme raste potrošnja novih vrsta pesticida kao što su piretroidi ili "zeleni" insekticidi poput  $\alpha$ -cipermetrina te neonikotinoidne tvari poput imidakloprida koji su u izrazito širokoj upotrebi kao učinkovit nadomjestak organofosfatnim insekticidima. Ovi spojevi razvijeni su kao zamjena za konvencionalne pesticide te za njih ne postoje dostatni znanstveni dokazi o netoksičnosti za neciljane organizme.

## 1.2. Piretroidi ( $\alpha$ -cipermetrin)

### 1.2.1. Osnovne karakteristike

Piretroidi su sintetički dobiveni spojevi čija je struktura i djelovanje slična strukturi i djelovanju prirodnog insekticida piretrina dobivenog iz cvijeta Dalmatinskog buhača (lat. *Chrysanthemum cinerariifolium*), a na tržištu se pojavljuju 70-tih godina 20. stoljeća. Zbog modifikacija u strukturi dovoljno su stabilni za primjenu u agronomiji, a zbog ciljano usmjerenog mehanizma djelovanja i brze biološke razgradnje postaju najvažnija grupa sintetskih insekticida na tržištu. Piretroidi su kao ekološki prihvatljiviji, učinkovitiji i selektivniji insekticidi upotrebljavani kao zamjena za ograničene i zabranjene organofosfate, međutim raste broj dokaza njihovog štetnog djelovanja (Saillenfait i sur. 2015).

$\alpha$ -cipermetrin ( $\alpha$ -CIP) ([*(S)*-cijano-(3-fenoksifenil)metil] (1*R*,3*R*)-3-(2,2-dikloroetenil)-2,2-dimetilciklopropan-1-karboksilat) (**Slika 1.**) je sintetski piretroid koji se počeo primjenjivati sredinom 80-tih godina 20. stoljeća, a intenzivno se koristi u agronomiji, veterini i u kućanstvu za suzbijanje štetočina i insekata (Solati i sur. 2010). Sadrži 90 % insekticidno aktivnih stereoizomernih parova od četiri cis izomera cipermetrina pa se zbog toga odlikuje većom biološkom aktivnošću i postojanošću. Iako se u tijelu sisavaca brzo izlučuje putem mokraće, najveći dio djelatne tvari se koncentrira u masti, jetri, bubrezima, mišićima i u mlijeku (Saillenfait i sur. 2015).



**Slika 1.** Strukturna formula  $\alpha$ -cipermetrina (izvor: PubChem).

### 1.2.2. Mehanizam djelovanja

Prema mehanizmu djelovanja piretroidi su živčani otrovi koji djeluju na prenošenje živčanih impulsa. Primarno mjesto djelovanja su natrijevi kanali neurona. Piretroidi se vežu na  $\alpha$ -podjedinicu naponom reguliranih natrijevih kanala te usporavaju njihovo zatvaranje omogućujući time prolazak više natrijevih iona kroz kanal i depolarizaciju membrane neurona (Soderlund i Bloomquist 1989). Zbog slične strukture i funkcije naponom reguliranih natrijevih kanala kod insekata i sisavaca, piretroidi mogu štetno djelovati i na sisavce (Saillenfait i sur. 2015).

Osim djelovanja na natrijeve kanale, piretroidi mogu posredno generirati reaktivne kisikove vrste poput superoksidnog i hidroksilnog radikala te reaktivne dušikove vrste poput peroksinitrita i dušikovih oksida te uzrokovati oksidacijski stres (Marjanović Čermak i sur. 2018). Citokrom P450 2E1 jedan je od glavnih faktora koji sudjeluju u metabolizmu cipermetrina koji rezultira stvaranjem reaktivnih vrsta (Singh i sur. 2012) čiji su najvjerojatniji cilj eritrociti zbog visokog sadržaja višestruko nezasićenih masnih kiselina u staničnoj membrani i povišene koncentracije kisika i hemoglobina (Clemens i Waller 1987).

### 1.2.3. Toksični učinci

Apsorpcija piretroida u probavnom je traktu brza, dok je apsorpcija kroz kožu sporija. Piretroidi se brzo metaboliziraju reakcijama hidrolize i oksidacije te se znatnije ne nakupljaju u tkivima, a izlučuju se uglavnom urinom (Macan i sur. 2006). Na temelju osnovne kemijske strukture i simptoma otrovanja u laboratorijskih glodavaca, prepoznate su dvije skupine

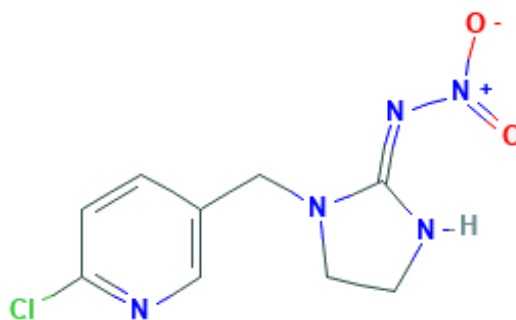
piretroidnih spojeva. Prva skupina u svojoj strukturi ne sadrži cijano grupu, a simptomi otrovanja u glodavaca su nagli nastup agresivnog ponašanja, pojačana osjetljivost na vanjske stimulanse, tremor cijelog tijela i povišena tjelesna temperatura. Ovaj tip otrovanja naziva se I. tip ili T-sindrom (T od engl. *tremor*). Druga skupina piretroida, u koju spada i  $\alpha$ -cipermetrin, sadržava cijano grupu, a simptomi otrovanja u glodavaca su salivacija i koreoatetični pokreti te snižena tjelesna temperatura. Opisani tip otrovanja označava se kao II. tip ili CS-sindrom (CS od engl. *choreoatetosis* i *salivation*). Akutna peroralna otrovnost ( $LD_{50}$ ) veća je za drugu skupinu piretroida u koju spada i  $\alpha$ -cipermetrin (Coats 1990).

Iako su sintetički piretroidi ekološki prihvatljiviji i selektivniji od primjerice organofosfata, neke studije ukazuju na hormonsku aktivnost piretroida zbog čega se ubrajaju među endokrine disruptore i predstavljaju potencijalnu prijetnju za ljude i divlje životinje. Rezultati istraživanja provedenih na laboratorijskim životinjama ukazuju na štetno djelovanje  $\alpha$ -cipermetrina na muški reproduktivni sustav što se manifestira kao smanjenje mase testisa i epididimisa, smanjenje brojnosti spermata, oštećenje strukture sjemenih kanalića i smanjenje koncentracijske razine spolnih hormona kod miševa i štakora (Hu i sur. 2011; Li i sur. 2013; Liu i sur. 2010; Mani i sur. 2002; Solati i sur. 2010; Wang i sur. 2010). Nekoliko dosadašnjih istraživanja pokazalo je da piretroidi generiraju nastanak reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta te uzrokuju oštećenja povezana s oksidacijskim stresom (El Demerdash i sur. 2013; Jin i sur. 2011; Kale i sur. 1999; Wang i sur. 2010). Reaktivne kisikove vrste imaju važnu ulogu u patogenezi muškog reproduktivnog sustava, budući da prisutnost višestruko nezasićenih masnih kiselina u testisima čini ovaj organ osjetljivijim na oksidacijska oštećenja.

### 1.3. Neonikotinoidi (Imidaklopid)

#### 1.3.1. Osnovne karakteristike

Zbog strukturne sličnosti s nikotinom, imidaklopid (IMI) (1-[(6-kloro-3-piridinil)metil]-N-nitro-4,5-dihidro-1H-imidazol-2-amin) (**Slika 2.**) spada u skupinu neonikotinoida. Nikotin karakterizira slabo insekticidno djelovanje i nestabilnost, zbog čega u odnosu na neonikotinoidne spojeve nije pogodan za uporabu u poljoprivredi. Imidaklopid je bio prvi neonikotinoid registriran za upotrebu kao pesticid od strane Agencije za zaštitu okoliša u SAD-u (USEPA). Danas, neonikotinoidni insekticidi čine jednu trećinu insekticida na svjetskom tržištu, a imidaklopid je proglašen najprodavanijim insekticidom 2010-te godine (Al-Sarar i sur. 2015).



Slika 2. Strukturna formula imidakloprida (izvor: PubChem).

### 1.3.2. Mehanizam djelovanja

Neonikotinoidi i nikotinoidi na živčani sustav djeluju kao agonisti nikotin acetilkolinških receptora (nAChR) koji imaju važnu ulogu u sinaptičkom prijenosu signala u centralnom živčanom sustavu. Na početku izazivaju stimulaciju postsinaptičkih membrana receptora i prijenos živčanih impulsa, no dugotrajna stimulacija nAChR-a zbog nemogućnosti razgradnje neonikotinoida i nikotinoida djelovanjem acetilkolinesteraze (AChE) dovodi do prekida živčanih impulsa te do oštećenja živčanog sustava što za posljedicu ima smrtni ishod (Di Muccio i sur. 2006). Nikotinoidi su pri fiziološkom pH ionizirani i selektivni za nAChR sisavaca, dok neonikotinoidi nisu ionizirani i karakterizira ih jača selektivnost prema nAChR-u insekata što je temeljna razlika između ovih dviju skupina spojeva. Djelovanje neonikotinoida na nAChR insekata znatno je jače u odnosu na sisavce (Wang i sur. 2018). Primjerice, sposobnost vezivanja imidakloprida za nAChR u *Drosophila* 550 puta je jača nego sposobnost vezivanja u sisavaca. Imidakloprid je oko 900 puta toksičniji za kućnu muhu nego za miša (Tomizawa i sur. 2000). Na različitoj građi i farmakološkim osobinama nAChR-a insekata i sisavaca zasniva se selektivnost neonikotinoida (Tomizawa i sur. 2003).

### 1.3.3. Toksični učinci

Zbog razlike u strukturi nAChR-a insekata i sisavaca te većeg afiniteta vezivanja na nAChR insekata, imidakloprid je smatran selektivnim pesticidom (Chao i Casida 1997; Liu i Casida 1993). Prema Tomizawa i sur. (2003) pretpostavlja se da za razliku od anionske nAChR vezujuće podstrane receptora u sisavaca, podstrana nAChR-a u insekata sadrži kationske aminokiseline koje reagiraju s negativnom nitro grupom imidakloprida. Unatoč tome, raste broj

dokaza koji ukazuju na različite posljedice toksičnog djelovanja imidakloprida na sisavce. Provedena su različita istraživanja o toksičnosti, karcinogenosti, genotoksičnosti i reproduktivnoj toksičnosti imidakloprida na laboratorijske glodavce, primjenjujući akutne (jednokratne) i kronične (opetovane) doze, a rezultati upućuju na teratogeno (Becker i sur. 1988), mutageno (Bagri i sur. 2016), neurotoksično (Duzguner i Erdogan 2010a; Duzguner i Erdogan 2010b; Lonare i sur. 2014) i imunotoksično (Badgujar i sur. 2013; Gawade i sur. 2013) djelovanje na sisavce.

Nakon unosa apsorpcija imidakloprida je intenzivna i potpuna, a nakon apsorpcije dolazi do postepenog metaboliziranja do 6-kloronikotinske kiseline koja može konjugirati s glicinom te se eliminirati ili reducirati do gvanidina. Ostaci imidakloprida i njegovih metabolita mogu se naći u jetri, bubrezima, plućima i koži (Shadnia i Moghaddam 2008). Imidakloprid se iz organizma izlučuje vrlo brzo i gotovo potpuno i to unutar 48 sati (25 % doze izlučuje se fecesom, a 75 % urinom). Ipak, istraživanja ukazuju da uslijed duže izloženosti može doći do poremećaja u tjelesnoj masi, poremećajima procesa osifikacije te do akutne kolinergične toksičnosti (Broznić i Milin 2009).

Istraživanja provedena na *in vivo* modelima, uglavnom laboratorijskim štakorima, upućuju na štetan utjecaj oralne primjene imidakloprida na reproduktivnu funkciju. Subkronična i kronična izloženost različitim dozama imidakloprida može uzrokovati histološka oštećenja tkiva testisa, promjene u morfologiji spermija, smanjenje broja i pokretljivosti spermija, inhibiciju spermatogeneze i smanjenje koncentracije testosterona što moguće vodi do neplodnosti (Bal i sur. 2012a; Bal i sur. 2012b; Hafez i sur. 2016; Lonare i sur. 2016; Najafi i sur. 2010). Izlaganje mužjaka štakora imidaklopridu imalo je negativan utjecaj na funkciju testisa u ranom postnatalnom razvoju i u odrasloj dobi. Smanjena reproduktivna sposobnost korelirala je s povećanom koncentracijom masnih kiselina i malondialdehida (MDA) što upućuje na pojačanu lipidnu peroksidaciju (LPO), dok se smanjena koncentracija neenzimatskih i enzimatskih antioksidansa povezuje s oksidacijskim stresom u tkivu testisa i to ovisno o dozi i vremenu djelovanja insekticida (Bal i sur. 2012b; Duzguner i Erdogan 2010a; Ince i sur. 2013; Kapoor i sur. 2010; Kanbur i sur. 2008; Lohiya i sur. 2018; Lonare i sur. 2016).

#### 1.4. Oksidacijski stres

Kisik je neophodan aerobnim organizmima koji kao izvor energije koriste oksidacijski metabolizam. Međutim, potrošnja kisika stvara međuproizvode te je biološki sustav bogat visoko reaktivnim molekulama ili atomima, kao što su reaktivni kisikovi i dušikovi spojevi,



koje karakterizira prooksidacijsko djelovanje. Prooksidacijsko djelovanje imaju slobodni radikali, molekule ili atomi koji u svojoj vanjskoj ljusci imaju jedan ili više nesparenih elektrona što ih čini nestabilnima i izuzetno reaktivnima te reaktivne neradikalne tvari koje izazivaju oksidaciju molekula, ali ne zadovoljavaju definiciju slobodnog radikala (Valko i sur. 2007). Nespareni elektroni povećavaju kemijsku reaktivnost atoma i molekula (Betteridge 2000). Reaktivni kisikovi spojevi (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) koji spadaju u skupinu slobodnih radikala su superoksid ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroksil ( $OH^{\cdot}$ ), peroksil ( $ROO^{\cdot}$ ), alkoksil ( $RO^{\cdot}$ ) i hidroperoksil ( $HO_2^{\cdot}$ ), dok u skupnu čestica koje ne zadovoljavaju definiciju slobodnog radikala spadaju vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), hipokloritna kiselina (HClO), ozon ( $O_3$ ) i singletni kisik ( $^1O_2$ ). Reaktivni dušikovi spojevi (engl. *Reactive Nitrogen Species*, RNS) koji spadaju u skupinu slobodnih radikala su dušikov(II) oksid radikal ( $NO^{\cdot}$ ) i dušikov(IV) oksid radikal ( $NO_2^{\cdot}$ ), dok u skupinu čestica koje nisu slobodni radikali spadaju nitrozil ( $NO^+$ ), nitritna kiselina ( $HNO_2$ ), dušikov(III) oksid ( $N_2O_3$ ), peroksinitrit ( $ONOO^-$ ) i alkilperoksinitrit ( $ROONO$ ) (Betteridge 2000; Södergren 2000). Slobodni radikali reagiraju s makromolekulama u organizmu i stvaraju nove radikale pri čemu nastaje lančana reakcija koja može dovesti do oštećenja tkiva (Södergren 2000).

U stanicama eukariota postoje mnogi metabolički putevi koji sudjeluju u stvaranju slobodnih radikala, a potaknuti su djelovanjem endogenih i egzogenih čimbenika. Reaktivne vrste neprekidno nastaju kao produkt normalnog staničnog metabolizma (endogeni čimbenik) tijekom fizioloških i patoloških procesa kao što su reakcije oksidacije, transportni lanac elektrona u mitohondrijskoj respiraciji, homolitičko cijepanje te enzimskom aktivnošću (oksidaze, karboksilaze, hidroksilaze, peroksidaze) (Žura Žaja i sur. 2019). Reaktivne vrste u zdravom su organizmu uključene u uobičajene fiziološke procese te sudjeluju u regulaciji staničnih puteva unutar stanice i između stanica, imunološkom odgovoru (neutrofili, monociti, makrofazi i eozinofili stvaraju ROS-ove kako bi uništili mikroorganizme nakon fagocitoze), aktivaciji leukocita, sintezi esencijalnih bioloških spojeva i proizvodnji energije, proliferaciji stanice i programiranoj staničnoj smrti (apoptozi) (Jomova i Valko 2011; Roos 2019; Södergren 2000). Egzogeni čimbenici nastanka slobodnih radikala uključuju djelovanje UV i X zračenja, utjecaj onečišćenog okoliša, toksične metale i metaloide, pesticide, policikličke aromatske ugljikovodike te pušenje cigareta i djelovanje nekih lijekova (Betteridge 2000; Limón-Pacheco i Gonsebatt 2009; Södergren 2000). Reaktivne vrste tražeći stabilnost reagiraju s ostalim molekulama u stanici kako bi popunile vanjsku ljusku u kojoj imaju jedan ili više nesparenih elektrona pri čemu dolazi do oštećenja strukture i funkcije molekula što posljedično uzrokuje oksidacijski stres, odnosno oksidacijsko oštećenje stanice (Halliwell i sur. 1992; Valko i sur.

2007). Oksidacijski stres u organizmu nastaje kada se poremeti ravnoteža slobodnih radikala i zaštitnih mehanizama (antioksidacijskih procesa) (Betteridge 2000; Limón-Pacheco i Gonsebatt 2009).

Stupanj oštećenja nastalih kao posljedica oksidacijskog stresa ovisi o njegovom trajanju, mehanizmu kojim je izazvan te o vrsti zahvaćenog organskog sustava. Dugotrajan i prekomjeren oksidacijski stres povezuje se s razvojem kroničnih bolesti (Lee i sur. 2004). Reaktivne vrste na molekularnoj razini unutar stanice mogu modificirati ili oštetiti proteine i lipide, uzrokovati promjene u strukturi DNA, reagirati s receptorima i sekundarnim glasnici, aktivirati transkripcijske faktore i producirati citokine što utječe na strukturu i funkciju staničnih komponenata.

Toksikološka istraživanja u posljednja se dva desetljeća, između ostalog, fokusiraju na parametre oksidacijskog stresa za utvrđivanje toksičnih učinaka pesticida. Toksičan učinak pesticida ovisi o njegovoj kemijskoj strukturi, primljenoj dozi i vremenu izlaganja (Jabłońska-Trypuć 2017). Neki pesticidi, uključujući organofosfatne, organokloridne, organofluoridne pesticide, karbamate, piretroide, bipiridilne herbicide, kloroacetanilidne herbicide i triazinske herbicide mogu uzrokovati oksidacijski stres (Abdollahi i sur. 2004; Barry i sur. 2011; Soltaninejad i Abdollahi 2009), međutim točan mehanizam djelovanja pesticida na molekularnoj i staničnoj razini i dalje je nepoznat.

### 1.5. Učinci oksidacijskog stresa na muški spolni sustav

Jedan od ključnih čimbenika u sazrijevanju spermija su ROS-ovi koji su u određenim količinama nužni za odvijanje fizioloških procesa poput kapacitacije, hiperaktivacije, akrosomske reakcije i fuzije spermija s oocitom (De Lamirande i Gagnon 1993; Sanocka i Kurpisz 2004), a također sudjeluju u procesima regulacije gena i staničnog rasta te unutarstaničnoj signalizaciji i ostalim vrstama prijenosa signala (Chabory i sur. 2010; Žura Žaja i sur. 2016a; Žura Žaja i sur. 2019). Održavanje fizioloških procesa spermatogeneze i steroidogeneze u testisima i povoljnih mikrokolišnih uvjeta u epididimisima, koji su nužni za sazrijevanje, pohranu i prolazak spermija, vrše epididimisi i akcesorne spolne žlijezde koji izlučivanjem antioksidansa u sjemenu plazmu uklanjanju suvišne količine ROS-ova (Koziorowska-Gilun i sur. 2011; Vernet i sur. 2004; Vince i sur. 2018; Žura Žaja i sur. 2016b; Žura Žaja i sur. 2019). Stanje oksidacijskog stresa, koje nastaje narušavanjem ravnoteže između oksidansa i antioksidansa u korist oksidansa, za posljedicu može imati narušavanje procesa spermatogeneze i steroidogeneze u testisima (Hales i sur. 2005) te se smatra dominantnim

čimbenikom u etiologiji muške neplodnosti (Aitken i Roman 2008). Narušena funkcija testisa negativno utječe na sposobnost stvaranja gibljivih, vijabilnih i morfološki normalnih spermija koji imaju sposobnost oploditi jajnu stanicu i održati rast i razvoj zametka. Spermiji se do oplodnje skladište u epididimisima gdje su znatno više od drugih stanica u organizmu izloženi oštećenjima nastalima kao posljedica oksidacijskog stresa (Chabory i sur. 2010; Noblanc i sur. 2012) prouzročenog prekomjernim stvaranjem ROS-ova. Citoplazmatska membrana spermija sadrži visoki udio višestruko nezasićenih masnih kiselina koje membrani spermija daju fluidnost potrebnu za spajanje s jajnom stanicom, a istodobno su glavni supstrat za LPO (Alvarez i sur. 1987). Kontinuirani proces LPO može prouzročiti gubitak integriteta stanične membrane, poremetiti normalne funkcije spermija i potpuno inhibirati proces spermatogeneze (Ogbuewu i sur. 2010). Zbog visokog udjela višestruko nezasićenih masnih kiselina, oskudne količine citoplazme te neadekvatne količine antioksidacijskih enzima spermiji su jako osjetljivi na oksidacijski stres (Koziorowska-Gilun i sur. 2011). Pesticidi su uglavnom hidrofobne molekule te se vežu za fosfolipidni dvosloj bioloških membrana (Ogutcu i sur. 2008) što također uzrokuje oštećenje membrana i inducira LPO (Heikal i sur. 2013; Kalender i sur. 2010; Mossa i sur. 2012). Tijekom spermatogeneze se u mitohondrijima stanica zametnog epitela (spermatogonije) troši velika količina kisika. Mitohondriji su najznačajniji unutarstanični izvor slobodnih radikala koji nastaju u procesu oksidativne fosforilacije prilikom stvaranja ATP-a. Oksidacijsko oštećenje mitohondrijske DNA spermija negativno utječe na fosforilaciju i stvaranje ATP-a što uzrokuje smanjenje pokretljivosti i oplodnog potencijala spermija (Cumminis i sur. 1994). Oksidacijsko oštećenje jezgrine DNA spermija uzrokuje rani prekid gravidnosti, nasljedne mutacije, genetske bolesti, povećanu učestalost urođenih psihofizičkih mana, mortalitet potomaka i karcinom u ranoj dobi (Aitken i Sawyer 2003; Kemal Duru i sur. 2000).

## 1.6. Antioksidacijski obrambeni sustav

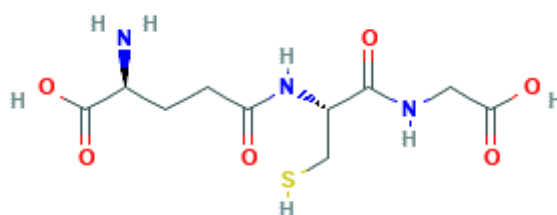
Zbog potencijalne mogućnosti prekomjernog nastanka reaktivnih vrsta u organizmu postoje vrlo djelotvorni mehanizmi antioksidacijske zaštite. Antioksidansi mogu biti prisutni u tijelu ili se mogu unijeti hranom. Antioksidacijski obrambeni mehanizmi dijele se na enzimatske i neenzimatske. U skupinu enzimatskih antioksidansa spadaju superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation peroksidaza (GPx), glutation reduktaza (GR) i glutation-S-transferaza (GST). U skupinu neenzimatskih antioksidansa spadaju glutation (GSH),

askorbinska kiselina (vitamin C),  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E), koenzim Q,  $\beta$ -karoten, mokraćna kiselina, selenij i cink (Erel 2004; Valko i sur. 2007).

U uvjetima normalnog staničnog metabolizma razina reaktivnih vrsta i antioksidansa u stanici je uravnotežena. Oksidacijski stres nastaje zbog povećane produkcije reaktivnih vrsta ili zbog nedovoljne djelotvornosti antioksidacijskih obrambenih mehanizama ili oboje (Circu i Aw 2010) što može biti potaknuto djelovanjem pesticida (Alavanja i sur. 2013). Ukupni antioksidacijski kapacitet (TAC) biološki je marker koji upućuje na ukupnu aktivnost svih molekula antioksidansa (enzimatskih i neenzimatskih) u nekom mediju (Erel 2004).

### 1.6.1. Glutation (GSH)

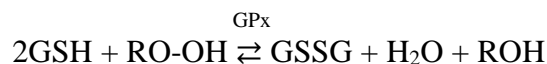
Jedan od najvažnijih neenzimatskih antioksidansa u organizmu je glutacion (GSH) koji ima važnu ulogu u zaštiti stanica od oksidansa nastalih normalnim staničnim metabolizmom. GSH je tripeptid građen od  $\gamma$ -glutamata, cisteina i glicina (**Slika 3.**). Uobičajeno vezanje cisteina je na  $\alpha$ -karboksilnu skupinu glutamata dok je kod GSH cistein vezan na  $\gamma$ -karboksilnu skupinu glutamata. Zbog te specifičnosti jedini enzim koji ga može hidrolizirati je  $\gamma$ -glutamiltanspeptidaza (GGT) koja se nalazi izvan stanice, stoga je GSH otporan na unutarstaničnu razgradnju (Kaplowitz i sur. 1985; Lu 2013; Meister i Anderson 1983; Sies 1999). GSH sadrži sulfhidrilnu skupinu (SH-) cisteina te ga karakterizira veliki redokspotencijal zahvaljujući kojem unutrašnjost stanice održava u reduciranom stanju. Kao donor elektrona sudjeluje u reakciji katalize peroksida pomoću glutacion peroksidaze (GPx) (Aladrović i sur. 2017; Fujii i sur. 2003).



**Slika 3.** Strukturna formula reduciranog glutationa (izvor: PubChem).

Glutation postoji u reduciranom (GSH) i oksidiranom (glutation disulfid, GSSG) obliku. GSH sa slobodnom sulfhidrilnom skupinom cisteina procesom redukcije prevodi reaktivne kisikove vrste u bezopasne oblike i sudjeluje u popravku oštećenih molekula. GSH se u tom procesu oksidira te najčešće formira disulfidnu vezu s drugom oksidiranom molekulom GSH

pri čemu nastaje oksidirani oblik glutathiona (GSSG). Enzim koji sudjeluje u ovim procesima je glutathion peroksidaza (GPx) koji u citosolu i mitohondrijima može metabolizirati vodikov peroksid i ostale organske perokside (Stryer i sur. 2013).



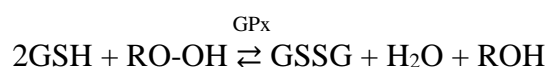
GSSG se mora reducirati u GSH. Redukcijsku snagu za to daje NADPH nastao pomoću glukoza-6-fosfat-dehidrogenaze na putu pentoza-fosfata. Elektroni se s NADPH ne prenose izravno na disulfidnu vezu GSSG-a. Umjesto toga, elektroni se s NADPH prenose na čvrsto vezani flavin adenin dinukleotid (FAD) na glutathion reduktazi (GR), zatim na disulfidni most između dvaju cisteinskih ostataka u enzimskoj podjedinici, a tek na kraju na GSSG. U većini stanica omjer GSH prema GSSG-u veći je od 500 (Stryer i sur. 2013).

GSH reagira i s oksidiranim cisteinom tvoreći mješovite disulfide koji se kasnije mogu reducirati čime se od oksidacijskih oštećenja štite osjetljivi proteinski tioli, a i sprječava se gubitak GSH u oksidacijskim uvjetima. Na sličan način (stvaranjem disulfida) sprječava se nakupljanje GSSG-a u stanici i promjena ravnotežnog omjera GSH prema GSSG-u, odnosno redukcijskog potencijala u stanici (Fernández-Checa i sur. 1997; Garcia-Ruiz i Fernández-Checa 2006; Limón-Pacheco i Gonsebatt 2009; Lu 2009; Lu 2013).

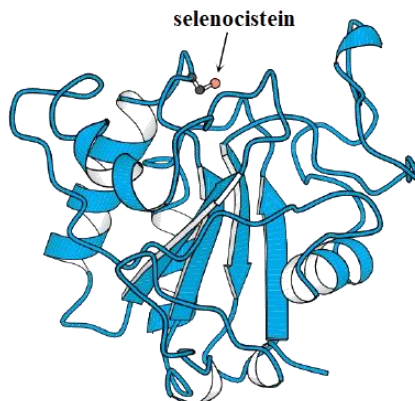
Sertolijeve stanice osiguravaju visoku razinu GSH u sjemenu, za razliku od spermatogenih stanica koje imaju mnogo manji kapacitet obnavljanja GSH, sintezom *de novo* ili redukcijom oksidiranog glutathiona pomoću glutathion reduktaze (GR) (Fujii i sur. 2003).

### 1.6.2. Glutathion peroksidaza (GPx)

Glutathion peroksidaza (GPx) naziv je skupine izoenzima koji kataliziraju reakciju redukcije vodikova peroksida i organskih hidroperoksida do vode ili alkohola, pri čemu kao reducens upotrebljavaju GSH te na taj način štite stanicu od oksidacijskog stresa (Stryer i sur. 2013).

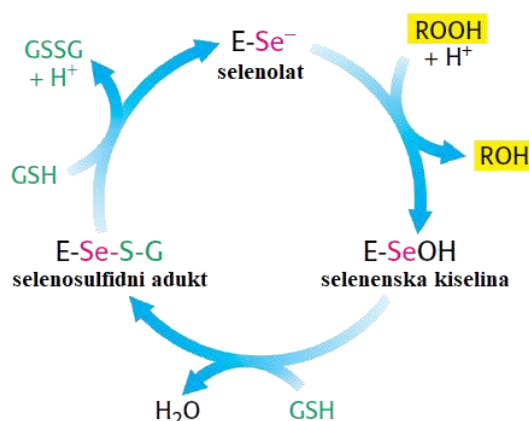


GPx u svojoj strukturi ima modificiranu aminokiselinu koja sadrži atom selenija (Se) (**Slika 4.**). Aktivno mjesto enzima sadrži selenijev analog cisteina u kojem je atom sumpora zamijenjen atomom selenija (selenocistein) (Stryer i sur. 2013).



**Slika 4.** Struktura glutation peroksidaze (preuzeto iz Stryer i sur. 2013).

Selenolatni oblik tog ostatka ( $E-Se^-$ ) reducira peroksidni supstrat u alkohol, a sam se oksidira u selenensku kiselinu ( $E-SeOH$ ). U aktivno mjesto potom dolazi GSH i nastane selenosulfidni adukt ( $E-Se-S-G$ ). Reakcijom s drugom molekulom GSH regenerira se aktivni oblik enzima (**Slika 5.**) (Stryer i sur. 2013). U živim organizmima glavna uloga GPx-a je otklanjanje malih koncentracija vodikovog peroksida i ostalih organskih hidroperoksida.



**Slika 5.** Katalitički ciklus glutation peroksidaze (preuzeto iz Stryer i sur. 2013).

GPx je prisutna u najmanje sedam različitih oblika (izoenzima): citosolna (cGPx ili GSHPx-1), gastrointestinalna (GI-GSH-Px ili GPx2), plazmatska (pGSH-Px ili GPx3), fosfolipid-hidroperoksidna (PH-GSH-Px ili GPx4) te glutation peroksidaza GPx5 i GPx6 (Čepelak 2009; Jurković i sur. 2008). Različite izoforme enzima različito su raspoređene po

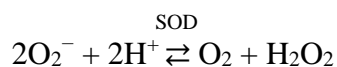
tkivima i pojedinim dijelovima stanice, a u najvećoj se količini nalaze u jetri i bubrezima. Osim navedenog, GPx ima najznačajniju funkciju u zaštiti i očuvanju oplodne sposobnosti spermija tijekom njihovog stvaranja, sazrijevanja i pohrane u epididimisu (Chabory i sur. 2010; Žura Žaja i sur. 2016a; Žura Žaja i sur. 2019).

Visoka aktivnost PH-GSH-Px (GPx4) zabilježena je u testisima (Fujii i sur. 2003). Prema Vaisbergu i sur. (2005) PH-GSH-Px (GPx4) od posebne je važnosti za proces embriogeneze i mušku plodnost jer smanjena aktivnost ovog enzima dovodi do smanjene plodnosti. U zaštiti spermija sudjeluje i GPx5 iz epididimisa (Fujii i sur. 2003). Pfeifer i sur. (2001) otkrili su u testisima štakora sn-GSH-Px specifičnu za glavu spermija čija je biološka uloga stabilizacija kondenziranog kromatina i zaštita DNA spermija od oksidacije.

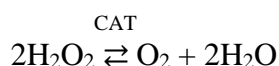
### 1.6.3. Superoksid dismutaza (SOD)

Glavna enzimatska obrana stanica protiv oksidacijskih oštećenja koja uzrokuju reaktivne kisikove vrste je metaloenzim superoksid dismutaza (SOD). SOD katalizira reakciju dismutacije (reakcija u kojoj se jedan reaktant prevede u dva različita produkta) dvaju superoksidnih radikala ( $O_2^-$ ) u molekularni kisik i vodikov peroksid pri čemu se promjenom oksidacijskog stanja metala mijenja aktivnost enzima (Stryer i sur. 2013).

Oksidirani oblik SOD-a reagira s jednim ionom superoksida ( $O_2^-$ ) pri čemu nastaju  $O_2$  i reducirani oblik SOD-a. Reducirani oblik SOD-a tada reagira s drugim ionom superoksida ( $O_2^-$ ) i s dva protona ( $H^+$ ) pri čemu nastaju vodikov peroksid i oksidirani oblik SOD-a (Stryer i sur. 2013).



Vodikov peroksid nastao u toj i sličnim reakcijama odstranjuje enzim glutation peroksidaza (GPx), ali i katalaza (CAT), sveprisutni hemoprotein koji katalizira dismutaciju vodikova peroksida u vodu i molekularni kisik. Iako je CAT enzim s velikom sposobnošću uklanjanja vodikovog peroksida, smatra se da je GPx ključni enzim u regulaciji i prevenciji oštećenja koja može prouzročiti vodikov peroksid (Stryer i sur. 2013; Žura Žaja i sur. 2019).



Reakcija katalizirana SOD-om je brza, a prisutnost SOD-a je ključna za prevenciju nastanka bolesti vezanih uz oksidacijski stres (Liu 1996; Maier i Chan 2002; Perry i sur. 2010; Sandström i sur. 1994). Kod eukariota, uključujući i čovjeka, prisutna su tri izoenzimska oblika SOD-a: citosolna ili bakar, cink-ovisna SOD (CuZnSOD ili SOD1), mitohondrijska ili mangan-ovisna SOD (MnSOD ili SOD2) i ekstracelularna SOD (ECSOD ili SOD3). Sva tri izoenzima imaju funkciju dismutacije superoksidnog aniona, ali se razlikuju po strukturi, svojstvima, lokaciji unutar stanice i distribuciji u tkivima te mehanizmima koji utječu na njihovu ekspresiju. CuZnSOD (SOD1) ima najvažniju ulogu u obrani od reaktivnih vrsta i pripada joj 50 – 80 % ukupne aktivnosti svih oblika SOD-a. Nalazi se pretežno u citosolu te u malim količinama u lizosomima, peroksisomima, jezgri te u prostoru između vanjske i unutarnje membrane mitohondrija. CuZnSOD (SOD1) prisutna je u svim tkivima kao i u plazmi i eritrocitima, a posebno visoku aktivnost pokazuje u jetri, bubrezima, srcu i nadbubrežnoj žlijezdi (Marklund 1984). MnSOD (SOD2) prisutna je u matriksu mitohondrija aerobnih stanica te uklanja superoksidne radikale koji nastaju tijekom oksidacijske fosforilacije. Kao i CuZnSOD (SOD1), u velikim je količinama prisutna u jetri, bubregu, mozgu i srcu. ECSOD (SOD3) je tetramerni, slabo hidrofobni protein s molekularnom masom od 135 kDa, a nalazi se u izvanstaničnoj tekućini. Sadrži 4 atoma bakra i cinka po molekuli, s atomima bakra u aktivnom mjestu. Ova izoforma SOD-a ima veliki afinitet za heparin i prvo je otkrivena u ljudskoj plazmi, limfi i cerebrospinalnoj tekućini (Zelko i sur. 2002), a visoka aktivnost ECSOD-a (SOD3) utvrđena je i u epididimisu (Mruk i sur. 2002).



## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Znanstveni dokazi o netoksičnosti niskih doza  $\alpha$ -cipermetrina i imidakloprida na reproduktivnu funkciju neciljanih organizama oskudni su i preliminarni. Dosadašnja istraživanja provedena na *in vivo* modelima u uvjetima subkronične i kronične izloženosti upućuju na štetan utjecaj ovih spojeva koji rezultira histološkim oštećenjem tkiva testisa, promjenama u morfologiji spermija, smanjenjem broja i pokretljivosti spermija te smanjenjem koncentracije testosterona. Toksičnom djelovanju pesticida na reproduktivnu funkciju dodatno pridonosi narušena ravnoteža između reaktivnih vrsta i antioksidacijske obrane stanice.

Cilj istraživanja bio je ispitati moguće toksične učinke niskih doza insekticida  $\alpha$ -cipermetrina i imidakloprida na reproduktivno zdravlje u uvjetima *in vivo*. Ispitan je utjecaj  $\alpha$ -cipermetrina i imidakloprida na prirast mase životinja, masu testisa i epididimisa te na parametre oksidacijskog stresa u tkivu testisa i epididimisa odraslih mužjaka Wistar štakora oralno izloženih navedenim insekticidima uzastopno tijekom 28 dana u koncentracijama koje odgovaraju dozama okolišne i profesionalne izloženosti ljudi. Mjerene su promjene koncentracijskih razina reduciranog glutationa (GSH), promjene katalitičke aktivnosti glutation peroksidaze (GPx) i Cu, Zn-ovisne superoksid dismutaze (CuZnSOD) te promjene ukupnog antioksidacijskog kapaciteta (TAC). Mjerenje oksidacijskih učinaka primjenom pristupa s više biomarkera omogućuje procjenu važnosti svakog biomarkera uslijed oksidacijskog stresa inducirano navedenim insekticidima.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Popis upotrijebljenih kemikalija

- $\alpha$ -cipermetrin (CAS-No. 67375-30-8), Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Njemačka
- $\beta$ -nikotinamid adenin dinukleotid 2'-fosfat,  $\beta$ -NADPH,  $\geq 97\%$ , Sigma, St. Louis, MO, SAD
- 2,2'-azino-di-[3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat], ABTS, Sigma, St. Louis, MO, SAD
- 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina, DTNB, Sigma, St. Louis, MO, SAD
- Boja za proteine 'Serva-Blue G', Serva, Heidelberg, Njemačka
- Deionizirana voda
- Dinatrijev hidrogenfosfat dodekahidrat,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ , Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Dinatrijeva sol etilendiamintetraoctene kiseline,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , Merck, Darmstadt, Njemačka
- DL-ditiotreitol, DTT, min 99 %, Sigma, St. Louis, MO, SAD
- Etilendiamintetraoctena kiselina p.a., EDTA, Merck, Darmstadt, Germany
- Glutation, GSH, 98 – 100 %, Sigma, St. Louis, MO, SAD
- Glutation reduktaza, GR, Sigma, St. Louis, MO, SAD
- Goveđi serumski albumin (BSA), Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri, SAD
- Imidaklopid (CAS-No. 138261-41-3), Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Njemačka
- Kalijev cijanid, KCN, Merck, Darmstadt, Njemačka
- Kalijev dihidrogenfosfat,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Merck, Darmstadt, Njemačka
- Kalijev heksacijanoferat(III),  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ , Merck, Darmstadt, Njemačka
- Kalijev hidrogenfosfat,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , Merck, Darmstadt, Njemačka
- Klorovodična kiselina, konc. 30 %, suprapur, HCl, Merck, Darmstadt, Njemačka
- Mravlja kiselina, HCOOH, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Narketan, Chassot AG, Bern, Švicarska
- Natrijev acetat,  $\text{CH}_3\text{COONa}$ , Sigma, St. Louis, Missouri, SAD
- Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev hidrogenkarbonat,  $\text{NaHCO}_3$ , Merck, Darmstadt, Njemačka

- Natrijev hidroksid, NaOH, Merck, Darmstadt, Njemačka
- Natrijev klorid, suprapur, NaCl, Merck, Darmstadt, Germany
- Octena kiselina, CH<sub>3</sub>COOH, Merck, Darmstadt, Njemačka
- Ransod test paket, Randox, Crumlin, UK
- Ransod fosfatni pufer 0,01 M, pH 7,0; Ransod Sample Diluent SD124, Randox, Crumlin, UK
- Redestilirana voda
- Saharoza, C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>, Sigma, St. Louis, MO, SAD
- Tert-butil hidroperoksid, 70 %, Sigma, St. Louis, MO, SAD
- Trikloroctena kiselina, CCl<sub>3</sub>COOH, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Trolox ((±)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina), 97 %, Sigma, St. Louis, MO, SAD
- Vodikov peroksid, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30 %, Sigma, St. Louis, MO, SAD
- Xylapan, Chassot AG, Bern, Švicarska

### 3.2. Uređaji i oprema rabljeni u eksperimentalnom radu

- Analitička vaga, Mettler Toledo AG, Švicarska
- Centrifuga Eppendorf 5415-C, Hamburg, Njemačka
- Ručni homogenizator, Omni International, SAD
- Klipne pipete Eppendorf s nastavcima
- pH metar, SevenEasy, Mettler Toledo
- Termostatirani spektrofotometar, Cary® 50 UV-Vis, Varian, Inc., Palo Alto, CA, SAD
- Termoblok, Dotherm RAL-101, Ruwag, Bettlach, Švicarska
- Vibracijska miješalica, IKA Works GmbH & Co., Staufen, Njemačka

### 3.3. Pokusne životinje

Odrasli mužjaci štakora soja Wistar (starosti 12 tjedana i 260 – 410 g tjelesne mase (t.m.)) tijekom eksperimenta bili su smješteni u polikarbonatnim kavezima na kontroliranoj sobnoj temperaturi (40 – 60 % vlage, 22 °C) i dnevno-noćnim ciklusima svjetla od 12 sati. Tijekom eksperimenta životinje su imale slobodan pristup standardnoj peletiranoj hrani

(4RF21, Mucedola, Settimo Milanese, Italija) i vodi iz slavine. Kontrolna i pokusne skupine životinja držane su pod istim standardnim uvjetima propisanim za uzgoj laboratorijskih životinja (glodavaca). Eksperiment je odobrilo Etičko povjerenstvo Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada te Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske, a proveden je prema direktivi Europske komisije od 22. rujna 2010. godine (2010/63/EU) i u skladu s međunarodnim standardima i nacionalnim zakonodavstvom za zaštitu dobrobiti životinja.

### 3.3.1. Tretman

Utjecaj pesticida  $\alpha$ -cipermetrina i imidakloprida na parametre oksidacijskog stresa ispitan je na uzorcima tkiva testisa i epididimisa odraslih štakora soja Wistar oralno (*p.o.*) tretiranih odabranim dozama pesticidnih tvari uzastopno tijekom 28 dana. Štakori su nasumično podijeljeni u skupine od po 5 životinja. Svaka skupina životinja tretirana je odabranom koncentracijom pesticidne tvari (**Tablica 1.**), osim kontrolne skupine životinja tretirane vodom. Životinje i uzorci tkiva testisa i epididimisa označeni su kao što je navedeno u tablici. Otopine pesticida svježe su pripravljene prije upotrebe otapanjem ispitivane pesticidne tvari u sterilnoj otopini fosfatnog pufera. Životinje su bile tretirane koncentracijama pesticida koje odgovaraju dozama izloženosti ljudi tijekom života i rada u poljoprivredi. Istraživanje se provodilo na četiri koncentracijske razine pesticida koje predstavljaju stvarnu izloženost ljudi: granična vrijednost izloženosti na radu (engl. *Occupational Exposure Limit* – OEL), dopuštena razina izloženosti primjenitelja (engl. *Acceptable Operator Exposure Level* – AOEL), prihvatljiv dnevni unos (engl. *Acceptable Daily Intake* – ADI) i razina izloženosti stanovništva (engl. *Residential Exposure Level* – REL).

**Tablica 1.** Oznake životinja i uzoraka tkiva testisa i epididimisa tijekom eksperimenta te koncentracijske razine ispitivanih pesticidnih tvari kojima su životinje bile tretirane.

GRUPE	$\alpha$ -CIPERMETRIN		IMIDAKLOPRID	
	OZNAKA	TRETMAN (mg/kg t.m./dan)	OZNAKA	TRETMAN (mg/kg t.m./dan)
Negativna kontrola	NK 1 – 5	voda	NK 1 – 5	voda
Grupa I	$\alpha$ -CIP ADI 1 – 5	0,02	IMI ADI 1 – 5	0,06
Grupa II	$\alpha$ -CIP OEL 1 – 5	0,15	IMI 10×AOEL 1 – 5	0,80
Grupa III	$\alpha$ -CIP 5×OEL 1 – 5	0,80	IMI 1/200 LD <sub>50</sub> 1 – 5	2,25
Grupa IV	$\alpha$ -CIP REL 1 – 5	2,20	–	–

### 3.3.2. Prikupljanje tkiva testisa i epididimisa

Sve su životinje humano eutanizirane 24 sata nakon posljednjeg tretmana pod anestezijom Xylapan/Narketan (Xylapan, 12 mg/kg t.m.; Narketan, 80 mg/kg t.m., *i.p.*). Izolirana tkiva testisa i epididimisa isprana su u hladnom fosfatnom puferu, izvagana i zamrznuta u tekućem dušiku te čuvana na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  do daljnje obrade.

### 3.3.3. Homogenizacija tkiva testisa i epididimisa

#### *Priprema reagensa*

- **Kalijev fosfatni pufer** (50 mM, pH 7,4) koji sadrži **0,25 M saharoze i 1 mM EDTA** pripremljen je otapanjem 2,640 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5,330 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 86 g saharoze i 0,37224 g EDTA-a u 1 L deionizirane vode. U pripremljenu otopinu postepeno se dodaje (prema potrebi) HCl (konc.) ili NaOH (konc.) uz mjerenje pH i miješanje na magnetskoj miješalici do konačnog pH 7,4.

#### *Priprema uzorka*

Prije određivanja parametara oksidacijskog stresa, uzorci tkiva testisa i epididimisa su homogenizirani (0,5 g tkiva na 2,5 mL 50 mM kalijevog fosfatnog pufera, pH 7,4). Dobiveni homogenat je centrifugiran pri 5000 okretaja u minuti i  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  tijekom 15 minuta radi dobivanja supernatanta (Kaya i sur. 2006). Dobiveni supernatant razdijeljen je na šest dijelova koji su pohranjeni na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  do daljnjih mjerenja.

## 3.4. Analiza parametara oksidacijskog stresa

### 3.4.1. Analiza ukupnog antioksidacijskog kapaciteta (TAC)

Ukupni antioksidacijski kapacitet (TAC) mjereno je spektrofotometrijski u supernatantu homogenata tkiva testisa i epididimisa prema objavljenoj metodi (Erel 2004). U kiselom mediju ABTS (2,2'-azino-di-[3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat]) se oksidira vodikovim peroksidom u  $\text{ABTS}^+$  te nastaje plavo-zeleno obojenje. S vremenom  $\text{ABTS}^+$  prelazi u reducirani oblik i obojenje blijedi, a antioksidansi prisutni u uzorku ubrzavaju redukciju  $\text{ABTS}^+$ . Proporcionalno

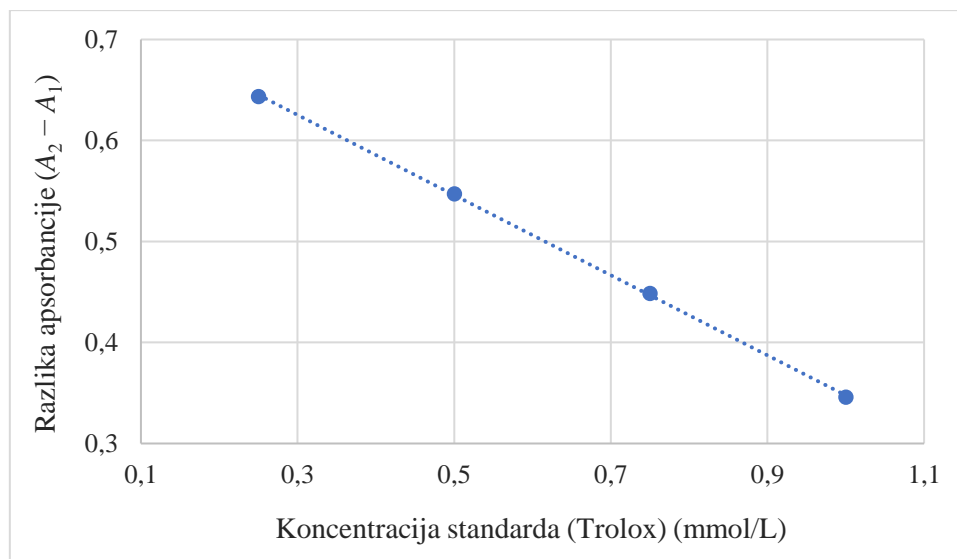
koncentraciji u uzorku, antioksidansi ubrzavaju smanjenje intenziteta obojenja što se registrira mjerenjem apsorbancije na valnoj duljini 660 nm.

#### *Priprema reagensa*

- **Reagens 1** (0,4 M acetatni pufer, pH 5,8).
  1. 16,4 g  $\text{CH}_3\text{COONa}$  otopljeno je u 500 mL deionizirane vode (konačna koncentracija 0,4 mol/L).
  2. 1,14 mL ledene octene kiseline razrijeđeno je s deioniziranom vodom do 50 mL (konačna koncentracija 0,4 mol/L).
  3. U 470 mL otopine  $\text{CH}_3\text{COONa}$  postepeno je dodana otopina ledene octene kiseline uz mjerenje pH do konačnog pH 5,8.
- **Reagens 2** (ABTS u 30 mM acetatnom puferu, pH 3,6).
  1. 0,0246 g  $\text{CH}_3\text{COONa}$  otopljeno je u 10 mL deionizirane vode (konačna koncentracija 30 mmol/L).
  2. 170,5  $\mu\text{L}$  ledene octene kiseline razrijeđeno je s deioniziranom vodom do 100 mL (konačna koncentracija 30 mmol/L).
  3. U 7,5 mL otopine  $\text{CH}_3\text{COONa}$  postepeno je dodana otopina ledene octene kiseline uz mjerenje pH do konačnog pH 3,6.
  4. 27,8  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (35 %) razrijeđeno je s pripremljenom otopinom 30 mM acetatnog pufera do 100 mL (konačna koncentracija 2 mmol/L).
  5. 0,275 g ABTS-a otopljeno je u 50 mL pripremljene otopine ( $\text{H}_2\text{O}_2$  + acetatni pufer) (konačna koncentracija 10 mmol/L). Otopina je inkubirana 1 sat na sobnoj temperaturi pri čemu dolazi do pojave karakteristične boje  $\text{ABTS}^+$ .
- **Kalijev fosfatni pufer** (30 mM, pH 7,4) pripremljen je otapanjem 1,6 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  i 3,17 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  u 1 L deionizirane vode. U pripremljenu otopinu postepeno se (prema potrebi) dodaje HCl (konc.) ili NaOH (konc.) uz mjerenje pH i miješanje na magnetskoj miješalici do konačnog pH 7,4.
- **Trolox međustandard** (0,01 M) pripremljen je otapanjem 0,00625 g Troloxa u 2,5 mL kalijevog fosfatnog pufera.
- **Radni standardi** pripremljeni su iz Trolox međustandarda razrjeđivanjem s kalijevim fosfatnim puferom (**Tablica 2.**). Pripremom različitih koncentracija Trolox međustandarda izrađena je baždarna krivulja (**Slika 6.**).

**Tablica 2.** Priprema različitih koncentracija standardne otopine Troloxa (radni standardi) za izradu baždarne krivulje.

Radni standardi	Koncentracija standardne otopine Troloxa (radni standard) (mmol/L)	Volumen Trolox međustandarda ( $\mu\text{L}$ )	Volumen kalijevog fosfatnog pufera ( $\mu\text{L}$ )
STD 1	0,25	25	975
STD 2	0,50	50	950
STD 3	0,75	75	925
STD 4	1,00	100	900



**Slika 6.** Baždarni pravac standarda Troloxa. Koeficijent linearnosti iznosi  $r^2 = 0,9998$ , a jednadžba pravca je  $y = -0,3967x + 0,7443$ .

### Priprema uzorka

Uzorci supernatanta homogenata tkiva testisa ili epididimisa odmrznuti su na sobnoj temperaturi i homogenizirani na vibracijskoj miješalici.

### Postupak mjerenja

Prva apsorbancija mjerena je nakon miješanja  $800 \mu\text{L}$  **Reagens 1** (0,4 M acetatni pufer, pH 5,8) i  $20 \mu\text{L}$  uzorka/slijepe probe/standarda. Zatim je dodano  $80 \mu\text{L}$  **Reagens 2** (ABTS u 30 mM acetatnom puferu, pH 3,6), smjesa je promiješana na vibracijskoj miješalici i nakon 5 min inkubacije ponovno je izmjerena apsorbancija. Mjerenje apsorbancije provedeno je na uređaju Varian-CARY 50. Svi uzorci mjereni su u duplikatu. Dobiveni rezultati su izraženi kao mmol Trolox ekvivalenta po litri (mmol Trolox ekviv./L).

### 3.4.2. Određivanje koncentracije reduciranog glutationa (GSH)

Koncentracija reduciranog glutationa (GSH) u uzorcima tkiva testisa i epididimisa određena je spektrofotometrijski na 412 nm prema Ellmanu (1958). Postupak određivanja koncentracije GSH temelji se na reakciji GSH i 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoične kiseline (DTNB). DTNB je poznat kao Ellmanov reagens, a koristi se pri kolorimetrijskom određivanju tiolnih skupina u biološkim uzorcima. U reakciji dolazi do cijepanja disulfidne veze te nastaje 2-nitro-5-tiobenzoat (TNB) koji se u neutralnoj ili alkalijskoj sredini ionizira do  $\text{TNB}^-$  koji je žuto obojani produkt i apsorbira svjetlost valne duljine od 412 nm.

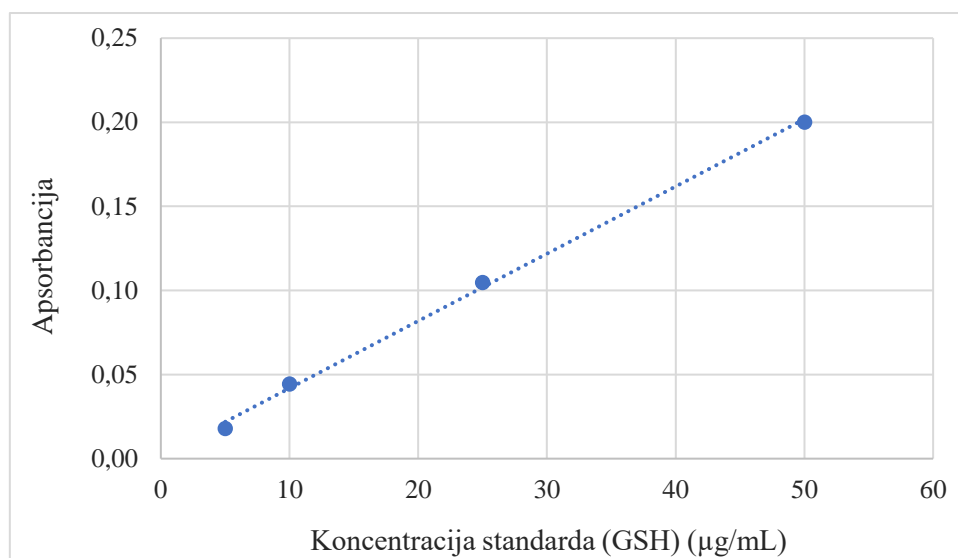
#### Priprema reagensa

- **Natrijev fosfatni pufer** (0,3 M, pH 7,4) pripremljen je otapanjem 107,44 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$  u 1 L deionizirane vode te otapanjem 46,8 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$  u 1 L deionizirane vode. U otopinu  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$  postepeno je dodana otopina  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$  uz mjerenje pH i miješanje na magnetskoj miješalici do konačnog pH 7,4.
- **DTNB** (0,3 M, pH 7,4) pripremljen je otapanjem 0,396 g DTNB-a u 1 L natrijevog fosfatnog pufera.
- **10 % trikloroetena kiselina (TCA)** pripremljena je otapanjem 104,8 g TCA u 1 L deionizirane vode.
- **Radni standardi** pripremljeni su iz standarda GSH (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) razrjeđivanjem s redestiliranom vodom (**Tablica 3.**). Pripremom različitih koncentracija standardnih otopina GSH izrađena je baždarna krivulja (**Slika 7.**).

**Tablica 3.** Priprema različitih koncentracija standardnih otopina GSH (radni standardi) za izradu baždarne krivulje.

Radni standardi	Koncentracija standardne otopine GSH (radni standard) ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Volumen redestilirane vode ( $\mu\text{L}$ )	Volumen GSH standarda 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ( $\mu\text{L}$ )
<b>STD 1</b>	5	285	15
<b>STD 2</b>	10	270	30
<b>STD 3</b>	25	225	75
<b>STD 4</b>	50	150	150





**Slika 7.** Baždarni pravac standarda reduciranog glutationa. Koeficijent linearnosti iznosi  $r^2 = 0,9983$ , a jednačba pravca je  $y = 0,004x + 0,0019$ .

#### *Priprema uzorka*

Nakon odmrzavanja, homogenati tkiva testisa ili epididimisa centrifugirani su 10 minuta pri 9600 okretaja u minuti. Pipetirano je 300 µL supernatanta homogenata tkiva u koji je dodano 100 µL 5 %-tne TCA. Smjesa je promiješana na vibracijskoj miješalici te centrifugirana 10 minuta na 9600 okretaja u minuti. Pripremljeni uzorci čuvani su u frižideru do mjerenja.

#### *Postupak mjerenja*

Prije mjerenja apsorbancije uzoraka mjerena je apsorbancija slijepe probe i serije standarda na 412 nm. Slijepa proba pripremljena je pipetiranjem 100 µL H<sub>2</sub>O, 850 µL fosfatnog pufera i 50 µL DTNB-a u mjernu kivetu, a serija standarda pipetiranjem 100 µL standarda odgovarajuće koncentracije, 850 µL fosfatnog pufera i 50 µL DTNB-a. DTNB je dodan neposredno prije mjerenja jer je razmjerno nestabilan pri sobnoj temperaturi.

Kod mjerenja apsorbancije uzoraka u mjernu kivetu pipetirano je 100 µL supernatanta homogenata uzorka u koji je potom dodano 850 µL fosfatnog pufera i 50 µL DTNB-a. Apsorbancija je mjerena na 412 nm. Svi uzorci su mjereni u duplikatu. Iz baždarne krivulje serije standarda poznatih koncentracija (**Slika 7.**) određena je nepoznata koncentracija GSH u uzorcima.

### 3.4.3. Određivanje katalitičke aktivnosti glutation peroksidaze (GPx)

Aktivnost enzima glutation peroksidaze (GPx) u uzorcima tkiva testisa i epididimisa mjerena je spektrofotometrijski na 340 nm prema Europskoj standardiziranoj metodi (EC-FLAIR) (Belsten i Wright 1995a). GPx katalizira redukciju tert-butil hidroperoksida uz istodobnu redukciju GSH pri čemu se stvara oksidirani glutation (GSSG) koji je supstrat za pomoćni enzim u reakcijskoj smjesi, glutation reduktazu (GR). GR reducira GSSG uz utrošak NADPH koji se istodobno oksidira u  $\text{NADP}^+$ . Pad apsorbancije reakcijske smjese uz konstantne uvjete proporcionalan je enzimskoj aktivnosti GPx-a.

#### Priprema reagensa

- **Drabkinov reagens dvostruke jakosti** pripremljen je otapanjem 2 g  $\text{NaHCO}_3$ , 100 mg KCN i 400 mg  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  u 1 L redestilirane vode.
- **Drabkinov radni reagens** pripremljen je miješanjem 2,5 mL Drabkinovog reagensa dvostruke jakosti i 42,5 mL redestilirane vode.
- **Fosfatni pufer** pripremljen je miješanjem 100 mL otopine A1 s dovoljno otopine A2 da se dobije pH 7.
  - Otopina A1 (0,25 mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,025 mol/L EDTA- $\text{Na}_2$ ) pripremljena je u odmjernoj tikvici od 500 mL otapanjem 17,01 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  i 4,65 g EDTA- $\text{Na}_2$  u redestiliranoj vodi.
  - Otopina A2 (0,25 mol/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,025 mol/L EDTA- $\text{Na}_2$ ) pripremljena je u odmjernoj tikvici od 500 mL otapanjem 21,77 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  i 4,65 g EDTA- $\text{Na}_2$  u redestiliranoj vodi.
- **Otopina glutation reduktaze** (214 U/mg proteina, 1,3 mg proteina/mL) pripremljena je razrjeđivanjem 359,5  $\mu\text{L}$  GR s 19640,5  $\mu\text{L}$  redestilirane vode. Aktivnost tako pripremljene otopine je 5 enzimskih jedinica.
- Reakcijska smjesa pripremljena je miješanjem 36 mL fosfatnog pufera, 18 mL otopine glutation reduktaze, 9 mL otopine 50 mM GSH i 9 mL otopine 2,5 mM  $\beta$ -NADPH.

#### Priprema uzorka

Uzorci supernatanta homogenata tkiva testisa ili epididimisa odmrznuti su na sobnoj temperaturi i homogenizirani na vibracijskoj miješalici. U 0,5 mL 0,1 M otopine stabilizacijskog reagensa (DL-ditiotreitol (DTT), redukcijско sredstvo) dodano je 50  $\mu\text{L}$  uzorka

supernatanta homogenata tkiva testisa ili epididimisa, smjesa je promiješana na vibracijskoj miješalici te ostavljena 5 minuta (stabilizacija). Nakon obrade stabilizacijskim reagensom, 50  $\mu\text{L}$  predtretiranog uzorka razrijeđeno je s 450  $\mu\text{L}$  Drabkinovog reagensa. Tako pripremljen uzorak ima ukupno razrjeđenje 110 $\times$ .

#### Postupak mjerenja

U mjernu kivetu sa 800  $\mu\text{L}$  reakcijske smjese (smjese supstrata) predinkubirane u termobloku (15 min na 37  $^{\circ}\text{C}$ , u zatvorenoj kiveti) dodano je 100  $\mu\text{L}$  uzorka supernatanta homogenata tkiva testisa ili epididimisa razrijeđenog Drabkinovim reagensom i predtretiranog stabilizacijskim reagensom. Reakcija je pokrenuta brzim dodavanjem 100  $\mu\text{L}$  tert-butil hidroperoksida (startni reagens) koji je prethodno inkubiran u termobloku (15 min na 37  $^{\circ}\text{C}$ ). Nakon dodavanja tert-butil hidroperoksida smjesa je trenutačno promiješana na vibracijskoj miješalici te je istovremeno pokrenut program mjerenja (Varian-CARY 50). Nakon 60 s odgode izmjerena je početna apsorbancija te nakon 180 s konačna apsorbancija iz čega je izračunata  $\Delta A$ , a potom i aktivnost GPx-a. Svi uzorci mjereni su u duplikatu. Jedinica aktivnosti enzima definirana je kao oksidacija 1  $\mu\text{mol}$  NADPH u litri reakcijske smjese tijekom jedne minute (U/L; 37  $^{\circ}\text{C}$ ) stoga se u računu koristi teoretski kalibracijski faktor ( $F = 176\ 800$ ). Dobivena vrijednost izražena je po gramu proteina.

$$\Delta A = \frac{A_{\text{konačno}} - A_{\text{početno}}}{2}$$

$$\text{GPx} \left[ \frac{\text{U}}{\text{L}} \right] = F \times (\Delta A - \Delta A(\text{slijepa proba}))$$

$$F = \frac{10^6}{\varepsilon} \times \frac{V_{\text{ukupno}}}{V_{\text{uzorak}}} \times \frac{1}{d} \times \text{razrjeđenje}$$

$$\varepsilon (\text{NADPH pri } 340 \text{ nm}) = 6,22 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$$

$$V_{\text{ukupno}} = 1 \text{ mL}$$

$$V_{\text{uzorak}} = 0,1 \text{ mL}$$

$$\text{razrjeđenje uzorka} = 110\times$$

$$d = 1 \text{ cm}$$

### 3.4.4. Određivanje katalitičke aktivnosti Cu, Zn-ovisne superoksid dismutaze (CuZnSOD)

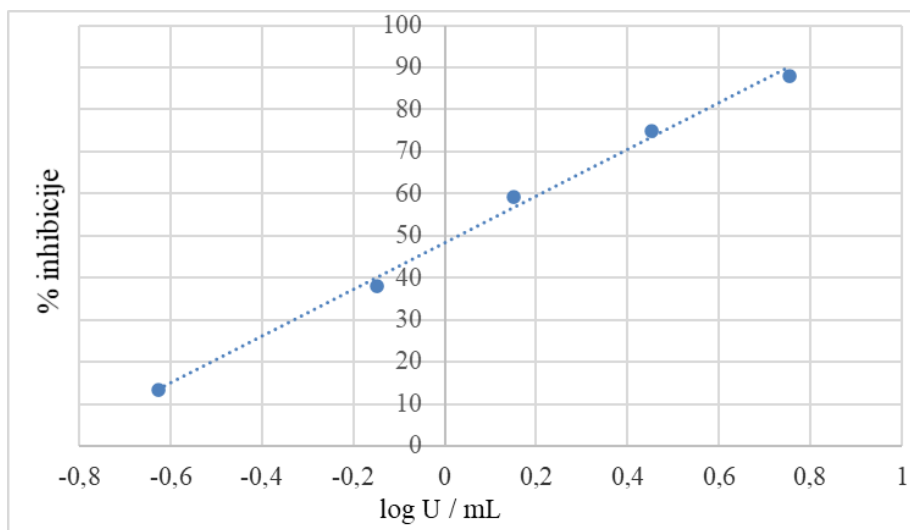
Aktivnost enzima superoksid dismutaze (SOD) u uzorcima tkiva testisa i epididimisa mjerena je spektrofotometrijski na 505 nm uz upotrebu komercijalnog kita (Ransod kit, Randox, Crumlin, UK) prema Europskoj standardiziranoj metodi (EC-FLAIR) (Belsten i Wright 1995b). Ksantin oksidaza odgovorna je za pretvorbu ksantina u mokraćnu kiselinu pri čemu se kao nusprodukt stvara superoksidni anion. Nastali superoksidni anion raspoloživ je za redukciju 2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5 feniltetrazolium klorida (INT) u crveno obojeni formazon, dok se dio superoksidnog aniona, usporedno katalitički razgrađuje pod djelovanjem SOD-a iz uzorka. Što je u uzorku veća enzimska aktivnost SOD-a to je inhibicija redukcije INT-a veća.

#### Priprema reagensa

- **Pufer** (50 mM, pH 10,2 CAPS / 0,94 mM EDTA) je isporučen spreman za uporabu.
- **Reakcijska smjesa / Smjesa supstrata** (0,05 mM ksantin / 0,025 mM INT) je isporučena u liofiliziranom stanju. Pripremljena je otapanjem u 20 mL 50 mM pufera.
- **Ksantin oksidaza** (80 U/L) je isporučena u liofiliziranom stanju. Pripremljena je otapanjem u 10 mL redestilirane vode.
- **Fosfatni pufer** (0,01 M, pH 7,0; Ransod Sample Diluent) je isporučen spreman za uporabu.
- **Matični standard** za izradu baždarne krivulje je isporučen u liofiliziranom stanju. Pripremljen je otapanjem u 10 mL redestilirane vode.
- **Radni standardi** pripremljeni su iz matičnog standarda SOD-a razrjeđivanjem s fosfatnim puferom (**Tablica 4.**). Pripremom različitih koncentracija standardnih otopina SOD-a izrađena je baždarna krivulja (**Slika 8.**).

**Tablica 4.** Priprema različitih koncentracija standardne otopine SOD-a (radni standardi) za izradu baždarne krivulje.

Radni standardi	Volumen matičnog ili radnog standarda (mL)	Volumen fosfatnog pufera (mL)
STD 1	0,5 mL radnog standarda STD3	1
STD 2	1 mL radnog standarda STD4	1
STD 3	1 mL radnog standarda STD5	1
STD 4	1 mL matičnog standarda	1
STD 5	1 mL matičnog standarda	-



**Slika 8.** Baždarni pravac standarda superoksid dismutaze. Koeficijent linearnosti iznosi  $r^2 = 0,9949$ , a jednačba pravca je  $y = 55,43x + 48,299$ .

#### Priprema uzorka

Uzorci supernatanta homogenata tkiva testisa ili epididimisa odmrznuti su na sobnoj temperaturi i homogenizirani na vibracijskoj miješalici. U 600  $\mu\text{L}$  fosfatnog pufera dodano je 15  $\mu\text{L}$  uzorka supernatanta homogenata tkiva testisa ili epididimisa te je smjesa promiješana na vibracijskoj miješalici. Tako pripremljen uzorak ima ukupno razrjeđenje  $41\times$ .

#### Postupak mjerenja

U mjernu kivetu sa 680  $\mu\text{L}$  reakcijske smjese/smjese supstrata predinkubirane u termobloku (15 min na 37  $^{\circ}\text{C}$ , u zatvorenoj kiveti) dodano je 20  $\mu\text{L}$  razrijeđenog uzorka supernatanta homogenata tkiva testisa ili epididimisa. Reakcija je pokrenuta brzim dodavanjem 100  $\mu\text{L}$  ksantin oksidaze (startni reagens). Nakon dodavanja ksantin oksidaze smjesa je promiješana na vibracijskoj miješalici te je istovremeno pokrenut program mjerenja (Varian-CARY 50 Scan). Nakon 30 s odgode izmjerena je početna apsorbancija te nakon 210 s konačna apsorbancija iz čega je izračunata  $\Delta A$  i postotak inhibicije. Svi uzorci su mjereni u duplikatu.

$$\Delta A = \frac{A_{\text{konačno}} - A_{\text{početno}}}{3}$$

$$\% \text{ inhibicije} = 100 - \frac{\Delta A \times 100}{\Delta A(\text{slijepa proba})}$$

Baždarni pravac (**Slika 8.**) konstruiran je na temelju dobivenih rezultata mjerenja. Na apscisi se nalazi logaritam poznate aktivnosti SOD-a, a na ordinati postotak inhibicije. Pomoću jednadžbe dobivene linearnom regresijom standardne krivulje izračunata je aktivnost SOD-a u pojedinom uzorku, dobivena vrijednost izražena je po gramu proteina.

$$\text{SOD} \left[ \frac{\text{U}}{\text{mL}} \right] = 10^{\left( \frac{\% \text{ inhibicije} - Y \text{ odsječak}}{\text{nagib pravca}} \right)} \times \text{razrjeđenje}$$

### 3.5. Određivanje ukupnih proteina

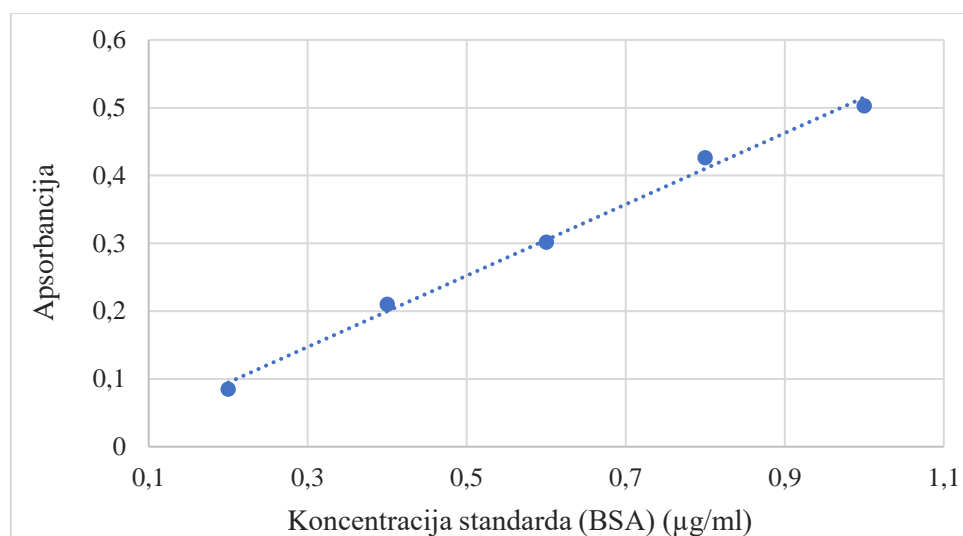
Koncentracija ukupnih proteina određena je kolorimetrijskom metodom po Bradfordu (1976). Bradfordova metoda temelji se na vezanju boje Coomassie Brilliant Blue na proteine što dovodi do povećanja maksimuma apsorpcije. Reakcija se odvija u kiselom mediju pri čemu se boja u otopini protonira i postaje crvena. Vezanjem na proteine postaje anion i mijenja boju u plavu te dolazi do metakromatskog odgovora. Povećanje apsorpcije mjeri se na 595 nm.

#### *Priprema reagensa*

- **Fiziološka otopina** (0,9 % otopina NaCl).
- **Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva-Blue G, #A35050)** pripremljen je otapanjem 22 mg Coomassie Brilliant Blue boje u 20 mL 85 % ortofosforne kiseline i 340 mL redestilirane vode. Smjesa je ostavljena da se otopi preko noći uz miješanje nakon čega je filtrirana. Coomassie Brilliant Blue se čuva u tamnoj boci na sobnoj temperaturi.
- **Standard govedeg serumskog albumina (BSA)** (1 mg/mL) pripremljen je otapanjem 10 mg BSA u 10 mL redestilirane vode. Pripremljeni standard razdijeljen je na alikvote od 0,5 mL koju su čuvani u hladnjaku na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- **Radni standardi** pripremljeni su iz standarda BSA (1 mg/mL) razrjeđivanjem s redestiliranom vodom (**Tablica 5.**). Pripremom različitih koncentracija standardnih otopina BSA izrađena je baždarna krivulja (**Slika 9.**).

**Tablica 5.** Priprema različitih koncentracija standardne otopine BSA (radni standardi) za izradu baždarne krivulje.

Radni standardi	Koncentracija standardne otopine BSA (radni standard) ( $\mu\text{g/mL}$ )	Volumen BSA standarda ( $\mu\text{L}$ )	Volumen redestilirane vode ( $\mu\text{L}$ )
STD 1	0,2	8	32
STD 2	0,4	16	24
STD 3	0,6	24	16
STD 4	0,8	32	8
STD 5	1,0	40	-



**Slika 9.** Baždarni pravac standarda govedjeg serumskog albumina (BSA). Koeficijent linearnosti iznosi  $r^2 = 0,9944$ , a jednadžba pravca je  $y = 0,5259x - 0,0106$ .

### Priprema uzorka

Homogenati tkiva testisa ili epididimisa centrifugirani su 10 minuta pri 9600 okretaja u minuti. U kivetu je pipetirano 950  $\mu\text{L}$  fiziološke otopine i 50  $\mu\text{L}$  supernatanta homogenata. Smjesa je promiješana na vibracijskoj miješalici te je centrifugirana 10 minuta na 9600 okretaja u minuti. Pripremljeni uzorci čuvani su u frižideru do početka mjerenja.

### Postupak mjerenja

Prije mjerenja apsorbancije uzoraka mjerena je apsorbancija slijepe probe i serije standarda na 595 nm. Slijepa proba pripremljena je pipetiranjem 40  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$ , 40  $\mu\text{L}$  mravlje kiseline i 2 mL Coomassie Brilliant Blue boje, a serija standarda pipetiranjem 40  $\mu\text{L}$  standarda odgovarajuće koncentracije, 40  $\mu\text{L}$  mravlje kiseline i 2 mL Coomassie Brilliant Blue boje. Kod mjerenja apsorbancije uzoraka u mjernu kivetu pipetirano je 40  $\mu\text{L}$  razrijeđenog uzorka u koji

je potom dodano 40  $\mu$ L mravlje kiseline i 2 mL Coomassie Brilliant Blue boje. Svaki uzorak mjeran je u duplikatu. Tako pripremljeni duplikati promiješani su na vibracijskoj miješalici i ostavljeni stajati 10 minuta prije spektrofotometrijskog mjerenja kako bi došlo do reakcije vezanja boje na proteine.

Apsorbancija je mjerena na 595 nm. Iz baždarne krivulje serije standarada poznatih koncentracija proteina (**Slika 9.**) određena je nepoznata koncentracija proteina u uzorcima.

### 3.6. Statistička obrada podataka

Za statističku analizu rezultata korišten je računalni program Statistica (StatSoft, Inc., Tulsa, SAD, verzija 13.0). Hipoteza o normalnosti distribucije ispitivanih parametara ispitana je Shapiro-Wilk-ovim testom. Rezultati svih mjerenja, osim rezultata mjerenja mase epididimisa i GPx-a u epididimisu štakora tretiranih  $\alpha$ -cipermetrinom, bili su normalno distribuirani.

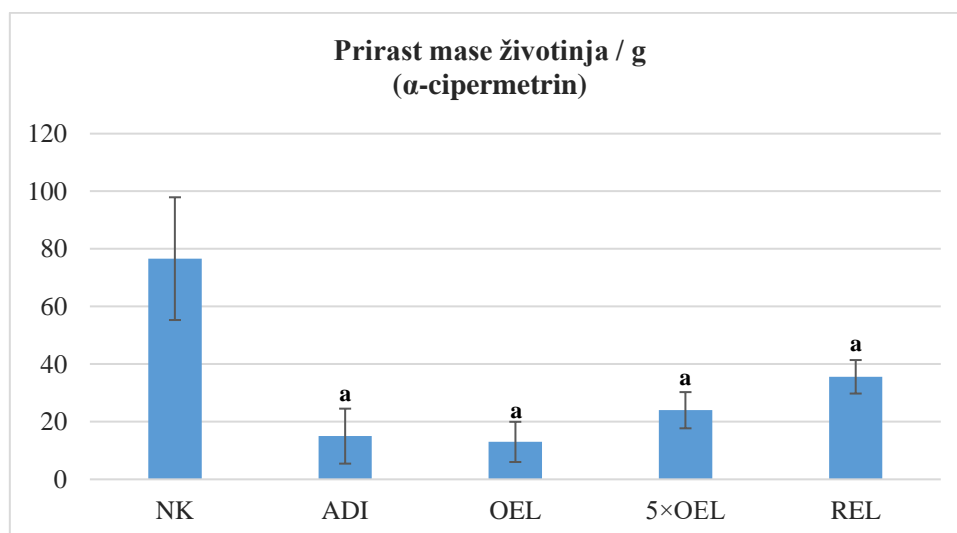
Za ocjenu značajnosti dobivenih numeričkih podataka o utjecaju  $\alpha$ -cipermetrina i imidakloprida na parametre oksidacijskog stresa u tkivu testisa i epididimisa korišten je One-way ANOVA test uz *post hoc* Tukey's HSD test za usporedbu značajnosti razlike između pojedinih skupina (normalno distribuirani parametri) ili Kruskal-Wallis test uz Medijan test (nenormalno distribuirani parametri). Razina statističke značajnosti određena je na 5 % ( $p < 0,05$ ). Rezultati mjerenja prikazani su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (5 životinja po ispitivanoj skupini).



## 4. REZULTATI

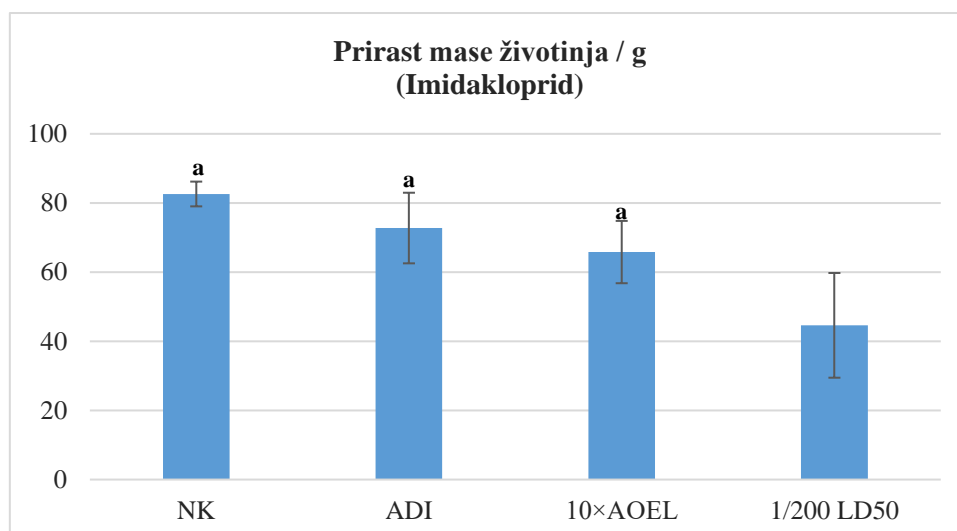
### 4.1. Utjecaj tretmana $\alpha$ -cipermetrinom i imidaklopidom na prirast mase životinja

**Slika 10.** prikazuje prosječan prirast mase kontrolne skupine životinja (NK) i pokusnih skupina životinja (ADI, OEL, 5×OEL, REL) oralno izloženih različitim dozama  $\alpha$ -cipermetrina uzastopno tijekom 28 dana (**Tablica 1.**). Tretman  $\alpha$ -cipermetrinom rezultirao je statistički značajnim smanjenjem prirasta mase životinja ( $F = 21,618$ ,  $p < 0,001$ ; One-way ANOVA uz *post hoc* Tukey's HSD test). Sve skupine životinja tretiranih  $\alpha$ -cipermetrinom imale su statistički značajno manji prirast mase u usporedbi s prirastom mase kontrolne skupine životinja.



**Slika 10.** Prosječan prirast mase kontrolne skupine i skupina životinja tretiranih  $\alpha$ -cipermetrinom (opis oznaka životinja dan je u **Tablici 1.**). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (prema **Prilogu 1.**) (a – statistički različito od kontrolne skupine;  $p < 0,05$ ).

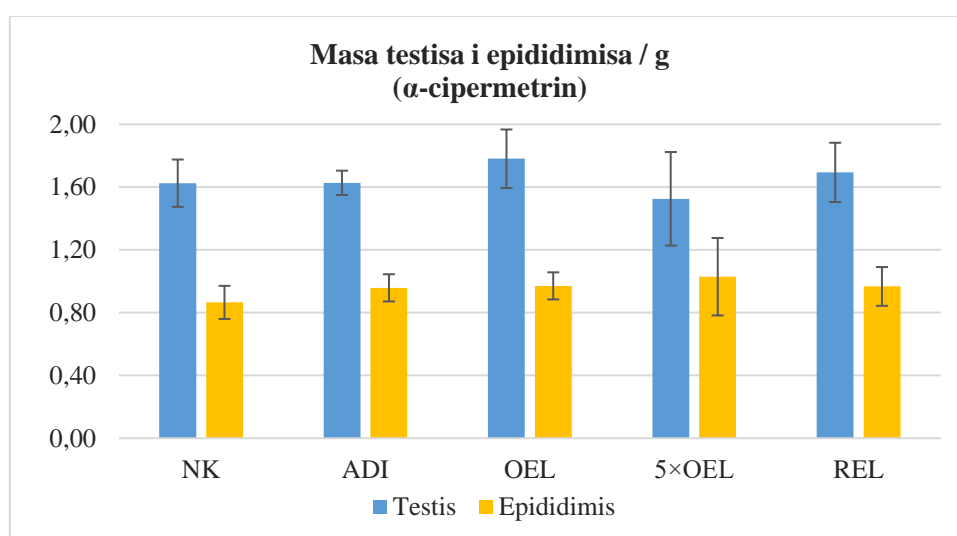
**Slika 11.** prikazuje prosječan prirast mase kontrolne skupine životinja (NK) i pokusnih skupina životinja (ADI, 10×AOEL, 1/200 LD<sub>50</sub>) oralno izloženih različitim dozama imidakloprida uzastopno tijekom 28 dana (**Tablica 1.**). Tretman imidaklopidom rezultirao je statistički značajnim smanjenjem prirasta mase životinja ( $F = 11,986$ ,  $p < 0,001$ ; One-way ANOVA uz *post hoc* Tukey's HSD test). Životinje tretirane s 2,25 mg imidakloprida/kg t.m./dan (1/200 LD<sub>50</sub>) imale su statistički značajno manji prirast mase u usporedbi sa svim ostalim pokusnim skupinama životinja.



**Slika 11.** Prosječan prirast mase kontrolne skupine i skupina životinja tretiranih imidaklopidom (opis oznaka životinja dan je u **Tablici 1.**). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (prema **Prilogu 1.**) (a – statistički različito od životinja tretiranih s 2,25 mg imidakloprida/kg t.m./dan (1/200 LD<sub>50</sub>);  $p < 0,05$ ).

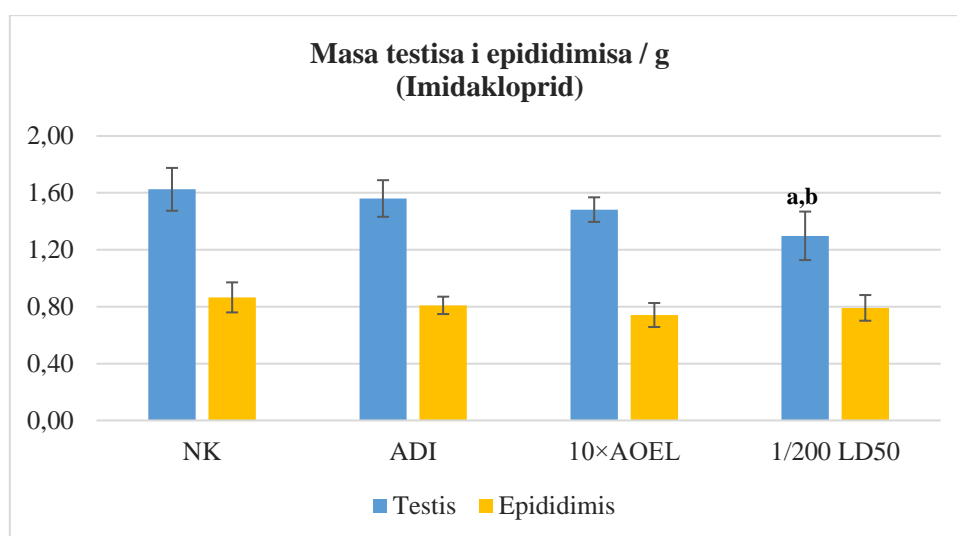
#### 4.2. Utjecaj tretmana $\alpha$ -cipermetrinom i imidaklopidom na masu testisa i epididimisa

**Slika 12.** prikazuje prosječnu masu testisa i epididimisa kontrolne skupine životinja (NK) i pokusnih skupina životinja (ADI, OEL, 5×OEL, REL) oralno izloženih različitim dozama  $\alpha$ -cipermetrina (**Tablica 1.**) uzastopno tijekom 28 dana. Prosječna masa testisa veća je od mase epididimisa kod svih skupina životinja. Mase testisa i epididimisa životinja tretiranih  $\alpha$ -cipermetrinom nisu se statistički značajno razlikovale između skupina.



**Slika 12.** Masa testisa i epididimisa kontrolne skupine životinja i skupina životinja tretiranih  $\alpha$ -cipermetrinom (opis oznaka životinja dan je u **Tablici 1.**). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (prema **Prilogu 1.**).

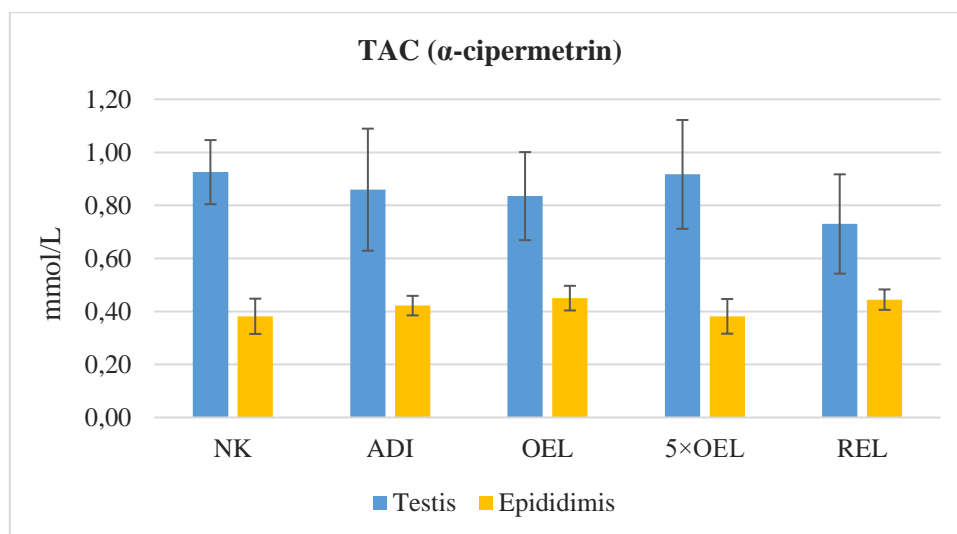
**Slika 13.** prikazuje prosječnu masu testisa i epididimisa kontrolne skupine životinja (NK) i pokusnih skupina životinja (ADI, 10×AOEL, 1/200 LD<sub>50</sub>) oralno izloženih različitim dozama imidakloprida (**Tablica 1.**) uzastopno tijekom 28 dana. Prosječna masa testisa veća je od mase epididimisa kod svih skupina životinja. Tretman najvećom dozom imidakloprida (2,25 mg/kg t.m./dan (1/200 LD<sub>50</sub>)) rezultirao je statistički značajno manjom masom testisa u usporedbi s kontrolnom skupinom i skupinom životinja tretiranom s 0,06 mg imidakloprida/kg t.m./dan (ADI) ( $F = 5,282$ ,  $p < 0,05$ ; One-way ANOVA uz *post hoc* Tukey's HSD test). Mase epididimisa životinja tretiranih imidaklopridom nisu se statistički značajno razlikovale između skupina.



**Slika 13.** Masa testisa i epididimisa kontrolne skupine životinja i skupina životinja tretiranih imidaklopridom (opis oznaka životinja dan je u **Tablici 1.**). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (prema **Prilogu 1.**) (a – statistički različito od kontrolne skupine, b – statistički različito od životinja tretiranih s 0,06 mg imidakloprida/kg t.m./dan (ADI);  $p < 0,05$ ).

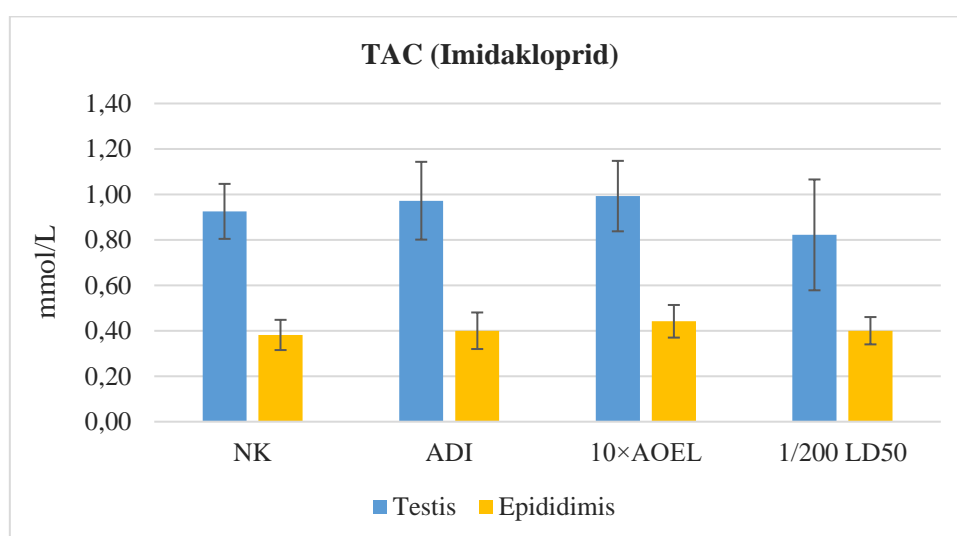
#### 4.3. Utjecaj tretmana $\alpha$ -cipermetrinom i imidaklopridom na ukupni antioksidacijski kapacitet (TAC) u testisu i epididimisu

**Slika 14.** prikazuje ukupni antioksidacijski kapacitet (TAC) u testisu i epididimisu kontrolne skupine životinja (NK) i pokusnih skupina životinja (ADI, OEL, 5×OEL, REL) oralno izloženih različitim dozama  $\alpha$ -cipermetrina (**Tablica 1.**) uzastopno tijekom 28 dana. TAC je veći u testisu nego u epididimisu kod svih skupina životinja. Vrijednost TAC-a u testisu i epididimisu životinja tretiranih  $\alpha$ -cipermetrinom nije se statistički značajno razlikovala između skupina.



**Slika 14.** Ukupni antioksidacijski kapacitet (TAC) u testisu i epididimisu kontrolne skupine životinja i skupina životinja tretiranih  $\alpha$ -cipermetrinom (opis oznaka životinja dan je u **Tablici 1.**). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (prema **Prilogu 2.** i **3.**).

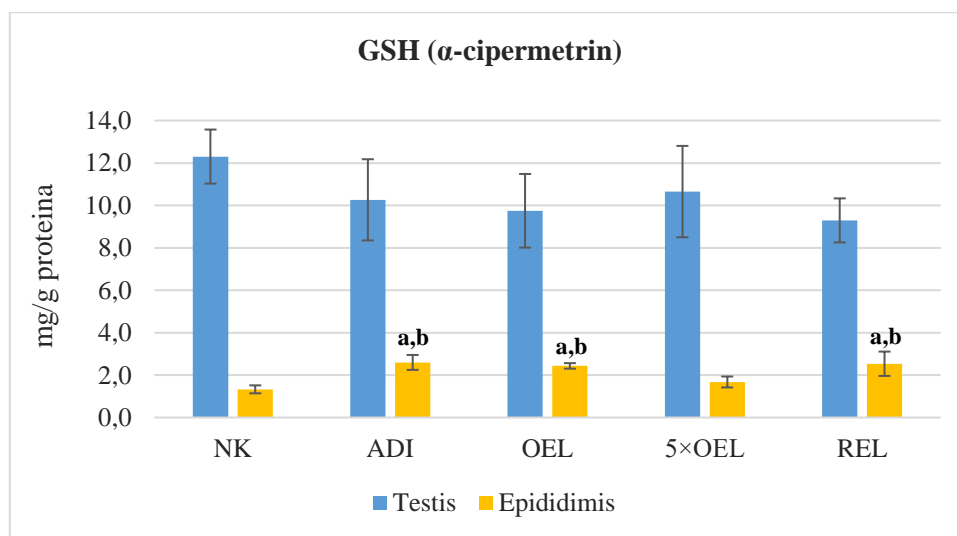
**Slika 15.** prikazuje ukupni antioksidacijski kapacitet (TAC) u testisu i epididimisu kontrolne skupine životinja (NK) i pokusnih skupina životinja (ADI, 10×AOEL, 1/200 LD<sub>50</sub>) oralno izloženih različitim dozama imidakloprida (**Tablica 1.**) uzastopno tijekom 28 dana. TAC je veći u testisu nego u epididimisu kod svih skupina životinja. Vrijednost TAC-a u testisu i epididimisu životinja tretiranih imidaklopridom nije se statistički značajno razlikovala između skupina.



**Slika 15.** Ukupni antioksidacijski kapacitet (TAC) u testisu i epididimisu kontrolne skupine životinja i skupina životinja tretiranih imidaklopridom (opis oznaka životinja dan je u **Tablici 1.**). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (prema **Prilogu 2.** i **3.**).

#### 4.4. Utjecaj tretmana $\alpha$ -cipermetrinom i imidaklopridom na koncentraciju reduciranog glutationa (GSH) u testisu i epididimisu

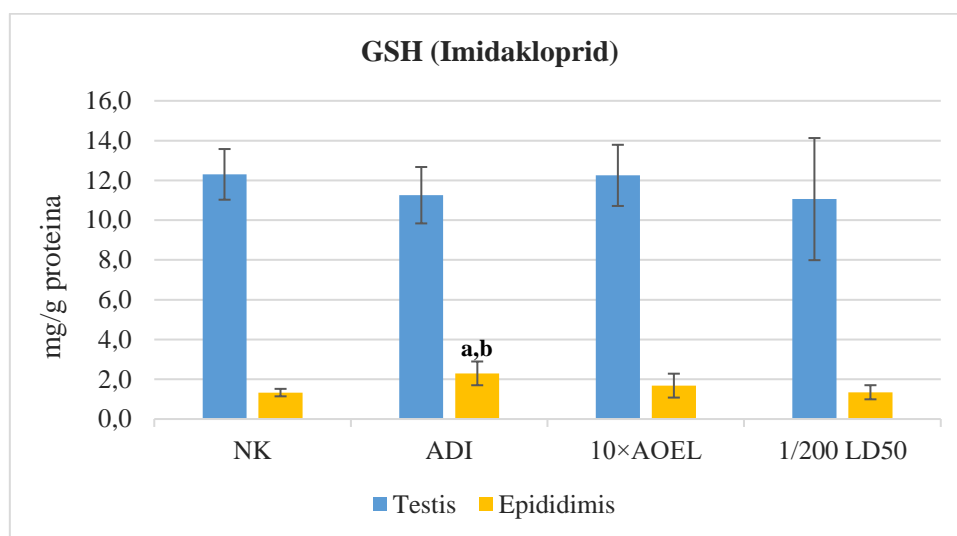
**Slika 16.** prikazuje koncentraciju reduciranog glutationa (GSH) u testisu i epididimisu kontrolne skupine životinja (NK) i pokusnih skupina životinja (ADI, OEL, 5×OEL, REL) oralno izloženih različitim dozama  $\alpha$ -cipermetrina (**Tablica 1.**) uzastopno tijekom 28 dana. Koncentracija GSH veća je u testisu nego u epididimisu kod svih skupina životinja. Tretman  $\alpha$ -cipermetrinom nije rezultirao statistički značajnom promjenom koncentracije GSH u testisu dok je u epididimisu došlo do statistički značajnog povećanja koncentracije GSH u tretiranih životinja ( $F = 14,452$ ,  $p < 0,001$ ; One-way ANOVA uz *post hoc* Tukey's HSD test). Koncentracija GSH u epididimisu životinja tretiranih  $\alpha$ -cipermetrinom u dozama od 0,02 mg/kg t.m./dan (ADI), 0,15 mg/kg t.m./dan (OEL) i 2,20 mg/kg t.m./dan (REL) bila je statistički značajno veća u odnosu na kontrolnu skupinu i životinje tretirane s 0,80 mg  $\alpha$ -cipermetrina/kg t.m./dan (5×OEL).



**Slika 16.** Koncentracija reduciranog glutationa (GSH) u testisu i epididimisu kontrolne skupine životinja i skupina životinja tretiranih  $\alpha$ -cipermetrinom (opis oznaka životinja dan je u **Tablici 1.**). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (prema **Prilogu 2.** i **3.**) (a – statistički različito od kontrolne skupine, b – statistički različito od skupine tretirane s 0,80 mg  $\alpha$ -cipermetrina/kg t.m./dan (5×OEL);  $p < 0,05$ ).

**Slika 17.** prikazuje koncentraciju reduciranog glutationa (GSH) u testisu i epididimisu kontrolne skupine životinja (NK) i pokusnih skupina životinja (ADI, 10×AOEL, 1/200 LD<sub>50</sub>) oralno izloženih različitim dozama imidakloprida (**Tablica 1.**) uzastopno tijekom 28 dana.

Koncentracija GSH veća je u testisu nego u epididimisu kod svih skupina životinja. Tretman imidaklopridom nije utjecao na koncentraciju GSH u testisu dok je koncentracija GSH u epididimisu pokazala statistički značajan porast ( $F = 4,649$ ,  $p < 0,05$ ; One-way ANOVA uz *post hoc* Tukey's HSD test). Životinje tretirane imidaklopridom u dozi od 0,06 mg/kg t.m./dan (ADI) imale su statistički značajno veću koncentraciju GSH u epididimisu u usporedbi s kontrolnom skupinom i životinjama tretiranim s 2,25 mg imidakloprida/kg t.m./dan (1/200 LD<sub>50</sub>).

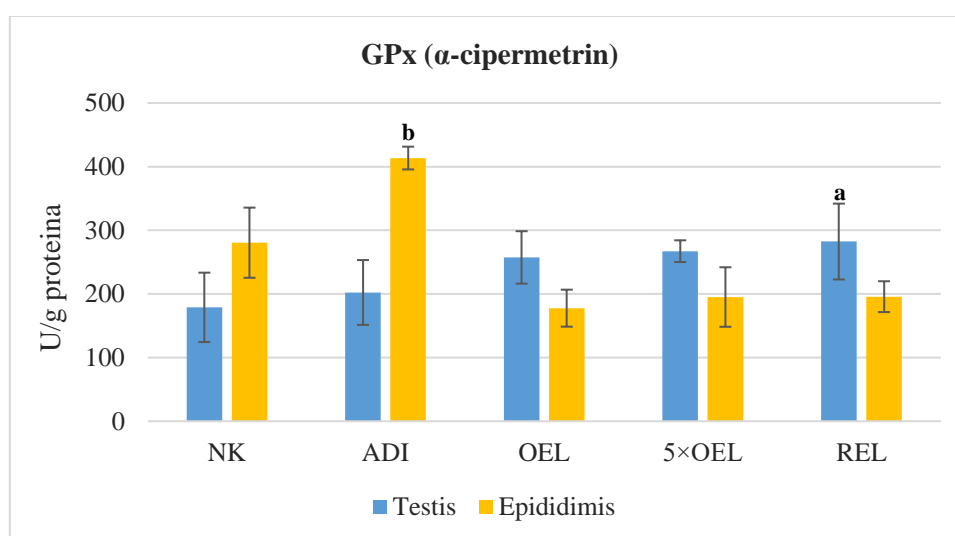


**Slika 17.** Koncentracija reduciranog glutationa (GSH) u testisu i epididimisu kontrolne skupine životinja i skupina životinja tretiranih imidaklopridom (opis oznaka životinja dan je u **Tablici 1.**). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (prema **Prilogu 2.** i **3.**) (a – statistički različito od kontrolne skupine, b – statistički različito od skupine tretirane s 2,25 mg imidakloprida/kg t.m./dan (1/200 LD<sub>50</sub>);  $p < 0,05$ ).

#### 4.5. Utjecaj tretmana $\alpha$ -cipermetrinom i imidaklopridom na katalitičku aktivnost glutatión peroksidaze (GPx) u testisu i epididimisu

**Slika 18.** prikazuje katalitičku aktivnost glutatión peroksidaze (GPx) u testisu i epididimisu kontrolne skupine životinja (NK) i pokusnih skupina životinja (ADI, OEL, 5×OEL, REL) oralno izloženih različitim dozama  $\alpha$ -cipermetrina (**Tablica 1.**) uzastopno tijekom 28 dana. Katalitička aktivnost GPx-a veća je u epididimisu nego u testisu kontrolne skupine životinja i životinja tretiranih s 0,02 mg  $\alpha$ -cipermetrina/kg t.m./dan (ADI), dok je kod ostalih skupina životinja (tretman s 0,15 mg/kg t.m./dan (OEL), 0,80 mg/kg t.m./dan (5×OEL) i 2,20 mg/kg t.m./dan (REL)) katalitička aktivnost GPx-a veća u testisu. Tretman  $\alpha$ -cipermetrinom

rezultirao je statistički značajnim povećanjem aktivnosti GPx-a u testisu ( $F = 3,943$ ,  $p < 0,05$ ; One-way ANOVA uz *post hoc* Tukey's HSD test). Katalitička aktivnost GPx-a u testisu životinja tretiranih s najvišom dozom  $\alpha$ -cipermetrina (2,20 mg/kg t.m./dan (REL)) bila je statistički značajno veća u usporedbi s kontrolnom skupinom. Tretman  $\alpha$ -cipermetrinom rezultirao je i statistički značajnom promjenom aktivnosti GPx-a u epididimisu ( $H = 12,862$ ,  $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis test uz Medijan test). Katalitička aktivnost GPx-a u epididimisu životinja tretiranih s 0,02 mg  $\alpha$ -cipermetrina/kg t.m./dan (ADI) bila je statistički značajno veća u usporedbi s životinjama tretiranima s 0,15 mg/kg t.m./dan (OEL).

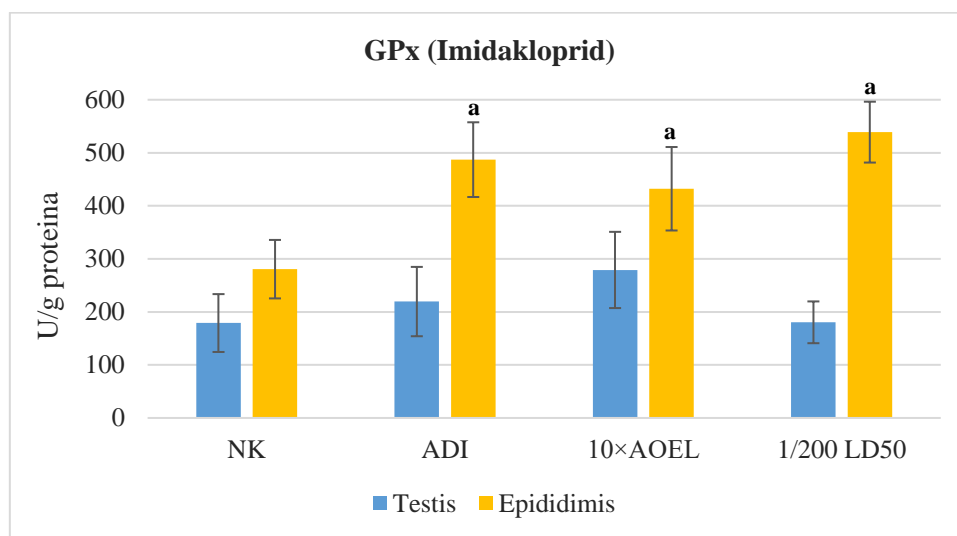


**Slika 18.** Katalitička aktivnost glutation peroksidaze (GPx) u testisu i epididimisu kontrolne skupine životinja i skupina životinja tretiranih  $\alpha$ -cipermetrinom (opis oznaka životinja dan je u **Tablici 1.**).

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (prema **Prilogu 2. i 3.**) (a – statistički različito od kontrolne skupine, b – statistički različito od skupine tretirane s 0,15 mg  $\alpha$ -cipermetrina/kg t.m./dan (OEL);  $p < 0,05$ ).

**Slika 19.** prikazuje katalitičku aktivnost glutation peroksidaze (GPx) u testisu i epididimisu kontrolne skupine životinja (NK) i pokusnih skupina životinja (ADI, 10×AOEL, 1/200 LD<sub>50</sub>) oralno izloženih različitim dozama imidakloprida (**Tablica 1.**) uzastopno tijekom 28 dana. Katalitička aktivnost GPx-a bila je veća u epididimisu nego u testisu kod svih skupina životinja. Tretman imidaklopridom nije statistički značajno utjecao na aktivnost GPx-a u testisu dok je aktivnost ovog enzima u epididimisu pokazala statistički značajan porast ( $F = 12,035$ ,  $p < 0,001$ ; One-way ANOVA uz *post hoc* Tukey's HSD test). Katalitička aktivnost GPx-a u epididimisu životinja tretiranih imidaklopridom (0,06 mg/kg t.m./dan (ADI), 0,80 mg/kg

t.m./dan ( $10\times$ AOEL) i 2,25 mg/kg t.m./dan ( $1/200$  LD<sub>50</sub>) bila je statistički značajno veća u odnosu na kontrolnu skupinu.

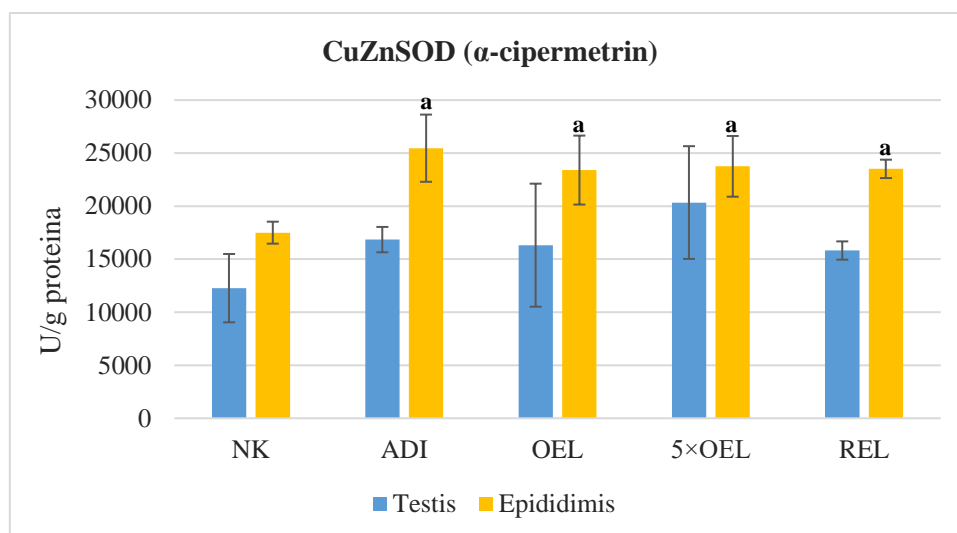


**Slika 19.** Katalitička aktivnost glutation peroksidaze (GPx) u testisu i epididimisu kontrolne skupine životinja i skupina životinja tretiranih imidaklopidom (opis oznaka životinja dan je u **Tablici 1.**). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (prema **Prilogu 2.** i **3.**) (a – statistički različito od kontrolne skupine,  $p < 0,05$ ).

#### 4.6. Utjecaj tretmana $\alpha$ -cipermetrinom i imidaklopidom na katalitičku aktivnost Cu, Zn-ovisne superoksid dismutaze (CuZnSOD) u testisu i epididimisu

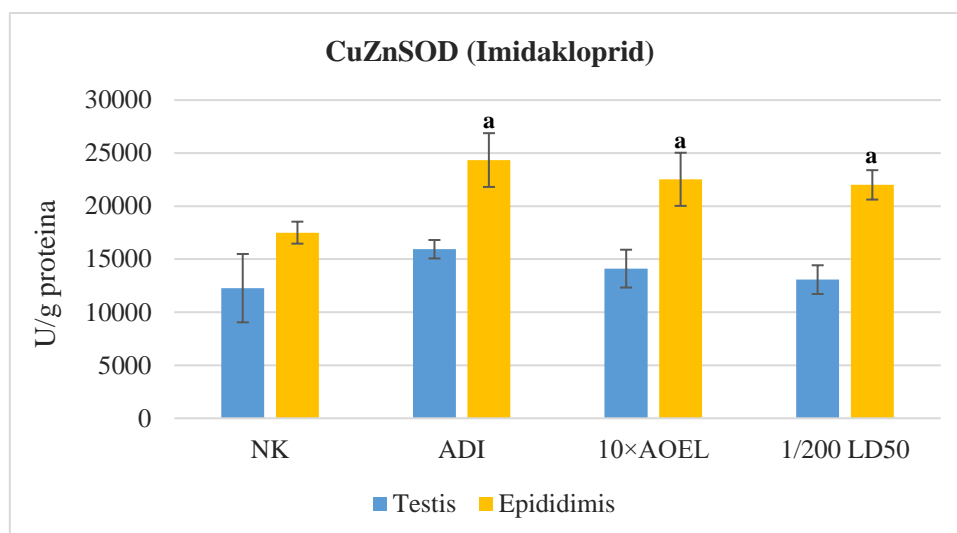
**Slika 20.** prikazuje katalitičku aktivnost Cu, Zn-ovisne superoksid dismutaze (CuZnSOD) u testisu i epididimisu kontrolne skupine životinja (NK) i pokusnih skupina životinja (ADI, OEL,  $5\times$ OEL, REL) oralno izloženih različitim dozama  $\alpha$ -cipermetrina (**Tablica 1.**) uzastopno tijekom 28 dana. Katalitička aktivnost CuZnSOD-a veća je u epididimisu nego u testisu kod svih skupina životinja. Tretman  $\alpha$ -cipermetrinom nije statistički značajno utjecao na promjenu aktivnosti CuZnSOD-a u testisu dok je aktivnost ovog enzima u epididimisu pokazala statistički značajan porast ( $F = 7,538$ ,  $p < 0,001$ ; One-way ANOVA uz *post hoc* Tukey's HSD test). Katalitička aktivnost CuZnSOD-a u epididimisu svih skupina životinja tretiranih  $\alpha$ -cipermetrinom (0,02 mg/kg t.m./dan (ADI), 0,15 mg/kg t.m./dan (OEL), 0,80 mg/kg t.m./dan ( $5\times$ OEL) i 2,20 mg/kg t.m./dan (REL)) bila je statistički značajno veća u odnosu na kontrolnu skupinu.





**Slika 20.** Katalitička aktivnost Cu, Zn-ovisne superoksid dismutaze (CuZnSOD) u testisu i epididimisu kontrolne skupine životinja i skupina životinja tretiranih  $\alpha$ -cipermetrinom (opis oznaka životinja dan je u **Tablici 1.**). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (prema **Prilogu 2.** i **3.**) (a – statistički različito od kontrolne skupine,  $p < 0,05$ ).

**Slika 21.** prikazuje katalitičku aktivnost Cu, Zn-ovisne superoksid dismutaze (CuZnSOD) u testisu i epididimisu kontrolne skupine životinja (NK) i pokusnih skupina životinja (ADI, 10×AOEL, 1/200 LD<sub>50</sub>) oralno izloženih različitim dozama imidakloprida (**Tablica 1.**) uzastopno tijekom 28 dana. Katalitička aktivnost CuZnSOD-a bila je veća u epididimisu nego u testisu kod svih skupina životinja. Tretman imidaklopridom nije statistički značajno utjecao na promjenu aktivnosti CuZnSOD-a u testisu dok je aktivnost ovog enzima u epididimisu pokazala statistički značajan porast ( $F = 10,781$ ,  $p < 0,001$ ; One-way ANOVA uz *post hoc* Tukey's HSD test). Katalitička aktivnost CuZnSOD-a u epididimisu svih skupina životinja tretiranih imidaklopridom (0,06 mg/kg t.m./dan (ADI), 0,80 mg/kg t.m./dan (10×AOEL) i 2,25 mg/kg t.m./dan (1/200 LD<sub>50</sub>)) bila je statistički značajno veća u odnosu na kontrolnu skupinu.

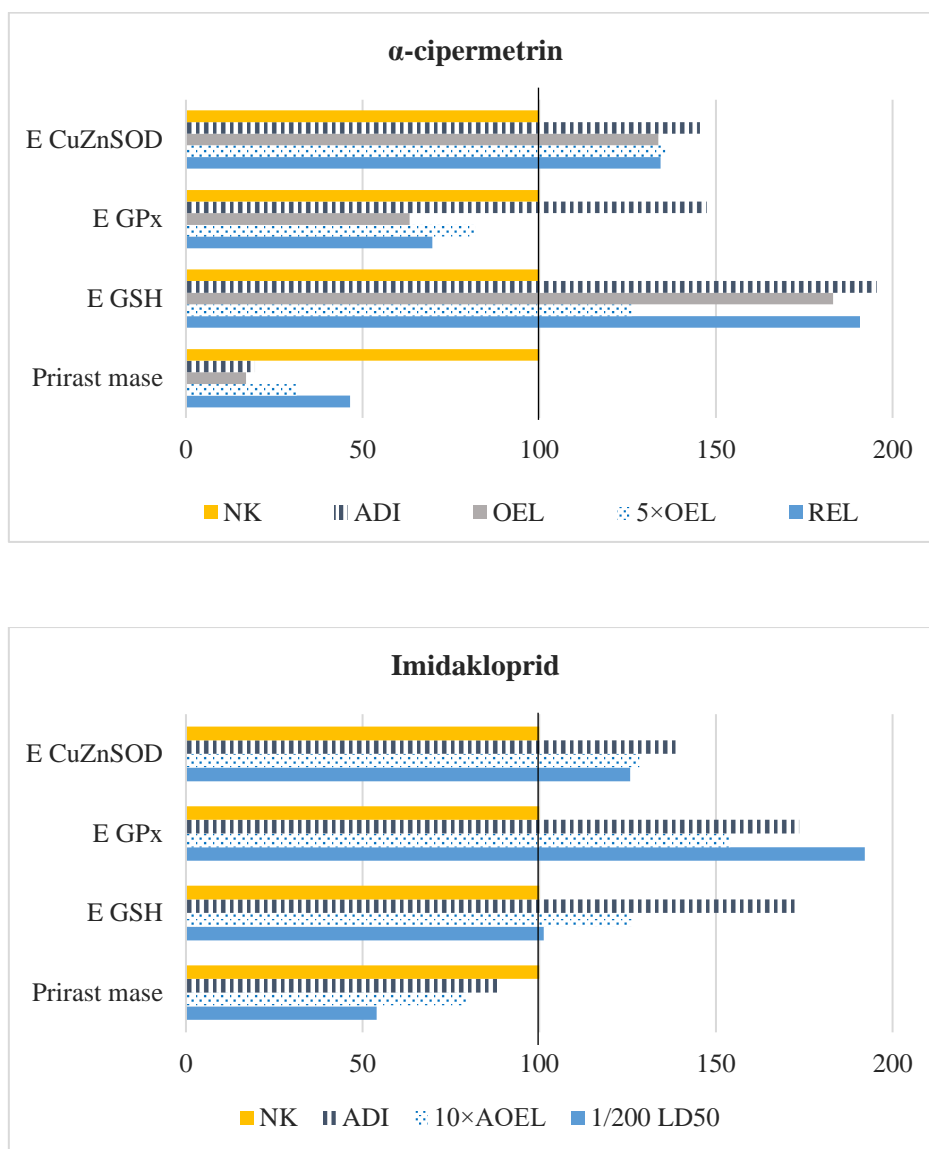


**Slika 21.** Katalitička aktivnost Cu, Zn-ovisne superoksid dismutaze (CuZnSOD) u testisu i epididimisu kontrolne skupine životinja i skupina životinja tretiranih imidaklopidom (opis oznaka životinja dan je u **Tablici 1.**). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (prema **Prilogu 2. i 3.**) (a – statistički različito od kontrolne skupine,  $p < 0,05$ ).

#### 4.7. Usporedba intenziteta učinaka $\alpha$ -cipermetrina i imidakloprida na prosječan prirast mase životinja, koncentracijsku razinu reduciranog glutationa (GSH) i katalitičku aktivnost antioksidacijskih enzima glutation peroksidaze (GPx) i Cu, Zn-ovisne superoksid dismutaze (CuZnSOD)

**Slika 22.** prikazuje intenzitet učinka  $\alpha$ -cipermetrina i imidakloprida na parametre kod kojih je uočena statistički značajna promjena između pokusnih skupina u odnosu na kontrolnu skupinu životinja nakon 28 dana tretmana ispitivanim pesticidom. Izuzevši statistički značajno smanjenje mase testisa uočeno nakon tretmana najvećom dozom imidakloprida, uočen je sličan učinak na ispitivane parametre koji je za oba insekticida bio statistički značajan za prosječan prirast mase životinja, koncentracijske razine GSH i katalitičke aktivnosti antioksidacijskih enzima GPx-a i CuZnSOD-a u epididimisu. Rezultati mjerenja za pojedini parametar prikazani su kao relativne vrijednosti u odnosu na kontrolnu skupinu (% od rezultata izmjenjenog za negativnu kontrolu koji je prikazan kao 100 % vrijednosti). Kod tretmana  $\alpha$ -cipermetrinom uočen je manji prosječan prirast mase tretiranih skupina (17 – 46 %) u odnosu na tretman imidaklopidom (54 – 88 %). Tretman  $\alpha$ -cipermetrinom rezultirao je i višom koncentracijskom razinom GSH u tretiranih životinja (126 – 196 % od kontrolne vrijednosti) u usporedbi s imidaklopidom (101 – 173 % od kontrolne vrijednosti), ali znatno manjom katalitičkom aktivnosti GPx-a (70 – 147 % za  $\alpha$ -cipermetrin vs. 154 – 192 % za imidaklopid). Katalitička

aktivnost CuZnSOD-a imala je sličan porast kod oba tretmana (134 – 146 % za  $\alpha$ -cipermetrin vs. 126 – 139 % za imidaklopid).



**Slika 22.** Intenzitet učinaka  $\alpha$ -cipermetrina i imidakloprida na prosječan prirast mase životinja, koncentracijsku razinu glutaciona (GSH) i katalitičku aktivnost antioksidacijskih enzima glutacion peroksidaze (GPx) i Cu, Zn-ovisne superoksid dismutaze (CuZnSOD) u epididimisu (E). Rezultati mjerenja za pojedini parametar prikazani su kao relativne vrijednosti (% od rezultata izmjenjenog za negativnu kontrolu (100 %)).

## 5. RASPRAVA

U današnje vrijeme raste potrošnja novih vrsta pesticida kao što su piretroidi ili "zeleni" insekticidi poput  $\alpha$ -cipermetrina te neonikotinoide tvari poput imidakloprida. Ovi spojevi su u izrazito širokoj upotrebi kao učinkovit nadomjestak organofosfatnim insekticidima, a razvijeni su kao zamjena za konvencionalne pesticide te za njih ne postoje dostatni znanstveni dokazi o netoksičnosti za ne ciljane organizme. Dostupni podaci o utjecaju navedenih insekticida na reproduktivne poremećaje su oskudni i preliminarni, a toksičnost niskih koncentracija  $\alpha$ -cipermetrina i imidakloprida do danas nije detaljno proučena. Koliko je poznato, ovo je prvo istraživanje u kojem su uspoređena ova dva najčešće korištena insekticida primijenjena u toksikološki relevantnim koncentracijama. Istraživanje je provedeno na koncentracijskim razinama insekticida koje se mogu susresti u svakodnevnom životu, izračunatih na temelju nekoliko toksikološki referentnih vrijednosti (granična vrijednost izloženosti na radu, dopuštena razina izloženosti primjenitelja, prihvatljiv dnevni unos i razina izloženosti stanovništva) za svaki testirani spoj. Navedene referentne vrijednosti dobivene aproksimacijama i ekstrapolacijama na temelju razine bez uočenog štetnog učinka (engl. *No Observed Adverse Effect Level* – NOAEL) dosad nisu eksperimentalno testirane.

Utjecaj  $\alpha$ -cipermetrina i imidakloprida na parametre oksidacijskog stresa primjenom pristupa s više biomarkera (analiza ukupnog antioksidacijskog kapaciteta (TAC), određivanje koncentracije reduciranog glutationa (GSH) te određivanje katalitičke aktivnosti glutation peroksidaze (GPx) i Cu, Zn-ovisne superoksid dismutaze (CuZnSOD)) ispitan je u tkivu testisa i epididimisa odraslih mužjaka Wistar štakora oralno izloženih koncentracijama  $\alpha$ -cipermetrina (0,02 (ADI); 0,15 (OEL); 0,80 (5×OEL); 2,20 (REL) mg/kg t.m./dan) i imidakloprida (0,06 (ADI); 0,80 (10×AOEL); 2,25 (1/200 LD<sub>50</sub>) mg/kg t.m./dan) koje odgovaraju dozama okolišne i profesionalne izloženosti ljudi uzastopno tijekom 28 dana. Dosadašnja istraživanja pokazala su da su antioksidacijski enzimi kao redoks biomarkeri dovoljno osjetljivi te da se mogu smatrati dobrim pokazateljima toksičnih učinaka neonikotinoide spojeva (Wang i sur. 2018).

Kod tretmana navedenim pesticidima uočen je sličan učinak na ispitivane parametre. Rezultati istraživanja pokazali su da oba testirana pesticidna spoja primijenjena u niskim koncentracijama uzrokuju značajnu promjenu prirasta mase životinja u odnosu na kontrolnu skupinu te značajan porast koncentracijske razine GSH i aktivnosti antioksidacijskih enzima GPx-a i CuZnSOD-a u epididimisu. Kod tretmana  $\alpha$ -cipermetrinom uočen je manji prosječan prirast mase tretiranih skupina životinja u odnosu na kontrolnu skupinu u usporedbi s

imidaklopidom. Tretman  $\alpha$ -cipermetrinom uzrokovao je veći porast relativne koncentracije GSH u epididimisu u odnosu na kontrolnu skupinu u usporedbi s imidaklopidom. Relativne vrijednosti za aktivnost GPx-a bile su znatno više u tkivu epididimisa kod tretmana imidaklopidom dok je relativna aktivnost CuZnSOD-a imala sličan porast u odnosu na kontrolnu skupinu kod oba tretmana.

### 5.1. Utjecaj tretmana $\alpha$ -cipermetrinom i imidaklopidom na prirast mase životinja te masu testisa i epididimisa

U provedenom istraživanju tretman  $\alpha$ -cipermetrinom rezultirao je smanjenjem prosječnog prirasta mase životinja sa statistički značajnom promjenom uočenom kod svih tretiranih skupina u odnosu na kontrolnu skupinu životinja, ali nije utjecao na promjenu mase testisa i epididimisa.

Rezultati našeg istraživanja u skladu su s rezultatima Elbetieha i sur. (2001) koji za tretman odraslih mužjaka Sprague-Dawley štakora od 13,15, 18,93 i 39,66 mg  $\alpha$ -cipermetrina/kg t.m./dan tijekom 12 tjedana navode statistički značajno smanjenje prirasta mase životinja. Statistički značajno smanjenje prirasta mase životinja uslijed oralne izloženosti mužjaka Sprague-Dawley štakora  $\alpha$ -cipermetrinu potvrđuju Hu i sur. (2011) za doze od 12,5, 25 i 50 mg/kg t.m./dan tijekom 15 dana. U istom istraživanju nije uočena statistički značajna promjena apsolutne mase testisa i epididimisa kao ni u istraživanjima koje su proveli Ikpeme i sur. (2016) na odraslim mužjacima Wistar štakora oralno izloženih dozama  $\alpha$ -cipermetrina od 5 i 10 mg/kg t.m./dan tijekom 65 dana te Li i sur. (2013) koji su štakore tretirali dozama od 7,5, 15, 30 i 60 mg cipermetrina/kg t.m./dan tijekom 15 dana. Značajno smanjenje prirasta mase životinja unatoč neograničenom pristupu hrani jasan je pokazatelj opće toksičnosti ovog insekticida. Statistički značajno smanjenje apsolutne mase testisa i epididimisa odraslih mužjaka Wistar štakora u rezultatima navode Sharma i sur. (2013) za tretman od 3,38 mg  $\alpha$ -cipermetrina/kg t.m./dan tijekom 28 dana te Alaa-Eldin i sur. (2017) za tretman od 12,5 mg  $\alpha$ -cipermetrina/kg t.m./dan tijekom 12 tjedana. Autori navode kako je smanjenje mase testisa uslijed tretmana cipermetrinom rezultat nekrotičnih promjena u sjemenim kanalicima, smanjenja broja zametnih stanica ili spermatogonija te spermija. Osim toga, smanjenje mase testisa može biti i rezultat nižih koncentracijskih razina folikulostimulirajućeg (FSH) i luteinizirajućeg (LH) hormona te testosterona u serumu koje je uočeno u ovim studijama (Alaa-Eldin i sur. 2017; Sharma i sur. 2013).

Rezultati tretmana imidaklopridom u provedenom su istraživanju bili slični učincima piretroida, odnosno uočeno je smanjenje prirasta mase životinja koje je bilo statistički značajno pri najvišoj primijenjenoj dozi (2,25 mg/kg t.m./dan) u usporedbi s prirastom mase svih ostalih skupina životinja. Masa epididimisa nije se značajno razlikovala između skupina, ali je u skladu s rezultatima prirasta mase životinja, uočeno značajno smanjenje mase testisa pri najvišoj primijenjenoj dozi u odnosu na kontrolnu skupinu i skupinu životinja tretiranih najnižom dozom imidakloprida.

Istraživanja provedena na odraslim mužjacima Wistar štakora oralno izloženih dozi imidakloprida od 2 i 8 mg/kg t.m./dan tijekom 90 dana (Bal i sur. 2012a) i 90 mg imidakloprida/kg t.m./dan tijekom 28 dana (Lonare i sur. 2016) navode statistički značajno smanjenje prirasta mase životinja i apsolutne mase epididimisa, dok se apsolutna masa testisa nije statistički značajno promijenila. Tretman imidaklopridom bio je popraćen smanjenim unosom hrane što je rezultiralo smanjenjem prirasta mase životinja (Lonare i sur. 2016). Tetsatsi i sur. (2019) u istraživanju provedenom na odraslim mužjacima Wistar štakora oralno izloženih tretmanu komercijalnom formulacijom imidakloprida (Colibri®) u dozi od 22,5 mg/kg t.m./dan tijekom 14 dana također navode statistički značajno smanjenje prirasta mase životinja, ali i smanjenje relativne mase testisa i epididimisa. Autori navode kako je manja masa testisa i epididimisa uočena kod tretiranih životinja izravna posljedica smanjenja koncentracije testosterona i ukupnih proteina. U ranijim istraživanjima uočeno je kako nikotin i njegovi agonisti mogu inhibirati 17- $\alpha$  hidroksilazu čime sprječavaju pretvorbu pregnenolona i progesterona u odgovarajuće prekursore, odnosno inhibiraju sintezu testosterona u stanicama testisa (Kasson i Hsueh 1985). To je potvrđeno i u kasnijim istraživanjima na odraslim mužjacima štakora gdje je tretman imidaklopridom rezultirao smanjenim izlučivanjem testosterona (Annabi i sur. 2015; Najafi i sur. 2010).

## **5.2. Utjecaj tretmana $\alpha$ -cipermetrinom i imidaklopridom na parametre oksidacijskog stresa u testisu i epididimisu**

U usporedbi s kontrolnom skupinom, jedino je tretman  $\alpha$ -cipermetrinom rezultirao statistički značajnim povećanjem aktivnosti GPx-a u testisu životinja i to pri najvišoj primijenjenoj dozi insekticida (2,20 mg/kg t.m./dan). Ostali parametri oksidacijskog stresa nisu se statistički značajno promijenili u testisu pokusnih životinja kod tretmana  $\alpha$ -cipermetrinom ili imidaklopridom. Za razliku od testisa, u tkivu epididimisa uočen je značajan porast koncentracijske razine GSH i katalitičke aktivnosti antioksidacijskih enzima GPx-a i

CuZnSOD-a kod životinja tretiranih  $\alpha$ -cipermetrinom ili imidaklopridom u usporedbi s kontrolnom skupinom.

Iako je smatran relativno sigurnim pesticidom, istraživanja su pokazala kako se izloženost  $\alpha$ -cipermetrinu može povezati s neurotoksičnošću, oksidacijskim stresom i apoptozom (Marjanović Čermak i sur. 2018). Pretpostavlja se da  $\alpha$ -cipermetrin ima sposobnost stvaranja reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta te da može utjecati na koncentracijske razine antioksidansa u organizmu putem svojih metabolita posredstvom citokroma P450 (Singh i sur. 2012). U studiji Sharma i sur. (2013) odrasli mužjaci Wistar štakora tretirani su s 3,38 mg  $\alpha$ -cipermetrina/kg t.m./dan tijekom 28 dana što je rezultiralo poremećajem parametara reprodukcijske funkcije (smanjenje mase testisa i epididimisa, smanjenje koncentracijske razine spolnih hormona, smanjenje pokretljivosti i broja spermija, porast broja abnormalnih spermija). Rezultati istraživanja pokazali su značajno smanjenje koncentracijske razine GSH u skupini izloženoj  $\alpha$ -cipermetrinu u usporedbi s kontrolom, vjerojatno zbog povećanog korištenja GSH za uklanjanje nastalih slobodnih radikala. Uočeno je i smanjenje aktivnosti antioksidacijskih enzima (SOD, CAT, GPx, GR i GST) u testisu životinja izloženih  $\alpha$ -cipermetrinu u usporedbi s kontrolnom skupinom. Autori navode kako bi smanjenje aktivnosti GPx-a u testisu moglo biti posljedica smanjenja koncentracijske razine GSH, budući da se GSH koristi kao supstrat za GPx koji katalizira reakciju redukcije vodikovog peroksida (Pizzorno 2014). SOD se smatra prvom linijom obrane od štetnih učinaka ROS-ova u stanici, a katalizira raspad superoksidnih radikala na vodikov peroksid i molekularni kisik (Stryer i sur. 2013). Suvišak ROS-ova može inhibirati SOD što dovodi do daljnjeg nakupljanja reaktivnih vrsta i porasta opsega oštećenja tkiva. Smanjenje aktivnosti SOD-a također može rezultirati nakupljanjem vodikovog peroksida u testisima te inhibirati aktivnost CAT-a i GPx-a (Stryer i sur. 2013). Negativan učinak  $\beta$ -cipermetrina na parametre reprodukcijske funkcije (masa reprodukcijskih organa i kvaliteta spermija) uočen je u istraživanju Wang i sur. (2009) nakon 35 dana tretmana s 10 ili 20 mg  $\beta$ -cipermetrina/kg t.m./dan u usporedbi s kontrolnom skupinom, što je znatno viša primijenjena doza pesticida od našeg tretmana. Autori navode kako su ovi toksični učinci vjerojatno uzrokovani oksidacijskim stresom, budući da su bili popraćeni značajnim povećanjem razine MDA i dušikovog(II) oksida te smanjenjem aktivnosti antioksidacijskih enzima (SOD, CAT i GPx) u testisu. U navedenom istraživanju nije uočen nikakav učinak na parametre oksidacijskog stresa pri dozi od 1 mg  $\beta$ -cipermetrina/kg t.m./dan. Rezultati dobiveni u mužjaka albino Wistar štakora nakon 60 dana tretmana s 12 mg cipermetrina/kg t.m./dan (Eraslan i sur. 2015). U navedenom istraživanju uočen je porast razine

MDA u testisu i smanjenje aktivnosti antioksidacijskih enzima (SOD, CAT i GPx) u odnosu na kontrolnu skupinu, što je protumačeno kao pokazatelj poremećaja oksidacijske/antioksidacijske ravnoteže. Kako navode autori, izloženost cipermetrinu dovela je do stvaranja visoke koncentracijske razine slobodnih radikala koje stanični obrambeni sustav nije mogao u potpunosti inaktivirati što je rezultiralo nastankom LPO-a, odnosno oksidacijskog stresa.

U usporedbi s našim istraživanjem, znatno više doze i dulja vremenska izloženost životinja cipermetrinu u navedenim studijama mogli bi biti glavni uzročnici oštećenja stanične strukture i smanjenja aktivnosti antioksidacijskih enzima. Porast katalitičke aktivnosti GPx-a u testisu uočen u našem istraživanju pri najvišoj primijenjenoj dozi insekticida (2,20 mg  $\alpha$ -cipermetrina/kg t.m./dan) vjerojatno je rezultat prilagodbe staničnog odgovora i aktivacije mehanizama antioksidacijske obrane. Ostale doze primijenjene u ovom istraživanju nisu bile dovoljno toksične da bi izazvale oštećenje stanica testisa koje zahtjeva aktivaciju antioksidacijskih enzima određivanih u ovom istraživanju te su vjerojatno drugi enzimski i neenzimski sustavi prisutni u testisu bili dovoljni za eliminaciju suviška reaktivnih vrsta.

Dosadašnja istraživanja, provedena uglavnom na laboratorijskim štakorima, pokazala su da imidakloprid može štetno djelovati na reproduktivnu sposobnost u generacijama roditelja i potomaka te imati štetan utjecaj na razvoj potomstva. Poput mnogih pesticida, imidakloprid može djelovati kao endokrini disruptor te poremetiti homeostazu metabolizma i steroidogenezu inhibiranjem aktivnosti enzima citokroma P450 (Mikolić i Brčić Karačonji 2018). Svi navedeni učinci imidakloprida mogu predstavljati ozbiljan rizik za reprodukciju i razvoj s dugoročnim posljedicama u odrasloj dobi.

Studije Bal i sur. (2012 a,b) pokazale su da je tromjesečna izloženost imidaklopridu u dozama manjim od razine bez uočenog štetnog učinka (NOAEL), koja za štakore iznosi 5 – 10 mg/kg t.m./dan, nepovoljno utjecala na funkciju testisa tijekom ranog postnatalnog razvoja i u odrasloj dobi. Povišene razine masnih kiselina i LPO-a, uz smanjenu koncentracijsku razinu GSH u testisima izloženih štakora rezultirale su oslabljenom plodnošću i uzrokovale povećanu apoptozu zametnih stanica i fragmentaciju sjemenske DNA te smanjenu koncentracijsku razinu testosterona u testisu i veću stopu abnormalnosti spermija. Autori su povezali ove štetne učinke s indukcijom oksidacijskog stresa u testisima koji su posebno osjetljivi na oksidacijska oštećenja zbog prisutnosti višestruko nezasićenih masnih kiselina. Ove su studije prve sugerirale moguće štetne učinke imidakloprida na reprodukciju. Rezultati kasnijih istraživanja dokazali su prisutnost LPO-a i smanjenje koncentracijske razine GSH te aktivnosti antioksidacijskih enzima (CAT, SOD, GPx i GST) u testisima štakora izloženih višim dozama



imidakloprida (45 i 90 mg/kg t.m./dan, što odgovara 1/10 i 1/5 LD<sub>50</sub>, odnosno 16.9 mg/kg t.m./dan, što odgovara najnižoj dozi kod koje je uočen štetan učinak (engl. *Lowest Observed Adverse Effect Level* – LOAEL)) tijekom 28 dana i potvrdili da je oksidacijski stres djelomično odgovoran za reproduktivnu toksičnost imidakloprida (Lonare i sur. 2016; Mahajan i sur. 2018). Tretman imidaklopridom u navedenim je istraživanjima rezultirao značajnim smanjenjem aktivnosti antioksidacijskih enzima u testisu što može biti posljedica inaktivacije enzima uslijed kumulativnog nakupljanja insekticida u tkivu prilikom izloženosti višim koncentracijama. Ovi učinci u konačnici dovode do oštećenja stanice i patohistoloških promjena tkiva testisa (Lonare i sur. 2016).

Suprotno rezultatima dosad navedenih studija, u istraživanju koje su proveli Tetsatsi i sur. (2019) uočen je značajan porast aktivnosti antioksidacijskih enzima SOD-a, CAT-a i ukupnih peroksidaza u testisima odraslih mužjaka štakora nakon 14 dana tretmana komercijalnom formulacijom imidakloprida (Colibri®) u dozi od 22,5 mg/kg t.m./dan. Navedena doza imidakloprida odabrana je na temelju preliminarnog eksperimenta kao najniža doza koja je rezultirala najvećim reproduktivnim oštećenjima bez smrtnosti životinja. Porast aktivnosti antioksidacijskih enzima u testisu ukazuje na to da je izlaganje navedenoj formulaciji izazvalo umjerenu toksičnost. Izostanak učinka imidakloprida na mjerene parametre oksidacijskog stresa u testisu može se pripisati vrlo niskim dozama primijenjenim u ovom istraživanju.

Za razliku od testisa, tkivo epididimisa se u ovom istraživanju pokazalo osjetljivijim na oksidacijske promjene nastale uslijed izloženosti niskim dozama  $\alpha$ -cipermetrina i imidakloprida, međutim niti jedna od dostupnih studija nije istraživala utjecaje insekticida na parametre oksidacijskog stresa u epididimisu. Poznato je da kod sisavaca epididimisi imaju važnu ulogu u sazrijevanju i skladištenju spermija. Tijekom epididimalnog tranzita koncentracija spermija doseže do 10<sup>10</sup> stanica/mL, a istovremeno se povećava pokretljivost i metabolizam spermija što gamete čini podložnijima oksidacijskom stresu (Dacheux i sur. 2003). Kako bi zaštitili spermije od štetnih učinaka nastalih djelovanjem reaktivnih kisikovih/dušikovih vrsta ili drugih toksikanata, epididimisi izlučuju tekućinu bogatu bjelančevinama i steroidima (Aladrović i sur. 2017). Žura Žaja i sur. (2019) navode da specifični mikrookoliš epididimisa štiti gamete do ejakulacije, a odgovoran je i za regulaciju funkcije i očuvanje integriteta epididimisa. Karakteriziraju ga optimalna temperatura, pH vrijednost i parcijalni tlak kisika te prisustvo energetskih supstrata. U nedostatku supstrata za glikolizu, spermije energijom opskrbljuju endogeni i egzogeni lipidi neophodni za njihovu

održivost i gibljivost (Juyena i Stelletta 2012). Svi navedeni uvjeti bitni su za sazrijevanje spermija, a narušavanje bilo kojeg od njih može dovesti do poremećaja oplodne sposobnosti i očuvanja spermija (Arrotéia i sur. 2012; Dacheux i sur. 2005).

Zbog velikog udjela višestruko nezasićenih masnih kiselina i oskudne količine citoplazme stanice spermija vrlo su osjetljive na oksidacijska oštećenja što može rezultirati poremećajem funkcije spermija. Epididimis je dobro opremljen antioksidacijskim sustavom koji štiti spermije (Vernet i sur. 2004), a skupina GPx enzima ima najznačajniju funkciju u zaštiti i očuvanju oplodne sposobnosti spermija tijekom njihovog stvaranja, sazrijevanja i pohrane u epididimisu (Chabory i sur. 2010; Žura Žaja i sur. 2019). Osim toga, mRNA enzima CuZnSOD-a eksprimirana je u visokim razinama duž cijelog epididimisa te se ne razlikuje značajno između različitih regija ovog organa (Jervis i Robaire 2001). Porast koncentracijske razine GSH i katalitičke aktivnosti enzima GPx-a i CuZnSOD-a u epididimisu uočen u našem istraživanju vjerojatno je rezultat adaptivnog odgovora na niske razine oksidacijskog stresa ili oštećenja, što može imati za posljedicu pojačanu otpornost na toksikante. Sadržaj GSH ovisi o okolišnim čimbenicima i funkcionira kao ravnoteža između sinteze novog GSH i njegova iskorištenja. Male koncentracije toksikanta potiču ubrzanu sintezu sustava popravka i aktivaciju antioksidacijskih mehanizama zaštite što omogućuje poboljšanu zaštitu stanica i organa od oksidacijskog stresa. Povećanjem brzine sinteze GSH uslijed izlaganja pesticidima i sličnim spojevima koji stvaraju ROS-ove, može se povećati sadržaj GSH (Valko i sur. 2006) koji se koristi i kao supstrat za GPx (Pizzorno 2014).

## 6. ZAKLJUČAK

- ✓ Oba testirana spoja ( $\alpha$ -cipermetrin i imidaklopid) primijenjena u niskim koncentracijama uzrokovala su značajno smanjenje prirasta mase mužjaka Wistar štakora u odnosu na kontrolnu skupinu. Kod tretmana  $\alpha$ -cipermetrinom uočen je manji prosječan prirast mase tretiranih skupina u odnosu na tretman imidaklopidom.
- ✓ Životinje tretirane najvišom dozom imidakloprida (2,25 mg/kg t.m./dan) imale su značajno manju masu testisa u odnosu na kontrolnu skupinu životinja dok tretman  $\alpha$ -cipermetrinom nije utjecao na promjenu mase testisa i epididimisa.
- ✓ Tretman  $\alpha$ -cipermetrinom uzrokovao je značajan porast aktivnosti GPx-a u testisu pri najvišoj primijenjenoj dozi (2,20 mg/kg t.m./dan) te značajan porast koncentracije GSH i aktivnosti antioksidacijskih enzima GPx-a i CuZnSOD-a u epididimisu.
- ✓ Tretman imidaklopidom uzrokovao je značajan porast koncentracije GSH i aktivnosti antioksidacijskih enzima GPx-a i CuZnSOD-a u epididimisu.
- ✓ Tretman  $\alpha$ -cipermetrinom uzrokovao je veći porast relativne koncentracije GSH u tretiranih životinja u usporedbi s imidaklopidom, ali su relativne vrijednosti za porast aktivnosti GPx-a bile znatno niže nego kod tretmana imidaklopidom. Relativna aktivnost CuZnSOD-a imala je sličan porast u odnosu na kontrolnu skupinu kod oba tretmana.

## 7. LITERATURA

- Abdollahi M., Ranjbar A., Shadnia S., Nikfar S., Rezaie A. (2004): Pesticides and oxidative stress: a review. *Med. Sci. Monit.* **10**: 141–147.
- Aitken R. J., Roman S. D. (2008): Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **1**: 15–24.
- Aitken R. J., Sawyer D. (2003): The human spermatozoon - not waving but drowning. *Adv. Exp. Med. Biol.* **518**: 85–98.
- Alaa-Eldin E. A., El-Shafei D. A., Abouhashem N. S. (2017): Individual and combined effect of chlorpyrifos and cypermethrin on reproductive system of adult male albino rats. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **24**: 1523–1543.
- Aladrović J., Lovrić Z., Vranković L., Beer Ljubić B., Prevendar Crnić A., Lojkić M., Majić Balić I. (2017): Utjecaj oksidacijskog stresa na plodnost muških rasplodnjaka. *Hrvatski veterinarski vjesnik* **25**: 64–73.
- Alavanja M. C., Ross M. K., Bonner M. R. (2013): Increased cancer burden among pesticide applicators and others due to pesticide exposure. *C: Cancer J. Clin.* **63**: 120–142.
- Al-Sarar A. S., Abobakr Y., Bayoumi A. E., Hussein H. I. (2015): Cytotoxic and genotoxic effects of abamectin, chlorfenapyr, and imidacloprid on CHO<sub>K1</sub> cells. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **22**: 17041–17052.
- Alvarez J. G., Touchstone J. C., Blasco L., Storey B. T. (1987): Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa: Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J. Androl.* **8**: 338–348.
- Annabi A., Dhouib I. B., Lamine A. J., El-Golli N., Gharbi N., El-Fasâa S., et al. (2015): Recovery by N-acetylcysteine from subchronic exposure to Imidacloprid induced hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis tissues injury in male rats. *Toxicol. Mech. Methods* **25**(7): 524–31.
- Arrotéia K. F., Garcia P. V., Barbieri M. F., Justino M. L., Pereira, L. A. V. (2012): The Epididymis: Embryology, Structure, Function and Its Role in Fertilization and Infertility, Embryology. U: Periera L. V. (ur.) Updates and Highlights on Classic Topics, InTech, str. 41–67.
- Badgajar P. C., Jain S. K., Singh A. et al. (2013): Immunotoxic effects of imidacloprid following 28 days of oral exposure in BALB/c mice. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **35**: 408–418.
- Bagri P., Kumar V., Sikka A. K. (2016): Assessment of imidacloprid induced mutagenic effects in somatic cells of Swiss albino male mice. *Drug Chem. Toxicol.* **39**: 412–417.
- Bal R., Naziroğlu M., Türk G., Yılmaz Ö., Kuloğlu T., Etem E., Baydas G. (2012b): Insecticide imidacloprid induces morphological and DNA damage through oxidative toxicity on the reproductive organs of developing male rats. *Cell Biochem. Funct.* **30**: 492–499.
- Bal R., Türk G., Tuzcu M., Yılmaz Ö., Kuloğlu T., Gundogdu R., Gür S., Agca A., Ulas M., Çambay Z., Tuzcu Z., Gencoglu H., Guvenc M., Ozsahin A. D., Kocaman N., Aslan A., Etem E. (2012a): Assessment of imidacloprid toxicity on reproductive organ system of adult male rats. *J. Environ. Sci. Health B* **47**: 434–444.
- Barry K. H., Koutros S., Berndt S. I., Andreotti G., Hoppin J. A., Sandler D. P., Burdette L. A., Yeager M., Freeman L. E., Lubin J. H., Ma X., Zheng T., Alavanja M. C. (2011): Genetic variation in base excision repair pathway genes, pesticide exposure, and prostate cancer risk. *Environ. Health Persp.* **119**: 1726–32.
- Becker H., Vogel W., Terrier, C. (1988): Embryotoxicity study (including teratogenicity) with NTN 33893 technical in the rabbit. Unpublished Report no. R 4583, submitted to WHO by Bayer AG, Mannheim, Germany. INCHEM Toxicological Evaluations: Imidacloprid; International Programme on Chemical Safety. Geneva: WHO.

- Belsten J. L., Wright A. J. (1995a): European Community: FLAIR common assay for wholeblood glutathione peroxidase (GSH-Px); results of an inter-laboratory trial. *Eur. J. Clin. Nutr.* **49**: 921–927.
- Belsten J. L., Wright A. J. (1995b): European community: FLAIR common assay for erythrocyte superoxide dismutase (SOD); results of an inter-laboratory trial. *Eur. J. Clin. Nutr.* **49**: 928–931.
- Betteridge D. J. (2000): What is oxidative stress? *Metabolism.* **49**: 3–8.
- Biswas A. K., Kondaiah N., Anjaneyulu A. S. R., Mandal P. K. (2010): Food safety concerns of pesticides, veterinary drug residues and mycotoxins in meat and meat products. *Asian J. Anim. Sci.* **4**: 46–55.
- Bradford M. M. (1976): Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dyebinding. *Anal. Biochem.* **72**: 248–254.
- Broznić D., Milin Č. (2009): Imidaklopid - „čuvar“ maslinika. *Medicina Fluminensis.* **45**: 119–126.
- Casida J. E. (2012): The greening of pesticide-environment interactions: some personal observations. *Environ. Health Perspect.* **120**: 487–493.
- Chabory E., Damon E. C., Lenoir A., Henry-Berger J., Vernet P., Cadet R., Saez F., Drevet J. R. (2010): Mammalian glutathione peroxidases control acquisition and maintenance of spermatozoa integrity. *J. Anim. Sci.* **88**: 1321–1331.
- Chao S. L., Casida J. E. (1997): Interaction of imidaclopid metabolites and alongs with nicotinic acetylcholine receptor of mouse brain in relation to toxicity. *Pestic. Biochem. Pshys.* **58**: 77–88.
- Circu M. L., Aw T. Y. (2010): Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* **45**: 749–762.
- Clemens M. R., Waller H. D. (1987): Lipid peroxidation in erythrocytes. *Chem. Phys. Lipids* **45**: 251–268.
- Coats J. R. (1990): Mechanisms of toxic action and structure activity relationships for organochlorine and synthetic pyrethroid insecticides. *Environ. Health Persp.* **87**: 255–262.
- Cummins J. M., Jequier A. M., Raymond K. (1994): Molecular biology of human male infertility: Links with aging, mitochondrial genetics and oxidative stress. *Mol. Rep. Dev.* **37**: 345–362.
- Čepelak I. (2009): Slobodni radikali i antioksidansi. U: Čvorišćec D., Čepelak I. (ur.) Štrausova medicinska biokemija. Medicinska naklada, Zagreb, str. 638–648.
- Dacheux J. L., Gatti J. L., Dacheux F. (2003): Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microsc. Res. Tech.* **61**: 7.
- De Lamirande E., Gagon C. (1993): A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *Int. J. Androl.* **16**: 21–25.
- Di Muccio A., Fidente P., Barbini D. A., Dommarco R., Seccia S., Morrìca P. (2006): Application of solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry to the determination of neonicotinoid pesticide residues in fruit and vegetables. *J. Chromatogr. A.* **1108**: 1–6.
- Duzguner V., Erdogan S. (2010a): Chronic exposure to imidaclopid induces inflammation and oxidative stress in the liver & central nervous system of rats. *Pestic. Biochem. Phys.* **104**: 58–64.
- Duzguner V., Erdogan S. (2010b): Acute oxidant and inflammatory effects of imidaclopid on the mammalian central nervous system and liver in rats. *Pestic. Biochem. Phys.* **97**: 412–417.
- Elbetieha A., Da'as S. I., Khamas W., Darmani H. (2001): Evaluation of the Toxic Potentials of Cypermethrin Pesticide on Some Reproductive and Fertility Parameters in the Male Rats. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **41**: 522–528.

- El Demerdash F., Jebur A. B., Nasr H. M. (2013): Oxidative stress and biochemical perturbations induced by insecticides mixture in rat testes. *J. Environ. Sci. Health B* **48**: 593–599.
- Ellman G. L. (1958): A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. *Arch. Biochem. Biophys.* **74**: 443–450.
- Eraslan G., Kanbur M., Siliğ Y., Karabacak M., Sarlca Z. S., Şahin S. (2015): The Acute and Chronic Toxic Effect of Cypermethrin, Propetamphos, and Their Combinations in Rats. *Environmental Toxicology DOI* 10.1002/tox
- Erel O. (2004): A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin. Biochem.* **37**: 277–285.
- EU, 2009. Directive 2009/128/EC of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 establishing a framework for Community action to achieve the sustainable use of pesticides. *OJ L* 309, 71.
- Fernández-Checa J., Kaplowitz N., Garcia-Ruiz C., Colell A., Miranda M., Mai M., Ardite E., Morales A. (1997): GSH transport in mitochondria: defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol-induced defect. *Am. J. Physiol.* **273**: 7–17.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). The International Code of Conduct on Pesticide Management. Rome: FAO/WHO; 2014.
- Fujii J., Iuchi Y., Matsuki S., Ishii T. (2003): Cooperative function of antioxidant and redox systems against oxidative stress in male reproductive tissues. *Asian J. Androl.* **5**: 231–242.
- Garcia-Ruiz C., Fernández-Checa J. C. (2006): Mitochondrial glutathione: hepatocellular survival-death switch. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **21**: 3–6.
- Gawade L., Dadarkar S. S., Husain R., Gatne M. (2013): A detailed study of developmental immunotoxicity of imidacloprid in Wistar rats. *Food. Chem. Toxicol.* **51**: 61–70.
- Hafez E. M., Issa S. Y., Al-Mazroua M. K. et al. (2016): The neonicotinoid insecticide imidacloprid: a male reproductive system toxicity inducer-human and experimental study. *Toxicol. Open Access* **2**: 1000109.
- Hales D. B., Allen J., Shankara T., Janus P., Buck S., Diemer T., Held Hales K. (2005): Mitochondrial function in Leydig cell steroidogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1061**: 120–134.
- Halliwell B., Gutteridge J. M. C., Cross C. E. (1992): Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now? *J. Lab. Clin. Med.* **119**: 598–620.
- Heikal T. M., Mossa A. T. H., Abdel Rasoul M. A., Marei G. I. K. (2013): The ameliorating effects of green tea extract against cyromazine and chlorpyrifos induced liver toxicity in male rats. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* **6**: 48–55.
- Hu J. X., Li Y. E., Li J. et al. (2011): Toxic effects of cypermethrin on the male reproductive system: with emphasis on the androgen receptor. *J. Appl. Toxicol.* **33**: 576–585.
- Ikpeme E. V., Okonko L. E., Udensi O. U. (2016): Detrimental Effects of Chlorpyrifos and Cypermethrin Reproductive Physiology of Male Albino Rats. *Res. J. Environ. Toxicol.* **10**: 68–74.
- Ince S., Kucukkurt I., Demirel H. H., Turkmen R., Zemheri F., Akbel E. (2013): The role of thymoquinone as antioxidant protection on oxidative stress induced by imidacloprid in male and female Swiss albino mice. *Toxicol. Environ. Chem.* **95**(2): 318–329.
- Jabłońska-Trypuc A. (2017): Pesticides as inducers of oxidative stress. *ROS* **3**: 96–110.
- Jervis K. M., Robaire B. (2001): Dynamic changes in gene expression along the rat epididymis. *Biol. Reprod.* **65**: 696–703.

- 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**: 124–130.
- Jomova K., Valko M. (2011): Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* **283**: 65–87.
- Juyena N. S., Stelletta C. (2012): Seminal Plasma: An Essential Attribute to Spermatozoa. *J. Androl.* **4**: 536–551.
- Jurković S., Osredkar J., Marc J. (2008): Molekularni utjecaj glutation-peroksidaze u autoksidacijskim procesima. *Biochem. Medica* **18**(2):162–174.
- Kale M., Rathore N., John S., Bhatnagar D. (1999): Lipid peroxidative damage on pyrethroid exposure and alterations in antioxidant status in rat erythrocytes: a possible involvement of reactive oxygen species. *Toxicol. Lett.* **105**: 197–205.
- Kalender S., Uzun F. G., Durak D., Demir F., Kalender Y. (2010): Malathion-induced hepatotoxicity in rats: The effects of vitamins C and E. *Food Chem. Toxicol.* **48**: 633–638.
- Kanbur M., Liman B. C., Eraslan G., Altinordulu S. (2008): Effects of Cypermethrin, Propetamphos, and Combination Involving Cypermethrin and Propetamphos on Lipid Peroxidation in Mice. *Environ. Toxicol.* **23**: 73–79.
- Kaplowitz N., Aw T. Y., Ookhtens M. (1985): The regulation of hepatic GSH. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **25**: 714–744.
- Kapoor U., Srivastava M. K., Bhardwaj S., Srivastava L. P. (2010): Effect of imidacloprid on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in female rats to derive its NOEL. *J. Toxicol. Sci.* **35**: 577–581.
- Kasson B. G., Hsueh A. J. (1985): Nicotinic cholinergic agonists inhibit androgen biosynthesis by cultured rat testicular cells. *Endocrinol.* **117**(5):1874–1880.
- Kaya M., Boleken M. E., Zeyrek F., Ozardali I., Kanmaz T., Erel O., Yücesan S. (2006): Oxidative and Antioxidative Status in the Testes of Rats with Acute Epididymitis. *Urol. Int.* **76**: 353–358.
- Kemal Duru N., Morshedi M., Oehninger S. (2000): Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Int. J. Fertil. Steril.* **74**: 1200–1207.
- Koziorowska-Gilun M., Gilun P., Fraser L., Koziorowski M., Kordan W., Stefanczyk-Krzymowska S. (2011): Antioxidant Defence System of Boar Cauda Epididymidal Spermatozoa and Reproductive Tract Fluids. *Reprod. Domest. Anim.* **46**: 527–533.
- Lee B. W., Oh S. H., Chung J. H., Moon C. K., Lee B. H. (2004): *N*-Nitrosometabolite of carbofuran induces apoptosis in CHL cells by cytochrome *c*-mediated activation of caspases. *Toxicol.* **3**: 51–58.
- Li Y. F., Pan C., Hu J. X., Li J., Xu L. C. (2013): Effects of Cypermethrin on Male Reproductive System in Adult Rats. *Biomed Environ Sci* **26**(3): 201–208.
- Liu D. (1996): The roles of free radicals in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Mol. Neurosci.* **7**: 159–167.
- Liu L., Hu J. X., Wang H., Chen B. J., He Z., Xu L. C. (2010): Effects of beta-cypermethrin on male rat reproductive system. *Environ. Toxicol. and Pharmacol.* **30**: 251–256.
- Liu M. Y., Casida J. E. (1993): High affinity binding of [<sup>3</sup>H]-imidacloprid in the insect acetylcholine receptor. *Pestic. Biochem. Phys.* **46**: 40–46.
- Limón-Pacheco J., Gonsbatt M. E. (2009): The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **674**: 137–147.

- Lohiya A., Kumar V., Punia J. S. (2018): Sub-acute oxidant and histopathological effects of imidacloprid on kidney of adult female Wistar rats. *Indian J. Anim. Res.* **52**(9): 1324–1330.
- Lonare M., Kumar M., Raut S. et al. (2014): Evaluation of imidacloprid-induced neurotoxicity in male rats: a protective effect of curcumin. *Neurochem. Int.* **78**: 122–129.
- Lonare M., Kumar M., Raut S. et al. (2016): Evaluation of ameliorative effect of curcumin on imidacloprid-induced male reproductive toxicity in Wistar rats. *Environ. Toxicol.* **10**: 1250–1263.
- Lu S. C. (2009): Regulation of glutathione synthesis. *Mol. Asp. Med.* **30**: 42–59.
- Lu S. C. (2013): Glutathione synthesis. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1830**: 3143–3153.
- Macan J., Varnai V. M., Turk R. (2006): Zdravstveni učinci piretrina i piretrodia. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **57**: 237–243.
- Mahajan L., Verma P. K., Raina R., Sood S. (2018): Potentiating effect of imidacloprid on arsenic-induced testicular toxicity in Wistar rats. *BMC Pharmacol. and Toxicol.* **19**: 3–18.
- Maier C. M., Chan P. H. (2002): Role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders. *Neuroscientist.* **8**: 323–334.
- Mani U. F., Islam A. K., Prasad V. et al. (2002): Steroidogenic alterations in testes and sera of rats exposed to formulated fenvalerate by inhalation. *Human Exp. Toxicol.* **21**: 593–597.
- Marjanović Čermak A. M., Pavičić I., Želježić D. (2018): Redox imbalance caused by pesticides: a review of OPENTOX-related research. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **69**: 126–134.
- Marklund S. (1984): Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *Biochem. J.* **222**: 649–655.
- McCauley L. A., Kent Anger W., Keifer M., Langley R., Robson M. G., Rohlman D. (2006): Studying health outcomes in farmworker populations exposed to pesticides. *Environ. Health Persp.* **114**: 953–960.
- Meister A., Anderson M. E. (1983): Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.* **52**: 711–760.
- Mikolić A., Brčić Karačonji I. (2018): Imidacloprid as reproductive toxicant and endocrine disruptor: investigations in laboratory animals. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **69**: 103–108.
- Mossa A. T. H., Heikal T. M., Omara E. A. A. (2012): Physiological and histopathological changes in the liver of male rats exposed to paracetamol and diazinon. *Asian Pacific J. Trop. Biomed.* **2**: 1683–1690.
- Mostafalou S., Abdollah M. (2013): Pesticides and human chronic diseases: evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicol. Appl. Pharm.* **268**: 157–177.
- Mruk D. D., Silvestrini B., Mo M. Y., Cheng C. Y. (2002): Antioxidant superoxide dismutase - a review: It's function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception.* **65**: 305–311.
- Murati, T., Šimić B., Kniewald, J., Pleadin, J., Kmetič, I. (2014): Organoklorovi insekticidi – mehanizmi toksičnog djelovanja. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, **9**: 97–109.
- Najafi G., Razi M., Hoshyar A. et al. (2010): The effect of chronic exposure with imidacloprid insecticide on fertility in mature male rats. *Int. J. Fertil. Steril.* **4**: 9–16.
- Noblanc A., Kocer A., Drevet J. R. (2012): Post-testicular protection of male gametes from oxidative damage. The role of the epididymis. *Med. Sci.* **28**: 519–525.
- Ogbuewu I. P., Aladi N. O., Etuk I. F., Opara M. N., Uchegbu M. C., Okoli I. C., Iloeje M. U. (2010): Relevance of oxygen free radicals and antioxidants in sperm production and function. *Res. J. Vet. Sci.* **3**: 138–164.



- Ogutcu A., Suludere Z., Kalender Y. (2008): Dichlorvos-induced hepatotoxicity in rats and the protective effects of vitamins C and E. *Environ Toxicol Pharmacol* **26**: 355–361.
- Perry J. J. P., Shin D. S., Getzoff E. D., Tainer J. A. (2010): The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1804**: 245–262.
- Pfeifer H., Conrad M., Roethlein D., Kyriakopoulos A., Brielmeier M., Bornkamm G. W., Behne D. (2001): Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol crosslinking during sperm maturation. *Faseb J.* **15**: 1236–1238.
- Pizzorno J. (2014): Glutathione!. *Integr. Med.* **13**: 8–12.
- Pleadin J., Bogdanović T., Murati T., Kmetič I. (2017): Kemijska onečišćivala iz okoliša i njihovi ostaci u hrani životinjskog podrijetla. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **12**(1-2): 19–29.
- PubChem,  $\alpha$ -cipermetrin, preuzeto sa stranice <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/alpha-Cypermethrin>, (datum preuzimanja: 20. ožujka 2020.)
- PubChem, glutation, preuzeto sa stranice <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glutathione>, (datum preuzimanja: 20. ožujka 2020.)
- PubChem, imidaklopid, preuzeto sa stranice <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Imidaclopid>, (datum preuzimanja: 20. ožujka 2020.)
- Roos D. (2019): Chronic granulomatous disease. *Methods Mol. Biol.* **1982**: 531–542.
- Saillenfait A. M., Ndiaye D., Sabaté J. P. (2015): Pyrethroids: exposure and health effects-an update. *Int. J. Hyg. Envir. Health.* **218**: 281–292.
- Sandström J., Nilsson P., Karlsson K., Marklund S. L. (1994): 10-fold increase in human plasma extracellular superoxide dismutase content caused by a mutation in heparin-binding domain. *J. Biol. Chem.* **269**: 19163–19166.
- Sanocka D., Kurpisz M. (2004): Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2**: 1–7.
- Shadnia S., Moghaddam H. H. (2008): Fatal intoxication with imidaclopid insecticide. *Am. J. Emerg. Med.* **26**: 634.
- Sharma P., Ul-Huq A., Singh R. (2013): Cypermethrin induced reproductive toxicity in male Wistar rats: Protective role of *Tribulus terrestris*. *Journal of Environmental Biology* **34**: 857–862.
- Sies H. (1999): Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic. Biol. Med.* **27**: 916–921.
- Singh A. K., Tiwari M. N., Prakash O., Singh P. M. (2012): A Current Review of Cypermethrin-Induced Neurotoxicity and Nigrostriatal Dopaminergic Neurodegeneration. *Curr. Neuropharmacol.* **10**: 64–71.
- Soderlund D. M., Bloomquist J. R. (1989): Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. *Annu. Rev. Entmol.* **34**: 77–96.
- Solati J., Hajikhani R., Zaeim R. T. (2010): Effects of cypermethrin on sexual behaviour and plasma concentrations of pituitary gonadal hormones. *Int. J. Fertil. Steril.* **4**: 23–28.
- Soltaninejad K., Abdollahi M. (2009): Current opinion on the science of organophosphate pesticides and toxic stress: a systematic review. *Med. Sci. Monit.* **15**: 75–90.
- Södergren E. (2000): Lipid peroxidation *in vivo*. Evaluation and application of methods for measurement. Disertacija, Sveučilište u Uppsali, Medicinski fakultet, preuzeto sa stranice <http://uu.diva-portal.org/smash/get/diva2:160811/FULLTEXT01.pdf>, (datum preuzimanja: 8. travnja 2020.)

- Stryer L., Tymoczko J. L., Berg J. M. (2013): Oksidacijska fosforilacija. Aminokiseline kao prekursor. U: Bukan G. (ur.) Biokemija. Školska knjiga, Zagreb, str. 518, 701.
- Tetsatsi A. C. M., Nkeng-Effouet P. A., Alumeti D. M., Bonsou G. R. F., Kamanyi A., Watcho P. (2019): Colibri® insecticide induces male reproductive toxicity: alleviating effects of *Lansea acida* (Anacardiaceae) in rats. *Basic and Clinical Androl.* **29**: 2–13.
- Tomizawa M., Lee D. L., Casida J. E. (2000): Neonicotinoid insecticides: Molecular features conferring selectivity for insect versus mammalian nicotinic receptors. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 6016–6024.
- Tomizawa M., Zhang N., Durkin K. A., Olmstead M. M., Casida J. E. (2003): The neonicotinoid electronegative pharmacophore plays the crucial role in the high affinity and selectivity for the *Drosophila* nicotinic receptor: An anomaly for the nicotinoid cation –  $\pi$  interaction model. *Biochem.* **42**: 7819–7827.
- Vaisberg C. N., Jelezarsky L. V., Dishlianova B., Chaushev T. A. (2005): Activity, substrate detection and immunolocalization of glutathione peroxidase (GPx) in bovine reproductive organs and semen. *Theriogenology.* **2**: 416–428.
- Valko M., Rhodes C. J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. (2006): Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* **160**: 1–40.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T. D., Mazur M., Telser J. (2007): Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**: 44–84.
- Vernet P., Aitken R. J., Drevet J. R. (2004): Antioxidant strategies in the epididymis. *Mol. Cell Endocrinol.* **216**: 31–39.
- Vince S., Žura Žaja I., Samardžija M., Majić Balić I., Vilić M., Đuričić D., Valpotić H., Marković F., Milinković-Tur S. (2018): Age-related differences of semen quality, seminal plasma, and spermatozoa antioxidative and oxidative stress variables in bulls during cold and warm periods of the year. *Animal.* **12**: 559–568.
- Wang H., Wang Q., Zhao X. F. et al. (2010): Cypermethrin exposure during puberty disrupts testosterone synthesis via downregulating StAR in mouse testes. *Arch. Toxicol.* **84**: 53–61.
- Wang X., Anadón A., Qinghua W., Qiao F., Ares I., Martínez-Larrañaga M. R., Yuan Z., Martínez M. A. (2018): Mechanism of neonicotinoid toxicity: impact on oxidative stress and metabolism. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **58**: 471–507.
- Wang X. Z., Liu S. S., Sun Y., Wu J. Y., Zhou Y. L., Zhang J. H. (2009): Beta-cypermethrin impairs reproductive function in male mice by inducing oxidative stress. *Theriogenology* **72**: 599–611.
- Zelko I. N., Mariani T. J., Folz R. J. (2002): Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic. Biol. Med.* **33**: 337–349.
- Žura Žaja I., Samardžija M., Vince S., Ljubičić I., Radin L., Pejaković Hlede J., Đuričić D., Valpotić H., Rošić N., Milinković-Tur S. (2016a): Positive and negative effects of reactive oxygen species on the fertilization ability of spermatozoa. *Vet. stn.* **47**: 161–173.
- Žura Žaja I., Samardžija M., Vince S., Vilić M., Majić-Balić I., Đuričić D., Milinković-Tur S. (2016b): Differences in seminal plasma and spermatozoa antioxidative systems and seminal plasma lipid and protein levels among breeds and hybrid genetic traits. *Anim. Reprod. Sci.* **170**: 75–82.
- Žura Žaja I., Sluganović A., Samardžija M., Milinković-Tur S., Dobranić T., Strelec S., Đuričić D., Valpotić H., Vince S. (2019): Učinci oksidacijskog stresa na muški spolni sustav i mehanizmi antioksidacijske zaštite. *Vet. stn.* **50**: 43–54.

## 8. PRILOZI

**Prilog 1.** Utjecaj tretmana  $\alpha$ -cipermetrinom ( $\alpha$ -CIP) i imidaklopridom (IMI) na prirast mase životinja te masu testisa i epididimisa. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija te kao medijan i raspon.

GRUPE ŽIVOTINJA	Početna masa životinja (g)		Konačna masa životinja (g)		Prirast mase životinja (g)		Masa testisa (g)		Masa epididimisa (g)	
	arit. sred. $\pm$ std. dev.	medijan (raspon)	arit. sred. $\pm$ std. dev.	medijan (raspon)	arit. sred. $\pm$ std. dev.	medijan (raspon)	arit. sred. $\pm$ std. dev.	medijan (raspon)	arit. sred. $\pm$ std. dev.	medijan (raspon)
<b><math>\alpha</math>-CIPERMETRIN</b>	NK	333 $\pm$ 5 (326 – 338)	401 (394 – 438)	76,6 $\pm$ 21,3	70,0 (56,0 – 112,0)	1,63 $\pm$ 0,15	1,56 (1,48 – 1,80)	0,865 $\pm$ 0,106	0,807 (0,778 – 1,02)	
	ADI	338 $\pm$ 9 (330 – 348)	357 (334 – 369)	15,0 $\pm$ 9,5 <sup>a</sup>	20,0 (4,0 – 21,0)	1,63 $\pm$ 0,08	1,60 (1,54 – 1,72)	0,958 $\pm$ 0,087	0,954 (0,881 – 1,10)	
	OEL	357 $\pm$ 17 (328 – 370)	394 (362 – 413)	35,6 $\pm$ 5,8 <sup>a</sup>	35,0 (29,0 – 45,0)	1,78 $\pm$ 0,19	1,87 (1,51 – 1,97)	0,971 $\pm$ 0,086	0,949 (0,855 – 1,06)	
	5 $\times$ OEL	362 $\pm$ 14 (342 – 374)	384 (346 – 385)	13,0 $\pm$ 7,0 <sup>a</sup>	14,5 (4,0 – 19,0)	1,53 $\pm$ 0,30	1,59 (1,04 – 1,84)	1,03 $\pm$ 0,25	0,990 (0,749 – 1,43)	
	REL	342 $\pm$ 16 (326 – 364)	371 (341 – 394)	24,0 $\pm$ 6,3 <sup>a</sup>	23,0 (15,0 – 30,0)	1,69 $\pm$ 0,19	1,67 (1,55 – 2,02)	0,967 $\pm$ 0,124	0,959 (0,808 – 1,14)	
<b>IMIDAKLOPRID</b>	NK	254 $\pm$ 8 (245 – 266)	337 (322 – 349)	82,6 $\pm$ 3,6	83,0 (77,0 – 87,0)	1,63 $\pm$ 0,15	1,56 (1,48 – 1,80)	0,865 $\pm$ 0,106	0,807 (0,778 – 1,02)	
	ADI	242 $\pm$ 8 (230 – 246)	313 (297 – 334)	72,8 $\pm$ 10,2	68,0 (67,0 – 88,0)	1,56 $\pm$ 0,13	1,62 (1,38 – 1,68)	0,809 $\pm$ 0,061	0,790 (0,744 – 0,891)	
	10 $\times$ AOEL	248 $\pm$ 10 (236 – 260)	312 (291 – 333)	65,8 $\pm$ 9,0	63,0 (55,0 – 77,0)	1,48 $\pm$ 0,09	1,48 (1,38 – 1,57)	0,741 $\pm$ 0,084	0,729 (0,624 – 0,858)	
	1/200 LD <sub>50</sub>	255 $\pm$ 13 (243 – 274)	303 (276 – 310)	44,6 $\pm$ 15,1 <sup>b,c,d</sup>	40,0 (29,0 – 63,0)	1,30 $\pm$ 0,17 <sup>b,c</sup>	1,26 (1,08 – 1,49)	0,792 $\pm$ 0,090	0,774 (0,708 – 0,918)	

**Opis oznaka:**

**$\alpha$ -cipermetrin ( $\alpha$ -CIP):** kontrolna skupina (NK); 0,02 mg  $\alpha$ -CIP/kg t.m./dan (ADD); 0,15 mg  $\alpha$ -CIP/kg t.m./dan (OEL); 0,80 mg  $\alpha$ -CIP/kg t.m./dan (5 $\times$ OEL); 2,20 mg  $\alpha$ -CIP/kg t.m./dan (REL).

**Imidakloprid (IMI):** kontrolna skupina (NK); 0,06 mg IMI/kg t.m./dan (ADD); 0,80 mg IMI/kg t.m./dan (10 $\times$ AOEL); 2,25 mg IMI/kg t.m./dan (1/200 LD<sub>50</sub>).

**a** – statistički različito od kontrolne skupine za tretman  $\alpha$ -cipermetrinom; **b** – statistički različito od kontrolne skupine za tretman imidaklopridom; **c** – statistički različito od skupine životinja tretiranih s 0,06 mg IMI/kg t.m./dan (ADD); **d** – statistički različito od skupine životinja tretiranih s 0,80 mg IMI/kg t.m./dan (10 $\times$ AOEL) (One-way ANOVA uz *post hoc* Tukey's HSD test ( $p < 0,05$ ))

**Prilog 2.** Utjecaj tretmana  $\alpha$ -cipermetrinom ( $\alpha$ -CIP) i imidaklopridom (IMI) na totalni antioksidacijski kapacitet (TAC), koncentraciju reduciranog glutationa (GSH) te katalitičku aktivnost glutation peroksidaze (GPx) i Cu, Zn-ovisne superoksid dismutaze (CuZnSOD) u tkivu testisa. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija te kao medijan i raspon.

GRUPE ŽIVOTINJA	TAC (mmol/L)		GSH (mg/g proteina)		GPx (U/g proteina)		CuZnSOD (U/g proteina)		
	arit. sred. $\pm$ std. dev.	medijan (raspon)	arit. sred. $\pm$ std. dev.	medijan (raspon)	arit. sred. $\pm$ std. dev.	medijan (raspon)	arit. sred. $\pm$ std. dev.	medijan (raspon)	
<b><math>\alpha</math>-CIPERMETRIN</b>	NK	0,925 $\pm$ 0,121 (0,799 – 1,057)	0,922 (0,589 – 1,062)	12,30 $\pm$ 1,27 (10,61 – 13,71)	12,44 (7,10 – 11,77)	178,9 $\pm$ 54,5 (126,9 – 230,5)	179,1 (148,4 – 271,2)	12269 $\pm$ 3222 (9352 – 15727)	11726 (9352 – 15727)
	ADI	0,859 $\pm$ 0,230	0,965 (0,647 – 1,019)	10,26 $\pm$ 1,91	10,98 (8,09 – 12,16)	202,3 $\pm$ 50,9	194,8 (220,4 – 312,0)	16848 $\pm$ 1194	16783 (15687 – 18073)
	OEL	0,835 $\pm$ 0,166	0,842 (0,645 – 1,096)	9,75 $\pm$ 1,74	9,51 (7,95 – 10,56)	257,4 $\pm$ 41,2	248,6 (207,0 – 362,3)	16319 $\pm$ 5801	13188 (12756 – 23013)
	5 $\times$ OEL	0,917 $\pm$ 0,205	1,032	10,65 $\pm$ 2,15	11,70 (7,73 – 12,66)	267,2 $\pm$ 17,1	260,6	20340 $\pm$ 5314	20115 (15142 – 25763)
	REL	0,730 $\pm$ 0,187	0,760 (0,424 – 0,902)	9,29 $\pm$ 1,04	9,57 (7,95 – 10,56)	282,4 $\pm$ 59,6 <sup>a</sup>	295,2	15815 $\pm$ 863	15632 (15059 – 16756)
<b>IMIDAKLOPRID</b>	NK	0,925 $\pm$ 0,121 (0,799 – 1,057)	0,922 (0,759 – 1,191)	12,30 $\pm$ 1,27 (10,61 – 13,71)	12,44 (9,86 – 13,49)	178,9 $\pm$ 54,5 (136,9 – 230,5)	179,1 (158,3 – 318,7)	12269 $\pm$ 3222 (9352 – 15727)	11726 (9352 – 15727)
	ADI	0,972 $\pm$ 0,171	1,003 (0,817 – 1,146)	11,25 $\pm$ 1,42	10,80 (10,75 – 14,45)	219,4 $\pm$ 65,4	216,0	15940 $\pm$ 870	15659 (15244 – 16916)
	10 $\times$ AOEL	0,993 $\pm$ 0,155	1,007	12,25 $\pm$ 1,54	12,10 (7,38 – 14,66)	279,1 $\pm$ 71,9	307,1 (197,4 – 332,7)	14111 $\pm$ 1783	14463 (12177 – 15692)
	1/200 LD <sub>50</sub>	0,822 $\pm$ 0,244	0,725 (0,604 – 1,198)	11,06 $\pm$ 3,07	11,09	206,0 $\pm$ 66,7	193,2 (134,6 – 308,5)	13072 $\pm$ 155	12865 (11832 – 14519)

**Opis oznaka:**

$\alpha$ -cipermetrin ( $\alpha$ -CIP): kontrolna skupina (NK); 0,02 mg  $\alpha$ -CIP/kg t.m./dan (ADD); 0,15 mg  $\alpha$ -CIP/kg t.m./dan (OEL); 0,80 mg  $\alpha$ -CIP/kg t.m./dan (5 $\times$ OEL); 2,20 mg  $\alpha$ -CIP/kg t.m./dan (REL).

Imidakloprid (IMI): kontrolna skupina (NK); 0,06 mg IMI/kg t.m./dan (AD); 0,80 mg IMI/kg t.m./dan (10 $\times$ AOEL); 2,25 mg IMI/kg t.m./dan (1/200 LD<sub>50</sub>).

<sup>a</sup> – statistički različito od kontrolne skupine za tretman  $\alpha$ -cipermetrinom (One-way ANOVA uz *post hoc* Tukey's HSD test ( $p < 0,05$ ))

**Prilog 3.** Utjecaj tretmana  $\alpha$ -cipermetrinom ( $\alpha$ -CIP) i imidaklopridom (IMI) na totalni antioksidacijski kapacitet (TAC), koncentraciju reduciranog glutatona (GSH) te katalitičku aktivnost glutation peroksidaze (GPx) i Cu, Zn-ovisne superoksid dismutaze (CuZnSOD) u tkivu epididimisa. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija te kao medijan i raspon.

GRUPE ŽIVOTINJA	TAC (mmol/L)		GSH (mg/g proteina)		GPx (U/g proteina)		CuZnSOD (U/g proteina)		
	arit. sred. $\pm$ std. dev.	medijan (raspon)	arit. sred. $\pm$ std. dev.	medijan (raspon)	arit. sred. $\pm$ std. dev.	medijan (raspon)	arit. sred. $\pm$ std. dev.	medijan (raspon)	
$\alpha$ -CIPERMETRIN	NK	0,382 $\pm$ 0,067 (0,309 – 0,476)	0,352 (0,309 – 0,476)	1,33 $\pm$ 0,19 (1,06 – 1,50)	1,41 (1,06 – 1,50)	280,5 $\pm$ 55,1 (232,1 – 351,4)	269,3 (232,1 – 351,4)	17501 $\pm$ 1036 (16315 – 18858)	17057 (16315 – 18858)
	ADI	0,422 $\pm$ 0,037 (0,375 – 0,462)	0,440 (0,375 – 0,462)	2,60 $\pm$ 0,35 <sup>ac</sup> (2,26 – 3,12)	2,51 (2,26 – 3,12)	413,6 $\pm$ 17,9 <sup>b</sup> (393,6 – 428,1)	419,0 (393,6 – 428,1)	25465 $\pm$ 3168 <sup>a</sup> (21775 – 29892)	24292 (21775 – 29892)
	OEL	0,450 $\pm$ 0,047 (0,388 – 0,499)	0,449 (0,388 – 0,499)	2,44 $\pm$ 0,13 <sup>ac</sup> (2,27 – 2,59)	2,47 (2,27 – 2,59)	177,7 $\pm$ 29,1 (158,5 – 220,5)	165,8 (158,5 – 220,5)	23400 $\pm$ 3251 <sup>a</sup> (20342 – 28363)	23259 (20342 – 28363)
	5 $\times$ OEL	0,381 $\pm$ 0,065 (0,282 – 0,455)	0,385 (0,282 – 0,455)	1,68 $\pm$ 0,258 (1,31 – 1,97)	1,65 (1,31 – 1,97)	229,6 $\pm$ 87,0 (152,9 – 367,4)	183,9 (152,9 – 367,4)	23754 $\pm$ 2862 <sup>a</sup> (19505 – 27464)	24194 (19505 – 27464)
	REL	0,445 $\pm$ 0,038 (0,402 – 0,500)	0,436 (0,402 – 0,500)	2,54 $\pm$ 0,57 <sup>ac</sup> (1,68 – 3,20)	2,46 (1,68 – 3,20)	195,7 $\pm$ 24,2 (174,0 – 225,0)	183,3 (174,0 – 225,0)	23516 $\pm$ 866 <sup>a</sup> (22588 – 24929)	23335 (22588 – 24929)
IMDAKLOPRID	NK	0,382 $\pm$ 0,067 (0,309 – 0,476)	0,352 (0,309 – 0,476)	1,33 $\pm$ 0,19 (1,06 – 1,50)	1,41 (1,06 – 1,50)	280,5 $\pm$ 55,1 (323,1 – 351,4)	269,3 (323,1 – 351,4)	17501 $\pm$ 1036 (16315 – 18858)	17057 (16315 – 18858)
	ADI	0,400 $\pm$ 0,080 (0,286 – 0,488)	0,431 (0,286 – 0,488)	2,30 $\pm$ 0,60 <sup>de</sup> (1,61 – 3,23)	2,19 (1,61 – 3,23)	487,0 $\pm$ 70,4 <sup>d</sup> (414,7 – 567,5)	483,0 (414,7 – 567,5)	24347 $\pm$ 2534 <sup>d</sup> (22283 – 28626)	24079 (22283 – 28626)
	10 $\times$ AOEL	0,442 $\pm$ 0,072 (0,365 – 0,538)	0,432 (0,365 – 0,538)	1,86 $\pm$ 0,60 (0,95 – 2,49)	1,71 (0,95 – 2,49)	432,2 $\pm$ 78,7 <sup>d</sup> (334,9 – 513,2)	429,0 (334,9 – 513,2)	22532 $\pm$ 2505 <sup>d</sup> (20525 – 26826)	22017 (20525 – 26826)
	1/200 LD <sub>50</sub>	0,400 $\pm$ 0,060 (0,340 – 0,482)	0,410 (0,340 – 0,482)	1,35 $\pm$ 0,36 (0,84 – 1,70)	1,29 (0,84 – 1,70)	538,9 $\pm$ 57,4 <sup>d</sup> (470,6 – 598,0)	538,5 (470,6 – 598,0)	22008 $\pm$ 1387 <sup>d</sup> (20031 – 23511)	22561 (20031 – 23511)

**Opis oznaka:**

$\alpha$ -cipermetrin ( $\alpha$ -CIP): kontrolna skupina (NK); 0,02 mg  $\alpha$ -CIP/kg t.m./dan (ADI); 0,15 mg  $\alpha$ -CIP/kg t.m./dan (OEL); 0,80 mg  $\alpha$ -CIP/kg t.m./dan (5 $\times$ OEL); 2,20 mg  $\alpha$ -CIP/kg t.m./dan (REL).

Imidakloprid (IMI): kontrolna skupina (NK); 0,06 mg IMI/kg t.m./dan (ADI); 0,80 mg IMI/kg t.m./dan (10 $\times$ AOEL); 2,25 mg IMI/kg t.m./dan (1/200 LD<sub>50</sub>).

**a** – statistički različito od kontrolne skupine za tretman  $\alpha$ -cipermetrinom; **b** – statistički različito od skupine životinja tretiranih s 0,15 mg  $\alpha$ -CIP/kg t.m./dan (OEL); **c** – statistički različito od skupine životinja tretiranih s 0,80 mg  $\alpha$ -CIP/kg t.m./dan (5 $\times$ OEL); **d** – statistički različito od kontrolne skupine za tretman imidaklopridom; **e** – statistički različito od skupine životinja tretiranih s 2,25 mg IMI/kg t.m./dan (1/200 LD<sub>50</sub>) (One-way ANOVA uz *post hoc* Tukey's HSD test ( $p < 0,05$ ))

**Prilog 4.** Pregled dostupnih literaturnih podataka o utjecaju  $\alpha$ -cipermetrina ( $\alpha$ -CIP) na prirast mase laboratorijskih životinja, masu testisa i epididimisa te na parametre oksidacijskog stresa u tkivu testisa i epididimisa.

Referenca	Životinje	Način primjene	Trajanje primjene	Primijenjena doza	Uočeni efekti
Alaa-Eldin i sur. 2017	odrasli mužjaci Wistar štakora, starosti 10 – 12 tj., mase 190 – 210 g	<i>p.o.</i> <sup>a</sup>	12 tjedana	12,5 (1/20 LD <sub>50</sub> ) mg $\alpha$ -CIP/kg t.m./dan	↓ masa testisa
Elbetieha i sur. 2001	odrasli mužjaci Sprague-Dawley štakora, starosti 80 – 90 dana, mase 250 – 300 g	<i>p.o.</i>	12 tjedana	13,15 (1/40 LD <sub>50</sub> ); 18,93 (1/20 LD <sub>50</sub> ); 39,66 (1/10 LD <sub>50</sub> ) mg $\alpha$ -CIP/kg t.m./dan	↓ prirast mase životinja (13,15, 18,93 i 39,66 mg/kg t.m./dan) ↑ apsolutna masa testisa (18,93 i 39,66 mg/kg t.m./dan)
Hu i sur. 2011	odrasli mužjaci Sprague-Dawley štakora, starosti 80 – 90 dana	<i>p.o.</i>	15 dana	6,25 (1/40 LD <sub>50</sub> ); 12,5 (1/20 LD <sub>50</sub> ); 25 (1/10 LD <sub>50</sub> ); 50 (1/5 LD <sub>50</sub> ) mg $\alpha$ -CIP/kg t.m./dan	↓ prirast mase životinja (12,5, 25 i 50 mg/kg t.m./dan) apsolutna masa testisa i epididimisa bez promjene
Ikpe me i sur. 2016	odrasli mužjaci Wistar štakora, mase 170 – 200 g	<i>p.o.</i>	65 dana	5; 10 mg $\alpha$ -CIP/kg t.m./dan	apsolutna masa testisa i epididimisa bez promjene
Li i sur. 2013	odrasli mužjaci Sprague Dawley štakora, starosti 9 tj., mase 169 – 190 g	<i>p.o.</i>	15 dana	7,5; 15; 30; 60 mg $\alpha$ -CIP/kg t.m./dan	prirast mase životinja bez promjene apsolutna masa testisa i epididimisa bez promjene
Sharma i sur. 2013	odrasli mužjaci Wistar štakora, starosti 3 – 4 mj., mase 250 – 300 g	<i>p.o.</i>	28 dana	3,38 mg $\alpha$ -CIP/kg t.m./dan	↓ apsolutna masa testisa i epididimisa ↓ GSH, SOD i GPx u testisu
Wang i sur. 2009	odrasli mužjaci Kunbai miševa, mase 30 – 35 g	<i>p.o.</i>	35 dana	1; 10; 20 mg $\beta$ -CIP/kg t.m./dan	↓ prirast mase životinja (10 i 20 mg/kg t.m./dan) ↓ apsolutna masa testisa i epididimisa (10 i 20 mg/kg t.m./dan) ↓ GPx i SOD u testisu (10 i 20 mg/kg t.m./dan)

<sup>a</sup> *per os*

**Prilog 5.** Pregled dostupnih literaturnih podataka o utjecaju imidakloprida (IMI) na prirast mase laboratorijskih životinja, masu testisa i epididimisa te na parametre oksidacijskog stresa u tkivu testisa i epididimisa.

Referenca	Životinje	Način primjene	Trajanje primjene	Primijenjena doza	Uočeni efekti
Bal i sur. 2012a	odrasli mužjaci Wistar štakora, starosti 8 – 9 tj., mase 180 – 210 g	<i>p.o.</i> <sup>a</sup>	90 dana	0,5; 2; 8 (NOAEL) mg IMI/kg t.m./dan	↓prirast mase životinja (2 i 8 mg/kg t.m./dan) ↓apsolutna masa epididimisa (0,5, 2 i 8 mg/kg t.m./dan) apsolutna masa testisa bez promjene ↓GSH u testisu (8 mg/kg t.m./dan)
Lonare i sur. 2016	odrasli mužjaci Wistar štakora, starosti 8 tj., mase 110 – 120g	<i>p.o.</i>	28 dana	45 (1/10 LD <sub>50</sub> ); 90 (1/5 LD <sub>50</sub> ) mg IMI/kg t.m./dan	↓prirast mase životinja (90 mg/kg t.m./dan) ↓apsolutna masa epididimisa (45 i 90 mg/kg t.m./dan) apsolutna masa testisa bez promjene ↓GSH, SOD, GPx u testisu (45 i 90 mg/kg t.m./dan)
Mahajan i sur. 2018	odrasli mužjaci Wistar štakora, starosti 12 – 4 tj., mase 180 – 200 g	<i>p.o.</i>	28 dana	16,9 (LOAEL) mg IMI/kg t.m./dan	↓GPx i SOD u testisu
Tetsatsi i sur. 2019.	odrasli mužjaci Wistar štakora, mase 150 – 200 g	<i>p.o.</i>	14 dana	22,5 mg/kg t.m./dan (Colibri®, komercijalna formulacija imidakloprida)	↓prirast mase životinja ↓relativna masa testisa i epididimisa ↑SOD u testisu

<sup>a</sup> *per os*

## 9. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 28. srpnja 1996. godine u Čakovcu. Osnovnu školu završila sam u Ivanovcu, a srednjoškolsko obrazovanje nastavila sam u Čakovcu gdje sam 2015. godine završila jezični smjer u Gimnaziji Josipa Slavenskog. Iste godine upisala sam integrirani preddiplomski i diplomski nastavnički studij Biologije i kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

2015. godine sudjelovala sam na Prvom hrvatskom simpoziju biologa u zdravstvu, a 2018. na 5. Simpoziju studenata kemičara. Tijekom studijskog obrazovanja aktivno sam sudjelovala u izvedbi popularno-znanstvene manifestacije „Otvoreni dan Kemije“ 2016., 2017. i 2018. godine koja je dio cjelodnevnog događanja „Dan i noć na PMF-u“. 2019. godine sudjelovala sam na radionici dr. Stuarta Kohlhagena, javnosti poznatijeg kao „The Science Nomad“, namijenjenoj učiteljima primarnog obrazovanja, učiteljima i nastavnicima tzv. STEM predmeta, visokoškolskim nastavnicima te studentima učiteljskih i nastavničkih studija. 2020. godine sam u sklopu kolegija Održivi razvoj u nastavi prirodoslovlja postala voditelj Programa GLOBE. Tijekom završne godine studija odradila sam metodičku praksu iz biologije u Gimnaziji Josipa Slavenskog u Čakovcu i metodičku praksu iz kemije u VI. osnovnoj školi u Varaždinu gdje sam stekla iskustvo rada s učenicima. Kao voditeljica radionice za 7. i 8. razred sudjelovala sam na Ljetnoj tvornici znanosti kojoj je cilj omogućiti djeci kontakt sa znanostima na njima prikladan i zabavan način što je obogatilo moje iskustvo rada s djecom. Akademske godine 2018./2019. bila sam član predsjedništva Udruge studenata Međimurja te sudjelovala u realizaciji projekata „Kam na faks“ i „Upoznajmo Međimurje“.