

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
I  
INSTITUT RUĐER BOŠKOVIĆ ZAGREB**

**Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni studij  
Zaštita prirode i okoliša**

**Sandra Stepić**

**PROMJENE TOKSIČNIH UČINAKA SMJESA PESTICIDA NA  
MOLEKULARNE MARKERE IZLOŽENOSTI KOMPOSTNE  
GUJAVICE (*Eisenia andrei*)**

**DOKTORSKI RAD**

**Osijek, 2010.**

*Posebno se zahvaljujem mentoru **doc. dr. sc. Branimiru K. Hackenbergeru** na korisnim savjetima, strpljenju i pomoći prilikom izrade i pisanja ovog rada.*

*Zahvaljujem se na srdačnosti i velikoj podršci **prof. dr. sc. Tarzanu Legoviću**.*

*Veliko hvala **Davorki Jarić, prof. i Željki Lončarić** tijekom izrade rada. Hvala **Mirni Velki** za tehničku podršku u eksperimentalnom radu.*

*Posebno hvala **dr. sc. Dubravki Hackenberger, zn. savj.**, na razumijevanju i podršci kada mi je bila najpotrebnija, te višegodišnjem hostingu u Zavodu za znanstveni rad HAZU u Osijeku. Hvala i **Snježani** na administriranju i pomoći.*

*Hvala svim članovima Odjela za biologiju Sveučilišta J.J. Strossmayer u Osijeku što su mi omogućili da rad izradim koristeći prostor i opremu Odjela.*

*Hvala i svim drugima koji su posredno ili neposredno, savjetima, primjedbama ili na kakav drugi način, pomogli u ostvarivanju ovog rada.*

*Rad je izrađen potporom Ministarstva znanosti i tehnologije – Projekt 101-0000000-3484.*

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i

Doktorski rad

Institut Ruđer Bošković, Zagreb

Poslijediplomski sveučilišni interdisciplinarni studij

ZAŠTITA PRIRODE I OKOLIŠA

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Biologija

**Promjene toksičnih učinaka smjesa pesticida na molekularne markere  
izloženosti kompostne gujavice (*Eisenia andrei*)**

**mr. sc. Sandra Stepić**

**Doktorski rad izrađen je na** Odjelu za biologiju Sveučilišta Josipa Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

**Mentor: doc. dr. sc. Branimir K. Hackenberger**, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

**Sažetak doktorskog rada**

Pesticidi imaju važnu ulogu u poljoprivrednoj proizvodnji. Unatoč koristi, upotreba pesticida nosi i određeni rizik za okoliš u kojem se primjenjuju. U realnom okolišu organizmi su rijetko izloženi samo jednom pesticidu, a najčešće su istovremeno izloženi smjesi različitih pesticida. Stoga je i predmet istraživanja u ovome radu bio odrediti toksičnost često upotrebljavanih pripravaka pesticida (endosulfan, pirimifos-metil, malation, temefos, bentazon, metolaklor i terbutilazin) pojedinačno i u kombinaciji s obzirom na promjene aktivnosti tri molekularna biomarkera: acetilkolinesteraze (AChE), glutation-S-transferaze (GST) i katalaze (CAT), te s obzirom na histopatološke promjene epidermalnog i mišićnog sloja kod kompostne gujavice (*Eisenia andrei* Bouché, 1972). Za utvrđivanje aditivnih, sinergističkih i antagonističkih interakcija među pesticidima upotrijebljena je izoblografska metoda. Rezultati ovog rada su pokazali da je aktivnost AChE ovisna o koncentraciji tijekom sva 4 vremena izlaganja, dok su se aktivnosti CAT i GST mijenjale u temporalnom i kvantitativnom smislu. Odnosno, aktivnost AChE se pokazala kvantitativnim biomarkerom, a aktivnost CAT i GST indikativnim biomarkerima. Kod binarnih kombinacija AChE inhibirajućih i AChE neinhibirajućih pesticida, metolaklor je iskazao potencijacijsko djelovanje na

endosulfan i temefos. Binarne smjese AChE inhibirajućih pesticida su ukazale na aditivan učinak kod svih kombinacija, osim kod kombinacije endosulfan : temefos koja je pokazala sinergističko obilježje. Mjerenja omjera površine epitelnog i mišićnog sloja pokazala su smanjenje istog nakon izlaganja smjesama pesticida. No zbog velike varijance njegova upotreba je moguća samo u smislu binarnog odlučivanja (prisustvo-odsustvo toksikanta).

**Broj stranica:** 191

**Broj slika:** 88

**Broj tablica:** 18

**Broj literaturnih navoda:** 168

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** pesticidi, mješavine, biomarkeri, izoblogrami, hormeza, *Eisenia andrei*

**Datum obrane:** 23.02.2010.

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. **Doc. dr. sc. Enrih Merdić**, pročelnik i docent Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, predsjednik;
2. **Prof. dr. sc. Tarzan Legović**, redoviti profesor i znanstveni savjetnik Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, komentor i član;
3. **Doc. dr. sc. Branimir K. Hackenberger**, docent Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, mentor i član.

**Rad je pohranjen u:**

Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu (Ul. Hrvatske bratske zajednice 4); Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek (Europske avenije 24); Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku (Trg Sv. Trojstva 3) i Odjelu za biologiju u Osijeku (Trg LJ. Gaja 6).



**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek and  
Ruđer Bošković Institute Zagreb**

**PhD Thesis**

**Scientific Area:** Natural sciences

**Scientific Field:** Biology

**Changes in the toxic effects of pesticide mixtures on molecular markers of exposure  
in earthworm (*Eisenia andrei*)**

**Sandra Stepčić, MSc**

**Thesis performed at** Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek.

**Supervisor:** Branimir K. Hackenberger, PhD, Assistant Professor, Department of biology  
Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

**Abstract**

Pesticides play an important role in agricultural production. In spite of benefit, the use of pesticides carries a certain risk to the environment in which they are applied. In real environment, organisms are rarely exposed to only one pesticide, and are often simultaneously exposed to the mixture of different pesticides. The toxicity of mixtures of pesticides may be stronger or weaker than the individual pesticides alone. Therefore, the subject of research in this thesis was to determine the toxicity of frequently used pesticides (endosulfan, pirimiphosmethyl, malathion, temephos, bentazone, metolachlor and terbutylazine), individually and in combination with respect to changes in activities of three molecular biomarkers: acetylcholinesterase (AChE), glutathione-S-transferase (GST) and catalase (CAT), and with respect to histopathological changes of epidermal and muscle layers of the earthworm (*Eisenia andrei* Bouché, 1972).

The results have indicated that the AChE activity has been concentration dependent during all four exposure periods, while CAT and GST activities varied in both temporal and quantitative sense. In other words, AChE is a quantitative biomarker, and CAT and GST are indicative biomarkers. Metolachlor had a potentiation effect on endosulfan and temephos

when binary combinations of AChE inhibiting and AChE non-inhibiting pesticides were used. The binary mixtures of AChE inhibiting pesticides showed an additive effecting all used combinations, except endosulfan : temephos combination that showed synergistic effect. The measurements of epithelial and muscular layers indicated the decrease of their ratio after exposure to pesticide mixtures. However, due to the large variance the usage of this ratio is possible only in the binary decision sense, i.e. if the toxicant is present or absent.

**Number of pages:** 190

**Number of figures:** 88

**Number of tables:** 18

**Number of references:** 165

**Original in:** Croatian

**Key words:** pesticides, mixture toxicity, biomarkers, isobologram, hormesis, *Eisenia andrei*

**Date of thesis defense:** 23.02.2009.

**Reviewers:**

1. **Enrih Merdić, PhD, Assistant Professor**, Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek.
2. **Tarzan Legović, PhD, Research Professor**, Ruđer Bošković Institute, Zagreb;
3. **Branimir K. Hackenberger, PhD, Assistant Professor**, Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek.

**Thesis is deposited in:**

National and University Library in Zagreb (Hrvatske bratske zajednice 4); City and University Library in Osijek (Europske avenije 24); Josip Juraj Strossmayer University of Osijek (Trg Sv. Trojstva 3), and Library of Department of Biology in Osijek, (Trg Lj. Gaja 6).

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1 VRSTE INTERAKCIJA MEĐU SPOJEVIMA.....	1
1.1.1. JEDNOSTAVNO SLIČNO ZDRUŽENO DJELOVANJE .....	3
1.1.2. NEZAVISNO ZAJEDNIČKO DJELOVANJE.....	3
1.1.3. SLOŽENO SLIČNO I SLOŽENO ZAVISNO ZDRUŽENO DJELOVANJE.....	3
1.1.4. IZOBLOGRAFSKA METODA ZA ODREĐIVANJE INTERAKCIJA MEĐU SPOJEVIMA.....	4
1.2. HORMETIČKI KONCEPT U PROCJENI TOKSIČNOSTI SPOJEVA.....	5
1.3. PESTICIDI.....	6
1.3.1. ORGANOFOSFORNI PESTICIDI.....	7
1.3.2. KARBAMATNI PESTICIDI.....	7
1.3.3. PIRETROIDNI PESTICIDI.....	8
1.3.4. ORGANOKLORNI PESTICIDI.....	8
1.4. SUDBINA PESTICIDA U OKOLIŠU.....	9
1.5. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA VEZANIH ZA ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI MJEŠAVINA PESTICIDA .....	11
1.6. PRIMJENA BIOMARKERA U ZAGAĐENJU OKOLIŠA .....	13
1.7. OSOBINE ENZIMA ACETILKOLINESTERAZE (AChE, EC 3.1.1.8) KAO BIOMARKERA .....	16
1.8. METABOLIZAM KSENOBIOTIKA .....	22
1.8.1. BIOMARKERI I FAZE METABOLIZMA KSENOBIOTIKA .....	22
1.8.2. BIOMARKERI II FAZE METABOLIZMA KSENOBIOTIKA .....	25
1.8.2.1. GLUTATION-S-TRANSFERAZA (GST, EC 2.5.1.18).....	26
1.8.3. BIOMARKERI OKSIDATIVNOG STRESA.....	29
1.8.3.1. KATALAZA KAO BIOMARKER OKSIDATIVNOG STRESA (CAT, EC 1.11.1.6) .....	30
1.8.4. HISTOPATOLOŠKI BIOMARKERI .....	32
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>34</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE.....</b>	<b>35</b>
3.1. KEMIKALIJE .....	35
3.2. INSTRUMENTI I PRIBOR .....	36
3.3. EKSPERIMENTALNI ORGANIZMI.....	37
3.3.1. SISTEMATIKA KOMPOSTNE GUJAVICE (EISENIA ANDREI) .....	37
3.3.2. BIOLOGIJA GUJAVICA.....	37

2.3.3. ODRŽAVANJE GUJAVICA U LABORATORIJU I PRIPREMA ZA EKSPERIMENT .....	38
3.4. FIZIKALNO-KEMIJSKA SVOJSTVA PESTICIDA UPOTRIJEBLJENIH U ISTRAŽIVANJU .....	38
3.4.1. ENDOSULFAN (GLOBAL E-35) .....	39
3.4.2. PIRIMIFOS-METIL (ACTELIC 50-EC) .....	42
3.4.3. MALATION (RADOTION E-50) .....	44
3.4.4. TEMEFOS (ABATE 4-E) .....	46
3.4.5. BENTAZON (BASAGRAN 600) .....	47
3.4.6. METOLAKLOR (DUAL GOLD 960 EC) .....	48
3.4.7. TERBUTILAZIN (TERAZIN SC 50) .....	49
3.5. ODREĐIVANJE TOKSIČNOSTI POJEDINAČNIH I SMJESE PESTICIDA UZ UPOTREBU KONTAKT TESTA NA FILTER PAPIRU („FILTER PAPER CONTACT TEST“) .....	51
3.5.1. PRIPRAVA POSTMITOHONDRIJSKE FRAKCIJE GUJAVICA .....	56
3.5.2. MJERENJE AKTIVNOSTI ENZIMA ACETILKOLINESTERAZE (AChE) .....	56
3.5.3. MJERENJE AKTIVNOSTI KATALAZE (CAT) .....	56
3.5.4. MJERENJE AKTIVNOSTI GLUTATION-S-TRANSFERAZE (GST) .....	57
3.5.5. ODREĐIVANJE KOLIČINE PROTEINA U POSTMITOHONDRIJSKOJ FRAKCIJI .....	57
3.6. IZLAGANJE GUJAVICA PESTICIDIMA I UZORKOVANJE ZA HISTOLOŠKU OBRADU .....	58
3.6.1. UKLAPANJE TKIVA U PARAFINSKI BLOK .....	59
3.6.2. REZANJE PARAFINSKIH BLOKOVA .....	59
3.6.3. BOJANJE REZOVA I UKLAPANJE U CANADA BALZAM .....	60
3.6.4. MIKROFOTOGRAFIRANJE I MIKROMETRIJA PREPARATA .....	61
3.6.5. MODELI ZA ODREĐIVANJE OMJERA POVRŠINE EPITELNOG I MIŠIĆNOG SLOJA .....	62
3.6.5.1. KRUŽNI MODEL .....	63
3.6.5.2. ELIPTIČNI MODEL .....	64
3.7. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA .....	65
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>66</b>
4.1. OVISNOST FUNKCIJE OVISNOSTI JAČINE UČINKA O KONCENTRACIJI PESTICIDA PRI RAZLIČITOM TRAJANJU IZLAGANJA .....	66
4.1.1. AKTIVNOST AChE, CAT, I GST U S9 FRAKCIJI HOMOGENATA GUJAVICA NAKON 2, 12, 24 I 48 SATI IZLAGANJA ENDOSULFANU .....	66
4.1.2. AKTIVNOST AChE, CAT, I GST U S9 FRAKCIJI HOMOGENATA GUJAVICA NAKON 2, 12, 24 I 48 SATI IZLAGANJA TEMEFOSU .....	72
4.1.3. AKTIVNOST AChE, CAT, I GST U S9 FRAKCIJI HOMOGENATA GUJAVICA NAKON 2, 12, 24 I 48 SATI IZLAGANJA MALATIONU .....	77
4.1.4. AKTIVNOST AChE, CAT, I GST U S9 FRAKCIJI HOMOGENATA GUJAVICA NAKON 2, 12, 24 I 48 SATI IZLAGANJA PIRIMIFOSMETILU .....	82

4.1.5. AKTIVNOST AChE, CAT, I GST U S9 FRAKCIJI HOMOGENATA GUJAVICA NAKON 2, 12, 24 I 48 SATI IZLAGANJA TERBUTILAZINU.....	87
4.1.6. AKTIVNOST AChE, CAT, I GST U S9 FRAKCIJI HOMOGENATA GUJAVICA NAKON 2, 12, 24 I 48 SATI IZLAGANJA METOLAKLORU.....	92
4.1.7. AKTIVNOST AChE, CAT, I GST U S9 FRAKCIJI HOMOGENATA GUJAVICA NAKON 2, 12, 24 I 48 SATI IZLAGANJA BENTAZONU .....	97
4.2. PROMJENA OVISNOSTI UČINKA POJEDINAČNIH PESTICIDA U ODNOSU NA VRIJEME IZLAGANJA.....	102
4.2.1. PROMJENA OVISNOSTI UČINKA ENDOSULFANA U ODNOSU NA VRIJEME IZLAGANJA .....	102
4.2.1.1. AKTIVNOST AChE .....	102
4.2.1.2. AKTIVNOST CAT.....	102
4.2.1.3. AKTIVNOST GST .....	102
4.2.2. PROMJENA OVISNOSTI UČINKA TEMEFOSA U ODNOSU NA VRIJEME IZLAGANJA .....	106
4.2.2.1. AKTIVNOST AChE .....	106
4.2.2.2. AKTIVNOST CAT.....	106
4.2.2.3. AKTIVNOST GST .....	106
4.2.3. PROMJENA OVISNOSTI UČINKA MALATIONA U ODNOSU NA VRIJEME IZLAGANJA .....	110
4.2.3.1. AKTIVNOST AChE .....	110
4.2.3.2. AKTIVNOST CAT.....	110
4.2.3.3. AKTIVNOST GST .....	110
4.2.4. PROMJENA OVISNOSTI UČINKA PIRIMIFOSMETILA U ODNOSU NA VRIJEME IZLAGANJA.....	114
4.2.4.1. AKTIVNOST AChE .....	114
4.2.4.2. AKTIVNOST CAT.....	114
4.2.4.3. AKTIVNOST GST .....	114
4.2.5. PROMJENA OVISNOSTI UČINKA TERBUTILAZINA U ODNOSU NA VRIJEME IZLAGANJA .....	118
4.2.5.1. AKTIVNOST AChE .....	118
4.2.5.2. AKTIVNOST CAT.....	118
4.2.5.3. AKTIVNOST GST .....	118
4.2.6. PROMJENA OVISNOSTI UČINKA BENTAZONA U ODNOSU NA VRIJEME IZLAGANJA .....	122
4.2.6.1. AKTIVNOST AChE .....	122
4.2.6.2. AKTIVNOST CAT.....	122
4.2.6.3. AKTIVNOST GST .....	122
4.2.7. PROMJENA OVISNOSTI UČINKA TERBUTILAZINA U ODNOSU NA VRIJEME IZLAGANJA .....	126
4.2.7.1. AKTIVNOST AChE .....	126
4.2.7.2. AKTIVNOST CAT.....	126
4.2.7.3. AKTIVNOST GST .....	126

4.3. OVISNOST MORTALITETA O DOZI ZA POJEDINAČNE PESTICIDE NAKON 24 I 48 h IZLAGANJA .....	130
4.4. EC50 IZOBOLOGRAMI SMJESA S PRIKAZOM VRIJEDNOSTI EC50 ZA SVAKU SMJESU .....	134
4.4.1. EC50 IZOBOLOGRAM SMJESA ENDOSULFANA I TEMEFOSA S PRIKAZOM EC50 VRIJEDNOSTI ZA SVAKU SMJESU .....	134
4.4.2. EC50 IZOBOLOGRAM SMJESA ENDOSULFANA I MALATIONA S PRIKAZOM EC50 VRIJEDNOSTI ZA SVAKU SMJESU .....	134
4.4.3. EC50 IZOBOLOGRAM SMJESA ENDOSULFANA I PIRIMIFOSMETILA S PRIKAZOM EC50 VRIJEDNOSTI ZA SVAKU SMJESU .....	134
4.4.4. EC50 IZOBOLOGRAM SMJESA TEMEFOSA I MALATIONA S PRIKAZOM EC50 VRIJEDNOSTI ZA SVAKU SMJESU.....	138
4.4.5. EC50 IZOBOLOGRAM SMJESA TEMEFOSA I PIRIMIFOSMETILA S PRIKAZOM EC50 VRIJEDNOSTI ZA SVAKU SMJESU .....	138
4.4.6. EC50 IZOBOLOGRAM SMJESA MALATIONA I PIRIMIFOSMETILA S PRIKAZOM EC50 VRIJEDNOSTI ZA SVAKU SMJESU .....	138
4.5. PROMJENA EC50 VRIJEDNOSTI U SMJESAMA U ODNOSU NA EC50 VRIJEDNOSTI POJEDINAČNIH PESTICIDA .....	142
4.6. HISTOLOŠKE PROMJENE U ODNOSU DEBLJINE EPITELNOG I MIŠIČNOG SLOJA.....	144
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>160</b>
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>179</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>171</b>
<b>8. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>186</b>
<b>9. POPIS RADOVA .....</b>	<b>188</b>

## 1. UVOD

Napretkom organske sintetske kemije razvijen je velik broj različitih spojeva koji nas okružuju u svakodnevnom životu, a nalazimo ih u hrani, vodi, tlu, zraku. Takve, organizmima i biološkim sustavima strane kemijske spojeve, nazivamo ksenobioticima (grč. *kse-no-s*-stran, *bios* - život).

U ksenobiotike spadaju spojevi kao što su pesticidi, poliklorirani bifenili, dioksini, policiklički aromatski ugljikovodici, poliklorirani dibenzofurani, fenoli i brojni drugi organski i anorganski spojevi. Tijekom proizvodnje i upotrebe ovi se spojevi dijelom unose i u okoliš, kako u tlo, gdje su raspoloživi organizmima koji u njemu žive, tako i u rijeke i mora gdje su raspoloživi akvatičkim organizmima, a procesima bioakumulacije i biomagnifikacije i svim ostalim organizmima na kopnu. Ranih šezdesetih godina 20. stoljeća ljudi su postali svjesni i zabrinuti za moguće štetne učinke ovih spojeva na organizme, od kada su i započela sustavna istraživanja u iznalaženju brzih i kvalitetnih metoda praćenja i zaštite okoliša.

Procjena rizika antropogenih toksikanata prvenstveno se izvodi na temelju eksperimenata provedenih s jednom tvari. Međutim, toksičnost u prirodnim ekosustavima obično ne proizlazi iz izloženosti jednom spoju, nego je rezultat izloženosti smjesi različitih spojeva (Altenburger i sur., 1996; Syberg i sur., 2008). Spojevi u kombinaciji mogu polučiti učinak koji je jači ili slabiji od učinka pojedinačnih komponenti. Uzrok tome može biti činjenica da jedan spoj može značajno utjecati na toksikokinetiku i/ili toksikodinamiku drugog spoja u uvjetima združenog djelovanja (Klaassen, 2001). Postojanje i prisutnost velikog broja različitih spojeva u okolišu zahtijeva razmatranja njihovih potencijalnih interakcija. Zbog ove činjenice, toksičnost mješavina predmet je istraživanja u posljednjih nekoliko desetljeća (Hermens i sur., 1984; Altenburger i sur., 1996; Engell-Kofoed, 2005).

### 1.1. Vrste interakcija među spojevima

Pri opisivanju toksičnosti mješavina u literaturi se koristi velik broj različitih termina kao npr. supra-aditivnost, više od aditivnosti, potencijacija, sumacija, manje od aditivnosti, infra-aditivnost, kompetitivna aditivnost, kompetitivni antagonizam, itd. (Warne, 2003). Međutim, četiri su osnovna oblika zajedničkog djelovanja spojeva koji mogu opisati učinak mješavine: aditivnost, sinergizam, potencijacija i antagonizam.

**Aditivnost** je najčešći oblik zajedničkog djelovanja spojeva, pri čemu je toksičnost mješavine jednaka sumi toksičnih učinaka pojedinačnih spojeva prisutnih u mješavini (npr.  $1 + 1 = 2$ ). Tako na primjer kloroform i ugljik tetraklorid uzrokuju aditivni hepatotoksični učinak ako se primjene zajedno. Razlog tome je u činjenici što kloroform uzrokuje puno istih toksičnih učinaka kao i ugljik tetraklorid uslijed njihove metaboličke pretvorbe u slobodne radikale i fosgen (Bruckner i Warreen, 2001).

**Sinergizam** je za zajedničko djelovanje spojeva kod kojeg dolazi do jačanja učinka mješavine u odnosu na pojedinačne sastojke (npr.  $1 + 1 > 2$ ). Često se za ovu interakciju upotrebljava i naziv supra-aditivna interakcija. Najčešće do nje dolazi kod spojeva koji imaju različite mehanizme djelovanja. Na primjer, i ugljik tetraklorid i etanol su hepatotoksični, ali zajedno uzrokuju puno jača oštećenja na jetri od onih koji bi se očekivali zbrajanjem njihovih pojedinačnih učinaka. To je najčešće zbog toga što alkoholom inducirano povećanje proizvodnje toksičnog ugljik tetraklorid slobodnog radikala i hidrosil-etil radikala zajedno djeluju puno štetnije na jetru i polučuju puno jači učinak nego svaki od radikala pojedinačno (Mantle i Preedy, 1999).

**Potencijacija** je interakcija kod koje slično kao i kod sinergizma dolazi do jačanja učinka kombinacije u odnosu na pojedinačne sastojke, ali se potencijacija javlja kod spojeva koji nemaju neki specifični toksični učinak, međutim u prisustvu nekog drugog spoja čine ga puno toksičnijim (npr.  $0 + 2 > 2$ ). Tako na primjer, izopropanol sam po sebi nije hepatotoksičan, međutim on znatno pojačava hepatotoksičnost ugljik tetraklorida, najčešće zbog pojačanog, mikrosomalnim enzimima, posredovanog metabolizma (Klaassen, 2001).

**Antagonizam** opisuje zajedničko djelovanje spojeva kod kojeg je toksičnost mješavine manja nego što se očekuje, pri čemu jedan sastojak najčešće umanjuje toksičnost drugog (npr.  $1 + 1 < 2$ ). Za ovu vrstu interakcije često se koristi i naziv infra-aditivna interakcija. Četiri su tipa antagonističkih reakcija: funkcionalno/fiziološke, kemijske, zatim dispozicijske i receptorske. Kod funkcionalno/fiziološkog antagonizma, dva spoja proizvode suprotne učinke na istoj fiziološkoj funkciji, bilo da stimuliraju ili inhibiraju dva različita receptora. Na primjer, alkaloid ergot uzrokuje vazokonstrikciju stimuliranjem serotonergičkog receptora podtipa 5-HT<sub>1D</sub>, dok nitriti i /ili nitrati uzrokuju vazodilataciju stimuliranjem aktivnosti enzima gvanil ciklaze, i tako postaju funkcionalni antagonisti jedan drugome. Kemijski antagonizam je reakcija između dva spoja koji neutraliziraju međusobno djelovanje. Npr. heparin je heteropolisaharidni tip antikoagulansa, a neutralizira ga protamin, koji služi kao učinkovit antidot kod predoziranja heparina. To je zato što je heparin kiselog karaktera, a protamin bazičnog, te jedan drugog stehiometrijski neutraliziraju. Pored toga razlikujemo i dispozicijski antagonizam i receptorski antagonizam. Dispozicijski antagonizam se događa tamo gdje jedna tvar mijenja toksikokinetiku drugoj tvari u nekoj od faza apsorpcije, distribucije, biotransformacije ili ekskrecije. Tako na primjer, velike količine kalcija ili željeza umanjuju apsorpciju olova u crijevu (Mahaffey i Rader, 1980). Kolestipol (politiolna smola) veže klorirane ugljikovodike, endotoksine i umanjuje njihovu apsorpciju (Fraser, 1986). Receptorski antagonizam javlja se tamo gdje se dva spoja vežu na isto receptorsko mjesto pa jedan „istiskuje“ drugog s ovoga mjesta. Tako se atropin veže na muskarinske kolinergičke receptore i služi kao antidot kod trovanja organofosfornim insekticidima.



Hewlett i Plackett (1952) opisuju četiri tipa zajedničkog djelovanja komponenti u mješavini uzimajući u obzir obilježja komponenti karakterizirana biološkim mehanizmima djelovanja (promjenama u apsorpciji, metabolizmu ili ekskreciji, fiziološkim promjenama, djelovanje na receptore i vezna mjesta). Tako se razlikuju:

### 1.1.1. Jednostavno slično združeno djelovanje („*simple similar joint action*“)

Kod ovog oblika, spojevi (komponente) u smjesi imaju isto mjesto djelovanja, ali jedan spoj ne utječe na biološku aktivnost drugog, drugim riječima nema međusobne interakcije. Ovaj tip zajedničkog djelovanja zove se još i aditivnost koncentracija, a njihov zajednički učinak jednak je zbroju koncentracija pojedinačnih spojeva i može se matematički prikazati na slijedeći način:

$$\text{Ukupna toksičnost} = (Ca/Ta) + (Cb/Tb) + \dots(Cn/Tn)$$

gdje Ca, Cb, Cn predstavljaju koncentracije pojedinog spoja u mješavini, a T mjeru toksičnosti za pojedini spoj (npr. EC50 ili LC50). Neophodno da krajnja točka mjerenja (endpoint) bude ista za svaki pojedini spoj u mješavini (npr. smrtnost, reproduktivne promjene, pokretljivost).

### 1.1.2. Nezavisno zajedničko djelovanje („*independent joint action*“)

Kod ovog oblika zajedničkog djelovanja, komponente mješavine imaju različita mjesta djelovanja i jedan spoj ne utječe na biološku aktivnost drugog spoja u mješavini, drugim riječima ne dolazi do interakcije. Ovaj oblik međusobnog djelovanja javlja se kada komponente unutar mješavine djeluju na različite fiziološke i biokemijske sustave ali polučuju isti odgovor (Anderson i Weber, 1975). Ovaj tip zajedničkog djelovanja obično dovodi do aditivnog odgovora, jer je ukupna toksičnost smjese jednaka sumi bioloških odgovora dobivenih od svakog spoja pojedinačno. Biološki odgovor (BO) koji se određuje, odnosi se na koncentracija-odgovor odnos za svaki spoj. Matematički se ovaj oblik zajedničkog djelovanja može prikazati na slijedeći način:

$$\text{Ukupna toksičnost} = BO_1 + BO_2 \dots BO_n$$

### 1.1.3. Složeno slično i složeno zavisno združeno djelovanje („*complex similar and dependent action*“)

Za ovaj oblik zajedničkog djelovanja karakteristično je da najmanje jedna komponenta mješavine utječe na biološku aktivnost druge komponente. Biološka aktivnost može biti promjenjena djelovanjem na brzinu apsorpcije, metabolizma ili eliminacije. Razlika između

složenog sličnog i složenog zavisnog združenog djelovanja spojeva je u tome što komponente mješavine kod prvog imaju isto mjesto djelovanja, dok kod drugog imaju različita mjesta djelovanja. Toksični učinak ove smjese teško je predvidjeti, s obzirom da komponente međusobno utječu na biološke aktivnosti jedna druge. Kako ove mješavine nemaju aditivno zajedničko djelovanje, imaju tendenciju za singergistički ili antagonistički učinak.

#### 1.1.4. Izobologrfska metoda za određivanje interakcija među spojevima

Izobologrfsku metodu prvi je predložio Fraser (1870-1871, 1872), a upotrebu izobolograma proširili su Loewe i Muischnek (1926), Loewe (1953), i Berenbaum (1981). Riječ izobola dolazi od grčke riječi *bolos* (Βολος) koja znači pogodak, odnosno riječi *izobola* - slični pogodci.

Ova metoda je primjenjiva pri većini uvjeta za istraživanje interakcija među spojevima budući da je neovisna o bilo kakvom poznavanju mehanizama toksičnosti komponenti u smjesi. Izobologram se sastoji od koordinativnog sustava na koji se nanose doze pojedinačnih komponenti smjese, te „linije aditivnosti“ koja služi za razlikovanje (razlučivanje) aditivnih, sinergističkih ili antagonističkih interakcija (Tallarida, 2006).

Izobologrfska metoda se zasniva na slijedećoj pretpostavci: Ako se spoj *A* i Spoj *B* primjene u kombinaciji, toksičnost ove smjese može se odrediti (procijeniti) dijeljenjem koncentracije svakog spoja u smjesi sa koncentracijom pojedinačnog spoja koja daje isti učinak kao i smjesa (izo-efektna koncentracija). Metoda vrijedi za smjese koje se sastoje od bilo kojeg zadanog broja spojeva, ali je opisana za binarne smjese kako bi se što jednostavnije prikazala. Izobologram se izrađuje iz doza-odgovor krivulja koje opisuju spoj *A* i spoj *B* pojedinačno, te u kombinaciji u izoefektnim koncentracijama (koncentracije koje polučuju isti učinak, npr.  $LC_{50}$ ,  $EC_{50}$  za pojedinačni spoj). Ravna linija (linija aditivnosti) povezuje specifični učinak (npr.  $EC_{50}$ ) za pojedini spoj i predstavlja kombinaciju *A* i *B* kada spojevi daju aditivni učinak. Ovaj odnos se može prikazati na slijedeći način:

$$\frac{d_A}{D_A} + \frac{d_B}{D_B} = 1$$

gdje su  $d_A$  i  $d_B$  = doze spojeva *A* i *B* u smjesi koja daje određeni učinak,  $D_A$  i  $D_B$  = doze spojeva *A* i *B* u pojedinačnim eksperimentima koje dovode do istog učinka kao u smjesi (Brenbaum, 1989; Kortenkamp i Altenburger, 1998).

Ako je učinak smjese jači nego za pojedinačne spojeve ( $D_A + D_B$ ), ovaj međudodnos se može prikazati slijedećim izrazom:

$$\frac{d_A}{D_A} + \frac{d_B}{D_B} < 1$$

Ako je učinak smjese manji nego od učinka pojedinačnih spojeva odnos se može prikazati na slijedeći način:

$$\frac{d_A}{D_A} + \frac{d_B}{D_B} > 1$$

## 1.2. Hormetički koncept u procjeni toksičnosti spojeva

Velik broj različitih ksenobiotika, a među njima i pesticidi u okolišu se pojavljuju u vrlo malim (subefektnim) koncentracijama. Dugo se smatralo da te male, odnosno subefektne koncentracije toksičnih tvari nemaju učinka na organizme. Tek u novije vrijeme ustanovila se pojava kod koje upravo ove subefektne koncentracije toksične tvari dovode do učinka i to suprotnog od onog kojeg uzrokuju pri većim koncentracijama (Stenersen, 1980b; Calabrese, E.J., 2008, Zanucio i sur., 2003; Belz i sur., 2008). Ova pojava se naziva hormezom, a među prvima ju je opisao njemački liječnik i farmakolog Hugo Schulz, 80-tih godina prošlog stoljeća (Calabrese, 2008). Istraživanja koja su se do sada provodila uglavnom su se odnosila na hormetičko djelovanje lijekova, no u novije vrijeme hormetički učinak se istražuje i na okolišnim zagađivačima (Gardner i sur., 1998; Łaszczycza i sur., 2004; Kefford i sur., 2008; Zalizniak, L., Nugegoda, N., 2006a).

Obilježje hormeze je neuobičajen izgled „dose-response“ krivulje, koji je uobičajeno sigmoidalan, no u slučaju hormeze, ova krivulja mijenja svoj oblik i to upravo u dijelu subefektnih koncentracija, tako da možemo reći da male doze dovode do stimulacije a velike do učinka inhibicije (Stenersen, 1980b). Jedan od primjera je hormetički učinak temefosa na aktivnost acetilkolinesteraze kod gujavice *Eisenia fetida*. Naime, kao i većina organofosfata, temefos uzrokuje inhibiciju enzima acetilkolin-esteraze (AChE). Međutim, ustanovilo se da subefektne koncentracije ovog spoja uzrokuju statistički značajno povećanje aktivnosti AChE (Hackenberger i sur., 2008).

Danas se zna za oko 3000 spojeva koji uzrokuju ovu pojavu. Upravo zbog toga što neki spojevi dovode do učinka u subefektnim koncentracijama, u procjeni toksičnosti ksenobiotika svakako treba uzeti u obzir i hormezu.

Calabrese (2008) smatra da hormeza, kao središnji koncept u toksikologiji i farmakologiji treba biti uključena u doza odgovor procjene, uključujući i procjene učinka smjese spojeva. Istraživanja koja su se do sada provodila vezana za toksičnost mješavina, zatim modeli i metode za određivanje toksičnosti mješavina, baziraju se na monofaznim doza-odgovor krivuljama. Međutim, postavlja se pitanje što se događa kada neki od spojeva u smjesi potiču bifazni doza odgovor odnos? Može li se i tada učinak smjese predvidjeti, pogotovo pri niskom rasponu koncentracija? Može li se veličina i raspon koncentracija hormeze u smjesi predvidjeti iz poznavanja doza-odgovor odnosa pojedinačnih spojeva? Kako sve to utječe na

predviđanje zajedničkog djelovanja spojeva ako se hormetički odgovor ignorira? Odgovori na ova pitanja još uvijek ne postoje. Iako su ova pitanja najčešće upućivana humanoj toksikologiji i farmakologiji, pitanje hormeze u smjesama jednako je relevantno i za ekotoksikologiju i fitofarmakologiju gdje se radi o smjesama različitih zagađivala, pesticida ili alelokemikalija koji također mogu uzrokovati bifazne doza-odgovor krivulje (Calabrese, 2008; Belz i sur., 2008).

### 1.3. Pesticidi

Pesticidi (lat. *pestis*-kuga, *occidere*-ubiti) su kemijske tvari sintetičkog ili biološkog porijekla koje služe za suzbijanje, odbijanje, reguliranje rasta, te općenito za kontrolu neželjenih učinaka ciljnih organizama. Upotreba pesticida ima široku primjenu u poljoprivrednoj proizvodnji, šumarstvu i javnom zdravstvu. Do intenziviranja upotrebe pesticida došlo je nakon Drugog svjetskog rata, od kada su pesticidi postali jedan od najtraženijih proizvoda u poljoprivredi, pa su se tako 1,1,1-trikloro-di-(4-klorfenil)etan poznatiji kao DDT, te drugi perzistentni pesticidi unosili u okoliš u enormnim količinama kako bi riješili probleme u kontroli različitih bolesti koje prenose kukci, te probleme vezane uz gubitak hrane uslijed djelovanja štetnika.

U svijetu se godišnje potroši u prosjeku 2,5 milijuna tona ovih spojeva. Prema podacima iz Izvješća o stanju okoliša iz 2007. godine, u Republici Hrvatskoj se godišnje proizvede oko 4000 tona sredstava za zaštitu bilja, a procjenjuje se da se godišnje potroši oko 3 kg aktivnih tvari po hektaru obradive površine. Danas je poznato oko 890 sintetičkih kemikalija koje se koriste kao pesticidi, a broj tržišnih proizvoda na bazi pesticida procjenjuje se na 20 700 (Stenersen, 2004).

Tek potkraj šezdesetih godina prošlog stoljeća, kada je Rachel Carson objavila knjigu *Silent spring* (1962), počelo se ozbiljnije razmišljati o ovim spojevima, njihovoj emisiji u okoliš, te o toksičnim učincima na ljude i druge neciljne organizme.

Pesticidi se mogu klasificirati na različite načine. Ovisno o ciljnim skupinama na koje djeluju pesticidi se mogu podijeliti na insekticide, herbicide, akaricide, rodenticide, limacide, avicide, fungicide. Nešto složenija podjela je na temelju kemijske strukture i mehanizma toksičnog djelovanja. Termin mehanizam toksičnog djelovanja odnosi se na ključne procese kojim pesticidi dovode do subletalnih i letalnih učinaka. Najvažnije skupine pesticida s obzirom na kemijsku građu i mehanizam toksičnog djelovanja obuhvaćaju organofosfate, karbamate, piretroide i organoklorne spojeve.

### 1.3.1. Organofosforni pesticidi

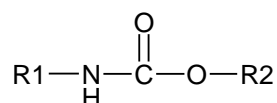
To su esteri, amidi ili tioli fosfatne, fosfonske, ili fosfinske kiseline kod kojih je atom kisika ili sumpora neposredno vezan na atom fosfora (Slika 1). Ovo je jedna od najvećih skupina pesticida u upotrebi upravo zbog svojstva brze razgradnje u okolišu. Ovi spojevi se sintetiziraju različitim kemijsko-tehnološkim postupcima i primjenu nalaze uglavnom kao insekticidi. Dobro su topljivi u vodi i jako dobro topljivi u organskim otapalima. U okoliš organofosfati dospijevaju namjerno kao pesticidi na poljima, oranicama i slučajno akcidentima, procjednim vodama s tretiranih oranica i slično. U ovu skupinu spadaju malation, diazinon, klorpirifos, pirimifosmetil, temefos i mnogi drugi pesticidi. Ovi spojevi inhibiraju enzim acetilkolinesterazu, ključni enzim za hidrolizu acetilkolina. Inhibicijom AChE dolazi do nakupljanja acetilkolina i prekomjerne stimulacije kolinergičkih receptora i remećenja neuroloških aktivnosti u organizmu.



**Slika 1.** Strukturna formula organofosfornih pesticida. Središnji atom fosfora je peterovalentan. Kisik ili sumpor vezani su dvostrukom vezom na fosfor. R1 i R2 mogu biti alkil-, alkoksi-, alkiltio-, aril-, ariloksi-, mono- ili dialkil-aminogrupe. Supstituent L je alifatska, aromatska ili heterociklička skupina koja se lako odcjepljuje.

### 1.3.2. Karbamatni pesticidi

Karbamati čine veliku skupinu sintetičkih pesticida i svoju su svoju primjenu pronašli kao insekticidi, fungicidi, nematocidi. Svi karbamati su N-supstituirani esteri karbamidne kiseline (Slika 2). Većinom su slabo topljivi u vodi, a dobro topljivi u organskim otapalima. Neurotoksični su i uzrokuju neuralnu disfunkciju inhibirajući acetilkolinesterazu, brzo se razgrađuju i izlučuju iz organizma. Danas je poznato više od 50 karbamatnih spojeva, a u ovu skupinu spadaju karbofuran, karbaril, aldikarb, benomil. Kao i organofosfati, karbamatni spojevi se relativno brzo razgrađuju u okolišu. Neki karbamati imaju tendenciju bioakumulacije u u organizmima, prvenstveno ribama, zbog sporog metaboliziranja. Velik broj ovih spojeva je toksičan za gujavice i druge organizme koji žive u tlu.



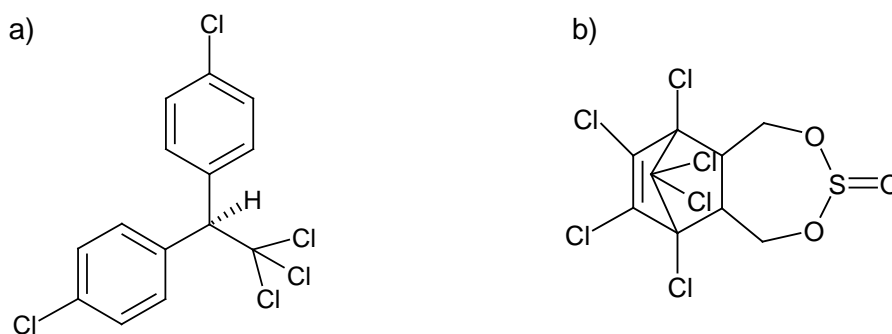
**Slika 2.** Strukturna formula karbamatnih pesticida. Ukoliko je R1 skupina metil, tada se radi o insekticidu; ukoliko je R1 skupina aromatska radi se o herbicidu; ukoliko je R1 skupina derivat benzimidazola, radi se o fungicidu. R2 je alifatski ili aromatski supstituent.

### 1.3.3. Piretroidni pesticidi

Piretroidi (npr. permetrin) su insekticidni spojevi u širokoj upotrebi u poljoprivredi, šumarstvu, komunalnoj higijeni i kućanstvu. To su sintetički analozi i derivati piretrina sadržanih u piretrumu, ekstraktu cvjetova biljaka *Chrysanthemum cinerariifolium* i *Chrysanthemum coccineum*. U ovu skupinu se ubrajaju alfa-cipermetrin, akrinatin, bifentrin, beta-ciflutrin, deltametrin i brojni drugi. I ovi insekticidi također uzrokuju neurološke promjene, ali na drugim ciljnim mjestima. Mehanizam toksičnosti ovih spojeva temelji se na neurotoksičnom djelovanju i to pobuđivanjem natrijevih i kalijevih kanala neurona i usporavanja njihova zatvaranja tijekom faze depolarizacije. Pored toga, u organizmu uzrokuju oksidativni stres i pojačanu produkciju slobodnih radikala, a pokazalo se i da pojačavaju estrogenu aktivnost. U okolišu se relativno brzo razgrađuju.

### 1.3.4. Organoklorni pesticidi

Organoklorni pesticidi su organski spojevi koji u svojoj strukturi imaju jedan ili više atoma klora. Postoji četiri osnovna tipa organoklornih pesticida: diklorodifeniletani, ciklodieni, klorirani benzeni i cikloheksani. Ovi spojevi su vrlo stabilni, sporo se razgrađuju, lipofilni su (topivi su u mastima). Imaju tendenciju bioakumulacije i biomagnifikacije. U ovu skupinu spadaju DDT, klordan, aldrin, dieldrin, heptaklor. DDT je bio prvi učinkoviti sintetički pesticid i imao je vrlo dobru učinkovitost kao insekticid, zbog svoje stabilnosti, vrlo jeftine proizvodnje, te vrlo dobre učinkovitosti protiv malarije. 70-tih godina 20. stoljeća u svim razvijenim zemljama svijeta zabranjena je upotreba DDT-a, ali ne zbog njegove akutne toksičnosti nego zbog činjenice da je izuzetno stabilan i perzistentan kemijski spoj, koji vrlo sporo i teško podliježe razgradnji. Spojevi iz ove skupine djeluju neurotoksično, karcinogeno, te kao endokrini disruptori. Mehanizam kojim djeluju na organizme je blokiranje ionskih kanala (Na-K kanali), blokiranje Na-K ATPaze, vežu se za receptore spolnih hormona (DDT), izazivaju indukciju CYP enzima, metaboliti stvaraju adukte s DNA. Donedavno ova skupina pesticida se smatrala najvažnijom, no zbog velike perzistentnosti u okolišu, teške razgradljivosti, topivosti u mastima i nakupljanja u lancu prehrane ovi se spojevi sve više i više izbacuju iz upotrebe. U Republici Hrvatskoj donedavno je samo jedan pesticid iz ove skupine imao dozvolu za upotrebu (endosulfan), no u popisu sredstava za zaštitu bilja od 2009. godine niti jedan pesticid iz ove skupine nema dozvolu za uporabu.



**Slika 3.** Strukturne formule organoklornih pesticida: a) DDT, b) endosulfan.

Ostale vrste insekticida kao što su regulatori rasta, pesticidi sa kontaktnim i želučanim djelovanjem imaju potpuno različit mehanizam djelovanja. Pored toga mehanizam toksičnog djelovanja između insekticida i herbicida gotovo je uvijek različit. Često, toksičnost insekticida na biljke ili herbicida na životinje uzrokovana sekundarnim mehanizmima toksičnog djelovanja koji nisu sasvim poznati i dovoljno razjašnjeni.

#### 1.4. Sudbina pesticida u okolišu

Ulaskom pesticida u okoliš oni se raspodjeljuju između četiri glavna kompartmenta: vode, zraka, tla i živih organizama, te prolaze kroz različite procese, a tri su osnovna: adsorpcija, translokacija i razgradnja.

Adsorpcija je primarni proces kojim tlo zadržava pesticide i definira se kao vezanje pesticida na čestice tla. Količina pesticida koja se adsorbira na čestice tla ovisi o vrsti, kemijskim svojstvima pesticida (topivosti u vodi, polarnosti), količini vlage u tlu, pH tla, teksturi tla. Za većinu pesticida sadržaj organske tvari je najvažnije svojstvo koje kontrolira stupanj adsorpcije. Stupanj adsorpcije je veći što je veća količina organske tvari.

Postoji više načina translokacije pesticida u okolišu kao npr. isparavanje (kretanje zrakom), kretanje vodom po površini tla (*runoff*), kretanje vodom i disociiranje kemijskih komponenti kroz zemlju (*leaching*), te adsorpcija (kretanje pesticida kroz biljku i životinje).

**Isparavanje** je proces kojim se krutine ili tekućine pretvaraju u plin, čime pesticidi imaju mogućnost translokacije sa inicijalnog mjesta aplikacije. To kretanje se naziva i strujanje, pomak para. Pesticidi lako isparavaju u pješčanim i vlažnim tlima. Temperatura, suh zrak, vjetar pojačavaju isparavanje. Inkorporiranje pesticida u tlo pomaže u sprječavanju isparavanja. Stupanj isparavanja uvelike ovisi o hlapivosti i vrsti pesticida.

**Otjecanje** (*runoff*) je kretanje pesticida u vodi preko nagnute površine. Otjecanje se može javiti kada velika količina vode dospijeva u tlo i to puno brže nego što se ta voda može adsorbirati u tlu. Pesticidi se u tlu mogu kretati otjecanjem kao spojevi otopljeni u vodi ili

vezani za sitne čestice tla. Količina pesticida koja otječe ovisi o nagibu, teksturi tla, vlažnosti tla, oborinama, vrsti pesticida. Otjecanjem pesticida od mjesta tretiranja oni mogu dospjeti u vodotokove, jezera, rijeke, izvore.

**Ispiranje** je kretanje pesticida u vodi kroz tlo. Čimbenici koji utječu na to da li će pesticidi doprijeti u podzemne vode uključuju svojstva tla i pesticida, njihovu interakciju sa vodom bilo nakon navodnjavanja ili oborina. Ispiranje se može pojačati u slučaju da je pesticid topiv u vodi, kada je tlo pjeskovito, ako padaline nastupe neposredno nakon primjene pesticida, ako se pesticid ne veže čvrsto na čestice tla.

Karakteristike tla su izuzetno važne u kretanju pesticida. Glinovita tla imaju veliki kapacitet adsorbiranja velikog broja spojeva uključujući pesticide i nutrijente u tlu. Pjeskovita tla imaju puno manji kapacitet adsorpcije pesticida. Tla bogata organskim tvarima vrlo lako adsorbiraju pesticide. O teksturi tla ovisi i kretanje vode i pesticida kroz tlo.

**Apsorpcija** je inkorporiranje pesticida u žive organizme (biljke, životinje, mikroorganizme). Velik broj pesticida razgrađuje se vrlo brzo nakon apsorpcije.

Pesticidi u okolišu podliježu razgradnji. Idealno je kada pesticid u tretiranom okolišu, tretiranoj površini ostaje toliko dugo da proizvede željeni učinak, a zatim da se razgradi u bezopasne spojeve. No neki pesticidi se u okolišu zadržavaju dugo. Ovaj proces može trajati od nekoliko sati, dana ili godina, ovisno o okolišnim uvjetima i kemijskim svojstvima pesticida. Pesticidi koji se brzo razgrađuju, općenito se ne zadržavaju u tlu, ali ponekad razgradni produkti pojedinih pesticida mogu biti perzistentniji i toksičniji od polaznog spoja. Pored toga, neki se pesticidi u okolišu razgrađuju u spojeve koji su puno toksičniji od polaznog spoja. Tako se npr. dimilin, u okolišu raspada na 2,6-difluorobenzoičnu kiselinu, 4-klorfenilureu i 4-kloroanilin.

Tri su osnovna načina razgradnje pesticida: biološka (razgradnja uz pomoć mikroorganizama), kemijska (razgradnja kemijskim reakcijama, kao što su hidroliza i redoks reakcije) i fotokemijska (razgradnja ultravioletnim ili vidljivim svjetlom).

**Mikrobiološka razgradnja** je razgradnja spojeva mikroorganizmima kao što su gljivice i bakterije. Mikrobiološka razgradnja se pojačava pri višim temperaturama, pri odgovarajućem pH tla, vlažnosti, prisutnosti kisika itd.

**Kemijska razgradnja** pesticida odvija se putem kemijskih reakcija u tlu, kao što je npr. hidroliza. Brzina i tip kemijskih reakcija ovisi o vezanju pesticida za tlo, temperaturi tla, pH vrijednosti (većina pesticida, pogotovo organofosfata razgrađuje se puno brže u alkalnim tlima), zatim o vlažnosti tla.

Brzina kemijske razgradnje može se prikazati vremenom poluživota, odnosno vremenom koje je potrebno da se polovica pesticida razgradi, te njegova koncentracija padne na polovicu početne razine. Vrijeme poluživota ovisi o više čimbenika: vrsti tla, formulaciji pesticida, ekološkim uvjetima (npr. temperatura, vlaga, vjetar).



**Fotokemijska razgradnja** je razgradnja pesticida ultravioletnim ili vidljivim svjetlom. Svi pesticidi su podložni fotodegradaciji u određenoj mjeri. Na brzinu razgradnje utječe intenzitet svjetla, trajanje izloženosti, svojstva pesticida.

### **1.5. Pregled dosadašnjih istraživanja vezanih za ispitivanje toksičnosti mješavina pesticida**

Zbog intenzivne upotrebe velikog broja različitih pesticida opsežna istraživanja vezana uz učinke i toksičnost mješavina napravljena su u posljednjih nekoliko desetljeća. Vrlo je malo istraživanja ovog tipa objavljeno za terestričke organizme, dok je velik broj istraživanja usmjeren na akvatičke organizme.

Učinak binarnih smjesa metamidofosa i bakra, acetoklora i bakra, te metamidofosa i acetoklora nakon 14 dana izlaganja *Eisenia foetida* u tlu prikazali su u svom radu Lian i Zhou (2003). Mješavine pesticida i metala u različitim koncentracijama uglavnom su polučile aditivni, dok je kombinacija metamidofosa i acetoklora kao rezultat imala sinergistički učinak na postotak mortaliteta.

Rezultati istraživanja učinaka binarnih smjesa triazinskih herbicida (atrazina, cimazina i simazina) sa organofosforinim insekticidom klorpirifosom primjenom kontakta testa na filter papiru nakon 96 h izlaganja gujavica (*Eisenia fetida*) pokazali su da atrazin i cianazin značajno pojačavaju toksičnost klorpirifosa, dok simazin ne pokazuje utjecaj na klorpirifos (Lydy i Linck, 2003).

Složeno istraživanje upotrebe modela adicije koncentracija u određivanju toksičnosti mješavina napravili su Gomez-Eyles i sur. (2009), pri čemu su pratili učinak smjese dva insekticida imidakloprida i tiakloprida na reproduktivne parametre (broj jajašaca, broj kokona) kod vrpčara (*Caenorhabditis elegans*) i gujavica (*Eisenia fetida*).

Jedno od prvih većih osvrta na toksičnost mešavina provedeno je od strane Europske savjetodavne komisije za kopneno ribarstvo (European Inland Fisheries Advisory Commission, EIFAC, 1980). Istraživanje je obavljeno sa 76 mješavina na ribama. Istraživanja su obuhvaćala uglavnom binarne smjese spojeva koji se mogu pronaći u kanalizacijskim i industrijskim izljevima. Većina ovih mješavina polučila je aditivni učinak.

Toksikološka istraživanja provedena sa smjesama pesticida rezultirala su velikim spektrom odgovora u kojima kompleksnost interakcija ovisi o razlikama u kemijskim svojstvima i mehanizmima djelovanja pesticida. Studije vezane za ispitivanje učinaka pesticida iz iste skupine obično se lako interpretiraju, jer su promatrani učinci najčešće aditivni. Bailey i sur. (2000) su uočili da organofosforni insekticidi kao što su klorpirifos i diazinon u eksperimentima provedenim u laboratorijskim i okolišnim uvjetima na kladocerama (*Ceriodaphnia dubia*) polučuju isključivo aditivni toksični učinak (Bailey i sur., 1997). Aditivni učinci također su zabilježeni i kod trzalaca (*Chironomus tentans*) nakon izlaganja binarnim

smjesama nekoliko organofosfata, uključujući klorpirifos, azinofos metil, metidation i diazinon (Lydy i Austin 2004). Faust i sur. (1993) su uočili aditivni učinak za binarne smjese s-triazinskih herbicida atrazina i cianazina u reproduktivnim testovima toksičnosti sa zelenim algama (*Chlorella fusca*). Mehanizam toksičnog djelovanja ovih herbicida temelji se na ometaju lanca transporta elektrona u fotosustavu II. Aditivni učinak inhibitora acetilkolinesteraze dokazan je kod zelenih algi (*Chlorella dubia*) u eksperimentima sa karbamatnim insekticidom karbofuranom, te organofosfatima metilparationom i malationom (Norberg-King i sur., 1991).

Razumijevanje toksičnosti smjesa pesticida sa različitim mehanizmom djelovanja više je izazovno, ali je i puno teže objasniti procese koji dovode do toksičnih odgovora. Pape-Lindstrom i Lydy (1997). Aditivni toksični učinak kod mušica izlaganih smjesi organoklornog insekticida metolaklora i organofosforinog insekticida metil parationa (Pape-Lindstrom i Lydy, 1997). Faust i sur. (1994) su pronašli da herbicidi sa različitim mehanizmima toksičnog djelovanja u binarnim kombinacijama općenito dovode do aditivnog učinka kod algi.

Veliki broj istraživanja odnosi se na zajedničko djelovanje piretroidnih insekticida i organofosfata (Tripathi i Agarwal, 1998; Moreby i sur., 2001; Denton i sur., 2003). Najčešći učinak ove kombinacije je veći od aditivnog. Denton i sur. (2003) su pokazali da izlaganje smjesi esfenvalerata i diazinona kod velikoglavog klena (*Pimephales promelas*) rezultira toksičnim učinkom više od aditivnog. Slični toksični učinci uočeni su i nakon izlaganja organizama smjesi piretroida i karbamata. Permetrin i karbamat propoksur dovode do više od aditivnog toksičnog učinka kod komarca (*Culex quinquefasciatus*) (Corbel i sur., 2003). Ovakvi učinci se povezuju sa komplementarnim mehanizmima toksičnog djelovanja ove dvije skupine insekticida, koji djeluju na različite komponente prijenosa živčanih impulsa.

Istraživanja vezana za utjecaje smjesa koje se sastoje od komponenti sa potpuno različitim mehanizmima toksičnog djelovanja, kao na primjer smjesa insekticida i herbicida ili pak smjesa pesticida sa nekim drugim spojem, dovodi do mješovitih rezultata. Tako na primjer netoksična interakcija uočena je nakon izlaganja trzalaca (*Chironomus tetans*) binarnoj smjesi triazinskog herbicida atrazina i karbamatnog insekticida karbofurana (Douglas i sur., 1993), dok atrazin u kombinaciji sa klorpirifosom (fosforotioatni insekticid) dovodi do značajne inhibicije acetilkolinesteraze kod istog organizma (Belden i Lydy, 2000). Djelovanje smjese organofosfata diazinona i amonijaka istraživana je kod zelenih algi (*Chlorella dubia*) upotrebom 48 h akutnog testa toksičnosti (Bailey i sur., 2001). Rezultati za ovu binarnu smjesu su pokazali toksični učinak manje od aditivnog. Manje od aditivnog učinka uočili su i Blanks i sur. (2003), nakon izlaganja zelenih algi binarnoj smjesi diazinona i bakra.

Rezultati nekih istraživanja su pokazali da triazinski herbicidi mogu pojačati učinak organofosfata i time dovesti do više od aditivnog odgovora smjese (Pape-Lindstrom i Lidy,

1997; Belden i Lydy, 2000; Anderson i Lydy, 2002; Lydy i Linck, 2004). Zapravo ovaj odgovor predstavlja potencijajski učinak, jer herbicidi nisu akutno toksični za ove organizme. Veličina potencijacije uvelike ovisi o koncentraciji i vrsti triazinskog herbicida i organofosfata koji se koriste u istraživanju. Okolišne studije rijetko istražuju toksikokinetičke i toksikodinamičke procese zajedničkog djelovanja pesticida. Izuzetak je pokušaj da se objasni mehanizam kojim triazinski herbicidi potenciraju toksičnost organofosfornih insekticida. Lindstrom i Lydy (1997) navode da atrazin potiče biotransformaciju organofosfata koji se pretvara u jače toksične metabolite (okisi-analoge). Naime, organofosforni insekticidi iz skupine fosforotioata zahtijevaju oksidativnu aktivaciju uz pomoć CYP P450 enzima u njihove okon analoge da bi inhibirali AChE. Stoga ovi autori pretpostavljaju da atrazin utječe na indukciju citokrom P450 enzima odgovornih za pretvorbu i time potiču metaboličku aktivaciju organofosfornih insekticida. Predhodna istraživanja podržavaju ovu hipotezu, budući da su pokazala da se biotransformacijski enzimi snažno induciraju nakon izlaganja mnogih kralježnjaka i beskralježnjaka atrazinu (Egaas i sur., 1993). Istraživanja koja su proveli Belden i Lydy (2000) su pokazala da se nakon izlaganja trzalaca (*Chironomus tentans*) smjesi atrazina i klorpirifosa, znatne količine klorpirifosa pretvaraju u okson oblik.

Eksperimenti sa multikomponentnim smjesama pesticida manje su se provodili, no najčešći rezultat kod izlaganja organizama većem broju pesticida je aditivni odgovor (Broderius i Kahl, 1985; Altenburger i sur., 2000). Upotrebom modela adicije koncentracija Broderius i Kahl (1985) su istraživali akutnu toksičnost velikog broja smjesa organskih spojeva kod velikoglavog klena (*Pimephales promelas*) pri čemu su kao odgovor aditivni učinak.

Hayes i suradnici (2006) su uspjeli dokazati na primjeru smjese pesticida koje se sastoje od herbicida (npr. atrazin, metolaklor), insekticida (npr. ciflutrin) i fungicida (npr. propikonizol) koji se uobičajeno upotrebljavaju u dozvoljenim količinama u tretiranju štetnika, da se toksičnost ovakve kombinacije na laboratorijskom uzorku vodozemaca (žaba) višestruko pojačava. Kombinacija izaziva spolne promjene, oštećenja imunološkog sustava i promjene u režimu ishrane.

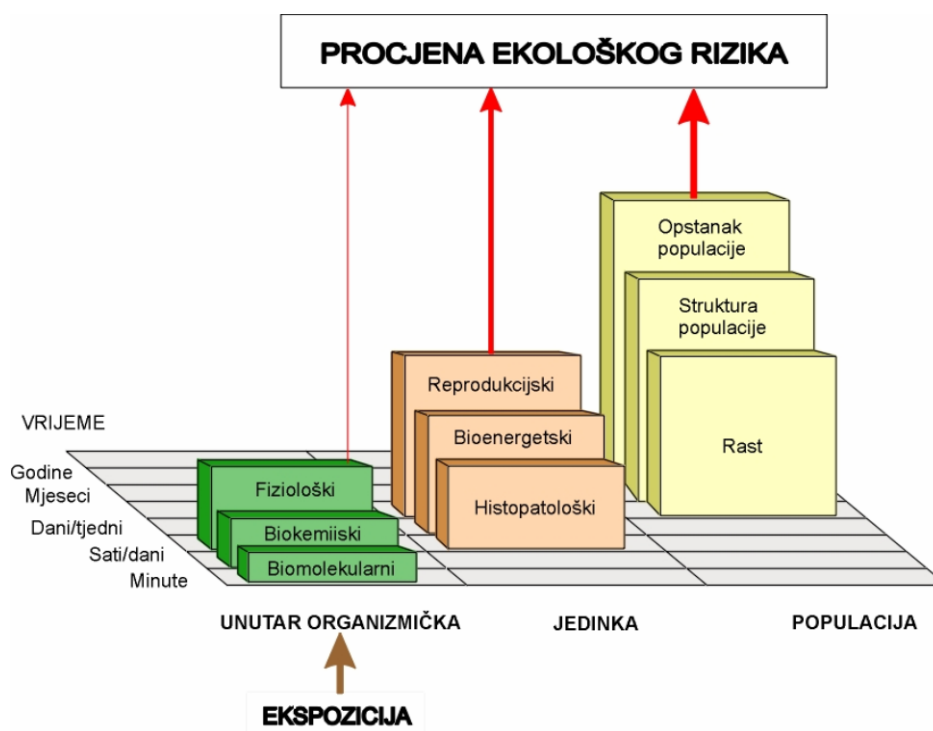
## 1.6. Primjena biomarkera u zagađenju okoliša

Značajan korak u zaštiti okoliša je procjena ekološkog rizika (PER; engl. *Ecological Risk Assessment* - ERA) tj. procjenjivanje vjerojatnosti nepovoljnih ekoloških učinaka koji se mogu pojaviti ili se pojavljuju kao rezultat izloženosti jednom ili više štetnih čimbenika. Proces PER-a temelji se na dva bitna elementa: karakterizaciji izloženosti i karakterizaciji ekološkog učinka. Svakim danom pronalaze se nove ili se prilagođavaju i osuvremenjavaju stare metode PER-a. Karakterizacija ekološkog učinka može biti izvedena na različitim razinama biološkog sustava, počevši od molekularne, pa sve do razine viših ekoloških kategorija kao što su populacije, biocenoze ili cjelokupni ekološki sustav. Primarnu ulogu u takvim

karakterizacijama, pored klasičnih kemijskih analiza, imaju biološki markeri ili uobičajeniji naziv biomarkeri. Pojam biomarker označava mjerljiv biološki odgovor na izloženost organizma zagađivalu ili jednostavno učinak zagađivala na organizam (Kurelec, 1998). Cilj praćenja bioloških pokazatelja u okolišu temeljen na biomarkerima je otkrivanje signala stresa u jedinkama populacije, koji pružaju rano tj. pravovremeno upozorenje na izloženost zagađivalu.

Za učinkovitu zaštitu cjelokupnog sustava potrebno je, pravodobno detektirati pojavu promjene na njemu. Rano otkrivanje biološkog učinka na nižim biološkim razinama (molekule, stanice, tkiva) omogućava pravovremeno uočavanje promjena i efikasno djelovanje u smislu sanacije i reparacije viših bioloških razina (populacija, ekološki sustav). Svaki stres na razini molekula ne mora nužno biti praćen stresom na razini populacije, ali svakom stresu na razini populacije mora prethoditi stres na razini molekula.

Pored toga, vjerojatnost popravka sustava opada s vremenom koji je prošao od trenutka djelovanja čimbenika nestabilnosti, odnosno unosa nekog zagađivala u ekološki sustav (Slika 4). Tako, populacijski biomarkeri, kao što su brojnost, natalitet, mortalitet, odnos spolova itd. detektiraju promjenu u sustavu tek nakon što je prošao dug vremenski period kada je vjerojatnost popravka, tj. intervencije na okolišu već jako mala. Promjene na razini organizma, kao što su makrohistološke promjene, anatomske promjene i dr., mogu se detektirati ranije od populacijskih, ali ni oni ne pružaju dovoljno brzo informaciju dostatnu za intervenciju. Stanični i histološki biomarkeri, kao što je npr. propusnost membrana, promjene staničnog potencijala, promjene mitotkog indeksa, promjene u histokemijskim osobinama tkiva i slično, mogu se pratiti već vrlo rano od nastanka promjena u okolišu. Međutim, molekularni biomarkeri, predstavljaju najraniji mogući odgovor na biološki učinak zagađivala. Stoga su biomarkeri na razini molekula, stanica ili tkiva izuzetno povoljni jer njihovo ispoljavanje i mjerljive promjene njihovih veličina nastupaju vrlo brzo nakon izlaganja organizma ksenobioticima.



**Slika 4.** Shematski prikaz pojavljivanja specifičnih odgovora unutar bioloških sustava na izloženost okolišnim zagađivačima.

Zbog navedenog, pri određivanju i kvantifikaciji učinka zagađivala te procjeni rizika na ekološki sustav veliku važnost imaju upravo molekularni biomarkeri. U usporedbi sa standardnim mjerenjima koncentracije štetnih tvari u zraku, vodi i tlu, prednost biomarkera je u tome što oni kvantitativno ukazuju na status organizma čime dobiveni rezultati imaju veći biološki značaj. Uspoređujući rezultate mjerenja biomarkera s rezultatima ciljane kemijske analize, rezultati dobiveni praćenjem bioloških pokazatelja u okolišu su manje određeni i teže objašnjivi. S druge strane, u usporedbi s rezultatima praćenja ekoloških parametara (npr. rast populacije, starosna struktura, brojčani odnos spolova itd.) rezultati mjerenja biomarkerima su najčešće određeni i lakši za interpretaciju. Uobičajena mjerenja koncentracija zagađivala tj. ksenobiotika su neophodna ali samo u kombinaciji s mjerenjem pokazatelja utjecaja na više razine sustava.

Biomarkeri se mogu podijeliti u tri osnovne kategorije: biomarkeri izloženosti, biomarkeri učinka i biomarkeri prijemljivosti (Van der Oost i sur., 2003). Biomarkeri izloženosti su signali izloženosti jednog organizma, populacije ili zajednice na kemijska zagađivala. Oni mjere jednu egzogenu supstanciju ili njene metabolite i njenu interakciju s biološkom molekulom (npr. inhibicija aktivnosti acetilkolinesteraze). Biomarkeri učinka mjere biokemijske, fiziološke ili druge promjene unutar tkiva ili tjelesnih tekućina organizma koji se mogu prepoznati i povezati sa mogućim oštećenjem zdravlja ili pojavom bolesti i obično su to signali koji

upućuju da je jedan organizam, populacija ili zajednica oštećena (obično nepovratno) s jednim ili više zagađivala (npr. DNA adukti, zatim indukcija vitelogenina kod mužjaka) (Marquardt i sur., 1991). Biomarkeri osjetljivosti su pokazatelji nasljedne ili stečene sposobnosti nekog organizma da odgovori na izloženost organizma specifičnom ksenobiotiku.

Prema Sandersu (1998) molekularni biomarkeri se mogu podijeliti u dvije skupine. Prvu skupinu čine biokemijski odgovori na specifična zagađivala koji uglavnom uključuju smanjenje (inhibiciju) aktivnosti enzima. Ovoj skupni biomarkera pripada inhibicija aktivnosti acetilkolinesteraze (AChE) kao odgovor na izloženost organizma organofosfatima i karbamatima, te inhibicija aktivnosti  $\gamma$ -aminolevulinat dehidrataze kao odgovor na izloženost organizma olovu i sl.

Drugu skupinu čine molekularni i stanični odgovori na općeniti subletalni stres koji najčešće uključuju poticanje (indukciju) aktivnosti enzima. U tu skupinu spadaju mnogobrojni histološki, tj. histopatološki biomarkeri, produkcija „heat shock“ proteina i stresu odgovornih proteina (Bengtsson i sur., 1992), te promjena u peroksidaciji lipida tj. nastajanju malondialdehida, kao odgovor na izloženost organizma polikloriranim bifenilima (PCB) i pesticidima (Ribera i sur., 2001; Saint-Denis i sur., 1999), te teškim metalima (olovo, uran) (Saint-Denis i sur., 2001). Od biomarkera ove skupine značajni su i biomarkeri koji u praktičnom smislu ukazuju na genotoksična svojstva zagađivala. To su broj mikronukleusa, količina nastalih DNA adukata, te količina DNA lomova (Fairbairn i sur., 1995).

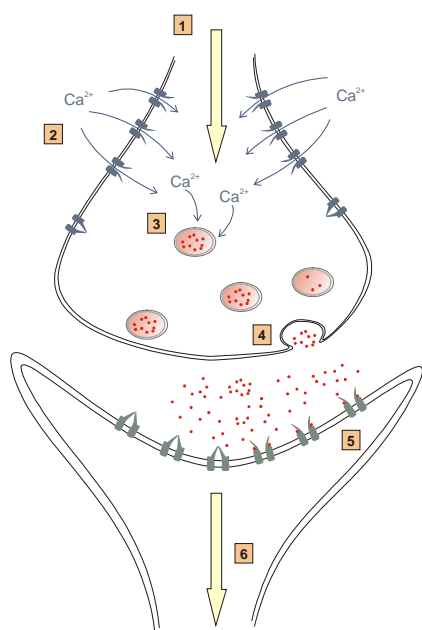
Posebnu skupinu biomarkera na molekularnoj razini čine enzimi ili enzimski sustavi uključeni u metabolizam ksenobiotika. Kao i sam metabolizam ksenobiotika, ovi biomarkeri se mogu podijeliti na biomarkere prve i druge faze biotransformacije.

### **1.7. Osobine enzima acetilkolinesteraze (AChE, EC 3.1.1.8) kao biomarkera**

Vrlo važan molekularni biomarker, je enzim acetilkolinesteraza (AChE). AChE se nalazi prvenstveno u mišićnom tkivu gdje sudjeluje u prijenosu živčanog impulsa u živčanim i živčano-mišićnim sinapsama. Osim u sinapsama, AChE se nalazi i u krvi gdje je vezana na eritrocite, ali njezina uloga na eritrocitima za sada nije poznata. AChE je enzim veličine 75 kD. „*Turnover number*“ ovog enzima je 14000 molekula ACh u sekundi što ga čini gotovo savršenim katalizatorom. Aktivno mjesto AChE čini katalitička trijada koja se sastoji od Ser 200, His 440 i Glu 327 (Urich, 1990).

Fiziološka funkcija AChE je hidroliza neurotransmitera acetilkolina (ACh) u sinapsama, na acetat i kolin, čime je omogućen normalan prijenos živčanih impulsa. Sinapsa je mjesto komunikacije između dva neurona. To je mjesto gdje se živčani impuls prenosi s jednog neurona na drugi. Na sinapsi razlikujemo mjesto slanja impulsa (aksonski završetak) i mjesto

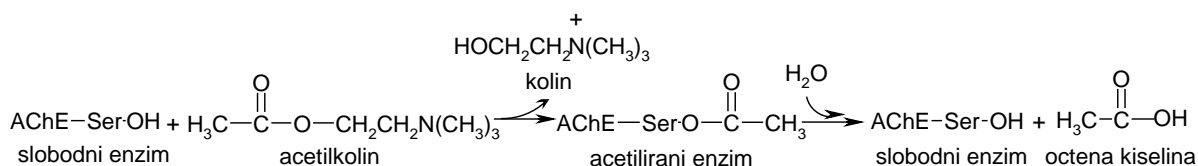
gdje se impuls prepoznaje (dendrit). Gotovo svi živčani završeci parasimpatičkog živčanog sustava luče acetilkolin. Acetilkolin (ACh) se sintetizira na presinaptičkom kraju neurona gdje se nakuplja unutar sinaptičkih vezikula. Dolazak akcijskog potencijala na presinaptičku membranu aktivira kalcijeve  $\text{Ca}^{2+}$ -kanale koji se otvaraju te omogućavaju ulazak  $\text{Ca}^{2+}$  iona u citoplazmu.  $\text{Ca}^{2+}$  ioni vezanjem za sinaptičke vezikule ispunjene acetilkolinom, potiču njihovu egzocitozu što za posljedicu ima oslobađanje acetilkolina u sinaptičku pukotinu. Postsinaptička membrana sadrži specifične kolinergičke proteinske receptore na kojima se nalaze vezna mjesta za acetilkolin. Vezanjem dvije molekule acetilkolina na dva vezna mjesta receptora dovodi do otvaranja ionskih kanala i depolarizacije postsinaptičke membrane. Na taj način se živčani impuls prenosi s presinaptičkog područja na postsinaptičko, tj. s jednog neurona na drugi (Slika 5). Nakon otpuštanja sa receptora molekule ACh koje su sudjelovale u prijenosu određenog živčanog impulsa moraju biti razgrađene tijekom nekoliko narednih milisekundi prije potencijalnog dolaska narednog živčanog impulsa. Djelovanje acetilkolina je vrlo kratko oko 1/500 sekundi. Zato AChE brzo hidrolizira acetilkolin na kolin i octenu kiselinu. Kolin može difundirati natrag kroz presinaptičku membranu i biti opet rabljen za sintezu acetilkolina.



1. Smjer širenja živčanog impulsa
2. Ulazak kalcijevih iona
3. Vezanje kalcijevih iona za vezikule ispunjene acetilkolinom
4. Otpuštanje acetilkolina u sinaptičku pukotinu
5. Otvaranje ionskih kanala vezanjem acetilkolina na kolinergičke receptore
6. Smjer depolarizacije postsinaptičke membrane i širenje živčanog impulsa

**Slika 5.** Prijenos živčanog impulsa pomoću acetil-kolina.

Prvi korak u hidrolizi predstavlja acetiliranje serina u aktivnom mjestu enzima. Hidroksilna skupina serina djeluje kao nukleofil, te se kovalentno veže na karbonilnu komponentu supstrata. Ovo vezanje dovodi do transesterifikacije i otpuštanja alkoholne komponente supstrata (kolin). Acetilirani enzim se zatim hidrolizira pri čemu nastaju slobodni enzim i octena kiselina. Molekula vode u aktivnom centru enzima aktivira se u hidroksilni anion koji hidrolizira preostali esterski kompleks enzim-supstrat, čime se enzim regenerira i oslobađa se acetat (Slika 6).



**Slika 6.** Mehanizam hidrolize acetilkolina.

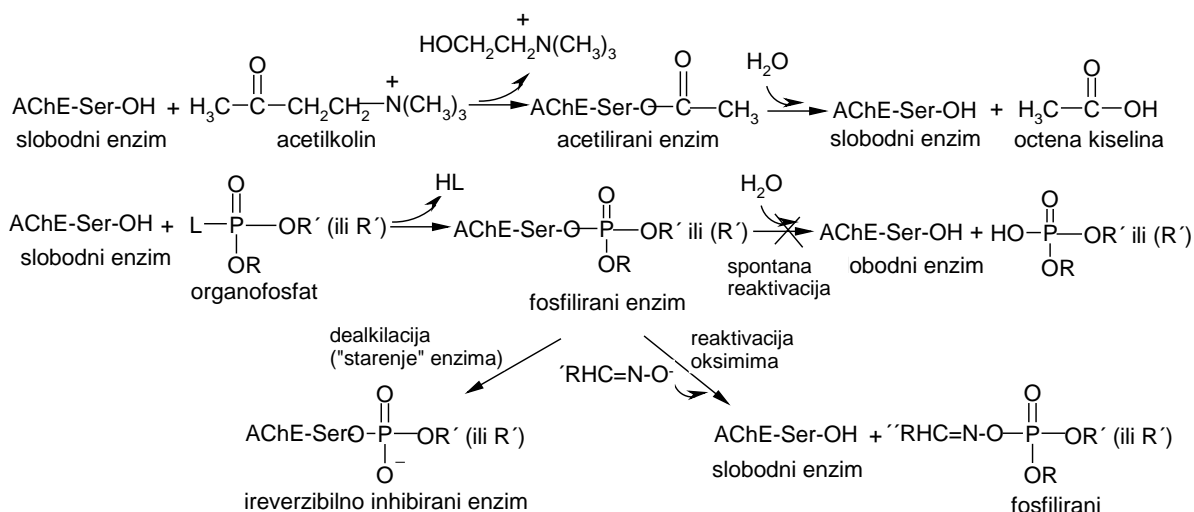
AChE pripada skupini serinskih esteraza, tj. esteraza koje u aktivnom centru imaju serin. Osim AChE u ovu skupinu spadaju još butirilkolinesteraza (BChE; EC 3.1.1.7), esteraza povezana s neuropatskim djelovanjem OP spojeva (engl. *Neuropathy Target Esterase*, NTE; EC 3.1.1.5.) i karboksilesteraza (CaE; EC 3.1.1.1). Ova skupina enzima snažno se inhibira organofosforim i karbamatnim spojevima (za razliku od A-esteraza koje ove spojeve hidroliziraju i C-esteraza koje ne ulaze u interakciju s organofosfatima) (Abdollahi i sur., 2003). Iako je ustanovljeno da AChE mogu inhibirati i druge tvari, poput nekih metala, aktivnost ovog enzima prvenstveno je koristan biomarker za detekciju izloženosti organofosforim i karbamatnim spojevima.

Organofosfati su našli su svoju primjenu kao pesticidi (insekticidi, herbicidi, fungicidi, akaricidi i nematocidi), zatim kao živčani bojni otrovi kao što su npr. sarin, soman, tabun, VX. Njihova toksičnost, počiva na svojstvu inhibiranja esteraza, prvenstveno acetilkolinesteraze.

Ovisno o tome da li je na atom fosfora vezan kisik ili sumpor razlikujemo neposredne i posredne inhibitore AChE. Posredni inhibitori kao što su malation, paration, moraju biti metabolički aktivirani u svoje oksianaloge (malaokson, paraokson). Velik broj organofosfata se aktivira putem sustava CYP ili putem sustava FAD-sadržavajućih monooksigenaza.

Do inhibicije AChE organofosfatima dolazi zbog odcjepljivanja jednog supstituenta fosfata i vezanja ostatka molekule kovalentno s aktivnim mjestom enzima. Fosfiliranje enzima je skupni naziv za fosforiliranje, fosfoniliranje i fosfiniliranje i to je prvi korak u interakciji AChE i OP spojeva. Fosfilirani enzim je inaktivan, a inaktivacija traje sve dok se fosfilirani enzim ne hidrolizira. Vrijeme potrebno za hidrolizu fosfiliranog enzima tj. za njegovu reaktivaciju varira od vrste do vrste organofosfata, te može iznositi od nekoliko sati do nekoliko dana.



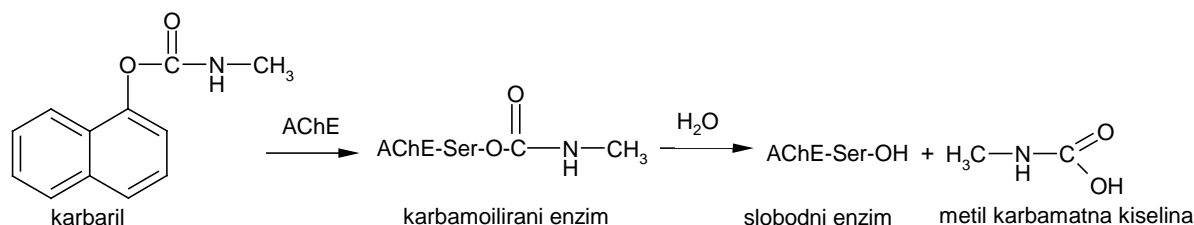


**Slika 7.** Mehaniizam interakcije acetilkolinesteraze i organofosforinih spojeva.

Razlika između hidrolize acetilkolina i hidrolize OP spojeva je u brzini reakcije s vodom, pri čemu je deacetiliranje enzima puno brže od defosfiliranja. Defosfiliranje enzima često se naziva i spontanom reaktivacijom, jako je sporo, a kod nekih spojeva i ne postoji.

S pojedinim organofosfatima, kao što je paraokson, nakon fosfiliranja enzima može doći do dealkilacije jedne alkoksilne skupine na fosforu, čime fosfilirani enzim dobiva negativan naboj koji vodi ili oksimima onemogućava nukleofilni napad. Na taj način se fosfilirani enzim stabilizira, tj. on je ireverzibilno inhibiran. Ova pojava naziva se «starenjem» enzima (Slika 7). U takvim slučajevima u svrhu ponovne enzimске aktivnosti potrebno je sintetizirati novu AChE.

Karbamati inaktiviraju esterase na sličan način kao i organofosfati. Ovi spojevi karbamoiliraju esterase. Za razliku od fosfoliranih esteraza karbamilirane se vrlo brzo hidroliziraju i reaktiviraju (Slika 8).



**Slika 8.** Interakcija karbamatnog pesticida (karbarila) i AChE.

AChE jedan od najistraživanijih biomarkera kod gujavica (Tablica 1). Kod *Eisenia foetida* karakterizirane su dvije različite kolinesteraze uz upotrebu selektivnih substrata i inhibitora. Jedan od enzima je propionilkolinesteraza, a drugi je nespecifična kolinesteraza (EC 3.1.1.7)

koja se u nekoliko karakteristika razlikuje od kolinesteraze (EC 3.1.1.8) (Stenersen, 1979). Oba ova enzima imaju važnu ulogu kod trovanja organofosforim i karbamatnim pesticidima i smatra se da je inhibicija oba enzima kroz duže vrijeme je letalna za gujavice (Stenersen, 1979). Kod kralježnjaka su prisutne dvije kolinesteraze, acetilkolinesteraza (AChE, EC 3.1.1.7) i nespecifična kolinesteraza (ChE, EC 3.1.1.8), ali kod izloženosti pesticidima, najčešće dolazi do inhibicije samo jednog enzima i to AChE.

Nakon izlaganja gujavice (*Lumbricus terrestris*) organofosforim insekticidima uočena 99%-tna inhibicija AChE, dok su karbamatni insekticidi uzrokovali 30%-inhibiciju ovog enzima (Stenersen i sur., 1973). Inhibiciju AChE uočili su također u svojim istraživanjima nakon izlaganja gujavica karbarilu (Ribera i sur., 2001), klorpirofos-etilu, metaksilu, miklobutanilu (Schreck i sur., 2008), atrazinu, ciazinu i klorpirifosu (Lydy i Linck, 2003), benomilu (Stringer i Wright, 1976), azodrinu i klorpirifosu (Venkateswara Rao i Kavitha, 2003, 2004), klorpirifosu i diazinonu (Booth i sur., 1998), klorpirifosu, butolakloru, diazinonu (Rodriguez-Castellanos i sur., 2007), olovu i uranu (Labrot i sur., 1996).

Tablica 1. Pregled dosadašnjih istraživanja učinka različitih pesticida na aktivnost AChE kod gujavica.

PESTICID	IZLAGANJE	KONCENTRACIJA PESTICIDA	VRSTA	UČINAK NA AChE	REFERENCA
<b>Diazinon, 60%</b> - Basudin 600EW (organofosforni insekticid)	Zlaganje u subletalnoj koncentraciji diazinona u tlu 14 dana.	60 mg kg <sup>-1</sup>	<i>Aporectodea caliginosa</i>	Nakon 24 h AChE je inhibirana 72% u odnosu na kontrolu.	Booth i sur., 1998.
<b>Klorpirifos, 40%</b> - Lorsban 40EC (organofosforni insekticid)	Zlaganje subletalnoj koncentraciji klorpirifosa u tlu 14 dana.	28 mg kg <sup>-1</sup>	<i>Aporectodea caliginosa</i>	Nakon 24 h AChE je inhibirana 87% u odnosu na kontrolu	Booth i sur., 1998.
<b>Diazinon, 60%</b> - Basudin 600EW (organofosforni insekticid)	Zlaganje najmanjoj i najvećoj subletalnoj koncentraciji diazinona u prirodnom tlu 28 dana.	12 i 60 mg kg <sup>-1</sup>	<i>Aporectodea caliginosa</i> (juvenile, odrasle)	Nakon 4 tjedna AChE inhibirana 90% u odnosu na kontrolu kod konc 60 mg/kg.	Booth i O'Halloran., 2001.
<b>Klorpirifos, 40%</b> - Lorsban 40EC (organofosforni insekticid)	Zlaganje najmanjoj i najvećoj subletalnoj koncentraciji diazinona u prirodnom tlu 28 dana.	4 i 28 mg kg <sup>-1</sup>	<i>Aporectodea caliginosa</i> (juvenile, odrasle)	Inhibicija AChE 70% (8.4 nmoI/min/mg prot.) kod koncentracije 28 mg/kg, te 35% kod gujavica izlaganih konc. 4 mg/kg (24,8 min/moI/min/mg prot)	Booth i O'Halloran., 2001.
<b>Imidakloprid, 200 g/L</b> - Corifidor (insekticid, kloronikotini)	Zlaganje gujavica u umjetnom tlu.	0,01, 0,1 i 11 ppm	<i>Aporectodea nocturna</i> i <i>Allobophora icterica</i>	Nema razlike u aktivnosti u odnosu na kontrolu.	Capowisz i sur., 2003.
<b>Profenofos, 99,9%</b> (organofosforni insekticid)	Zlaganje gujavica na filter papiru 48 sati.	2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0 i 5,5 µg cm <sup>2</sup>	<i>Eisenia foetida</i>	Doza-odgovor ovisna inhibicija AChE. Inhibicija AChE 90% nakon 32h kod konc. 3.55 µg/cm <sup>2</sup> .	Chakra Reddy i Venkateswara Rao, 2008.
<b>Karbaril - Zoni 5</b> (karbamati insekticid)	Zlaganje gujavica na filter papiru 1, 3, 5 dana. Zlaganje u tlu 1, 3, 5 dana.	10 <sup>0</sup> , 10 <sup>6</sup> , 10 <sup>8</sup> M (zlaganje na filter papiru); 4,29, 42,9 i 429 mg kg <sup>-1</sup> tla	<i>Eisenia andrei</i>	Inhibicija kod svih doza nakon zlaganja na filter papiru već nakon jednog dana izlaganja (58,25% kod doze 0,4 mg karbarila. Inhibicija AChE 85,29% kod konc. 48,3 mg/kg nakon zlaganja gujavica u tlu.	Gambi i sur., 2007.
<b>Temefos, 44%</b> - Abate 4-E (organofosforni insekticid)	Zlaganje gujavica na filter papiru 72 sati.	120, 12, 2,5, 1,24, 0,5, 0,25, 0,12, 0,1, 0,05 i 0,025 mg cm <sup>2</sup>	<i>Eisenia foetida</i>	Inhibicija AChE, hormetički učinak kod konc. 0,12 mg cm <sup>2</sup> .	Hacklenberger i sur., 2008.
<b>Klorpirifos - Dursban, 480 g/L</b> (organofosforni insekticid)	Zlaganje gujavica u tlu (mikrokozmos) u trajanju od 5 tjedana.	0,5, 1,0, 2,5 i 8 µg/kg	<i>Aporectodea caliginosa</i>	Inhibicija AChE.	Reinecke i Reinecke, 2007.
<b>Malatlon - Cythion 50% EC</b> (organofosforni insekticid)	Zlaganje u tlu 105 dana.	1,1, 2,2, mg kg <sup>-1</sup> suhog tla (butoliaklor); 2,2, 4,4 mg kg <sup>-1</sup> suhog tla (malatlon); 1,1 i 2,2 mg kg <sup>-1</sup> suhog tla (karboturan)	<i>Dreawida wilsii</i> (juvenile)	Inhibicija AChE. Maksimum inhibicije nakon 9 dana (41 - 46%)	Panda i Sahu, 2004.
<b>Karboturan - Furdan 3G</b> (karbamati insekticid)	Zlaganje u tlu 105 dana.	1,1, 1,22, mg kg <sup>-1</sup> suhog tla (butoliaklor); 2,2, 4,4 mg kg <sup>-1</sup> suhog tla (malatlon); 1,1 i 2,2 mg kg <sup>-1</sup> suhog tla (karboturan)	<i>Dreawida wilsii</i> (juvenile)	Inhibicija AChE. Maksimum inhibicije nakon 12 dana (54,58 - 62,97%).	Panda i Sahu, 2004.
<b>Buatiaklor - Nirmu 50% EC</b> (organofosforni insekticid)	Zlaganje u tlu 105 dana.	1,1, 1,22, mg kg <sup>-1</sup> suhog tla (butoliaklor); 2,2, 4,4 mg kg <sup>-1</sup> suhog tla (malatlon); 1,1 i 2,2 mg kg <sup>-1</sup> suhog tla (karboturan)	<i>Dreawida wilsii</i> (juvenile)	Nema promjene u aktivnosti AChE u odnosu na kontrolu.	Panda i Sahu, 2004.
<b>Karbaril</b> (karbamati insekticid)	Zlaganje u umjetnom tlu prema OECD protokolu.	0, 12, 25 i 50 mg kg <sup>-1</sup> tla	<i>Eisenia andrei</i>	Inhibicija AChE. Inhibicija nakon 14 dana izlaganja 77% u odnosu na kontrolu kod doze 50 mg kg <sup>-1</sup> tla.	Ribera i sur., 2001.
<b>Klorpirifos, 98%</b>	Zlaganje gujavica na filter papiru 48 sati.	0,0158, 0,0317, 0,0476, 0,0634 i 0,0793 µg cm <sup>2</sup>	<i>Eisenia foetida</i>	Inhibicija AChE. Maksimum inhibicije 91% nakon 48 h kod LC <sub>50</sub> koncentracije (0,037 µg/cm <sup>2</sup> ).	Venkateswara Rao i sur., 2003.
<b>Azodrin, &lt;95%</b> (organofosforni insekticid)	Zlaganje gujavica na filter papiru (48 sati) i u umjetnom tlu (14 dana).	0,1, 0,3, 0,6, 1,2 i 2,5 µg cm <sup>2</sup> (test na filter papiru); 100, 150, 200 i 250 mg kg <sup>-1</sup> (testi u umjetnom tlu)	<i>Eisenia foetida</i>	Inhibicija AChE. Maksimum inhibicije 90% nakon 14 dana kod najveće koncentracije azodrina.	Venkateswara Rao i sur., 2004.
<b>Karboturan, 98%</b> (karbamati insekticid)	Zlaganje u tlu (5 dana).	12,2 ppm	<i>Lumbricus terrestris</i>	Inhibicija AChE (p <sub>50</sub> =6,31).	Stensens i sur., 1973.
<b>Klorpirifos-etil, 98%</b> (organofosforni insekticid)	Zlaganje gujavica, 14 dana, smjesi dva insekticida i četiri fungicida u tlu u različitim kombinacijama, u koncentracijama koje se primjenjuju u okolišu.	0,168 mg kg <sup>-1</sup> tla 0,11 i 0,21 mg kg <sup>-1</sup> tla 0,805 i 1,613 mg kg <sup>-1</sup> tla 0,098 i 0,195 mg kg <sup>-1</sup> tla 0,025 i 0,05 mg kg <sup>-1</sup> tla 1,175 i 5,292 mg kg <sup>-1</sup> tla	<i>Aporectodea caliginosa nocturna</i>	Insekticid (i fungicid kod maksimalnih doza) inhibiraju AChE nakon tri dana. Aktivnost AChE značajno je inhibirana je kod svih tretiranih grupa gujavica nakon 7 i 14 dana.	Schrecke i sur., 2008.
<b>Folpet, 98%</b> (fungicid)					
<b>Metsulfil-M, 98%</b> (fungicid)					
<b>Fosetil-AI, 98%</b> (fungicid)					
<b>Miklobutanil, 98%</b> (fungicid)					

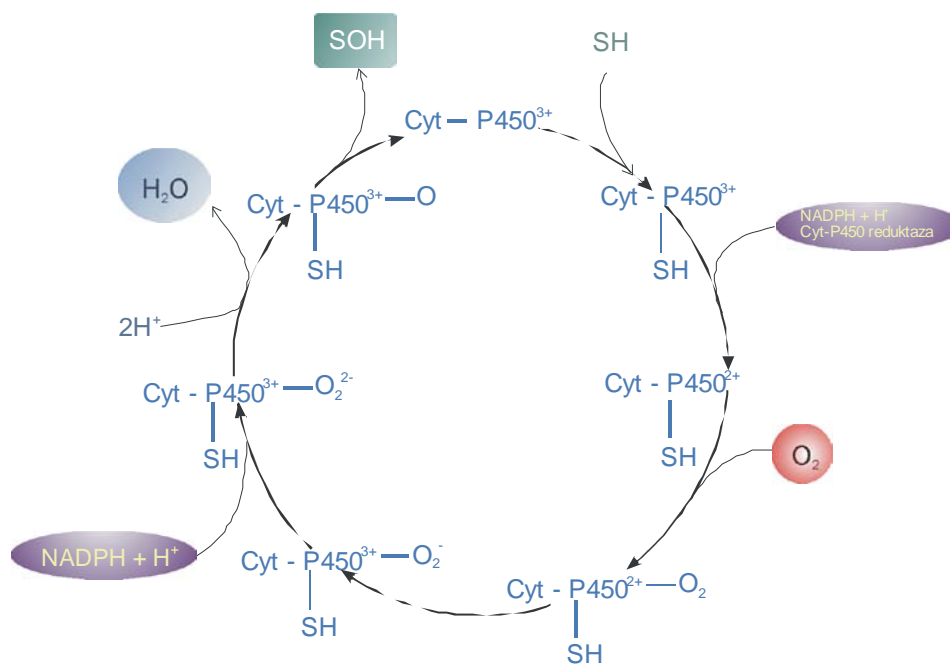
## 1.8. Metabolizam ksenobiotika

### 1.8.1. Biomarkeri I faze metabolizma ksenobiotika

Prva faza metabolizma ksenobiotika je bioaktivacijska i zasniva se na adiciji reaktivnih skupina (-OH, -COOH, -NH<sub>2</sub>, -SH i dr.) na ksenobiotik, a uključuje reakcije oksidacije, redukcije i hidrolize. Najpoznatiju skupinu biomarkera prve faze čine tzv. oksidaze miješanih funkcija (engl. *Mixed Function Oxidase*, MFO). MFO predstavljaju enzimski sustav ovisan o citokromu P-450 kojim se uspješno detoksicira velik broj različitih egzogenih supstanci, ali se neke, na žalost pretvaraju u metabolite koji su toksični, mutageni i kancerogeni. Pored toga ovi enzimi sudjeluju i u reakcijama biosinteze i metaboličke razgradnje niza fiziološki važnih endogenih tvari (kolesterol, žučne kiseline, masne kiseline, steroidni hormoni).

Biološke oksidacije općenito obuhvaćaju dvije kategorije reakcija: reakcije dehidrogenacije (karakteristično za anaerobne organizme) i reakcije adicije molekule kisika (posredovanjem enzima dioksigenaza) ili molekule kisika (posredovanjem enzima monooksigenaza ili hidroksilaza). Za biotransformaciju ksenobiotika najznačajnije su adicije kisika. Reakcije dioksigenaza karakteristične su za metabolizam ksenobiotika u prokariota, dok u eukariotskim stanicama reakcijama monooksigenaza nastaju epoksidi (Wolfe, 1977). Reakcije monooksigenaza predstavljaju prvi stupanj u oksidaciji ksenobiotika, pri čemu se ksenobiotici oksidiraju uz pomoć CYP P450, koji reagira s molekularnim kisikom aktivirajući ga kako bi se vezao za supstrat. U reakcijama monooksigeniranja, CYP P450 preuzima molekulu kisika i jedan njegov atom prenosi na supstrat, a drugi na vodu.

Kada se atom željeza u aktivnom mjestu CYP P450 sustava oksidira u formu Fe<sup>3+</sup>, na sebe tada može vezati supstrat (S). Vezanje supstrata dovodi do redukcije kompleksa enzim-supstrat s elektronom koji se prenosi s NADPH preko NADPH citokrom P450 reduktaze (Andersson i sur., 1985). Reducirani Fe<sup>2+</sup> kompleks enzim-supstrat može vezati molekulu kisika pri čemu nastaje aktivirani kisik-željezo-hemoproteinski kompleks. Slijedi redukcija s drugim elektronom koji potječe ili od citokrom-P450 reduktaze ili iz nekog drugog lanca prijenosa elektrona, ali najvjerojatnija alternativa je da je donesen od NADH preko citokrom b5 i NADH citokrom b5 reduktaze. Citokrom b5 je široko rasprostranjen mikrosomalni hemoprotein uključen u metaboličke reakcije kao što je desaturacija masnih kiselina koja uključuje endogene supstrate. Konačno, na enzim-supstrat-kisik kompleks, djeluju protoni vodene sredine pri čemu ovaj kompleks prelazi u vodu, oksidirani supstrat i oksidirani oblik enzima ( $\text{SH} + \text{O}_2 + \text{H}^+ \rightarrow \text{SOH} + \text{H}_2\text{O} + \text{NADP}^+$ ). Shematski prikaz ciklusa citokroma-P450 prikazan je na slici 9.



**Slika 9.** Shematski prikaz ciklusa citokrom P450 monooksigenaznog sustava.

Citokrom P450 sustav otkriven je 1958. godine u endoplazmatskom retikulumu hepatocita sisavaca. To je atipičan citokrom tipa b s protohemom kao prostetičkom skupinom. Vezan je za lipoproteinsku membranu endoplazmatskog retikuluma, a manje ga ima u citoplazmi i mitohondrijima. Citokrom P450, kao i drugi hemoproteini, ima karakterističan apsorpcijski spektar u vidljivom području. Dodavanje različitih organskih i anorganskih supstrata rezultira promjenom spektra. Postoje tri osnovna tipa supstrata prema načinu na koji mijenjaju apsorpcijski spektar CYP P450, a najvažniji diferencijalni spektar oksidiranog citokrom P450 čine supstrati s apsorpcijskim maksimumom od 385-390 nm i minimumom na oko 420 nm. Supstratima ovog tipa pripadaju spojevi kao npr. lijekovi, okolišna zagađivala, insekticidi, itd. Supstrati tipa II uzrokuju pik kompleksa pri 450 nm. Naziv CYP P450 odnosi se na glavnu vrpču apsorpcije (450 nm) kompleksa reduciranog CYP P450 sa ugljikovim(II)-oksidom. Najpoznatiji supstrat tipa III je etil-izocijanat.

Sustav monooksigenaza s citokromom P450 otkriven je i kod mnogih kukaca. cDNA citokroma P450 izolirana je iz kućne muhe (*Musca domestica*) tretirane fenobarbitonom, pri čemu je pokazala 27% sličnosti u 590 aminokiselina s proteinima obitelji CYP3 sisavaca. Većina citokroma P450 beskralježnjaka je usporediva s enzimima sisavaca samo u njihovim karakteristikama inducibilnosti i inhibicije.

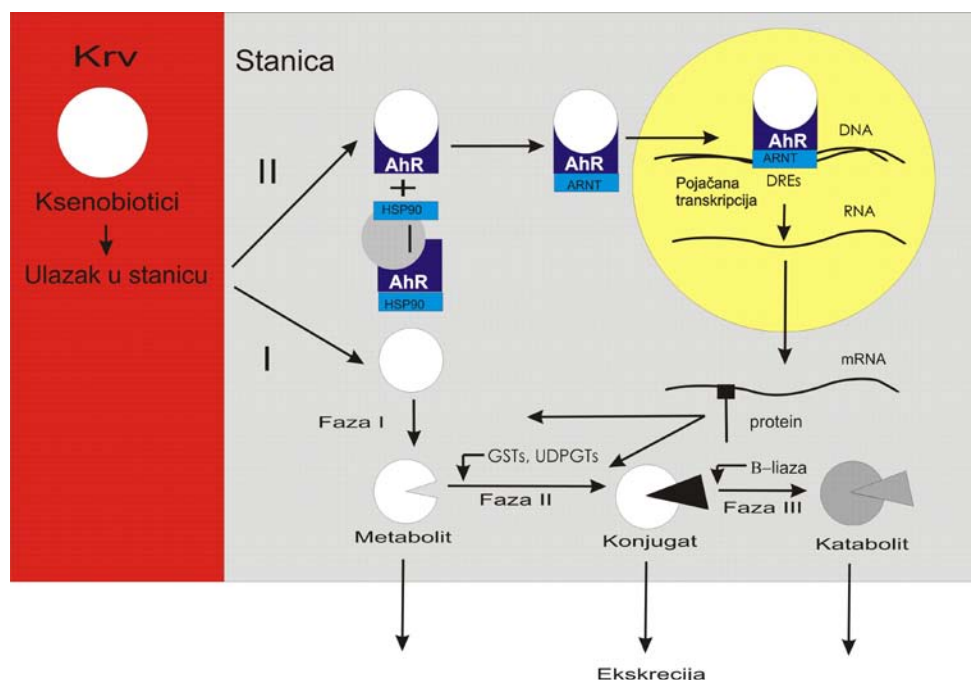
Najpoznatiji enzimski sustavi MFO kod gujavica su enzimski sustavi CYP1A i CYP2B enzimske obitelji (Achazi i sur., 1998; Lee, 1998; Zhang i sur., 2006). Iako pokazuju relativno nisku aktivnost u usporedbi sa aktivnošću kod kralježnjaka, smatra se da imaju značajnu

ulogu i u metabolizmu ksenobiotika kod gujavica (Zhang i sur., 2006). Najčešće mjerene aktivnosti P450 izozima, kod gujavica su etoksirezorufin-O-deetilaza (EROD), etoksikumarin-O-deetilaza (ECOD), pentoksirezorufin-O-deetilaza i metoksirezorufin-O-deetilaza (MROD) (Achazi i sur., 1998; Saint-Denis i sur., 1999, 2001; Xiao i sur., 2006). Povećanje aktivnosti citokrom P450 monooksigenaza kod *Eisenia fetida* nakon izlaganja acetokloru uočili su u svojim istraživanjima Xiao i sur. (2006). Saint-Denis i sur. (1999), ustanovili su značajno povećanje aktivnosti MROD već pri najmanjim dozama benz(a)pirena i to kod gujavica (*Eisenia fetida andreii*) nakon kratkotrajnog izlaganja u trajanju od 1, 2, i 7 dana, dok Zhang i sur. (2006) nakon izlaganja gujavica (*Aporrectodea caliginosa*, *Lumbricus rubellus*, *Eisenia fetida*) istom spoju nisu uočili promjene u aktivnosti ECOD, PROD i BROD izozima. Stoga učinkovitost upotrebe P450 izozima kao biomarkera ovisi o izboru odgovarajućeg izozima koji daje učinak na specifični stresor u okolišu, te i o nekim drugim faktorima kao što su metodologija pripreme uzorka za mjerenje.

Aktivnost oksigenaza miješanih funkcija može se u nazočnosti ksenobiotika inducirati. Zajednička osobina svih poznatih tvari koje induciraju CYP P450 sustav je da su topljivi u mastima. Induceri monooksigenaza grubo se mogu podijeliti na dva tipa: tip fenobarbitala (različite kemikalije, lijekovi, insekticidi) i tip metilkolantrena (policiklički ugljikovodici kao što je benz(a)piren).

CYP enzimi se razlikuju u inducerima koji uvećavaju njihovu aktivnost. Tako npr. CYP1A1 induciraju policiklički aromatski ugljikovodici kao što su 3-metilkolantren i  $\beta$ -naftoflavon, dibenzodioksini i slične planarne molekule. Induceri fenobarbitalnog tipa snažno induciraju CYP2B1 i 2B4, ali djeluju i na druge citokrome kao što su CYP2A1, 2B2, 2C5, 2C6, 3A2, 3A4, 4B1.

Do danas nisu poznati svi detalji vezani za njihovo djelovanje unutar i izvan stanice. Poznato je da se u citoplazmi nalazi Ah-receptor (engl. *Ah hydrocarbons Receptor*) vezan na „heat-shock“ protein *hsp90* (Hankinson, 1993; Whyte i sur., 2000). Nakon ulaska ksenobiotika u citoplazmu, on se, ako po građi odgovara, veže za Ah-receptor koji se zatim otpušta sa *hsp90* (Slika 10). Kompleks ksenobiotika i Ah-receptora veže se zatim na Ah-receptorski nuklearni translokator (ARNT), te dospijeva u staničnu jezgru u kojoj se veže na XRE mjesto na DNA (engl. *Xenobiotic Responsive Elements*). Ova mjesta na DNA su lokalizirana u 5'-kontrolnom području (operonu) Ah-genskog kompleksa. Vežanje kompleksa inducira s Ah-receptorom na XRE inducira transkripciju susjednih strukturnih gena. U kontrolnom području Ah-genske baterije prisutni su i dodatni elementi koji utječu na kvalitetu indukcije, zbog kojih svaki induktor metilkolantrenskog tipa ne inducira jednako jako transkripciju svih enzima kompleksa Ah-gena (Slika 10).



**Slika 10.** Shematski prikaz djelovanja ksenobiotika nakon ulaska u stanicu: I. na mehanizam detoksifikacije, II. na indukciju gena Ah-kompleksa u stanici. AhR (Aryl Hydrocarbon Receptor); HSP90 (Heat Shock Protein 90 kDa); ARNT, Ah receptorski nuklearni translokator; XRE, xenobiotic responsive elements; cyt P450 izozimi; GST, glutation S-transferaze; UDPGT, UDP-glukuronil transferaze

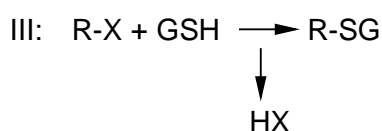
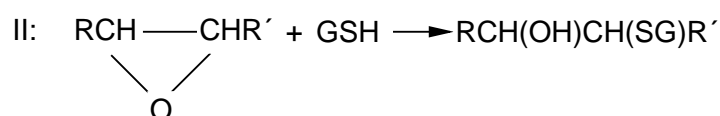
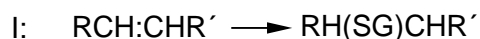
### 1.8.2. Biomarkeri II faze metabolizma ksenobiotika

Druga faza metabolizma naziva se još i konjugacijskom fazom jer obuhvaća biosintetske reakcije između ksenobiotika ili njihovih metabolita iz prve faze s raznim endogenim molekulama kao što su glutation (GSH) i s glukuronska kiselina (GA) čime se povećava polarnost, a time i topivost u vodi, nakon čega se vodotopivi produkti lako izlučuju iz organizma putem žuči ili urina.

Enzimi faze II imaju vrlo važnu ulogu u održavanju homeostaze kao i u detoksikaciji i ekskreciji mnogih ksenobiotika. Uobičajeni put za elektrofilne spojeve i metabolite je konjugacija s GSH, dok je za nukleofilne spojeve karakteristična konjugacija sa glukuronskom kiselinom (George, 1994).

### 1.8.2.1. Glutation-S-transferaza (GST, EC 2.5.1.18)

Glutation-S-transferaze (GST) čine skupinu citosolnih enzima, te imaju veliku važnost zbog svoje uloge u kataliziranju konjugacije različitih endogenih i egzogenih elektrofilnih supstrata sa tripeptidom glutationom, a produkti ove reakcije najčešće su više polarni, manje toksični, te im je time omogućena ekskrecija iz organizma. Konjugacija se odvija adicijom glutaciona iona na dvostruku vezu (I), cijepanjem epoksidnog mosta (II) ili supstitucijom halogena ili drugih odlazećih skupina (III) (Stenersen, 1984).



GST je važan detoksikacijski enzim prisutan u velikom broju biljnih i životinjskih organizama. Prisutanost GST u jetri štakora i ostalih sisavaca dobro je poznata. U jetri štakora, ovi enzimi čine oko 10% ukupnih citosolnih proteina. Kod sisavaca, GST ima ključnu ulogu u detoksikaciji epoksida i diol-epoksida koji nastaju u prvoj fazi metabolizma policikličkih aromatskih ugljikovodika (PAH) (Saint-Denis i sur., 1999). GST je pronađena i kod ostalih kralježnjaka kao npr. gmazova (*Lacerta*), ptica (*Gallus* i *Anas*), vodozemaca (*Rana*), slatkovodnih i morskih koštunjača (*Elasmobranchias*), hrskavičnjača (*Raja*) i kružnosta (*Myxine*) (Stenersen, 1978).

Kod kukaca GST ima važnu ulogu u detoksifikaciji različitih ksenobiotika, uključujući i razgradnju nekih organofosfornih spojeva, te može biti koristan biomarker izloženosti pesticidima (Booth i sur., 1998).

Važnost GST, kao i općenito cjelokupne druge faze metabolizma, u detoksifikaciji organizama je vrlo velika. Stenersen i sur. (1979) dokazali su prisutnost GSH glutacion-S-transferaza sustava kod gujavica i pokazali su da je njihova aktivnost kod ovih organizama velika kada se mjere u prisustvu „dobrih supstrata“ (Stenersen, 1984). Supstrat za GST mora zadovoljavati nekoliko osnovnih uvjeta: mora biti do određenog stupnja lipofilan, mora sadržavati elektrofilni atom ugljika i mora mjerljivo neenzimatski reagirati s GSH. Njihova istraživanja su pokazala da je GSH S-transferaza sustav kod gujavica puno složeniji nego kod štakora. Ionskom kromatografskom analizom utvrđeno je nekoliko oblika ovih enzima izoliranih kod različitih vrsta gujavica. Upotrebom različitih supstrata kvintozena, (pentakloronitrobenzena), etakrinske kiseline, 1,2-dikloro-4-nitrobenzena, 1-kloro-2,4-



dinitrobenzena utvrđeno je da se GST prisutne kod *Eisenia unicolor* razlikuju u specifičnosti prema supstratu. Aktivnost se pokazala najboljom uz prisustvo supstrata 1-kloro-2,4-dinitrobenzena i etakrinske kiseline kod svih istraživanih vrsta gujavica. GSH S-transferaze prisutne su u većini tkiva gujavica, a najjača aktivnost utvrđena je u nefridijima, uz ventralnu živčanu prugu dok je u kloragogenom tkivu najmanja zastupljenost (Stenersen, 1983)

Nekoliko široko upotrebljavanih herbicida kao što su alaklor, metolaklor, propaklor detoksiciraju se formiranjem glutation acetanilid konjugata, a ova konjugacija je posredovana glutation-S-transferazom (Abdel Salam Aly i Schröder, 2008).

GST aktivnost nakon izlaganja različitim okolišnim zagađivalima, istraživana je kod mnogih vrsta gujavica (*Eisenia andrei*, *Lumbricus rubellus*, *Allolobophora chlorotica*, *Aporrectodea caliginosa*, *Pheretima posthuma*, *Eisenia hortensis*). Značajno povećanje aktivnosti GST nakon izlaganja gujavica metil-parationu, atrazinu i kvintozenu uočili su Stenersen i sur. (1979), acetokloru (Xiao i sur., 2006), diazinonu i klorpirifosu (Booth i sur., 1998). Poznato je da aktivnost GST raste u jetri štakora izloženih PCB-ima (Kamohara i sur., 1984), jetri riba *i.p.* izloženim benzo(a)pirenu (BaP) (Fair, 1986), jetri riba izloženim klorotalonilu u vodi (Davies, 1985). Pregled dosadašnjih istraživanja učinka različitih pesticida na aktivnost GST kod gujavica dan je u Tablici 2.

Tablica 2. Pregled dosadašnjih istraživanja učinka različitih pesticida na aktivnost GST kod gujavica.

PESTICID	IZLAGANJE	KONCENTRACIJA PESTICIDA	VRSTA	UČINAK NA GST	REFERENCA
<b>Fenoksaprop</b> (herbicid)	Izlaganje u petrijevim zdjelicama (24 i 48 sati) .	2700 mg/kg tjelesne težine	<i>Eisenia fetida</i>	Nakon 24 h povećanje aktivnosti GST za oko 10%, a nakon 48h za oko 40% u odnosu na kontrolu.	Abdel Salam Aly i Schröder, 2008.
<b>Metolaklor</b> (herbicid)	Izlaganje u petrijevim zdjelicama (48 sati).	3200 mg/kg tjelesne težine	<i>Eisenia fetida</i>	Nakon 24h povećanje aktivnosti GST za oko 15%, a nakon 48h za oko 20%.	Abdel Salam Aly i Schröder, 2008.
<b>Diazinon</b> - Basudin 600EW (organofosfatni insekticid)	Izlaganje u subletalnoj koncentraciji diazinona u tlu 14 dana.	60 mg/kg	<i>Apporectodea caliginosa</i>	Aktivnost GST se povećala nakon 7 d, a maksimalno povećanje aktivnosti nakon 14 d iznosilo je 56%.	Booth i sur., 1998.
<b>Klorpirifos, 40%</b> - Lorsban 40EC (organofosfatni insekticid)	Izlaganje subletalnoj koncentraciji klorpirifosa u tlu 14 dana.	28 mg/kg	<i>Apporectodea caliginosa</i>	Aktivnost GST značajno se povećala nakon 14 d i to 148% u odnosu na kontrolu.	Booth i sur., 1998.
<b>Diazinon</b> - Basudin 600EW (organofosfatni insekticid)	Izlaganje najmanjoj i najvećoj subletalnoj koncentraciji diazinona u tlu (12 tjedana).	12 i 60 mg/kg	<i>Apporectodea caliginosa</i> (juvenilne)	Inhibicija GST do 90% u odnosu na kontrolu (5,2 nmol/min/mg prot) kod konc. 60 mg/kg, te 75% (11,6 nmol/min/mg prot) kod konc. 12 mg/kg.	Booth i sur., 1998.
<b>Klorpirifos, 40%</b> - Lorsban 40EC (organofosfatni insekticid)	Izlaganje najmanjoj i najvećoj subletalnoj koncentraciji diazinona u tlu (12 tjedana).	4 i 28 mg/kg	<i>Apporectodea caliginosa</i> (juvenilne)	Inhibicija GST do 90% u odnosu na kontrolu (5,2 nmol/min/mg prot).	Booth i sur., 1998.
<b>Imidakloprid, 200 g/L</b> - Confidor (insekticid, kloronikotil)	Izlaganje gujavica u umjetnom tlu.	0,01, 0,1 i 1 ppm	<i>Aporrectodea nocturna</i> i <i>Allobophora icterica</i>	Nema razlike u aktivnosti u odnosu na kontrolu.	Capowiez i sur., 2003.
<b>Atrazin</b> (herbicid, triazin)	Polustatično izlaganje uz izmjenu medija svakih 24 sata. Trajanje izlaganja 4 sati, 1, 3, 7 dana.	0,05, 0,5 i 5 mg l <sup>-1</sup>	<i>Lumbriculus variegatus</i>	Aktivnost GST je značajno porasla nakon 1 d za 15% u odnosu na kontrolu kod koncentracije 0.05 mg l <sup>-1</sup> atrazina, a nakon 7d za 20% kod iste konc. Aktivnost GST ne pokazuje ovisnost o koncentraciji i trajanju izlaganja.	Contardo-Jara i sur., 2008.
<b>Acetoklor, 90%</b> (herbicid, kloroacetamid)	Izlaganje u umjetnom tlu prema OECD protokolu (7, 15, 30, 45, 60 dana).	50, 100, 200, 300, 400 mg kg <sup>-1</sup> suhog tla	<i>Eisenia fetida</i>	Aktivnost GST se jako povisila 60d nakon izlaganja kod konc. 5 mg kg <sup>-1</sup> (okolišna konc.) <sup>-1</sup> 103,12% u odnosu na kontrolu.	Xiao i sur., 2006.
<b>Karbaril</b> (karbamatni insekticid)	Izlaganje u umjetnom tlu prema OECD protokolu.	0, 12, 25, 50 mg kg <sup>-1</sup> tla	<i>Eisenia andrei</i>	Smanjena aktivnost GST nakon 2 i 14 dana izlaganja.	Ribera i sur., 2001.
<b>Klorpirifos-etil, 98%</b> (organofosforni insekticid) <b>λ-Cihalotrin, 98%</b> (insekticid, sintetički piretroid) <b>Folpet, 98%</b> (fungicid) <b>Metalksill-M, 98%</b> (fungicid) <b>Fosetil-AI, 98%</b> (fungicid) <b>Miklobutanil, 98%</b> (fungicid)	Izlaganje gujavica smjesi dva insekticida i četiri fungicida u tlu u različitim kombinacijama, u koncentracijama koje se primjenjuju u okolišu (14 dana).	0,168 mg kg <sup>-1</sup> tla 0,11 i 0,21 mg kg <sup>-1</sup> tla 0,805 i 1,613 mg kg <sup>-1</sup> tla 0,098 i 0,195 mg kg <sup>-1</sup> tla 0,025 i 0,05 mg kg <sup>-1</sup> tla 1,175 i 5,292 mg kg <sup>-1</sup> tla	<i>Aporrectodea caliginosa nocturna</i>	Aktivnost GST povećala se kod gujavica izlaganih insekticidima. GST aktivnost nakon 14 dana izlaganja insekticidima značajno je inhibirana u odnosu na kontrolu.	Schreck i sur., 2008.

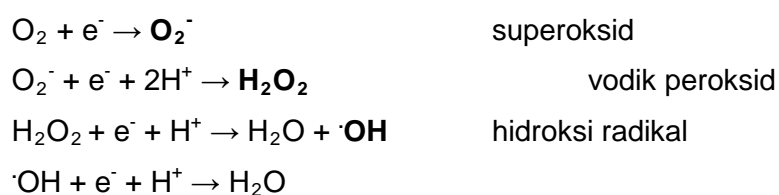
### 1.8.3. Biomarkeri oksidativnog stresa

Važan čimbenik koji se mora uzeti u obzir pri tumačenju rezultata biološkog praćenja okoliša je i oksidativni stres. Mnoga okolišna zagađivala uzrokuju toksične učinke povezane s oksidativnim stresom. Stoga je svrsishodno istraživati i mjeriti pokazatelje oksidativnog stresa kao što je npr. katalaza (CAT).

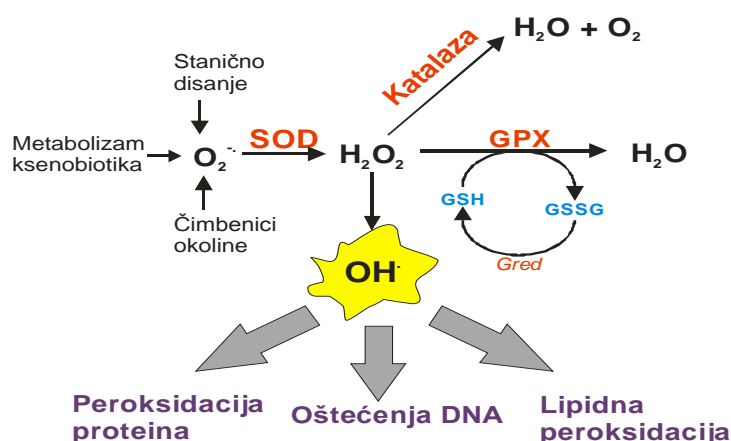
Oksidativni stres nastaje kada se poremeti ravnoteža oksidacijsko-redukcijskih procesa prekomjernim stvaranjem slobodnih radikala koje stanični homeostatski mehanizmi nisu u stanju neutralizirati (Kelly i sur., 1998). Slobodni radikali najvećim dijelom uključuju reaktivne spojeve kisika (engl. *reactive oxygen species*) kao što su npr. superoksid radikal  $O_2^-$ , hidroksi radikal  $\cdot OH$ , te molekulu vodikovog peroksida ( $H_2O_2$ ). Ovi spojevi su nužni za antitumorski i antibakterijski kapacitet makrofaga i neutrofila, ali s druge strane, u prekomjernoj količini su vrlo toksični. Njihova toksičnost nije samo primarnog karaktera (subcelularna, celularna i histološka oštećenja), već se očituje i u snažnom međudjelovanju s drugim tvarima, te njihovoj mogućnosti „napada“ na nukleinske kiseline, tj. na genetički materijal. Porast koncentracije slobodnih radikala u organizmima gotovo uvijek ima štetnu, a može imati i pogubnu posljedicu ukoliko se takvi porasti ponavljaju ili je visoka koncentracija ROS kronična.

Glavni izvor ROS *in vivo* je aerobna respiracija, a također ROS mogu nastajati i peroksisomalnom  $\beta$ -oksidacijom masnih kiselina, mikrosomalnim citokrom P450 metabolizmom ksenobiotika, stimulacijom fagocita patogenima ili lipopolisaharidima, metabolizmom arginina i tkivno specifičnih enzima. U svakoj stanici odvijaju se kemijske reakcije koje uključuju oksidaciju i redukciju molekula. Na primjer, kada stanice koriste kisik za proizvodnju energije, slobodni radikali nastaju kao posljedica proizvodnje ATP u mitohondrijima.

Razina nastajanja ROS u uskoj je vezi sa potrošnjom kisika i proporcionalno količinom mitohondrija u tkivu. Kod sisavaca, kao npr. u jetri štakora, pri fiziološkim koncentracijama  $O_2$ , približno 1-4% utrošenog kisika prijeđe u  $O_2^-$  i  $H_2O_2$  na mitohondrijskoj razini, kao posljedica gubitka elektrona (Storey, 1996). Superoksid i vodik-peroksid radikal dugo se zadržavaju u biološkim sustavima, a njihova opasnost leži u činjenici da stvaraju jako reaktivni hidroksi radikal ( $\cdot OH$ ) koji je uključen u brojne oblike oštećivanja staničnih makromolekula. Reaktivni spojevi kisika su intermedijeri jednovalentne redukcije kisika:



Nakupljanje ROS može se pojaviti u brojnim fiziološkim i nefiziološkim procesima koji uključuju njihovo nakupljanje kao nusprodukata normalnog staničnog metabolizma prvenstveno u mitohondrijima. ROS mogu oštetiti sve vrste bioloških molekula, bilo da se radi o proteinima, nezasićenim masnim kiselinama i membranskim lipidima ili DNA (Slika 11). Obilježje svih slobodnih radikala je nesparen elektron u vanjskoj ljusci, te nestabilnost, što za posljedicu ima sklonost ulaska u različite reakcije.



**Slika 11.** Shematski prikaz čimbenika oksidativnog stresa i njegovih posljedica.

Da bi neutralizirale toksične učinke ROS organizmi posjeduju dobro razvijen sustav antioksidativne obrane (Ahmad i sur., 2005; Dautremepuits i sur., 2003). Ovaj sustav obuhvaća antioksidativne enzime kao što su: superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation peroksidaza (GPX), i glutation reduktaza koji su neophodni u detoksifikaciji radikala do nereaktivnih molekula (Van der Oost i sur., 2003).

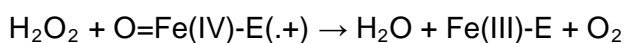
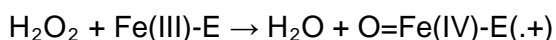
Osim toga, tu su i brojni nisko-molekularni antioksidansi kao što je glutatjon,  $\beta$ -karoten (vitamin A), askorbinska kiselina (vitamin C),  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E) koji također sudjeluju u procesu uklanjanja oksiradikala (Van der Oost i sur., 2003).

Pokazalo se da odgovor u aktivnosti antioksidativnih enzima može biti vrijedan instrument u praćenju zagađenja, te u procesu POR-a (Pandey i sur., 2003; Stephensen i sur., 2002). Stoga je svrsishodno u praćenju stanja okoliša, pored biljega izloženosti i učinka, istraživati i mjeriti pokazatelje oksidativnog stresa

### 1.8.3.1. Katalaza kao biomarker oksidativnog stresa (CAT, EC 1.11.1.6)

Katalaza je hematin-sadržavajući enzim prisutan u peroksisomima gotovo svih aerobnih stanica (najviše u eritrocitima i hepatocitima, manje u mišićnim, moždanim i srčanim stanicama) i služi za zaštitu stanica od toksičnih učinaka vodik peroksida, katalizirajući njegovu razgradnju u molekularni kisik i vodu bez nastajanja slobodnih radikala ( $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ ).

Molekularni mehanizam razgradnje vodikovog peroksida uz pomoć katalaze odvija se u dva stupnja prema slijedećim reakcijama:



gdje, Fe()-E predstavlja željezo u centru hem skupine vezan za enzim. (Fe(IV)-E(.+)) je mezomerni oblik Fe(V)-E, koji označava to da željezo nije u potpunosti oksidirano u +V ali prima „prateće elektrone“ iz hem liganda. Ovaj hem se označava kao radikalni kation (.+). Kako vodikov peroksid ulazi u aktivno mjesto, on ulazi u interakciju s aminokiselinom asparagin na položaju 147 (Asn147) i histidin na položaju 74 (His74) uzrokujući pri tome prijenos protona (vodikovog iona) između atoma kisika. Slobodni kisikov atom koordinira, oslobađajući novoformirane molekule vode i Fe(IV)=O. Fe(IV)O reagira sa drugom molekulom vodikovog peroksida te prelazi u Fe(III)-E pri čemu nastaju voda i kisik. Reaktivnost željeza u centru može se poboljšati prisutnošću fenolatnog liganda tirozin 357 (Tyr357), koji može pomoći u oksidaciji Fe(III) u Fe(IV). Učinkovitost reakcije također se može poboljšati interakcijom His74 i Ash147 s intermedijerima. Općenito brzina reakcije se može odrediti Michaelis-Mentenovom jednačinom.

Peroksisomi su u životinjskim stanicama uključeni u oksidaciju masnih kiselina, kao i u proces sinteze kolesterola i žučne kiseline. Vodik peroksid je nusprodukt koji nastaje oksidacijom masnih kiselina. Bijele krvne stanice proizvode vodik peroksid koji koriste za uništavanje bakterija. U oba slučaja katalaza sprječava da vodik peroksid nanese štetu samoj stanici. Molekula katalaze je tetramer sastavljena od četiri polipeptidna lanca. Svaki lanac se sastoji od više od 500 amino kiselina. Unutar ovog tetramera nalaze se i četiri porfirinske hem skupine koje su vrlo slične hemoglobinima i citokromima. Hem skupina odgovorna je za enzimatsku aktivnost katalaze. Katalaza posjeduje jedan od najvećih proteinskih *turnovera*: jedna molekula katalaze može pretvoriti šest miliona molekula vodik peroksida u vodu i kisik u svakoj minuti.

Katalaza je važan biomarker izloženosti organizama pesticidima i metalima (olovu, kadmiju) (Saint-Denis, 1998; Łaszczycza i sur., 2004; Ribera i sur., 2001; Antunes i sur., 2008). Značajno povećanje aktivnosti CAT kod gujavice (*Aporrectodea caliginosa nocturna*) nakon izlaganja insekticidima i fungicidima uz upotrebu „soil testa“ zabilježili su u svom istraživanju Schreck i sur. (2008), dok se njezina aktivnost u prisustvu metala (Fe, Zn) povećava (Antunes i sur., 2008; Labrot i sur., 1996). Detaljan pregled dosadašnjih istraživanja učinka različitih pesticida na aktivnost CAT kod gujavica dan je u Tablici 3. Nakon akutne intoksikacije štakora organofosfornim insekticidom klorfenvifosu dolazi do povećanja aktivnosti jetrene CAT (Lukaszewicz-Hussain i Moniuszko-Jakoniuk, 2003). Snižene

vrijednosti CAT mogu se pripisati velikoj proizvodnji superoksid anion radikala za kojeg se zna da inhibira CAT aktivnost u slučaju prekomjerne proizvodnje (Bagnjukova i sur., 2005).

**Tablica 3.** Pregled dosadašnjih istraživanja učinka različitih pesticida na aktivnost CAT kod gujavica.

PESTICID	IZLAGANJE	KONCENTRACIJA PESTICIDA	VRSTA	UČINAK NA CAT	REFERENCA
<b>Atrazin</b> (herbucid, triazin)	Polustatično izlaganje uz izmjenu medija svakih 24 sata. Trajanje izlaganja 4 sati, 1, 3, 7 dana.	0,05, 0,5 i 5 mg l <sup>-1</sup>	<i>Lumbriculus variegatus</i>	Aktivnost CAT se smanjila u ovisnosti o koncentraciji i trajanju izlaganja. Maksimalno smanjenje aktivnosti je 65% uključujući i kontrolu.	Contardo-Jara i sur., 2008.
<b>Karbaril, 98%</b> (karbamatni insekticid)	Izlaganje u umjetnom tlu prema OECD protokolu.	0, 12, 25 i 50 mg kg <sup>-1</sup> tla	<i>Eisenia andrei</i>	Nema promjene u aktivnosti CAT.	Ribera i sur., 2001.
<b>Klorpirifos-etil, 98%</b> (organofosforni insekticid) <b>λ-Cihalotrin, 98%</b> (insekticid, sintetički piretroid) <b>Folpet, 98%</b> (fungicid) <b>Metalksill-M, 98%</b> (fungicid) <b>Fosetil-Al, 98%</b> (fungicid) <b>Miklobutanil, 98%</b> (fungicid)	Izlaganje gujavica, 14 dana, smjesi dva insekticida i četiri fungicida u tlu u različitim kombinacijama, u koncentracijama koje se primjenjuju u okolišu.	0,168 mg kg <sup>-1</sup> tla 0,11 i 0,21 mg kg <sup>-1</sup> tla 0,805 i 1,613 mg kg <sup>-1</sup> tla 0,098 i 0,195 mg kg <sup>-1</sup> tla 0,025 i 0,05 mg kg <sup>-1</sup> tla 1,175 i 5,292 mg kg <sup>-1</sup> tla	<i>Aporrectodea caliginosa nocturna</i>	Povećanje aktivnosti CAT nakon 3 dana kod gujavica izlaganih fungicidima. Nakon sedam dana aktivnost CAT pada na kontrolnu vrijednost. Nakon 14 dana izlaganja insekticidima i/ili fungicidima kod maksimalnih doza, aktivnost CAT je značajno inhibirana u odnosu na kontrolu.	Schreck i sur., 2008.
<b>Atrazin, 95%</b> (herbucid, triazin)	Izlaganje gujavica u tlu prema OECD protokolu 28 dana u umjetnom tlu.	0, 2,5, 5, 10 mg atrazina kg <sup>-1</sup> tla	<i>Eisenia foetida</i>	Aktivnost CAT kod konc. 2,5 mg kg <sup>-1</sup> do 14 d puno veća u odnosu na kontrolu, nakon čega aktivnost pada. Aktivnost CAT kod konc. 5 mg kg <sup>-1</sup> manja je u odnosu na kontrolu do 14 d, nakon 28 d aktivnost je veća u odnosu na kontrolu. Kod konc 10 mg kg <sup>-1</sup> aktivnost je manja u odnosu na kontrolu, osim nakon 21 d.	Song i sur., 2009.

#### 1.8.4. Histopatološki biomarkeri

Histopatološki markeri uključuju oštećenja tkiva koji mogu signalizirati štetne učinke koji proizlaze iz izloženosti organizma jednom ili više zagađivala. Kod mnogih skupina životinja, histopatološke promjene su dobri i važni pokazatelji izloženosti zagađivalima, te u nekim slučajevima daju precizne informacije o spojevima koji uzrokuju takva oštećenja (Hinton i sur., 1992).

Do sada je napravljen velik broj istraživanja koja pokazuju opće histopatološke promjene kod gujavica kao što su nekroza tkiva, otekline osobito na području kiteluma, istjecanje celomske tekućine, te nekoliko istraživanja koja upućuju na specifične histopatološke promjene kod

*Eisenia fetida*, *Dendrodrilus rubidus*, *Lumbricus terrestris*, *L. rubellus*, and *Octolasion transpadanum*.

Do ovih promjena može doći nakon izloženosti organskim okolišnim zagađivačima kao što su pesticidi, ali i teškim metalima (Gupta i Sundaraman, 1990). Kod vrste *Dendrodrilus rubidus*, histološke promjene nakon izlaganja olovu zabilježene su u citoplazmi kloragocita (Richards i Ireland, 1978). Kloragogene stanice pokazivale su nepravilnosti u obliku, te sadržavale agregirane čestice različitih veličina u svojoj unutrašnjosti. Nakon izlaganja gujavica pesticidima benomilu i karbofuranu, histopatološka istraživanja pokazala su da kloragogene i celomske stanice gube sadržaj i postaju ispražnjene (Fischer, 1976). Izlaganje karbarilu potiče bubrenje jezgre kloragocita kod *P. posthuma* (Gupta i Sundaraman, 1988). Sorour i Larink (2001) su pokazali da fungicid benomil u subletalnim koncentracijama uzrokuje reproduktivna oštećenja i malformacije spermatida i citofora, a slična oštećenja se javljaju i nakon izlaganja gujavica organofosfatu malationu (Espinosa-Navarro i Bustos-Obregon, 2005). Pored smanjenja težine kod malationom tretiranih gujavica tu su prisutne i promjene poput vakuolizacije spermateka i fragmentacija DNA kod velikog postotka spermatogonija. Kod *E. fetida* izlaganih parakvatu, nakon početnog značajnog povećanja stanica i njihovog oštećenja uslijedila je potpuna razgradnja kloragogenog tkiva (Fischer i Molnar, 1992). Do morfoloških i histoloških promjene poput perforacija, oštećenja epitela, zatim povećanja žljezdanih stanica, oteknuća na području kliteluma, razgradnje prstenastih i uzdužnih mišića i fragmentacije tijela dolazi nakon 48 h izlaganja *Eisenia foetida* organofosforom pesticidu profenofosu putem kontakt testa na filter papiru (Chakra Reddy i Rao, 2008). Osim kontaktnim putem, gujavice pesticidima mogu biti izložene preko probavila, pri čemu su zabilježene promjene kao što su bubrenje jezgri epitela, nepravilnosti u obliku stanica, oštećenje stanične membrane i stapanje stanica (Morowati, 2000). Malo toga se zna o prirodnoj varijabilnosti i vanjskim utjecajima na histopatološke parametre. Fischer i Molnar (1992) su uočili da povećana količina vlage, suša, hipoksija, salinitet znatno utječu na kloragocite kod *E. fetida*, pri čemu dolazi do povećanja jezgri kloragocita. Pored toga oni su uočili da potpuno uništeno kloragogeno tkivo kod gujavica izlaganih parakvatu ima sposobnost potpune regeneracije nakon premještanja gujavica u čisto tlo.

Nema podataka o doza-ovisnom odnosu u izloženosti određenim spojevima i histopatološkim učincima kod gujavica (Scott-Fordsmann i Weeks, 2000), dok su kod npr. štakora zabilježene doza-ovisne degenerativne promjene jetre, povećan broj Kupffer-ovih stanica (hiperplazije) parenhimskog tkiva jetre nakon izlaganja sintetičkom piretroidu cipermetrinu (Costa i sur., 2008).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

1. Odrediti efektne koncentracije (EC) pojedinačnih pesticida s obzirom na promjene aktivnosti tri molekularna biomarkera mjerena u ovom istraživanju: katalaze (CAT), glutation-S-transferaze (GST) i acetilkolin-esteraze (AChE). Ovi biomarkeri su odabrani stoga što su dosadašnja istraživanja pokazala njihovu relevantnost u smislu biokemijskog odgovora na izloženost ksenobiotičima.
2. Utvrditi da li postoji biometrijska histološka veličina koja bi se mogla upotrijebiti kao histopatološki biomarker izloženosti organizama pesticidima.
3. Ustanoviti odnos efektnih koncentracija (EC) mješavina i EC svake od komponenti mješavina.
4. Odrediti utjecaj acetilkolinesteraza neinhibirajućih pesticida (herbicida: bentazona, metolaklora, terbutilazina) na učinkovitost tj. na EC<sub>50</sub> acetilkolinesteraza inhibirajućih pesticida (insekticida: endosulfan, pirimifosmetil, malation, temefos).
5. Utvrditi mogućnost primjene izoblografske metode u procjeni toksičnosti mješavina.
6. Utvrditi mogućnost iznalaženja modela upotrebe pesticida, na način da se onemogući stvaranje mješavina u okolišu, lošijih ekotoksikoloških svojstava, od svojstava svake od komponenti mješavina.
7. Ustanoviti oblik utjecaja hormetičkih svojstava jedne od sastojina mješavina, na ukupnu toksičnost, to jest, odrediti da li hormetičko svojstvo pojedinog sastojka mješavine može bitno utjecati na ekotoksikološka svojstva te mješavine.



### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. KEMIKALIJE

Za obradu uzoraka i sva potrebna mjerenja pri izradi ovoga rada upotrebene su sljedeće kemikalije:

- Natrijev-hidrogenfosfat bezvodni, Kemika
- Natrijev-dihidrogenfosfat bezvodni, Kemika
- Coomassie Brilliant Blue G-250, Etanol, 85% fosfatna kiselina ( $H_3PO_4$ )
- Goveđi serumski albumin (BSA), 96% , Sigma Aldrich
- 5,5'-ditiobisnitrobenzoat (DTNB), Sigma Aldrich
- Acetiltiokolinjodid, Sigma Aldrich
- 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB), Sigma Aldrich
- L-glutation, reducirani, 98 %, Sigma Aldrich
- Vodikov peroksid, 30%, Kemika
- Formaldehid, min. 36,5%, Alkaloid, Skopje
- Natrijev karbonat, bezvodni, Kemika
- Hematoksilin, kristalni, Sigma Aldrich
- Eozin B, 94%, Sigma, Aldrich
- Limunska kiselina, kristalni, Kemika
- Kalijev permanganat, kristalni, Kemika
- Etilni alkohol, 96%, Kemika
- Apsolutni etilni alkohol, 100%, Kemika
- Fenol kristalni, Merck
- Aluminijev-kalijev sulfat, kristalni, Kemika
- Kloridna kiselina, min. 36%, Kemika
- Dinatrijev hidrogen fosfat, bezvodni, Kemika
- Dihidrogen natrijev fosfat monohidrat, Kemika
- Natrijev klorid, kristalni, Kemika
- Ksilen, Alkaloid, Skopje
- Parafin, kruti, histološki,  $t_f=56-58^\circ C$ , Kemika
- Cera alba (bijeli pčelinji vosak), Kemig
- Canada balzam, Kemika

Sve upotrebene kemikalije bile su isključivo analitičke čistoće.

### 3.2. INSTRUMENTI I PRIBOR

Pri izradi ovoga rada upotrebljeni su sljedeći instrumenti i pribor:

- Spektrofotometar (UV-visible 1601 Shimadzu)
- Mikrotom, klizni, SM 2000R, Leica
- Mikroskop DX 41, Olympus
- Digitalna fotokamera DP-12, Olympus
- Analitička vaga, Sartorius
- pH-metar, Mettler Toledo
- Električna vibracijsko rotacijska mućkalica, Vortex
- Centrifuga/ultracentrifuga s hlađenjem, Hermle Z 233 MK-2
- Plastične epruvete, 2 ml, Ependorff
- Podesive mikropipete, 1 - 10  $\mu$ l, 10 - 100  $\mu$ l, 500 - 1000  $\mu$ l, 1 – 5 ml Ependorff
- Prenosivi terenski hladnjak
- Hladnjak -4 °C
- Hladnjak, -80 °C, Heraeus Sepatech
- Spremnik za tekući dušik, L'air liquide RG9
- Hladne podloge, -4 °C
- Grijača ploča sa magnetnom miješalicom, Tehnica
- Homogenizator (Potter-Elvehjem)
- Vodena kupelj, Sutjeska
- Sterilizator, Instrumentaria, Zagreb
- Pincete (kirurške i anatomske), Steinless, Njemačka
- Skalpel metalni br.22 sa držačem, Steinless, Njemačka
- Pokrovna stakalca, 20x20 mm, TLOS, Zagreb
- Predmetna stakalca, 76x26x1 mm, TLOS, Zagreb
- Bazni kalupi za uklapanje histoloških preparata
- Plastične histološke košarice (Embedd cassette), Shandon, USA
- Stakleno laboratorijsko posuđe

### 3.3. EKSPERIMENTALNI ORGANIZMI

#### 2.3.1. Sistematika kompostne gujavice (*Eisenia andrei*)

Carstvo:	<i>Animalia</i>
Koljeno:	<i>Annelida</i>
Razred:	<i>Clitellata</i>
Podrazred:	<i>Oligochaeta</i>
Red:	<i>Haplotaxida</i>
Porodica:	<i>Lumbricidae</i>
Rod:	<i>Eisenia</i>
Vrsta:	<i>Eisenia andrei</i>



Slika 12. Kompostna gujavica (*Eisenia andrei*)

#### 3.3.2. Biologija gujavica

Gujavice spadaju u razred Oligochaeta, a rasprostranjene su u tlu i vodi. Jedna od najvažnijih porodica terestričkih gujavica u Europi i općenito u Palearktičkoj regiji su *Lumbricidae* (Edwards i Bohlen, 1996). Postoji oko 220 rodova unutar ovog razreda od kojih je 19 rasprostranjeno u Europi. Dominantne vrste na poljoprivrednim zemljištima i vrtovima pripadaju slijedećim rodovima *Aporrectodea*, *Allolobophora*, *Lumbricus* i *Dendrobaena*.

Tijelo gujavice je bilateralno simetrično, izvana i iznutra je jasno kolutičavo. Izvana je obavijeno jednoslojnom epidermom, a njenu strukturalnu osnovu čine cilindrične epitelne stanice između kojih se nalaze mnoge žljezdane stanice. Na površini epiderme je tanka kutikula. Ispod epiderme je najprije sloj prstenastih, a zatim i sloj uzdužnih mišića čijim se naizmjeničnim stezanjem postižu valovite kontrakcije duž glavne osi tijela, te omogućavaju pokretanje. Tjelesna šupljina je celom u kojoj je celomska tekućina koja osim što sudjeluje u prijenosu tvari u tijelu djeluje i kao hidrostatski skelet, a utječe i na pokretanje i ispružanje ždrijela. U središtu celomske šupljine smješteno crijevo koje na leđnoj strani ima duboku brazdu (tiflozolis). Na površini crijeva smještene su kloragogene stanice. Ispod su prstenasti mišići koji omogućuju peristaltiku crijeva. Unutrašnju stranu crijeva oblaže crijevni epitel. S gornje strane crijeva je leđna krvna žila. S trbušne strane nalazi se živčana vrpca, iznad koje je trbušna, a ispod subneuralna krvna žila. Probavni sustav se sastoji od usta, ždrijela, jednjaka, volje, želuca, crijeva i analnog otvora. Probava se odvija u želucu i prednjem dijelu crijeva, apsorpcija se odvija u zadnjem dijelu crijeva. Optjecajni sustav je zatvoren, disanje se odvija preko kože. Sustav za izlučivanje čine protonefridiji i metanefridiji. Živčani sustav je ljestvičast. Gujavice su dvospolci, na trbušnoj strani 15. kolutića su muški, a na 14. kolutiću ženski spolni otvor. Oplodnja je vanjska.

Gujavice zbog svojih biološko ekoloških osobina znatno doprinose poboljšanju kvalitete tla tako što premještaju i miješaju različite slojeve tla, poboljšavaju prozračivanje, svojim

aktivnostima poboljšavaju propusnost za vodu i time pozitivno utječu na hidraulička svojstva tla, te izgrađuju sloj humusa (Edwards i Bohlen, 1992). Ovi kolutičavci posjeduju niz ekoloških i fizioloških značajki koje ih čine izvrsnim biološkim indikatorima zagađenja tla (Sanchez-Hernandez, 2006; Van Straalen, 2002).

Gujavice se mogu podijeliti u tri ekološke kategorije s obzirom na neke opće karakteristike, kao što su pigmentacija, oblik i veličina tijela, afinitet prema tipu hrane, dubini kopanja, te tipu hodnika koje kopaju u tlu. Epigejne vrste koje su aktivne u površinskim dijelovima tla (npr. *Eisenia fetida*), endogejne vrste grade horizontalne hodnike (npr. *Aporrectodea caliginosa*), dok anecične vrste grade vertikalne hodnike i nastanjuju dublje dijelove tla (npr. *Lumbricus terrestris*) (Bouché, 1977).

*Eisenia andrei* je epigejna vrsta koja živi u površinskim slojevima tla bogatim organskom materijom, a manje u tlima bogatim mineralnim tvarima. Prema OECD protokolu preporučena je vrsta za toksikološke testove (OECD, 1984). Ima kratak životni ciklus, izlijeganje iz kokona traje tri do četiri tjedna, a spolnu zrelost postižu sa sedam do osam tjedana na temperaturi od 20 °C. Vrlo je plodna vrsta, svaka jedinka proizvede dva do pet kokona tjedno. Lako je dostupna i jednostavna za održavanje i uzgoj.

Gujavice u tlu mogu biti izložene različitim zagađivalima bilo preko kutikule ili pak preko probavne površine (Jager i sur., 2003). Pored toga česti su plijen za mnoge kralježnjake kao npr. ptice i rovke, stoga imaju važnu ulogu u procesima biomagnifikacije mnogih zagađivala koji se pojavljuju u tlu (Paoletti, 1999), te su stoga izvrsni bioindikator za monitoring zagađenja tla. Pored toga ovi su organizmi pogodni indikatori za monitoring učinkovitosti procesa remedijacije tla od zagađivala (Lock i Jansen, 2003).

### **3.3.3. Održavanje gujavica u laboratoriju i priprema za eksperiment**

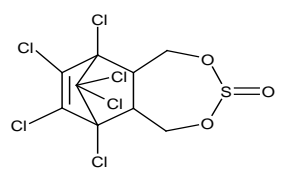
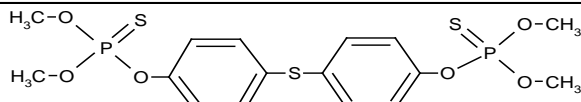
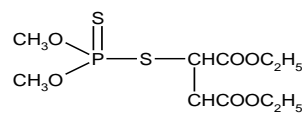
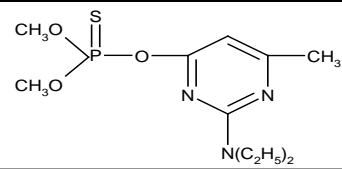
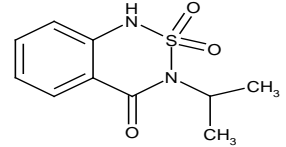
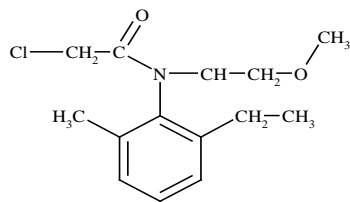
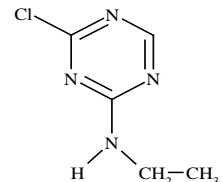
Gujavice korištene u ovom radu potječu iz uzgajališta (Eršek d.o.o., Donja Bistra). U laboratoriju su gujavice držane u posebno priređenim drvenim kutijama, u tlu određenog sastava (33% ilovača, 33% kompost, 33% treset) na temperaturi od  $20 \pm 1$  °C, pH tla između 6,8 i 7,2, uz normalan dnevni ritam svjetla (12 sati svjetla i 12 sati mraka). Vlažnost tla je održavana do točke u kojoj nema stajaće vode. Gujavice su hranjene jednom tjedno vlažnim stajnjakom koji je također dopremljen sa uzgajališta. Za eksperimente su odabrane odrasle, spolno zrele jedinke gujavica (stare 2 mjeseca) s dobro razvijenim klitelumom, težine između 350 i 400 mg.

## **3.4. FIZIKALNO-KEMIJSKA SVOJSTVA PESTICIDA UPOTRIJEBLJENIH U ISTRAŽIVANJU**

Za istraživanje su upotrijebljene formulacije pesticida za komercijalnu upotrebu. Formulacije pesticida sadrže aktivni sastojak, te sastojke kao što su otapala, površinski aktivne tvari,

nosači, antioksidansi koji poboljšavaju svojstva pesticida za skladištenje, rukovanje, primjenu, učinkovitost i sigurnost. Aktivni sastojak je kemijski spoj koji ima specifičan učinak na ciljani organizam. Popis svih pesticida korištenih u istraživanju prikazan je u Tablici 4.

**Tablica 4.** Popis pripravaka pesticida korištenih u istraživanju.

DJELATNA TVAR	VRSTA SPOJA	MEHANIZAM DJELOVANJA	FORMULA DJELATNE TVARI PESTICIDA
Endosulfan (Global E-35)	insekticid (organoklorni ciklodien)	inhibicija acetilkolineseteraze	
Temefos (Abate 4-E)	insekticid (organofosfat)	inhibicija acetilkolineseteraze	
Malation (Radotion E-50)	insekticid (organofosfat)	inhibicija acetilkolineseteraze	
Pirimifosmetil (Actelic 50-EC)	insekticid (organofosfat)	inhibicija acetilkolineseteraze	
Bentazon (Basgran 600)	herbicid (benzotiazol)	inhibicija fotosinteze	
Metolaklor (Dual gold 960 EC)	herbicid (acetamid)	inhibicija sinteze aminokiselina	
Terbutilazin (Terazin SC 50)	herbicid (triazin)	inhibicija fotosinteze	

### 3.4.1. Endosulfan (Global E-35)

Endosulfan je insekticid koji pripada u skupinu organoklornih ciklodiena. U upotrebu je uveden 1950. godine, a koristi se protiv širokog spektra insekata i grinja, u voćarstvu, vinovoj lozi i na industrijskom bilju. Spada u vrlo opasna sredstva, svrstava se u drugu kategoriju prema otrovnosti (O = II).

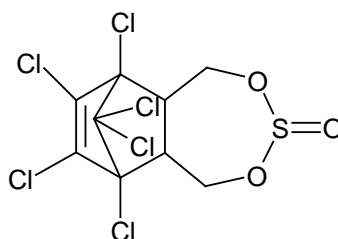
Djeluje neurotoksično, inhibitor je GABA receptora sinapsi, zatim  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  ATPaze, inhibira acetilkolineserazu pri čemu ometa i sprječava prijenos živčanih impulsa. Endokrini je disruptor.

Na temelju laboratorijskih istraživanja, dostupnih modela, monitoringa u okolišu, te literaturnih podataka, može se reći da je endosulfan vrlo perzistentan pesticid u okolišu, posebice u kiselom mediju. Jako je toksičan za ptice, ribe i ostale akvatičke organizme, umjereno je toksičan za pčele, a relativno je netoksičan za parazitske ose i neke grinje.

Zbog velike toksičnosti i velikog bioakumulacijskog potencijala, te perzistentnosti u okolišu, endosulfan je u mnogim zemljama, a od nedavno i u Republici Hrvatskoj, zabranjen za upotrebu i proizvodnju. Rok valjanosti rješenja o registraciji endosulfana u Hrvatskoj vrijedio je do 01.07.2007., a dopuštena prodaja i primjena krajnjim korisnicima vrijedila je do 01.01.2009.

Global E-35 (proizvođač: Chromos Agro d.d.) je komercijalni naziv pripravka na bazi endosulfana koji je korišten u ovom istraživanju. To je svijetlo crvenosmeđi tekući koncentrat za emulziju.

Strukturna formula:



Kemijska formula:

$\text{C}_9\text{H}_6\text{Cl}_6\text{O}_3\text{S}$

Relativna molekulska masa:

406,9

Kemijski naziv po IUPAC-u:

1,4,5,7,7-heksaklor-8,9,10-tri-norborn-5-en-2,3-iten-bis-metilen-sulfit

Topivost u vodi:

0,33 mg l<sup>-1</sup> (22°C)

Koc:

3000 – 20000

Log K<sub>ow</sub>:

α 4,74; β 4,79 (pri pH 5)

pK<sub>a</sub>:

ne ionizira

Tlak para:

8,3 x 10<sup>-4</sup> Pa (25 °C) za 2:1 smjesu α i β izomera

CAS broj:

115-29-7

EINECS broj:

204-079-4

Metabolizam endosulfana

Glavni metabolički produkti kod sisavaca su endosulfan sulfat i endosulfan diol, a prisutni su i drugi metaboli u manjim količinama. Kada se mužjaci skakavca izlože endosulfanu oralno, dermalno ili subkutano, metaboli koji se mogu identificirati su endosulfan sulfat, eter i hidroksi eter, te lakton. Sličan je metabolički put i kod kućne muhe, te žohara.

Endosulfan se brzo metabolizira u organizmu sisavaca u manje toksične metabolite i polarne konjugate. Nakon oralne ili intraperitonealne primjene endosulfana štakorima u koncentraciji od 4-8 mg kg<sup>-1</sup>, nepromijenjeni endosulfan, hidroksi eter, lakton i neidentificirani metaboliti se putem urina izlučuju iz organizma u omjeru 3:1:1:2. Najčeći metabolit pronađen u tkivima, organima i fecesu je endosulfan sulfat. Nakon doziranja <sup>14</sup>C-obilježenog endosulfana miševima, endosulfan, te endosulfan sulfat mogu se detektirati u masnom tkivu i jetri miševa, a u urinu se mogu detektirati metaboliti endosulfana.

Endosulfan je jako toksičan za ribe. Rezidue detektirane kod riba izlaganih akutnim i višekratnim subakutnim koncentracijama endosulfana su nepromijenjeni oblik endosulfana, diol i konjugati s glukuronskom kiselinom.

Endosulfan ne perzistira na biljkama, a znatne količine mogu se izgubiti isparavanjem. Glavni metabolit endosulfana u biljkama je endosulfan sulfat. Unutar 3-7 dana rezidue se smanjuju za oko 50% (ovisno o vrsti biljke). Endosulfan se hidrolizira na lišću biljaka do diola ili se pretvara u endosulfan sulfat.

#### Sudbina endosulfna u okolišu

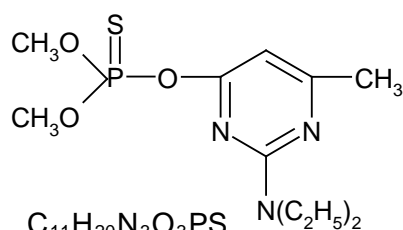
Tehnički endosulfan (6, 7, 8, 9, 10, 10-heksakloro-1, 5, 5a, 6, 9, 9a, heksahidro 6,9-metano-2, 4, 3-benzodioxatienin, 3-oksidi) je smeđe obojena kristalna tvar koja se sastoji od alfa- i beta- izomera u omjeru 70 : 30. Oba izomera endosulfana su otporna na fotodegradaciju, ali metaboliti endosulfan sulfat i endosulfan diol su podložni fotolizi. U vodi se uglavnom razgrađuje u endosulfan diol. U tlu, alfa-izomer nestaje puno brže nego beta-izomer. Endosulfan sulfat je glavni razgradni produkt u tlu. Biorazgradnja u tlu i vodi ovisi o klimatskim uvjetima i mikroorganizmima prisutnima u tlu. Endosulfan se u vodi brzo hidrolizira u diol, ali u tlu je umjereno perzistentan, gdje se pretvara u sulfat, koji je jako perzistentan. Vrijeme poluraspada u tlu kreće se u rasponu od nekoliko mjeseci do 2 godine, a u vodi od 1-6 mjeseci, ovisno o temperaturi, sadržaju kisika i pH.

Endosulfan se sporo hidrolizira u alkalnim i kiselim sredinama uz formiranje diola i sumpornog dioksida. Stabilan je u prisustvu sunčevog zračenja, ali UV zračenjem nastaju različiti produkti, čiji identitet ovisi o mediju u kojem se fotoliza odvija. Produkti koji nastaju u parnoj fazi uključuju ciklički sulfat, diol, eter i lakton, i ostale. Glavni metabolit najčešće je ciklički sulfat koji se razgrađuje puno sporije od polaznog spoja. U mediju gdje je prisutno i raslinje razgrađuje se uz pomoć miješane kulture organizama prisutnih u tlu i to uz anaerobne uvjete pri čemu nastaju slijedeći produkti: diol, eter, lakton i hidroksi eter. U subtropskim uvjetima, kada se endosulfan aplicira na pjeskovito glinastom tlu, dolazi do gubitka endosulfana isparavanjem. Dio nestaje pretvorbom u endosulfan sulfat i diol, a endosulfan sulfat perzistira do 238 dana, dok diol gotovo potpuno nestaje unutar 28 dana.

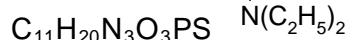
### 3.4.2. Pirimifos-metil (Actellic 50 EC)

Pirimifos-metil spada u skupinu organofosfornih insekticida s izraženim fumigantnim djelovanjem. Učinkovit je i široko upotrebljavan insekticid protiv štetnika kako u voćarstvu tako i u ratarstvu i povrtlarstvu. Djeluje kao kontaktni i kao želučani insekticid, a primarna reakcija u organizmu je inhibicija acetilkolin eseraze. Prema otrovnosti se svrstava u opasne kemikalije (O = III). Pirimifos-metil ima velik bioakumulacijski potencijal, slabo je perzistentan u tlu i u vodi. Umjereno je toksičan za sisavce. Akutna oralna toksičnost za štakora je 1414 mg/kg, akutni dermalni LD<sub>50</sub> za štakora je veći od 2000 mg/kg i akutni inhalacijski LD<sub>50</sub> za štakora je 4,7 mg/L. Pokazuje širok raspon toksičnosti za ribe, od umjerene do jake toksičnosti: 48 h LC<sub>50</sub> (*Cyprinus carpio*) = 1,4 mg/L, 24 h LC<sub>50</sub> (*Gambusia affinis*) = 33 µg/L. Jako je toksičan za slatkovodni zooplankton: 48 h LC<sub>50</sub> (*Daphnia magna*) = 0,17 µg/L. Actellic 50 EC (proizvođač: Syngenta) je komercijalni naziv pripravka na bazi pirimifos-metila, koji je korišten u ovom istraživanju. To je svijetlo smeđe obojena tekućina za emulziju.

Strukturna formula:



Kemijska formula:



Molekularna težina:

305,3

Kemijski naziv prema IUPAC-u:

O-2-dietilamino-6-metilpirimidin-4-il-O,O-dimetil  
fosforotioat

Topivost u vodi:

9,9 mg l<sup>-1</sup> (30 °C, pH 5,2)

Koc:

1100

Log Kow:

4,2

pKa:

3,71

Tlak para:

1,5 x 10<sup>-2</sup> Pa (30°C)

CAS broj:

29232-93-7

EINECS:

249-528-5

Metabolizam i metaboliti pirimifosmetila

Najviše istraživanja vezanih za metabolizam pirimifos-metila kod životinja provedeno je psima i štakorima. U urinu obje vrste detektirano je dvanaest metabolita, od kojih je pet identificirano. Glavni metaboliti su produkti hidrolize pirimidinola, a dva od njih su de-etilirani metaboliti: des-*N*-etilpirimidinol i 2-amino-6-metilpirimidin-4-ol. Konjugati pirimidinola s glukuronskom kiselinom također su identificirani kod obje vrste. Pored toga, hidrosilirani *N*-



etil metabolit, 2-[*N*-etil-*N*-(2-hidroksietil)amino]-6-metilpirimidin-4-ol, detektiran je u urinu štakora, ali ne i pasa, za koji se smatara da je metabolit oksidativne *N*-de-etilacije katalizirane mikrosomalnim oksidazama. U procesu metabolizma nastaje i aktivni antikolinesterazni spoj, ali zbog svoje nestabilnosti često se ne uspijeva detektirati. Neka istraživanja pokazuju prisutnost neidentificiranih metabolita *O*-demetiliranih spojeva. Oni se vrlo brzo hidroliziraju *in vivo* pa su njihove količine vrlo male.

Glavni put metabolizma pirimifos-metila u biljkama je hidroliza i *N*-deetilacija. Glavni početni metabolit je des-*N*-etilpirimifos-metil čija se maksimalna koncentracija može detektirati nakon dva dana od primjene pirimifosmetila. Stoga je moguće da des-etil pirimidinol potječe od hidrolize metabolita des-*N*-etilpirimifos-metila u biljkama, prije nego od deetilacije pirimidinola. Produkt hidrolize pirimidinol i njegov des-*N*-etilirani metabolit detektirani su u malim količinama.

Glavni put metabolizma u tlu je hidroliza fosforotioata pri čemu nastaje pirimidinol, te oksidacija pri kojoj nastaje pirimifos-metil okson. U laboratorijskim istraživanjima gdje je pirimifos-metil apliciran u četiri različita tipa tla, glavni metabolit koji je identificiran je pirimidinol, te manje količine oksona i des-*N*-etilpirimidinola. Jedan od metabolita detektiran u vrlo malim količinama je *O*-metilirani pirimidinol. Glavni polarni metabolit vezan za tlo je *N,N*-dietilgvanidin koji nastaje potpunom razgradnjom pirimidinskog prstena.

Metabolizam pirimifos-metila apliciranog na uskladištenim žitaricama, na 20°C, nakon 12 i 24 tjedana pokazao se puno sporijim u odnosu na metabolizam pirimifos-metila primjenjenog na rastućim biljkama. Glavni metabolit je pirimidinol, a metaboliti detektirani u manjim količinama su des-*N*-etil pirimifos-metil, des-*N*-etil pirimidinol i njegov metabolit *N*-deetilirani metabolit, zatim 2-amino-6-metil-pirimidin-4-ol, od kojih posljednji nije detektiran kod rastućih biljaka.

Sudbina pirimifosmetila u okolišu

Pirimifos-metil se brzo hidrolizira pri kiselom pH i relativno je stabilan kod neutralnog i bazičnog pH. Vrijeme poluraspada je 7 dana pri pH 5, a 79 dana pri pH 7, te 54-62 dana pri pH 9. Glavni produkt hidrolize je pirimidinol. Vrijeme poluraspada u sterilnoj deioniziranoj vodi u mraku je 3-4 dana.

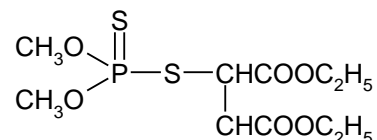
### 3.4.3. Malation (Radotion E-50)

Malation je jedan od najčešće korištenih organofosfornih insekticida u svijetu, a razlog za njegovu široku upotrebu je relativno niska toksičnost za sisavce, visoka selektivnost prema kukcima te slaba perzistentnost u okolišu u usporedbi sa drugim organofosfornim spojevima. To je jedan od najranije proizvedenih insekticida, a primjenjuje se kao insekticid i akaricid za kontrolu štetnika na voću i povrću, žitaricama, protiv muha, uši i životinjskih parazita, te za suzbijanje vektora različitih bolesti u javnom zdravstvu. To je nesistemični insekticid sa

kontaktnim, želučanim i respiratornim djelovanjem na štetnike. Ciljna reakcija u organizmu je inhibicija AChE. Ubraja se u opasna sredstva, svrstava se u treću kategoriju prema otrovnosti (O = III).

Radotion E-50 (proizvođač: Herbos) je komercijalni naziv, tekućeg bezbojnog do blago žuto obojenog koncentrata za emulziju na bazi malationa koji je korišten u ovom istraživanju.

Strukturna formula:



Kemijska formula:	$\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{O}_6\text{PS}_2$
Relativna molekulska masa:	330,3
Kemijski naziv po IUPAC-u:	S-1,2-bis(etoksikarbonil)etil O,O-dimetil fosforoditioat ili dietil (dimetoksitiofosforiltio) sukcinat
Topivost u vodi:	145 mg l <sup>-1</sup>
Koc:	405
Log Kow:	2,75
pKa:	ne ionizira
Tlak para:	$5,3 \times 10^{-3}$ Pa (30°C)
CAS broj:	121-75-5
EINECS broj:	204-497-7

#### Metabolizam malationa

Glavni metabolički put malationa kod sisavaca uključuje hidrolizu kataliziranu karboksilestrazama, pri čemu nastaju dikarboksilna kiselina, te  $\alpha$ - i  $\beta$ -malation monokiseline, dok je kod kukaca glavni metabolički put oksidacijska desulfuracija pri čemu nastaje malaokson, jaki inhibitor AChE. Kod štakora tretiranih s <sup>14</sup>C-označenim malationom, nakon 72 h identificirani su metaboliti u urinu (85-89%) i fecesu (4-15%). Glavni metabolit identificiran u urinu je dikarboksilna kiselina zatim slijede  $\alpha$ - i  $\beta$ -malation monokiseline što upućuje na to da se malation uglavnom metabolizira detoksikacijskim mehanizmima koji uključuju deesterifikaciju. Ostali detektirani metaboliti su malaokson, desmetil malation, O,O-dimetil fosforoditioat, O,O-fosforotioat, tiomalna kiselina, fumarna kiselina i monoetil fumarat. Ostali detoksikacijski mehanizmi malationa kod sisavaca su oksidativna desulfuracija u malaokson, dealkilacija u desmetil malation i hidroliza fosfatazama. Glavni metaboliti detektirani u osam različitih tkiva čovjeka nakon fatalnog slučaja trovanja malationom su  $\alpha$ - ili  $\beta$ -malation monokiselina, također i znatne količine malation dikarboksilne kiseline, te malaoksona u vrlo malim količinama. Naknadno su identificirani i drugi metaboliti, O,O-dimetil fosforoditioat, O,O-dimetil fosforotioat, dimetil fosfat i monometil fosfat.

Istraživanja su pokazala se da malation apliciran preko korjena i lišća biljaka (pamuk i bob), vrlo brzo raspada. Glavni metabolički put malationa u biljkama je karboksilesterazama-kataliziranom hidrolizom, pri čemu nastaju  $\alpha$ -malation monokiselina i dikarboksilna kiselina. Hidrolizom fosforoditioata nastaje O,O-dimetil fosforoditioat, tiofosfat, dimetil fosfat i monometil fosfat. Malaokson je metabolit koji se pojavljuje u malim količinama i vrlo brzo se hidrolizira u tkivu biljaka.

Sudbina malationa u okolišu

Brzina razgradnje u tlu iznosi 6-25 sati i ovisi o adsorpcijskom koeficijentu tla, pri čemu je najveća za tla koja imaju najveću moć vezanja. Istraživanja su pokazala da je što upućuje na mehanizam razgradnje malationa u tlu nemikrobiološki. U tlu koji sadrži 2% organske materije i 18% gline pri pH 6,1, malation se vrlo brzo razgrađuje sa vremenom poluraspada od 5 sati na 22 °C. Glavni produkt razgradnje malationa je dikarboksilna kiselina, te manje količine  $\alpha$ - i  $\beta$ -malation monokiseline. Jedan od metabolita je i malaokson ali se detektira kao kratkotrajni metabolit vrlo brzo nakon tretmana, a nakon 7 dana prisutan je u količini manjoj od 1%. U drugim studijama gdje je praćena razgradnja malationa u ilovasto pjeskovitom tlu, brzina razgradnje puno veća sa vremenom poluživota od jednog dana. Glavni metabolit i u ovom slučaju je malation dikarboksilna kiselina uz prisustvo malih količina  $\alpha$ - ili  $\beta$ -malation monokiseline. Nakon 31 dana, krajnji metaboliti ostaci sukcinatne kiseline detektirani kao malatna i laktatna kiselina. Razgradni produkti malationa u muljevito glinastom tlu su O,O-dimetil fosforoditioat i dietil fumarat. U eksperimentima gdje je malation apliciran u anaerobni sediment tla, nakon 45 dana identificirana su dva metabolita,  $\beta$ -desmetil malation monokiselina i desmetilmalation dikarboksilna kiselina kao glavni metabolit.

Fotoliza malationa u vodi, osvijetljenog sa ksenonskim svjetlom istraživana je u sterilnoj vodi pri pH 4, kako bi se minimalizirala hidroliza i razgradnja mikroorganizmima. Vrijeme poluraspada osvijetljenog uzorka je 98 dana, približno trećina vrijednosti za uzorak čuvan u tami. Glavni metaboliti identificirani i u osvijetljenom i u uzorku iz tame su jednaki, ali je njihova količina puno veća u osvijetljenom uzorku. Metaboliti su desmetilmalation,  $\alpha$ - i  $\beta$ -malation monokiseline, vrlo male količine dietil maleata, monoetil maleata i dietil tiomalata.

#### 3.4.4. Temefos (Abate 4-E)

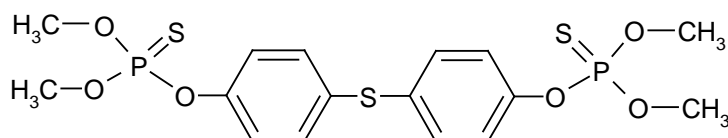
Temefos je organofosforni insekticid registriran 1965. godine, a upotrebljava se za kontrolu ličinki komaraca. Temefos se koristi u područjima stajaćih voda, plitkim barama, močvarama, plitkim jezerima.

Umjereno je do slabo toksičan za ptice, umjereno do jako toksičan je za slatkovodne ribe, jako je toksičan za slatkovodne račiće, te pčele. Kod štakora koji su kronično izlagani malim koncentracijama, temefos je uzrokovao inhibiciju kolinesteraze u krvi i mozgu. Oralni akutni

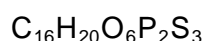
LD<sub>50</sub> za štakora je u rasponu 1226 do 13000 mg/kg, a za miša 460 do 4700 mg/kg. Pokazuje širok raspon akutne toksičnosti za ribe: LC<sub>50</sub> (*Cyprinus carpio*) = 33500 µg/L, 96h LC<sub>50</sub> (*Ictaulurus punctatus*) = 3270 µg/L, LC<sub>50</sub> (*Gambusia affinis*) = 4,11 µg/L. Jako je toksičan za zooplankton 48h LC<sub>50</sub> (*Daphnia magna*) = 0,54 µg/L.

Abate 4-E je komercijalni naziv pripravka na bazi temefosa, koji je korišten u ovom istraživanju. To je blago smeđa viskozna tekućina za emulziju.

Strukturna formula:



Kemijska formula:



Molekularna težina:

466.5

Kemijski naziv prema IUPAC-u:

O,O,O',O'-tetrametil O,O'-tiodi-*p*-fenilen difosforotioat

Topivost u vodi:

0,03 mg l<sup>-1</sup> (25°C)

Koc:

17000

Log Kow:

4,91

Tlak para:

9,5 x 10<sup>-6</sup> Pa (20 – 25°C)

pKa:

ne ionizira

CAS broj:

3383-96-8

EINECS broj:

222-191-1

#### Metabolizam temefosa

Temefos je relativno stabilan na metaboličku razgradnju i u životinjskim i u biljnim organizmima. Glavni put je tiooksidacijom do sulfoksida i hidrolizom do 4,4'-tiodifenola, a tiooksidirani metaboliti se dalje konjugiraju kao glukozidi kod biljaka i kao sulfatni esteri kod štakora. Oksidativna desulfuracija u temefos okson je nešto rjeđi put.

Kod štakora, nakon jedne oralne primjene, metaboliti temefosa mogu se detektirati u urinu, fecesu, krvi i tjelesnim tkivima nakon 72 h. Glavni metaboliti u krvi pored nepromijenjenog temefosa su 4,4'-ditioldifenol i 4,4'-sulfinildifenol. U masnom tkivu utvrđeni su nepromijenjeni temefos i temefos sulfoksid, dok su glavni metaboliti utvrđeni u fecesu temefos, temefos sulfoksid i 4,4'-sulfinildifenol, te male količine 4,4'-tiodifenola i 4,4'-sulfinildifenola. U urinu su detektirani, nepromijenjeni temefos, 4,4'-tiodifenol, 4,4'-sulfinildifenol i 4,4'-sulfonilfenol.

#### Sudbina temefosa u okolišu

Temefos se hidrolizira jakim kiselinama i lužinama. Maksimalna stabilnost je kod pH 5-7. Kada se metanolska otopina temefosa izloži suncu, dolazi do brze razgradnje što rezultira nastajanjem najmanje osam produkata od kojih su samo temefos sulfoksid i temefos sulfon identificirani. Sulfoksid je glavni početni produkt ali on se dalje fotolizom prevodi u sulfon.

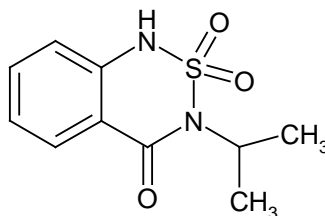
Vrijeme poluraspada u tlu je 30 dana što upućuje na slabu do umjerenu perzistentnost. U okolišu je slabo perzistentan u vodi, ostaci pesticida već par sati nakon aplikacije nisu detektibilni

### 3.4.5. Bentazon (Basagran 600)

Bentazon je herbicid kontaktnog djelovanja koji se koristi za suzivanje korova u poljodjelstvu i ratarstvu. Inhibitor je fotosinteze, čime je onemogućen proces proizvodnje hrane za biljku, inhibira fotosustav II. Umjereno je toksičan za sisavce, slabo je toksičan za ptice, gotovo je netoksičan za ribe i beskralježnjake koji žive u vodi, netoksičan je za pčele. Slabo je perzistentan u tlu. Prema otrovnosti se svrstava u opasne kemikalije (O = III).

Basagran 600 (proizvođač: BASF) je komercijalni naziv pripravka na bazi bentazona. To je vodotopivi tekući koncentrat žuto smeđe boje.

Strukturna formula:



Kemijska formula:	$C_{10}H_{12}N_2O_3S$
Molekularna težina:	240,28
Kemijski naziv prema IUPAC-u:	3-izopropil-1H-2,1,3-benzotiazin-4(3H)-on-2,2-dioksid
Topivost u vodi:	570 mg l <sup>-1</sup> (20°C, pH 7)
Koc:	<100
Log Kow:	0,35
pKa:	3,4
Tlak para:	0,17 mPa (20°C)
CAS broj:	25057-89-0
EINECS broj:	246-585-8

Metaboliti bentazona

Glavni ekskrecijski produkt u urinu štakora tretiranih bentazonom je najvećim dijelom nepromjenjeni bentazon (81-91 % u odnosu na dozu kod mužjaka i 77- 89 % kod ženki). 6-hidroksibentazon predstavlja 6,3 % doze kod mužjaka, a izomer 8-hidroksibentazon je prisutan u tragovima (0-0,23 % doze). Bentazon je više akutno toksičan za štakore. Toksičnost bentazona unesenog oralno u organizam štakora puno je veća od njegovih metabolita 6-hidroksi i 8-hidroksi metabolita.

Sudbina bentazona u okolišu

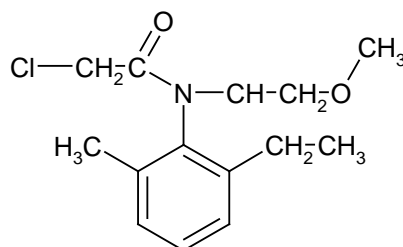
Bentazon je otporan na hidrolizu. U vodi dolazi do fotorazgradnje sa vremenom poluživota < 24 h. U tlu dolazi do fotokemijske razgradnje. Pod anaerobnim uvjetima, bentazon se razgrađuje sa vremenom poluživota u rasponu od 7 dana do 14 tjedana ovisno u tipu tla i uvjetima u tlu. U tlu je jako pokretan, stoga ima velik potencijal zagađenja površinskih voda. Bentazon ima mali potencijal bioakumulacije.

### 3.4.6. Metolaklor (Dual gold 960 EC)

Metolaklor je herbicid koji spada u skupinu kloroacetanilida. U biljkama djeluje kao inhibitor elogenaza, inhibira sintezu aminokiselina, sprječava razvoj korijena, djeluje štetno na stanične membrane. Prema otrovnosti razvrstan je u III. skupinu otrova (O = III). Od acetanilidnih herbicida, metolaklor je najviše perzistentan u tlu (vrijeme poluraspada, ovisno o tipu tla je od 15-132 dana). Zbog svoje relativno dobre topivosti u vodi (530 mg/L na 20°C) i malog koeficijenta raspodjele ima velik potencijal dospijevanja do podzemnih voda. Smatra se netoksičanim za sisavce, ptice i insekte, umjereno je toksičan za ribe (96 h LC<sub>50</sub> (*Cyprinus carpio*) = 4,9 mg/kg) i zooplankton (48 h LC<sub>50</sub> (*Daphnia magna*) = 25,1 mg/L). Toksičan je za alge.

Dual gold 960 EC (proizvođač: Syngenta) je komercijalni naziv pripravka na bazi metolaklora koji je korišten u ovome radu. To je tekući koncentrat za emulziju, svijetlo do tamno smeđe boje.

Strukturna formula:



Kemijska formula: C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>ClNO<sub>2</sub>

Molekulska masa: 283,8

Kemijski naziv prema IUPAC-u: (S)-2-klor-N-(2-etil-6-metoksi-fenil)-N-(2-metoksil-metil-etil)-acetamid

Topivost u vodi: 530 mg l<sup>-1</sup> (20°C)

Koc: 1,48

Log Kow: 3,45

pKa: 283,8

Tlak para: 1,7 mPa (20°C)

CAS broj: 51218-45-2

EINECS broj: 257-060-8

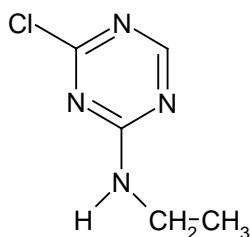
### Sudbina metolaklora u okolišu

Metolaklor je umjereno perzistentan u tlu. Vrijeme poluraspada od 15 do 70 dana ovisno o tipu tla, vlazi, nitrifikaciji, mikrobnj aktivnosti, koncentraciji kisika. U vlažnom tlu puno brže se razgrađuje, a male količine isparavaju. Fotorazgradnja je glavni put razgradnje metolaklora na površinskim dijelovima tla, dok ukupna razgradnja (anaerobna i aerobna) prvenstveno ovisi o prisutnosti mikroorganizama, temperaturi, količini vlage. Lako se veže za čestice većine tala, osobito za tla bogata organskim tvarima i glinom. Vrijeme poluraspada u laboratorijskim uvjetima uz aerobnu mikrobiološku razgradnju iznosi 67 dana, a rezultira nastajanjem glavnog metaboličkog produkta (2-etil-6-metilfenil) (2-metoksi-1-metiletil) amino okso-octenom kiselinom. Uz anaerobnu razgradnju vrijeme poluraspada je 81 dan uz nastajanje istog metaboličkog produkta. U vodi relativno dugo perzistira. Vrijeme poluraspada hidrolizom u jako kiselim vodama pri 20 °C iznosi više od 200 dana, a 97 dana u bazičnim vodama. Glavni razgradni produkti metolaklora su etan sulfonska kiselina i metolaklor oksalna kiselina.

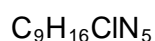
### 3.4.7. Terbutilazin (Terazin SC 50)

Terbutilazin je herbicid iz skupine triazina. Upotrebljava se za široki spektar korova u različitim kulturama. Na korove djeluje tako da inhibira fotosintezu u fotosustavu II, absorbira se uglavnom putem korijena. Prema otrovnosti se svrstava u opasne kemikalije (O = III). Slabo je toksičan za sisavce, ptice, umjereno je toksičan za ribe (LC<sub>50</sub> između 3,6 i 7,6 mg/L), zooplankton, alge. Jako je toksičan za zelene alge (0,02 mg/kg) i ostale vodene biljke (0,23 mg/L). Svi metaboliti pokazuju slabu toksičnost u testovima na pastrvama, planktonskim račićima i algama. Standardni testovi pokazali su da je terbutilazin ne toksičan za pčele (oralni i kontaktni LD<sub>50</sub> > 100 µg/pčeli), te za gujavice (LC50 > 1000 mg/kg) Terazin SC 50 (proizvođač: Herbos) je komercijalni naziv za pripravak na bazi terbutilazina koji je korišten u ovom istraživanju. To je tekuća koncentrirana suspenzija.

Strukturna formula:



Kemijska formula:



Molekulska masa:

229,7

Kemijski naziv prema IUPAC-u:

N<sup>2</sup>-terc-butil-6kloro-N<sup>4</sup>-etil-1,3,5-triazin-2,4-diamin

Topivost u vodi:

6,6 mg l<sup>-1</sup> (20°C)

Koc:

162-278

Log <i>K</i> <sub>ow</sub> :	3,21
<i>pK</i> <sub>a</sub> :	2
Tlak para:	0,15 mPa (25°C)
CAS broj:	5915-41-3
EINECS broj:	227-637-9

#### Metabolizam terbutilazina

Glavni metaboliti terbutilazina u organizmima su su de-klorinirani i N-dealkilirani produkti, koji su puno mobilniji od polaznog spoja, a neki od njih pokazuju i herbicidalno djelovanje kada zadrže atom klora na triazinskom prstenu, te jednu alkilnu skupinu.

Kod štakora pokazuje malu akutnu oralna, dermalnu i inhalacijsku toksičnost. Nakon oralne primjene štakoru, terbutilazin se potpuno apsorbira. Izlučuje se unutar 48 sati i to 2/3 urinom, a ostatak fecesom. Ne akumulira se u organima.

Terbutilazin je blago toksičan za ribe i školjke, a toksičnost za različite vrsta rakova varira od velike do gotovo netoksičnosti. Istraživanja na pticama, sisavcima, mikroorganizmima u tlu, pčelama i gujavicama pokazuju da je terbutilazin gotovo netoksičan za ove skupine organizama.

#### Sudbina terbutilazina u okolišu

Glavni putevi razgradnje u okolišu su fotoliza u akvatičkim uvjetima, a u tlu aerobna mikrobiološka razgradnja. Osnovni razgradni putevi za triazinske skupine herbicida dobro su poznati, a glavni razgradni produkti su hidroksi-terbutilazin koji nastaje dekloriranjem triazinskog prstena i desetil-terbutilazin koji nastaje kada se odcijepi alkilni postranični lanci. Terbutilazin se dobro razgrađuje u u tlu, ali razgradnja ovisi o mikrobnjoj aktivnosti. Vrijeme poluraspada u tlu iznosi oko 11-36 dana ovisno o tipu tla. U anaerobnim uvjetima vrijeme poluraspada je nešto duže i iznosi oko 69 dana. S obzirom na vrijednost *K<sub>oc</sub>*, terbutilazin je dobro pokretan kroz pjeskovita i glinasta tla. Čvrsto se veže na čestice tla (*K<sub>oc</sub>* 162-278; 2.2-25, vrijednosti tipične za oranice). Mikrobiološka razgradnja odvija se de-etilacijom i hidroksilacijom. U biološki aktivnom tlu vrijeme poluraspada iznosi 30-60 dana.

U laboratorijskim uvjetima, vrijeme poluraspada fotorazgradnjom traje 1-5 dana, pri čemu je najčešći razgradni produkt hidroksi-terbutilazin. Ostaci u akvatičkim sustavima (voda / sediment) dobro su razgradivi pri višim temperaturama (20°C).

U laboratorijskim uvjetima u pjeskovito glinastom tlu vrijeme poluraspada mu je 73-138 dana na 20-25°C, dok je kod 10°C vrijeme poluraspada 456 dana, pri čemu su glavni razgradni produkti hidroksi-terbutilazin i desetil-terbutilazin. Vrijeme poluraspada u okolišnim uvjetima je 11-36 dana ovisno o tipu tla.



### 3.5. ODREĐIVANJE TOKSIČNOSTI POJEDINAČNIH I SMJESE PESTICIDA UZ UPOTREBU KONTAKT TESTA NA FILTER PAPIRU („FILTER PAPER CONTACT TEST“)

Dvanaest sati prije početka eksperimenta gujavice su stavljene na vlažan filter papir u Petrijeve zdjelice, kako bi se probavni trakt očistio od zemlje. Pri tome su Petrijeve zdjelice pokrivene perforiranom folijom te ostavljene u tamnoj komori na 21 °C.

Kontakt test na filter papiru je akutni test toksičnosti koji se izvodi prema OECD 207 protokolu (OECD, 1984), a princip testa se sastoji u tome da se gujavice nakon provedenog postupka čišćenja probavila, pojedinačno izlažu ispitivanoj tvari i to u staklenim posudicama ravnog dna (visine 4,5 cm, promjera 5 cm) čija se površina obloži filter papirom (Whatman no. 1), bez preklapanja (Slika 13). Jedan mililitar ispitivanog pojedinačnog pesticida ili smjese pesticida rasporedi se po površini filter papira. Za pripremu određenih razrjeđenja pesticida korištena je destilirana voda. Filter papir se zatim suši uz pomoć laganog toka komprimiranog zraka. Nakon sušenja, dodaje se 1 mL destilirane vode. Kontrola sadrži samo destiliranu vodu. U svaku bočicu stavlja se po jedna gujavica, bočice se zatvore poklopcem na kojem se nalazi mali otvor, te se odlože u klima komoru na temperaturi od 21±1 °C, uz dnevni ritam osvjjetljenja jačine 400 – 800 luxa. Test traje 48 sati. Mortalitet se utvrđuje nakon 24 i 48 sati. Gujavice se smatraju mrtvima ako ne odgovaraju na blagi mehanički podražaj na prednjem kraju.



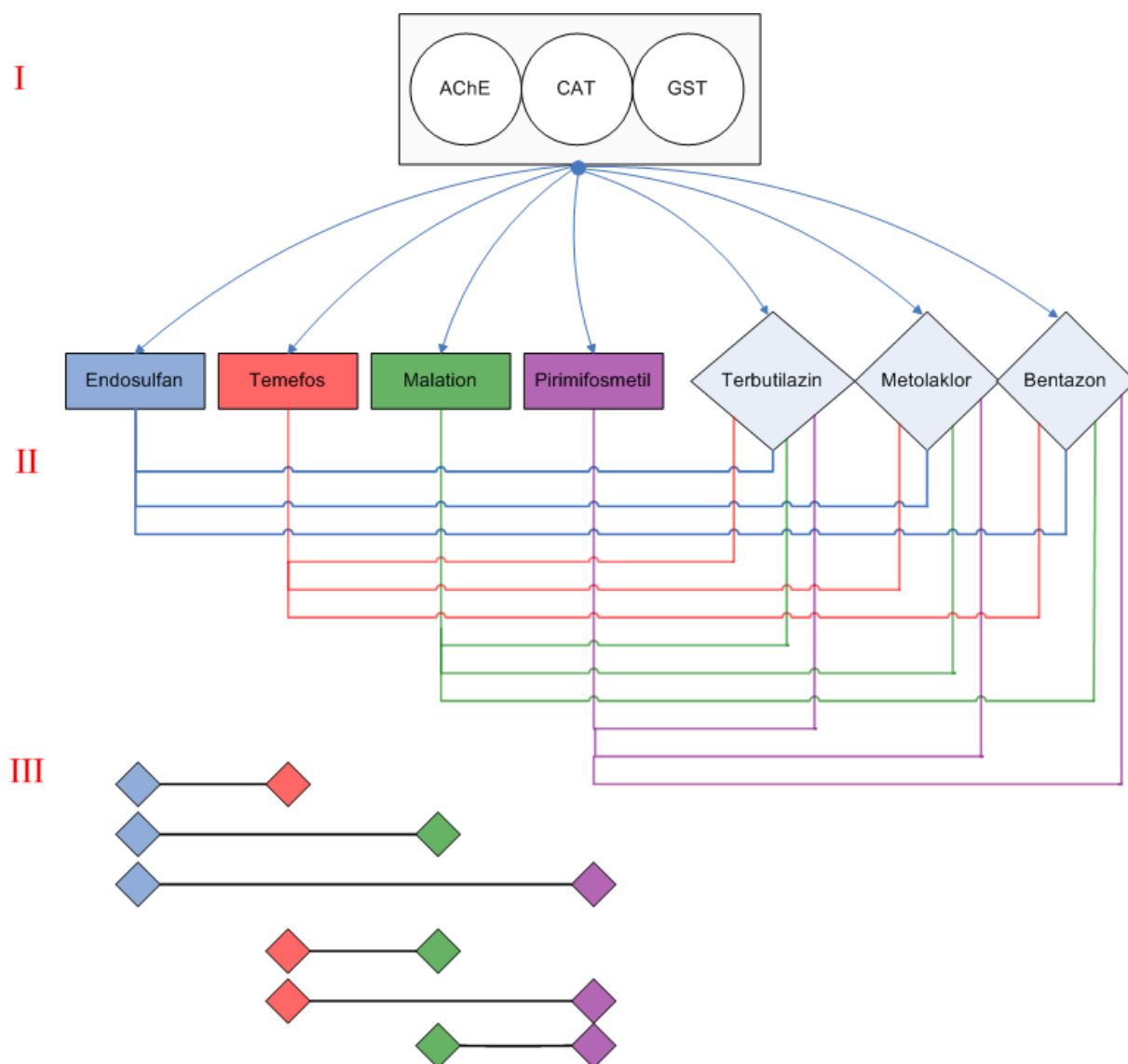
**Slika 13.** Kontakt test na filter papiru.

Dizajn eksperimenta prikazan je na Slici 14, a korištene 100%-tne koncentracije te kombinacije pesticida prikazane su u Tablici 6 i kombinacije pesticida na Slici 14. 100%-tne koncentracije su maksimalne koncentracije pesticida upotrebjene u eksperimentu s pojedinačnim pesticidima (C7).

U svrhu određivanja ( $EC_{50}$ ) i srednje letalne doze ( $LC_{50}$ ) za svaki pojedini pesticid priređeno je po sedam koncentracija, svaka koncentracija je rađena u duplikatu, a za jednu repliku upotrijebljeno je po deset gujavica (Tablica 5 a).

Kod određivanja toksičnosti smjese pesticida raspon koncentracija smjese određuje na temelju  $EC_{50}$  vrijednosti za svaki pesticid, tj. na temelju izračuna donje asimptote logističke krivulje koje su prethodno određene u eksperimentu s pojedinačnim pesticidima. Tako izračunate koncentracije (endosulfan  $2\mu\text{gcm}^{-2}$ , temefos  $2,4\mu\text{gcm}^{-2}$ , malation  $70\mu\text{gcm}^{-2}$ , te terbutilazin, metolaklor i bentazon po  $140\mu\text{gcm}^{-2}$ ) su se zatim razrjeđivale da bi se za svaku smjesu dobilo sedam koncentracija (Tablica 5b, Slika 15). Kombinacije pesticida u smjesi su se određivale tako što je svaki od pesticida s djelovanjem na aktivnost acetilkolinesteraze (endosulfan, temefos, malation i pirimifosmetil) sparivan s pesticidima koji nisu imali djelovanje na acetilkolinesterazu u eksperimentu s pojedinačnim pesticidima (terbutilazin, metolaklor i bentazon) (Slika 14).

Za izradu izoblograma izabrano je šest kombinacija pesticida (Tablica 6), i to onih koji su u eksperimentu s pojedinačnim pesticidima pokazali značajan učinak na mjerene biomarkere.



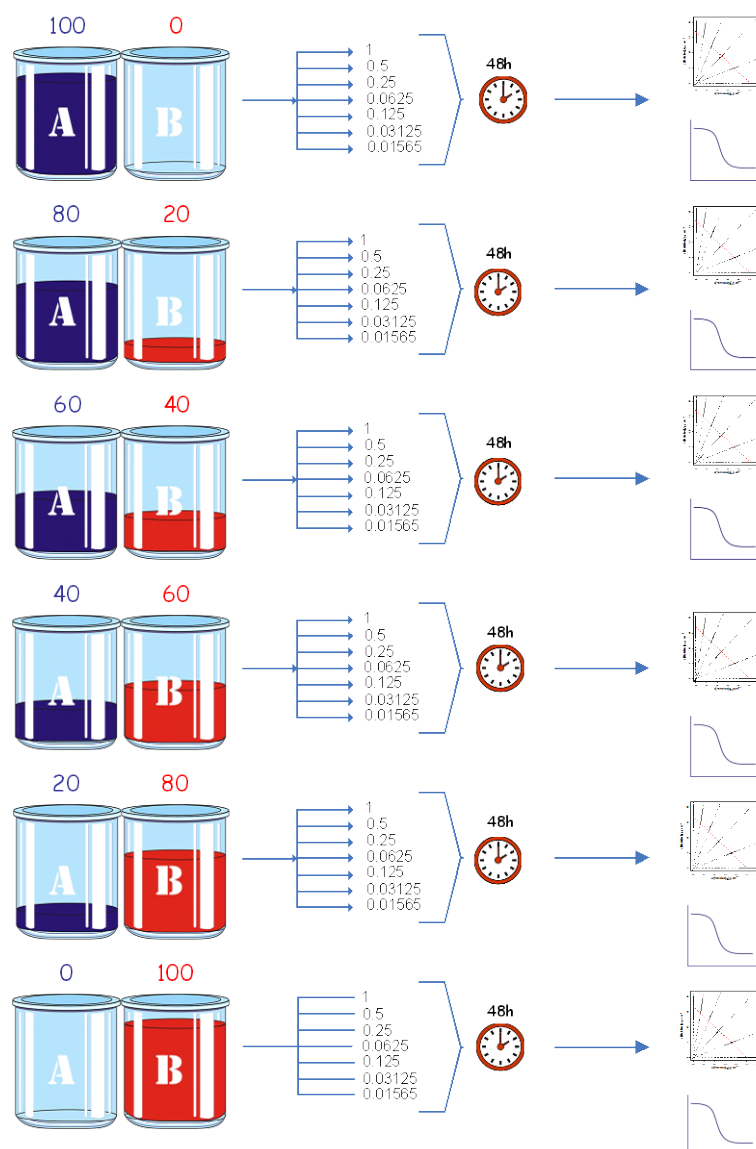
**Slika 14.** Shema dizajna eksperimenta; kombinacije pesticida upotrebljene u eksperimentu sa smjesama (II) i one upotrebljene u eksperimentu sa izobologramima (III).

**Tablica 5.** Koncentracije pojedinačnih (a) i pesticida u smjesi (b) upotrebljenih za izlaganje gujavica u kontakt testu na filter papiru.

a)	K ( $\mu\text{gcm}^{-2}$ )	C1 ( $\mu\text{gcm}^{-2}$ )	C2 ( $\mu\text{gcm}^{-2}$ )	C3 ( $\mu\text{gcm}^{-2}$ )	C4 ( $\mu\text{gcm}^{-2}$ )	C5 ( $\mu\text{gcm}^{-2}$ )	C6 ( $\mu\text{gcm}^{-2}$ )	C7 ( $\mu\text{gcm}^{-2}$ )
Endosulfan	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5
Temefos	0	0.6	1.2	1.8	2.4	3.0	3.6	4.0
Malation	0	10	20	30	40	50	60	70
Pirimifosmetil	0	12	24	36	48	60	72	84
Terbutilazin	0	20	40	60	80	100	120	140
Metolaklor	0	20	40	60	80	100	120	140
Bentazon	0	20	40	60	80	100	120	140
b)	K ( $\mu\text{gcm}^{-2}$ )	C1 ( $\mu\text{gcm}^{-2}$ )	C2 ( $\mu\text{gcm}^{-2}$ )	C3 ( $\mu\text{gcm}^{-2}$ )	C4 ( $\mu\text{gcm}^{-2}$ )	C5 ( $\mu\text{gcm}^{-2}$ )		
Endosulfan + Terbutilazin	0	0.13	0.25	0.50	1.00	2.00		
Endosulfan + Metolaklor	0	0.13	0.25	0.50	1.00	2.00		
Endosulfan + Bentazon	0	0.13	0.25	0.50	1.00	2.00		
Temefos + Terbutilazin	0	0.15	0.30	0.60	1.20	2.40		
Temefos + Metolaklor	0	0.15	0.30	0.60	1.20	2.40		
Temefos + Bentazon	0	0.15	0.30	0.60	1.20	2.40		
Malation + Terbutilazin	0	4.38	8.75	17.50	35.00	70.00		
Malation + Metolaklor	0	4.38	8.75	17.50	35.00	70.00		
Malation + Bentazon	0	4.38	8.75	17.50	35.00	70.00		
Pirimifosmetil + Terbutilazin	0	5.25	10.50	21.00	42.00	84.00		
Pirimifosmetil + Metolaklor	0	5.25	10.50	21.00	42.00	84.00		
Pirimifosmetil + Bentazon	0	5.25	10.50	21.00	42.00	84.00		

**Tablica 6.** Kombinacije pesticida, te njihove 100%-tne koncentracije upotrebjene pri eksperimentu za izradu izoblograma.

KOMBINACIJE PESTICIDA	KONCENTRACIJE ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ )
Endosulfan – Malation	3,5 – 70
Endosulfan – Pirimifosmetil	3,5 – 84
Endosulfan - Temefos	3,5 – 4
Malation – Pirimifosmetil	70 – 84
Temefos - Malation	4 – 70
Temefos - Pirimifosmetil	4 - 84



**Slika 15.** Shema razrjeđenja korištenih u eksperimentu određivanja  $ER_{50}$  vrijednosti.

### 3.5.1. Priprava postmitohondrijske frakcije gujavica

Za izradu homogenata gujavice su najprije izvađene iz spremnika s tekućim dušikom te pohranjena na +4°C. Nakon postignuća temperature od +4°C cijela gujavica, kratkotrajno je isprana hladnim fosfatnim puferom (0,1 M, pH 7,4) nakon čega je prenesena u homogenizator uz dodatak jednako hladnog fosfatnog pufera u omjeru 1:4 (masa tkiva : volumen pufera). Homogenizacija se izvodila upotrebom Potter-Elvehjem-ovog homogenizatora uronjenog u posudu s ledom, tijekom jedne minute. Homogenat se zatim centrifugirao na 9000 x g, pri temperaturi od +2 °C u eppendorf epruveticama s poklopcem. Supernatant, postmitohondrijska ili S9 frakcija, odmah se odlila u nove eppendorf epruvetice s poklopcem i pohranjena na -80 °C do upotrebe.

### 3.5.2. Mjerenje aktivnosti enzima acetilkolinesteraze (AChE)

Aktivnost enzima AChE mjerena je na UV-visible 1601 Shimadzu spektrofotometru metodom po Ellman i sur. (1961) u S9 frakciji homogenata gujavica. Mjerenje se zasniva na slijedećem principu: acetiltiokolin (ATCh) se enzimatski hidrolizira pri čemu nastaje acetat i tiokolin. Tiokolin reagira s 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojevom kiselinom (DTNB), a kao produkt nastaje žuto obojen 5-tio-2-tionitrobenzojev kiseli anion (TNB). Maksimum apsorpcije TNB je na 412 nm.

Volumen reakcijske smjese iznosio je 1,5 ml, od čega je bilo 1,4 ml fosfatnog pufera (0,1 M, pH 7,2), 25 µl DTNB, 40 µl PMF i 35 µl supstarata acetiltiokolin-jodida. Aktivnost AChE mjerena je tijekom jedne minute, a izračunavala se na temelju molarnog apsorpcijskog koeficijenta DTNB ( $\epsilon = 13,6 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

Vrijednosti mjerenja enzima AChE u S9 frakciji ovisi o količini enzima, pa se aktivnost AChE izrazila u količini prerađenog supstrata u jedinici vremena po miligramu proteina ( $\text{nmol mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$ ).

### 3.5.3. Mjerenje aktivnosti katalaze (CAT)

Za mjerenje aktivnosti katalaze korištena je metoda po Claiborne (1985). Metoda se zasniva na mjerenju razgradnje vodikovog peroksida, odnosno prati se opadanje apsorpcije tijekom vremena (60 sekundi) na 240 nm.

Ukupni volumen reakcijske smjese iznosio je 1,5 ml od čega je bilo 780 µL fosfatnog pufera (0,1 M, pH 7,2), zatim 20 µl S9 i 700 µl vodikovog peroksida (0,019 M). Konačni volumen reakcijske smjese iznosio je 3 ml. Promjena apsorpcije mjerila se na 240 nm. Aktivnost katalaze izražena je u mikromolima H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utrošenog u minuti po miligramu proteina ( $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$ ).

### 3.5.4. Mjerenje aktivnosti glutation-S-transferaze (GST)

Aktivnost GST određivana je spektrofotometrijski, metodom po Habig i sur., (1981). Princip metode zasniva se na slijedećem: GST katalizira konjugaciju 1-kloro-2,4-dinitrobenzena s glutationom, pri čemu nastaje s-(2,4-dinitrofenil) glutation. Porast intenziteta fluorescencije mjeri se na 590 nm.

Ukupni volumen reakcijske smjese iznosio je 1,275 ml, a sadržavao je 1 ml CDNB, 250  $\mu$ l GSH i 25  $\mu$ l S9. Jedinica enzimске aktivnosti izražena je u nanomolima CDNB konjugata nastalog u minuti po miligramu proteina ( $\text{nmol mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$ ) uz upotrebu molekularnog ekstinkcijskog koeficijenta od  $9,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### 3.5.5. Određivanje količine proteina u postmitohondrijskoj frakciji

Količina proteina u postmitohondrijskoj frakciji (PMF) određivana je spektrofotometrijski metodom po Bradfordu (Bradford, 1976).

I. Prema ovoj metodi najprije je potrebno prirediti otopinu boje (Coomassie Brilliant Blue G-250) na slijedeći način:

1) Najprije se priredi matična otopina otapanjem 175 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 boje u 50 ml etanola (95 %), a zatim se dod 100 ml fosfatne kiseline (85 %). Ova je otopina na sobnoj temperaturi stabilna neograničeno dugo.

2) Nakon toga priređuje se radna otopina boje na način da se pomiješa 3,75 ml etanola (95%), 7,5 ml fosfatne kiseline (88%), 7,5 ml Bradford štok otopine boje i 125 ml deionizirane vode. Ovako priređena otopina boje filtrira se kroz Whatman No. 1 filter papir i čuva u tamnoj boci na sobnoj temperaturi. Ovako priređena otopina može se koristiti nekoliko tjedana, ali je potrebno potrebno ponovo filtrirati.

II. Nakon što se priredi otopina boje, potrebno je prirediti i otopinu pufera, pri čemu se koristi istovjetan pufer korišten i za pripremu PMF (fosfatni pufer).

III. Slijedi priprema standardne otopine albumina goveđeg seruma (BSA), tako da se određena količina albumina goveđeg seruma otopi u puferu (1mg/ml).

IV. Slijedeći korak je fotometriiranje uzorka na 595 nm. U kivetu se najprije dodaje uzorak (x  $\mu$ l), zatim otopina G-250 (100  $\mu$ l) i na kraju pufer (200-X  $\mu$ l). Ukupni volumen u mikrokiveti iznosi 300  $\mu$ l).

Prije početka mjerenja potrebno je načiniti «screening» uzorka, tj. treba iz navedenog uzorka odpipetirati po 1, 5, 10 i 50  $\mu$ l da bi se ustanovio volumen uzorka kojeg treba stavljati u mikrokivetu. Odabire se onaj volumen pri kojem apsorbancija iznosi između 0,400 i 1,000. Kako bi u mikrokiveti pri screening-u bio sačuvan volumen smjese od 300  $\mu$ l, pufer se dodaje u volumenu umanjenom za volumen dodanog uzorka. Koncentracija proteina izračuna se prema regresijskom modelu kalibracijske krivulje koja se izrađuje fotometriranjem otopina BSA različitih koncentracija.

### 3.6. IZLAGANJE GUJAVICA PESTICIDIMA I UZORKOVANJE ZA HISTOLOŠKU OBRADU

Dvanaest sati prije početka eksperimenta gujavice su stavljene na vlažan filter papir u Petrijeve zdjelice, kako bi se probavni trakt očistio od zemlje, a nakon toga je svaka gujavica pojedinačno izlagana pojedinačnim, a zatim i smjesi pesticida uz upotrebu kontakt testa na filter papiru. Gujavice su pojedinačnim i smjesi pesticida izlagane 24 h, a svaka dva sata uzeto je po dvije gujavice od svake koncentracije. Upotrebljeni pesticidi i njihove koncentracije prikazani su u Tablici 7. Gujavice su anestetizirane u 20%-tnoj otopini etanola u trajanju od 1-2 minute, te se pristupilo uzorkovanju tkiva. Uz pomoć lupe, skalpela i pincete uzimani su poprečni prerezi gujavica dužine 5 mm i to na 6. kolutiću iza kliteluma. Prerezi su isprani 0,9%-tnom otopinom NaCl (kako bi se uklonila sluz i nečistoće nastale pri sekciji) i stavljeni u označene histološke košarice. Tako priređeni uzorci stavljeni su na fiksaciju u 10% otopinu neutralnog puferiranog formalina najmanje 72 sata. Nakon fiksiranja pristupilo se procesiranju čime je tkivo pripremljeno za završne korake histološke obrade (Tablica 8).

**Tablica 7.** Koncentracije smjesa pesticida upotrebljenih za izlaganje gujavica u kontakt testu na filter papiru za histološku analizu.

<b>Pesticid / Smjese pesticida</b>	<b>Koncentracija / <math>\mu\text{g}/\text{cm}^2</math></b>
Pirimifos-metil	0,1
Pirimifos-metil	0,75
Pirimifos-metil + Metolaklor	0,375 0,375
Pirimifos-metil + Metolaklor	0,75 +0,75
Pirimifos-metil + Bentazon	0,375 + 25
Pirimifos-metil + Bentazon	0,75 + 50
Pirimifos-metil + Malation	0,75 + 0,1
Pirimifos-metil + Terbutilazin	0,75 + 40
Pirimifos-metil + Temefos	0,75 + 1



**Tablica 8.** Protokol za procesiranje tkiva gujavica (Prophet i sur., 1994)

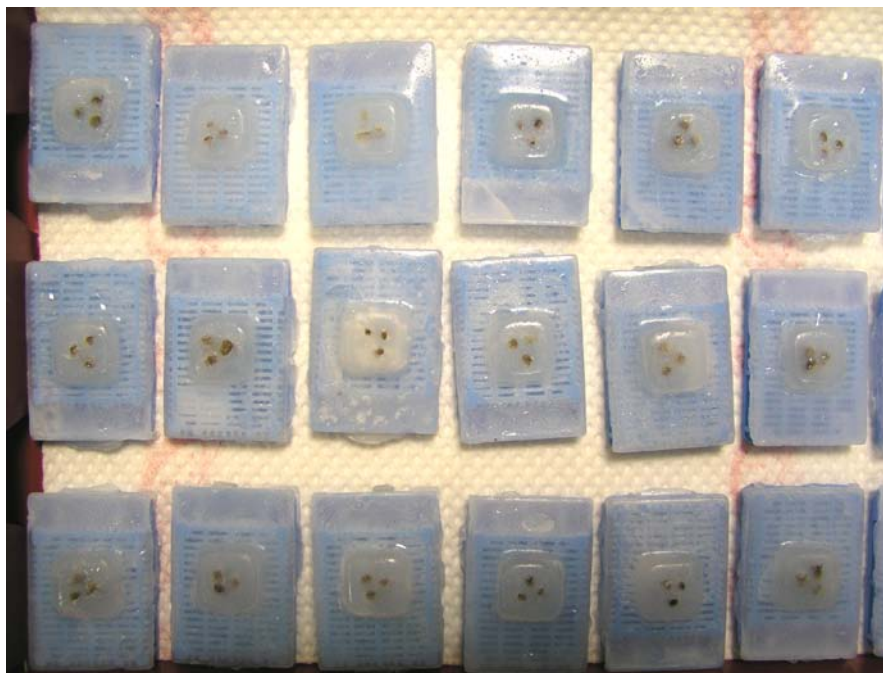
Procesiranje	Destilirana voda	96% EtOH	Abs EtOH	4% fenol	Vrijeme procesiranja
1.	95,0 ml	5,0 ml	-	-	30 min
2.	80,0 ml	20,0 ml	-	-	30 min
3.	50,0 ml	40,0 ml	10,0 ml	-	1 sat
4.	15,0 ml	50,0 ml	35,0 ml	4,0 ml	24 sata
5.	-	25,0 ml	75,0 ml	-	1 sat
6.	-	-	100,0 ml	4,0 ml	1 sat
7.	Ksilen	-	-	-	30 min
9.	PARAFIN (pri 60°C)	-	-	-	19 sati

### 3.6.1. Uklapanje tkiva u parafinski blok

Nakon procesiranja, uzorci su priređeni za postupak rezanja, tako što su uklopljeni u histološki parafin u koji je predhodno dodano 5% *Cera albae* (bijelog pčelinjeg voska). Rastaljeni parafin ulijeva se u uleknuču metalnog kalupa u koji se postavi uzorak tkiva tako da stoji okomito na površinu kalupa. Na metalni kalup sa postavljenim uzorkom stavi se donji dio plastične histološke košarice i sve se nadopuni parafinom. Kompletan postupak uklapanja komadića tkiva izvodio se u vodenoj kupelji pri 60°C kako bi se spriječilo prijevremeno skrutnjavanje parafina. Nakon uklapanja, blokovi su ohlađeni držanjem na ravnoj podlozi pri sobnoj temperaturi do skrutnjavanja parafina. Blokovi tkiva su izvađeni iz metalnog kalupa i skalpelom je odstranjen suvišni parafin (Slika 16).

### 3.6.2. Rezanje parafinskih blokova

Parafinski blokovi su rezani na kliznom mikrotomu (Leica, SM 2000R) (Slika 17 a). Grubim rezanjem na mikrotomu najprije je uklonjen višak parafina iznad uzorka tkiva, a zatim su rađeni fini rezovi debljine 20 µm. Rezovi se ispravljani u posudi s toplom vodom, pri čemu se uklonjeni svi nabori i mjehurići zraka koji se javljaju pri rezanju. Nakon ispravljanja, rezovi su hvatani na čistu predmetnicu. Označeni preparati su ostavljeni u sušioniku minimalno 1h na 60°C kako bi se s preparata uklonio suvišak parafina.



**Slika 16.** Parafinski blokovi s uklopljenim tkivom gujavica.

### **3.6.3. Bojanje rezova i uklapanje u Canada balzam**

Bojanje se izvodilo u kadicama za bojanje, tako da se svaki preparat provodio slijedom prema propisanom protokolu koji je prikazan u Tablici 9 (Slika 17 b). Nakon bojanja preparati su s donje strane obrisani pamučnom krpicom, a s gornje strane obrisani je višak ksilena oko samih preparata. Na pokrovnicu se zatim kapnula kap razrijeđenog Canada balzama, te se pokrovnica s nanesenom smolom zalijepila na predmetnicu. Ksilen prisutan na predmetnici otopio je Canada balzam, te je pokrovnica fiksirana za predmeticu. Takav preparat ostavljen je da se osuši na zraku (2-3 dana), nakon čega je bio spreman za mikroskopiranje i mikrotografiranje (Slika 17 c).

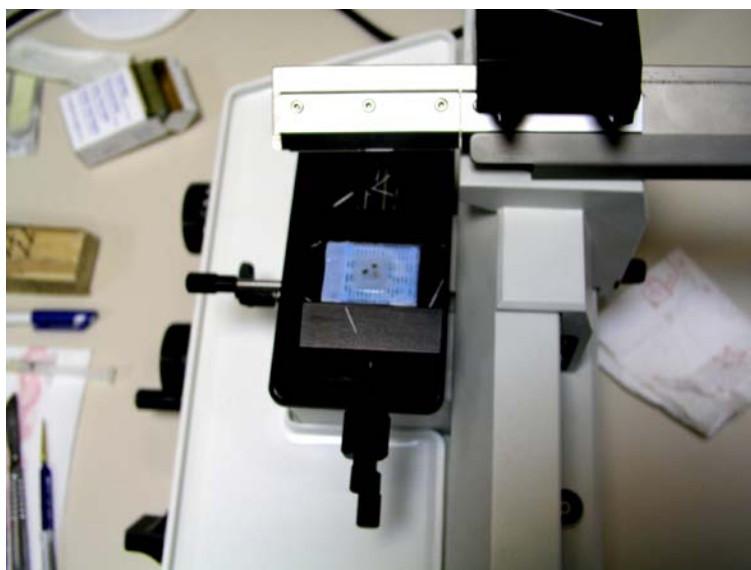
**Tablica 9.** Protokol bojanja preparata.

Redni broj	Kemikalija	Vrijeme
1.	Ksilen I	3 min
2.	Ksilen II	3 min
3.	ABS etilni alkohol	3 min
4.	96% etilni alkohol	3 min
5.	Destilirana voda	3 min
6.	MAYER-OV HEMALAUN	3 min
7.	Vodovodna voda	5 min
8.	80% etilni alkohol	3 min
9.	EOSIN 1%	30 s
10.	Vodovodna voda	Isprati preparate
11.	96 % etilni alkohol	2 min
12.	96 % etilni alkohol	2 min
13.	ABS etilni alkohol I	2 min
14.	ABS etilni alkohol II	2 min
15.	ABS – Ksilen (1:1)	2 min
16.	Ksilen II	2 min

#### 3.6.4. Mikrofotografiranje i mikrometrija preparata

Gotovi mikroskopski preparati mikrofotografirani su pomoću mikroskopa Olympus DX41, uz korištenje digitalne fotokamere Olympus DP-12, a zatim je obavljeno mjerenje debljine slojeva kružnih i uzdužnih mišića uz pomoć "Image analysis" programa.

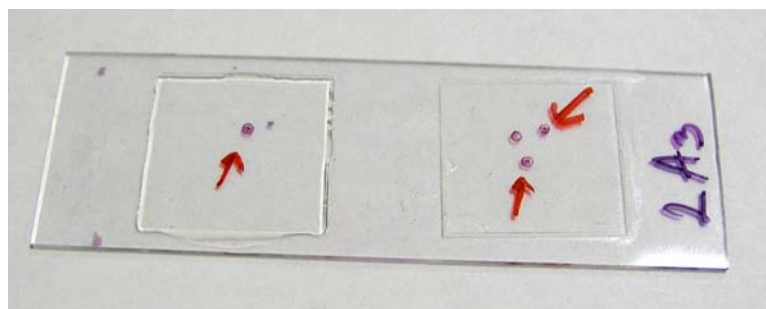
a)



b)



c)

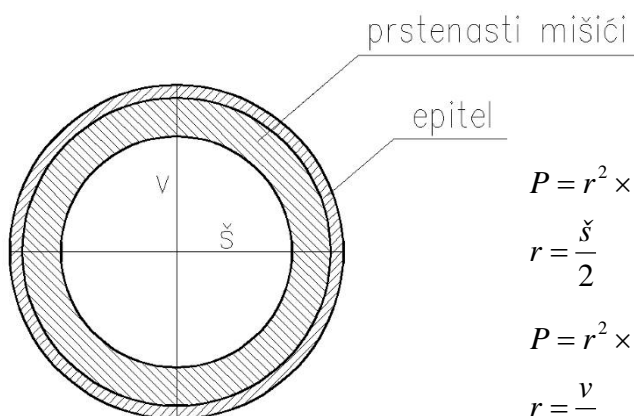


**Slika 17.** a) Rezanje uklopljenog tkiva gujavice, b) bojanje preparata, c) preparati pripremljeni za mikroskopiranje.

### 3.6.5. Modeli za određivanje omjera površine epitelnog i mišićnog sloja ( $P_{ep} / P_{em}$ )

S obzirom na građu gujavice, a shodno tome i izgled poprečnog presjeka gujavice, mjerilo se ukupno 7 varijabli pomoću analizatora slika (ImageTool): površina i debljina epitela, površina i debljina prstenstih mišića, visina i širina preparata te površina preparata. Kako se prilikom mjerenja zapazilo da poprečni presjek može biti kružnog odnosno eliptičnog oblika, izradila su se dva modela kako bi se izrazila površina epitela i površina prstenastih mišića te se usporedile teorijske i eksperimentalne vrijednosti.

## 3.6.5.1. Kružni model



$$\begin{aligned}
 P &= r^2 \times \pi & P_{ep} &= (\check{s} - d_{ep}) \times d_{ep} \times \pi \\
 r &= \frac{\check{s}}{2} & P_{mus} &= (\check{s} \times d_{mus} - 2 \times d_{ep} \times d_{mus} - d_{mus}^2) \times \pi \\
 P &= r^2 \times \pi & P_{ep} &= (v - d_{ep}) \times d_{ep} \times \pi \\
 r &= \frac{v}{2} & P_{mus} &= (v \times d_{mus} - 2 \times d_{ep} \times d_{mus} - d_{mus}^2) \times \pi
 \end{aligned}$$

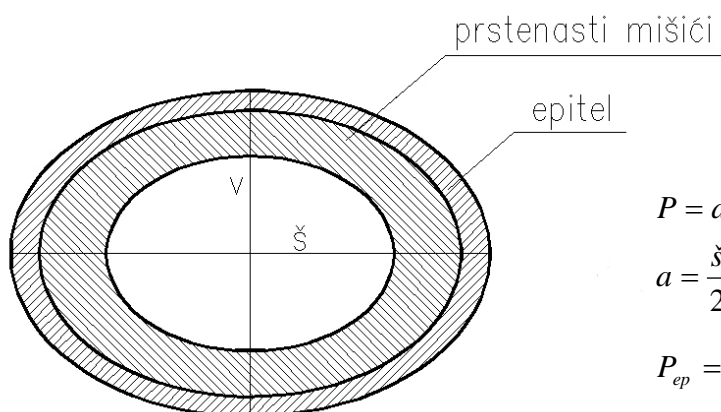
Slika 18. Kružni model.

Gdje je:

- $v$       visina preparata
- $\check{s}$       širina preparata
- $P_{ep}$     površina epitela
- $P_{mus}$    površina prstenastih mišića
- $d_{mus}$    debljina prstenastih mišića
- $d_{ep}$     debljina epitela

Kružni model (Slika 18) ima 2 oblika – u jednom je kao polumjer kruga korištena polovina širine preparata, dok je u drugom korištena polovina visine preparata. Izvedene formule koristile su se za izračun teorijskih vrijednosti površine epitela i površine prstenastih mišića, a ulazni parametri su bili debljina epitela i debljina mišića, te visina i širina preparata.

## 3.6.5.2. Eliptični model



$$P = a \times b \times \pi$$

$$a = \frac{\check{s}}{2}, \quad b = \frac{v}{2}$$

$$P_{ep} = \left( \frac{\check{s}}{2} + \frac{v}{2} - d_{ep} \right) \times d_{ep} \times \pi$$

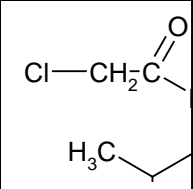
$$P_{mus} = \left( \frac{\check{s}}{2} + \frac{v}{2} - 2 \times d_{ep} - d_{mus} \right) \times d_{mus} \times \pi$$

Slika 19. Eliptični model.

Gdje je:

- $v$       visina preparata
- $\check{S}$       širina preparata
- $P_{ep}$     površina epitela
- $P_{mus}$    površina prstenastih mišića
- $d_{mus}$    debljina prstenastih mišića
- $d_{ep}$     debljina epitela

U eliptičnom modelu (Slika 19) za izvođenje formula korištene su polovina širine preparata i polovina visine preparata. Izvedene formule koristile su se za izračun teorijskih vrijednosti površine epitela i površine prstenastih mišića, a ulazni parametri su bili isti kao i u kružnom modelu - debljina epitela i debljina mišića, te visina i širina preparata.



### 3.7. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Za analizu podataka i crtanje grafova korišten je program otvorenog koda za statističku obradu i vizualizaciju podataka R (verzija 2.9.2), koji predstavlja implementaciju S-programa (Ihaka i Gentleman, 1996).  $EC_{50}$  vrijednosti određivane su korištenjem funkcije ED (efektivna doza) paketa drc (*dose response curve*) koji radi pod R programom (Ritz i Streibig, 2005.)

Krivulje doza odgovor prilagođivane („fitane“) su linearno-logističkim modelom koji su predložili Brain i Cousen (1989), a koji omogućuje jednostavan test na hormezu, te petero-parametarskom logističkom funkcijom (LL.5). Korištene su dvije parametrizacije Brian-Cousens modela i to Brain-Cousenova četvero-parametarska logistička funkcija (BC.4) te Brain-Cousenova petero-parametarska logistička funkcija (BC.5).

## 4. REZULTATI

### 4.1. OVISNOST FUNKCIJE OVISNOSTI JAČINE UČINKA O KONCENTRACIJI PESTICIDA PRI RAZLIČITOM TRAJANJU IZLAGANJA

#### 4.1.1. Aktivnost AChE, CAT i GST u S9 frakciji homogenata gujavica nakon 2, 12, 24 i 48 sati izlaganja endosulfanu

Rezultati mjerenja aktivnosti AChE, CAT i GST u S9 frakciji homogenata gujavica nakon 2, 12, 24 i 48 sati izlaganja endosulfanu pri koncentracijama 0,5, 1, 1,5, 2,0, 2,5 i 3,0 i 3,5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  prikazani su na Slikama 20-23. Kod najmanje koncentracije endosulfana aktivnost AChE nije se značajno promijenila u odnosu na kontrolu nakon 2, 12, i 24 h, dok je nakon 48 h došlo statistički značajnog smanjenja aktivnosti AChE od 1,3 puta u odnosu na kontrolu (Slika 20 a). Nakon 48 h pri koncentraciji endosulfana od 1,0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  izmjerena je aktivnost AChE od 62,8  $\text{nmol mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$ , dok je u kontrolnim uzorcima izmjerena aktivnost od 104,8  $\text{nmol mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$ , što znači da je došlo do smanjenja aktivnosti za 1,7 puta (Slika 20 b). Maksimalna inhibicija postignuta je pri koncentraciji endosulfana od 3,5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , pri čemu je izmjerena aktivnost AChE od 39,6  $\text{nmol mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$ , što je u odnosu na kontrolu smanjenje od 2,8 puta (Slika 20 g). Kod koncentracija endosulfana od 2,5, 3,0 i 3,5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  aktivnost AChE nije bilo moguće izmjeriti nakon 48 h zbog mortaliteta. Aktivnost AChE nakon izlaganja endosulfanu kontinuirano se smanjivala povećanjem koncentracije, a unutar iste koncentracije smanjivala se s povećanjem trajanja izlaganja (Slika 20).

Nije zabilježena značajna razlika u aktivnosti CAT u kontrolnim uzorcima nakon 2, 12, 24 i 48 h, pri čemu je maksimalna izmjerena aktivnost katalaze u kontroli iznosila 96,2  $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$  (Slika 21 a). Nakon 12 h izlaganja pri koncentraciji endosulfana 1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  došlo je do statistički značajnog smanjenja aktivnosti CAT u odnosu na kontrolu (Slika 21). Aktivnost CAT kod ove koncentracije iznosila je 68,9  $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$  što znači smanjenje od 1,7 puta u odnosu na kontrolu, međutim nakon 48 h dolazi do značajnog povećanja aktivnosti CAT (100,1  $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$ ), 1,3 puta u odnosu na kontrolu (Slika 21 b). Slični rezultati dobiveni su i u izmjerenim uzorcima pri koncentracijama endosulfana 1,5 i 2,0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , dakle nakon 2, 12 i 24 h izmjerena je smanjena aktivnost CAT, dok nakon 48 h aktivnost naglo raste.

Maksimalna vrijednost GST izmjerena u kontrolnim uzorcima iznosila je 239  $\text{nmol mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$  (Slika 22 a). Pri najmanjoj koncentraciji endosulfana od 0,5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  izmjerena je aktivnost GST od 339  $\text{nmol mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$  što znači da se aktivnost u odnosu na kontrolu povećala za 1,3 puta. Nakon 12 sati dolazi do smanjenja aktivnosti GST u odnosu na kontrolnu vrijednost kod koncentracija endosulfana 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0 i 3,5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Slika

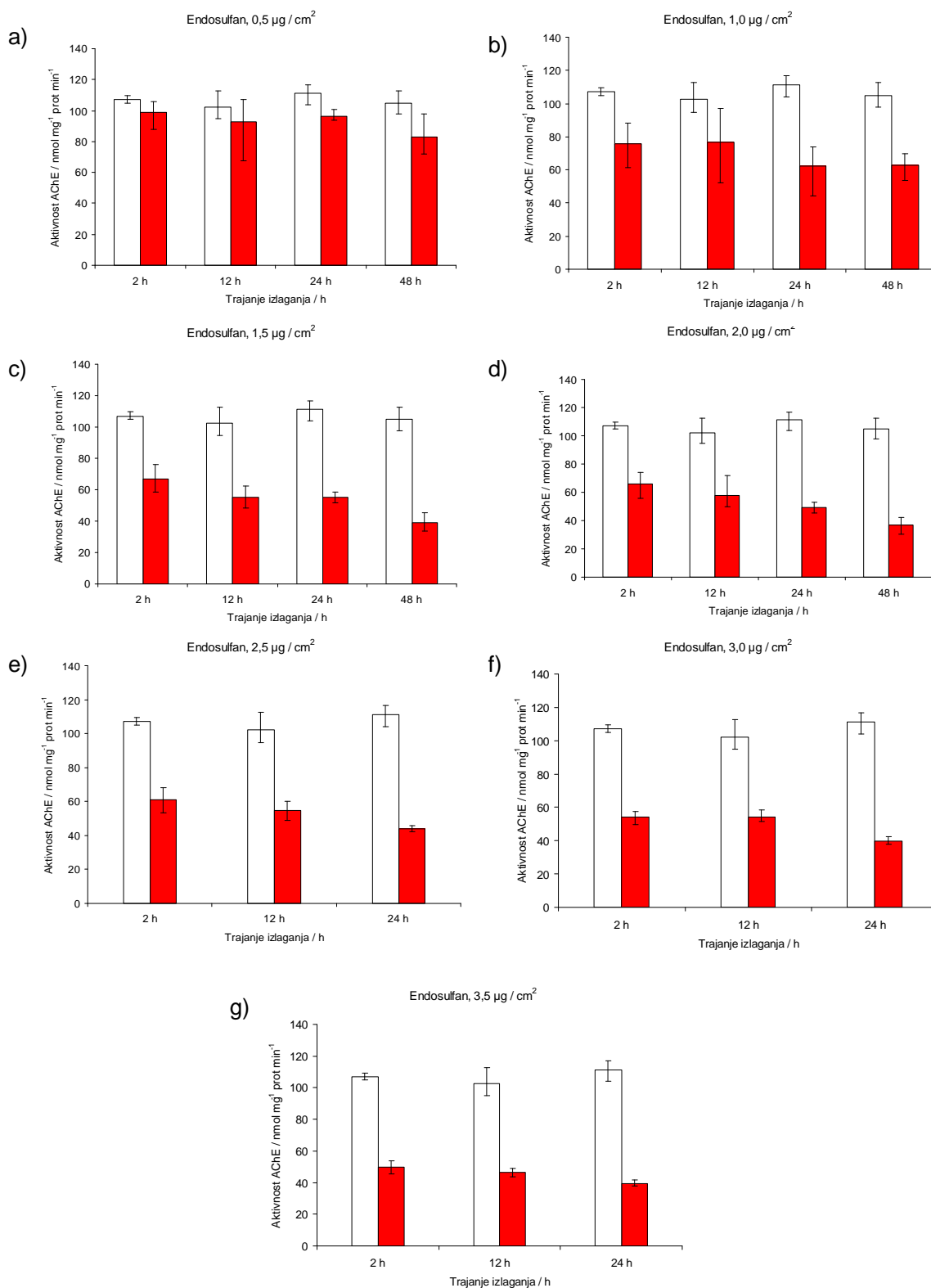


22). Statistički značajno povećanje aktivnosti GST zabilježeno je nakon 48 h izlaganja kod koncentracija 1,0, 1,5, 2,0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Slika 22 b, c, d), te nakon 24 h kod koncentracija 2,5, 3,0 i 3,5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Slika 22 e, f, g). Najveća izmjerena aktivnost GST od 682  $\text{nmol mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$  izmjerena je nakon 48 h izlaganja pri koncentraciji endosulfana od 2,0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , dok je u kontroli nakon 48 h ona iznosila 258,9  $\text{nmol mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$ .

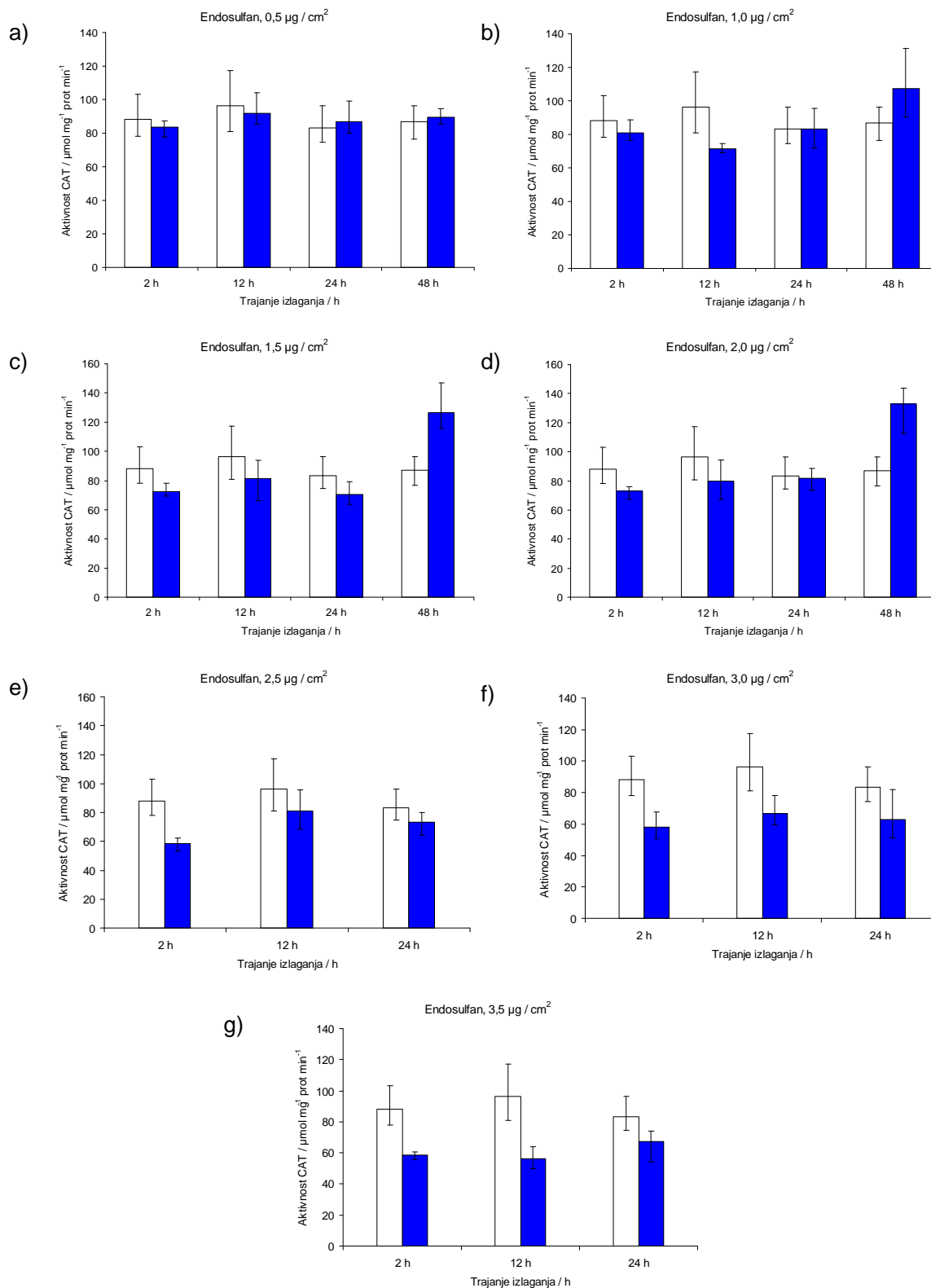
Na trodimenzionalnim prikazima relativnih aktivnosti enzima AChE, CAT i GST u ovisnosti o koncentraciji endosulfana ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) i trajanju izlaganja (h) bolje se uočavaju navedene promjene. Na grafičkim prikazima vidljivo je da se aktivnost AChE smanjuje povećanjem koncentracije endosulfana i povećanjem vremena izlaganja (Slika 23 a). Najveće smanjenje aktivnosti AChE, 2,85 puta u odnosu na kontrolu, zabilježeno je pri najvećoj koncentraciji endosulfana (3,5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) i 48 h izlaganja.

Aktivnost CAT najprije pada s povećanjem koncentracije endosulfana i trajanjem izlaganja, a zatim nakon 48 h dolazi do povećanja aktivnosti CAT (Slika 23 c, d). Najveća aktivnost CAT, 1,53 puta u odnosu na kontrolu, izmjerena je pri konc. endosulfana 2,0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  i pri vremenu izlaganja od 48 sati.

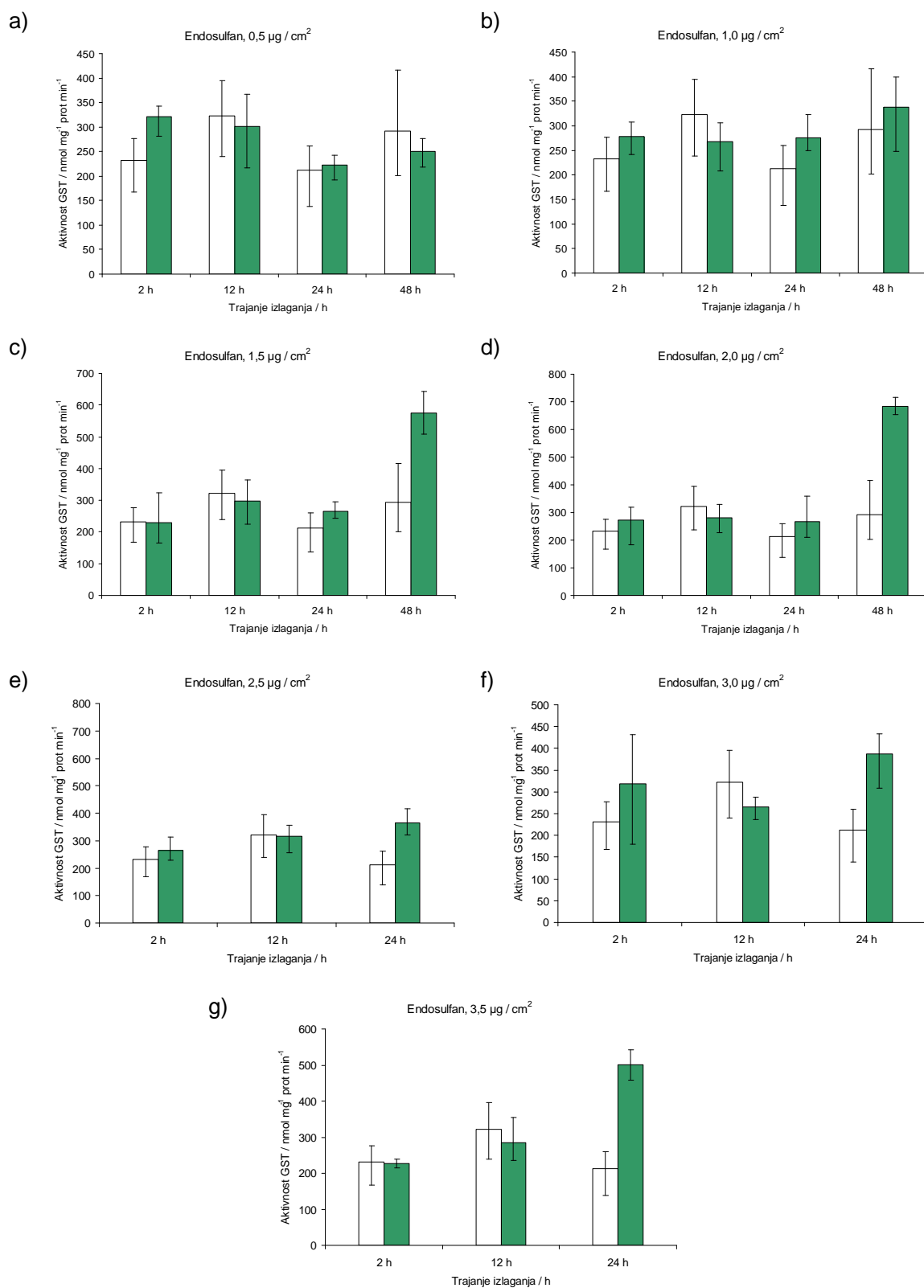
Nije zabilježena statistički značajna promjena u aktivnosti GST nakon 2 i 12 h niti kod jedne koncentracije. Nakon 48 h dolazi do statistički značajnog povećanja aktivnosti GST u odnosu na kontrolu kod nižih koncentracija endosulfana (Slika 22 c, b), dok kod viših koncentracija endosulfana dolazi do statistički značajnog povećanja aktivnosti GST nakon 48 h (Slika 22 e, f, g).



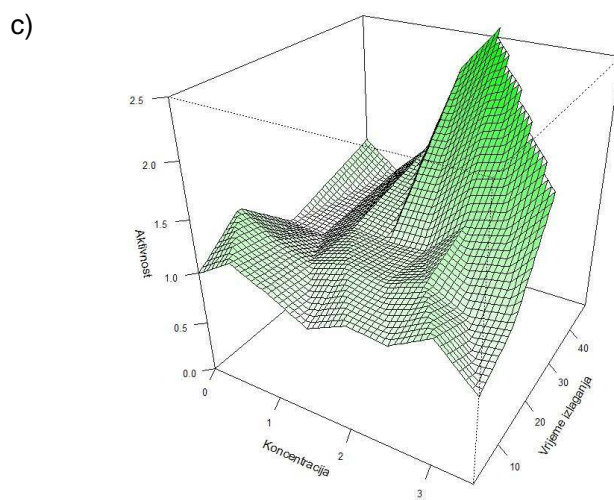
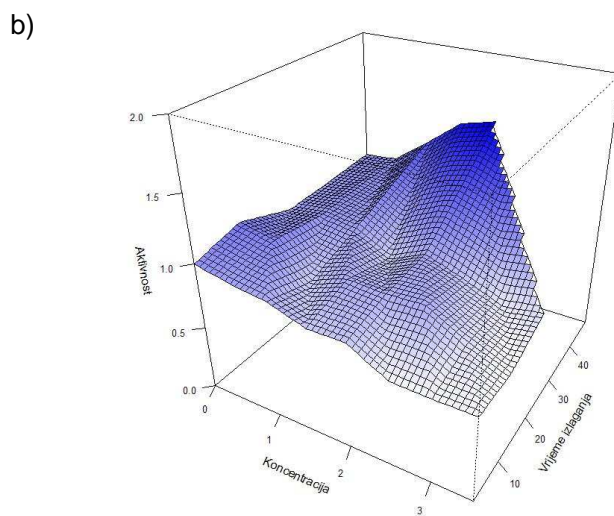
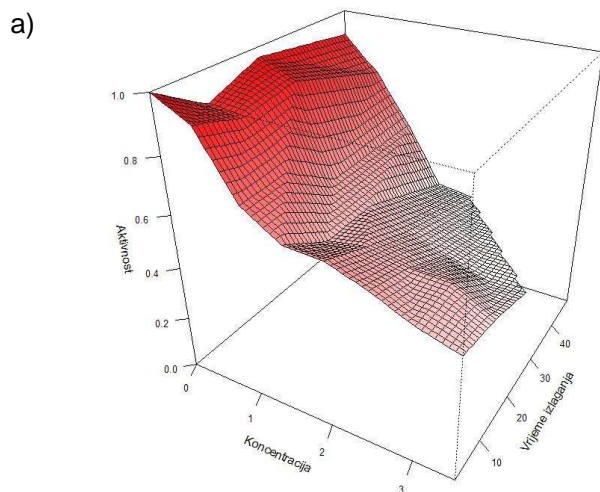
**Slika 20.** Aktivnost AChE pri istim koncentracijama endosulfana: a) 0,5 µg/cm<sup>2</sup>, b) 1,0 µg/cm<sup>2</sup>, c) 1,5 µg/cm<sup>2</sup>, d) 2,0 µg/cm<sup>2</sup>, e) 2,5 µg/cm<sup>2</sup>, f) 3,0 µg/cm<sup>2</sup>, g) 3,5 µg/cm<sup>2</sup> prikazana u četiri različita vremena izlaganja 2, 12, 24, 48 h.



**Slika 21.** Aktivnost CAT pri istim koncentracijama endosulfana: a)  $0,5 \mu\text{g/cm}^2$ , b)  $1,0 \mu\text{g/cm}^2$ , c)  $1,5 \mu\text{g/cm}^2$ , d)  $2,0 \mu\text{g/cm}^2$ , e)  $2,5 \mu\text{g/cm}^2$ , f)  $3,0 \mu\text{g/cm}^2$ , g)  $3,5 \mu\text{g/cm}^2$  prikazana u četiri različita vremena izlaganja 2, 12, 24, 48 h.



**Slika 22.** Aktivnost GST pri istim koncentracijama endosulfana: a) 0,5 µg/cm<sup>2</sup>, b) 1,0 µg/cm<sup>2</sup>, c) 1,5 µg/cm<sup>2</sup>, d) 2,0 µg/cm<sup>2</sup>, e) 2,5 µg/cm<sup>2</sup>, f) 3,0 µg/cm<sup>2</sup>, g) 3,5 µg/cm<sup>2</sup> prikazana u četiri različita vremena izlaganja 2, 12, 24, 48 h.



**Slika 23.** Trodimenzionalni prikaz relativnih aktivnosti a) AChE, b) CAT i c) GST u ovisnosti o koncentraciji endosulfana ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) i trajanju izlaganja (h).

#### 4.1.2. Aktivnost AChE, CAT i GST u S9 frakciji homogenata gujavica nakon 2, 12, 24 i 48 sati izlaganja temefosu

Rezultati mjerenja aktivnosti AChE, CAT i GST u S9 frakciji homogenata gujavica nakon 2, 12, 24 i 48 h izlaganja temefosu pri koncentracijama 0,5, 1, 1,5, 2,0, 2,5 i 3,0 i 3,5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  prikazani su na Slikama 24–26.

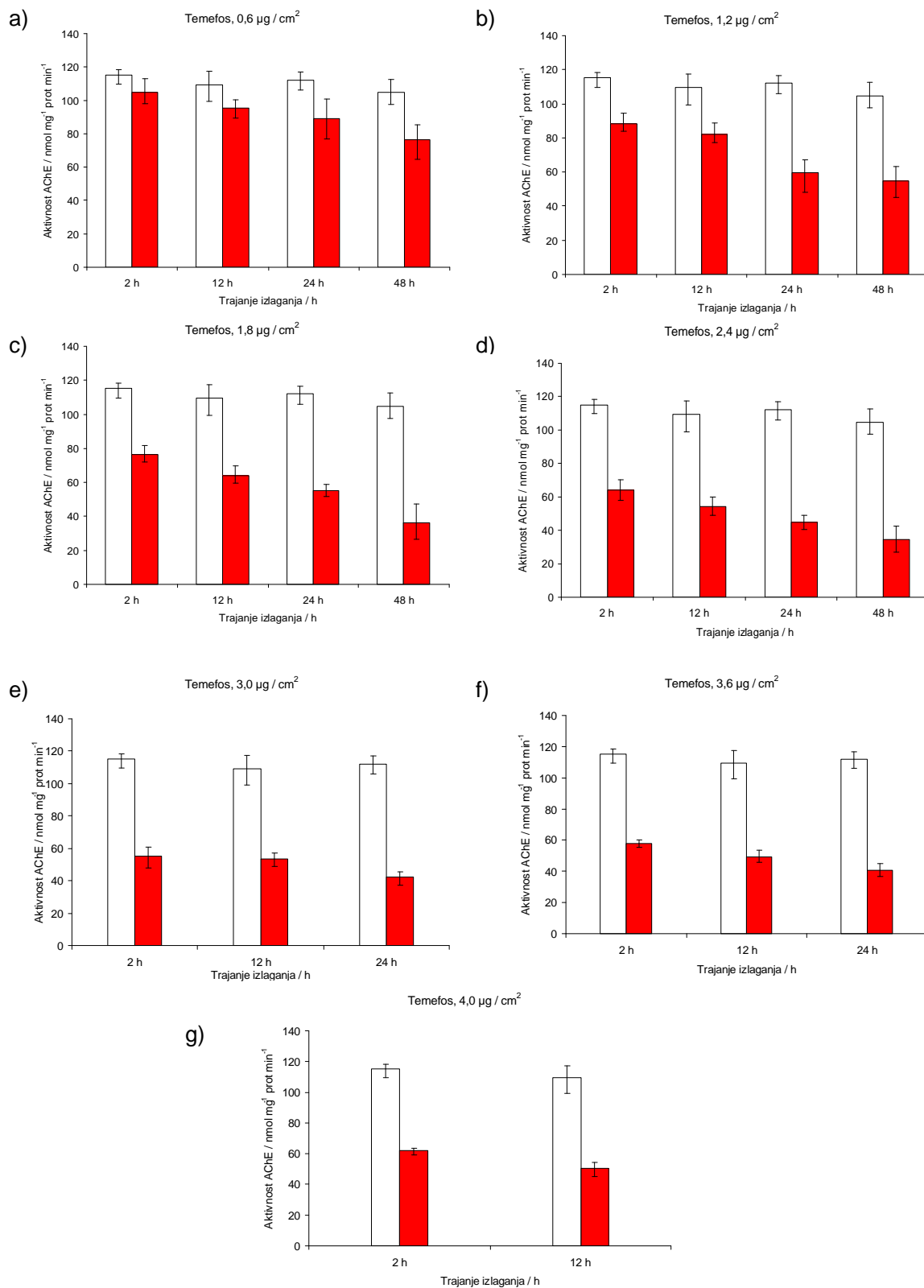
Aktivnost AChE nakon izlaganja temefosu u izmjerenim uzorcima kontinuirano se smanjivala povećanjem koncentracije temefosa, a unutar iste koncentracije smanjivala se s povećanjem trajanja izlaganja (Slika 24). Aktivnost AChE u kontroli nakon 2 h iznosila je 117,6  $\text{nmol mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$  i nije se značajno mijenjala nakon 2, 12, 24 i 48 h (Slika 24 a). Najmanja aktivnost AChE (34,5  $\text{nmol mg prot min}^{-1}$ ) zabilježena je nakon 48 h kod koncentracije 2,4  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , što je u odnosu na kontrolu smanjenje od 3,3 puta (Slika 24 d).

Aktivnost CAT nije se statistički značajno promijenila nakon 2 h kod nijedne koncentracije temefosa 0,6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Slika 25 a, b, c, d, e, f). Nakon 12 h pri koncentraciji temefosa od 1,2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  izmjerena je aktivnost CAT od 71,4  $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$  (Slika 25 b), što je u odnosu na kontrolu (96,2  $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$ ) smanjenje od 1,3 puta. Nakon početnog smanjenja, aktivnost CAT raste s povećanjem trajanja izlaganja (Slika 25 b). Najmanja vrijednost aktivnosti CAT izmjerena je nakon 12 h (56,0  $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$ ) kod koncentracije temefosa 4,0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Slika 25 g), dok je najveća vrijednost aktivnosti CAT izmjerena nakon 48 h (153,7  $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$ ) kod koncentracije 2,4  $\mu\text{g} / \text{cm}^2$  (Slika 25 d).

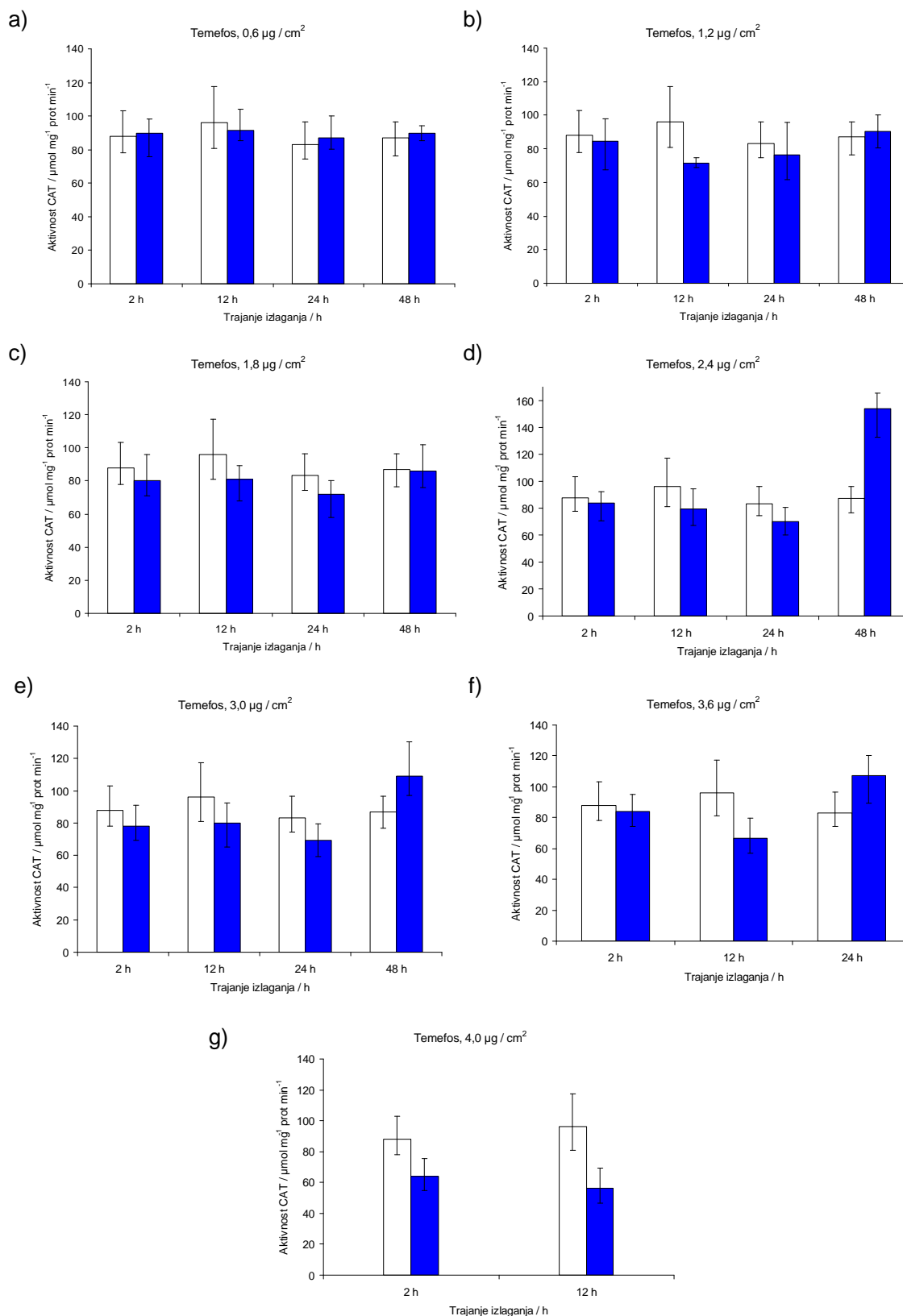
Nije zabilježena statistički značajna promjena u aktivnosti GST u odnosu na kontrolu, iako je nakon 48 h pokazivala tendenciju povećanja (Slika 26 e, f).

Aktivnost AChE, CAT i GST nakon 12, 24 i 48 h pri koncentraciji temefosa 4,0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , te nakon 48 h pri koncentracijama temefosa 3,0, 3,6, i 4,0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  nije bilo moguće izmjeriti zbog ugibanja organizama.

Trodimenzionalni prikaz relativnih aktivnosti AChE, CAT i GST u ovisnosti o koncentraciji temefosa i vremenu izlaganja prikazan je na Slici 27. Jasno je vidljivo da tijekom vremena i s povećanjem koncentracije temefosa dolazi do pada aktivnosti AChE (Slika 27 a). U slučaju CAT vidljiva je početna smanjena aktivnost da bi nakon 48 h njena aktivnost značajno porasla (Slika 27 b). U slučaju GST aktivnost nije kontinuirana tijekom vremena, ali je vidljivo da u prvim satima izlaganja dolazi do njenog povećanja kod većine koncentracija, da bi s trajanjem izlaganja njena aktivnost padala (Slika 27 c).

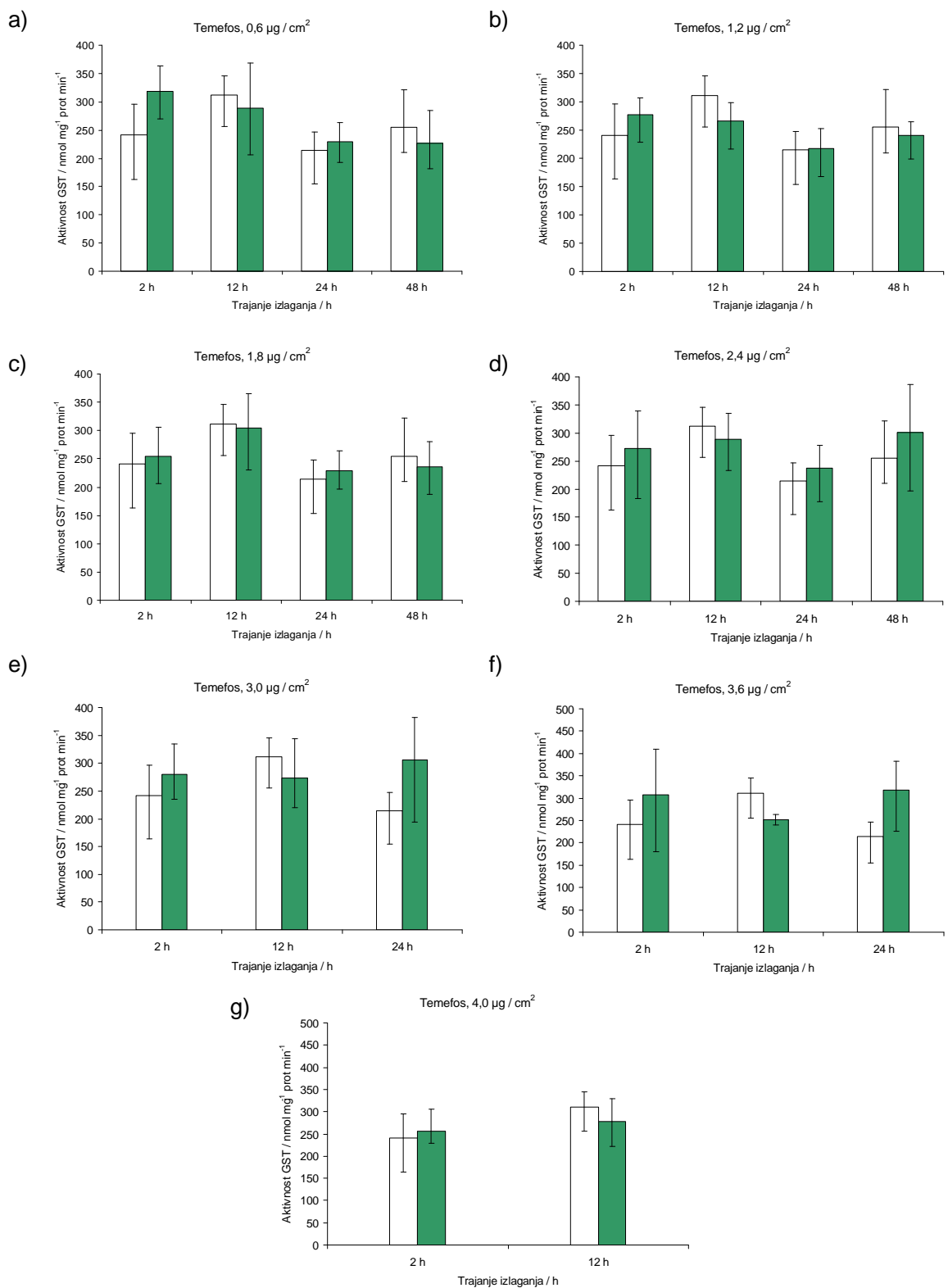


**Slika 24.** Aktivnost AChE pri istim koncentracijama temefosa: a) 0,6 µg/cm<sup>2</sup>, b) 1,2 µg/cm<sup>2</sup>, c) 1,8 µg/cm<sup>2</sup>, d) 2,4 µg/cm<sup>2</sup>, e) 3,0 µg/cm<sup>2</sup>, f) µg/cm<sup>2</sup>, g) 4 µg/cm<sup>2</sup> prikazana u četiri različita vremena izlaganja 2, 12, 24, 48 h.

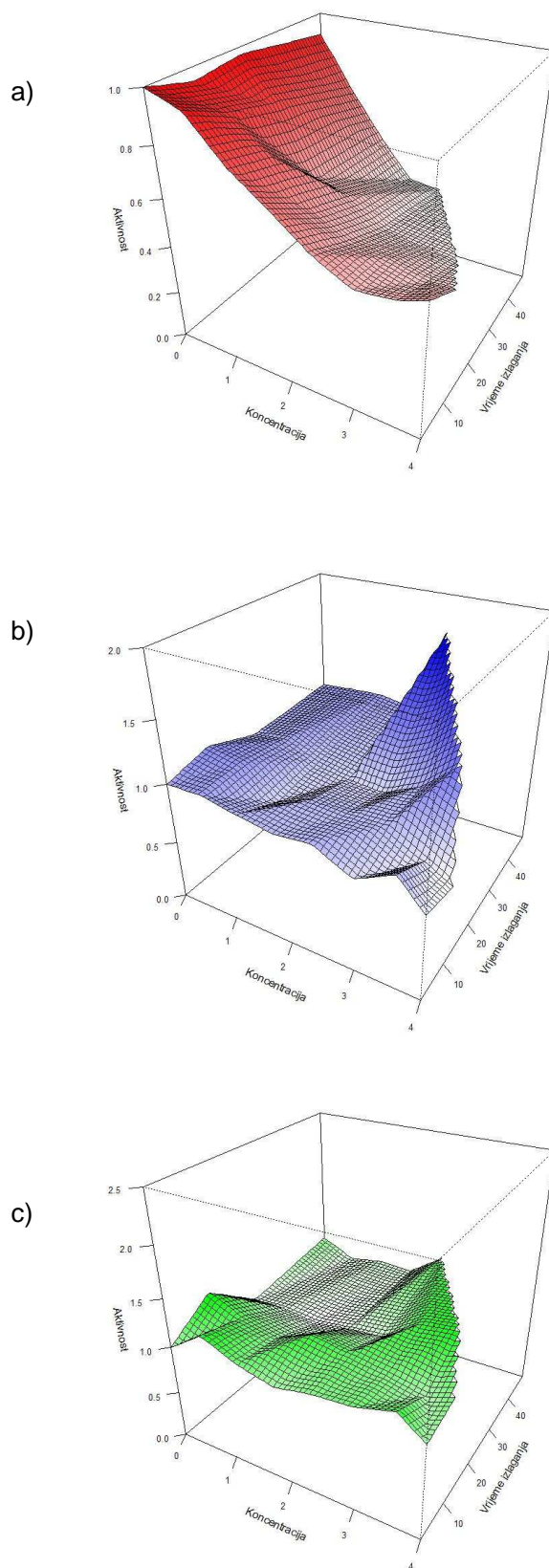


**Slika 25.** Aktivnost CAT pri istim koncentracijama temefosa: a)  $0,6 \mu\text{g/cm}^2$ , b)  $1,2 \mu\text{g/cm}^2$ , c)  $1,8 \mu\text{g/cm}^2$ , d)  $2,4 \mu\text{g/cm}^2$ , e)  $3,0 \mu\text{g/cm}^2$ , f)  $3,6 \mu\text{g/cm}^2$ , g)  $4,0 \mu\text{g/cm}^2$  prikazana u četiri različita vremena izlaganja 2, 12, 24, 48 h.





**Slika 26.** Aktivnost GST pri istim koncentracijama temefosa: a) 0,6 µg/cm<sup>2</sup>, b) 1,2 µg/cm<sup>2</sup>, c) 1,8 µg/cm<sup>2</sup>, d) 2,4 µg/cm<sup>2</sup>, e) 3,0 µg/cm<sup>2</sup>, f) 3,6 µg/cm<sup>2</sup>, g) 4,0 µg/cm<sup>2</sup> prikazana u četiri različita vremena izlaganja 2, 12, 24, 48 h.



**Slika 27.** Trodimenzionalni prikaz relativnih aktivnosti a) AChE, b) CAT i c) GST u ovisnosti o koncentraciji temefosa ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) i trajanju izlaganja (h).

#### 4.1.3. Aktivnost AChE, CAT i GST u S9 frakciji homogenata gujavica nakon 2, 12, 24 i 48 sati izlaganja malationu

Rezultati mjerenja aktivnosti AChE, CAT i GST u S9 frakciji homogenata gujavica nakon 2, 12, 24 i 48 h izlaganja malationu pri koncentracijama 10,0, 20,0, 30,0, 40,0, 50,0 i 3,0 i 60,0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  prikazani su na Slici 28–30.

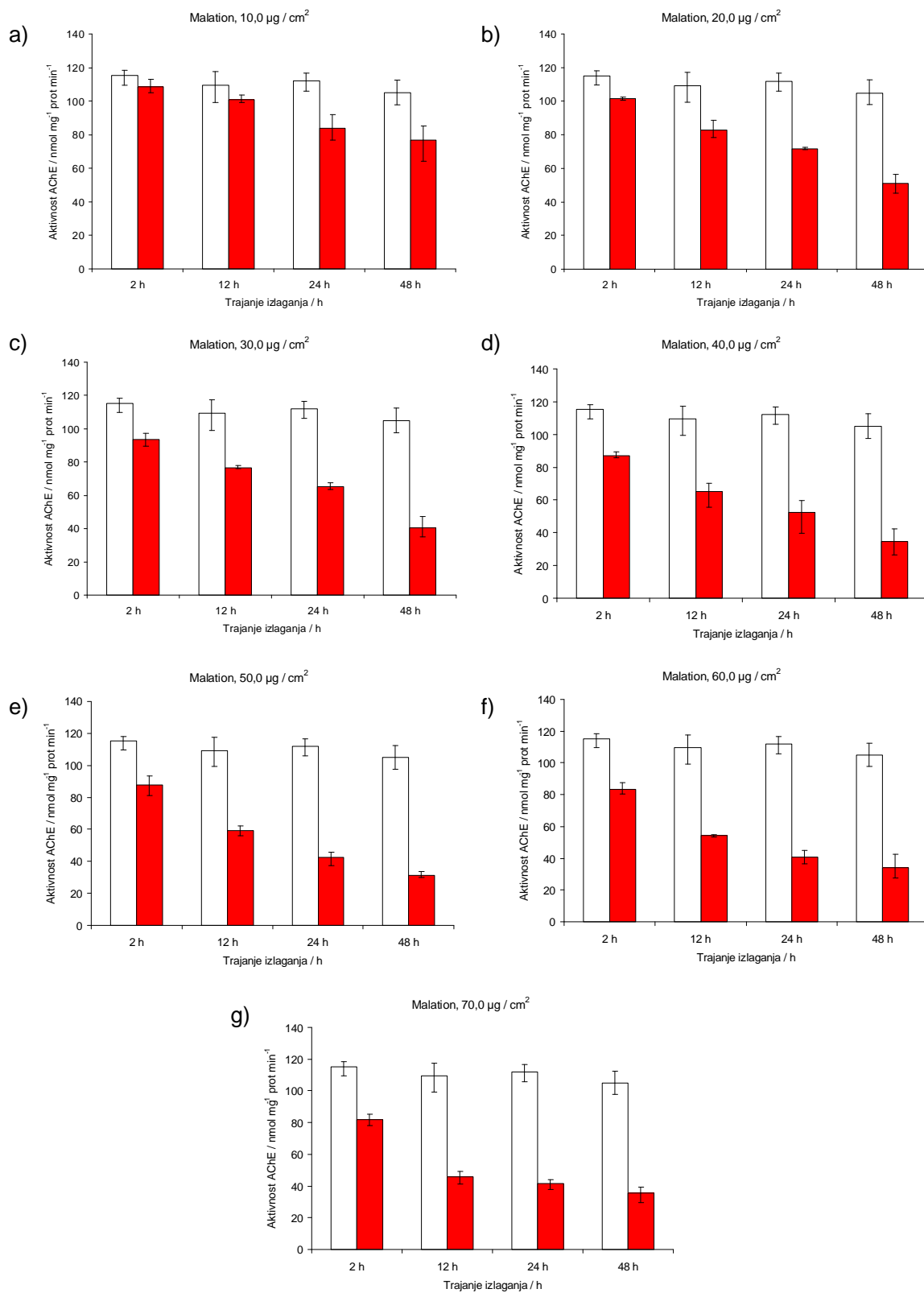
Aktivnost AChE nakon izlaganja malationu u izmjerenim uzorcima kontinuirano se smanjivala s povećanjem koncentracije malationa, a unutar iste koncentracije smanjivala se s povećanjem trajanja izlaganja (Slika 28). U kontroli je najveća izmjerena aktivnost AChE iznosila 115,2  $\text{nmol mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$ . Najveći pad aktivnosti AChE izmjeren je nakon 48 h kod koncentracije malationa od 50  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Slika 28 e), a iznosila je 31,5  $\text{nmol mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$  što je pad u odnosu na kontrolu od 3,3 puta.

Aktivnost CAT se nakon 2 h pri svim koncentracijama značajno smanjila u odnosu na kontrolu, ali nakon 12, 24 i 48 h njena vrijednost se postupno povećavala (Slika 29 e, f, g). Najveće povećanje aktivnosti CAT zabilježeno je pri 48 h izlaganja kod koncentracije 70  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (167,7  $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$ ), pri čemu se aktivnost povećala za 1,9 puta u odnosu na kontrolu (Slika 29 g). Najniža vrijednost CAT izmjerena je kod koncentracije malationa 50  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  nakon 2 h izlaganja i iznosila je 64,6  $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$ .

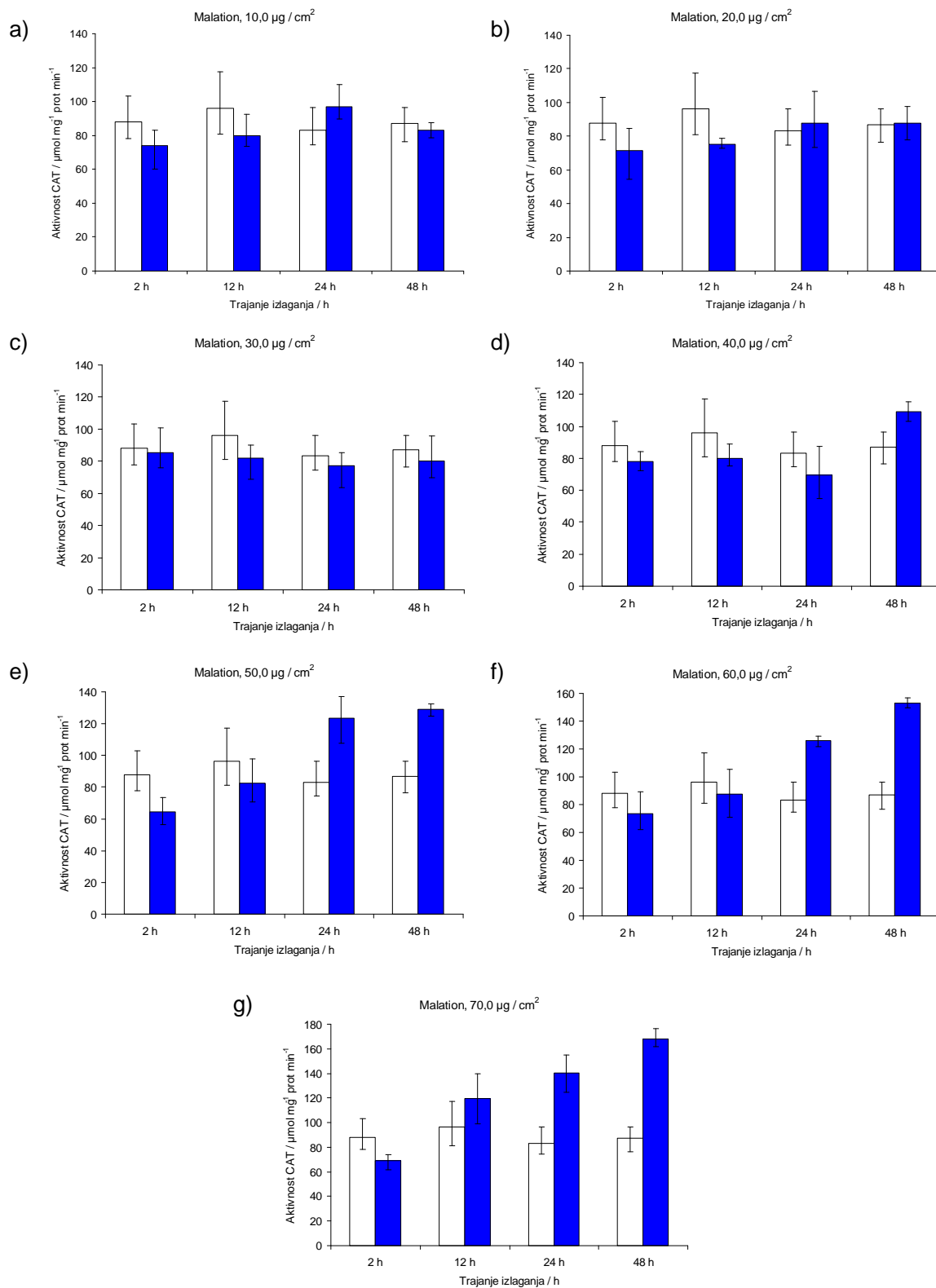
Aktivnost GST nakon izlaganja malationu kontinuirano se povećavala s povećanjem koncentracije, a unutar iste koncentracije povećavala se s povećanjem trajanja izlaganja (Slika 30). Najveće povećanje aktivnosti GST (447,1  $\text{nmol mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$ ) u odnosu na kontrolu (228,1  $\text{nmol mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$ ) izmjereno je pri koncentraciji malationa 30  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  i 48 h izlaganja, što je povećanje za 2 puta.

Trodimenzionalni prikaz relativnih aktivnosti AChE, CAT i GST u ovisnosti o koncentraciji malationa i trajanju izlaganja prikazan je na Slici 31. Na grafičkom prikazu jasno je vidljivo da tijekom vremena i s povećanjem koncentracije malationa dolazi do smanjenja aktivnosti AChE (Slika 31 a). Aktivnost CAT se povećava povećanjem koncentracije malationa i povećanjem trajanja izlaganja (Slika 31 b). Naglo povećanje aktivnosti CAT počinje pri koncentracijama malationa većim od 30  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , te aktivnost ubrzano raste povećanjem vremena izlaganja.

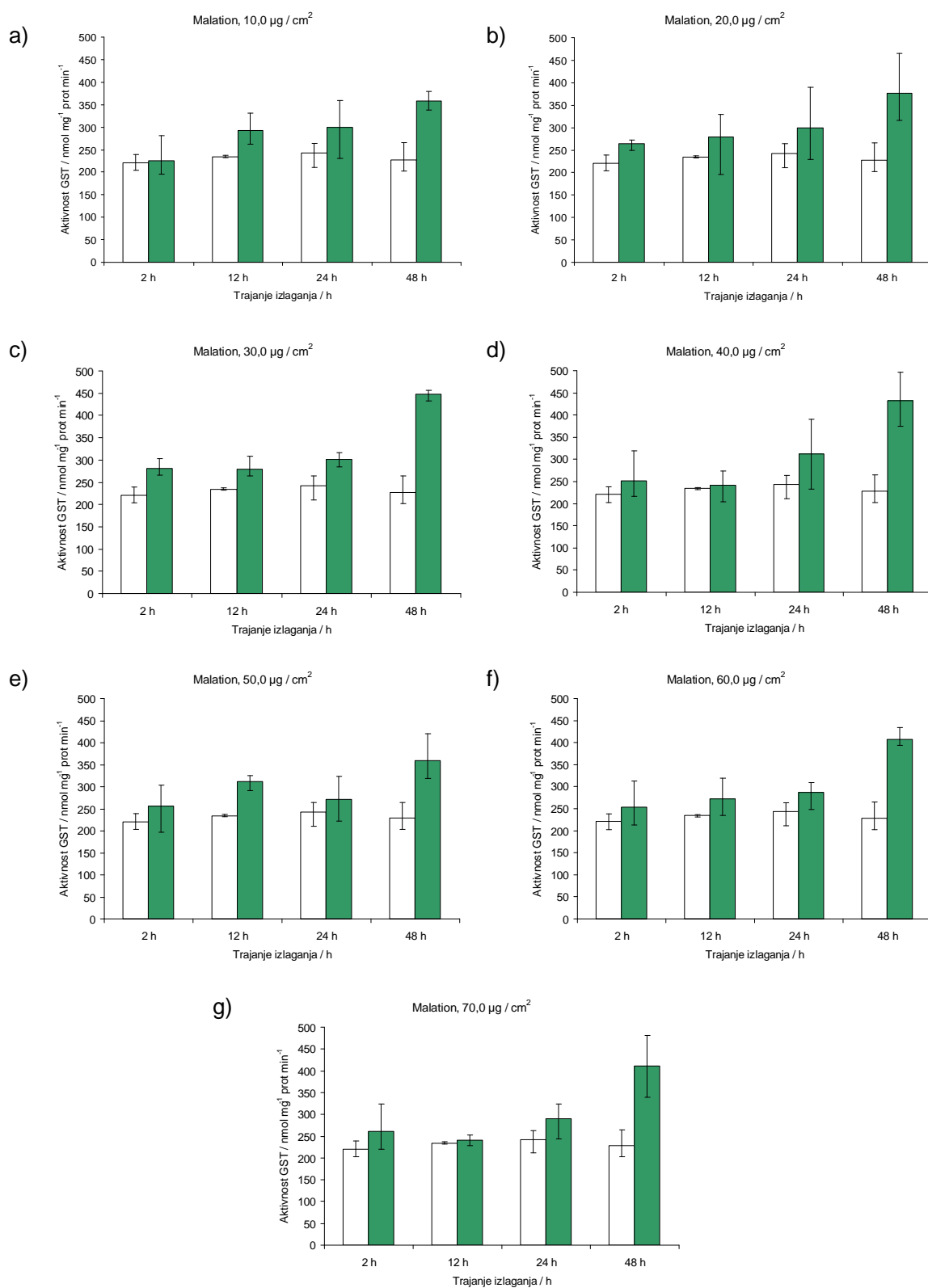
Aktivnost GST povećava se trajanjem vremena izlaganja pri svim koncentracijama malationa (Slika 31 c).



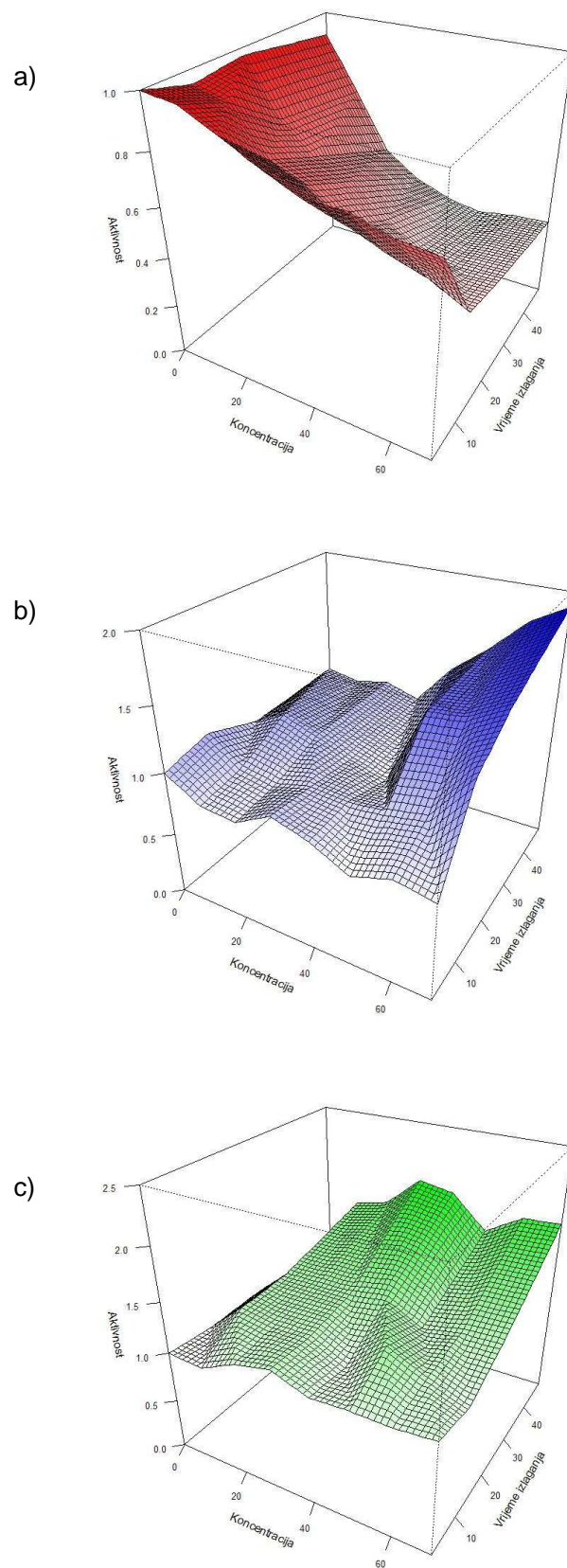
**Slika 28.** Aktivnost AChE pri istim koncentracijama malationa: a) 10,0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , b) 20,0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , c) 30,0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , d) 40,0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , e) 50,0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , f) 60,0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , g) 70,0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  prikazana u četiri različita vremena izlaganja 2, 12, 24, 48 h.



**Slika 29.** Aktivnost CAT pri istim koncentracijama malationa: a) 10,0 µg/cm<sup>2</sup>, b) 20,0 µg/cm<sup>2</sup>, c) 30,0 µg/cm<sup>2</sup>, d) 40,0 µg/cm<sup>2</sup>, e) 50,0 µg/cm<sup>2</sup>, f) 60,0 µg/cm<sup>2</sup>, g) 70,0 µg/cm<sup>2</sup> prikazana u četiri različita vremena izlaganja 2, 12, 24, 48 h.



**Slika 30.** Aktivnost GST pri istim koncentracijama malationa: a) 10,0 µg/cm<sup>2</sup>, b) 20,0 µg/cm<sup>2</sup>, c) 30,0 µg/cm<sup>2</sup>, d) 40,0 µg/cm<sup>2</sup>, e) 50,0 µg/cm<sup>2</sup>, f) 60,0 µg/cm<sup>2</sup>, g) 70,0 µg/cm<sup>2</sup> prikazana u četiri različita vremena izlaganja 2, 12, 24, 48 h.



**Slika 31.** Trodimenzionalni prikaz relativnih aktivnosti a) AChE, b) CAT i c) GST u ovisnosti o koncentraciji malationa ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) i trajanju izlaganja (h).

#### 4.1.4. Aktivnost AChE, CAT i GST u S9 frakciji homogenata gujavica nakon 2, 12, 24 i 48 sati izlaganja pirimifosmetilu

Rezultati mjerenja aktivnosti AChE, CAT i GST u S9 frakciji homogenata gujavica nakon 2, 12, 24 i 48 h izlaganja pirimifosmetilu pri koncentracijama 12,0, 24,0, 36,0, 48,0, 60,0 i 72,0 i 84,0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  prikazani su na Slici 32–34.

Pri najmanjoj koncentraciji pirimifosmetila 12  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  nije došlo do značajne razlike u aktivnosti AChE u odnosu na kontrolu nakon 2, 12, i 24 h, dok se aktivnost statistički značajno smanjila nakon 48 h, pri čemu je smanjenje u odnosu na kontrolu iznosilo 1,3 puta (Slika 32 a). Do najvećeg smanjenja aktivnosti došlo je pri najvećoj koncentraciji pirimifosmetila (84  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) nakon 48 h, pri čemu je aktivnost AChE iznosila 35,4  $\text{nmol mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$  (Slika 32 g) dok je u kontroli zabilježena aktivnost od 104,8, te stoga najveće smanjenje aktivnosti u odnosu na kontrolu iznosi 2,96 puta.

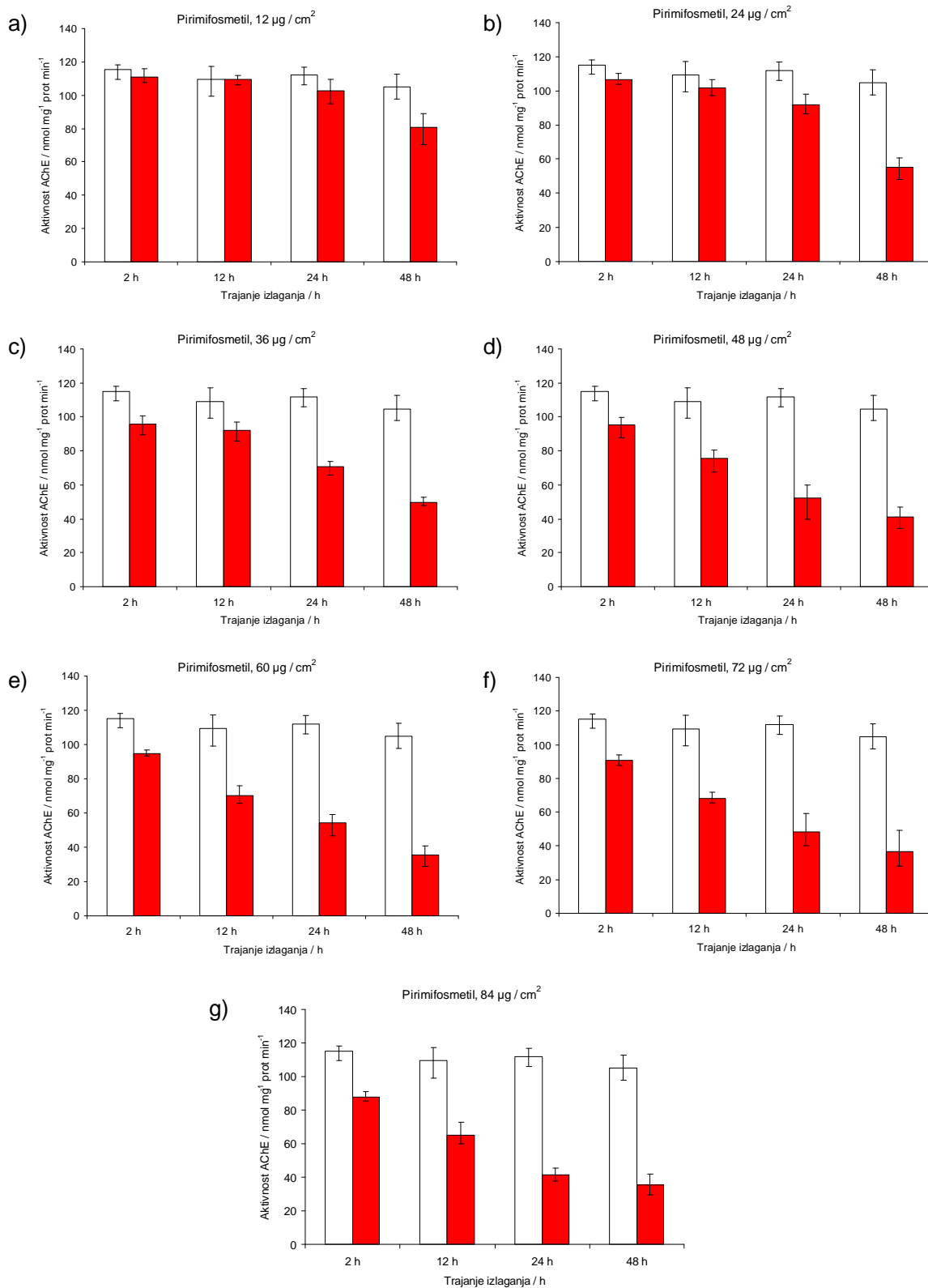
Nakon 2 i 12 h izlaganja došlo je do smanjenja aktivnosti CAT pri svim koncentracijama pirimifosmetila, no nakon 24 i 48 h aktivnost CAT raste (Slika 33 d, e, f, g). Najveće smanjenje aktivnosti u odnosu na kontrolu zabilježeno je nakon 2 h izlaganja kod koncentracije pirimifosmetila 72  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  gdje je aktivnost CAT iznosila 66,6  $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$ , što je smanjenje od 1,3 puta u odnosu na kontrolu, kod koje je aktivnost iznosila 88  $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$  (Slika 33 f).

Aktivnost GST pri najmanjoj koncentraciji pirimifosmetila nije pokazala značajnu razliku u odnosu na kontrolu tijekom vremena, dok je kod svih ostalih koncentracija aktivnost postupno rasla s povećanjem trajanja izlaganja. Najveće povećanje aktivnosti zabilježeno je nakon 48 h izlaganja kod koncentracije 72  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , gdje je izmjerena aktivnost GST iznosila 485,2  $\text{nmol mg prot min}^{-1}$  (Slika 34), što je povećanje od 1,91 puta u odnosu na kontrolu u kojoj je izmjerena aktivnost GST iznosila 245,2  $\text{nmol mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$ .

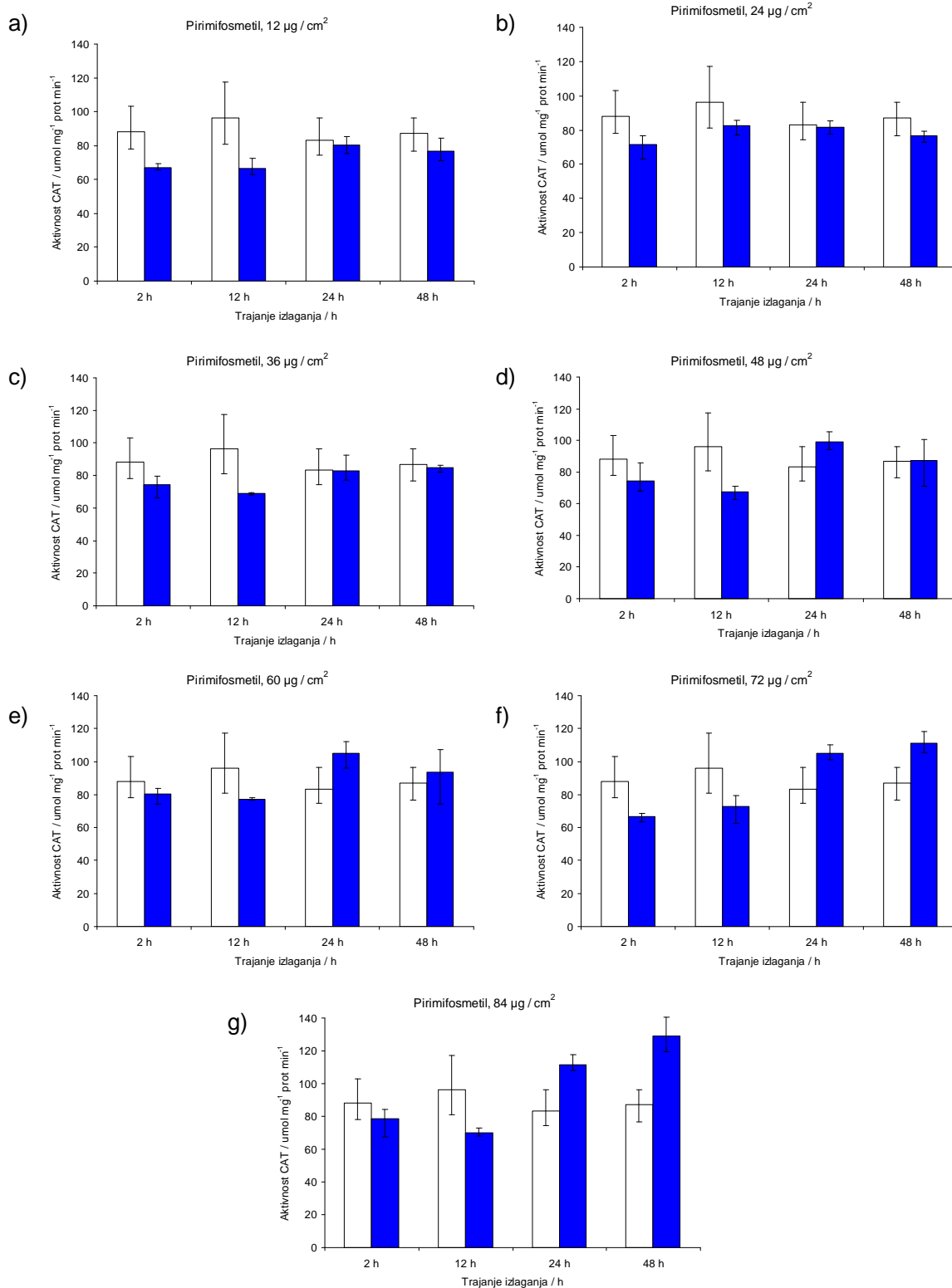
Trodimenzionalni prikaz relativnih aktivnosti AChE, CAT i GST u ovisnosti o koncentraciji pirimifosmetila i trajanju izlaganja prikazan je na Slici 35. Jasno je vidljivo da tijekom vremena i s povećanjem koncentracije pirimifosmetila dolazi do smanjenja aktivnosti AChE (Slika 35 a). Aktivnost CAT se kontinuirano povećava povećanjem koncentracije pirimifosmetila i trajanjem izlaganja (Slika 35 b).

Aktivnost GST kontinuirano se povećavala povećanjem koncentracije pirimifosmetila i trajanjem izlaganja (Slika 35 c).

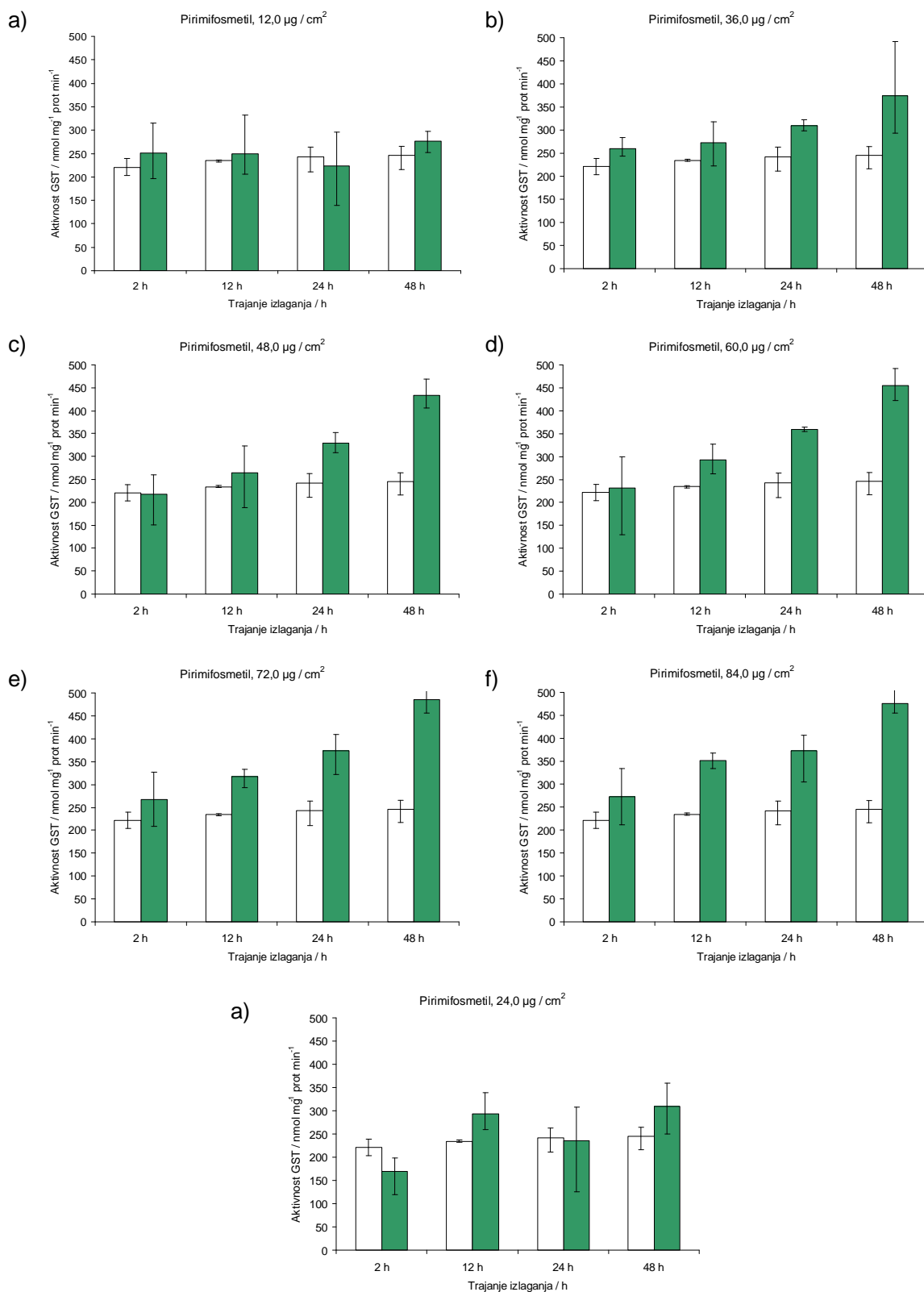




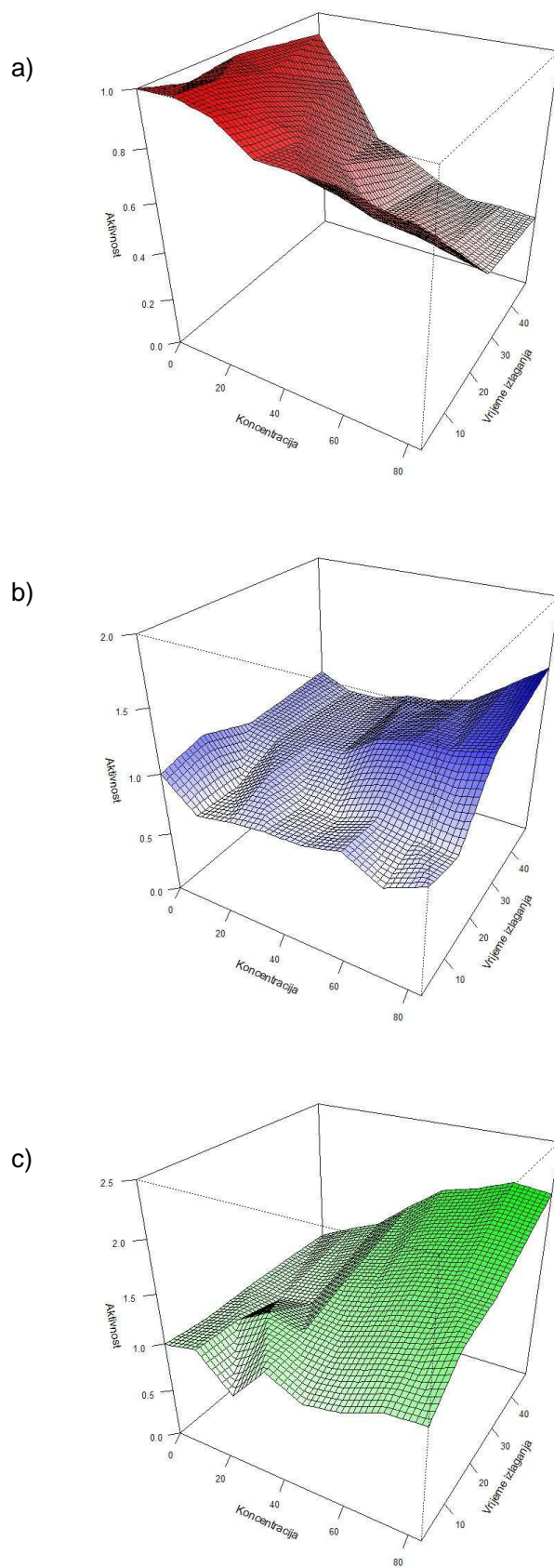
**Slika 32.** Aktivnost AChE pri istim koncentracijama pirimifosmetila: a) 12,0 µg/cm<sup>2</sup>, b) 24,0 µg/cm<sup>2</sup>, c) 36,0 µg/cm<sup>2</sup>, d) 48,0 µg/cm<sup>2</sup>, e) 60,0 µg/cm<sup>2</sup>, f) 72,0 µg/cm<sup>2</sup>, g) 84,0 µg/cm<sup>2</sup> prikazana u četiri različita vremena izlaganja 2, 12, 24, 48 h.



**Slika 33.** Aktivnost CAT pri istim koncentracijama pirimifosmetila: a) 12,0 µg/cm<sup>2</sup>, b) 24,0 µg/cm<sup>2</sup>, c) 36,0 µg/cm<sup>2</sup>, d) 48,0 µg/cm<sup>2</sup>, e) 60,0 µg/cm<sup>2</sup>, f) 72,0 µg/cm<sup>2</sup>, g) 84,0 µg/cm<sup>2</sup> prikazana u četiri različita vremena izlaganja 2, 12, 24, 48 h.



**Slika 34.** Aktivnost GST pri istim koncentracijama pirimifosmetila: a) 12,0 µg cm<sup>-2</sup>, b) 24,0 µg cm<sup>-2</sup>, c) 36,0 µg cm<sup>-2</sup>, d) 48,0 µg cm<sup>-2</sup>, e) 60,0 µg cm<sup>-2</sup>, f) 72,0 µg cm<sup>-2</sup>, g) 84,0 µg cm<sup>-2</sup> prikazana u četiri različita vremena izlaganja 2, 12, 24, 48 h.



**Slika 35.** Trodimenzionalni prikaz relativnih aktivnosti a) AChE, b) CAT i c) GST u ovisnosti o koncentraciji pirimifosmetila ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) i trajanju izlaganja (h).

#### 4.1.5. Aktivnost AChE, CAT i GST u S9 frakciji homogenata gujavica nakon 2, 12, 24 i 48 sati izlaganja terbutilazinu

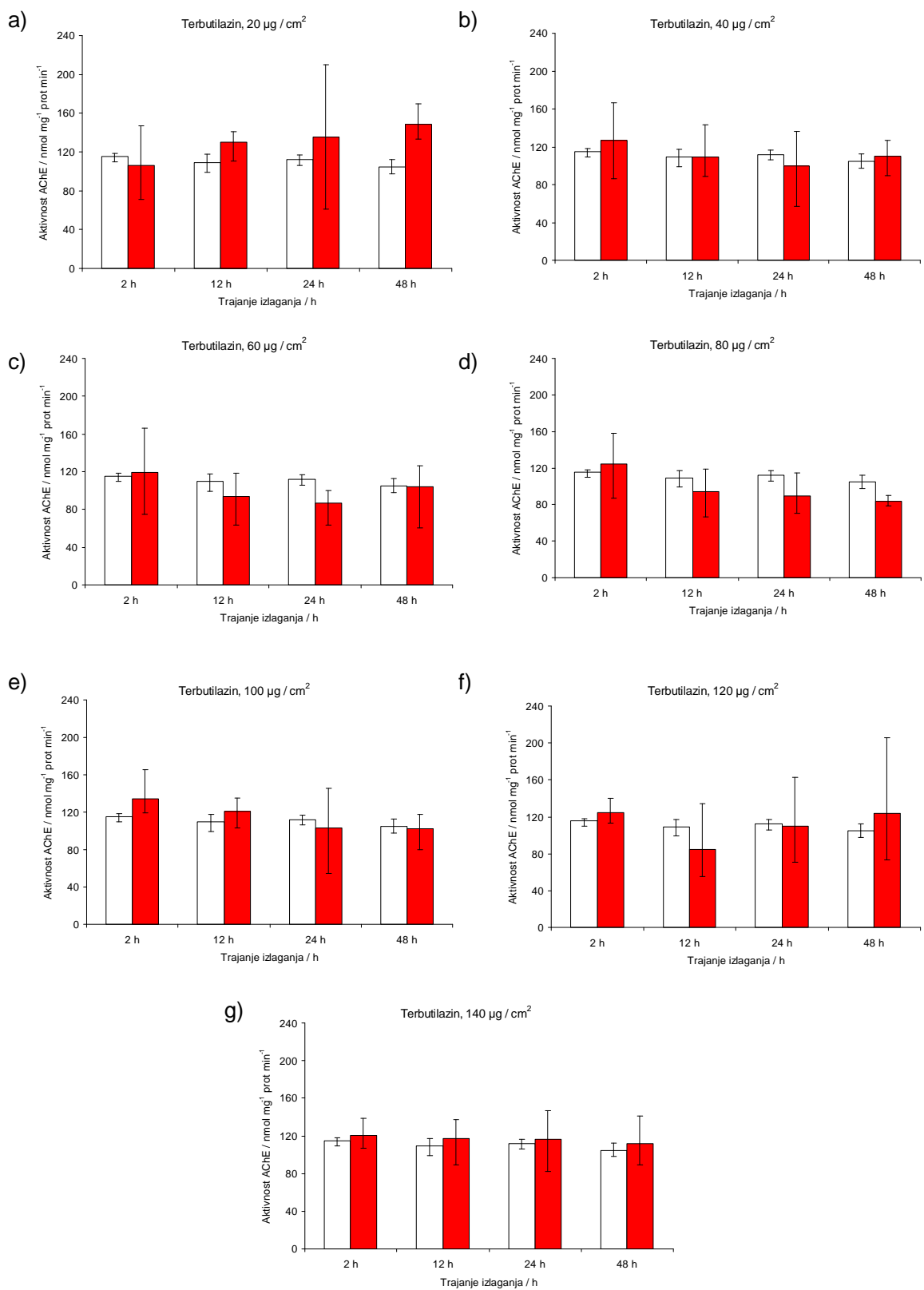
Rezultati mjerenja aktivnosti AChE, CAT i GST u S9 frakciji homogenata gujavica nakon 2, 12, 24 i 48 h izlaganja terbutilazinu pri koncentracijama 20, 40, 60, 80, 100, 120 i 140  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  prikazani su na Slici 36–38.

Tijekom izlaganja nije došlo do statistički značajne promjene u aktivnosti AChE nakon 2, 12, 24 h kod nijedne koncentracije terbutilazina (Slika 36 a, b, c, d, e, f, g), kao i nakon 48 h (Slika 36 b, c, e, f, g).

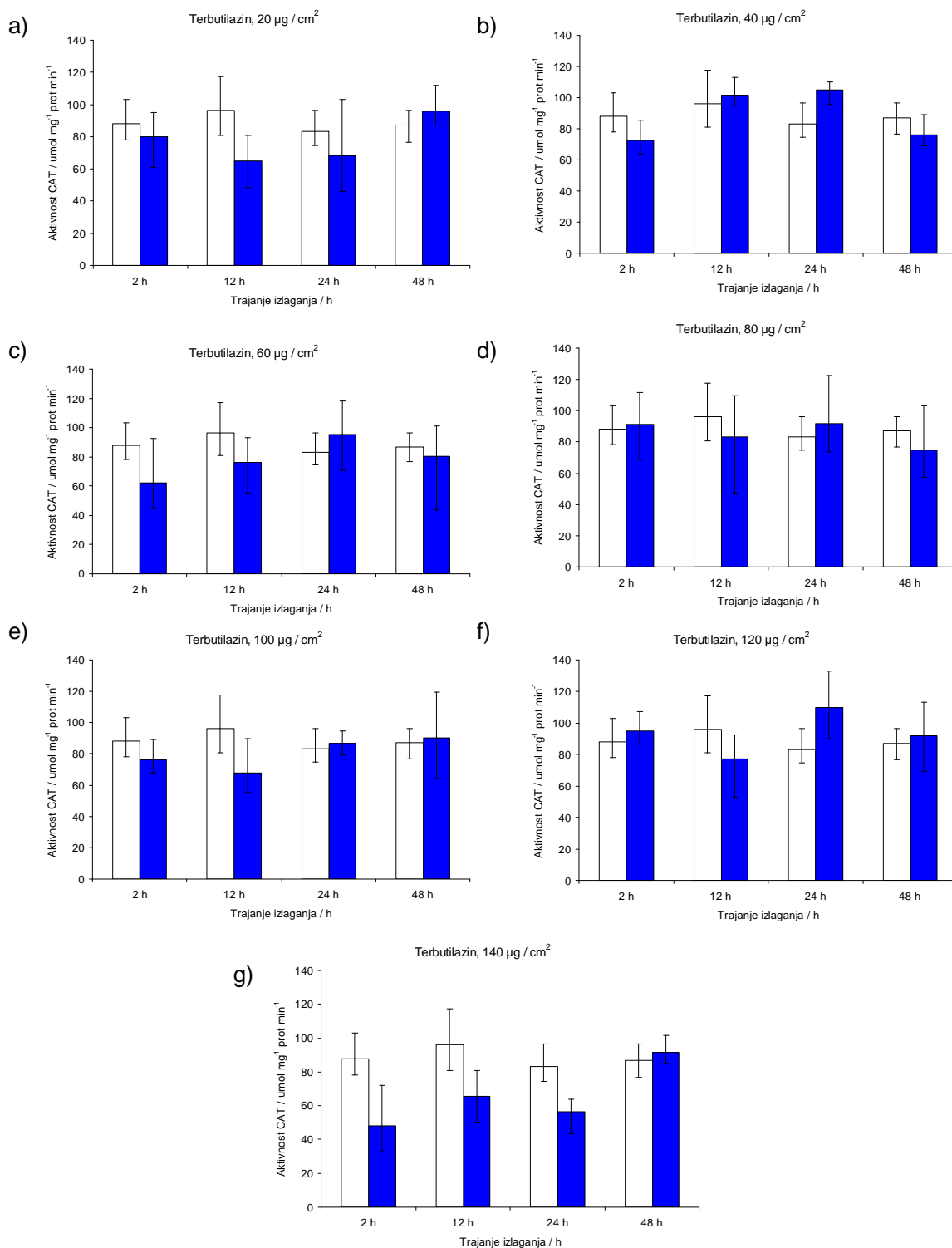
Aktivnost CAT je u početnim satima izlaganja pokazala tendenciju smanjivanja, pri čemu je najveće smanjenje zabilježeno nakon 2 h kod najveće koncentracije terbutilazina gdje je aktivnost CAT iznosila  $268,6 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$ , dok je aktivnost u kontroli iznosila  $241 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$ , što je smanjenje u odnosu na kontrolu od 1,1 puta. Najveće smanjenje aktivnosti CAT zabilježeno je kod najveće koncentracije terbutilazina ( $140 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) gdje je aktivnost CAT iznosila  $47,8 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$  što je smanjenje od 1,84 puta u odnosu na kontrolu nakon 2 h izlaganja. Aktivnost GST varirala je tijekom vremena i nije pokazivala značajnije razlike u odnosu na kontrolu.

Aktivnost GST varirala je tijekom vremena u svim ispitivanim koncentracijama, pri čemu je do značajnog povećanja aktivnosti došlo nakon 24 h kod koncentracija od 40 i  $60 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Slika 38 b, c).

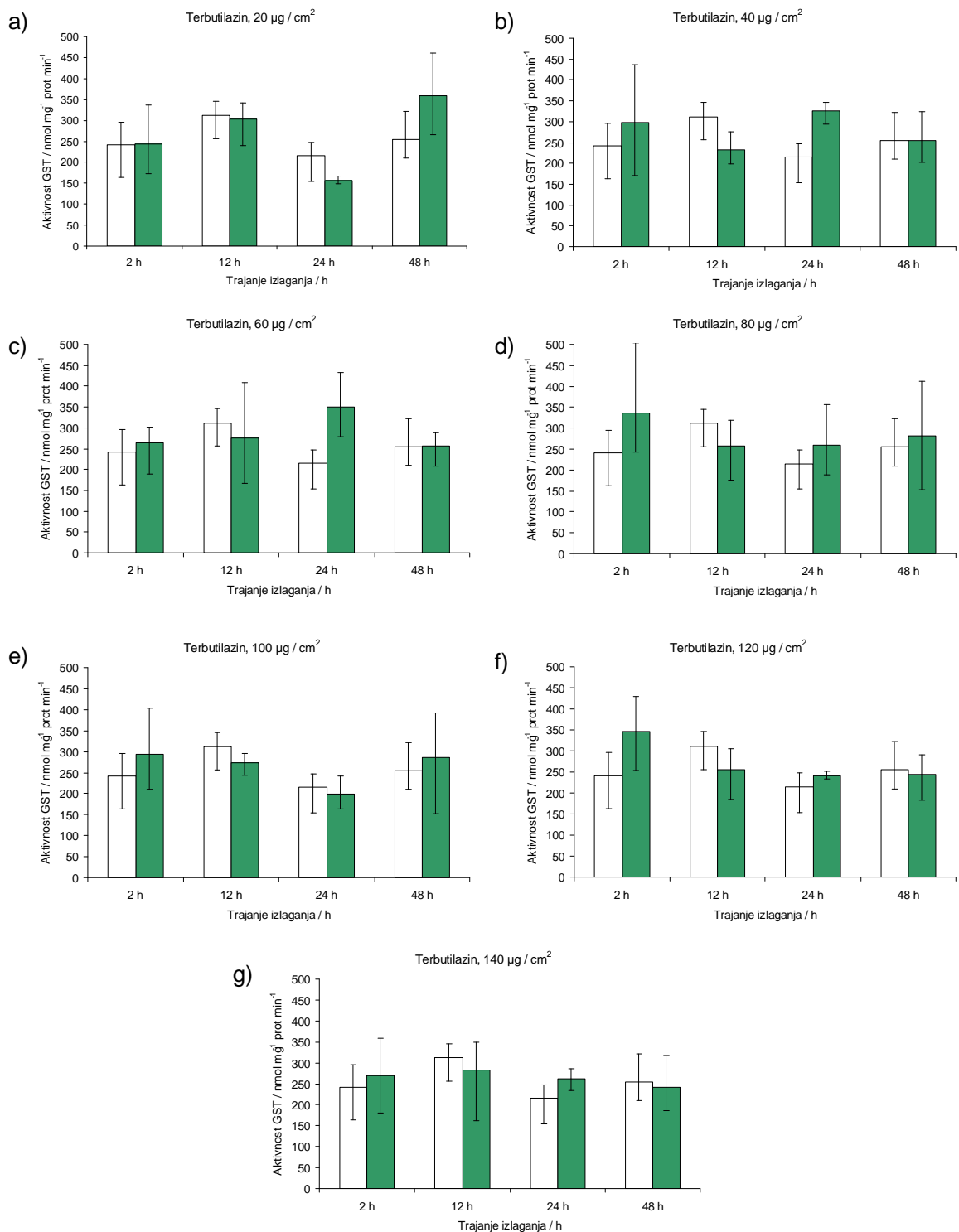
Na trodimenzionalnom prikazu je jasno vidljivo da nema značajnih promjena u aktivnosti AChE, CAT i GST s povećanjem vremena i s trajanjem izlaganja (Slika 39). Također je vidljivo povećanje aktivnosti AChE pri najkraćem vremenu izlaganja kod svih (osim najmanje) upotrebljenih koncentracija terbutilazina (Slika 39 a), te povećanja aktivnosti CAT pri najkraćem vremenu izlaganja kod većine primijenjenih koncentracija (Slika 39 b).



**Slika 36.** Aktivnost AChE pri istim koncentracijama terbutilazina: a) 20 µg/cm<sup>2</sup>, b) 40 µg/cm<sup>2</sup>, c) 60 µg/cm<sup>2</sup>, d) 80 µg/cm<sup>2</sup>, e) 100 µg/cm<sup>2</sup>, f) 120 µg/cm<sup>2</sup>, g) 140 µg/cm<sup>2</sup> prikazana u četiri različita vremena izlaganja 2, 12, 24, 48 h.

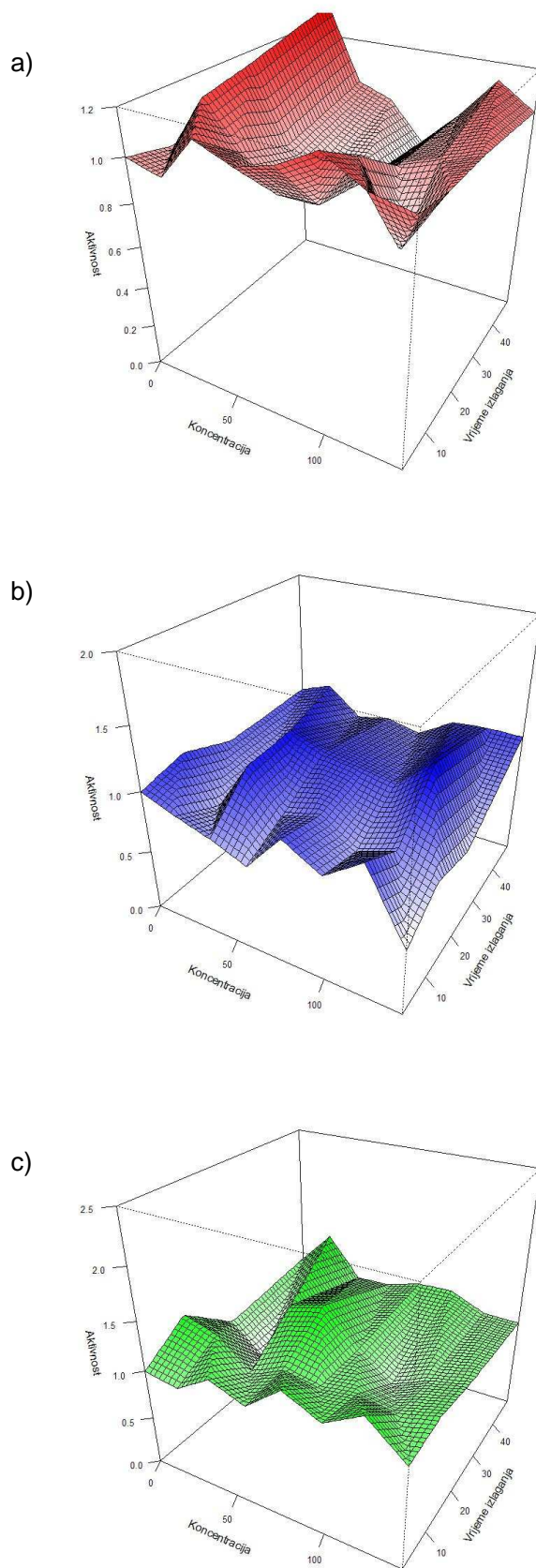


**Slika 37.** Aktivnost CAT pri istim koncentracijama terbutilazina: a) 20 µg/cm<sup>2</sup>, b) 40 µg/cm<sup>2</sup>, c) 60 µg/cm<sup>2</sup>, d) 80 µg/cm<sup>2</sup>, e) 100 µg/cm<sup>2</sup>, f) 120 µg/cm<sup>2</sup>, g) 140 µg/cm<sup>2</sup> prikazana u četiri različita vremena izlaganja 2, 12, 24, 48 h.



**Slika 38.** Aktivnost GST pri istim koncentracijama terbutilazina: a) 20 µg/cm<sup>2</sup>, b) 40 µg/cm<sup>2</sup>, c) 60 µg/cm<sup>2</sup>, d) 80 µg/cm<sup>2</sup>, e) 100 µg/cm<sup>2</sup>, f) 120 µg/cm<sup>2</sup>, g) 140 µg/cm<sup>2</sup> prikazana u četiri različita vremena izlaganja 2, 12, 24, 48 h.





**Slika 39.** Trodimenzionalni prikaz relativnih aktivnosti a) AChE, b) CAT i c) GST u ovisnosti o koncentraciji terbutilazina ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) i trajanju izlaganja (h).

#### 4.1.6. Aktivnost AChE, CAT i GST u S9 frakciji homogenata gujavica nakon 2, 12, 24 i 48 sati izlaganja metolakloru

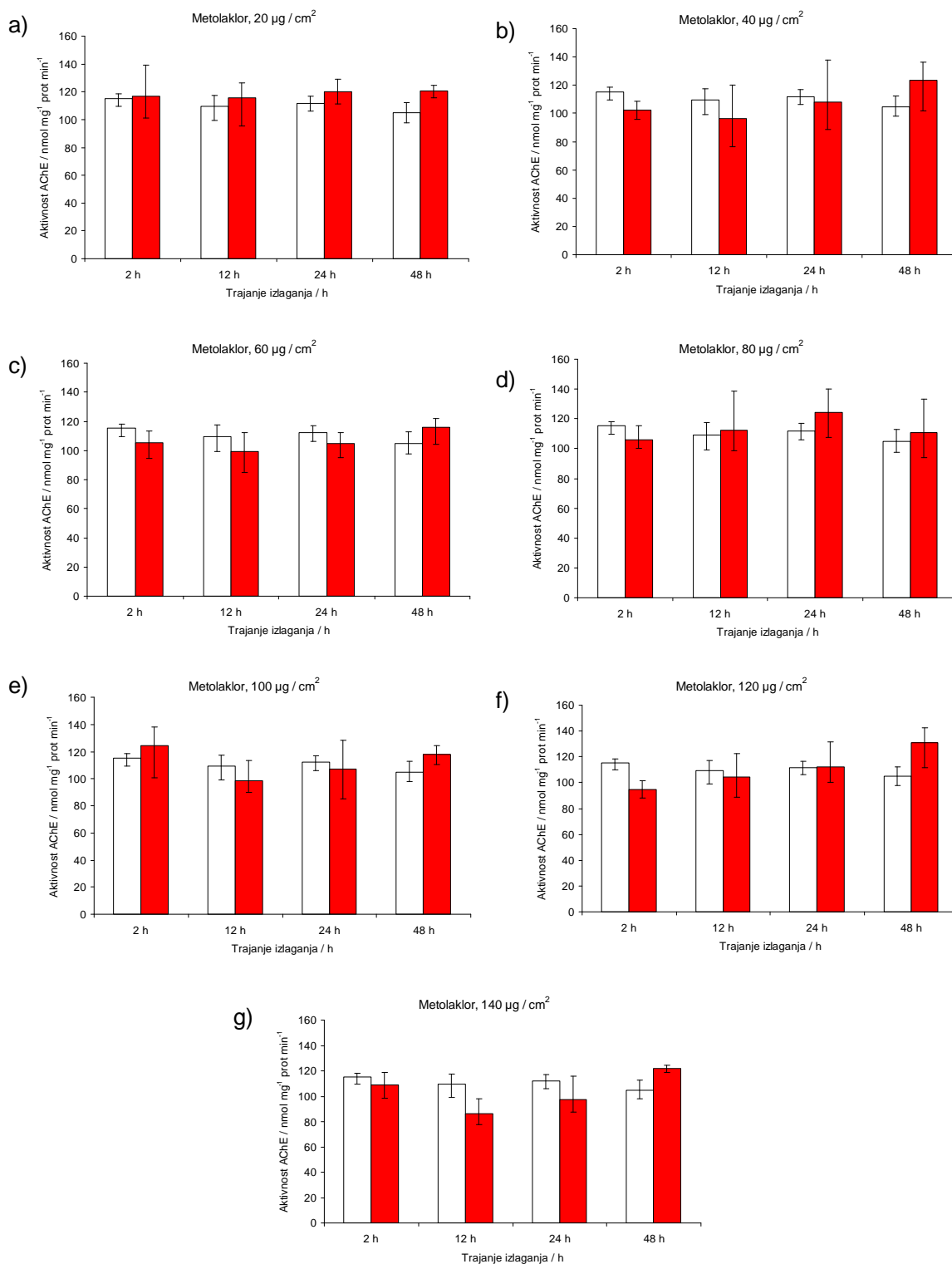
Rezultati mjerenja aktivnosti AChE, CAT i GST u S9 frakciji homogenata gujavica nakon 2, 12, 24 i 48 h izlaganja metolakloru pri koncentracijama 20, 40, 60, 80, 100 i 120 i 140  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  prikazani su na Slikama 40–42.

Aktivnost AChE nije se statistički značajno promijenila nakon izlaganja niti tijekom vremena, a ni pri različitim koncentracijama metolaklora (Slika 40). Aktivnost AChE je bila veća od aktivnosti AChE u kontroli kod sva četiri vremena izlaganja pri koncentraciji metolaklora od 20  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Slika 40 a). Povećanje u odnosu na kontrolu je zabilježeno i nakon 48 h izlaganja 40  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 60  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 120  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  i 140  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Slika 40 b, c, f, g), odnosno nakon 12, 24 i 48 sati pri koncentraciji metolaklora od 80  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , te nakon 2 i 48 sati pri koncentraciji metolaklora od 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Slika 40 d, e).

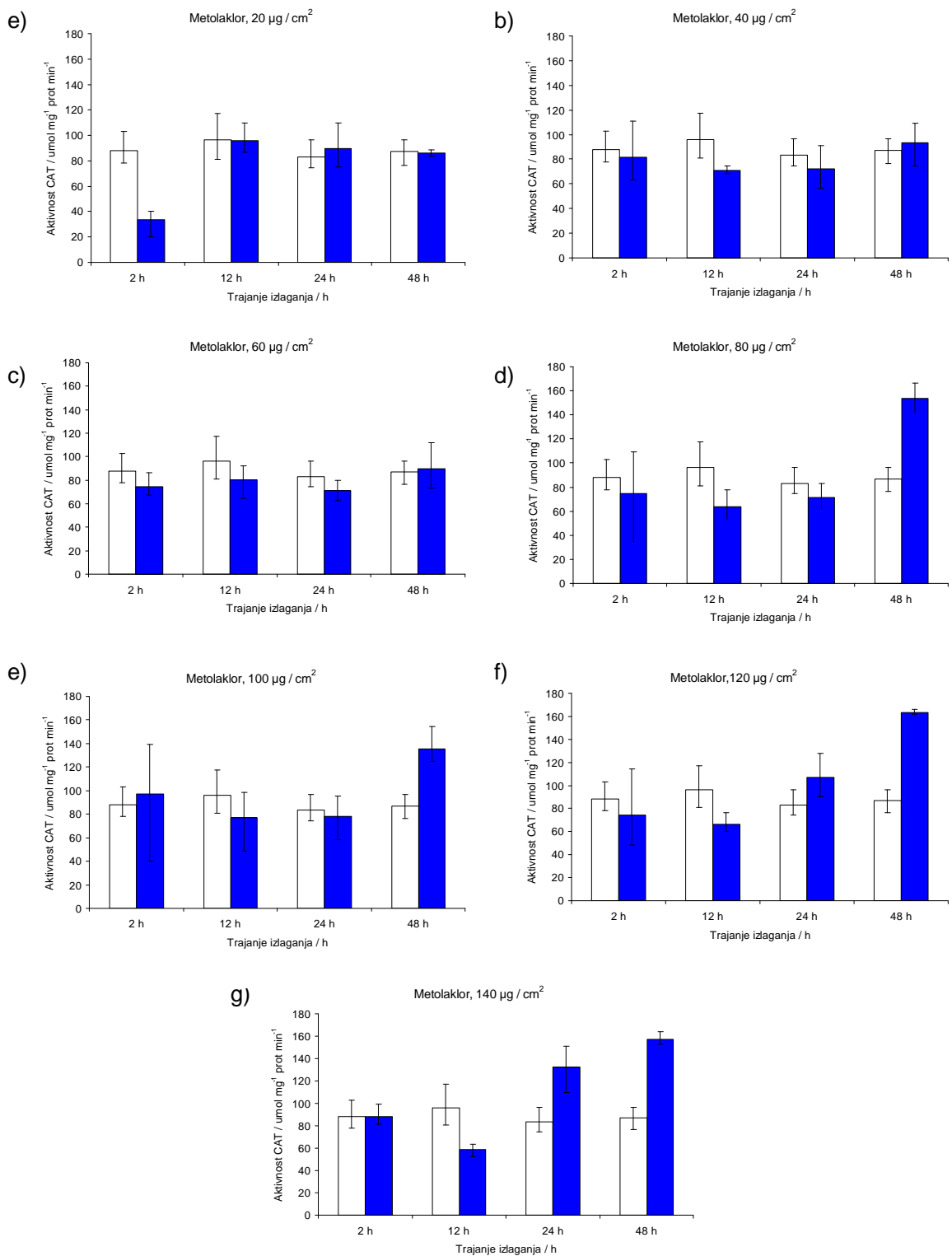
Aktivnost katalaze smanjila se nakon 2 h izlaganja kod svih koncentracija metolaklora, osim pri koncentracijama 100 i 140  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Do najvećeg smanjenja aktivnosti CAT došlo je kod najmanje koncentracije 20  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , pri čemu je aktivnost iznosila 3,4  $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$ . Aktivnost u kontrolnim uzorcima iznosila je 88  $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$ , što znači da je došlo do smanjenja aktivnosti od 2,7 puta u odnosu na kontrolu (Slika 41 a). Slični rezultati dobiveni su kod koncentracija 80, 120 i 140  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , pri čemu je nakon 2, 12 i 24 h uočena smanjena aktivnost CAT, a nakon 48 h dolazi do statistički značajnog povećanja aktivnosti. Najveće povećanje aktivnosti izmjereno je nakon 48 h kod koncentracije metolaklora 120  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , a iznosilo je 16,3  $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$ , pri čemu je povećanje u odnosu na kontrolu iznosilo 1,87 puta. Aktivnost CAT izmjerena u kontroli nakon 48 h iznosila je 87,0  $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$  (Slika 41 f).

Aktivnost GST varirala je u svim ispitivanim koncentracijama tijekom cijelog vremena izlaganja. Do statistički značajnog povećanja aktivnosti GST došlo je u uzorcima izmjerenim 48 h nakon izlaganja pri koncentracijama metolaklora od 120 i 140  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Slika 42 f, g), te nakon 24 h pri koncentracijama 100, 120 i 140  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (e, f, g). Do najvećeg povećanja aktivnosti GST došlo je nakon 48 h kod koncentracije metolaklora 140  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  i to za 1,6 puta u odnosu na kontrolu. Aktivnost GST kod ove koncentracije iznosila je 407,5  $\text{nmol mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$ , dok je u kontroli iznosila 255,1  $\text{nmol mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$ .

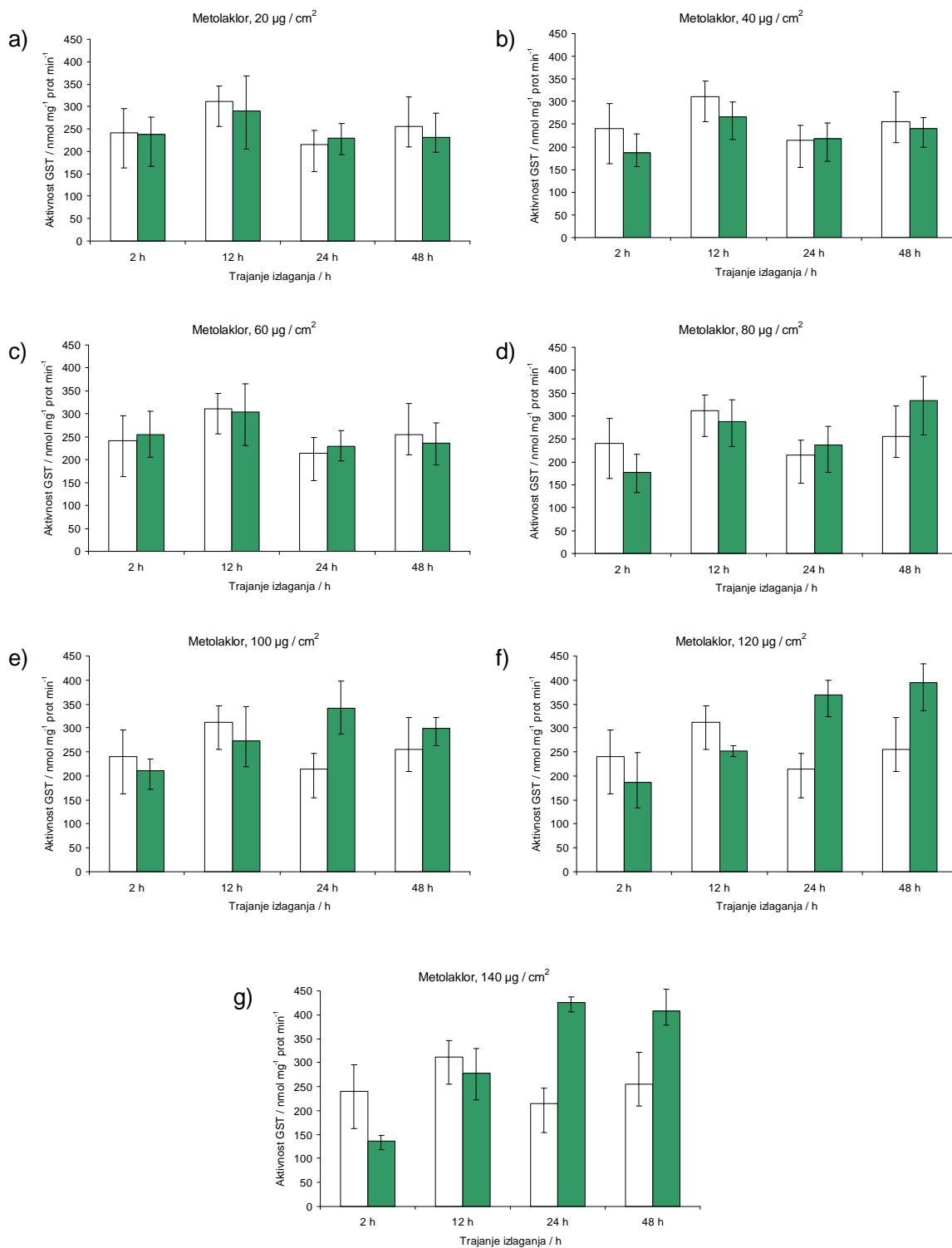
Na trodimenzionalnom prikazu je vidljivo da nema značajnih promjena u aktivnosti AChE, ali je također vidljivo smanjivanje aktivnosti CAT i GST s trajanjem izlaganja kod manjih koncentracija metolaklora, te povećanje aktivnosti CAT i GST s povećanjem trajanja izlaganja kod većih koncentracija metolaklora (Slika 43 a, b, c).



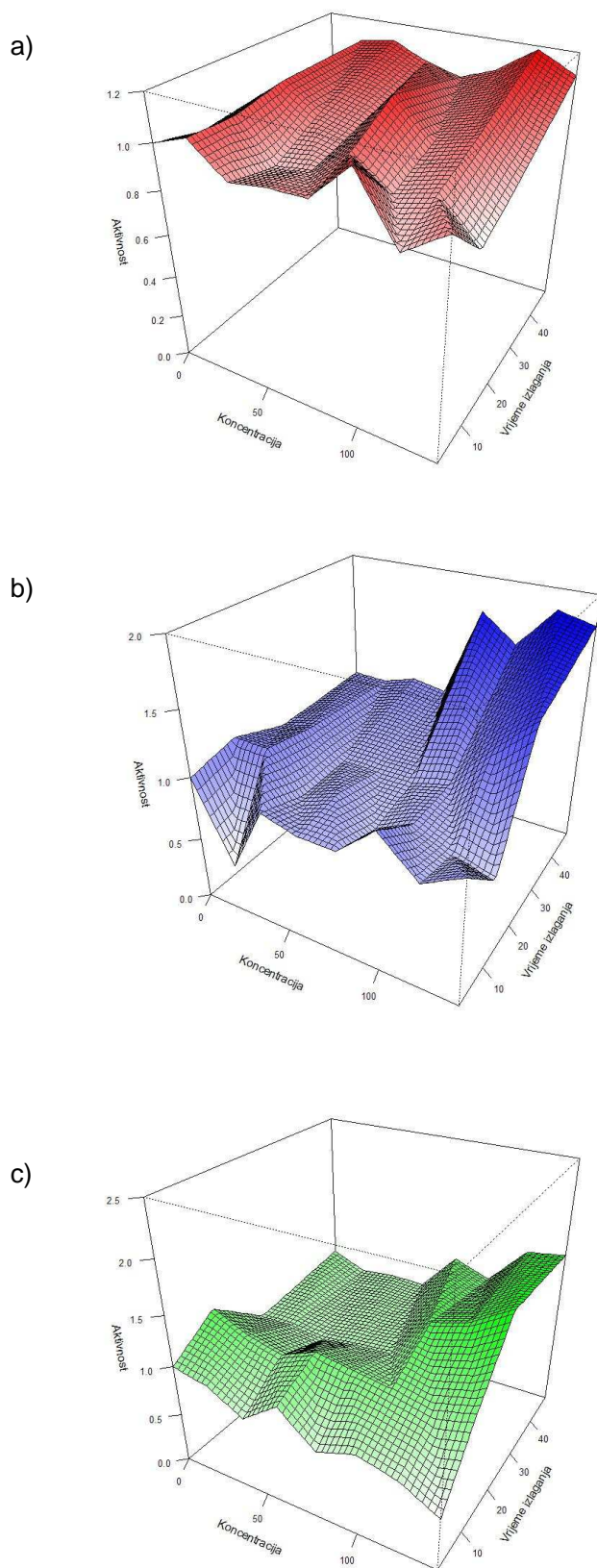
**Slika 40.** Aktivnost AChE pri istim koncentracijama metolaklora: a) 20 µg/cm<sup>2</sup>, b) 40 µg/cm<sup>2</sup>, c) 60 µg/cm<sup>2</sup>, d) 80 µg/cm<sup>2</sup>, e) 100 µg/cm<sup>2</sup>, f) 120 µg/cm<sup>2</sup>, g) 140 µg/cm<sup>2</sup> prikazana u četiri različita vremena izlaganja 2, 12, 24, 48 h.



**Slika 41.** Aktivnost CAT pri istim koncentracijama metolaklora: a) 20 µg/cm<sup>2</sup>, b) 40 µg/cm<sup>2</sup>, c) 60 µg/cm<sup>2</sup>, d) 80 µg/cm<sup>2</sup>, e) 100 µg/cm<sup>2</sup>, f) 120 µg/cm<sup>2</sup>, g) 140 µg/cm<sup>2</sup> prikazana u četiri različita vremena izlaganja 2, 12, 24, 48 h.



**Slika 42.** Aktivnost GST pri istim koncentracijama metolaklora: a) 20 µg/cm<sup>2</sup>, b) 40 µg/cm<sup>2</sup>, c) 60 µg/cm<sup>2</sup>, d) 80 µg/cm<sup>2</sup>, e) 100 µg/cm<sup>2</sup>, f) 120 µg/cm<sup>2</sup>, g) 140 µg/cm<sup>2</sup> prikazana u četiri različita vremena izlaganja 2, 12, 24, 48 h.



**Slika 43.** Trodimenzionalni prikaz relativnih aktivnosti a) AChE, b) CAT i c) GST u ovisnosti o koncentraciji metolaklora ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) i trajanju izlaganja (h).

#### 4.1.7. Aktivnost AChE, CAT i GST u S9 frakciji homogenata gujavica nakon 2, 12, 24 i 48 sati izlaganja bentazonu

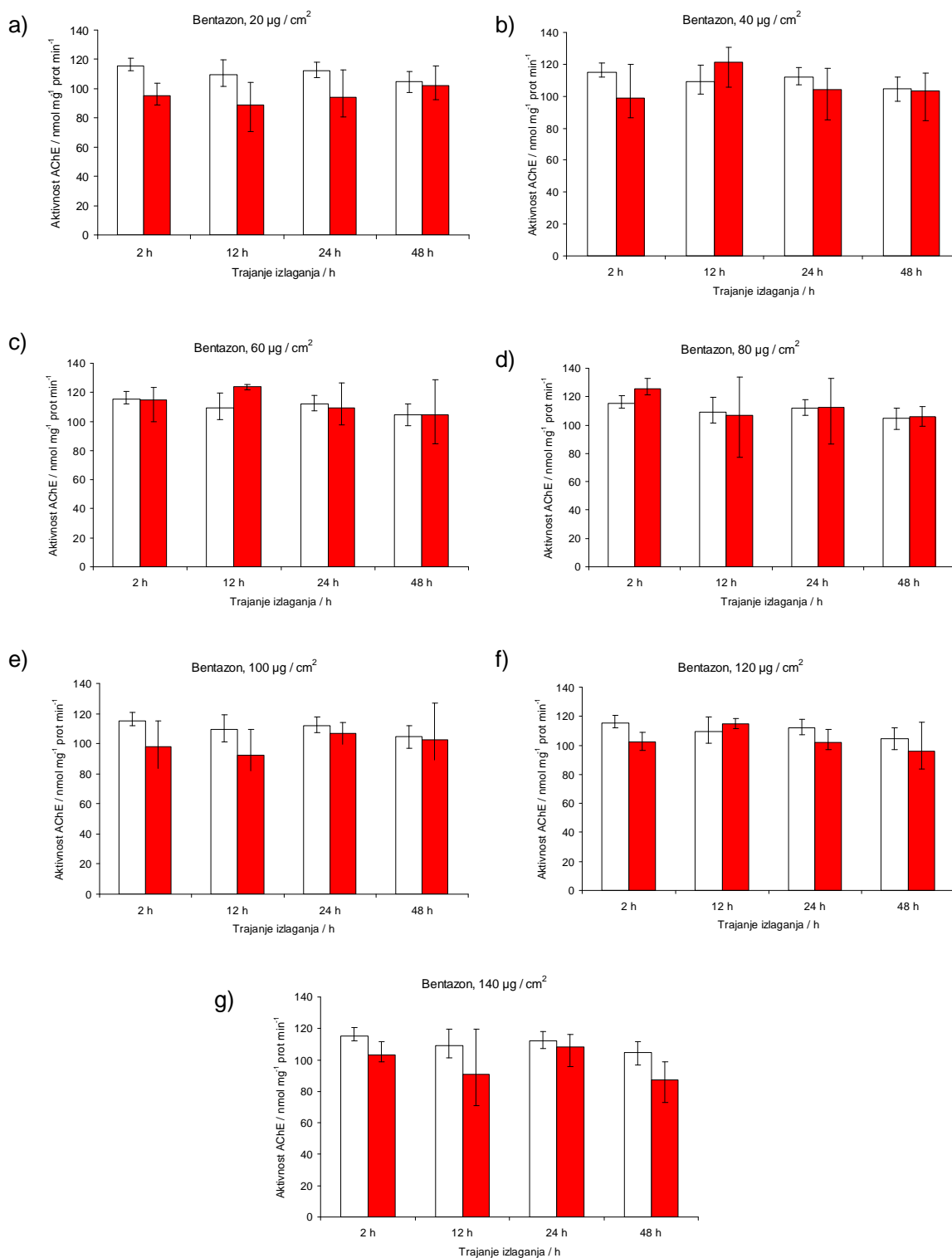
Rezultati mjerenja aktivnosti AChE, CAT i GST u S9 frakciji homogenata gujavica nakon 2, 12, 24 i 48 h izlaganja bentazonu pri koncentracijama 20, 40, 60, 80, 100, 120 i 140  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  prikazani su na Slici 44-46.

Pri najmanjoj koncentraciji bentazona od 20  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  izmjerene su smanjene aktivnosti AChE nakon 2, 12 i 24 h izlaganja (Slika 44 a). Kod nekih koncentracija bentazona (40, 60 i 120  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) nakon 12 h izlaganja došlo je do povećanja aktivnosti AChE. Kod koncentracije bentazona od 80  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  nakon 2, 24 i 48 h izlaganja također je došlo do povećanja aktivnosti AChE (Slika 44 b, c, d, f).

Aktivnost katalaze nije pokazala statistički značajnu promjenu kod nijedne koncentracije bentazona i varirala je kod svih koncentracija tijekom cijelog vremena izlaganja (Slika 45).

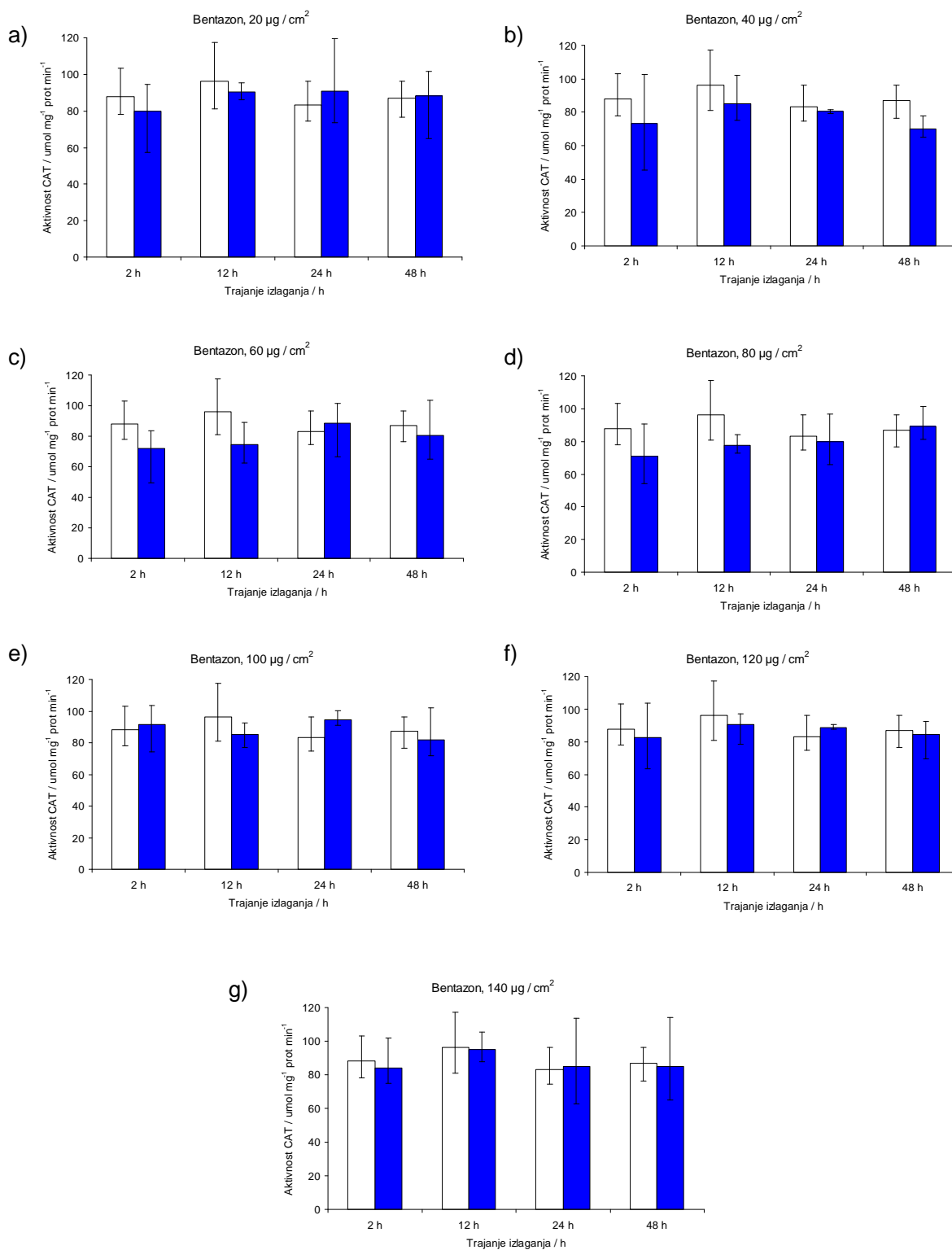
Aktivnost GST kao i aktivnost CAT varirala je u svim ispitivanim koncentracijama tijekom cijelog trajanja izlaganja (Slika 46).

Na trodimenzionalnom prikazu vidljivo je povećanje aktivnosti AChE nakon 12 sati izlaganja. Vrijednost aktivnosti CAT se značajno ne mijenja povećanjem koncentracije bentazona, niti povećanjem vremena izlaganja. Uočljivo je povećanje GST aktivnosti sa povećanjem vremena izlaganja (osim kod koncentracija od 60 i 100  $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ ) (Slika 47).

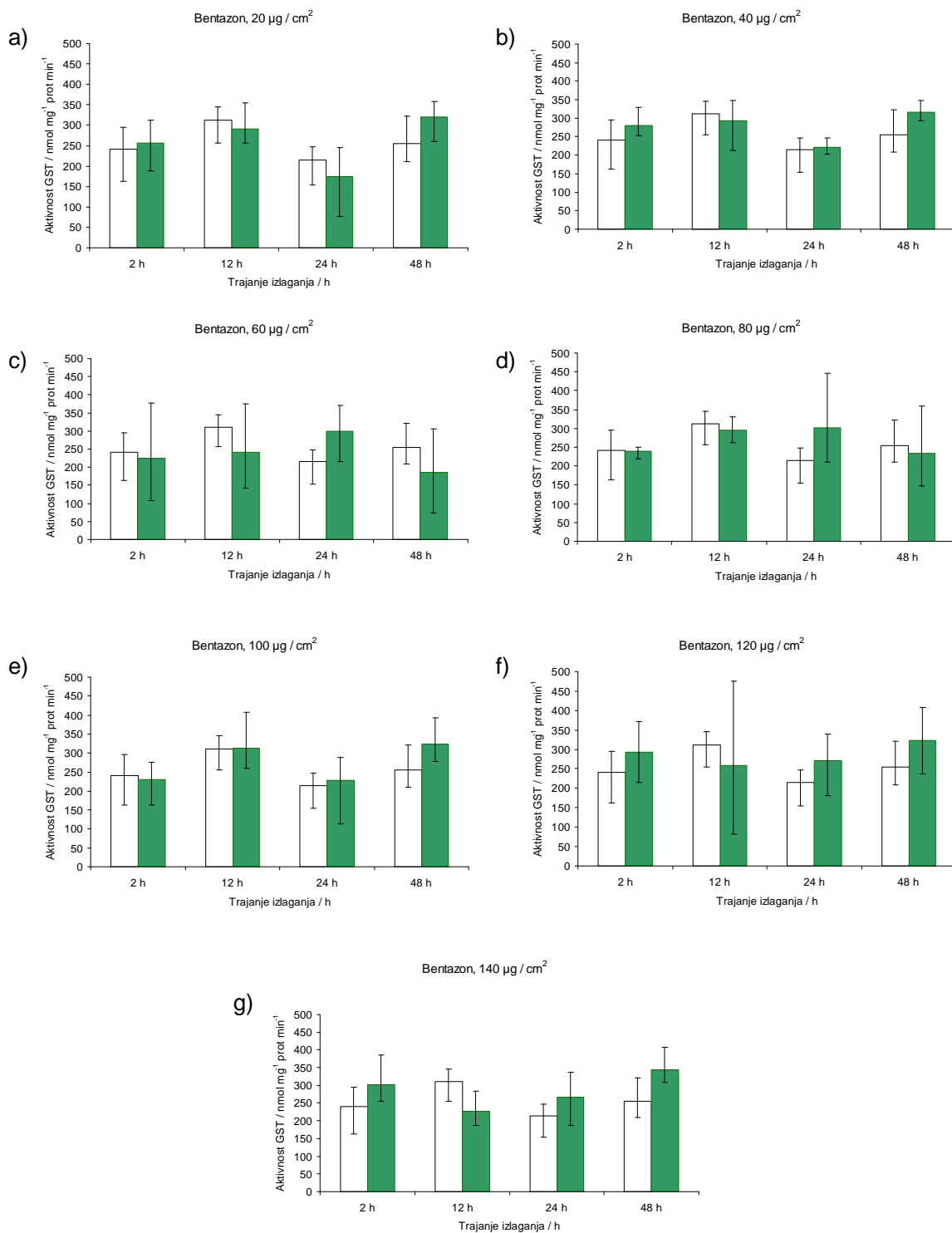


**Slika 44.** Aktivnost AChE pri istim koncentracijama bentazona: a) 20 µg/cm<sup>2</sup>, b) 40 µg/cm<sup>2</sup>, c) 60 µg/cm<sup>2</sup>, d) 80 µg/cm<sup>2</sup>, e) 100 µg/cm<sup>2</sup>, f) 120 µg/cm<sup>2</sup>, g) 140 µg/cm<sup>2</sup> prikazana u četiri različita vremena izlaganja 2, 12, 24, 48 h.

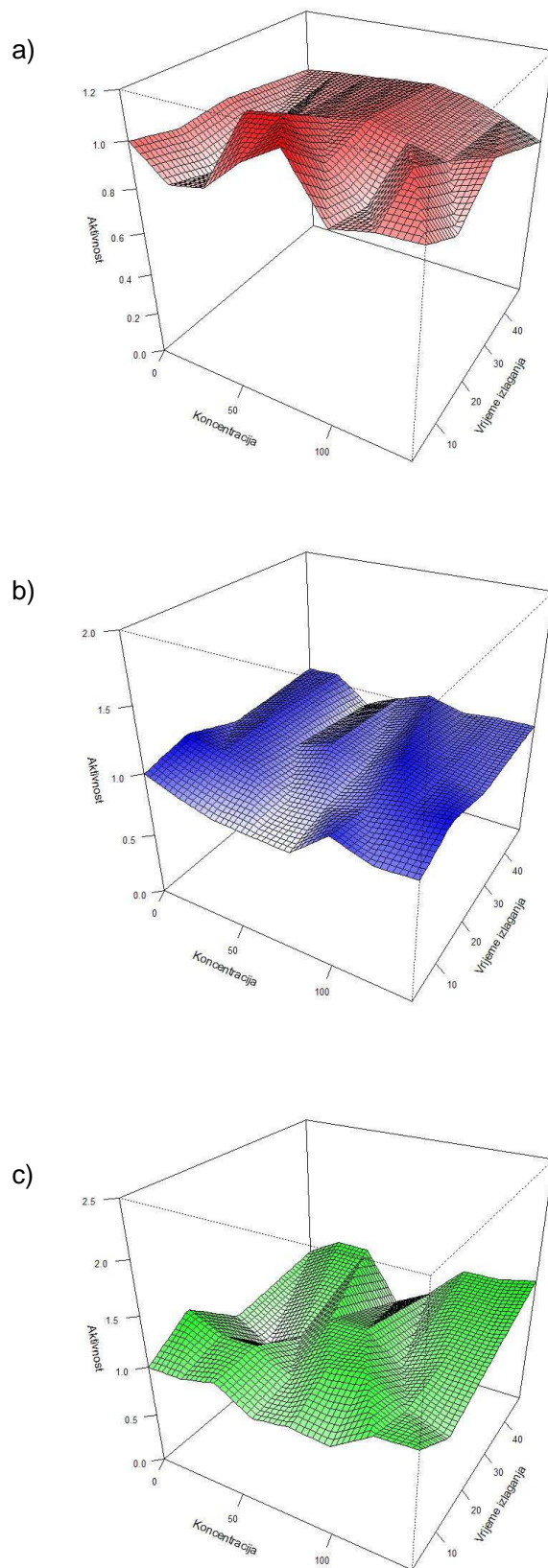




**Slika 45.** Aktivnost CAT pri istim koncentracijama bentazona: a) 20 µg/cm<sup>2</sup>, b) 40 µg/cm<sup>2</sup>, c) 60 µg/cm<sup>2</sup>, d) 80 µg/cm<sup>2</sup>, e) 100 µg/cm<sup>2</sup>, f) 120 µg/cm<sup>2</sup>, g) 140 µg/cm<sup>2</sup> prikazana u četiri različita vremena izlaganja 2, 12, 24, 48 h.



**Slika 46.** Aktivnost GST pri istim koncentracijama bentazona: a) 20 µg/cm<sup>2</sup>, b) 40 µg/cm<sup>2</sup>, c) 60 µg/cm<sup>2</sup>, d) 80 µg/cm<sup>2</sup>, e) 100 µg/cm<sup>2</sup>, f) 120 µg/cm<sup>2</sup>, g) 140 µg/cm<sup>2</sup> prikazana u četiri različita vremena izlaganja 2, 12, 24, 48 h.



**Slika 47.** Trodimenzionalni prikaz relativnih aktivnosti a) AChE, b) CAT i c) GST u ovisnosti o koncentraciji bentazona ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) i trajanju izlaganja (h).

## 4.2. PROMJENA OVISNOSTI UČINKA POJEDINAČNIH PESTICIDA U ODNOSU NA VRIJEME IZLAGANJA

### 4.2.1. Promjena ovisnosti učinka endosulfana u odnosu na vrijeme izlaganja

#### 4.2.1.1. Aktivnost AChE

Kako je i očekivano s obzirom na da je endosulfan inhibitor acetilkolinesteraze, aktivnost AChE je bila inhibirana već nakon 2 sata izlaganja pri svim upotrebljenim koncentracijama, te je takva i ostala i pri ostalim duljinama izlaganja. Smanjenje aktivnosti je pokazalo ovisnost o dozi prateći logističku krivulju (Slika 48).

#### 4.2.1.2. Aktivnost CAT

Pri prvih tri vremena izlaganja (2 h, 12 h i 24 h) endosulfan je izazvao smanjenje aktivnosti katalaze pri najvišim upotrebljenim koncentracijama. No, nakon 48 sati došlo je do promjene, te je aktivnost CAT počela rasti u ovisnosti o dozi prateći logistički krivulju (LL 5 model) (Slika 49).

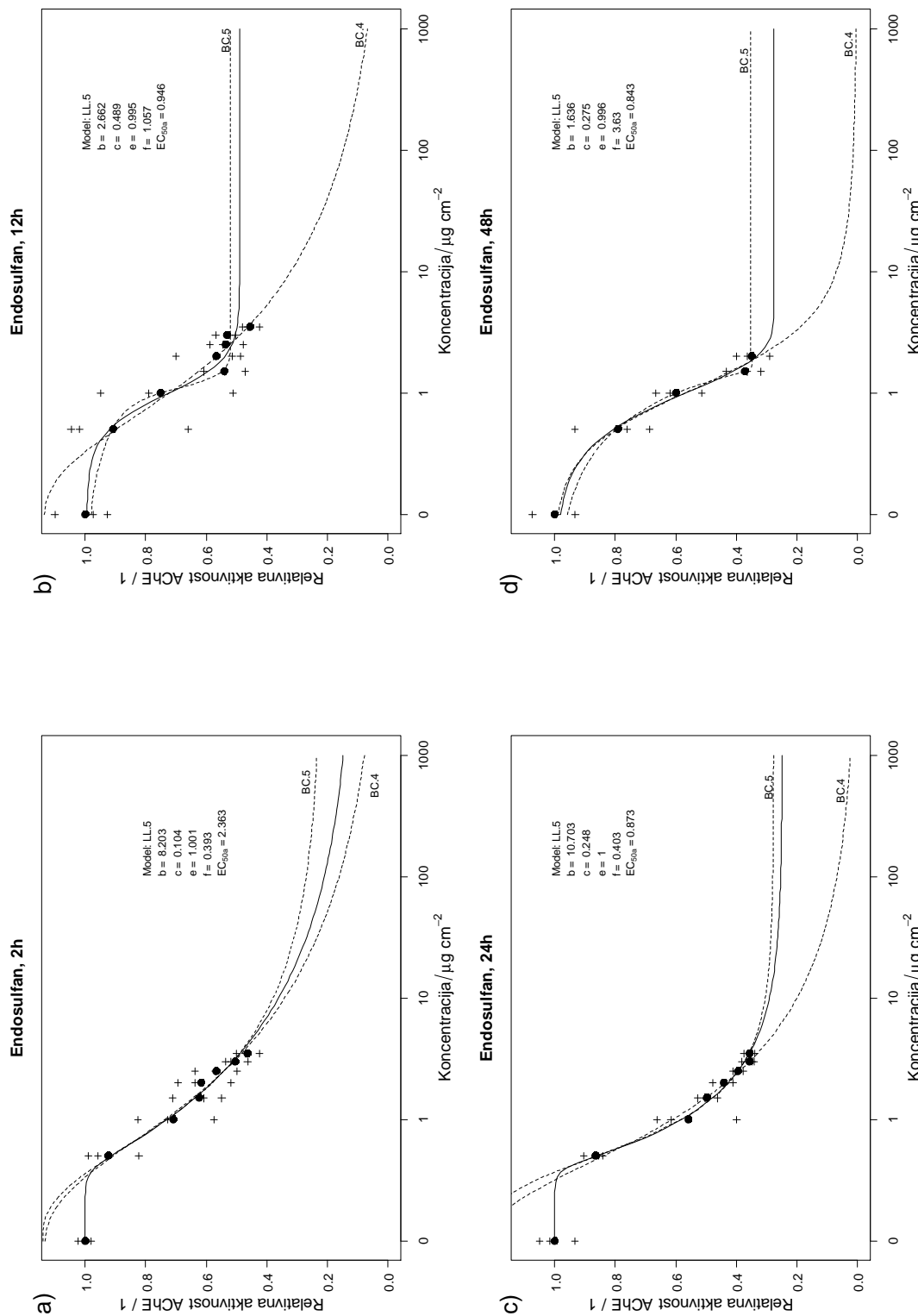
#### 4.2.1.3. Aktivnost GST

Prva dva vremena izlaganja (2 h i 12 h) nisu bila dovoljna kako bi endosulfan izazvao značajnije promjene u aktivnosti GST kod gujavica. No, nakon 24 i 48 sati izlaganja dolazi do snažnog povećanja aktivnosti ovisnog o dozi koje prati logistički krivulju (Slika 50).

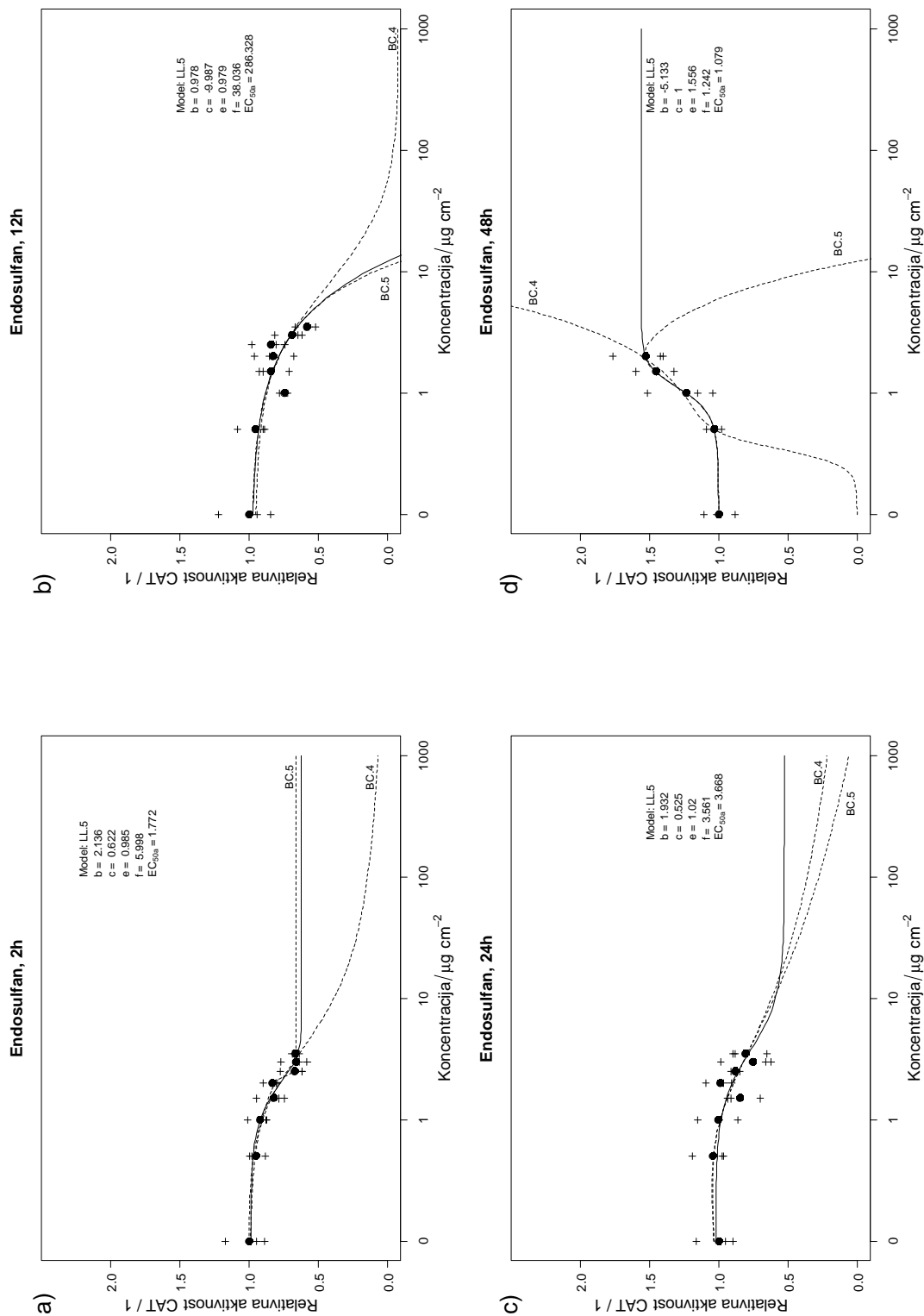
EC10, EC50 i EC90 vrijednosti za AChE, CAT i GST pri četiri različita vremena izlaganja endosulfanu 2, 12, 24, i 48 h s parametrima funkcije b, c, d, e i f prikazane su u Tablici 10.

**Tablica 10.** Prikaz EC10, EC50 i EC90 vrijednosti za AChE, CAT i GST pri četiri različita vremena izlaganja endosulfanu 2, 12, 24, i 48 h s parametrima funkcije b, c, d, e i f.

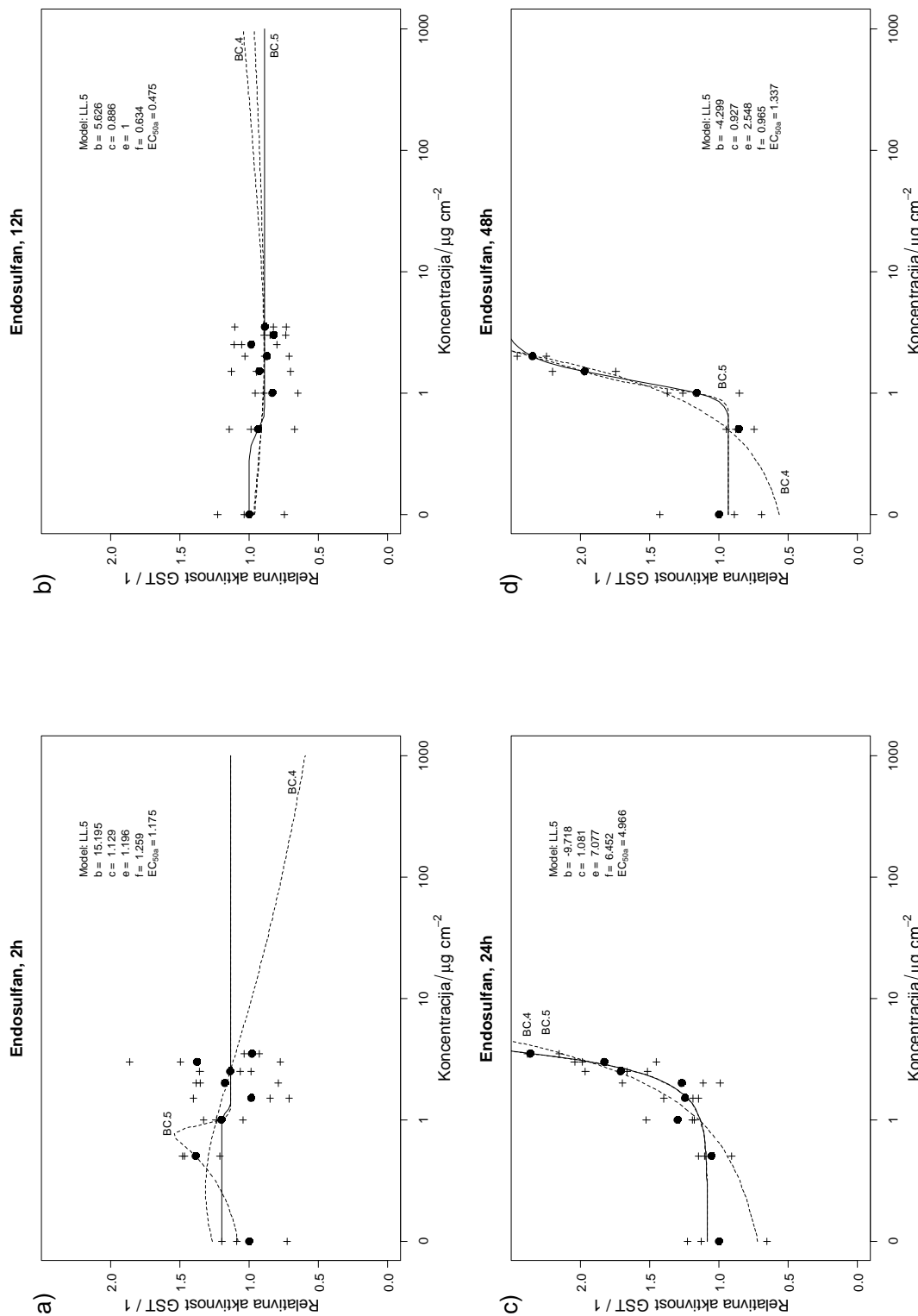
Endosulfan Parametar	AChE				CAT				GST			
	2 h	12 h	24 h	48 h	2 h	12 h	24 h	48 h	2 h	12 h	24 h	48 h
EC10	0.51	0.43	0.44	0.27	0.73	14.02	1.17	0.61	1.03	0.34	2.64	0.95
EC50	2.37	0.95	0.88	0.85	1.78	286.33	3.67	1.08	1.18	0.48	4.97	1.34
EC90	151.87	1.99	5.26	1.88	3.24	>E	11.74	1.73	1.31	0.62	6.95	2.12
b	8.21	2.67	10.71	1.64	2.14	0.98	1.94	-5.14	15.20	5.63	-9.72	-4.30
c	0.11	0.49	0.25	0.28	0.63	-9.99	0.53	1.00	1.13	0.89	1.09	0.93
d	1.01	1.00	1.00	1.00	0.99	0.98	1.02	1.56	1.20	1.00	7.08	2.55
e	0.40	1.06	0.41	3.63	6.00	38.04	3.57	1.25	1.26	0.64	6.46	0.97
f	0.05	1.25	0.09	7.89	9.72	0.33	0.96	0.62	2.33	3.89	0.27	3.15



Slika 48. Promjena ovisnosti učinka endosulfana na aktivnost AChE pri četiri različita vremena izlaganja: a) 2 h; b) 12 h; c) 24 h i d) 48h.



Slika 49. Promjena ovisnosti učinka endosulfana na aktivnost CAT pri četiri različita vremena izlaganja: a) 2 h; b) 12 h; c) 24 h i d) 48h.



Slika 50. Promjena ovisnosti učinka endosulfana na aktivnost GST pri četiri različita vremena izlaganja: a) 2 h; b) 12 h; c) 24 h i d) 48h.

#### 4.2.2. Promjena ovisnosti učinka temefosa u odnosu na vrijeme izlaganja

##### 4.2.2.1. Aktivnost AChE

Temefos je imao inhibitorni učinak pri svim upotrebljenim koncentracijama i svim vremenima izlaganja na aktivnost AChE kod gujavica. Nakon 12, 24 i 48 sati izlaganja izmjerene vrijednosti AChE pokazuju ovisnost o dozi prateći logističku krivulju (LL 5 model). Nakon najkraćeg vremena izlaganja (2 h) pri najveće dvije upotrebljene koncentracije temefosa dolazi do povećanja aktivnosti AChE u odnosu na prethodne koncentracije mijenjajući izgled krivulje i ukazujući na mogući hormetički učinak. Krivulja prati Brain-Cousens-ov 5-ero parametarski model (BC 5) (Slika 51).

##### 4.2.2.2. Aktivnost CAT

Nakon 2 i 12 sati izlaganja temefosu aktivnost CAT pokazuje tendenciju smanjenja s obzirom na povećanje koncentracije. Nakon 24 sata, poslije smanjenja aktivnosti pri nižim koncentracijama temefosa, dolazi do povećanja aktivnosti kod dvije najveće koncentracije. Tu krivulju aktivnosti najbolje opisuje Brain-Cousens-ov 5-ero parametarski model (BC 5). Nakon 48 sati izlaganja samo je aktivnost pri najvišoj upotrebljenoj koncentraciji temefosa ostala povišena dok su sve ostale došle na razinu vrijednosti kontrole (Slika 52).

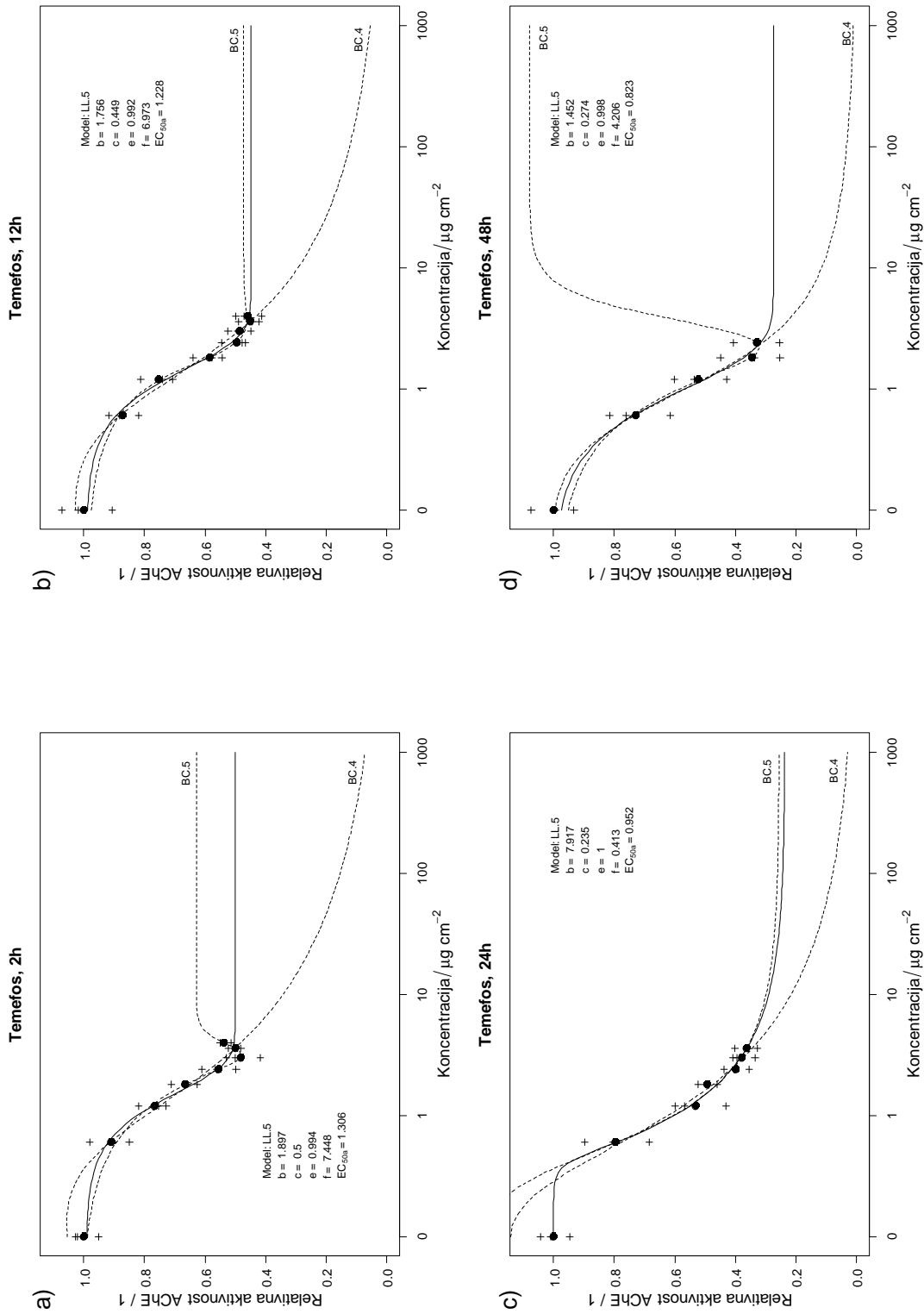
##### 4.2.2.3. Aktivnost GST

Nakon 2 sata izlaganja došlo je do promjena u aktivnosti GST, no one nisu pokazale ovisnost o dozi, neke koncentracije temefosa su izazvale smanjenje, a neke povećanje aktivnosti GST. Nakon 24 sata izlaganja aktivnosti GST pri najvećim koncentracijama temefosa su se značajno povećale u odnosu na kontrolu, dok su vrijednosti pri ostalim upotrebljenim koncentracijama temefosa bile približno jednake vrijednosti GST u kontroli. Nakon 48 sati izlaganja samo je aktivnost GST pri najvećoj koncentraciji temefosa ostala povećana (Slika 53). EC50 vrijednosti su se u slučaju sva tri enzima AChE, CAT i GST kontinuirano smanjivale s trajanjem vremena izlaganja, osim u slučaju CAT gdje je nakon 12 h EC50 vrijednost pokazivala puno veću vrijednost u odnosu na onu nakon 2 h (Tablica 11).

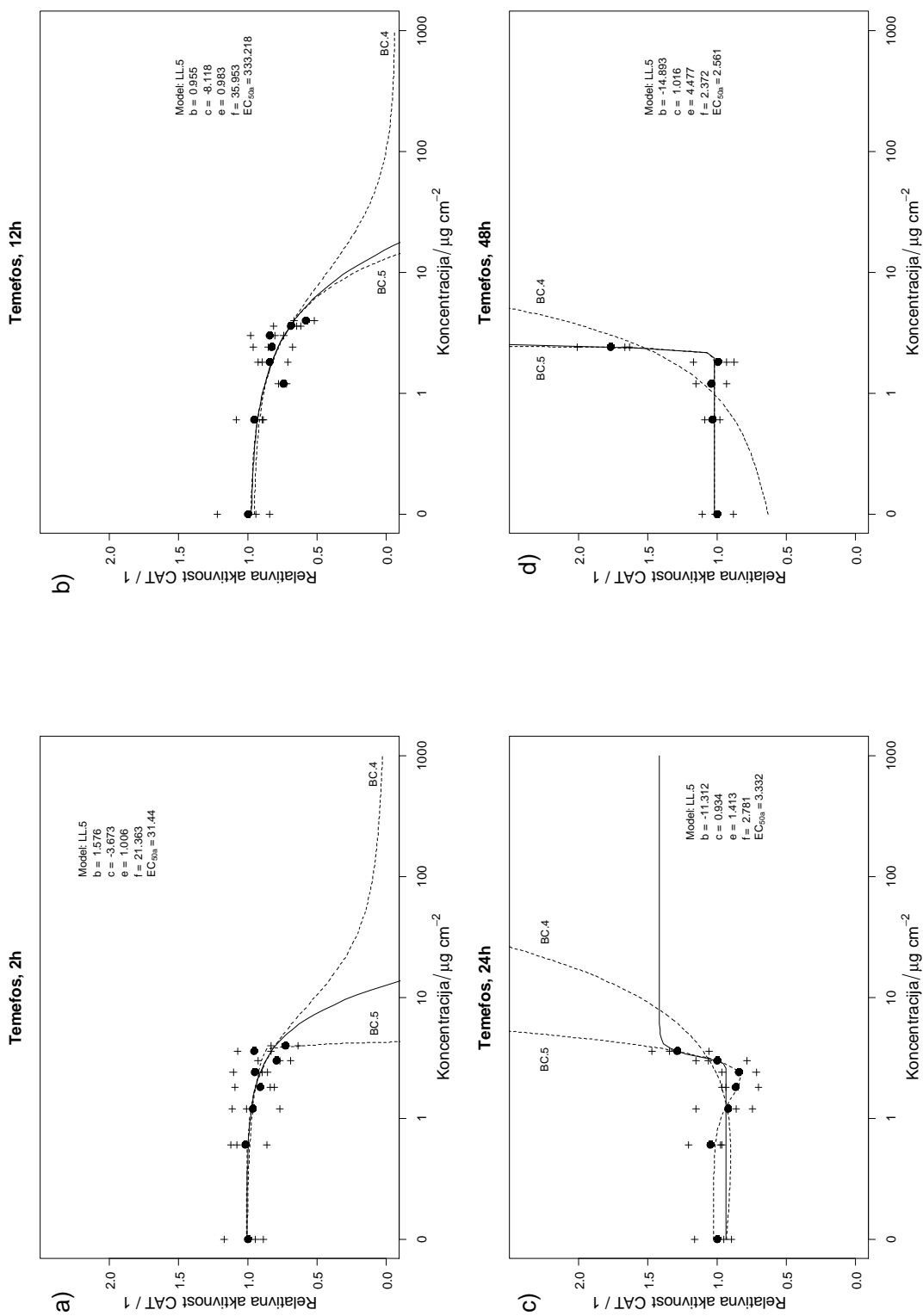
**Tablica 11.** Prikaz EC10, EC50 i EC90 vrijednosti za AChE, CAT i GST pri četiri različita vremena izlaganja temefosu 2, 12, 24, i 48 h s parametrima funkcije b, c, d, e i f.

Temefos Parametar	AChE				CAT				GST			
	2 h	12 h	24 h	48 h	2 h	12 h	24 h	48 h	2 h	12 h	24 h	48 h
EC10	0.48	0.42	0.45	0.22	6.99	13.98	2.96	2.31	2.36	124.92	2.35	2.18
EC50	1.31	1.23	0.96	0.83	31.44	333.22	3.34	2.57	2.75	>E	2.66	2.35
EC90	2.52	2.52	6.62	2.03	188.78	>E	3.96	2.94	3.11	>E	3.09	2.58
b	1.90	1.76	7.92	1.46	1.58	0.96	-11.32	-14.90	13.14	0.44	-13.34	-22.67
c	0.50	0.45	0.24	0.28	-3.68	-8.12	0.94	1.02	1.17	-2.29	1.04	0.94
d	1.00	1.00	1.00	1.00	1.01	0.99	1.42	4.48	1.14	1.00	1.49	1.33
e	7.45	6.98	0.42	4.21	21.37	35.96	2.79	2.38	2.98	8.00	2.49	2.29
f	19.20	14.97	0.11	7.75	0.67	0.31	5.70	2.51	2.27	0.08	1.99	1.63

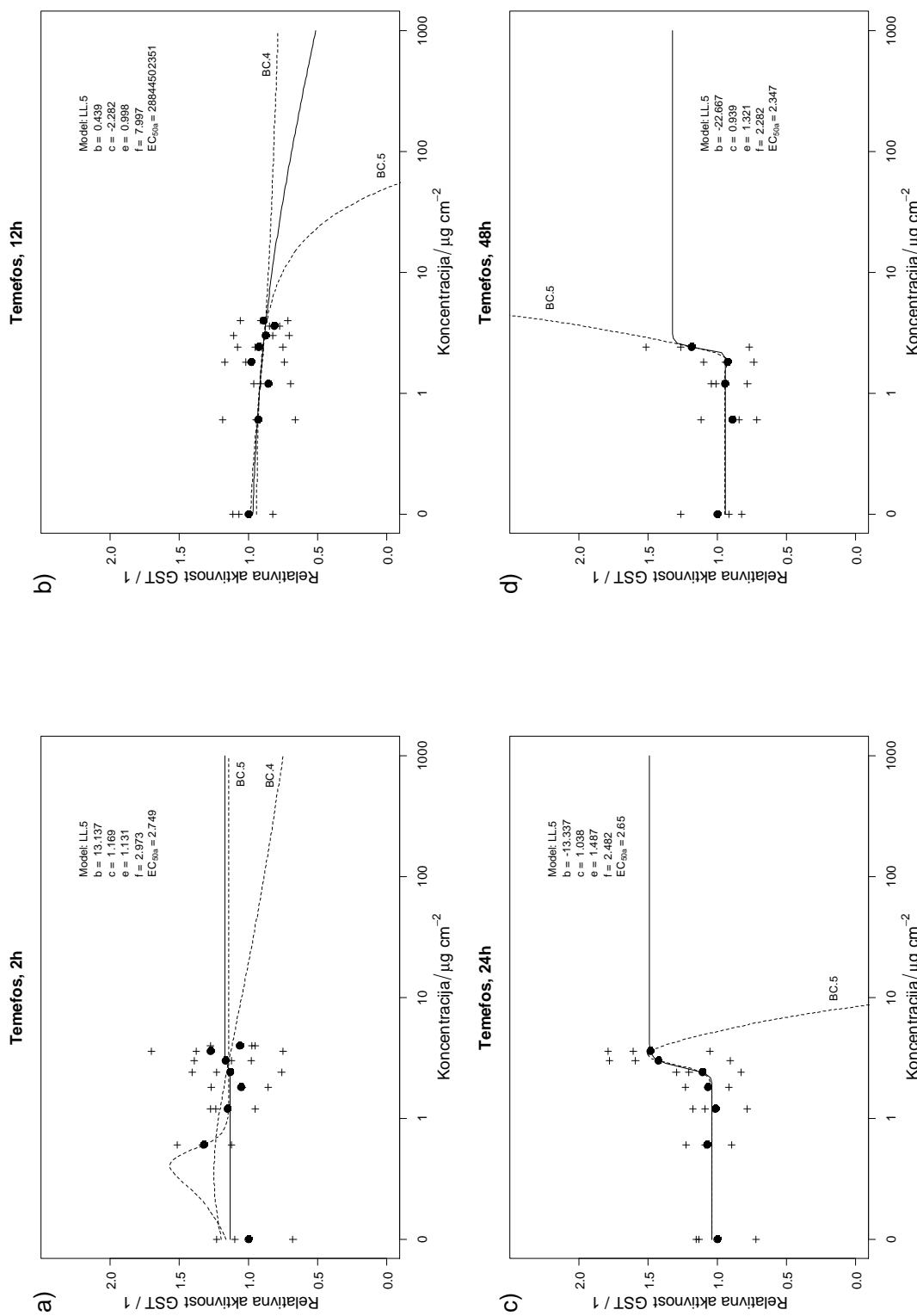




Slika 51. Promjena ovisnosti učinka temefosa na aktivnost AChE pri četiri različita vremena izlaganja: a) 2 h; b) 12 h; c) 24 h i d) 48 h.



Slika 52. Promjena ovisnosti učinka temefosa na aktivnost CAT pri četiri različita vremena izlaganja: a) 2 h; b) 12 h; c) 24 h i d) 48h



Slika 53. Promjena ovisnosti učinka temefosa na aktivnost GST pri četiri različita vremena izlaganja: a) 2 h; b) 12 h; c) 24 h i d) 48h.

### 4.2.3. Promjena ovisnosti učinka malationa u odnosu na vrijeme izlaganja

#### 4.2.3.1. Aktivnost AChE

S obzirom na poznato svojstvo organofosfornih pesticida kakav je i malation da inhibiraju aktivnost acetilkolinesteraze, smanjenje AChE ovisno o dozi pri svim duljinama izlaganja je bilo očekivano. Aktivnosti AChE prate logističku krivulju prema LL 5 modelu nakon 2, 12 i 24 sata izlaganja, no nakon 48 sati izlaganja aktivnosti bolje prate Brain-Cousens 5-parametarski model (Slika 54).

#### 4.2.3.2. Aktivnost CAT

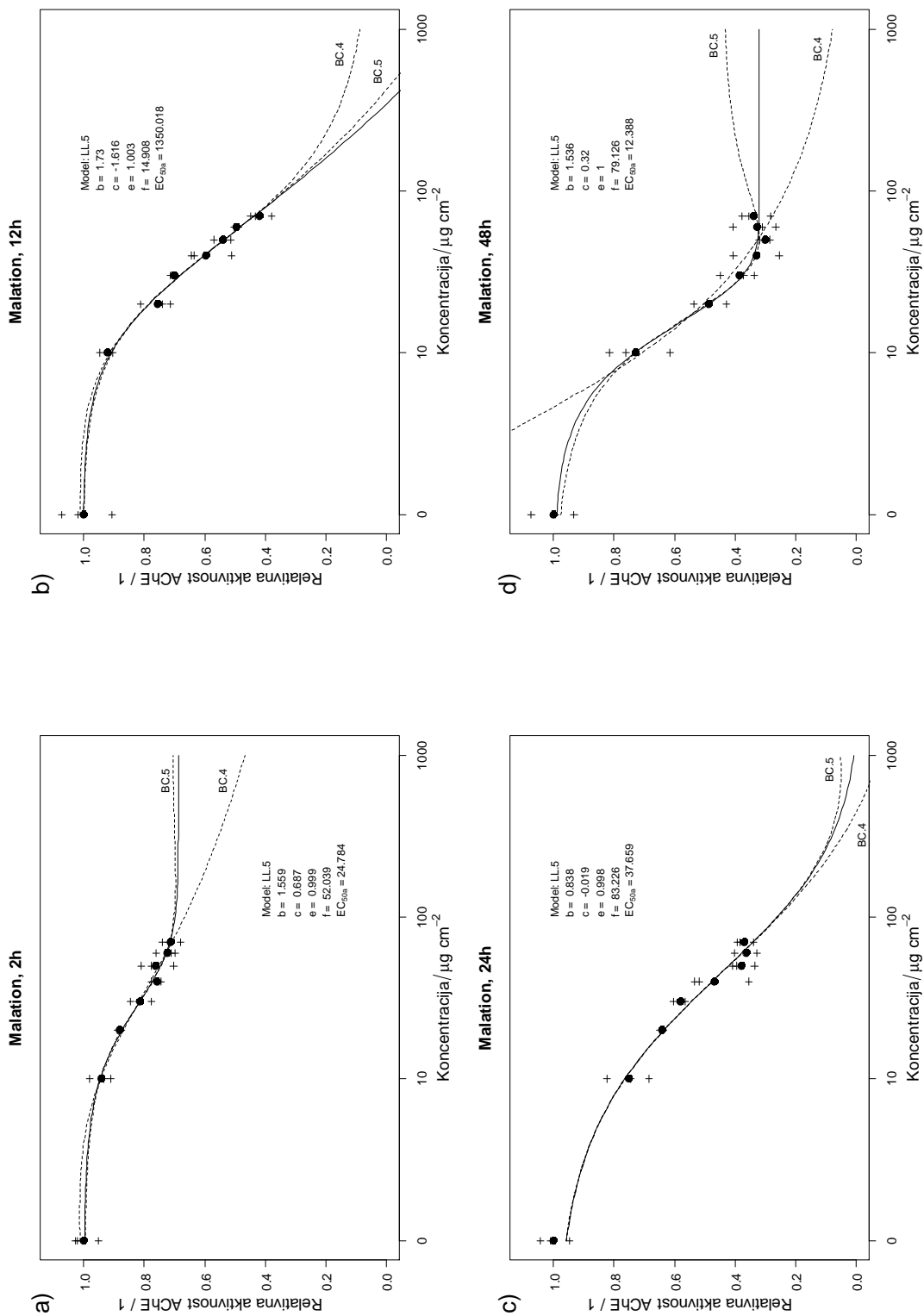
Duljina izlaganja od 2 h malationu je bila prekratka da bi izazvala značajniju promjenu u aktivnosti CAT kod gujavica. Nakon 12 i 48 sati izlaganja pri većim koncentracijama malationa dolazi do snažnog povećanja aktivnosti CAT ovisnog o dozi, te izmjerene vrijednosti prate logističku krivulju ovisnosti o dozi. Nakon 24 sata izlaganja krivulja ovisnosti je nešto drugačija, nakon prvotnog povećanja aktivnosti dolazi do njezinog smanjenja, te ponovno povećanja, stoga je najbolje opisuje Brain-Cousens-ov 5-parametarski model (BC 5) karakterističan za opisivanje hormetičkih pojava (Slika 55). EC50 vrijednosti su u slučaju CAT i AChE nakon 2 i 12 h bile puno veće u odnosu na vrijednosti nakon 24 i 48 h, dok su u slučaju GST EC50 vrijednosti bile veće nakon 2 i 24 h. (Tablica 12).

#### 4.2.3.3. Aktivnost GST

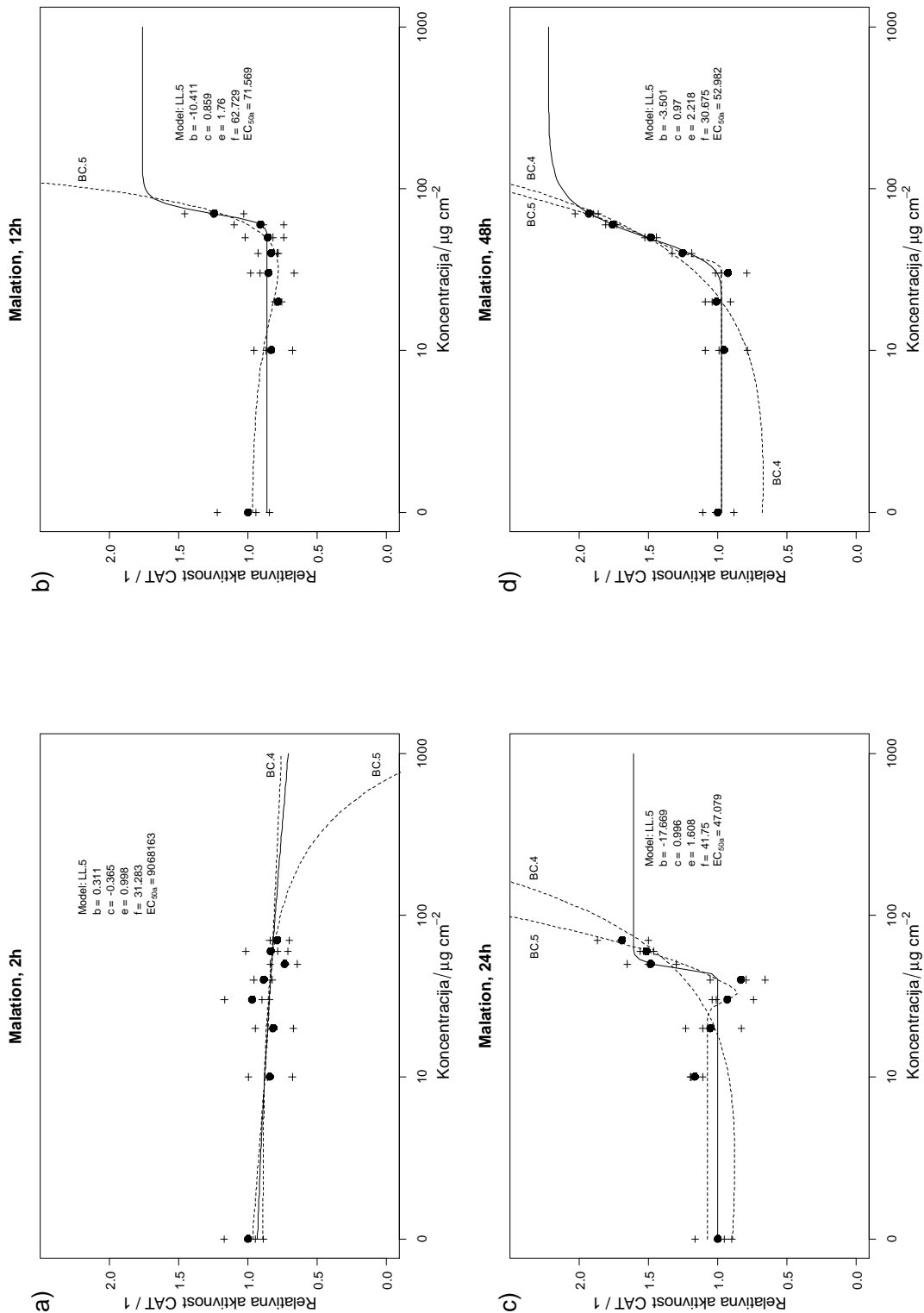
Niti jedna duljina izlaganja malationu nije izazvala promjenu aktivnosti GST ovisnu o dozi, no sva su izlaganja izazvala povećanje aktivnosti. To povećanje je malo nakon 2, 12 i 24 sata, ali nakon 48 sati izlaganja dolazi do snažnog povećanja aktivnosti GST (Slika 56).

**Tablica 12.** Prikaz EC10, EC50 i EC90 vrijednosti za AChE, CAT i GST pri četiri različita vremena izlaganja malationu 2, 12, 24, i 48 h s parametrima funkcije b, c, d, e i f.

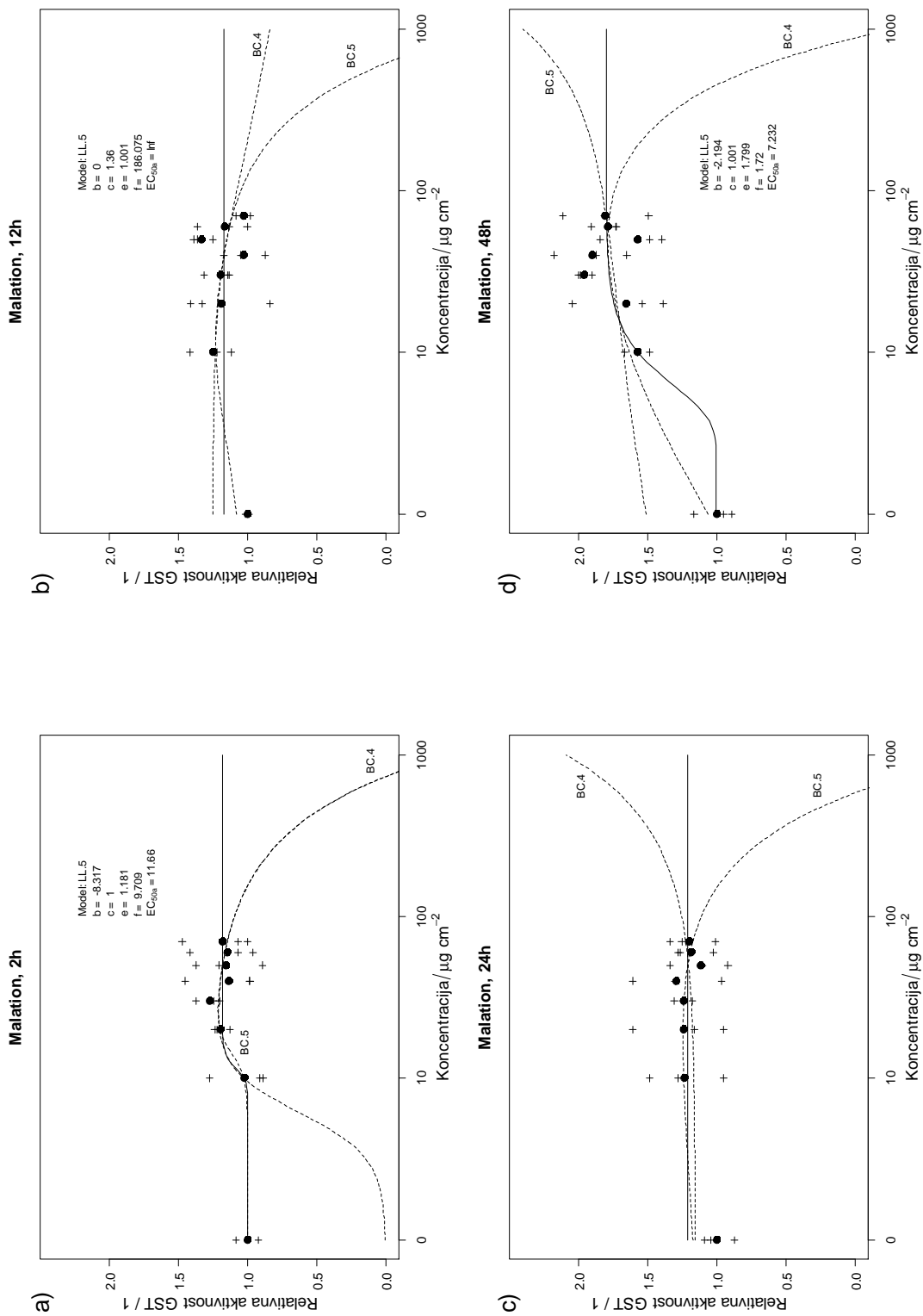
Malation Parametar	AChE				CAT				GST			
	2 h	12 h	24 h	48 h	2 h	12 h	24 h	48 h	2 h	12 h	24 h	48 h
EC10	6.86	23.95	3.21	3.58	16.36	62.07	43.65	35.85	9.80	NA	NA	4.10
EC50	24.79	>E	37.66	12.39	>E	71.57	47.08	52.99	11.66	NA	NA	7.24
EC90	66.97	>E	304.73	28.28	>E	86.58	52.52	92.29	14.78	NA	NA	17.21
b	1.56	1.73	0.84	1.54	0.32	-10.42	-17.67	-3.51	-8.32	0.00	0.00	-2.20
c	0.69	-1.62	-0.02	0.32	-0.37	0.86	1.00	0.97	1.00	1.36	1.87	1.01
d	1.00	1.01	1.00	1.00	1.00	1.76	1.61	2.22	1.19	1.01	1.00	1.80
e	52.04	14.91	83.23	79.13	31.29	62.73	41.75	30.68	9.71	186.08	>E	1.72
f	2.54	0.09	1.67	12.31	0.18	3.07	6.13	5.04	3.52	0.93	0.40	16.53



Slika 54. Promjena ovisnosti učinka malationa na aktivnost AChE pri četiri različita vremena izlaganja: a) 2 h; b) 12 h; c) 24 h i d) 48h.



Slika 55. Promjena ovisnosti učinka malationa na aktivnost CAT pri četiri različita vremena izlaganja: a) 2 h; b) 12 h; c) 24 h i d) 48h.



Slika 56. Promjena ovisnosti učinka malationa na aktivnost GST pri četiri različita vremena izlaganja: a) 2 h; b) 12 h; c) 24 h i d) 48h.

#### 4.2.4. Promjena ovisnosti učinka pirimifosmetila u odnosu na vrijeme izlaganja

##### 4.2.4.1. Aktivnost AChE

Pirimifosmetil je pokazao inhibitorni učinak na aktivnost AChE kod gujavica. Smanjenje aktivnosti je bilo ovisno o dozi kod sva četiri vremena izlaganja i aktivnosti su pratile logistički krivulju (LL 5 model). Inhibicija aktivnosti AChE je u ovisnosti o upotrebnoj koncentraciji pirimifosmetila pokazala i ovisnost o vremenu izlaganja, odnosno inhibitorni učinak je povećavao s povećanjem vremena izlaganja (Slika 57).

##### 4.2.4.2. Aktivnost CAT

Prva dva vremena izlaganja (2 i 12 h) pirimifosmetilu su izazvala lagano smanjenje aktivnosti CAT pri svim upotrebljenim koncentracijama, ali ne u ovisnosti o dozi. No, nakon 24 sata izlaganja, a još više nakon 48 sati izlaganja veće koncentracije pirimifosmetila su izazvale povećanje aktivnosti CAT i to u ovisnosti o dozi prateći logističku krivulju. Do znatnijeg povećanja aktivnosti dolazi nakon 48 h (Slika 58).

##### 4.2.4.3. Aktivnost GST

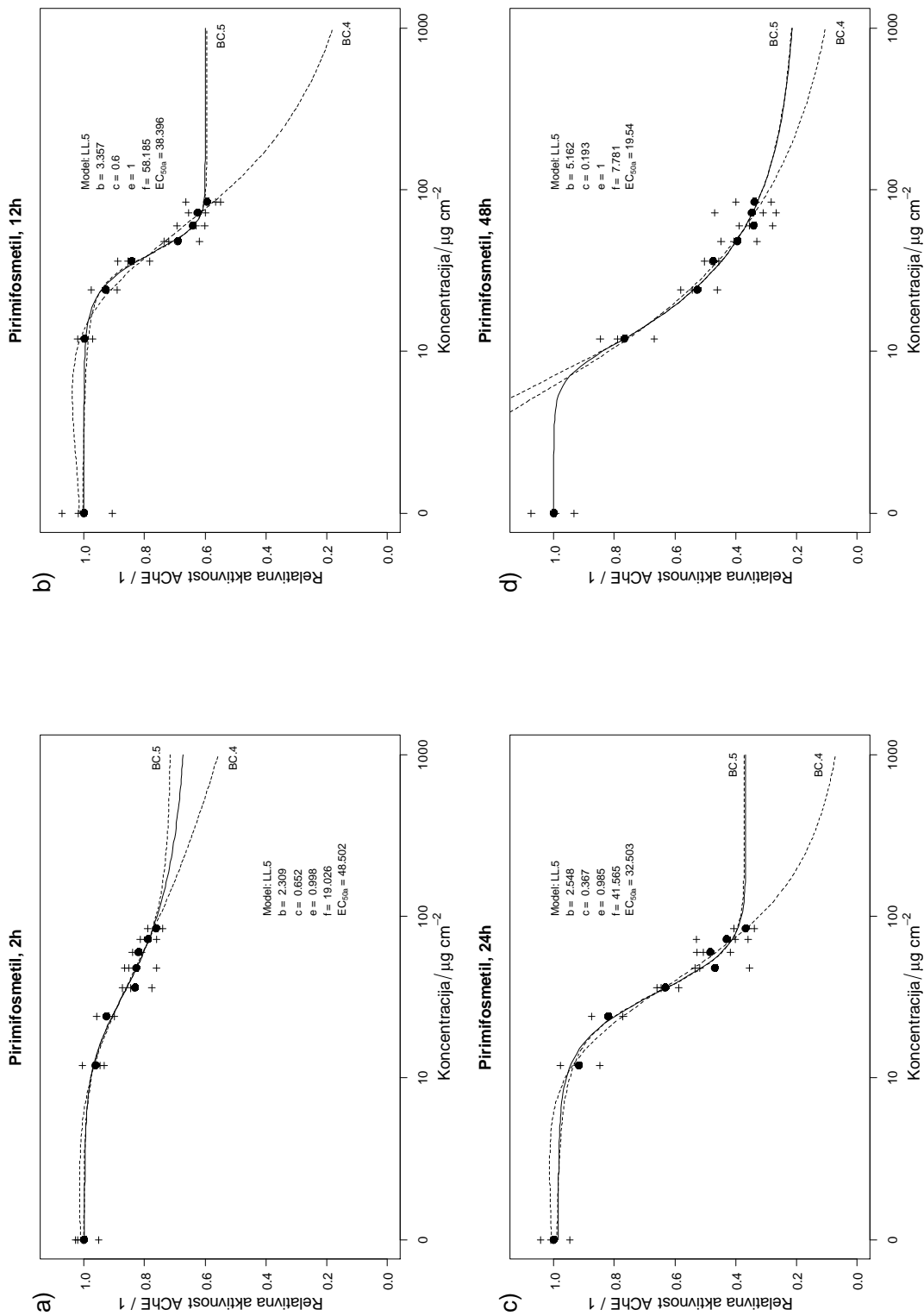
Nakon 2 sata izlaganja došlo je do promjena u aktivnosti GST, no one nisu pokazale ovisnost o dozi, neke koncentracije pirimifosmetila su izazvale smanjenje, a neke povećanje aktivnosti. Nakon 12 sati izlaganja dolazi do povećanja aktivnosti GST pri višim koncentracijama pirimifosmetila. To povećanje je veće nakon 24 sata izlaganja, a nakon 48 sati izlaganja povećanje aktivnosti GST su izazvale sve upotrebljene koncentracije pirimifosmetila (Slika 59).

EC50 vrijednosti kontinuirano su se smanjivale s povećanjem trajanja izlaganja u slučaju AChE, ali ne i u slučaju CAT i GST (Tablica 13).

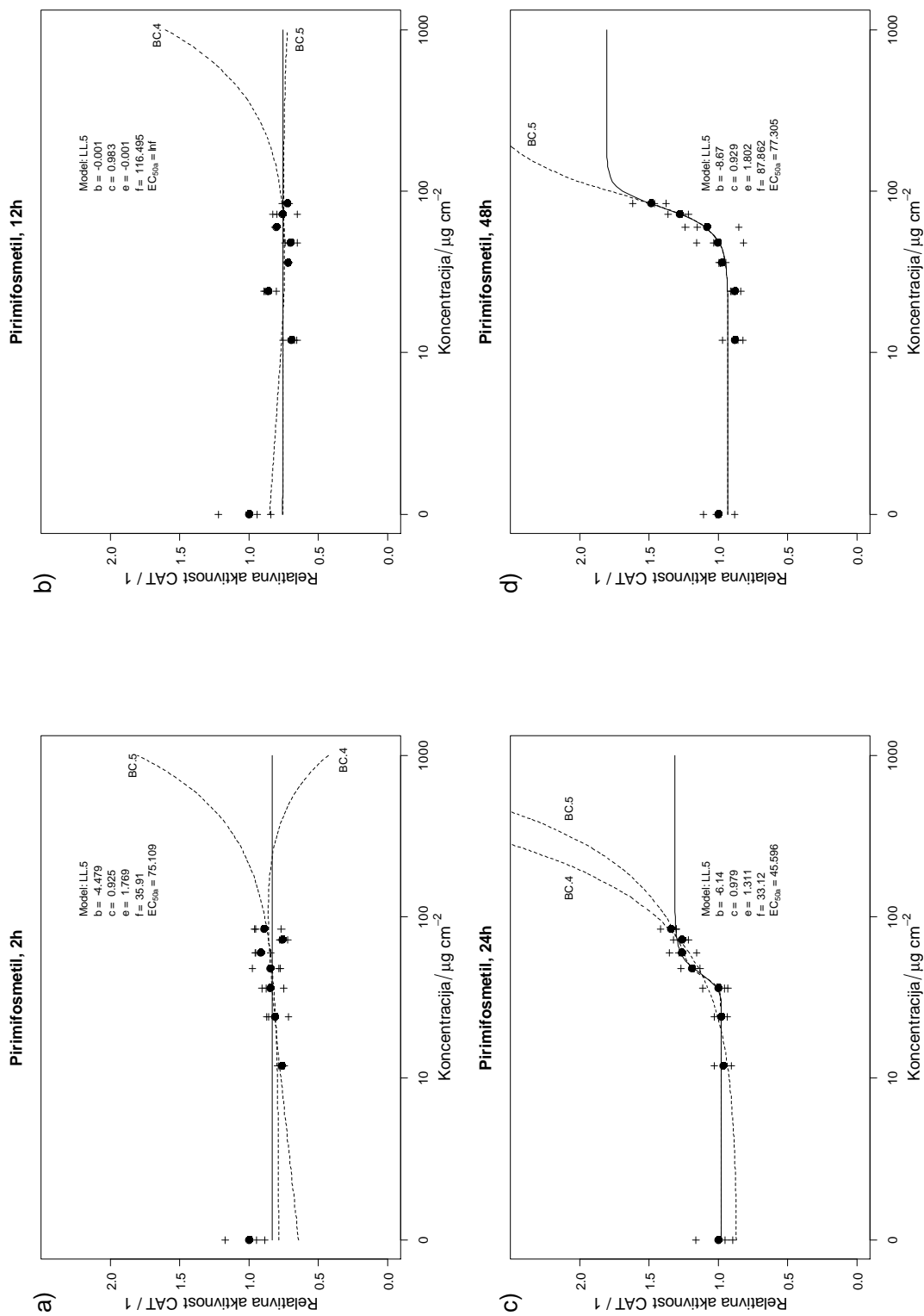
**Tablica 13.** Prikaz EC10, EC50 i EC90 vrijednosti za AChE, CAT i GST pri četiri različita vremena izlaganja pirimifosmetilu 2, 12, 24, i 48 h s parametrima funkcije b, c, d, e i f.

Pirimifosmetil Parametar	AChE				CAT				GST			
	2 h	12 h	24 h	48 h	2 h	12 h	24 h	48 h	2 h	12 h	24 h	48 h
EC10	12.97	21.29	14.41	7.88	7.88	0.01	36.54	51.55	58.58	63.28	24.89	12.22
EC50	48.51	38.40	32.51	19.54	19.54	NA	45.60	77.31	64.75	124.44	37.41	34.36
EC90	498.23	59.64	65.18	166.65	166.65	NA	62.55	103.78	73.87	187.22	66.72	57.86
b	2.31	3.36	2.55	5.17	0.00	-0.01	-6.14	-8.67	-15.11	-7.07	-3.36	-6.62
c	0.66	0.60	0.37	0.20	1.00	0.99	0.98	0.93	1.02	1.09	0.96	1.01
d	1.00	1.00	0.99	1.00	0.72	-0.01	1.32	1.81	1.24	3.08	1.57	1.97
e	19.03	58.19	41.57	7.79	>E	116.50	33.12	87.87	59.50	161.68	21.21	52.99
f	0.31	3.14	1.62	0.15	0.76	2.11	5.28	0.50	2.82	0.35	5.01	0.24

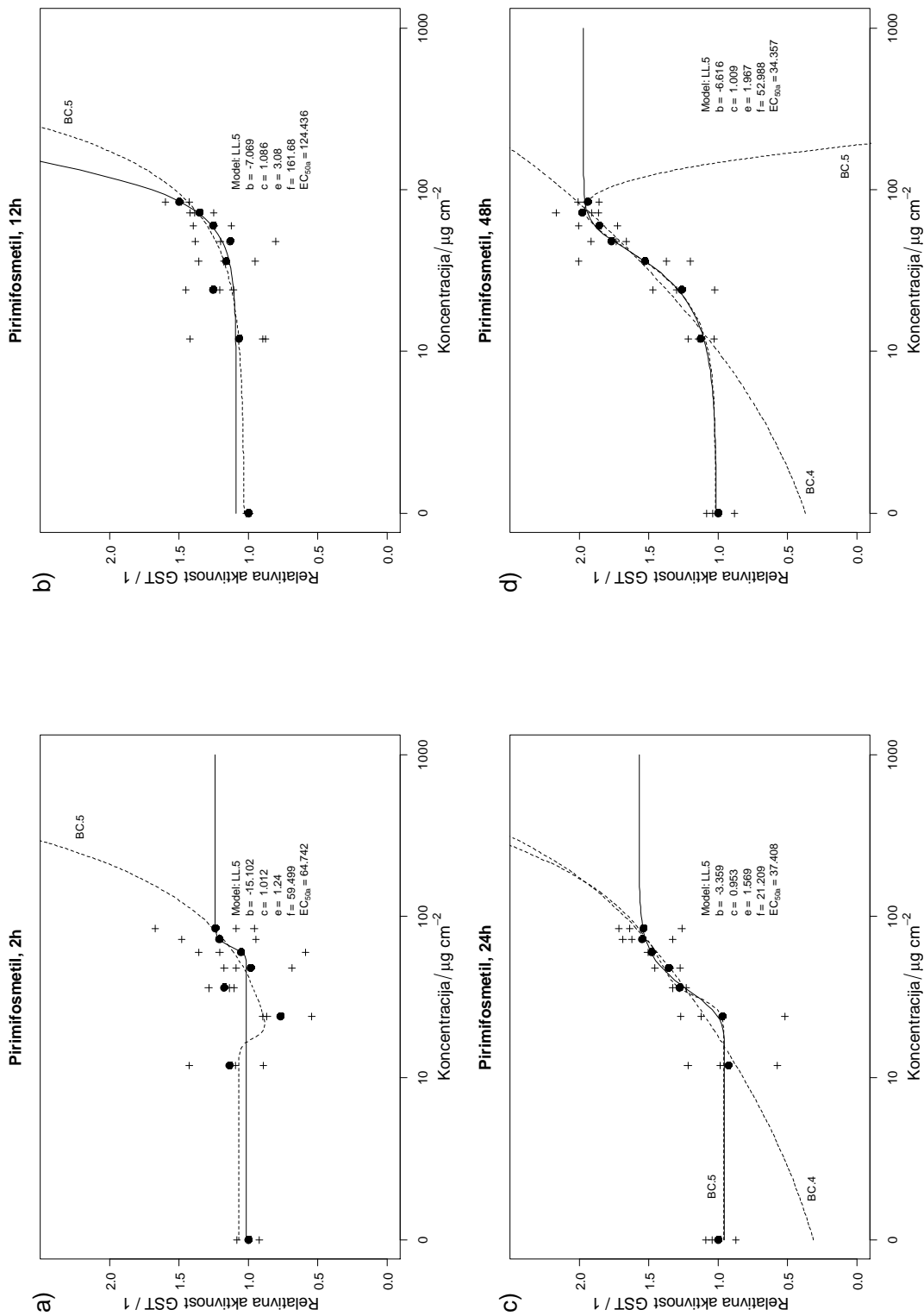




Slika 57. Promjena ovisnosti učinka pirimifosmetila na aktivnost AChE pri četiri različita vremena izlaganja: a) 2 h; b) 12 h; c) 24 h i d) 48h.



Slika 58. Promjena ovisnosti učinka pirimifosmetila na aktivnost CAT pri četiri različita vremena izlaganja: a) 2 h; b) 12 h; c) 24 h i d) 48h.



Slika 59. Promjena ovisnosti učinka pirimifosmetila na aktivnost GST pri četiri različita vremena izlaganja: a) 2 h; b) 12 h; c) 24 h i d) 48h.

#### 4.2.5. Promjena učinka terbutilazina u odnosu na vrijeme izlaganja

##### 4.2.5.1. Aktivnost AChE

Nakon 2 sata izlaganja samo je najmanja koncentracija terbutilazina izazvala smanjenje aktivnosti AChE, dok su sve ostale upotrebene koncentracije izazvale njeno povećanje, ali ne ovisno o dozi. Nakon 12 sati izlaganja vrijednost AChE aktivnosti pri najmanjoj koncentraciji terbutilazina izazvala je povećanje u odnosu na kontrolu, dok su se pri ostalim koncentracijama (osim dvije najveće) aktivnosti AChE smanjile u odnosu na kontrolu. Nakon 24 sata taj je raspored još uočljiviji, a takav ostaje i nakon 48 sati izlaganja (Slika 60).

##### 4.2.5.2. Aktivnost CAT

Tijekom niti jednog vremena izlaganja terbutilazinu aktivnost CAT nije pokazala ovisnost o dozi. Vrijednost aktivnosti CAT mijenja se tijekom vremena za svaku upotrebenu koncentraciju terbutilazina. Promatrajući vrijednosti aktivnosti CAT samo za najmanju koncentraciju terbutilazina vidimo da se ona nakon 2 sata izlaganja samo neznatno smanjila u odnosu na kontrolu, to se smanjenje povećalo nakon 12 i 24 sata izlaganja dok se nakon 48 sati vrijednost CAT aktivnosti povećala u odnosu na kontrolu (Slika 61).

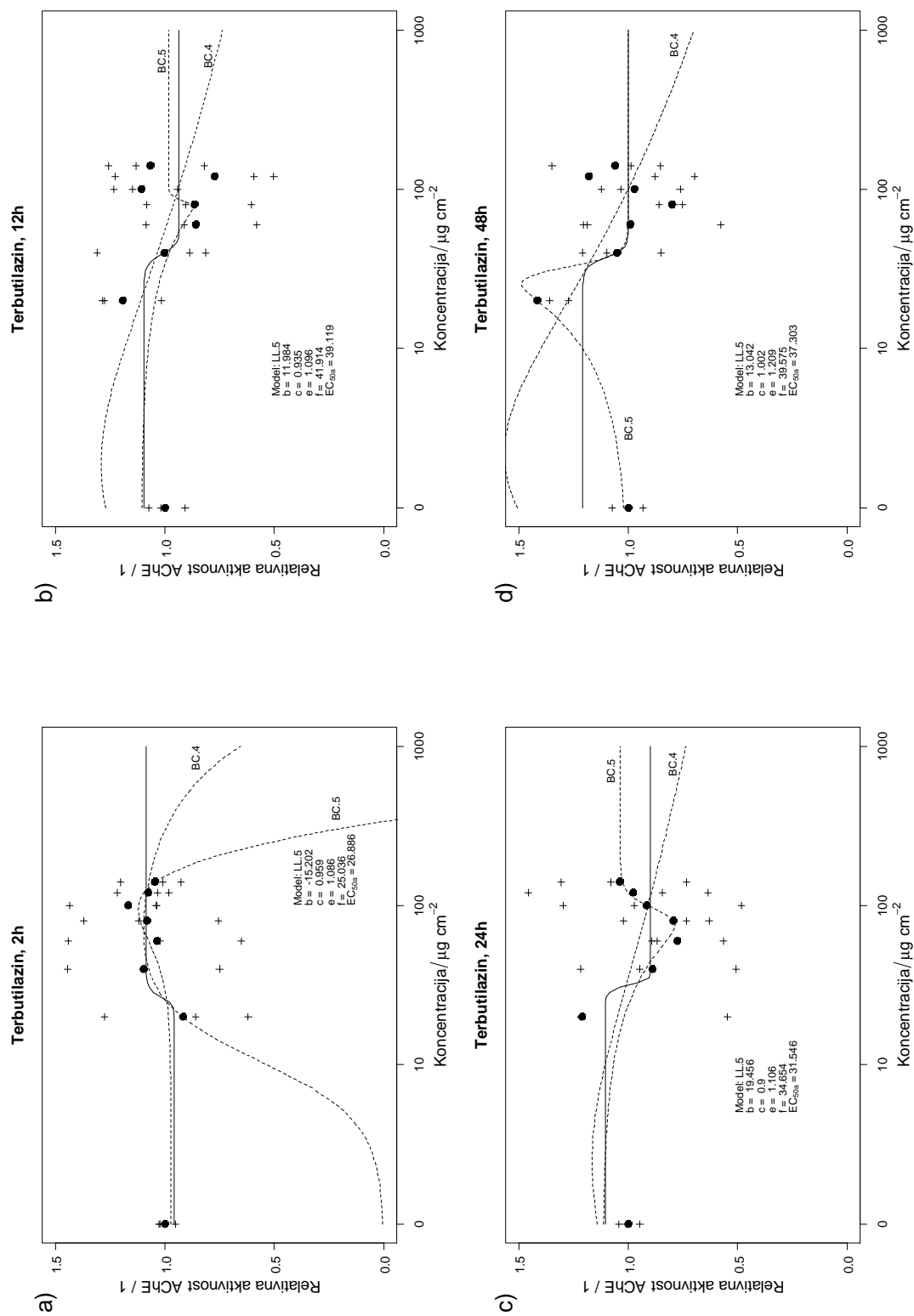
##### 4.2.5.3. Aktivnost GST

Sve osim najmanje koncentracije terbutilazina su nakon 2 sata izlaganja izazvale povećanje aktivnosti GST u odnosu na kontrolu. Nakon 12 sati izlaganja dogodio se suprotni učinak, naime osim kod najmanje koncentracije (koja je i dalje jednaka vrijednosti kontrole) aktivnosti GST su se pri svim ostalim koncentracijama smanjile u odnosu na kontrolu. Ponovni obrat dogodio se nakon 24 sata izlaganja kada su se vrijednosti aktivnosti povećale u odnosu na kontrolu. Nakon 24 sata izlaganja i vrijednost GST pri najmanjoj upotrebnoj koncentraciji terbutilazina se promijenila, odnosno smanjila na vrijednost GST aktivnosti u kontroli. Ta se aktivnost (pri najmanjoj koncentraciji) ponovno mijenja nakon 48 sati izlaganja i dolazi do povećanja u odnosu na kontrolu, dok su vrijednosti GST aktivnosti pri svim ostalim koncentracijama više-manje jednake onoj u kontroli (Slika 62).

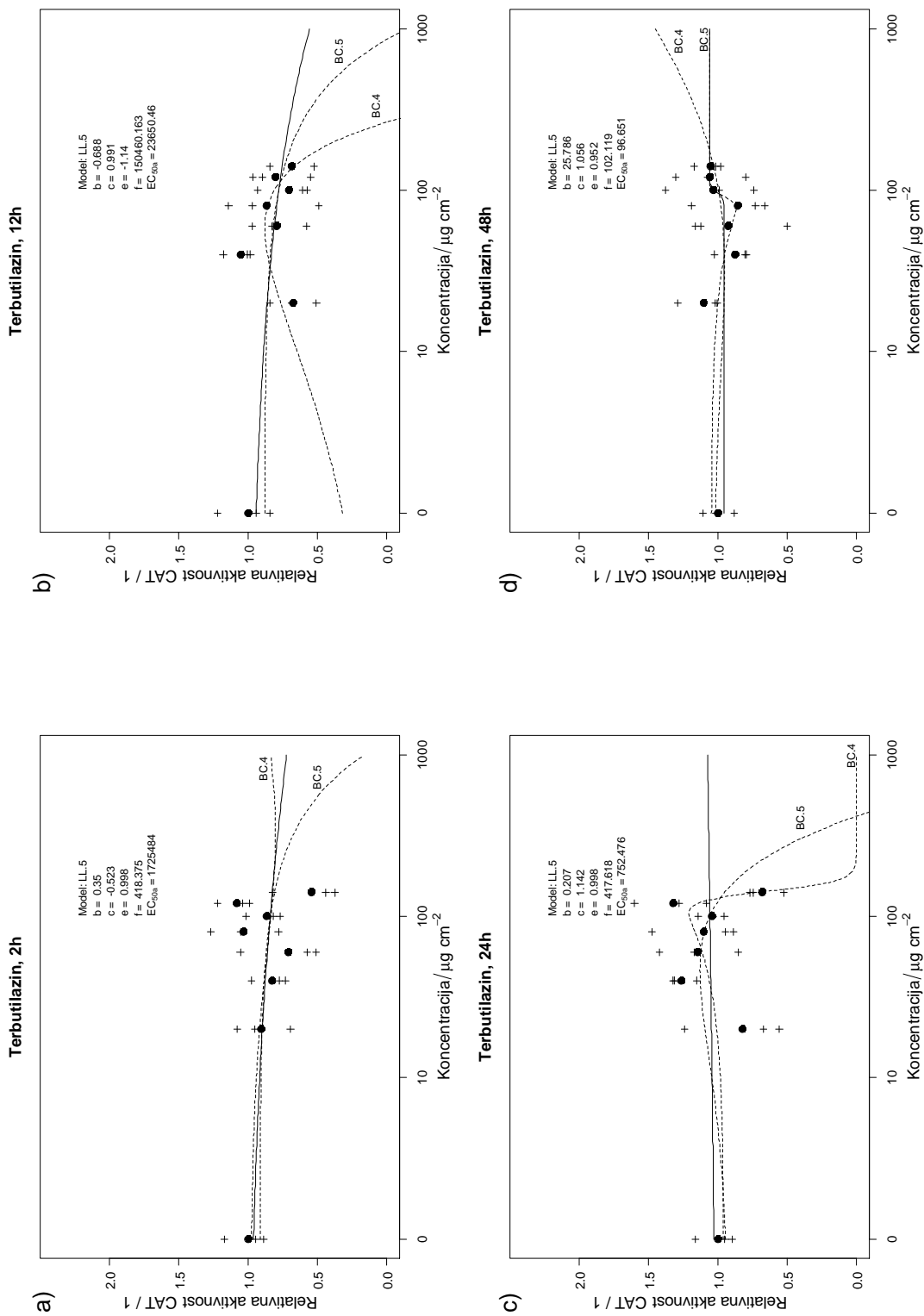
Vrijednosti EC10, EC50 i EC90 neravnomijerno su se mijenjale s povećanjem vremena izlaganja i to u slučaju sva tri enzima (Tablica 14).

**Tablica 14.** Prikaz EC10, EC50 i EC90 vrijednosti za AChE, CAT i GST pri četiri različita vremena izlaganja terbutilazin 2, 12, 24, i 48 h s parametrima funkcije b, c, d, e i f.

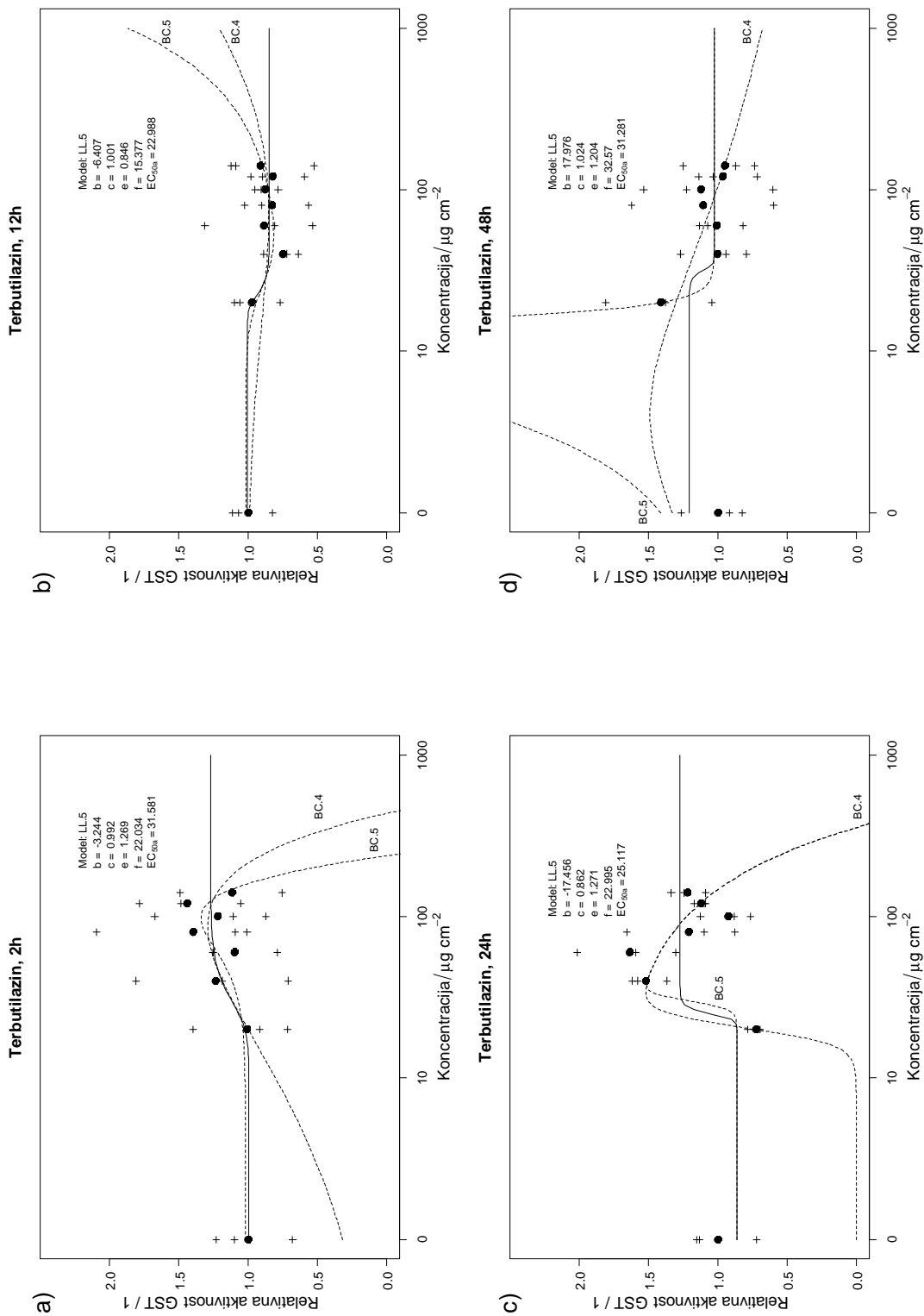
Terbutilazin Parametar	AChE				CAT				GST			
	2 h	12 h	24 h	48 h	2 h	12 h	24 h	48 h	2 h	12 h	24 h	48 h
EC10	24.25	32.99	28.55	31.88	83.39	98.82	0.02	89.52	19.62	18.81	23.13	27.90
EC50	26.89	39.12	31.55	37.31	>E	>E	752.48	96.66	31.59	22.99	25.12	31.29
EC90	30.69	45.00	33.87	42.51	>E	>E	>E	102.33	58.54	31.00	28.12	34.43
b	-15.21	11.99	19.46	13.05	0.35	-0.69	0.21	25.79	-3.25	-6.41	-17.46	17.98
c	0.96	0.94	0.90	1.01	-0.53	1.00	1.15	1.06	1.00	1.01	0.87	1.03
d	1.09	1.10	1.11	1.21	1.00	-1.14	1.00	0.96	1.27	0.85	1.28	1.21
e	25.04	41.92	34.66	39.58	418.38	>E	417.62	102.12	22.04	15.38	23.00	32.57
f	2.38	1.92	4.66	1.83	0.24	0.46	0.92	3.20	2.56	9.46	3.58	1.76



Slika 60. Promjena ovisnosti učinka terbutilazina na aktivnost AChE pri četiri različita vremena izlaganja: a) 2 h; b) 12 h; c) 24 h i d) 48h.



Slika 61. Promjena ovisnosti učinka terbutilazina na aktivnost CAT pri četiri različita vremena izlaganja: a) 2 h; b) 12 h; c) 24 h i d) 48h.



Slika 62. Promjena ovisnosti učinka terbutilazina na aktivnost GST pri četiri različita vremena izlaganja: a) 2 h; b) 12 h; c) 24 h i d) 48

#### 4.2.6. Promjena ovisnosti učinka metolaktora u odnosu na vrijeme izlaganja

##### 4.2.6.1. Aktivnost AChE

Metolaktor nije izazvao promjene aktivnosti AChE ovisne o dozi i trajanju izlaganja. Nakon 2, 12 i 24 sata izlaganja različite koncentracije metolaktora su izazvale neznatno povećanje ili smanjenje aktivnosti AChE. No, nakon 48 sati izlaganja sve upotrebene koncentracije metolaktora izazvale su povećanje aktivnosti AChE u odnosu na kontrolu (Slika 63).

##### 4.2.6.2. Aktivnost CAT

Kod prva dva vremena izlaganja (2 i 12 h) došlo je do smanjenja aktivnosti CAT. Nakon 24 sata smanjenje aktivnosti pri nižim koncentracijama metolaktora je bilo manje, dok su veće koncentracije izazvale povećanje aktivnosti. Nakon 48 sati došlo je do podjele aktivnosti u dvije grupe: vrijednosti CAT kod prve tri upotrebene koncentracije metolaktora su bile više-manje jednake onoj u kontroli dok su četiri više koncentracije metolaktora izazvale povećanje aktivnosti CAT (Slika 64). EC50 vrijednosti nakon 2 i 12 bile su puno manje u odnosu na vrijednost nakon 24 i 48 h (Tablica 15).

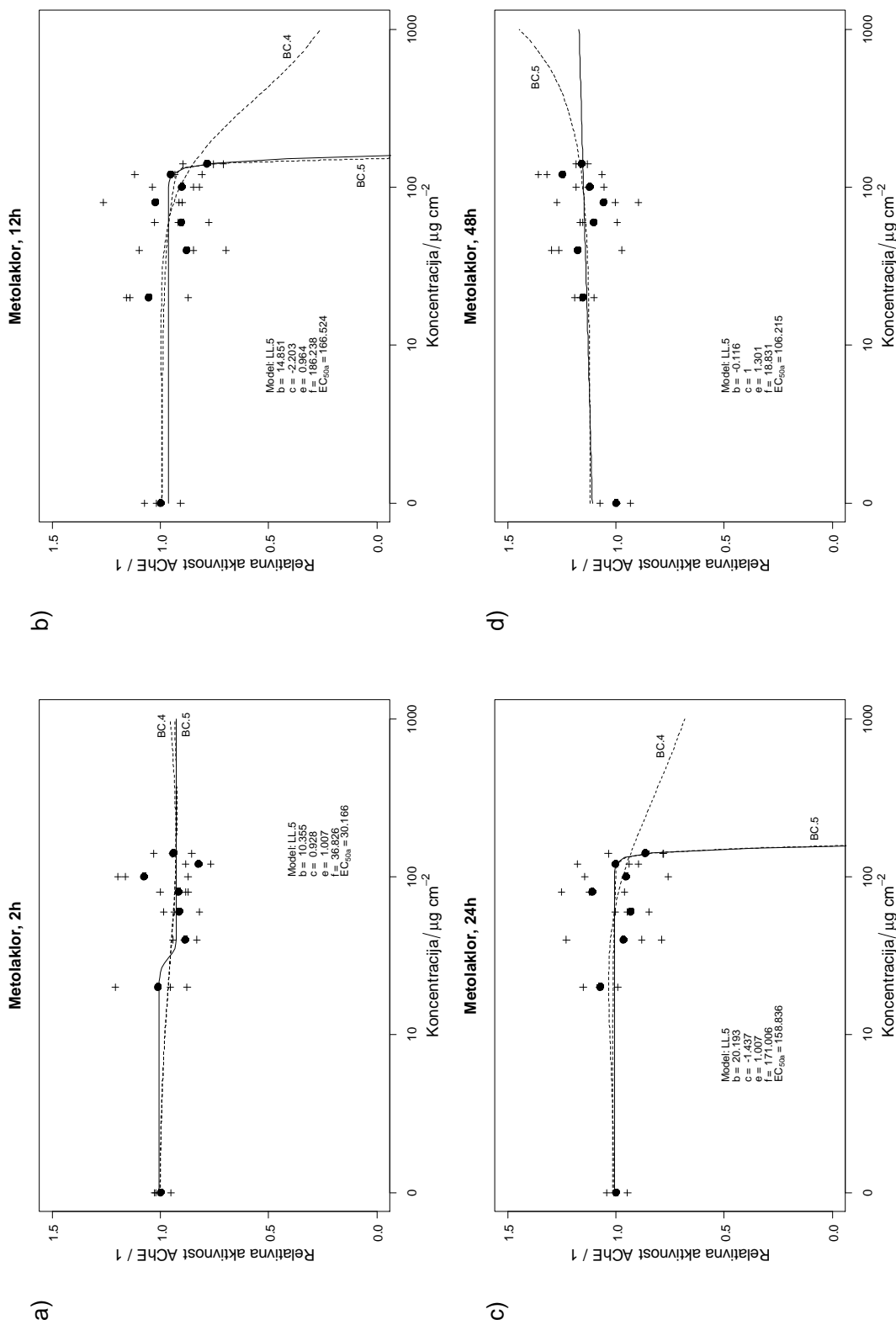
##### 4.2.6.3. Aktivnost GST

Nakon 2 sata izlaganja došlo je do smanjenja aktivnosti GST u odnosu na kontrolu, no nakon 12 sati vrijednosti GST aktivnosti su se vratile na vrijednosti približne vrijednosti GST aktivnosti u kontroli. Nakon 24 i 48 sati izlaganja dolazi do promjene, naime niže upotrebene koncentracije metolaktora nisu pokazale značajniji utjecaj na GST aktivnost, no više su koncentracije dovele do njezinog povećanja, koje pokazuju ovisnost o dozi (Slika 65).

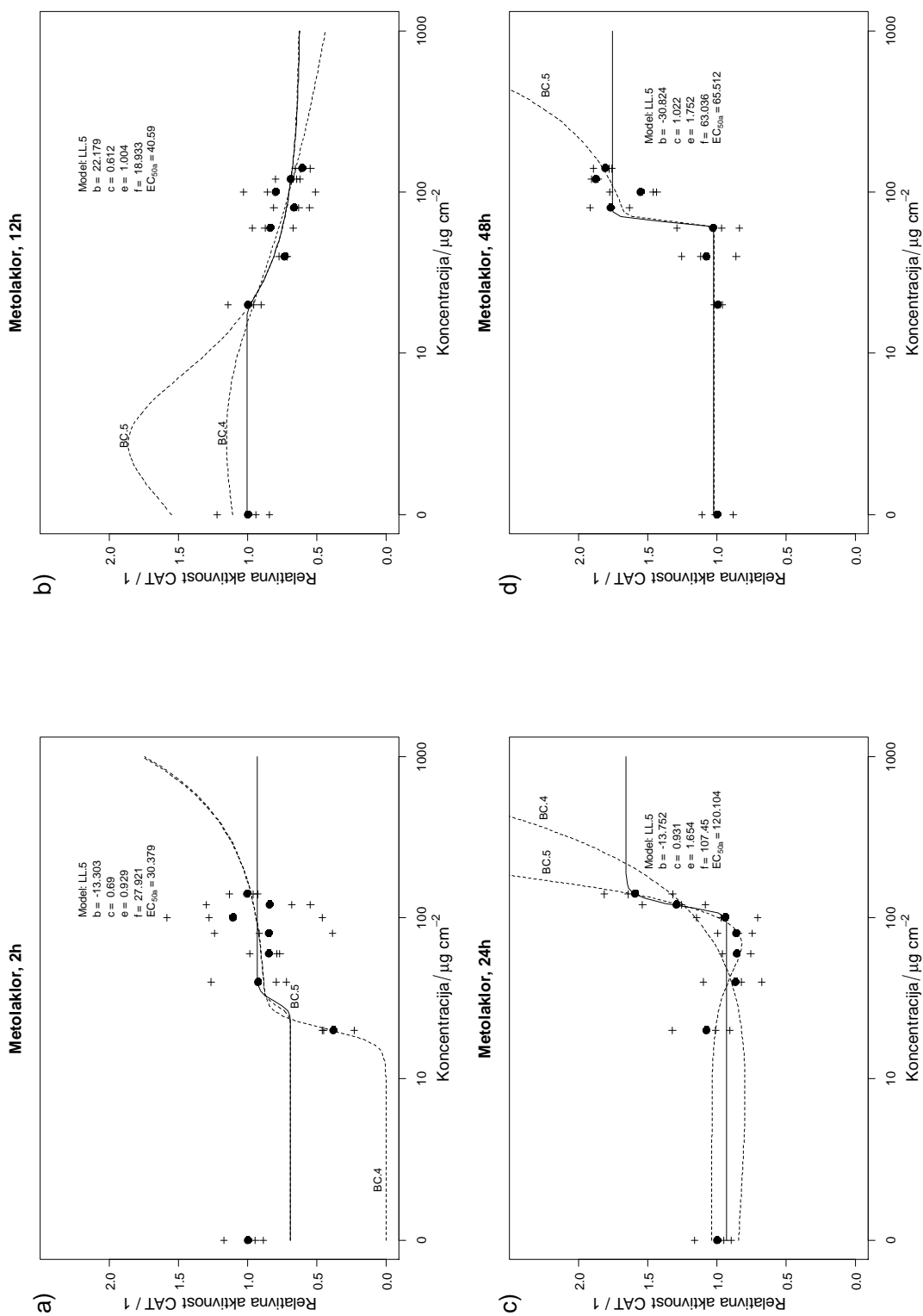
**Tablica 15.** Prikaz EC10, EC50 i EC90 vrijednosti za AChE, CAT i GST pri četiri različita vremena izlaganja metolaktoru 2, 12, 24, i 48 h s parametrima funkcije b, c, d, e i f.

Metolaktor Parametar	AChE				CAT				GST			
	2 h	12 h	24 h	48 h	2 h	12 h	24 h	48 h	2 h	12 h	24 h	48 h
EC10	25.03	145.95	144.07	0.01	27.02	21.19	108.14	62.33	175.84	>E	79.24	67.77
EC50	30.17	166.53	158.84	106.22	30.38	40.59	120.11	65.52	305.13	>E	100.53	128.81
EC90	34.36	183.18	170.70	>E	35.33	238.48	138.59	69.91	449.34	>E	141.55	317.13
b	10.36	14.86	20.20	-0.12	-13.31	22.18	-13.76	-30.83	3.53	0.43	-5.66	-2.17
c	0.93	-2.21	-1.44	1.00	0.69	0.62	0.94	1.03	-6.63	-1.92	1.04	0.95
d	1.01	0.97	1.01	1.31	0.93	1.01	1.66	1.76	0.94	1.00	2.05	2.14
e	36.83	186.24	171.01	18.84	27.93	18.94	107.45	63.04	530.12	224.17	69.86	56.45
f	5.81	3.99	3.42	1.16	2.46	0.05	3.54	2.61	5.19	0.08	5.77	4.48

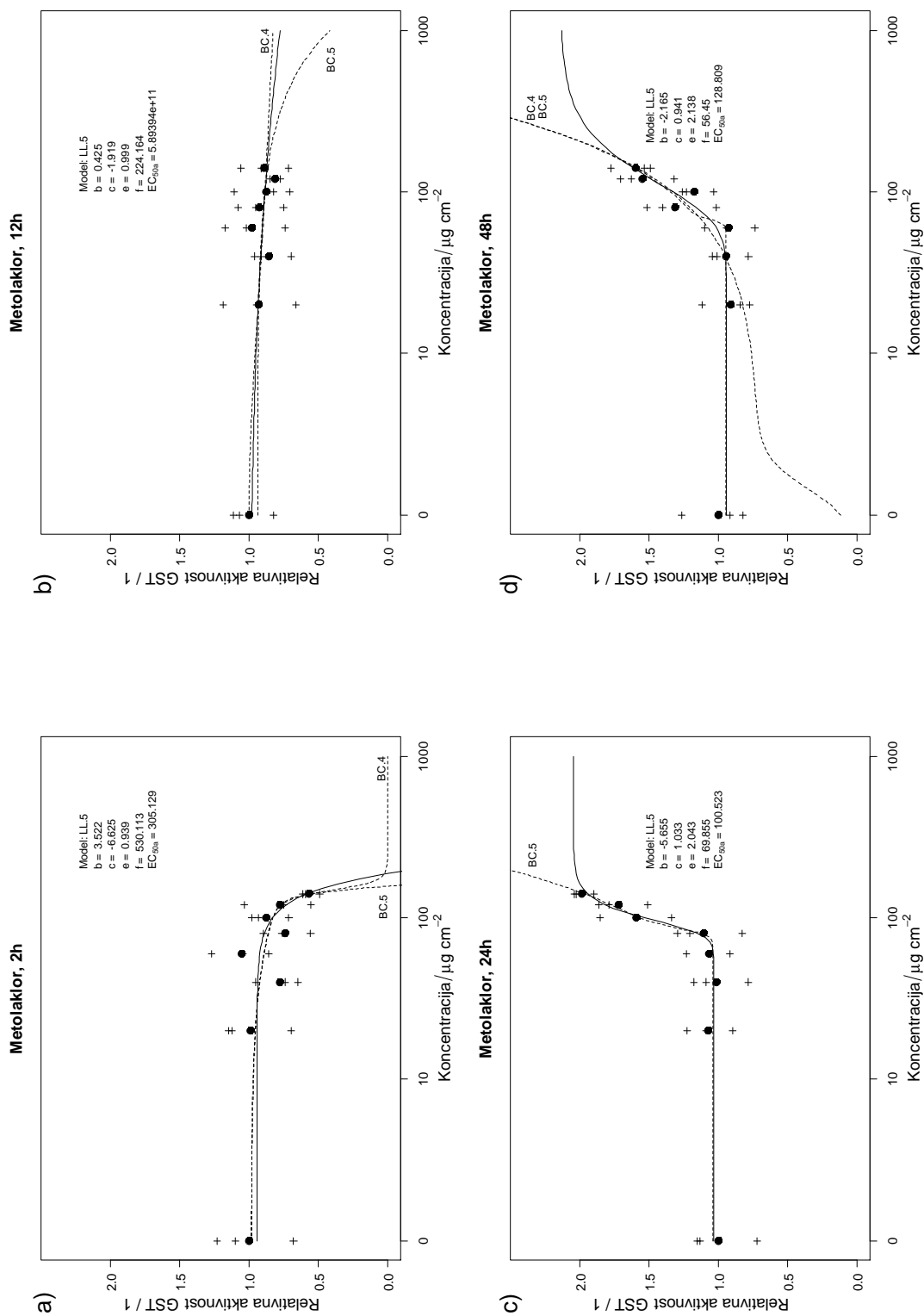




Slika 63. Promjena ovisnosti učinka metolaklor na aktivnost AChE pri četiri različita vremena izlaganja: a) 2 h; b) 12 h; c) 24 h i d) 48h.



Slika 64. Promjena ovisnosti učinka metolaklora na aktivnosti CAT pri četiri različita vremena izlaganja: a) 2 h; b) 12 h; c) 24 h i d) 48h.



Slika 65. Promjena ovisnosti učinka metolaklora na aktivnost GST pri četiri različita vremena izlaganja: a) 2 h; b) 12 h; c) 24 h i d) 48h.

#### 4.2.7. Promjena ovisnosti učinka bentazona u odnosu na vrijeme izlaganja

##### 4.2.7.1. Aktivnost AChE

Kod dva najmanja vremena izlaganja (2h i 12 h) pri srednje upotrebljenim koncentracijama bentazona došlo je do povećanja aktivnosti AChE. Nakon 24 h izlaganja najmanja koncentracija bentazona je izazvala inhibiciju aktivnosti AChE, dok su ostale aktivnosti bile približno jednake kontroli. Nakon 48 h izlaganja ponovno je došlo do promjene, te je došlo do inhibicije aktivnosti AChE pri najvećim koncentracijama bentazona, ujedno pri ovoj duljini izlaganja se krivulja ovisnosti o dozi najbolje mogla opisati Brain-Cousens-ovim 4-ero i 5-ero parametarskim modelom (BC 4 i BC 5) (Slika 66).

##### 4.2.7.2. Aktivnost CAT

Pri srednje upotrebljenim koncentracijama bentazona došlo je to značajnog smanjenja aktivnosti CAT nakon 12 sati izlaganja, pa se stoga ta krivulja ovisnosti o dozi mogla najbolje opisati Brain-Cousens-ovim 5-ero parametarskim modelom (BC 5), ukazujući na hormetički učinak bentazona na aktivnost CAT pri tim koncentracijama i tom vremenu izlaganja. Nakon 2, 24 i 48 h izlaganja vrijednosti aktivnosti CAT su se kretale oko vrijednosti CAT u kontroli, te ih niti jedan model ne opisuje u dovoljnoj mjeri (Slika 67).

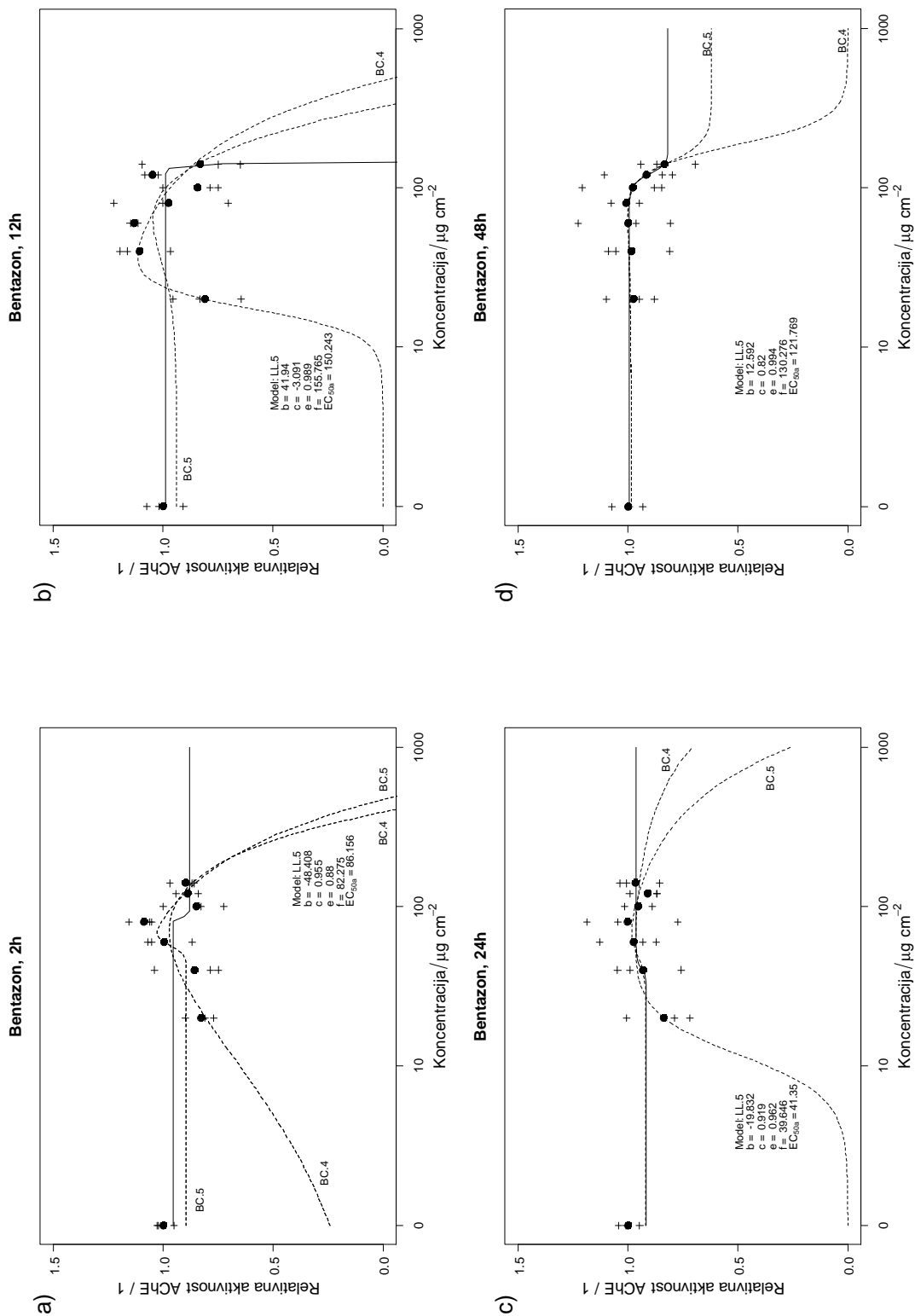
##### 4.2.7.3. Aktivnost GST

Dinamiku učinka bentazona na aktivnost GST možemo podijeliti na onu nakon 2 i 48 sati izlaganja i onu nakon 12 i 24 sata izlaganja. Naime, krivulja ovisnosti o dozi nakon 2 i 48 sati izlaganja bentazonu može se najbolje opisati 5-ero parametarskim Brain–Cousens-ovim modelom (BC 5) gdje nakon prvotnog porasta aktivnosti GST dolazi do njene inhibicije pri srednje upotrebljavanim koncentracijama, te nakon toga do njenog porasta ukazujući na hormetički izgled krivulje (Slika 68). Situacija je nešto drugačija nakon 12 sati izlaganja gdje dolazi do pada vrijednosti aktivnosti pri najvišim koncentracijama, te u suprotnosti s tim nakon 24 sata izlaganja kada dolazi do povećanja aktivnosti GST pri tim istim koncentracijama u odnosu na kontrolu.

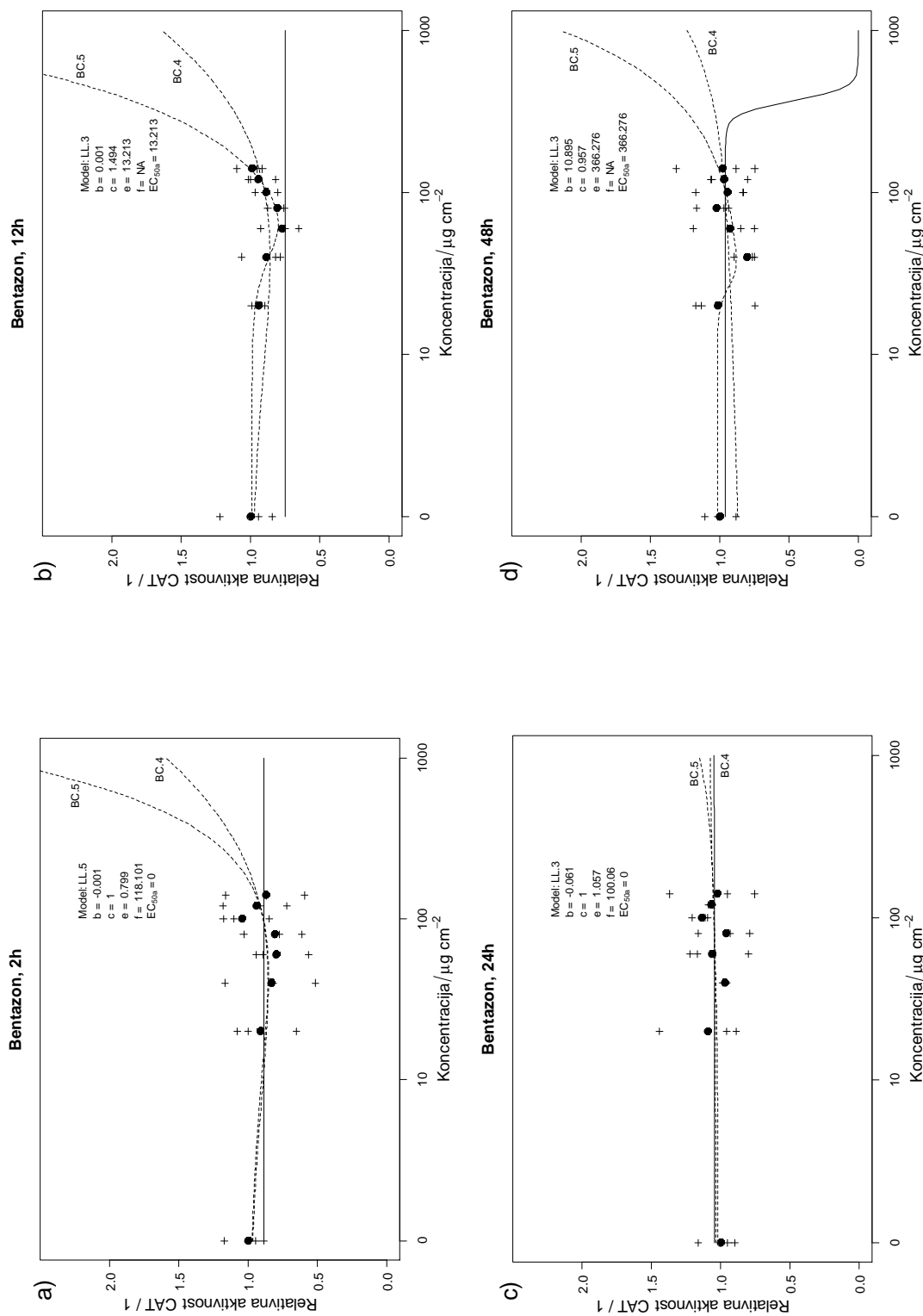
EC10, EC50 i EC90 vrijednosti neravnomijerno se mijenjaju s povećanjem vremena izlaganja u slučaju sva tri enzima (Tablica 16).

**Tablica 16.** Prikaz EC10, EC50 i EC90 vrijednosti za AChE, CAT i GST pri četiri različita vremena izlaganja bentazonu 2, 12, 24, i 48 h s parametrima funkcije b, c, d, e i f.

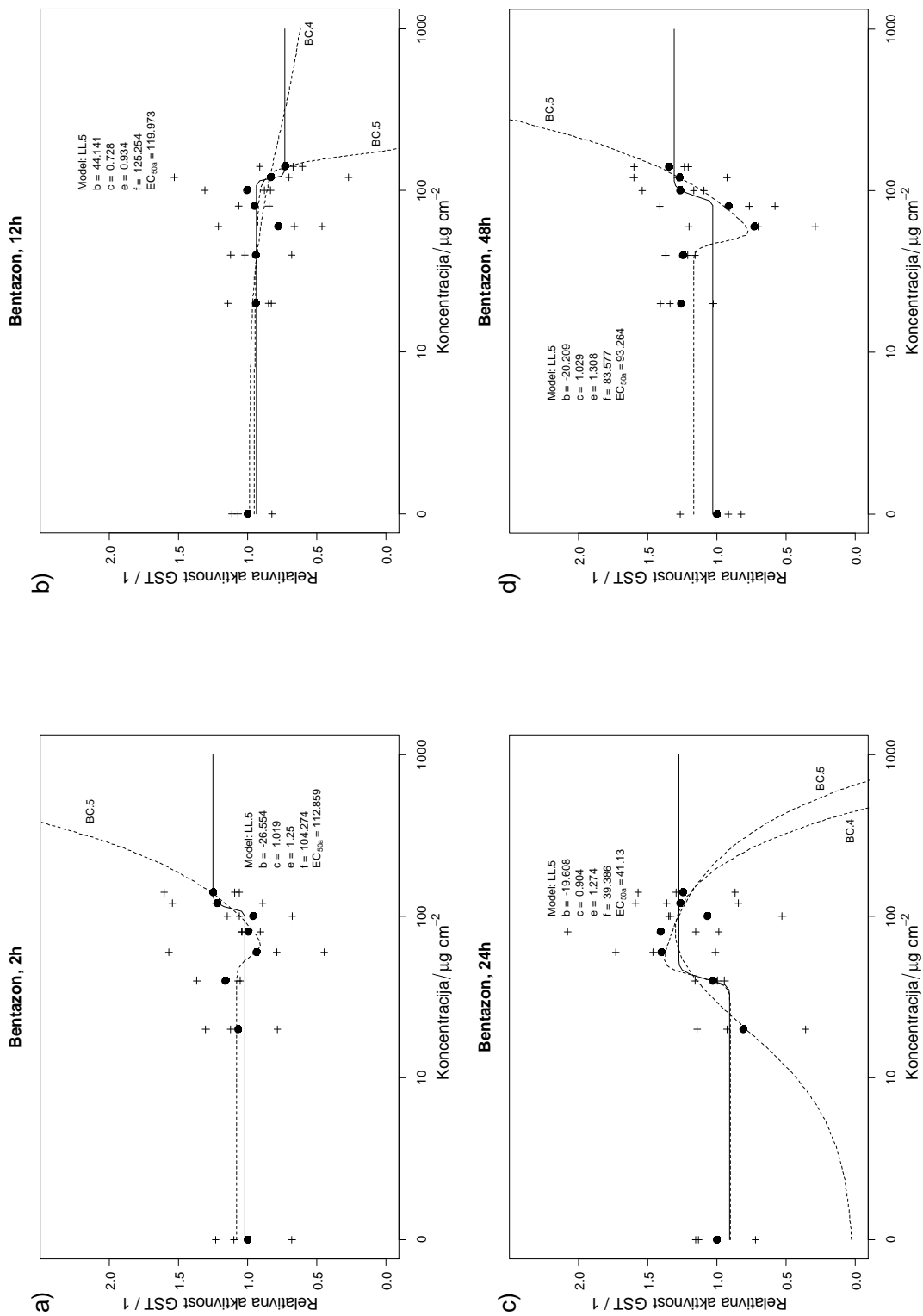
Bentazon Parametar	AChE				CAT				GST			
	2 h	12 h	24 h	48 h	2 h	12 h	24 h	48 h	2 h	12 h	24 h	48 h
EC10	83.84	143.35	38.01	103.56	83.21	0.00	0.01	299.39	107.31	114.81	37.78	87.35
EC50	86.16	150.25	41.36	121.77	85.81	13.22	0.01	366.28	112.86	119.98	41.14	93.27
EC90	89.66	155.53	45.84	139.00	89.84	NA	>E	448.12	121.39	123.76	45.65	102.61
b	-48.41	41.94	-19.84	12.60	-41.71	-0.01	-0.07	-0.07	-26.56	44.15	-19.61	-20.21
c	0.96	-3.10	0.92	0.82	0.88	1.01	1.00	1.00	1.02	0.73	0.91	1.03
d	0.88	0.99	0.97	1.00	0.98	0.73	1.06	1.06	1.25	0.94	1.28	1.31
e	82.28	155.77	39.65	130.28	80.58	151.40	100.06	100.06	104.28	125.26	39.39	83.58
f	6.80	3.49	1.93	1.95	9.90	1.21	0.39	0.39	6.01	4.98	1.95	6.70



Slika 66. Promjena ovisnosti učinka bentazona na aktivnost AChE pri četiri različita vremena izlaganja: a) 2 h; b) 12 h; c) 24 h i d) 48h.



Slika 67. Promjena ovisnosti učinka bentazona na aktivnost CAT pri četiri različita vremena izlaganja: a) 2 h; b) 12 h; c) 24 h i d) 48h.



Slika 68. Promjena ovisnosti učinka bentazona na aktivnost GST pri četiri različita vremena izlaganja: a) 2 h; b) 12 h; c) 24 h i d) 48h.

#### 4.3. Ovisnost mortaliteta o dozi za pojedinačne pesticide nakon 24 i 48 h izlaganja

Krivulje ovisnosti mortaliteta o dozi prikazane su na Slici 69 i 70, dok su  $LC_{10}$ ,  $LC_{50}$  i  $LC_{90}$  vrijednosti za pojedinačne pesticide nakon 24 i 48 h prikazane u Tablici 17. Najveću toksičnost pokazao je endosulfan čija je  $LC_{50}$  vrijednost nakon 24 h iznosila  $1,78 \mu\text{g cm}^{-2}$ , a nakon 48 h  $1,00 \mu\text{g cm}^{-2}$  (Slika 69 a), te temefos čija je  $LC_{50}$  vrijednost nakon 24 h iznosila  $2,59 \mu\text{g cm}^{-2}$ , a nakon 48 h  $LC_{50}$  je iznosila  $2,14 \mu\text{g cm}^{-2}$  (Slika 69 d). Za malation  $LC_{50}$  vrijednost nakon 24 h je iznosila  $52,60 \mu\text{g cm}^{-2}$ , a nakon 48 h  $39,39 \mu\text{g cm}^{-2}$ . Iz krivulje ovisnosti mortaliteta o koncentraciji vidljivo je da je najmanju toksičnost imao pirimifosmetil kod kojeg je nakon 24 h  $LC_{50}$  iznosila  $75,05 \mu\text{g cm}^{-2}$ , a nakon 48 h  $LC_{50}$   $61,34 \mu\text{g cm}^{-2}$  (Slika 69 c).

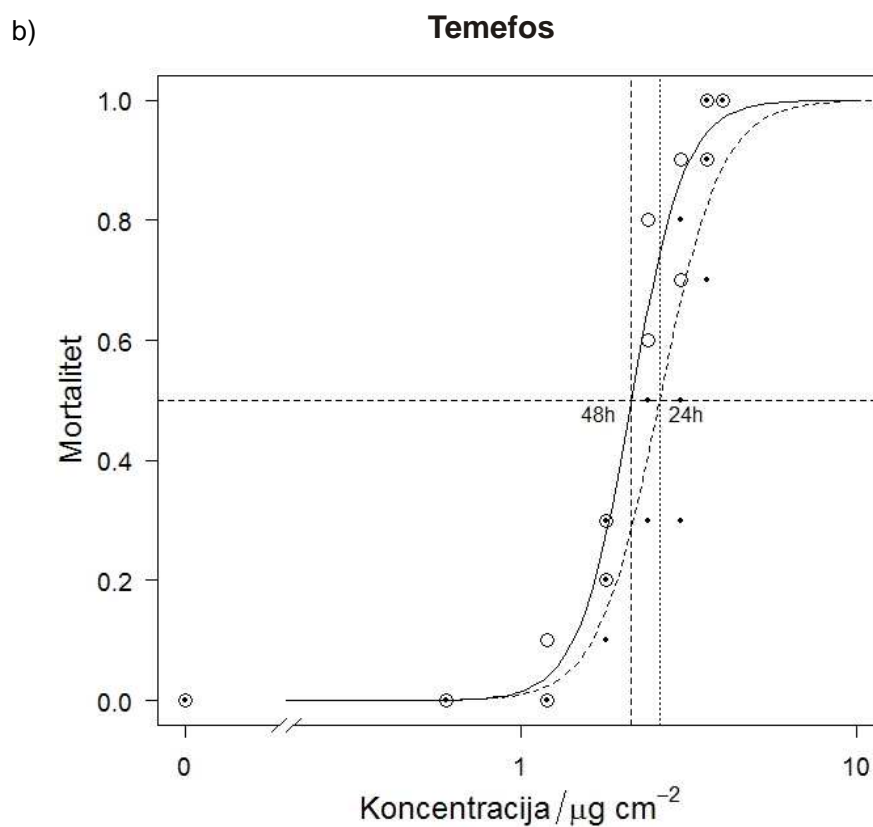
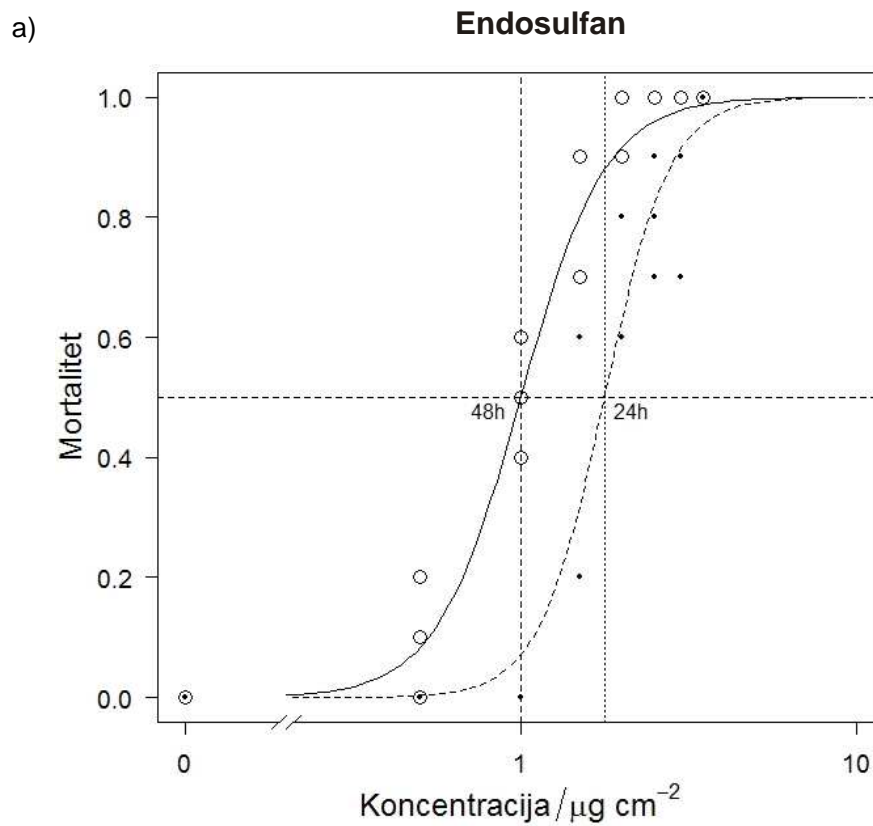
Usporedimo li krivulje ovisnosti mortaliteta o koncentraciji za 24 i 48 h za sve navedene insekticide vidljivo je da endosulfan i temefos pokazuju najveću toksičnost. Krivulje ovisnosti mortaliteta o koncentraciji za malation i pirimifosmetil nakon 24 i 48 h nalaze se u području većih koncentracija u odnosu na endosulfan i temefos te je stoga njihova toksičnost manja (Slika 70).

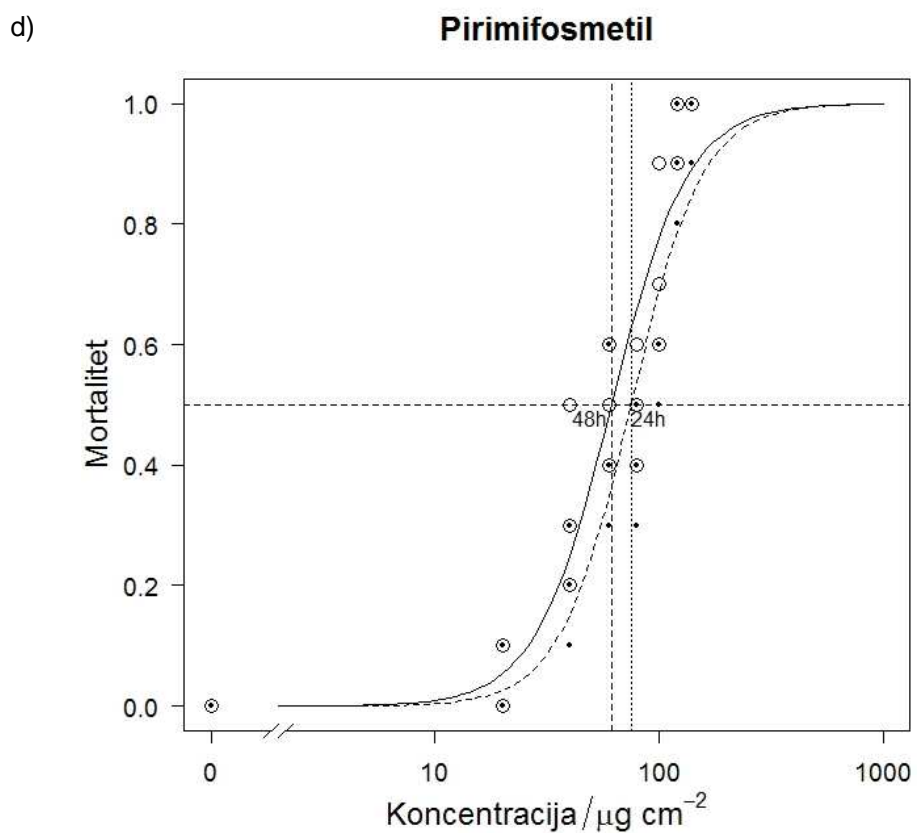
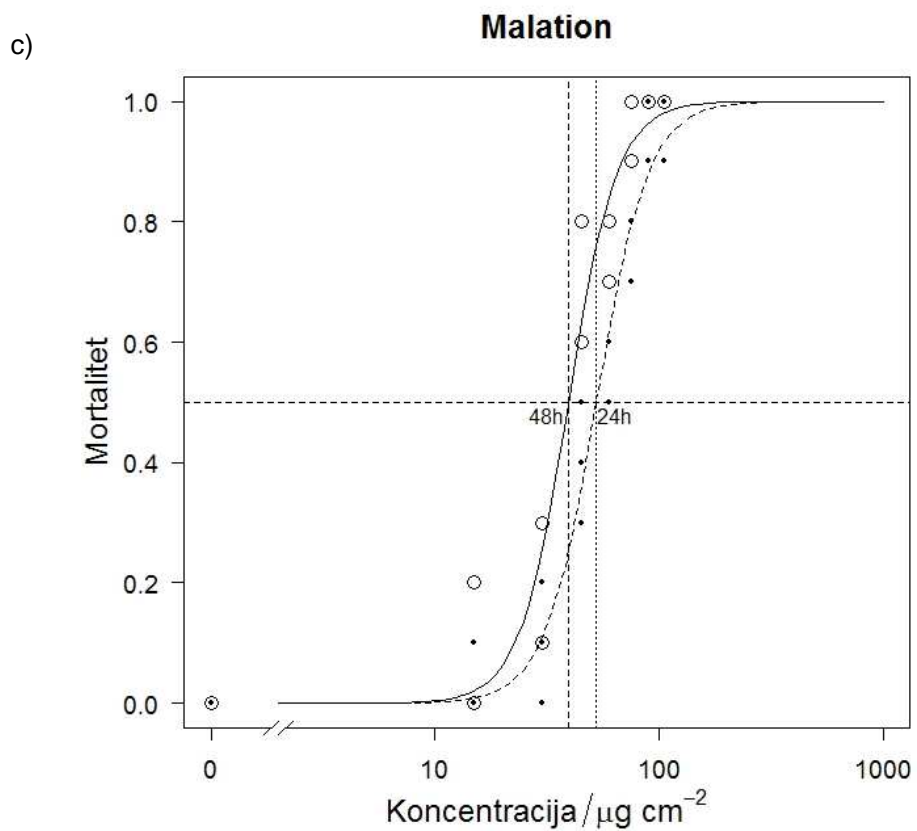
Sve krivulje za navedene insekticide pokazivale su tipičan sigmoidalan oblik ovisnosti mortaliteta o koncentraciji. Za terbutilazin, metolaklor i bentazon  $LC_{50}$  vrijednosti nije bilo moguće odrediti, budući da ovi herbicidi nisu pokazali toksičnost.

**Tablica 17.**  $LC_{10}$ ,  $LC_{50}$  i  $LC_{90}$  vrijednosti za pojedinačne pesticide nakon 24 i 48 h.

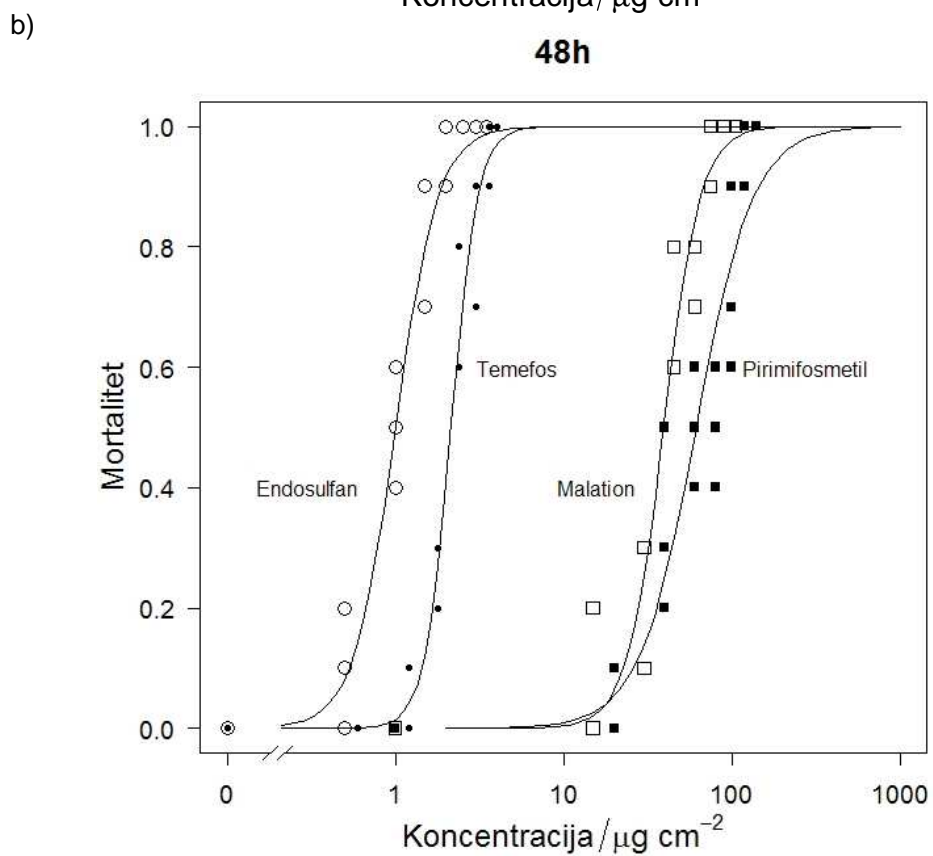
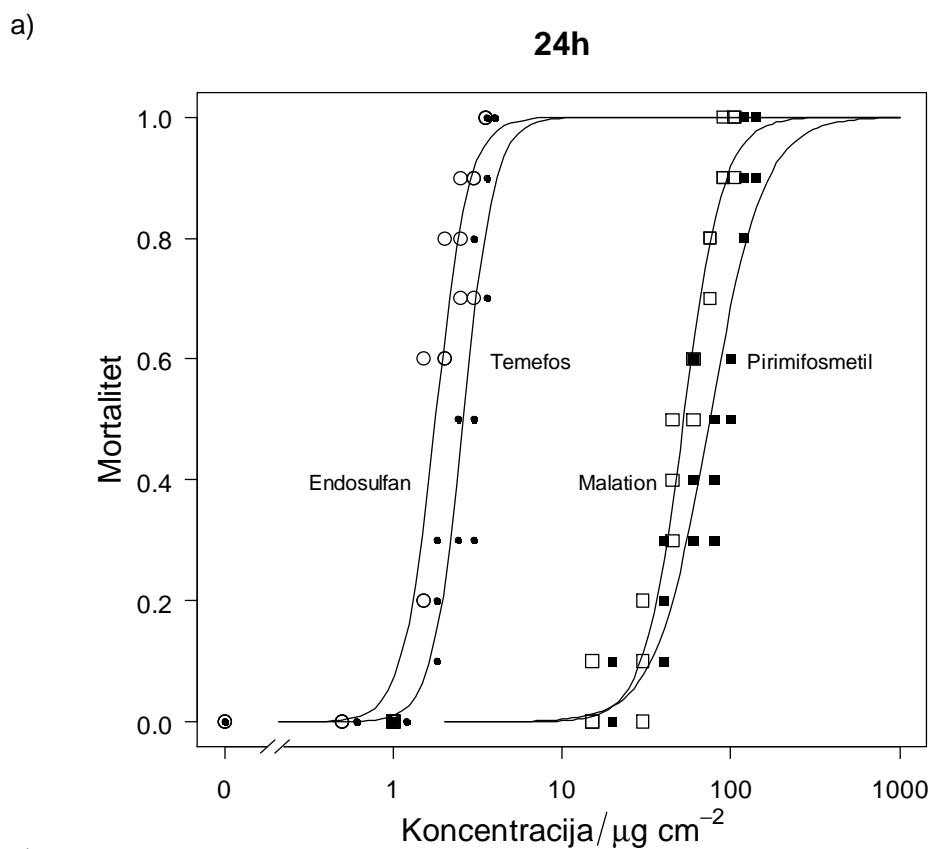
PARAMETAR	Endosulfan	Temefos	Malation	Pirimifosmetil
24 h $LC_{10}$ ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ )	1,09	1,64	29,30	33,59
48 h $LC_{10}$ ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ )	0,53	1,44	22,70	26,01
24 h $LC_{50}$ ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ )	1,78	2,60	52,61	75,05
48 h $LC_{50}$ ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ )	1,00	2,14	39,39	61,39
24 h $LC_{90}$ ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ )	2,90	4,11	94,46	167,66
48 h $LC_{90}$ ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ )	1,89	3,19	68,35	144,89







**Slika 69.** Krivulje ovisnosti mortaliteta o koncentraciji nakon 24 i 48 h za: a) endosulfan, b) temefos, c) malation i d) pirimifosmetil.



**Slika 70.** Krivulje ovisnosti mortaliteta o koncentraciji za: a) endosulfan, temefos malation i pirimifosmetil nakon 24 h, b) endosulfan, temefos, malation i pirimifosmetil nakon 48h.

#### **4.4. EC<sub>50</sub> IZOBLOGRAMI SMJESA S PRIKAZOM VRIJEDNOSTI EC<sub>50</sub> ZA SVAKU SMJESU**

##### **4.4.1. EC<sub>50</sub> Izobologram smjesa endosulfana i temefosa s prikazom vrijednosti EC<sub>50</sub> za svaku smjesu**

Na slici 71 prikazani su izobologrami smjesa endosulfana i temefosa, te ER<sub>50</sub> vrijednosti za svaku kombinaciju smjese. ER<sub>50</sub> pokazuje razrjeđenje kod kojeg se postiže 50% učinka, odnosno razrjeđenje kod kojeg se postiže polovica maksimalne inhibicije AChE. Najveća ER<sub>50</sub> vrijednost dobivena je kod omjera komponenti smjese 0 : 100 (0% Endosulfan : 100% Temefos) gdje je ona iznosila 0,424, dok je najniža vrijednost dobivena kod smjese gdje je omjer komponenti 60 : 40 (60% Endosulfan : 40% Temefos) pri čemu je ER<sub>50</sub> iznosila 0,182. Vrlo slične vrijednosti dobivene su i za smjesu 20 : 80 (20% Endosulfan : 40% Temefos) gdje je izračunata ER<sub>50</sub> vrijednost iznosila 0,187.

Svako ER<sub>50</sub> razrjeđenje polučilo je EC<sub>50</sub> učinak što se može vidjeti na izobolografskom prikazu. EC<sub>50</sub> izobologram pokazuje jednoznačno sinergističko djelovanje za smjesu kombinacije endosulfana i temefosa.

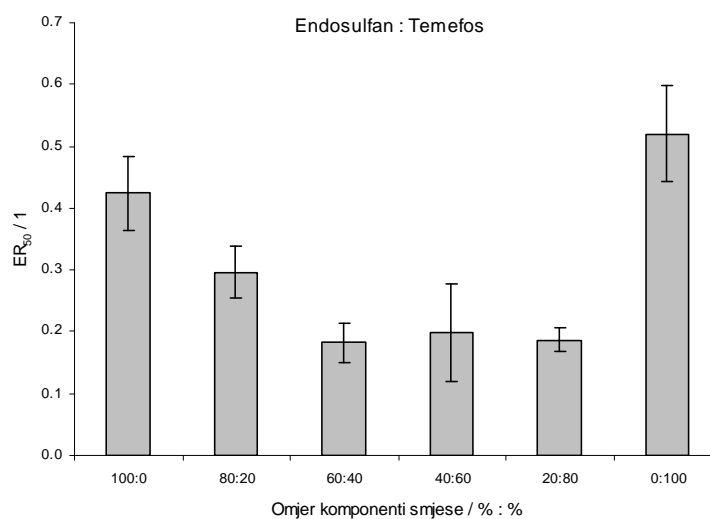
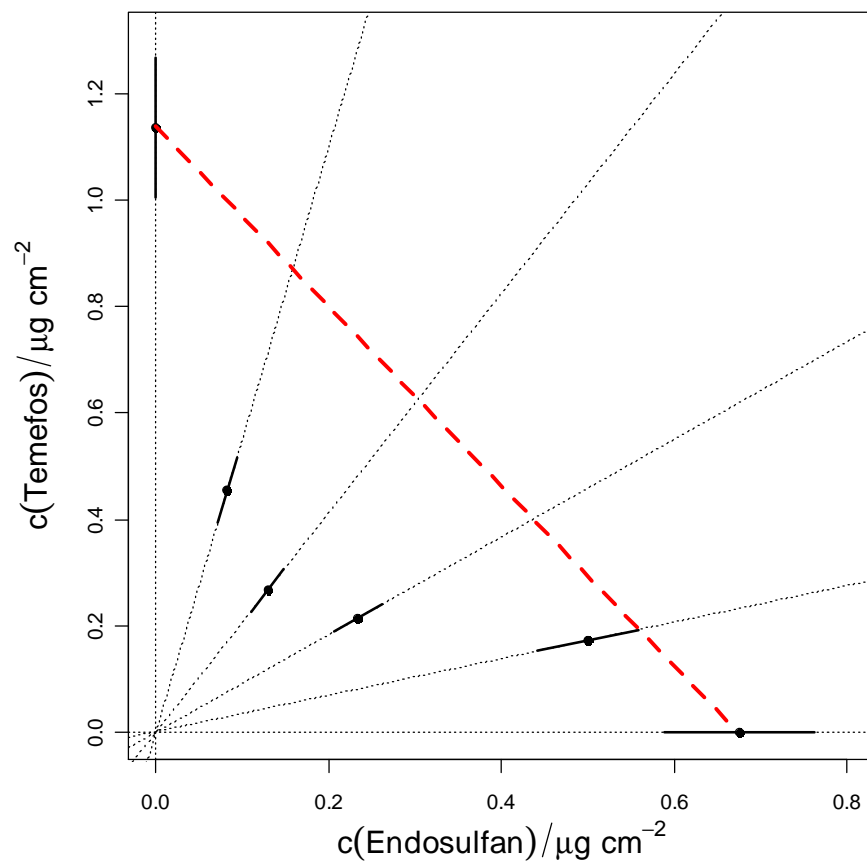
##### **4.4.2. EC<sub>50</sub> Izobologram smjesa endosulfana i malationa s prikazom vrijednosti EC<sub>50</sub> za svaku smjesu**

Na slici 72 prikazani su izobologrami smjesa endosulfana i malationa, te ER<sub>50</sub> vrijednosti za svaku kombinaciju smjese. Najveće ER<sub>50</sub> vrijednosti dobivene su kod omjera smjese 0 : 100 (0% endosulfan : 100% malation) s vrijednošću od 0,424, te za smjesu 20 : 80 (20% endosulfan : 80 % malation) gdje je ER<sub>50</sub> iznosila 0,422. Najniža ER<sub>50</sub> vrijednost dobivena je kod omjera smjese 100 : 0 (100% endosulfan : 0% malation) gdje je ER<sub>50</sub> vrijednost iznosila 0,179. EC<sub>50</sub> izobologram pokazuje aditivno djelovanje za smjesu kombinacije endosulfana i malationa.

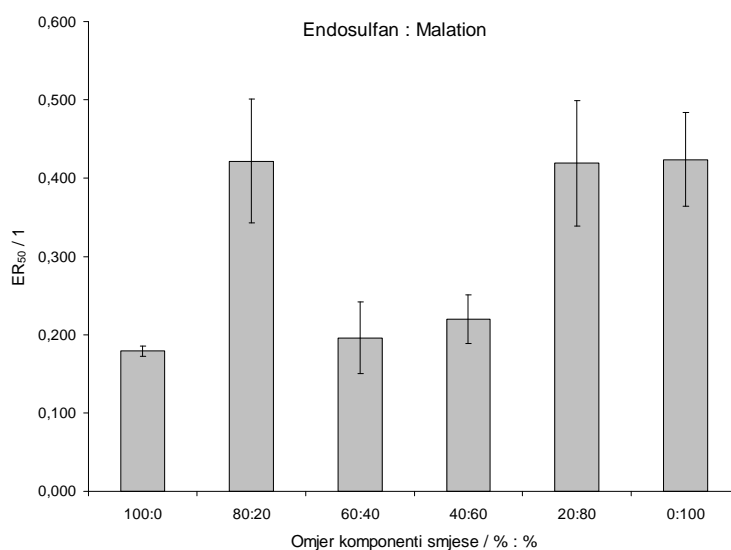
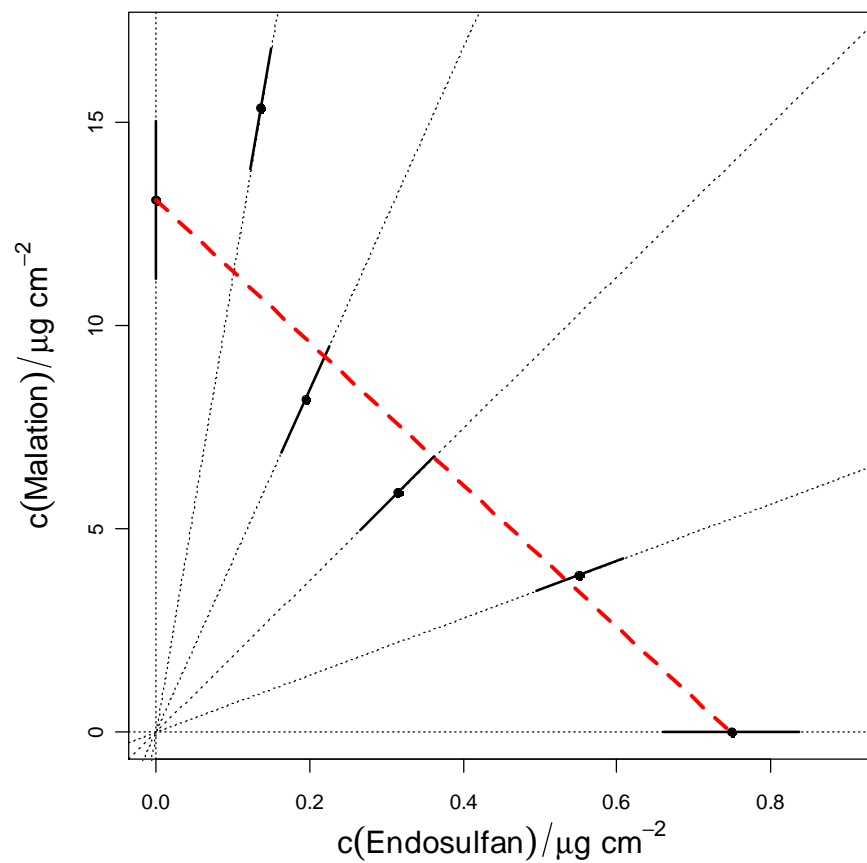
##### **4.4.3. EC<sub>50</sub> Izobologram smjesa endosulfana i pirimifosmetila s prikazom vrijednosti EC<sub>50</sub> za svaku smjesu**

Na slici 73 prikazani su izobologrami smjesa endosulfana i pirimifosmetila, te ER<sub>50</sub> vrijednosti za svaku kombinaciju smjese. Najveća ER<sub>50</sub> dobivena je kod omjera smjese 40 : 60 (40 % endosulfan : 60% pirimifosmetil) s vrijednošću od 0,593, dok je najniža ER<sub>50</sub> vrijednost dobivena je kod omjera smjese 100 : 0 (100% endosulfan : 0% pirimifosmetil) gdje je ER<sub>50</sub> vrijednost iznosila 0,241.

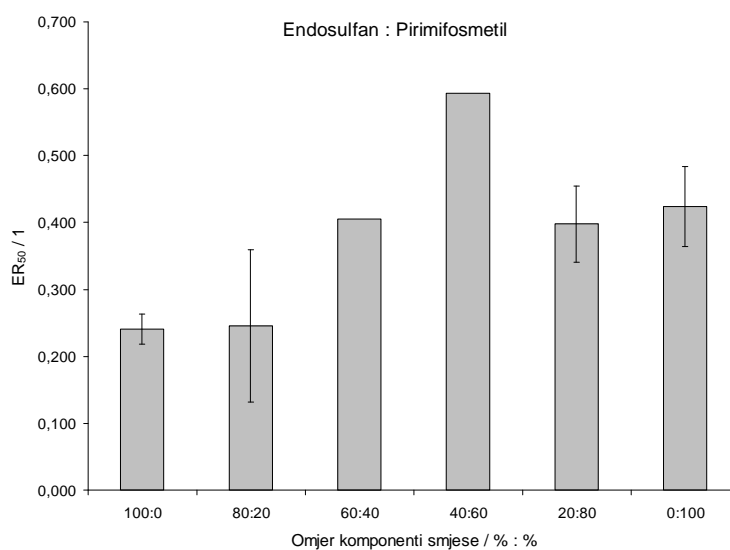
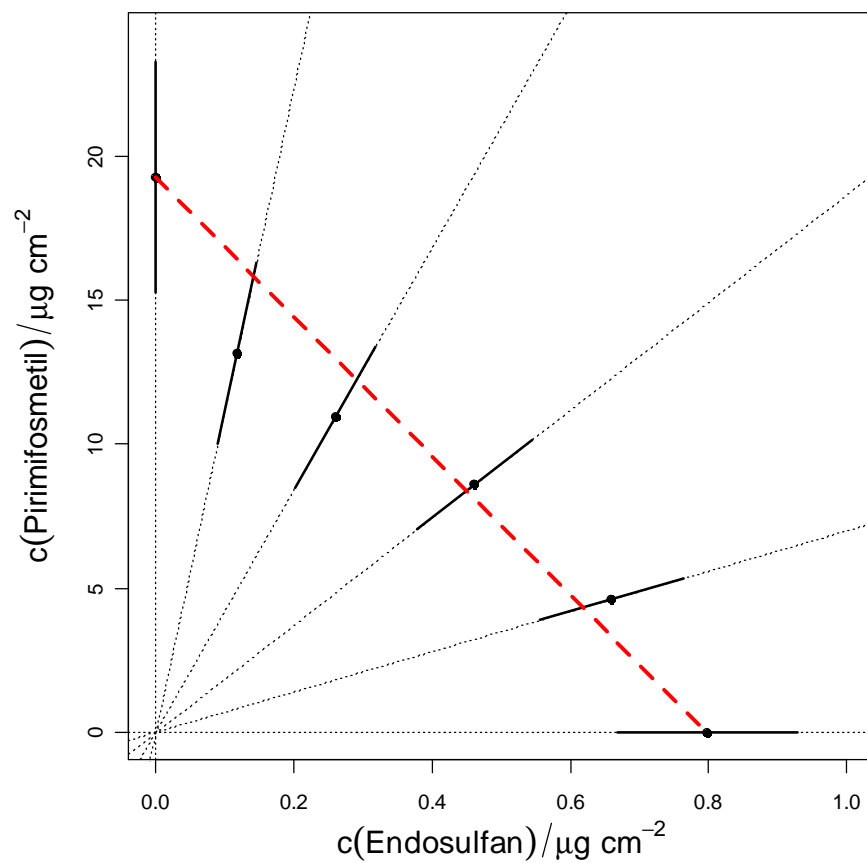
Svako ER<sub>50</sub> razrjeđenje polučilo je EC<sub>50</sub> učinak što se može vidjeti na izobolografskom prikazu. EC<sub>50</sub> izobologram pokazuje aditivno djelovanje za smjesu kombinacije endosulfana i pirimifosmetila.



**Slika 71.** EC<sub>50</sub> izobologram smjesa endosulfana i temefosa s prikazom vrijednosti EC<sub>50</sub> za svaku smjesu.



**Slika 72.**  $EC_{50}$  izobologram smjesa endosulfana i malationa s prikazom vrijednosti  $EC_{50}$  za svaku smjesu.



**Slika 73.** EC<sub>50</sub> izobologram smjesa endosulfana i pirimifosmetila s prikazom vrijednosti EC<sub>50</sub> za svaku smjesu.

#### **4.4.4. EC<sub>50</sub> Izobologram smjesa temefosa i malationa s prikazom vrijednosti EC<sub>50</sub> za svaku smjesu**

Na slici 74 prikazani su izobologrami smjesa temefosa i malationa, te ER<sub>50</sub> vrijednosti za svaku kombinaciju smjese. Najveća ER<sub>50</sub> dobivena je kod omjera smjese 40 : 60 (40 % temefos : 60% malation) s vrijednošću od 0,419, dok je najniža ER<sub>50</sub> vrijednost dobivena je kod omjera smjese 100 : 0 (0% temefos : 100% malation) gdje je ER<sub>50</sub> vrijednost iznosila 0,179. EC<sub>50</sub> izobologram pokazuje aditivno djelovanje za smjesu kombinacije temefosa i malationa.

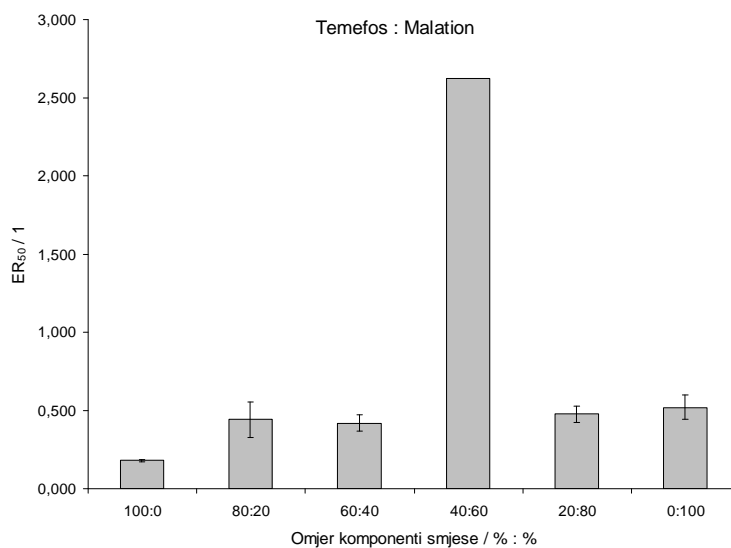
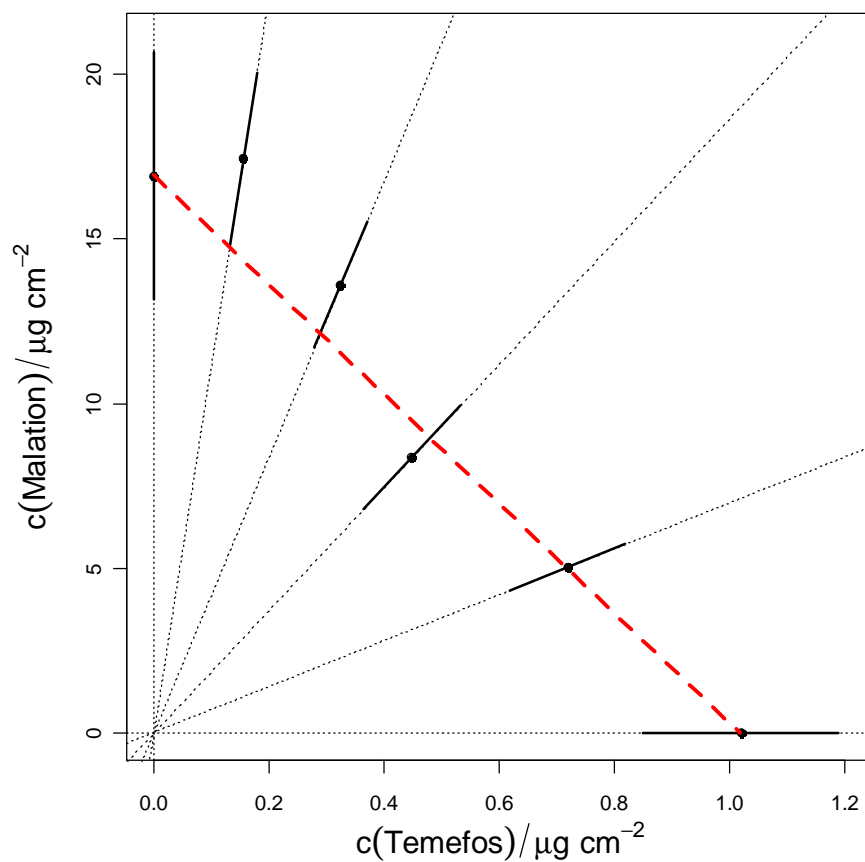
#### **4.4.5. EC<sub>50</sub> Izobologram smjesa temefosa i pirimifosmetila s prikazom vrijednosti EC<sub>50</sub> za svaku smjesu**

Na slici 75 prikazani su izobologrami smjesa temefosa i pirimifosmetila, te ER<sub>50</sub> vrijednosti za svaku kombinaciju smjese. Najveća ER<sub>50</sub> dobivena je kod omjera smjese 0 : 100 (0 % temefos : 0% pirimifosmetil) s vrijednošću od 0,520, dok je najniža ER<sub>50</sub> vrijednost dobivena je kod omjera smjese 40 : 60 (60% temefos : 40% pirimifosmetil) gdje je ER<sub>50</sub> vrijednost iznosila 0,239. EC<sub>50</sub> izobologram pokazuje aditivno djelovanje za smjesu kombinacije temefosa i pirimifosmetila.

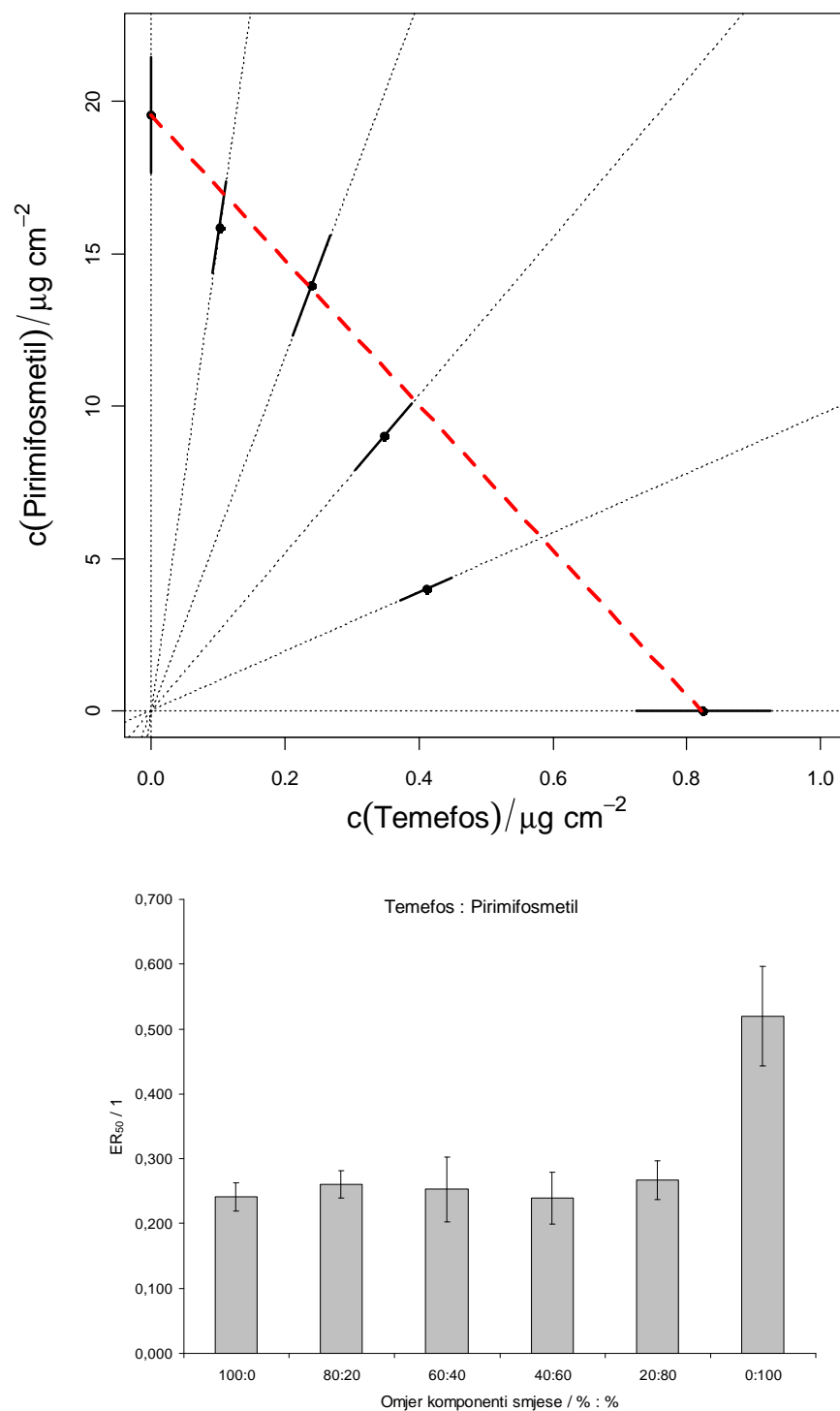
#### **4.4.6. EC<sub>50</sub> Izobologram smjesa malationa i pirimifosmetila s prikazom vrijednosti EC<sub>50</sub> za svaku smjesu**

Na slici 76 prikazani su izobologrami smjesa malationa i pirimifosmetila, te ER<sub>50</sub> vrijednosti za svaku kombinaciju smjese. Najveća ER<sub>50</sub> dobivena je kod omjera smjese 60 : 40 (100 % malation : 0% pirimifosmetil) s vrijednošću od 0,926, dok je najniža ER<sub>50</sub> vrijednost dobivena je kod omjera smjese 80 : 20 (80% malation : 20% pirimifosmetil) gdje je ER<sub>50</sub> vrijednost iznosila 0,147. Na EC<sub>50</sub> izobologramu vidi se da ne postoji jednoznačno antagonističko djelovanje za smjesu kombinacije malationa i pirimifosmetila, pri čemu je ono samo naznačeno.

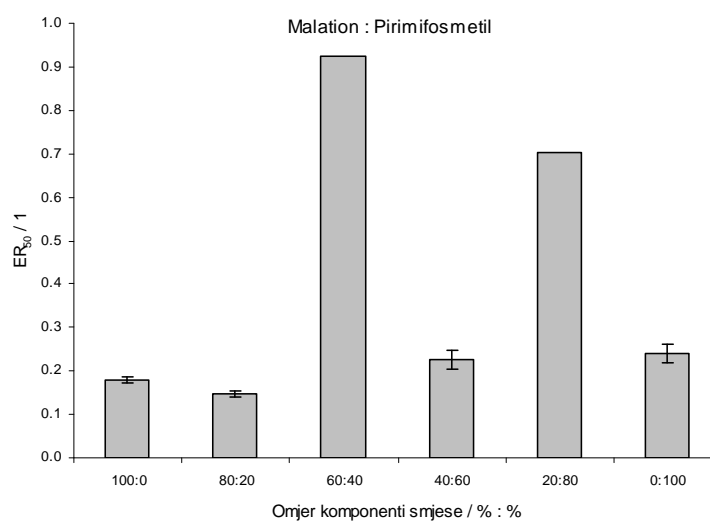
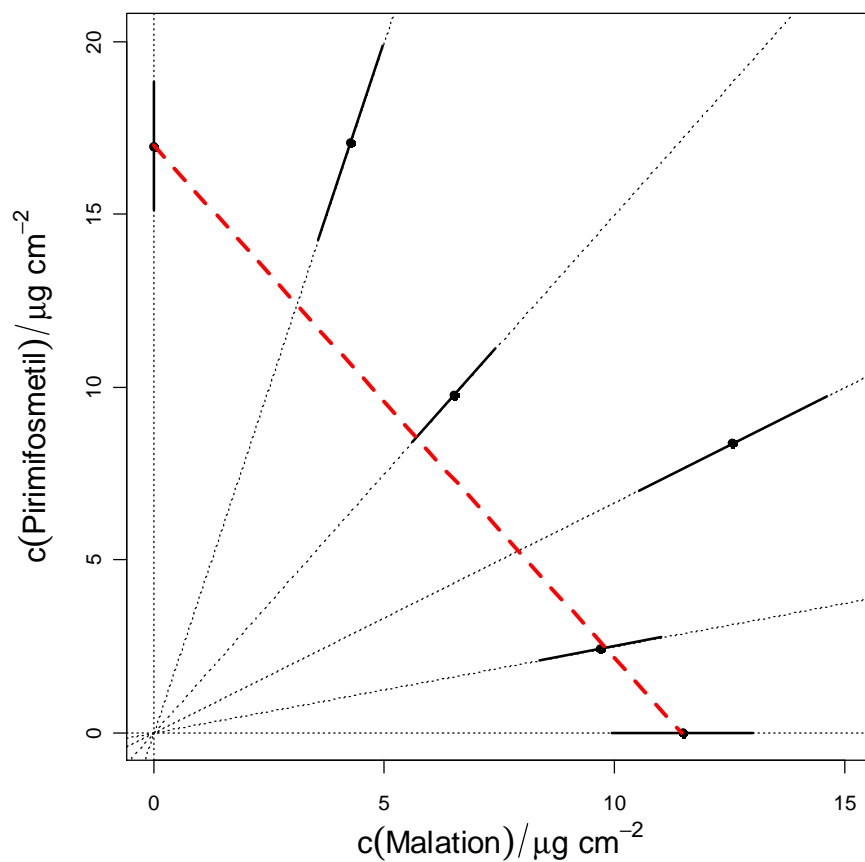




Slika 74.  $EC_{50}$  izobologram smjesa temefosa i malationa s prikazom vrijednosti  $EC_{50}$  za svaku smjesu.



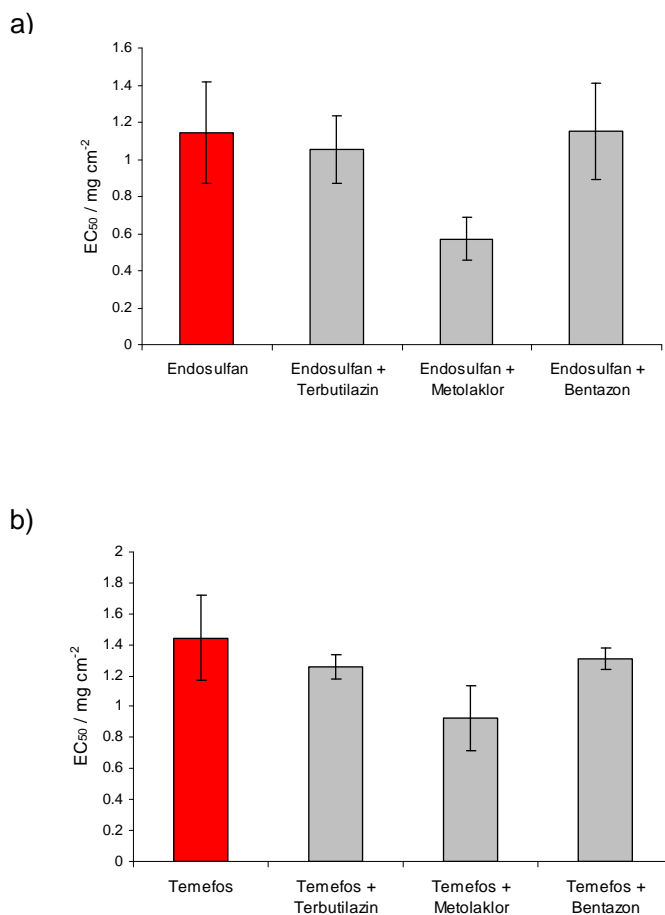
**Slika 75.**  $EC_{50}$  izobologram smjesa temefosa i pirimifosmetila s prikazom vrijednosti  $EC_{50}$  za svaku smjesu.



**Slika 76.** EC<sub>50</sub> izobologram smjesa malationa i pirimifosmetila s prikazom vrijednosti EC<sub>50</sub> za svaku smjesu.

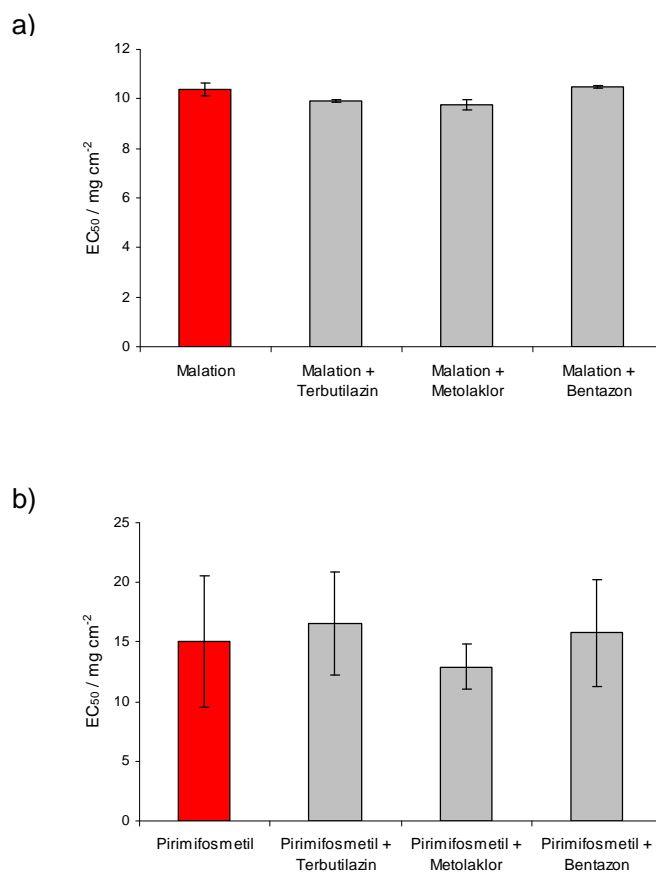
#### 4.5. Promjena $EC_{50}$ vrijednosti u smjesama u odnosu na $EC_{50}$ vrijednosti pojedinačnih pesticida

Smjese pesticida su određivane tako da su se pesticidi s dokazanim inhibitornim djelovanjem na AChE aktivnost (endosulfan, temefos, malation i pirimifosmetil) miješali sa pesticidima za koje nije dokazano da imaju inhibitorni učinak na AChE aktivnost (terbutilazin, metolaklor i bentazon) u eksperimentu s pojedinačnim pesticidima. Utvrđene su promjene u  $EC_{50}$  vrijednosti u smjesama u odnosu na  $EC_{50}$  vrijednosti pojedinačnih pesticida (Slika 77 a, b). Najveće smanjenje  $EC_{50}$  vrijednosti je izazvao metolaklor. U kombinaciji s endosulfanom (-50.22%), sa temefosom (-35.92%), sa malationom (-6.13%) i sa pirimifosmetilom (-14.32%) u odnosu na vrijednost  $EC_{50}$  svakog od tih pesticida posebno.



**Slika 77.** Promjene  $EC_{50}$  vrijednosti smjesa pesticida u odnosu na  $EC_{50}$  pojedinačnog pesticida: a) endosulfana i b) temefosa. Vrijednosti su prikazane kao srednje vrijednosti  $\pm$  s.d.

Najmanja promjena  $EC_{50}$  vrijednosti je zabilježena kod malationa u kombinaciji sa sva tri pesticida (terbutilazin -4.58%, metolaklor -6.13% i bentazon +0.99%) (Slika 78 c). U kombinaciji s bentazonom su se  $EC_{50}$  vrijednosti neznatno povećale kod endosulfana (+0.35%), malationa (+0.99%) i pirimifosmetila (+4.42%), dok se u kombinaciji s temefosom  $EC_{50}$  smanjio (-9.27%). Najveće povećanje vrijednosti  $EC_{50}$  je izazvala smjesa pirimifosmetila i terbutilazina (+10.02%). Terbutilazin je u kombinacijama s ostalim pesticidima izazvao smanjenje vrijednosti  $EC_{50}$  ali to smanjenje nije statistički značajno; s endosulfanom od -8.11%, temefosom -12.94% i malationom -4.58%.



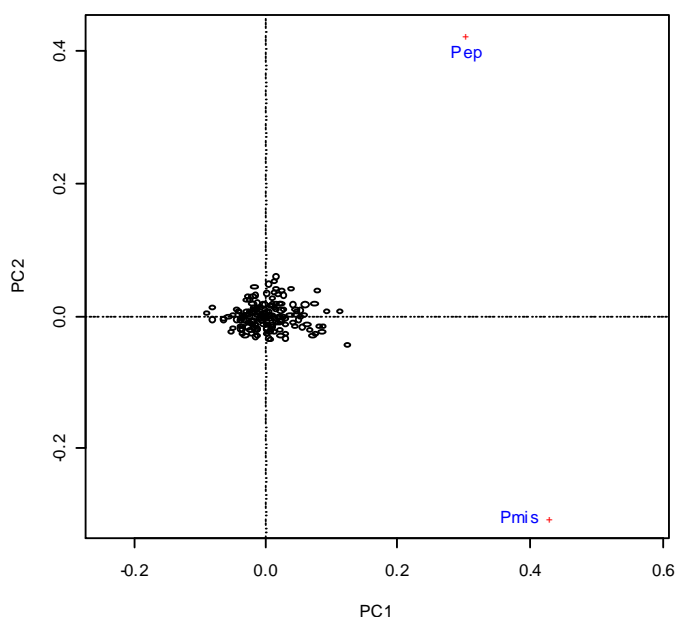
**Slika 78.** Promjene  $EC_{50}$  vrijednosti smjesa pesticida u odnosu na  $EC_{50}$  pojedinačnog pesticida: a) malationa i b) pirimifosmetila. Vrijednosti su prikazane kao srednje vrijednosti  $\pm$  s.d.

#### 4.6. Histološke promjene u odnosu debljine epitelnog i mišićnog sloja

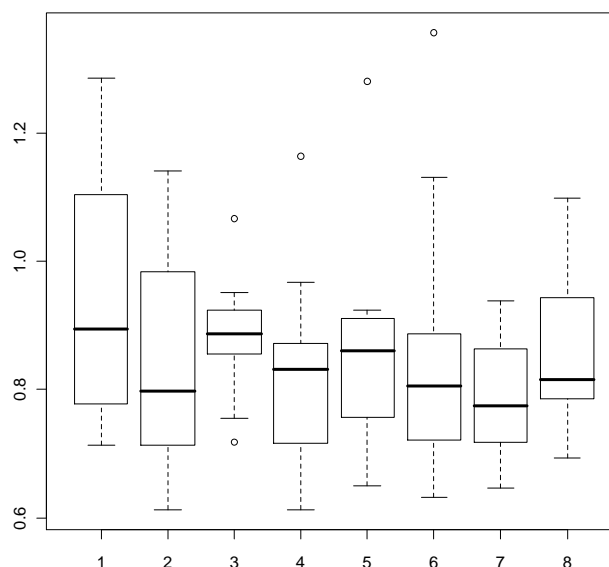
Gujavice u kontrolnim uzorcima nisu pokazivale promjene u anatomskom i morfološkom izgledu tijekom cijelog vremena izlaganja (Slika 82 a, b), dok je kod gujavica koje su izlagane smjesama pesticida već vrlo brzo nakon izlaganja došlo do uvrtnja tijela i grčenja mišića (Slika 82 c, d), a nakon 24 sata i do promjena poput istjecanja celomske tekućine i bubrenja kliteluma (Slika 82 e, f).

Iz prikaza fotografija poprečnih prereza izlaganih gujavica različitim smjesama pesticida teško je uočiti bilo kakve promjene u debljini epitelnog i mišićnog sloja (Slika 83 – 88), no tek nakon obrade preparata pomoću analizatora slika (ImageTool Analyzer), odnosno mjerenjem površine i debljine epitela, površine i debljine prstenastih mišića, visine i širine preparata te površine preparata uočeno je smanjivanje omjera površine epitela i površine prstenastih mišića.

Obradom podataka pomoću analize glavnih komponenti (PCA - Principal Component Analysis) na jednoj principijelnoj osi izdvojila se površina epitela, a na drugoj osi površina prstenastih mišića (Slika 79). Na box-plot grafičkom prikazu (Slika 80) vidljiva su odstupanja u srednjim vrijednostima omjera površine epitela i površine prstenastih mišića, koja su veća kod gujavica izlaganih većim koncentracijama mješavina pesticida (2 i 4 na slici 80) u odnosu na odstupanja kod gujavica izlaganih nižim koncentracijama mješavina pesticida (3 i 5 na slici 80). Najjači učinak imala je mješavina pirimifosmetila ( $0,75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) i metolaklora ( $0,75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) koja je uzrokovala najveću promjenu u omjeru površine epitela i površine prstenastih mišića (Tablica 18).



**Slika 79.** Analiza glavnih komponenti (PCA), sa podacima svedenim na zajednički faktor.

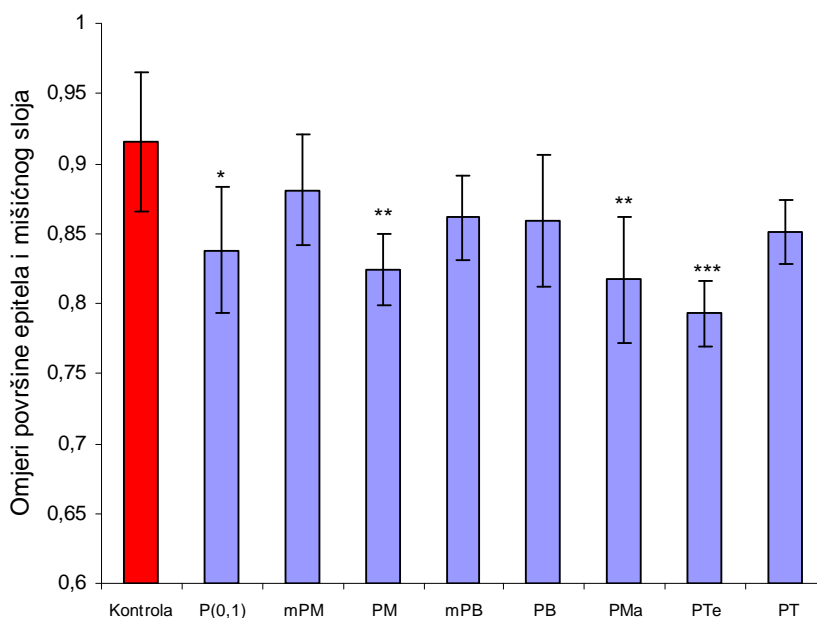


**Slika 80.** Omjeri površine epitela i površine mišića iz izmjerenih podataka; 1 – kontrola; 2 – pirimifosmetil ( $0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ); 3 – pirimifosmetil ( $0,375 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) + metolaklor ( $0,375 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ); 4 – pirimifosmetil ( $0,75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) + metolaklor ( $0,75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ); 5 – pirimifosmetil ( $0,375 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) + bentazon ( $25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ); 6 - pirimifosmetil ( $0,75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) + bentazon ( $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ); 7 – pirimifosmetil ( $0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) + temefos ( $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ); 8 – pirimifosmetil ( $0,75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) + terbutilazin ( $40 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ )

**Tablica 18.** Srednja vrijednost omjera površine epitela i površine prstenastih mišića iz izmjerenih podataka

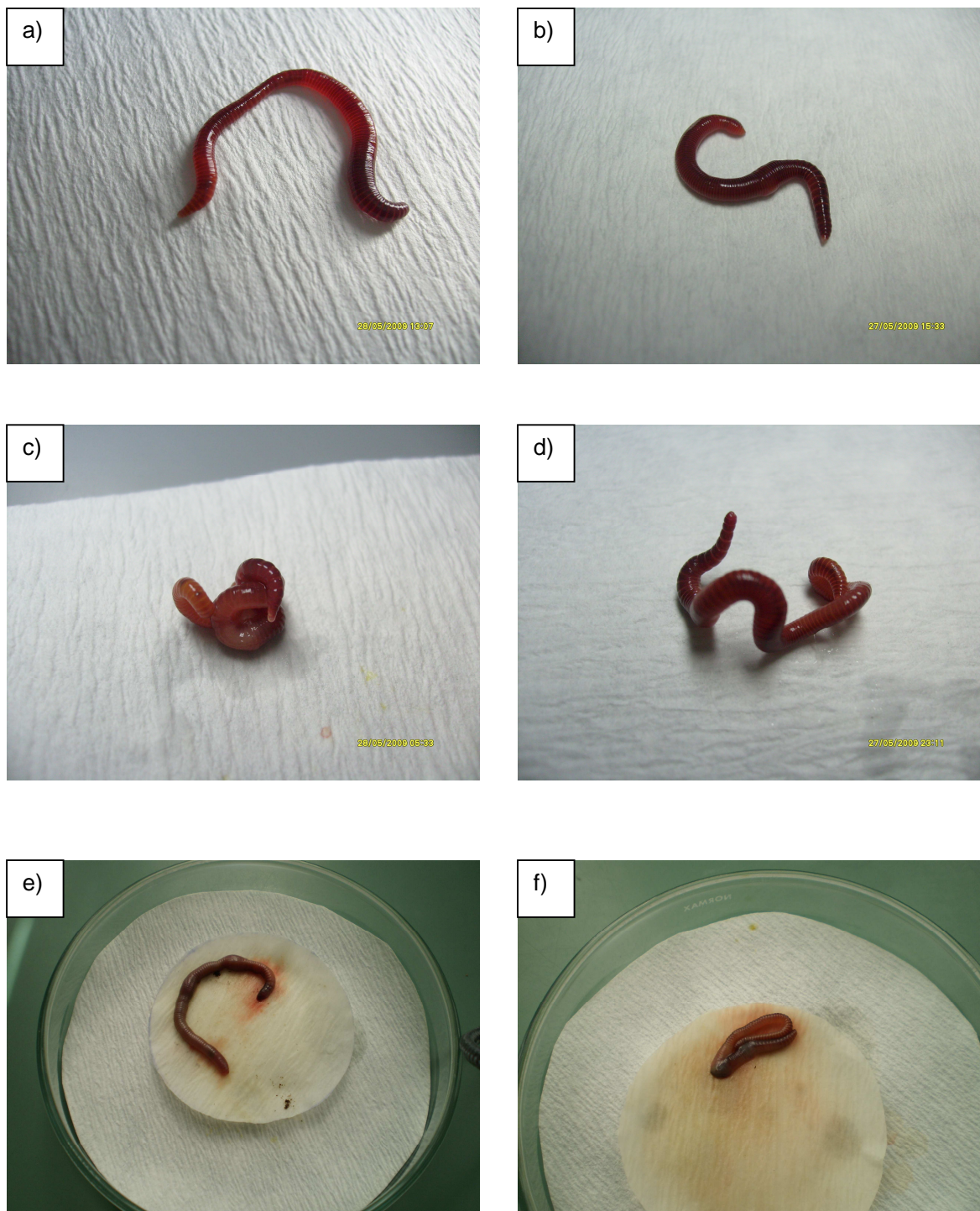
UZORAK	OMJER POVRŠINE EPITELA I POVRŠINE MIŠIĆA
kontrola	0,931
pirimifosmetil ( $0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	0,851
pirimifosmetil ( $0,75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	0,933
pirimifosmetil ( $0,375 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) + metolaklor ( $0,375 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	0,881
pirimifosmetil ( $0,75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) + metolaklor ( $0,75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	0,812
pirimifosmetil ( $0,375 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) + bentazon ( $25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	0,861
pirimifosmetil ( $0,75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) + bentazon ( $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	0,845
pirimifosmetil ( $0,75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) + malation ( $0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	0,817
pirimifosmetil ( $0,75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) + temefos ( $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	0,793
pirimifosmetil ( $0,75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) + terbutilazin ( $40 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	0,851

Rezultati usporedbe omjera površine epitela i mišića za pojedine kombinacije smjesa sa kontrolom prikazani su na Slici 81. Nakon izračunatih parametara *t*-testa za nezavisne uzorke, utvrđene su statistički značajne razlike u omjerima u odnosu na kontrolu. Najveća razlika u omjeru površine epitela i mišića u odnosu na kontrolu dobivena je kod kombinacije pesticida PTe – pirimifosmetil ( $0,75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) + temefos ( $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), dok je najmanja razlika dobivena za smjesu mPM - pirimifosmetil ( $0,375 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) + metolaklor ( $0,375 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Kod smjese PTe - pirimifosmetil ( $0,75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) + temefos ( $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) uz 99% sigurnosti, kod smjese PM - pirimifosmetil ( $0,75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) + metolaklor ( $0,75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) i PMa - pirimifosmetil ( $0,75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) + malation ( $0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) uz 95%, te kod samog pirimifosmetila P ( $0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) uz 90% sigurnosti postoji statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.



**Slika 81.** Usporedba omjera površina epitela i mišića za pojedine kombinacije smjesa sa kontrolom. K – kontrola; P(0,1) – pirimifosmetil  $0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ; mPM - pirimifosmetil ( $0,375 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) + metolaklor ( $0,375 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ); PM (pirimifosmetil ( $0,75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) + metolaklor ( $0,75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ); mPB - pirimifosmetil ( $0,375 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) + bentazon ( $25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ); PB - pirimifosmetil ( $0,75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) + bentazon ( $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ); PMa - pirimifosmetil ( $0,75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) + malation ( $0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ); PTe - pirimifosmetil ( $0,75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) + temefos ( $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ); PT - pirimifosmetil ( $0,75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) + terbutilazin ( $40 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Vrijednosti su prikazane kao srednje vrijednosti  $\pm$  s.d.



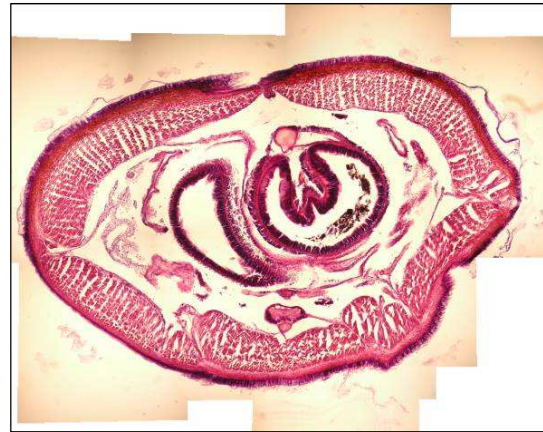


**Slika 82.** Morfološki izgled gujavica: a) u kontroli nakon 2 h; b) u kontroli nakon 24 h; c) nakon 6h izlaganja smjesi pirimifosmetila ( $0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) i temefosa ( $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ); d) nakon 6 h izlaganja smjesi pirimifosmetila ( $0,75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) i malation ( $0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ); nakon 24 h izlaganja smjesi pirimifosmetila ( $0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) i temefosa ( $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ); f) pirimifosmetila ( $0,75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) i malation ( $0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ).

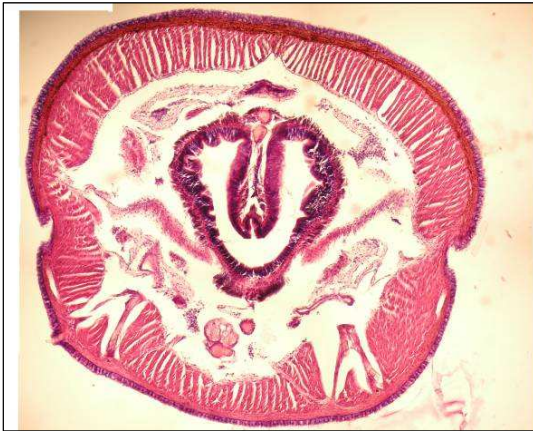




a)



b)



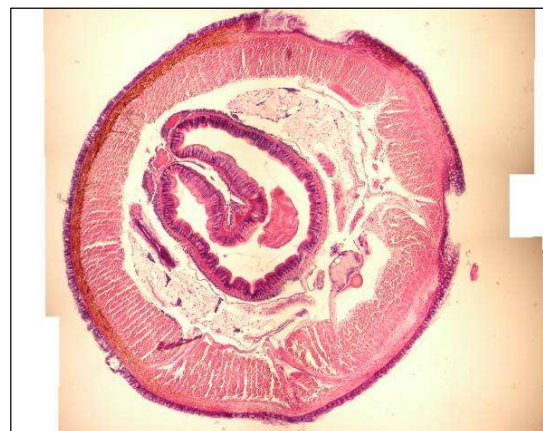
c)



d)

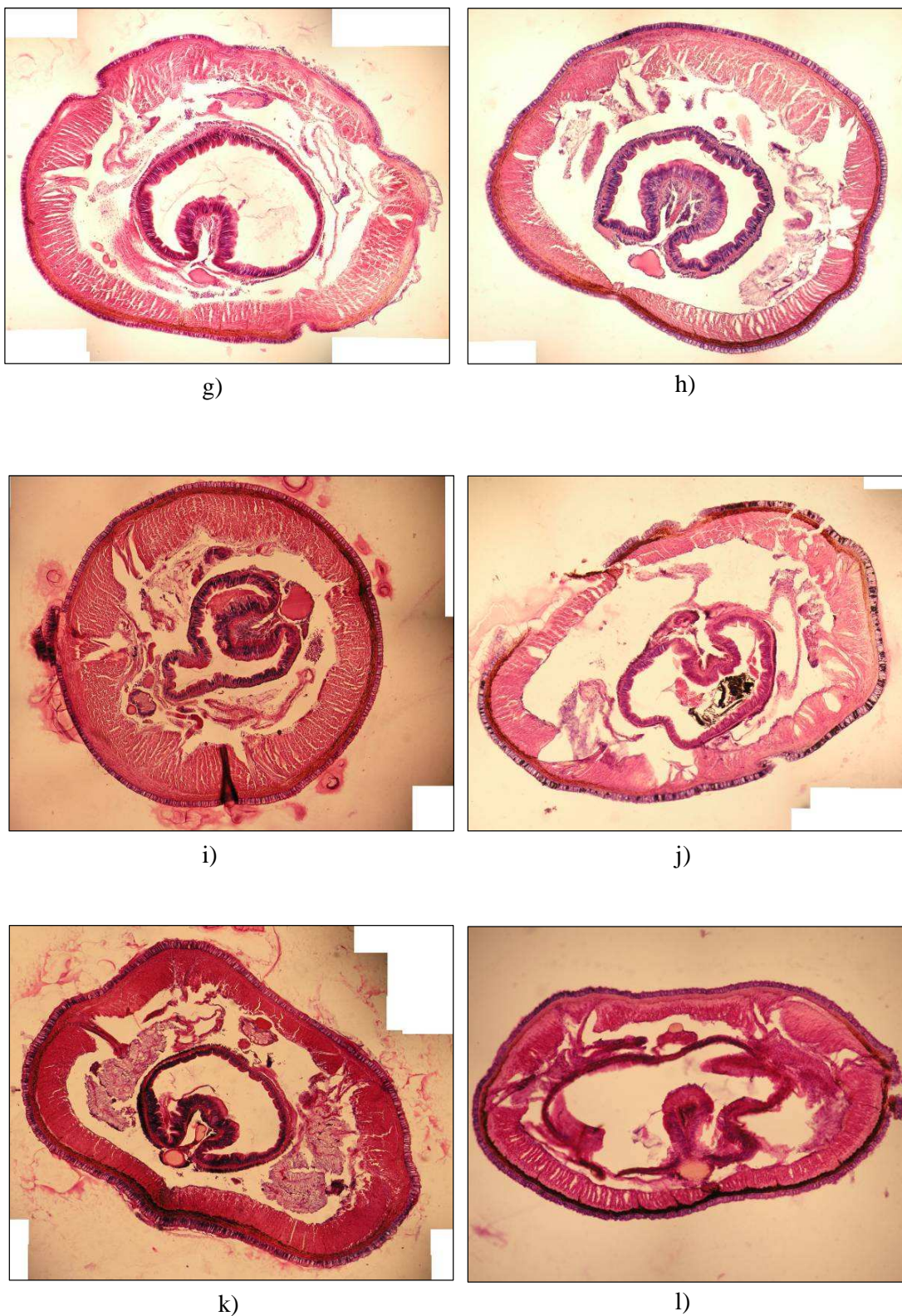


e)



f)





**Slika 83.** Histološki preparati gujavica (*Eisenia fetida*) u kontrolama nakon: a) 2h, b) 4h, c) 6h, d) 8h, e) 10h, f) 12h, g) 14h, h) 16h, i) 18h, j) 20h, k) 22h, l) 24h.



a)



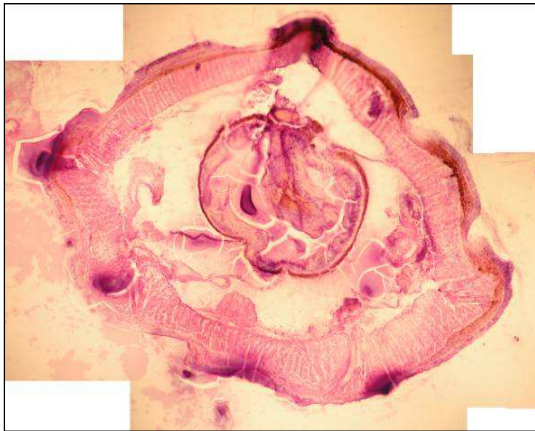
b)



c)



d)

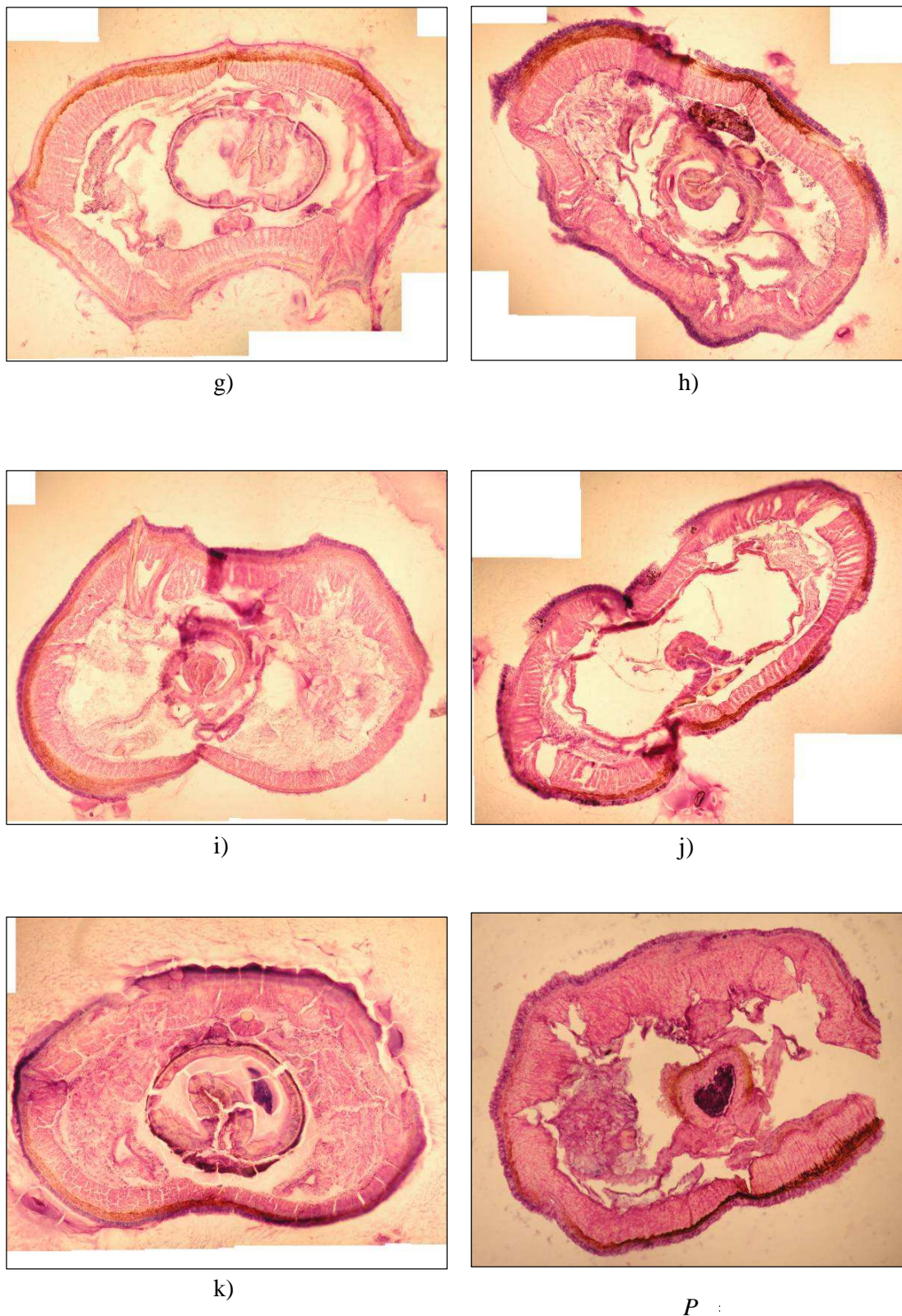


e)



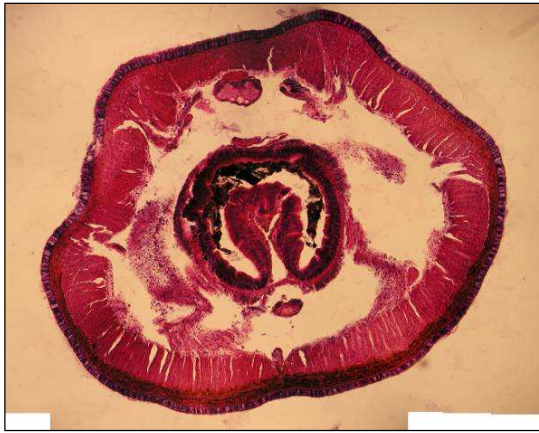
f)



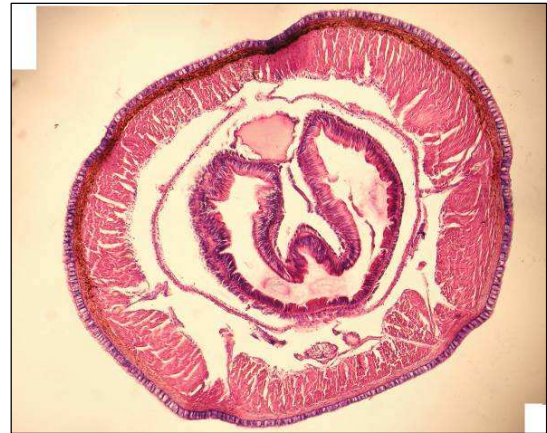


**Slika 84.** Histološki preparati gujavica (*Eisenia fetida*) nakon izlaganja mješavini pirimifosmetila ( $0,75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) i bentazona ( $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) nakon: a) 2h, b) 4h, c) 6h, d) 8h, e) 10h, f) 12h, g) 14h, h) 16h, i) 18h, j) 20h, k) 22h, l) 24h.

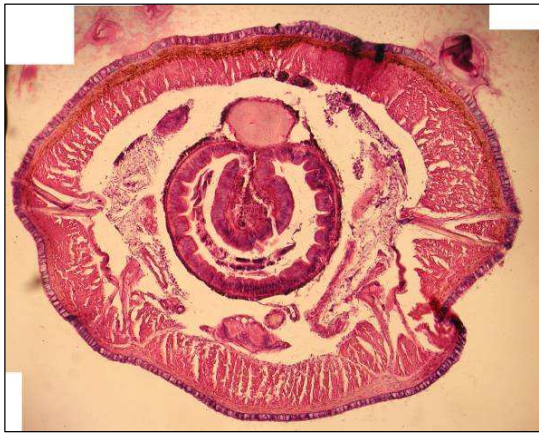




a)



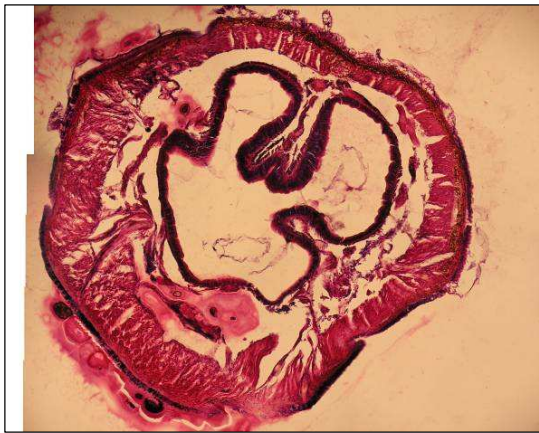
b)



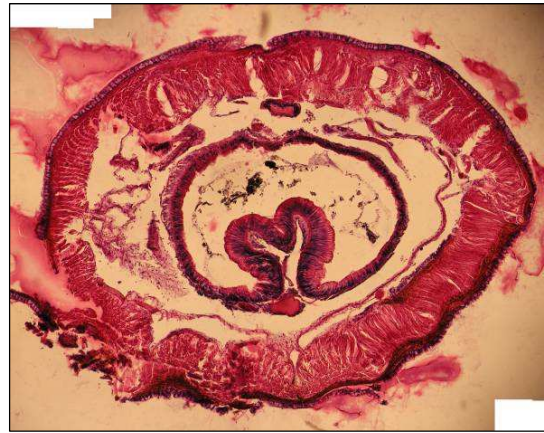
c)



d)



e)

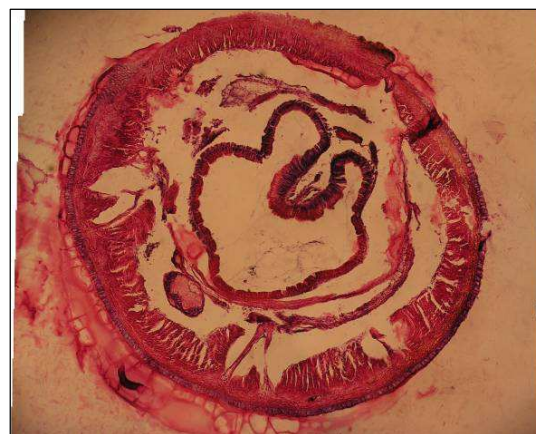


f)





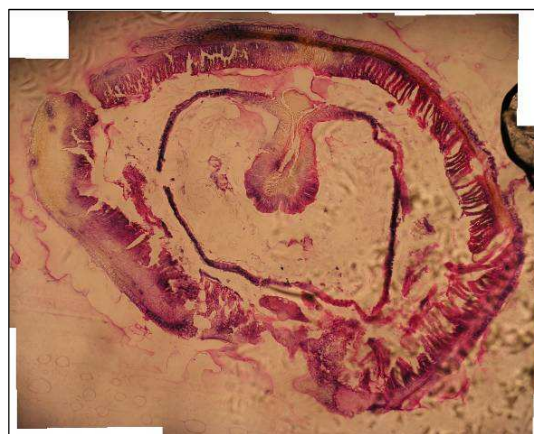
g)



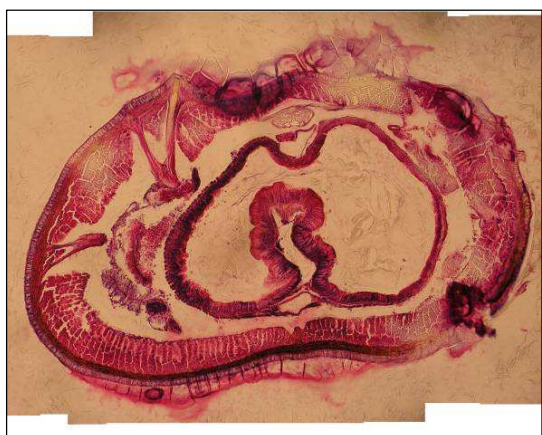
h)



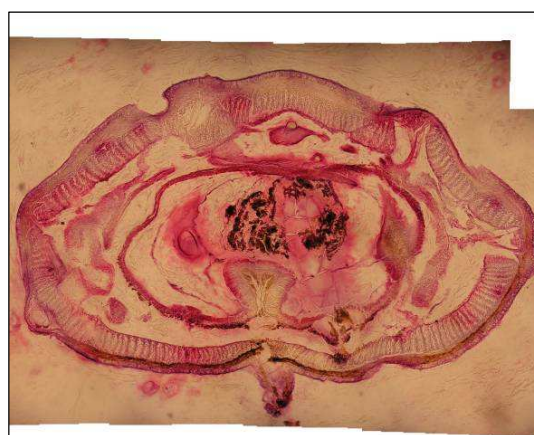
i)



j)



k)



l)

**Slika 85.** Histološki preparati gujavica (*Eisenia fetida*) nakon izlaganja mješavini pirimifosmetila ( $0,75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) i bentazona ( $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) nakon: a) 2h, b) 4h, c) 6h, d) 8h, e) 10h, f) 12h, g) 14h, h) 16h, i) 18h, j) 20h, k) 22h, l) 24h.





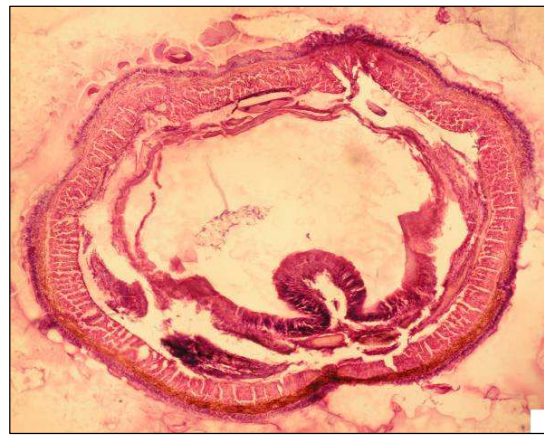
a)



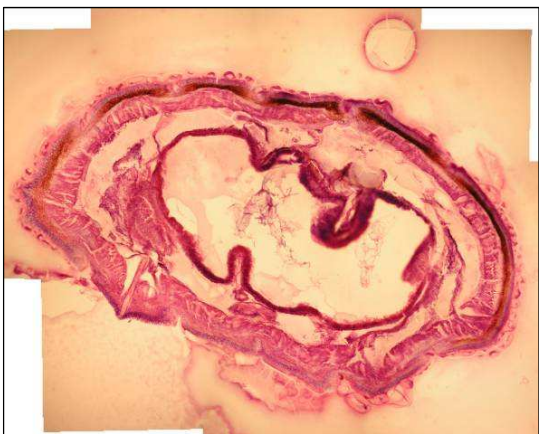
b)



c)



d)



e)

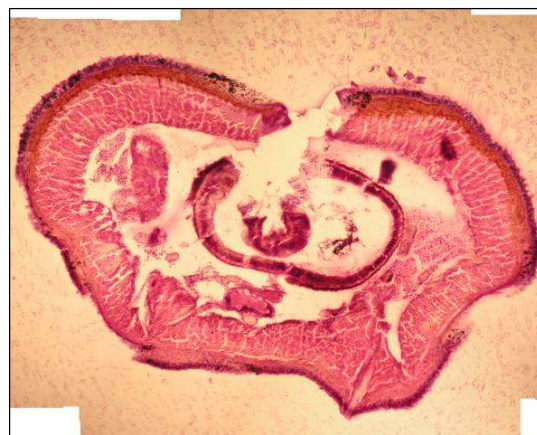


f)





g)



h)



i)



j)



k)



l)

**Slika 86.** Histološki preparati gujavica (*Eisenia fetida*) nakon izlaganja mješavini pirimifosmetila ( $0,75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) i metolaklora ( $0,75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) nakon: a) 2h, b) 4h, c) 6h, d) 8h, e) 10h, f) 12h, g) 14h, h) 16h, i) 18h, j) 20h, k) 22h, l) 24h.

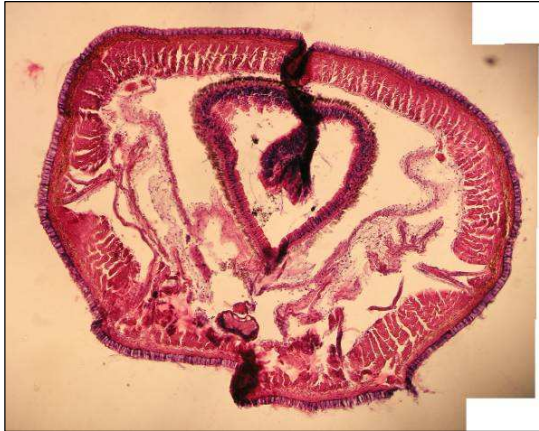




a)



b)



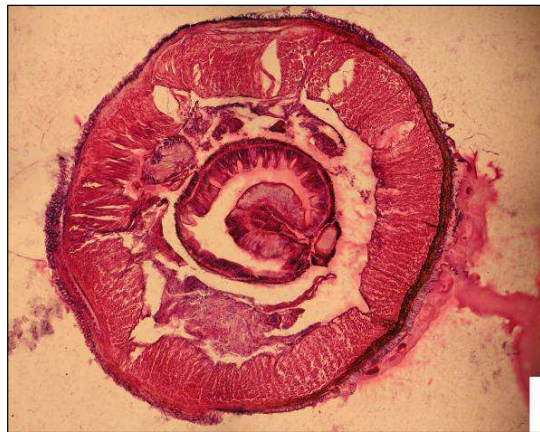
c)



d)

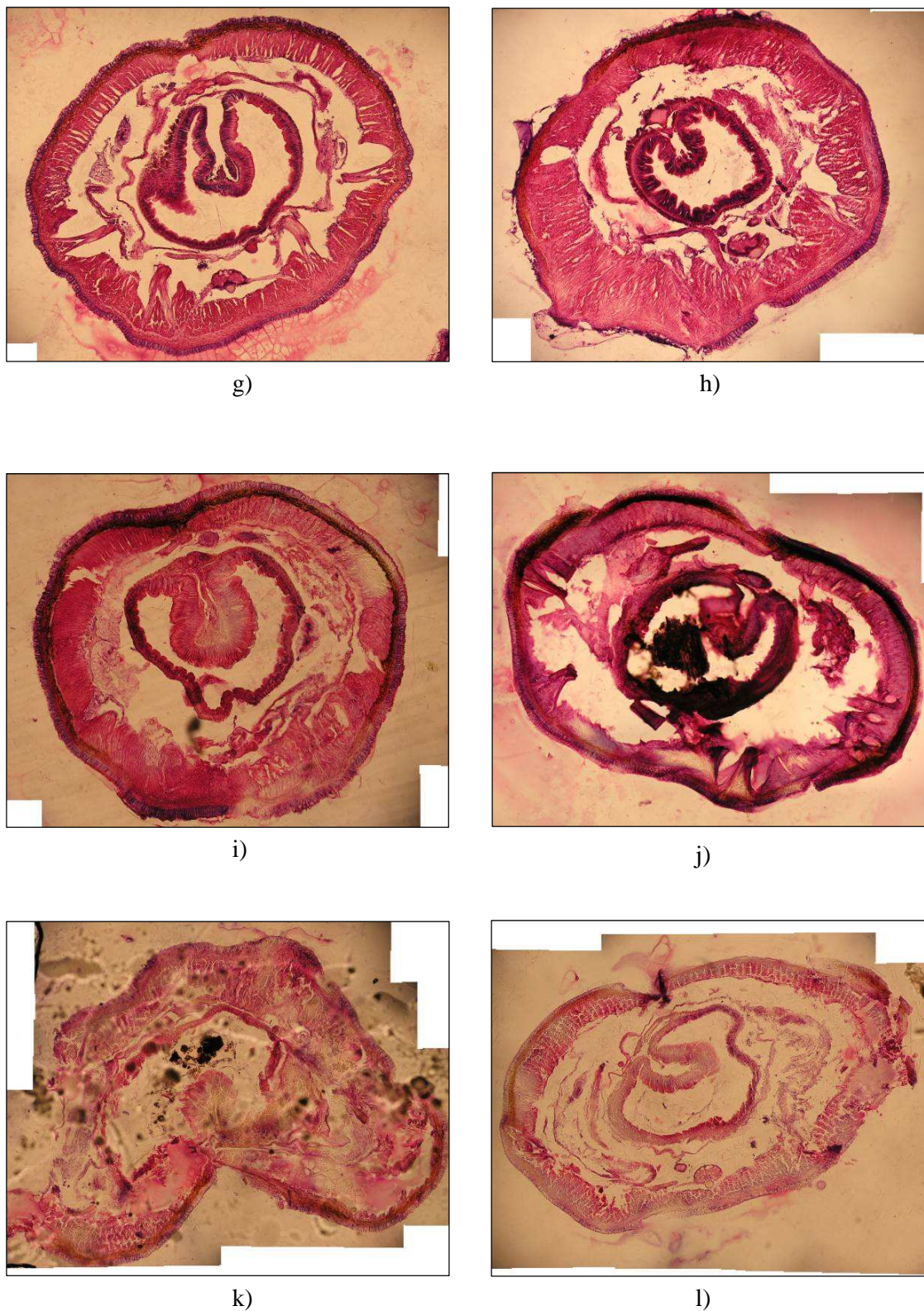


e)



f)





**Slika 87.** Histološki preparati gudavica (*Eisenia fetida*) nakon izlaganja mješavini pirimifosmetila ( $0,375 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) i metolaklora ( $0,375 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) nakon: a) 2h, b) 4h, c) 6h, d) 8h, e) 10h, f) 12h, g) 14h, h) 16h, i) 18h, j) 20h, k) 22h, l) 24h.





a)



b)



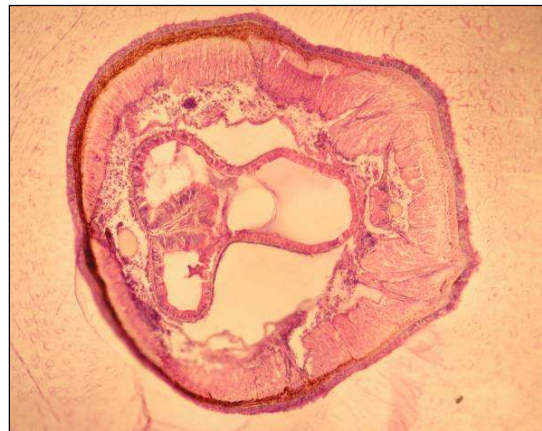
c)



d)

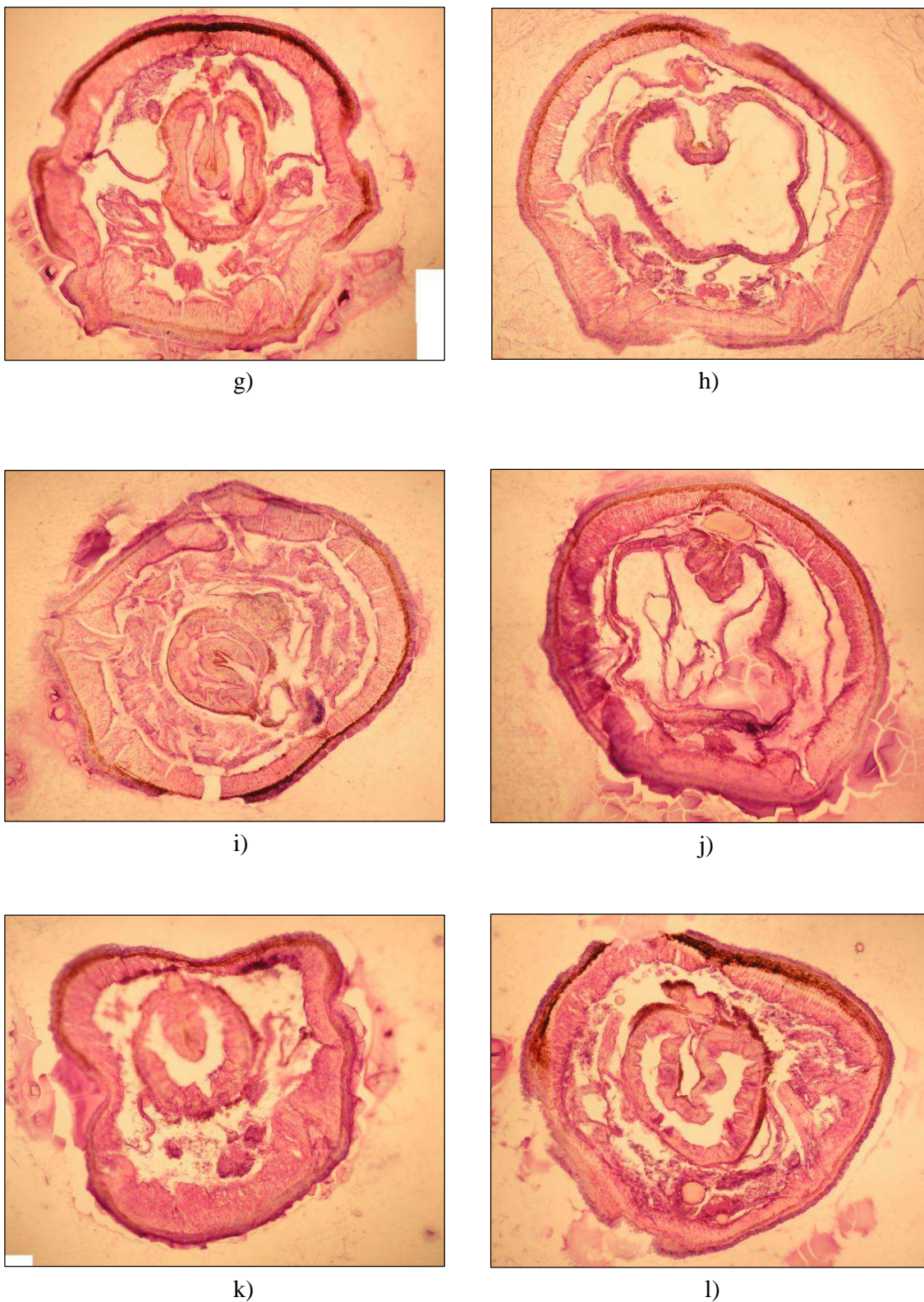


e)



f)





**Slika 88.** Histološki preparati gujavica (*Eisenia fetida*) nakon izlaganja mješavini pirimifosmetila ( $0,75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) i terbutilazina ( $40 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) nakon: a) 2h, b) 4h, c) 6h, d) 8h, e) 10h, f) 12h, g) 14h, h) 16h, i) 18h, j) 20h, k) 22h, l) 24h.

## 5. Rasprava

Upotreba pesticida u poljoprivrednim sustavima je najvažniji čimbenik povećanja proizvodnje hrane (Mosleh i sur., 2003). Zbog toga je istraživanje utjecaja pesticida na ekološke sustave izuzetno važno, a zbog svoje kompleksnosti često nedovoljno istraženo. Nedostatnost istraživanja utjecaja pesticida na biološke sustave ne ogleda se samo u manjku informacija o njihovom djelovanju na pojedine segmente biološkog sustava već vrlo često i u različitim rezultatima dobivenim jednakim metodama. Pregledom literature može se ustanoviti da je različitost u protokolima, odabiru vrsta, u parametrima upotrijebljenim za kreiranje toksikoloških pokusa sa gujavicama kao testnim organizmima izuzetno velika (Motalib i sur., 1996; Reinecke, 1992). Postoji više razloga takvom stanju. Najčešće je razlog specifičnost područja u kojem se nalazi laboratorij kao i specifikum aplikacijske problematike kojom se taj laboratorij bavi, no to su subjektivni čimbenici koji više ili manje nemaju značaj za globalno toksikološko i ekotoksikološko znanje. Daleko opasniji su objektivni čimbenici kao što je nedovoljno poznavanje fiziologije testnih organizama, nedovoljno poznavanje ekokemijskih i ekotoksikoloških osobina pesticida koji se istražuju, itd. što dovodi kako do pogrešno dizajniranih eksperimenata tako i često do potpuno pogrešne interpretacije dobivenih rezultata. Laboratorijski testovi zauzimaju važnu ulogu u procesima procjene okolišnog rizika na temelju ekotoksikoloških saznanja temeljenim na gujavicama kao testnim organizmima (Kula, 1996, 1998; Paradise i sur., 1998; Spurgeon, 2002; Van Gestel, 1992).

Upotreba standardiziranih testova (OECD, EPA i druge norme) osigurava dobivanje isključivo jednoznačnih rezultata. Za potrebe kvalitetne procjene okolišnog rizika kao i za kreiranje sustava upravljanja okolišnim rizicima takvi rezultati mogu biti samo od orijentacijskog značaja. To je vidljivo i iz rezultata prezentiranih u ovom radu na primjerima pesticida inhibitora acetilkolinesteraze (endosulfana, temefosa, pirimifosmetila i malationa). Procjenitelji njihove toksičnosti s obzirom na aktivnost AChE, CAT i GST mijenjaju se tijekom vremena neravnomjerno. Tako na primjer kod endosulfana promjene s obzirom na vrijeme variraju od 60% do svega 3%, dok kod malationa od čak 67% do 17%. Već na temelju toga je vidljivo da jednoznačan pokazatelj toksičnosti kao što je  $EC_{50}$  dobiven tijekom nekog određenog vremena ni u kom slučaju ne može biti varijabla na kojoj bi se mogla temeljiti kvalitetna procjena okolišnog rizika. Na primjerima primjene OECD standardiziranog testa kakav smo upotrijebili u testiranju acetilkolinesteraza neinhibirajućih pesticida (bentazona, metolaklora i terbutilazina) vidljivo je da je moguće izmjeriti učinak i takvih pesticida te odrediti računski statistički značajan  $EC_{50}$  koji će međutim u praksi biti potpuno besmislen. Testiranje letalnosti također je izuzetno varijabilno a naša istraživanja su pokazala (Slika 70) da je u istraživanjima takvih učinaka vrijeme važan čimbenik te da se letalne koncentracije

pojedinih pesticida mogu uvjetno upotrebljavati samo kao pokazatelji relativne toksičnosti tj. razlike u toksičnosti među pojedinim pesticidima.

Uobičajena funkcija kojom se prikazuje ovisnost učinka o koncentraciji toksikanta je logistička funkcija. Kod istraživanja letalnih koncentracija uobičajena je upotreba tro-parametarske logističke funkcije zbog toga što letalnost obuhvaća cjelovitu skalu relativnog učinka od 0 do 1 tj. od 0 – 100%. Kada su u pitanju molekularni biomarkeri od kojih su najzastupljeniji aktivnosti raznih enzima, takva funkcija nije zadovoljavajuća zbog toga što se gotovo nikad ne postižu vrijednosti ispod donje granične vrijednosti aktivnosti te zbog toga što se veličina donje granične vrijednosti ne može unaprijed predvidjeti. Naime, u slučaju kada bi donja granična vrijednost bila predvidljiva, reskaliranjem ordinate vrlo jednostavno bi se mogla dobiti iskoristivost cijelog opsega relativnog učinka. Stoga se u ovakvim istraživanjima mora upotrijebiti četiri- ili pet-parametarska logistička funkcija. U ovom istraživanju mi smo upotrijebili pet-parametarsku logističku funkciju sa *a priori* određenim parametrom gornje asimptote u slučaju mjerenja aktivnosti AChE i donje asimptote u slučaju mjerenja CAT i GST. Unaprijed određeni parametri bili su skalirani prema bazalnoj vrijednosti istraživanih biomarkera u gujavice na vrijednost 1. Iako se u literaturi uglavnom spominje porast aktivnosti CAT i GST kod izlaganja gujavica pesticidima (Abdel Salam Aly i Schröder, 2008; Booth i sur., 1998; Contardo-Jara i sur., 2008; Xiao i sur., 2006; Schreck i sur., 2008) naša prijašnja iskustva kao i preliminarni rezultati koji su predhodili ovom radu pokazali su da se aktivnost ovih enzima ne mora jednoznačno mijenjati uvijek u smjeru porasta, već da se pogotovo kod kraćih vremena izlaganja aktivnost ovih enzima može smanjivati. Stoga u slučajevima CAT i GST nije bilo primjereno skaliranje ordinate i početne vrijednosti na 0, već kao i kod AChE na 1.

Logistički model funkcije ovisnosti o koncentraciji naziva se još i granični model zbog toga što ga obilježavaju dva parametra: gornji parametar ili gornja asimptota i donji parametar ili donja asimptota ili granična vrijednost. Kada se radi o aktivnosti enzima čija se aktivnost smanjuje onda gornja asimptota odgovara bazalnoj vrijednosti tog enzima u intaktnim organizmima, dok je granična vrijednost ili donja asimptota ona minimalna vrijednost koja se može postići djelovanjem određenog toksikanta, tj. to je vrijednost ispod koje nije moguće očekivati preživljavanje organizma u vremenu koje bi omogućavalo mjerenje tog biomarkera. Kod enzima čija aktivnost raste je obratno, donja asimptota odgovara vrijednosti tog enzima u intaktnim organizmima, dok gornja vrijednost odgovara maksimalnoj vrijednosti koja se može postići kod takvih organizmima za taj enzim. Vrlo malo se zna o graničnim vrijednostima biomarkera kod gujavice a pogotovo o ovisnostima tih graničnih vrijednosti o kvaliteti pesticida koji se istražuje. U zadnjih dvanaest godina povećao se broj istraživanja koja su pokazala da ovisnost odgovora o koncentraciji nije moguće uvijek prikazati logističkom tj. graničnom funkcijom. Naime, ustanovljeno je da pesticidi mogu izazvati

takozvani hormetički učinak. Hormeza ili hormetički učinak je pojava da određena tvar u pojedinom segmentu koncentracijskog gradijenta uzrokuje suprotan učinak od očekivanog. Dosadašnja istraživanja su pokazala da je takav učinak, tj. hormetički model ovisnosti odgovora o koncentraciji u toksikologiji puno uobičajeniji od graničnog modela (Calabrese i Baldwin, 2003). Do prije nekoliko godina postojao je veliki prijemor između znanstvenika koji su svoje toksikološke hipoteze temeljili na graničnom modelu i znanstvenika koji su sve više uočavali značaj hormeze, kako u tumačenju toksikoloških učinaka, tako i u procesima procjene okolišnog i toksikološkog rizika. Naime, temelj procjene okolišnog rizika, tj. temelj upravljanja okolišnim rizikom su granične vrijednosti dobivene modeliranjem toksikološkog učinka u ovisnosti o koncentracijskom gradijentu. Najrespektabilnija granična vrijednost je tzv. NOAEL (engl. „no observable adverse effect level“). Prema takvom temeljnom shvaćanju sve doze ili koncentracije ispod NOAEL smatraju se nebitnim, neučinkovitim ili aproksimativnim. Hipoteza o hormetičkom učinku opovrgava takvo shvaćanje i unosi novi problem u procjeni okolišnog rizika. Naime, iako su hormetički učinci vezani uz niske, često pogrešno nazivane subefektne koncentracije i doze, vrlo jednostavno se može pokazati kako i u tom rasponu koncentracija hormetički učinak može itekako imati utjecaj na zaključke o procjeni ekološkog rizika (Rodricks, 2003). Istraživanja postojeće literature o toksičnosti pojedinih supstanci pokazala su da je hormetički učinak puno puta zanemaren i izostavljen u opisu ovisnosti toksičnog učinka o koncentraciji (Calabrese i Baldwin, 2003). Iako je hormeza najprije opisana kod mjerenja učinaka radioaktivnog zračenja i iako se dugo vremena držalo da su hormetički učinci kod biokemijskih reakcija i bioloških pojava samo hipotetski mogući, sve veći broj radova sa jasno dokazanim hormetičkim učincima pokazali su da hormeza nije slučajnost već pravilo koje treba respektirati. Temeljitija istraživanja hormetičkih reakcija su pokazala da se kod većine mogu razlučiti najmanje dva učinka, hormetički i toksični. Ovakvo razlučivanje mora se uzeti samo uvjetno. Naime, poput radijacijskog hormetičkog učinka i toksikološki hormetički učinak može se vrlo lako zloupotrijebiti u praksi. Kako je po definiciji hormetički učinak suprotan toksičnom učinku, vrlo lako se takva tvrdnja može pretvoriti u tvrdnju da je hormetički učinak beneficijalan, tj. koristan ili dobar za organizam. Ta opasnost postaje poglavito velika ako se u obzir uzmu hormetički učinci tvari koje se u pravilu upotrebljavaju u homeopatskoj medicini. U homeopatskoj medicini se doista radi o korištenju hormetičkog učinka koji jest koristan za organizam, koji dapače ima medikativni učinak, tj. učinak liječenja. Međutim, nemaju svi hormetički učinci takvo korisno svojstvo za organizam. To se vrlo lako može pokazati i u rezultatima koje smo dobili i u okviru naših istraživanja opisanih u ovom radu. Tako za povećanu vrijednost aktivnosti AChE koju smo dokazali kao hormetički učinak endosulfana i temefosa pri kraćem vremenu izlaganja i vrlo malim subefektnim dozama, možemo postaviti znanstvenu hipotezu da će takvo malo povećanje dovesti do brže razgradnje neurotransmitera, a time do kraćeg trajanja podražaja na



postsinaptičkim membranama, te umanjivanje nastanka postsinaptičkog akcijskog potencijala bilo u smislu smanjivanja njegove frekvencije ili u smislu smanjivanja njegove amplitude. Takav scenarij može dovesti do smanjivanja normalne bazalne fiziološke napetosti muskulature gujavica koja će opet polučiti bolji prodor lipofilnih toksičnih tvari. Povećanje aktivnosti AChE može se povezati povećanjem razine katekolamina kao najčešće reakcije organizma na stres. Povećanje razine katekolamina (adrenalina, noradrenalina i dopamina) dovodi do njihovog vezanja s receptorima na membrani stanice stvarajući hormon-receptor kompleks. Nastali hormon-receptor kompleks aktivira adenilat-ciklazu koja pretvara adenozin trifosfat (ATP) u ciklički adenozin monofosfat (cAMP), a cAMP povećava aktivnost enzima i propusnost stanične membrane, te povećava biokemijsku aktivnost stanice. Kod štakora je indukcija AChE upravo povezana sa aktivacijom adenilat i gvanilat ciklaza adrenalinom (Elayev, 1985), a dokazana je i sličnost ovih procesa kod sisavaca i riba također adrenalinom induciranim sadržajem proteina u mozgu i simultanom aktivacijom AChE (Pavlov, 1990).

Iz rezultata mjerenja aktivnosti AChE nakon izlaganja smjesama temefosa i endosulfana dokazali smo njihovu sinergističku interakciju (Slika 71) koja je po svom karakteru premašila očekivanja. Jedan od uzroka takve sinergističke interakcije može biti i činjenica da oba istraživana pesticida izražavaju mjerljiva hormetička svojstva. Zanimljivo je da se hormetičko svojstvo nije moglo ustanoviti kod izlaganja njihovoj smjesi, no to dakako ne isključuje mogućnost i realnost ove hipoteze. Hormezu je teško dokazati u smislu statistički značajnih razlika i jasno određenih veličina iz puno razloga, a dva su najvažnija: do hormeze dolazi pri vrlo malim koncentracijama i ona se događa u relativno kratkom vremenu nakon početka izlaganja. Postavlja se pitanje nije li hormeza uvijek prisutna, ali ne događa li se ona u vremenskim intervalima u kojima ju nije moguće raspoloživim tehnikama detektirati i izmjeriti. Naša pretpostavka je da se hormeza događa i nakon izlaganja smjesi temefosa i endosulfana, ali da traje suviše kratko vrijeme, te ju nije moguće izmjeriti metodama kojima smo mi raspolagali.

Naznake hormetičkog učinka istraživanih pesticida na aktivnost CAT i GST, te njezino moguće postojanje također nam ne sugerira korisno obilježje hormeze i u tim slučajevima. Naša istraživanja su naznačila da bi se aktivnost CAT i GST u prvim satima nakon izlaganja kod gujavice mogle smanjivati, da bi se tek nakon najmanje 24 sata ovi enzimi inducirali tj. povećala njihova aktivnost. I jedan i drugi enzim su izuzetno važni u reagiranju organizma na oksidativni stres, s tim da je GST posebno važan kao sastavni dio II faze metabolizma ksenobiotika. Smanjenje aktivnosti CAT može za organizam značiti umanjenu sposobnost održavanja oksidoredukcijskog „steady state“ stanja, dok smanjenje aktivnost GST za značaj može imati umanjenu sposobnost izlučivanja metabolita, tj. produkata nakon I faze metabolizma. Mi smo potvrdili ovu hipotezu i mjerenjem učinkovitosti herbicida metolaklora

koji iako nema letalno toksično svojstvo za gujavice, ispoljava toksični učinak u smislu djelovanja na aktivnost CAT i GST u smjesi sa insekticidima endosulfanom i temefosom. Rezultati tog istraživanja su pokazali da će u takvoj smjesi toksičnost endosulfana i temefosa biti pojačani, tj. dokazano je potencijacijsko svojstvo metolaklora. Ovi naši rezultati djelomično su u skladu sa prijašnjim istraživanjima koja su pokazala da dva kloroacetanilidna herbicida alaklor i metolaklor koji su samo slabo toksični za životinje u relativno velikim letalnim koncentracijama (Johnson i Finley, 1970), ali mogu imati mjerljiv toksikološki učinak na *Chironomidae* ako su u kombinaciji sa toksičnijim pesticidima kao što je klorpirifos (Jin-Clark i sur., 2008).

Do sada je hormetički model kod gujavica utvrđen kod utjecaja cinka, olova i kadmija na glutation peroksidazu (GPX) i GST (Łaszczycza i sur., 2004), kod utjecaja temefosa na AChE (Hackenberger i sur., 2007), zatim kod utjecaja žive na imunokompetentni odgovor (Sauvé i Fournier, 2005), te kod utjecaja kadmija na aktivnost CAT i superoksid dismutaze (SOD) (Zhang i sur., 2009). Ovakva ovisnost opisuje se s četiri- ili pet-parametarskom Brain-Cousenovom funkcijom. Mi smo istražili mogućnost primjene oba modela, i graničnog i hormetičkog, u mjerenju i istraživanju subletalnih toksičnih učinaka sva tri enzima (Slika 41-49). Iako se upotrebom oba modela mogu dobiti slični rezultati ipak postoje određena ograničenja u njihovoj primjeni. Brain-Cosenova funkcija gotovo nikada nije predvidjela donju graničnu vrijednost koja bi bila interpretabilna bilo u biološkom bilo u toksikološkom smislu. Osim toga, iako je ustanovljen hormetički učinak za temefos i endosulfan, u uobičajenom standardnom rasponu koncentracija hormetički učinak nije bilo moguće ustanoviti, niti dobiti rezultat koji bi bio statistički značajan. Ovakav rezultat pokazuje da se Brain-Cosenova funkcija može upotrijebiti samo u početnom segmentu koncentracijskog gradijenta dok je za cjelokupan raspon koncentracijskog gradijenta više odgovarajući granični model tj. logistička funkcija. Ukoliko se želi karakterizirati učinak pesticida u cjelokupnom rasponu koncentracijskog gradijenta od nula do maksimalne subletalne koncentracije istraživanje se mora izvoditi u dva dijela: globalno koncentracija-odgovor istraživanje u cijelom koncentracijskom rasponu, te lokalno istraživanje u rasponu od nule do vrijednosti koncentracije koja približno odgovara vrijednosti  $EC_{50}$ .

Promjene aktivnosti CAT i GST u zavisnosti koncentracije istraživanih pesticida bile su daleko manje nego što su to promjene u aktivnosti AChE. Maksimalna promjena aktivnosti AChE bila je smanjenje aktivnosti od 3,3 puta u odnosu na kontrolu, dok je za CAT maksimalna promjena bilo povećanje aktivnosti od 1,9 puta u odnosu na kontrolu, te za GST povećanje od 2,3 puta u odnosu na kontrolu. Iz navedenog se jasno da zaključiti da je aktivnost AChE u praktičnom smislu puno bolji biomarker jer je jasno izražena ovisnost doze o koncentraciji tijekom sva četiri vremena izlaganja, dok se promjena aktivnosti CAT i GST mijenjala i u temporalnom i u kvantitativnom smislu. Rezultati su pokazali da na početku

izlaganja vrlo često aktivnost CAT i GST statistički značajno opada da bi nakon prolongiranog vremena izlaganja ona rasla do maksimalno 1,9 puta u odnosu na kontrolu nakon 48 h kod koncentracije malationa  $60 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  za CAT (Slika 29 f), te za 2,3 puta u odnosu na kontrolu nakon 48 h kod koncentracije endosulfana  $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  za GST (Slika 22 d). Početno smanjenje aktivnosti CAT i GST može se objasniti toksičnim stresom uslijed prisutnosti velike količine reaktivnih kisikovih čestica kao što je npr. superoksidni anion ( $\text{O}_2^-$ ). Naime, poznato je da u normalnim uvjetima superoksid dismutaza (SOD), jedan od antioksidativnih enzima katalizira razgradnju superoksida u kisik i vodik peroksid. Međutim kada je količina superoksidnog aniona jako velika on postaje inhibitor katalaze (Kono i Fridovich, 1982; Geret i sur., 2002).

Poteškoće u određivanju statistički značajne razlike između uzoraka u dobivenom rasponu promjena aktivnosti CAT i GST ukazuje na binarni karakter ovih biomarkera. Sličnu pojavu imamo i kod drugih biomarkera kao što je EROD, koncentracija glutationa, broj mikronukleusa, itd. čija se vrijednost samo iznimno može dovesti u nekakvu realnu funkciju koncentracije kojoj su organizmi bili izloženi. Praktično to znači da porast aktivnosti CAT i GST iznad određene vrijednosti koja se statistički značajno razlikuje od njihove bazalne vrijednosti za značaj ima samo potvrdu da je organizam bio izložen toksikantu, i ne može se dovesti dovesti u vezu niti izračunati kojoj hipotetskoj koncentraciji toksikanta je gujavica bila izložena. Za razliku od ova dva biomarkera, aktivnost AChE kod gujavica je funkcija vremena izlaganja i koncentracije. Stoga, aktivnost AChE kod gujavica možemo smatrati kvantitativnim biomarkerom, a aktivnost CAT i GST indikativnim biomarkerima.

Iako su laboratorijski testovi izuzetno značajni njihov glavni nedostatak je relativno mala sličnost uvjeta eksperimenata sa uvjetima realnog okoliša. Unatoč postojanju već standardiziranih testova mikro i mezokozmosa temeljenih na upotrebi standardiziranih umjetnih tala te standardiziranih simulacija ekoloških sustava s postojećim hranidbenim lancima, takva istraživanja su vrlo skupa i dugotrajna, a vrlo često rezultati dobiveni u mikro i mezokozmičkim sustavima sadrže grešku koja je komparabilna sa greškama klasičnih laboratorijskih testova. To se vrlo često objašnjava multipliciranjem grešaka i nejednolikom zastupljenosti utjecaja pojedininih biotičkih i abiotičkih ekoloških čimbenika. Jedan od posebno važnih razloga koji dovode do slabe interpretabilnosti mikro i mezokozmičkih eksperimenata je slabo poznavanje specifičnih uvjeta do kojih dolazi u realnom okolišu, od kojih je najznačajniji uvjet prisutnosti više od jednog toksikanta u isto vrijeme. Na poljoprivrednim površinama gotovo uvijek se upotrebljava cijeli niz različitih pesticida, vrlo rijetko istovremeno, ali i vrlo često u kraćim ili duljim vremenskim razmacima. Koncentracije koje se upotrebljavaju u laboratorijskim testovima vrlo često višestruko premašuju koncentracije kojima gujavice bivaju izložene u realnom okolišu. Stoga je u eksperimentima nužno istraživati realne koncentracije pri čemu posebnu pozornost treba pridavati

hormetičkom učinku. Legislativa se temelji uglavnom na rezultatima istraživanja pojedinačnih pesticida i ne uzima u obzir njihovu interakciju sa drugim tvarima u okolišu. Unatoč vrlo visokim postavljenim limitima legislative učinak pesticida uvijek ostaje mjerljiv i izvjestan osim u slučaju visoko specijaliziranih pesticida sa djelovanjem na jednu ili vrlo mali broj vrsta. Takav primjer postoji kod metoda dezinfekcije kao što je na primjer Bti kod tretiranja komaraca. U poljoprivredi gotovo da i nema tako visokospecijaliziranog pesticida. Naše istraživanje je pokazalo da pesticidi kao što je na primjer metolaklor koji se upotrebljava u praksi kao herbicid ima određeni mjerljivi biološki učinak na gujavice u smislu povećanja aktivnosti CAT i GST. Rezultati su također pokazali da prisutnost metolaklora može potencijalski utjecati na učinkovitost endosulfana i temefosa tj. na statistički značajno smanjenje AChE. Takav isti učinak metolaklora nije bilo moguće utvrditi s malationom i pirimifosmetilom što znači da je potencijalski karakter metolaklora specifičan a ne općenit. Kako metolaklor uzrokuje povećanje aktivnosti CAT i GST enzima koji su direktno uključeni u fiziološki odgovor na oksidativni stres moguće je da metolaklor suprimira puferske mehanizme koji su u cijelosti ili djelomično uključeni u odgovor gujavice na aktivnost AChE. Istraživanja binarnih smjesa AChE inhibirajućih pesticida pokazala su da postoji aditivan učinak kod svih kombinacija, osim kod kombinacije endosulfan : temefos koja je pokazala sinergističko obilježje. Kombinacija endosulfan : temefos je u pojedinim koncentracijskim omjerima više nego dva puta učinkovitija od bilo koje pojedinačne koncentracije temefosa ili endosulfana iz čega proizlazi nužnost uzimanja u obzir te činjenice u legislativnim protokolima. Jedno od mogućih objašnjenja sinergističkog učinka pesticida potječe iz istraživanja djelovanja atrazina na povećanje toksičnosti klorpirifosa. Naime, primarni metabolit klorpirifosa je puno toksičniji glede inhibicije AChE od ishodišne tvari. Istovremeno pojačan unos atrazina pojačava prvu fazu metabolizma klorpirifosa i uzrokuje nagomilavanje njegovih oksonskih, vrlo toksičnih metabolita (Lydy i Linck, 2003). Slično tome, jedan od primarnih produkata endosulfana je endosulfan-sulfat, znatno toksičniji spoj od ishodišnog endosulfana. Endosulfan diol je također toksičan metabolit endosulfana, međutim njegova toksičnost je za dva reda veličine slabija. Najvjerojatnije metaboliti endosulfana induciraju enzime prve faze metabolizma pa se na taj način ubrzava i metabolizam temefosa što dovodi do jačeg tj. sinergističnog učinka. Drugo objašnjenje može biti primarni učinak temefosa na epitelno tkivo gujavica. Naime, mjerenja debljine epitelnog sloja nakon izlaganja organofosforinim insekticidima kao što je npr. pirimifosmetil ili smjesi pesticida koje su sadržavale temefos (Slika 88), pokazala su stanjivanje epitelnog tkiva, što može dovesti do brže apsorpcije toksikanata u organizam. Sličan rezultat je dobiven i ranije u pokusima s atrazinom i profenofosom (Reddy i Rao, 2008), u pokusima sa klorpirifosom i metadationom kod *Chironomus tentans* (Lydy i Austin, 2004), te u pokusima sa atrazinom i klorpirifosom kod *Chironomus tentans* (Belden i Lydy, 2001). Još je jedno moguće

objašnjenje sinergističkog učinka ove smjese, a to je da temefos utječe na toksikokinetiku endosulfana na tri moguća načina. Prvo, djeluje na povećanje brzine unosa endosulfana, zatim povećava brzinu pretvorbe endosulfana u više toksičniji metabolit endosulfan-sulfat i treće smanjuje brzinu transformacije metabolita u manje toksične metabolite. Osim toga, općenito vrijedi pravilo da lipofilnost određene tvari uvelike doprinosi njezinim toksičnim svojstvima, prije svega zbog bolje permeabilnosti kroz membranske strukture (Rico, 2001). Ukoliko usporedimo lipofilnost sva četiri istraživana insekticida može se jasno uočiti da su endosulfan i temefos za jedan red veličine lipofilniji u odnosu na pirimifosmetil i malation. Ovo njihovo svojstvo objašnjava i njihovu relativno brzu toksikodinamiku kao i relativno kratko vrijeme u kojem nastupaju njihovi učinci. Osim toga, budući da koeficijent razdjeljenja oktanol/voda ( $\log K_{ow}$ ) za temefos iznosi 4,9 dermalno izlaganje uz pomoć kontakt testa na filter papiru kojeg smo koristili u ovom istraživanju pri izlaganju gujavica, relevantan je put unosa ovog spoja, dok je za jako hidrofobne spojeve čiji je  $\log K_{ow} > 5$ , glavni put unosa različitih tvari je oralni (Belfroid i sur., 1995).

Značaj interakcija između temefosa i endosulfana ogleda se i u njihovom međusobnom utjecaju na hormetički učinak. Naime, ukoliko se mjeri odgovor na koncentracijski gradijent mješavina ovih dvaju pesticida, nije moguće izmjeriti standardnim metodama hormetički učinak ni u kojem rasponu koncentracijskog gradijenta. Naša mjerenja (Slika 48, 57) su pokazala da su veličina i oblik hormetičke krivulje funkcija doze i vremena u smislu da se hormetički učinak kod ova dva pesticida može izmjeriti samo nakon kraćeg vremena izlaganja. Bez obzira koju od navedenih hipoteza (hipoteza indukcije metabolizma i hipoteza pojačane apsorpcije kroz epitel) uzme u obzir njima se može i objasniti izostanak hormetičkog učinka. Naime, ubrzanje metabolizma u smislu povećanja brzine biotransformacije temefosa i endosulfana dovodi do brzog nagomilavanja toksičnih metabolita koji pak dalje ubrzavaju po principu pozitivne popratne sprege indukciju enzima prve faze metabolizma. Ta brzina je očito dovoljno velika da puferski mehanizmi održavanja aktivnosti AChE postaju nemjerljivi. Glede povećane apsorpcije kroz epitel nedostatak hormone objašnjava se na jednak način s osnovnom razlikom što je nagomilavanje ishodišnih tvari i njihovih metabolita posljedica povećane apsorpcije a povećana indukcija metaboličkih enzima je posljedični učinak.

Dokazano je da sve kemijske supstance ne pokazuju hormetički učinak kod svake završne točke mjerenja, tj. ako neka supstanca primjerice pokazuje hormetički učinak kod smanjivanja aktivnosti nekog enzima ne znači da će isti takav učinak imati kod smanjivanja nekog drugog enzima (Calabrese i Baldwin, 2001). Neka istraživanja su također pokazala da se hormetička svojstva pojedinih kemijskih tvari mijenjaju kada se te tvari nalaze u smjesama (Belz i sur., 2008).

Hormetički učinak je uspješno utvrđen u koncentracijskom rasponu od 0 do 0,1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  kod temefosa s čime smo potvrdili dosadašnja istraživanja (Hackenberger i sur., 2007), te kod endosulfana u jednakom koncentracijskom rasponu. Istraživanje hormetičkog učinka endosulfana naišlo je na niz poteškoća koja su ukazala na osnovne razloge zbog kojih se hormetički učinak teško opisuje i dokazuje. Iako su rezultati hormetičkog učinka endosulfana i temefosa najbolje bili prilagođeni Brain-Cousenovoj funkciji, podaci o jačini inhibicije endosulfanom i temefosom nisu mogli biti opisani tom funkcijom, u najmanju ruku ne bolje nego što ih je opisivala logistička funkcija. Višestruko testiranje parametarskim i neparametarskim statističkim metodama nedvojbeno je pokazalo da pri koncentraciji temefosa od 0,07  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  aktivnost AChE je statistički značajno veća nego kod kontrole što jasno dokazuje hormetički učinak. Kako je hormetički raspon koncentracija kod endosulfana i temefosa relativno uzak i pomaknut u lijevu stranu u odnosu na točku infleksije, Brain-Cousenova funkcija ne može bolje opisati ovisnost doze o koncentraciji nego što to čini logistička funkcija. Stoga smo dokazali da postoji najmanje dva oblika hormetičke funkcije koje opisuju odgovor gujavice u smislu smanjenja aktivnosti AChE na izloženost pojedinim pesticidima.

Usporedba omjera površine epitelnog i mišićnog sloja (Pep/Pmus) na poprečnom presjeku kod gujavice nakon izlaganja smjesama pesticida pokazala su smanjenje u odnosu na taj omjer kod kontrolne skupine (Tablica 14). Smanjenje ovog omjera može biti posljedica grčenja mišića uslijed djelovanja organofosfornih pesticida kao što je pirimifosmetil ili zbog oštećenja staničnih membrana epitelnih stanica uslijed direktnog kontakta gujavica sa pesticidima. Međutim, velika varijanca promjene omjera onemogućava njegovu upotrebu kao biomarkera u doza-odgovor smislu, ali je moguća njegova upotreba u smislu binarnog odlučivanja (prisustvo – odsustvo toksikanta). Uočene morfološke i anatomske promjene poput grčenja, uvrtanja, fragmentacije tijela, istjecanja celomske tekućine nakon izlaganja gujavica pesticidima potvrđuju rezultate dosadašnjih istraživanja na insekticidu profenofosu (Reddy i Rao, 2008).

## 6. ZAKLJUČCI

Akutno i kronično djelovanje pojedinačnih pesticida je poznato na većinu organizama zbog toga što se u procesu proizvodnje i registracije pesticida provode različiti akutni, uključujući i neke kronične testove toksičnosti. Na taj način se mogu predvidjeti mnogi ekotoksikološki učinci pesticida, međutim nepredvidljivim ostaju učinci i toksičnost kombinacije pesticida, a upravo su organizmi u okolišu najčešće istovremeno izloženi smjesi različitih pesticida. Postojanje i prisutnost velikog broja različitih pesticida u okolišu zahtijeva razmatranja njihovih potencijalnih interakcija. Zbog ove činjenice neophodno je provoditi istraživanja koja se odnose na toksičnost mješavina.

Ključni zaključci provedenog istraživanja su slijedeći:

1. Letalne koncentracije pojedinih pesticida kao što su acetilkolinesteraza inhibirajući pesticidi (endosulfan, temefos, pirimifosmetil i malation), te acetilkolinesteraza neinhibirajući pesticidi (bentazon, metolaklor, terbutilazin) mogu se uvjetno upotrebljavati samo kao pokazatelj relativne toksičnosti tj. razlike u toksičnosti među pojedinim pesticidima.
2. Kod istraživanja biomarkera za prikaz učinka o koncentraciji potrebno je upotrijebiti pet-parametarsku logističku funkciju ukoliko je obuhvaćen maksimalan raspon koncentracija i pet-parametarski Brain-Cousenov model za raspon koncentracija ispod  $EC_{50}$ .
3. Za karakterizaciju učinka pesticida u cjelokupnom rasponu koncentracijskog gradijenta od nula do maksimalne subletalne koncentracije istraživanje se mora izvoditi u dva dijela: globalno koncentracija-odgovor istraživanje u cijelom koncentracijskom rasponu, te lokalno istraživanje u rasponu od nule do vrijednosti koncentracije koja približno odgovara vrijednosti  $EC_{50}$ .
4. Aktivnost AChE u praktičnom smislu je interpretabilniji i stabilniji biomarker nego što su to aktivnosti CAT i GST, jer je kod AChE jasno izražena ovisnost o koncentraciji tijekom vremena izlaganja, s maksimalnim dosegom od 30% početne vrijednosti kod intaktnih organizama. Promjene aktivnosti CAT i GST mijenjaju se u temporalnom i kvantitativnom smislu, s maksimalnim dosegom od 1,9 puta većom aktivnosti od bazalne kod CAT i 2,3 kod GST. Stoga, aktivnost AChE kod gujavica možemo smatrati kvantitativnim biomarkerom, dok aktivnost CAT i GST samo indikativnim biomarkerima.

5. Temefos i endosulfan polučuju hormetički učinak u rasponu koncentracija od 0 do 0,1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ .
6. Binarne smjese AChE inhibirajućih pesticida pokazale su aditivni učinak kod svih istraživanih kombinacija pesticida osim u slučaju kombinacije endosulfana s temefosom koja je pokazala sinergističko obilježje.
7. Metolaklor potencijacijski djeluje na učinkovitost endosulfana i temefosa, odnosno na statistički značajno smanjenje aktivnosti AChE, no potencijacijski učinak nije utvrđen u kombinaciji metolaklora s malationom i pirimifosmetilom, stoga je potencijacijski karakter metolaklora specifičan a ne općenit
8. Promjena omjera površine epitela i površine mišića (Pep/Pmus) na poprečnom presjeku *Eisenia andrei* može biti indikatorski biomarker izloženosti gujavice pesticidima. Velika varijanca promjene omjera onemogućava njegovu upotrebu kao biomarkera u „doza-odgovor“ smislu, no moguća je njegova upotreba u smislu binarnog odlučivanja (prisustvo – odsustvo toksikanta).



## 7. LITERATURA

- Abdel Salam Aly, M., Schröder, P., 2008. Effect of herbicides on glutathione S-transferases in the earthworm, *Eisenia fetida*. *Envir. Sci. Pollut. Res.* 15, 2, 143-149.
- Abdollahi, M., Mostafalou, S., Pournourmohammadi, S. i Shadnia, S., 2003. Oxidative stress and cholinesterase inhibition in saliva and plasma of rats following subchronic exposure to malathion. *Comp. Biochem. Physiol.* 137C, 1, 29-34.
- Achazi, R.K., Flenner, C., Livingstone, D.R., Peters, L.D., Schaub, K., Scieive, E., 1998. Cytochrome P450 and dependent activities in unexposed and PAH-exposed terrestrial annelids. *Comp. Biochem. Phys. C*, 121, 339-350.
- Ahmad, I., Hamid, T., Fatima, M., Chand, H.S., Jain, S.K., Athar, M. i Raisuddin, S. 2000. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Bioch. Bioph. Acta.* 1523, 37-48.
- Altenburger, R., Backhaus, T., Boedeker, W., Faust, M., Scholze, M., Grimme, L.H., 2000. Predictability of the toxicity of multiple chemical mixtures to *Vibrio fischeri*: Mixtures composed of similarly acting chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2341-2347.
- Altenburger, R., Bodeker, W., Faust, M., Grimme, H., 1990. Evaluation of the isobologram method for the assessment of mixtures of chemicals. *Ecotoxicol. Environ. Safety. Ecotoxicol. Environ. Safety.* 20, 98-114.
- Altenburger, R., Boedeker, W., Faust, M., Grimme, L.H., 1996. Regulations for combined effects of pollutants: consequences from risk assessment in aquatic toxicology. *Food Chem. Toxicol.* 1996, 34, 1155-1157.
- Altenburger, R., Walter, H., Grote, M., 2004. What contributes to the combined effect of a complex mixture? *Environ. Sci. Technol.* 38, 6353-6362.
- Anderson, A., Lydy, M.J., 2002. Increased toxicity to invertebrates associated with a mixture of atrazine and organophosphate insecticides. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1507-1514.

- Anderson, P.D., Weber, Lj., 1975. The toxicity to aquatic populations of mixtures containing certain heavy metals. Proceedings of the interactional conference on heavy metals in the environmt. Toronto, Canada, October, 27-31. 2, 2, 933-953.
- Andersson, T., Pesonen, M. i Johansson, C., 1985. Differential induction of cytochrome P-450-dependent monooxygenase, epoxide hydrolase, glutathione transferase and UDP glucuronosyl transferase activities in the liver of rainbow trout by  $\beta$ -naphthoflavone or Clophen A50. *Biochem. Pharmacol.* 34, 3309-3314.
- Antunes, S.C., Castro, B.B., Nunes, B., Pereira, R., Gonçalves, 2008. *In situ* bioassay with *Eisenia andrei* to assess soil toxicity in an abandoned uranium mine. *Ecotox. Environ. Safety.* 71, 620-631.
- Bagnyukova, T.V., Vasylykiv, O.Y., Storey, K.B. i Lushchak, V.I., 2005b. Catalase inhibition by amino triazole induces oxidative stress in goldfish brain. *Brain Res.* 1052, 180-186.
- Bailey, H.C., Deanovic, L., Reyes, E., Kimball, T., Larson, K., Cortright, K., Connor, V., Hinton, D.E., 2000. Diazinon and chlorpyrifos in urban waterways in northern California, USA. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 1, 82-87.
- Bailey, H.C., Miller, J.L., Miller, M.J., Wiborg, L.C., Deanovic, L., Shed, T., 1997. Joint acute toxicity of diazinon and chlorpyrifos to *Ceriodaphnia dubia*. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 11, 2304-2308.
- Banks, K., Turner, P.K., Wood, S.H., Matthews, C. 2005. Increased toxicity to *Ceriodaphnia dubia* in mixtures of atrazine and diazon at environmentally realistic concentrations. *Ecotoxicol. Environ. Toxicol. Chem.* 23, 258-264.
- Belden, J., Lydy, M., 2000. Impact of atrazine on organophosphate insecticide toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2266-2274.
- Belfroid, A., van den Berg, M., Seinen, W., Hermens, J., van Gestel, K., 1994. Uptake, bioavailability and eliminaton of hydrophobic compounds in eearthworms (*Eisenia andre*) in field-contaminated soil. *Environ. Toxicol. Chem.* 14, 4, 605-612.
- Belz, R.G., Cedergreen, N., Sorensen, H., 2008. Hormesis in mixtures – Can it be predicted? *Sci. Total Environ.* 404, 77-78.

- Beneke, T.W., Schwippert, W.W., 1988. The effects of several biocides on a simple muscle preparation of the ecologically relevant soil-organism *Lumbricus terrestris* L. *Comp. Biochem. Physiol.* 89C, 2, 133-139.
- Bengtsson, G., Ek, H., Rundgren, S., 1992. Evolutionary response of earthworms to long-term metal exposure. *Oikos*. 63, 289-297.
- Berenbaum, M., 1989. What is synergy? *Pharmacol. Rev.* 41, 93-141.
- Berenbaum, M.C., 1981. Criteria for analyzing interactions between biologically active agents. *Advanc. Canc. Res.* 35, 269-335.
- Berghout, A.G.R.V., Wenzel, E., Büld, J., Netter, K.J., 1990. Isolation, partial purification, and characterization of the cytochrome P-450-dependent monooxygenase system from the midgut of the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Comp. Biochem. Physiol.* 100C, 3, 389-396.
- Booth, L.H., Heppelthwaite, V., Eason, C.T., 1998. Cholinesterase and glutathione S-transferase in the earthworm *Apporetodea caliginosa* as biomarkers of organophosphate exposure. *Proc. 51st N.Z. Plant Protection Conf.* 138-142.
- Booth, L.H., O'Halloran, 2001. A comparison of biomarker responses in the earthworm *Aporretodea caliginosa* to the organophosphorus insecticides diazinon and chlorpyrifos. *Envir. Toxicol. Chem.* 20, 11, 2494-2502.
- Bouché, M.B., 1977. Strategies lombiciennes. In *Soil organisms as Components of Ecosystems* (V. Lohm i P. Persson, Eds). *Ecol. Bull.* 25, 122-132.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brain, P., Cousens, R., 1989. An equation to describe dose response where there is a simulation of growth at low doses. *Weed Res.* 29, 93-96.
- Broderius, S., Kahl, M.D., 1985. Acute toxicity of organic chemical mixtures to the fathead minnow. *Aqua. Toxicol.* 6, 307-322.

- Bruckner, J.V., Warren, D.A., 2001. Toxic effects of solvents and vapors. In: Klassen, C.D., (Ed.), Casaret and Doull's Toxicology: The basic science of poisons, McGraw-Hill, New York.
- Calabrese, E.J., 1991. Multiple Chemical Interactions. Lewis Publishers, Chelsea, Mi., USA., 13.
- Calabrese, E.J., 2007. Hormesis: Why it is important to toxicology and toxicologists. Environ. Toxicol. Chem. 27, 7, 1451-1478.
- Calabrese, E.J., Baldwin, L.A., 2003. The hormetic dose-response model is more common than the threshold model in toxicology. Toxicol. Sci. 71, 246-250.
- Calabrese, E.J., Baldwin, L.A., 2001. The frequency of U-shaped dose responses in the toxicological literature. Toxicol. Sci. 62, 330-338.
- Capowiez, Y., Rault, M., Mazzia, C., Belzunces, L., 2003. Earthworm behaviour as a biomarker – a case study using imidacloprid. Pedobiologia. 47, 5-6, 542-547, 2003.
- Caselli, F., Gastaldi, L., Gambi, N., Fabbri, E., 2006. In vitro characterization of cholinesterases in the earthworm *Eisenia andrei*. Comp. Biochem. Physiol. 143C, 416-421.
- Chakra Reddy, N., Venkateswara Rao, J., 2008. Biological response of earthworm, *Eisenia foetida* (Savigny) to an organophosphorous pesticide, profenofos. Ecotoxicology and Environmental Safety. 71, 2, 574-582.
- Claiborne, A. (1985). Catalase activity. In: Greenwald, R.A. (Ed.), CRC Handbook of methods in oxygen radical research. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 283-284.
- Contardo-Jara, V., Wiegand, C., 2008. Biotransformation and antioxidant enzymes of *Lumbriculus variegatus* as biomarkers of contaminated sediment exposure. Chemosphere. 70, 1879-1888.
- Corbel, V., Stankiewicz, M., Julien, B., Francoise, G., Jean Marc, H., Bruno, L., 2006. Synergism between insecticides permethrin and propoxur occurs through activation of presynaptic muscarinic negative feedback of acetylcholine release in the insect central nervous system. Neurotoxicology. 27, 4, 508-519.

- Dautremepuits, C., Betoullef, S. i Vernet, G., 2003. Stimulation of antioxidant enzymes levels in carp (*Cyprinus carpio* L.) infected by *Ptychobothrium* sp. (Cestoda). *Fish Shellfish Immun.* 15, 467-471.
- Davies, N.A., Hodson, M.E., Black, S., 2003. Is the OECD acute worm toxicity test environmentally relevant? The effect of mineral form on calculated lead toxicity. *Environ. Poll.* 121, 49-54.
- Denton, D., Wheelock, C., Murray, S., Deanovic, L., Hammock, B., Hinton, D., 2003. Joint acute toxicity of esfenvalerate and diazinon to larval fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 336-341.
- Edwards, C.A., Bohlen, P.J., 1996. *Biology and Ecology of Earthworms*. Chapman & Hall, London, 426.
- Egaas, E., Skaare, J.U., Svendsen, N.O., Sandvik, M., Falls, J.G., Dauterman, W.C., Collier, T.K., Netland, J., 1993. A comparative study of effects of atrazine on xenobiotic metabolizing enzymes in fish and insect, and of the *in vitro* phase-II atrazine metabolism in some fish, insects, mammals, and one plant species. *Comp. Biochem. Physiol.* 106, 141-149.
- EIFAC (European Inland Fisheries Advisory Committee), 1980. Combined effect on freshwater fish and other aquatic life of mixtures of toxicants in water. Food and Agriculture Organisation of the united Nations, Rome, Italy.
- Elayev, N.R., 1985. Mediatory regulation of metabolic processes in nerve cells. In: *Cholinergic regulation of biochemical systems of cell*. 159-220.
- Elhalwagy, M.E.A., Zaki, N.I., 2009. Comparative study on pesticide mixture of organophosphorus and pyrethroid in commercial formulation. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* xxx, xxx-xxx.
- Ellman G.L., Courtney, K.D., Andres Jr., V. i Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95.
- Espinoza-Navarro, O., Bustos-Obregón, E., 2005. Effect of malathion on the male reproductive organs of earthworms, *Eisenia foetida*. *Asian J. Androl.* 7, 1, 97-101.

- Fairbairn, D.W., Olive, P.L., O'Neil, K.L., 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res.* 339, 37-59.
- Faust, M., Altenburger, R., Boedeker, W., Grimme, L.H., 1993. Algal toxicity of binary combinations of pesticides. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 53, 134-141.
- Faust, M., Altenburger, R., Boedeker, W., Grimme, L.H., 1994. Algal toxicity of binary combinations of pesticides. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 53, 134-141.
- Fischer, E., Molnar, L., 1992. Environmental aspects of the chloragogenous tissue of earthworms. *Soil Biol. Biochem.* 24, 1723-1727.
- Fraser, T.R., 1870-1871. An experimental research on the antagonism between the actions of physostigma and atropia. *Proc. R. Soc. Edinb.*, 7, 506-511.
- Furst, A., 2002. My saga with earthworms. *Food Chem. Toxicol.* 40, 789-791.
- Gambi, N., Pasteris, A., Fabbri, E., 2007. Acetylcholinesterase activity in the earthworm *Eisenia andrei* at different conditions of carbaryl exposure. *Comp. Biochem. Physiol.* 145C, 678-685.
- George, S.G., 1994. Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic-conjugating enzymes in fish. In: *Malins, D.C., Ostrander, G.K. (Eds.), Aquat. Toxicol; Molecular, Biochemical and Cellular perspectives. Lewis Publishers, CRC press.* 37-85.
- Geret, F., Serafim, A., Barreira, L., Bebianno, M.J., 2002. Effect of cadmium on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the clam *Ruditapes decussates*. *Biomarkers* 7, 242-256.
- Gibbs, M.H., Wicker, L., Stewart, A.J., 1995. A method for assessing sublethal effects of contaminants in soil to the earthworm, *Eisenia foetida*. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 3, 360-368.
- Gomez-Eyles, J.L., Svendsen, C., Lister, L., Martin, H., Hodson, M.E., Spurgeon, D.J., 2008. Measuring and modelling mixture toxicity of imidacloprid and thiacloprid on *Caenorhabditis elegans* and *Eisenia fetida*. *Ecotox. Environ. Safety.* 72, 1, 71-79.
- Gupta, S.K., Sundararaman, V., 1988. Carbaryl-induced changes in the earthworm *Pheretima posthuma* of inorganic cadmium. *Indian J. Exp. Biol.* 26, 688-693.

- Gupta, S.K., Sundararaman, V., 1990. Biological response of earthworm *Pheretima posthuma* of inorganic cadmium. *J. Exp. Biol.* 28, 71-73.
- Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1981. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. *Meth. Enzymol.* 77, 398-405.
- Hackenberger, B.K., Jarić-Perkušić, D., Stepić, S., 2008. Effect of temephos on cholinesterase activity in the earthworm *Eisenia fetida* (Oligochaeta, Lumbricidae). *Ecotox. Environ. Safety.* 71, 583-589.
- Hankinson, O., 1993. Perspectives in biochemistry and biophysics. *Arch. Biochem. Biophysics.* 300, (1), 1-5.
- Hayes, T., Case, P., Chui, S., Chung, D., Haefele, C., Haston, K., Lee, M., Mai, V.P., Marjuoa, Y., Parker, J., Tsui, M., 2006. Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: Are we underestimating the impact? *Environ. Health Perspect.* 1-65.
- Hermens, J.L.M., Canton, H., Janssen, P, Jong, R., 1984. QSARs and toxicity studies of mixtures. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 316-322.
- Hewlett, P.S., Plackett, R.L., 1952. Similar joint action of insecticides. *Nature.* 169, 198-199.
- Hinton, D.E., Baumann, P.C., Gardner, G.R., Hawkins W.E., hendricks, J.D., Murchelano, R.A., Okihiro, M.S., 1992. Histopathological biomarkers. In: Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Merle, P.M., Bergman, H.L. (eds) *Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress.* Lewis, Boca Raton, 155-211.
- Hyne, R.V., Maher, W.A., 2003. Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline. *Ecotoxicol. Environ. Safety.* 54, 366-374.
- Ihaka, R., Gentleman, R., 1996. R: a language for data analysis and graphics. *J. Comput. Graphical Stat.* 5, 299-314.
- Jager, T., Fleuren, R.H.L.J., Hogendoorn, E.A., De Korte, G., 2003. Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta). *Environ. Sci. Technol.* 37, 3399-3404.

- Jin-Clark, Y., Anderson, T.D., Zhu, K.Y., 2008. Effect of alachlor and metolachlor on toxicity of chlorpyrifos and major detoxification enzymes in the aquatic midge, *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 54, 645-652.
- Johnson, W.W., Finley, M.T. (1980). Handbook of acute toxicity of chemicals to fish and aquatic invertebrates, Resource publications 137. US Department of the interior, Fish and Wildlife Service, Washington.
- Kamohara, K., N. Yagi, Y. Itokawa, 1984. Mechanism of lipid peroxidation in polychlorinated biphenyl (PCB) and dichlorodiphenyltrichlorethane (DDT)-poisoned rats. *Environ. Res.* 324, 18-23.
- Kefford, B.J., Zalizniak, L., Warne, M.S.J., Nugegoda D., 2008. Is the intergration of hormesis and essentiality into ecotoxicology now opening Pandora's Box? *Environ. Pollut.* 151, 516-523.
- Kelly, S.A., Havrilla, C.M., Brady, T.C., Abramo, K.H. i Levin, E.D., 1998. Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems. *Envir. Health Persp.* 106: 375-384.
- Klaassen, C.D., 2001. Principles of toxicology and treatment of poisoning. In: Hardman, J. G., Limbird, L. E. (Eds.), Goodman & Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics, McGraw-Hill Medical publishing division, New York, 67-80.
- Kono, Y., Fridovich, I., 1982. Superoxide radical inhibits catalase. *J. Biol. Chem.* 257, 5751-5754.
- Konrad, J.G., Chesters, G., Armstrong, D.E., 1969. Soil degradation of malathion, a phosphorodithioate insecticide. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 33, 259-262.
- Kortenkamp, A., Altenburger, R., 1998. Synergisms with mixtures of xenoestrogens: A reevaluation using the method of isoboles. *Sci. Tot. Environ.* 221, 59-73.
- Kula, C., 1997. Advances in earthworm ecotoxicology. In: Advances in earthworm ecotoxicology. (Sheppard, S., Bembridge, J., Holmstrup, M., Posthuma, L., Eds.). Proceedings from the second international workshop on earthworm ecotoxicology. Amsterdam. SETAC Press. 3-15.



- Kula, H., Larink, O., 1996. Development and standardization of test methods for the prediction of sublethal effects of chemicals on earthworms. *Soil. Biol. Biochem.* 29, 3/4, 635-639.
- Kurelec B., 1998. Biomarkers and the ecological risk assesment paradigm. *In: Modern aspects in monitoring of environmental pollution in the sea; Ed: E. Werner, G. Muller. Akademie gemeinnutziger Wissenschaften zu Erfurt.*
- Labrot, F., Ribera, D., Saint Denis, M., Narbonne, J.F., 1996. *In vitro* and *in vivo* studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase and glutathione peroxidase. *Biomarkers.* 1, 21-28.
- Laetz, C.A., Baldwin, D.H., Collier, T.K., Hebert, V., Stark, J.D., Scholz, N.L., 2009. The synergistic toxicity of pesticide mixtures: implications for risk assessment and the conservation of endangered Pacific salmon. *Environ. Health Persp.* 117, 3, 348-353.
- Łaszczycza, P., Augustyniak, M., Babczyńska, A., Bednarska, K., Kafel, A., Migula, P., Wilczek, G., Witas, I., 2004. Profiles of enzymatic activity in earthworms from zinc, lead and cadmium polluted areas near Olkusz (Poland). *Environmental International.* 30, 901-910.
- Lee, R.F., 1998. Annelid cytochrome P-450. *Comp. Biochem. Physiol. Part C,* 121, 173-179.
- Liang, J., Zhou, Q., 2003. Single and binary-combined toxicity of methamidophos, acetochlor and copper acting on earthworms *Eisenia foelide*. 71, 1158-1166.
- Lock, K., Janssen, C.R., 2003. Influence of ageing on zinc bioavailability in soils. *Environ. Poll.* 126, 371-374.
- Loewe, S., 1953. The problem of synergism and antagonism of combined drug. *Arzneim. Forsch.* 3, 852-290.
- Loewe, S., Muischnek, H., 1926. Über Kombinationswirkungen. 1. Mitteilung: Hilfsmeittel der Fragestellung. *Naunyn-Schmiedeberg's. Arch. Exp. Patol. Pharmakol.* 114, 313-326.
- Łukaszewicz-Hussain, A., Moniuszko-Jakoniuk, J., 2004. A low dose of chlorfenvinphos affects hepatic enzymes in serum and antioxidant enzymes in erythrocytes and liver of rats. *Polish J. Environ. Studies.* 14, 2, 199-202.

- Lydy, M.J., Austin, K.R., (2004). Toxicity assessment of pesticide mixtures typical of the Sacramento-San Joaquin Delta Using *Chironomus tentans*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 48, 49-55.
- Lydy, M.J., Linck, S.L., 2003. Assessing the impact of triazine herbicides on organophosphate insecticide toxicity to the earthworm *Eisenia fetida*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 45, 343-349.
- Lydy, M.J., Linck, S.L., 2004. Assessing the impact of triazine herbicides on organophosphate insecticide toxicity to the earthworm *Eisenia fetida*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 17, 27-44.
- Mahaffey, K.R., Rader, J.I., 1980. Metabolic interactions: lead, calcium, and iron. Ann. N. Acad. Sci. 355, 285-297.
- Mantle, D., Preedy, V.R., 1999. Free radicals as mediators of alcohol toxicity. Adverse Drug React. Toxicol. Rev. 18, 235-252.
- Marquardt, H., Schafer, S.G., McClellan, R.D. i Welsch, F., 1991. Cytochrome P450 Isozymes with implication in xenobiotic metabolism. In: Toxicology, Part I: Fundamentals, Edited by: Hans Marquardt. 87-91, 130-131.
- Moreby, S.J., Southway, S., Barker, A., Holland, J.M., 2001. A comparison of the effect of new and established insecticides on non-target invertebrates of winte wheat fields. Environ. Toxicol. Chem. 20, 2243-2254.
- Morowati, M., 2000. Histochemical and histopathological study of the intestine of the (*Pheretima elongata*) earthworm *Pheretima elongata* exposed to a field dose of the herbicide glyphosate. Environmentalist. 20, 105-111.
- Mosleh, Y.Y., Paris-Palacios, S., Couderchet, M., Vernet, G., 2003. Acute and sublethal effects of two insecticides on earthworms (*Lumbricus terrestris* L.) under laboratory conditions. Environ. Toxicol. 18, 1-8.
- Motalib, A., Rida, A., Bouche, M.B., 1996. Earthworm toxicology: from acute to chronic tests. Soil Biol. Biochem. 29, 699-703.
- Neng-wen, X., Xiang-hui, L., Wei, L., Feng, G., 2006. Effect of herbicide acetochlor on cytochrome P450 monooxygenases and GST of earthworms *Eisenia fetida*. J. Environ. Sci. 18, 1, 135-140.

- Norberg-King, T.J., Durham, E.J., Ankley, G.T., Robert, G., 1991. Application of toxicity identification evaluation procedures to the ambient waters of the Colusa Basin drain, California. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 890-900.
- OECD, 1984. Guidelines for Testing of Chemicals, Earthworm Acute Toxicity Tests (Filter Paper Test and Artificial Soil Test). Vol. 207. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris.
- Panda, S., Sahu, S.K., 2004. Recovery of acetylcholine esterase activity of *Drawida willsi* (Oligochaeta) following application of three pesticides to soil. *Chemosphere*. 55, 283-290.
- Pandey, S., Parvez, S., Sayeed, I., Haque, R., Bin-Hafeez, B. i Raisuddin, S. (2003): Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). *Sci. Tot. Envir.* 309, 105-115.
- Paoletti, M.G., 1999. The role of earthworms for assessment of sustainability and as bioindicators. *Agr. Ecosyst. Environ.* 74, 137-155.
- Pape-Lindstrom, P.A., Lydy, M.J., 1997. Synergistic toxicity of atrazine and organophosphate insecticides contravenes the response addition mixture model. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 2415-2420.
- Paradise, C.J. A Standardized Soil Ecotoxicological Test Using Reed Worms (*Eisenia fetida*). *The American Biology Teacher*. 63, 9, 662-668.
- Pavlov, D.F., Chuiko, G.M., Shabrova, A.G., 1994. Adrenaline induced changes of acetylcholinesterase activity in the brains of perch (*Perca fluviatilis* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 113-115.
- Pradhan, S.C., Mishra, P.C., 1998. Inhibition and recovery kinetics of acetylcholinesterase activity in *Drawida calebi* and *Octochaetona surensis*, the tropical earthworms, exposed to carbaryl insecticide. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 60, 904-908.
- R Development Core Team, 2008. R: A language and environment for statistical computing.
- R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

- Reinecke, A.J., 1992. A review of ecotoxicological test methods using earthworms. In: Ecotoxicology of earthworms (Greigh-Smith, P.W., Becker, H., Edwards, P.J., Heimbach, F., Eds). 7-19.
- Ribera, D., Narbonne, J.F., Arnaud, C., Saint-Denis, M., 2001. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil, effects of carbaryl. Soil Biol. Biochem. 33, 1123-1130.
- Richards, K.S., Ireland, M.P., 1978. Glycogen-lead relationship in the earthworm *Dendrobaena rubida* a heavy metal site. Histochemistry. 56, 55-64.
- Rico, A., 2001. Chemo-defence system. Acad. Sci. Paris. 324, 97-106.
- Ritz, C. & Streibig, J. C., 2005. Bioassay Analysis using R. J. Statist. Software, 12, Issue 5.
- Rodricks., J.V., 2003. Toxicological highlight. Hormesis and toxicological risk assessment. Toxicol. Sci. 71, 134-136.
- Rodriguez-Castellanos, L., Sanchez-Hernandez, C., 2007. Earthworm biomarkers of pesticide contamination: Current status and perspectives. J. Pest. Sci. 32, 4, 360-371.
- Saint-Denis, M., Labrot, F., Narbonne, J.F., Ribera, D., 1998. Glutathione, glutathione-related enzymes, and catalase activities in the earthworm *Eisenia fetida andrei*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35, 602-614.
- Saint-Denis, M., Narbonne, J.F., Arnaud, C., Thybaud, E., Ribera, D., 1999. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil: effects of benzo(a)pyrene. Soil Biol. Biochem. 31, 1837-1846.
- Saint-Denis, M., Narbonne, J.F., Arnaud, C., Ribera, D., 2001. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil: effect of lead acetate. Soil Biol. Biochem. 33, 395-404.
- Sanchez-Hernandez, J.C., 2006. Earthworm biomarkers in ecological risk assessment. Rev Environ Contam Toxicol. 188, 85-126.
- Sanders, B., 1988. The role of stress proteins in physiological adaptation of marine molluscs. Mar. Environ. Res. 24, 207-210.
- Sauvé, S., Fournier, M., 2005. Age-specific immunocompetence of the earthworm *Eisenia andrei*: exposure to methylmercury chloride. Ecotoxicol. Environ. Safety. 60, 67-72.

- Scaps, P., Grelle, C., Descamps, M., 1997. Cadmium and lead accumulation in the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny) and its impact on cholinesterase and metabolic pathway enzyme activity. *Comp. Biochem. Physiol.* 116C, 3, 233-238.
- Schreck, E., Geret, F., Gontier, L., Treilhou, M., 2008. ChE, GST and CAT: Evaluation of the efficiency of a combined buffer for protein extraction. *Ecotox. Environ. Safety.* x, xxx-xxx.
- Schreck, E., Geret, F., Gontier, L., Trilhou, M., 2008. Neurotoxic effect and metabolic responses induced by a mixture of six pesticides on the earthworm *Aporrectodea caliginosa nocturna*. *Chemosphere.* 71, 1832-1839.
- Scott-Fordsmand, J.J., Weeks, J.M., 2000. Biomarkers in Earthworms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 165: 117-159.
- Song, Y., Zhu, L.S., Wang, J., Wang, J.H., Liu, W., Xie, H., 2008. DNA damage and effects on antioxidative enzymes in earthworm (*Eisenia foetida*) induced by atrazine. *Soil Biol. Biochem.* 41, 905-909.
- Sorour, J., Larink, O., 2001. Toxic effects of benomyl on the ultrastructure during spermatogenesis of the earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicol. Environ. Safety.* 50, 180-188.
- Spurgeon, J.D., Weeks, J.M., Van Gestel, C.A.M., 2002. A summary of eleven years progress in earthworm ecotoxicology. *Pedobiologia.* 47, 588-606.
- Stenersen, J., 1979. Esterases of earthworms. Part I: Characterisation of the cholinesterases in *Eisenia foetida* (Savigny) by substrates and inhibitors. *Comp. Biochem. Physiol.* 66C, 37-44.
- Stenersen, J., 1979. Esterases of earthworms. Part II: Characterisation of the cholinesterases in the earthworm *Eisenia foetida* (Savigny) by ion exchange chromatography and electrophoresis. *Comp. Biochem. Physiol.* 66C, 45-51.
- Stenersen, J., 1980b. Esterases of earthworms. Part II: Characterisation of the cholinesterases in the earthworm *Eisenia foetida* (Savigny) by ion exchange chromatography and electrophoresis. *Comp. Biochem Physiol.* 66C, 44-51.
- Stenersen, J., 1983. Detoxiacation of xenobiotics by earthworms. *Comp. Biochem. Physiol.* 78C, 2, 249-252.

- Stenersen, J., 1984. Detoxification of xenobiotics in earthworms. *Comp. Biochem Physiol.* 78 C, 249-252.
- Stenersen, J., 2004. The number of chemicals used as pesticides. In: *Chemical pesticides, mode of action and toxicology.* CRC Press. 1.3.1.
- Stenersen, J., Gilman, A., Vardanis, A., 1973. Carbofuran: Its toxicity to and metabolism by earthworm (*Lumbricus terrestris*). *J. Agr. Food Chem.* 21, 2, 166.
- Stenersen, J., Gilman, A., Vardanis, A., 1973. Carbofuran: Its toxicity to and metabolism by earthworm (*Lumbricus terrestris*). *J. Agr. Food Chem.* 21, 2, 166.
- Stephensen, E., Sturve, J. i Förlin (2002): Effects of redox cycling compounds on glutathione content and activity of glutathione-related enzymes in rainbow trout liver. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 133, 435-442.
- Stergiopoulou, T., Meletiadis, J., Sein, T., Papaioannidou, P., Tsiouris, I., Roilides, E., Walsh, T.J., 2008. Isobolographic analysis of pharmacodynamic interactions between antifungal agents and ciprofloxacin against *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*.
- Storey, K.B. (1996): Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz. Jour. Med. Biol. Res.* 29, 1715-1733.
- Syberg, K., Engell-Kofoed, A.E., Pedersen, H., Cedergreen, N., Forbes, V.E., 2008. Mixture toxicity of three toxicants with similar and dissimilar mode of action to *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Safety.* 69, 428-436.
- Tallarida, R.J., 2006. An overview of drug combination analysis with isobolograms. *J. Pharm. Exp. Therap.* 319, 1-7.
- Tripathi, A.M., Agarwal, R.A., 1997. Synergism in tertiary mixtures of pesticides. *Chemosphere.* 35, 2365-2374.
- Urich, K. (1990): Comparative animal biochemistry. *Springer Verlag, Berlin-Heidelberg.*
- Van der Oost, R., Beyer, J. i Vermeulen, N.P.E. (2003): Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Envir. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57-149.

- Van Gestel, C.A.M., 1992. Validation of earthworm toxicity test by comparison with field studies: A review of benomyl, carbedazim, carbofuran, and carbaryl. *Ecotox. Environ. Safety*. 23, 221-236.
- Van Straalen, N.M., 2002. Assessment of soil contamination – a functional perspective. *Biodegradation*. 13, 41-52.
- Venkateswara Rao, J., Kavitha, P., 2004. Toxicity of azodrin on the morphology and acetylcholinesterase activity of the earthworm *Eisenia foetida*. *Environ. Res.* 96, 323-327.
- Venkateswara Rao, J., Kavitha, P., Padmanabha Rao, A., 2003. Comparative toxicity of tetra ethyl lead and oxide to earthworms, *Eisenia fetida* (Savigny). *Environ. Res.* 92, 271-276.
- Venkateswara Rao, J., Pavan, Y.S., Madhavendra, S.S., 2003. Toxic effects of chlorpyrifos on morphology and acetylcholinesterase activity in the earthworm, *Eisenia foetida*. *Ecotoxicol. Environ. Safety*. 54, 296-301.
- Weltje, L., 1998. Mixture toxicity and tissue interactions of Cd, Cu, Pb and Zn in earthworms (Oligochaeta) in laboratory and field soils: A critical evaluation of data. *Chemosphere*. 36, 12, 2643-2660.
- Whyte, J.J., Jung, E.E., Schmitt, C.J., Tillitt, D.E., 2000. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Crit. Rev. Toxicol.* 30, 347-570.
- Wiesner, L., Hahn, M.E., Karchner, S.I., Cooper, E.L., Kauschke, E., 2002. Does an aryl hydrocarbon receptor (AHR)-like molecule exist in earthworms? Some implications for immunity. *Pedobiologia*. 47, 646-650.
- Wolfe, D.A., 1977. Fate and effects of petroleum hydrocarbons in marine organisms and ecosystems. Pergamon Press Inc., New York.
- Xiao, N.-W., Liu, X.-H., Li, W., Ge, F., 2006. Effect of herbicide acetochlor on cytochrome P450 monooxygenases and GST of earthworms *Eisenia fetida*. 18, 1, 135-140.
- Xiao, N.-W., Song, Y., Ge, F., Liu, X.-X., Ou-Yang, Z.-Y., 2006. Biomarkers responses of the earthworm *Eisenia fetida* to acetochlor exposure in OECD soil. *Chemosphere*. 65, 907-912.

- Zalizniak, L., Nugegoda, N., 2006a. Effect of sublethal concentrations of chlorpyrifos on three successive generations of *Daphnia carinata*. *Ecotoxicol. Environ. Safety*. 64, 207-213.
- Zanucio, T.V., Serrão, J.E., Zanucio, J.C., Guedes, R.N.C., 2003. Permethrin-induced hormesis on the predator *Supputius cincticeps* (Stål, 1860) (Heteroptera: Pentatomidae). *Crop Protection*. 22, 941-947.
- Zhang, Y., Shen, G., Yu, Y., Zhu, H., 2009. The hormetic effect of cadmium on the activity of antioxidant enzymes in earthworm *Eisenia fetida*. *Environ. Poll.* 157, 3064-3068.
- Zhou, S., Duan, C., Fu, H., Chen, Y., Wang., X., Yu, Z., 2006. Toxicity assessment for chlorpyrifos-contaminated soil with three different earthworm test methods. *J. Environ. Sci.* 19, 854-858.



## 8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 1975. godine u Travniku. Osnovnu i srednju Medicinsku školu završila sam u Osijeku. Studij biologije i kemije upisala sam 1994. godine pri Pedagoškom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Diplomski rad pod naslovom "Aktivnost enzima acetilkolin esteraze i nespecifične monooksigenaze u jetri riba kao pokazatelj izloženosti zagađivalima u okolišu", izradila sam na Zavodu za biologiju pri Pedagoškom fakultetu u Osijeku, a veći dio eksperimentalnog rada izradila sam u Laboratoriju za molekularnu ekotoksikologiju Centra za istraživanje mora i okoliša Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu.

Poslijediplomski studij Biologije iz polja Toksikologija na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 2001. Od 2001.-2006. godine radila sam kao znanstveni novak na projektu Ministarstva znanosti i tehnologije Republike Hrvatske: "Kakvoća i zdravstvena ispravnost poljoprivrednih proizvoda", čiji je voditelj dr. sc. Dubravka Hackenberger, a od 2006. do 2009. na projektu „Interakcija funkcionalnih sastojaka hrane“. Magistarski rad pod naslovom „Utjecaj oksidativnog stresa na izraženost molekularnih biljega kod babuške (*Carassius auratus gibelio*) i šarana (*Cyprinus carpio*)“, obranila sam 2006. godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, na sveučilišnom znanstvenom poslijediplomskom studiju iz područja prirodnih znanosti, znanstvenog polja biologija (Toksikologija).

Danas sam zaposlena kao znanstveni novak na projektu „Interakcija funkcionalnih sastojaka hrane s kakvoćom“ čiji je voditelj dr. sc. Branimir K. Hackenberger.

U nastavnom radu sudjelujem od 2002. godine kao vanjski suradnik – asistent na kolegiju Praktikum iz animalne fiziologije na Odjelu za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

U okviru suradnje s drugim projektima sudjelovala sam aktivno u okviru međunarodnog hrvatsko-norveškog projekta: „*An intergrated environmental monitoring system for Croatian freshwater, estaurine and coastal marine areas* (od 2000.-2004.)“.

Sudjelovala sam u izradi nekoliko ekoloških studija i Studija o utjecaju na okoliš:

- „Procjena rizika utjecaja okoliša na području izgradnje radničkog kampa Ogulin (Otok oštarijski“), 1999. godine.
- „Promjene u fiziologiji šarana (*Cyprinus carpio*) ribnjaka Grudnjak mjerene molekularnim biomarkerima fiziološkog stresa i izloženosti ksenobioticima tijekom 2000. godine“.
- „Studija revitalizacije Stare Drave na području Križnice“, 2006.-2008. godine.
- „Studija o utjecaju na okoliš za zahvat: Tvornica mineralnih gnojiva, Adriatica Dunav d.o.o. u Vukovaru“, 2008. godine.

- „Studija o utjecaju na okoliš farme tovne junadi i muznih krava, Berak d.o.o. u Semeljcima“, 2009. godine.
- „Studija o utjecaju na okoliš za zahvat: Pogon za proizvodnju bioplina iz biomase, 10 MW električne i 10 MW toplinske energije, Bioenergija d.o.o. u Vukovaru“, 2009. godine.

Sudjelovala sam na dva edukacijska tečaja:

- Od 26. do 30. rujna 1998. godine na EUROTOX edukacijskom tečaju „Principles of Risk Assessment“ u Puli.
- Od 15. do 18. lipnja 2009. godine na REP – Lecotox edukacijskom tečaju „1st workshop ecotoxicogenomics: The challenge of intergrating genomics / proteomics / metabolomics into aquatic and terrestrial ecotoxicology“ održanom na Sveučilištu u Novom Sadu.

Do sada sam objavila tri rada kao koautor u CC časopisima, jedan znanstveni rad u drugim časopisima, te petnaest kongresnih priopćenja koji su bili prezentirani na jedanaest domaćih kongresa s međunarodnim sudjelovanjem i šest međunarodnih kongresa. Član sam Hrvatskog toksikološkog društva.

## 9. POPIS RADOVA

### Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima:

1. Hackenberger, B.K., Jarić-Perkušić, D., **Stepić, S.**, 2007. Effect of temephos on cholinesterase activity in the earthworm *Eisenia fetida* (Oligochaeta, Lumbricidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 71, 583-589.
2. Jarić-Perkušić, D., Hackenberger, B.K., **Stepić, S.**, Merdić, E., 2008. Influence of molting on efficacy of two functionally different larvicides: Bti and Temephos. *Journal of Economic Entomology*. 101, 4, 1204-1210.
3. Hackenberger, B.K., Jarić, D., Hackenberger, D., **Stepić, S.**, 2010. Effects of chronic dietary exposure to a low-dose of Malathion, Aroclor-1254 and 3-methylcholanthrene on three biomarkers in male mice. *Acta biologica hungarica*. (prihvaćen za objavljivanje).

### Znanstveni radovi u drugim časopisima

3. Jarić, D., **Stepić, S.**, 2005. Differences in enzymes (biomarkers) activities in fish after cage exposure in Drava and Danube Rivers (Croatia). *Verh. Internat. Verein. Limnol.* Stuttgart, Germany. 29, 873-876.

### Priopćenja na znanstvenim skupovima

1. **Stepić, S.**, Hackenberger, B.,K., Hackenberger, D., 2009. Pojedinačni učinak pirimifosmetila i bentazona, te njihove smjese na aktivnost acetilkolinesteraze, glutation-S-transferaze i katalaze kod gujavice (*Eisenia andrei*). 10. Hrvatski biološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem. 14.-20. rujna 2009. Osijek, Hrvatska.
2. Velki M., Mihaljević, I., Lončarić, Ž., **Stepić, S.**, Hackenberger, B.K., 2009. Histološke promjene u gujavice *Eisenia andrei* (Oligochaeta, Lumbricidae) nakon izlaganja pirimifosmetilu, mješavini pirimifosmetila i metolaklora, i mješavini pirimifosmetila i bentazona. 10. Hrvatski biološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem. 14.-20. rujna 2009. Osijek, Hrvatska.
3. Hackenberger, B.K., Jarić, D., **Stepić, S.**, Merdić, E., Milas, J., Rudan, S., 2009. Could hormesis be the main problem in ecological risk assessment of insecticides? The 5th European Mosquito Control Association Workshop. 9-13.03.2009. Torino, Italija.

4. Hackenberger, B.K., Jarić, D., Stepić, S., Lončarić, Ž., 2009. Earthworms as test organisms for biomonitoring of marshlands after larvicide treatment. The 5th European Mosquito Control Association Workshop. 9-13.03.2009. Torino, Italija.
5. Hackenberger K., B., Hackenberger, D., **Stepić, S.**, 2007. Hormesis - an important factor in the assessment of cereal products soundness. FLOUR - BREAD '07 6th Croatian congress of cereal technologists. Opatija, Croatia, 24-27.10.2007. Organizator: Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek.
6. **Stepić, S.**, Velki, M., Hackenberger K., B., Jarić-Perkušić, D., 2007. Comparison of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and protein carbonyl (PC) as biomarkers of oxidative stress in rat (*Ratus norvegicus*) and common carp (*Cyprinus carpio*). Periodicum biologorum. Osijek, Hrvatska, 19-22.09.2007.
7. **Stepić, S.**, Hackenberger K., B., Velki, M., 2007. Utjecaj oksidativnog stresa na indukciju aktivnosti 7-etoksirezorufin-O-deetilaze kod šarana (*Cyprinus carpio*). Uzgoj riba u hidroakumulacijama - mogućnost upravljanja i zaštita okoliša. Međunarodni znanstveno stručni skup. Zbornik radova. 421-435. Organizator: Agronomski fakultet Sveučilišta u Mostaru; Zavod za ribarstvo, zoologiju i zaštitu voda. Neum, Bosna i Hercegovina, 24-26.10.2007.
8. Jarić, D., **Stepić, S.**, 2004. Differences in enzymes (biomarkers) activities in fish after cage exposure in Drava and Danube river (Croatia). SIL XXIX Congress Lahti Finland. Lahti, Finland, 8.-14.08.2004. 287.
9. Britvić, S., Krča, S., Jelaska, D., Žaja, R., **Stepić, S.**, Hackenberger K., B., 2004. Fish-farming Jadro-Solin, Croatia: biomonitoring of recovery using biomarkers. Society of Environmental Toxicology and Chemistry - SETAC Europe 14th Annual Meeting, Environmental Science Solutions: A Pan-European Perspective. Prague, 2004. 239.
10. Hackenberger K., B., **Stepić, S.**, Jarić, D., 2004. Significance of variability of EROD induction in field experiments for risk assessment. Society of Environmental Toxicology and Chemistry - SETAC Europe 14th Annual Meeting, Environmental Science Solutions: A Pan-European Perspective. Prague. 165.

11. Raspor, B., Erk, M., Filipović, V., Pavičić, J., Jurić, D., Dragun, Z., Britvić, S., Krča, S., Pivčević, B., Smital, T., Sauerborn-Klobučar, R., Jelaska, D., Žaja, R., Hackenberger K., B., **Stepić, S.**, Jarić, D., Klobučar, G.I.V., Pavlica, M., Štambuk, A., Erben, R., Hylland, K., Ruus, A., 2004. An integrated environmental monitoring system for Croatian freshwater, estuarine and coastal marine areas: the CROWAT project. Society of Environmental Toxicology and Chemistry - SETAC Europe 14th Annual Meeting, Environmental Science Solutions, A Pan-European Perspective. Prague. 244.
12. Hackenberger K., B., Hackenberger, D., **Stepić, S.**, Jarić, D., 2003. Application of some toxicological tests in cereal quality control. International congress Flour-bread '03 - 4th Croatian congress of cereal technologists. Opatija, Hrvatska, 19-22.11.2003. Organizator: Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek. 24.
13. Hackenberger K., B., Britvić Budicin, S., Smital, T., **Stepić, S.**, 2002. The possible influence of some physiological parameters on EROD-activity data evaluation. Proceedings of congress Risk Assessment and Management of Large Contamination Sites. Halle, Germany, 2002. 23.
14. Hackenberger, B., Jarić, D. **Stepić, S.**, 2005. Feasibility and characteristics of pollution biomonitoring on Drava and Danube river in Eastern Croatia. Biomarkers, risk and environmental assessment. Cavtat, Hrvatska, 6-10.04.2005.
15. Hackenberger K., B., Smital, T., Britvić, S., **Stepić, S.**, Pavlić, Ž., Klobučar, G.I.V., 2002. Eksperimentalni organizmi u suvremenom praćenju zagađenja vodenog okoliša. Prva hrvatska konferencija Hrvatskog društvo kemijskih inženjera i tehnologa - Ekoinženjerstvo 2002. Hrvatski inženjerski savez, Plitvička jezera, Hrvatska, 22.-24.10.2002.108.
16. Hackenberger K., B., **Stepić, S.**, Puntarić, D., 2002. Primjena molekularnih biomarkera u kontroli i monitoringu kvalitete voda. Prva hrvatska konferencija Hrvatskog društvo kemijskih inženjera i tehnologa - Ekoinženjerstvo 2002. Hrvatski inženjerski savez, Plitvička jezera, Hrvatska, 22.-24.10. 2002.108.
17. Hackenberger K., B., Lovaković, T., **Stepić, S.**, Ulm, L., 1997. Primjene toksičnosti i nekih fizikalno kemijskih osobina crnog čaja pod djelovanjem kombuče (*Fungus japonicus*). Šesti kongres biologa Hrvatske s međunarodnim sudjelovanjem. Organizator: Hrvatsko biološko društvo. Opatija, Hrvatska, 22.-26.09.1997. 392.