



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Marija D. Milošević

**EFEKTI EKSTRAKATA BILJNE VRSTE *Viscum album* L.
NA TOKSIČNOST INSEKTICIDA HLORPIRIFOSA I
IMIDAKLOPRIDA KOD RAZLIČITIH EKSPERIMENTALNIH
MODEL SISTEMA**

doktorska disertacija

Kragujevac, 2023



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF SCIENCE

Marija D. Milošević

**EFFECTS OF *Viscum album* L. PLANT EXTRACTS ON THE
TOXICITY OF INSECTICIDES CHLORPYRIFOS AND
IMIDACLOPRID IN DIFFERENT EXPERIMENTAL MODEL
SYSTEMS**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2023

Autor
Ime i prezime: Marija Milošević
Datum i mesto rođenja: 20.05.1990. godine, Čačak, Srbija
Sadašnje zaposlenje: Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Kragujevcu, zvanje: istraživač-saradnik
Doktorska disertacija
Naslov: Efekti ekstrakata biljne vrste <i>Viscum album</i> L. na toksičnost insekticida hlorspirifosa i imidakloprida kod različitih eksperimentalnih model sistema
Broj stranica: 188
Broj slika: 27
Broj bibliografskih podataka: 495
Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Kragujevcu
Naučna oblast (UDK): Fiziologija životinja i čoveka i molekularna biologija (591.1/577.2)
Mentor: Prof. dr Branka Ognjanović, redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Kragujevcu
Ocena i odbrana
Datum prijave teme: 11.4.2018. NNV Prirodno-matematičkog fakulteta, br. odluke 240/IX-1
Broj odluke i datum prihvatanja teme doktorske disertacije: Veće za prirodno-matematičke nauke, odluka br. IV-01-576/5, 11.07.2018. godine
Komisija za ocenu naučne zasnovanosti teme i ispunjenosti uslova kandidata:
<ol style="list-style-type: none"> 1. Dr Branka Ognjanović, redovni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Kragujevcu, uža naučna oblast: Fiziologija životinja i čoveka i molekularna biologija (predloženi mentor); 2. Dr Vladica Simić, redovni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Kragujevcu, uža naučna oblast: Ekologija, biogeografija i zaštita životne sredine (predsednik komisije); 3. Dr Zorica Saičić, naučni savetnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerzitet u Beogradu, naučna oblast: Biologija; 4. Dr Pavle Mašković, vanredni profesor, Agronomski fakultet u Čačku, Univerzitet u Kragujevcu, uža naučna oblast: Hemija; 5. Dr Jelena Gavrić, naučni saradnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerzitet u Beogradu, naučna oblast: Biologija.
Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije:
<ol style="list-style-type: none"> 1. Dr Pavle Mašković, redovni profesor, Agronomski fakultet u Čačku, Univerzitet u Kragujevcu, uža naučna oblast: Primenjena hemija; 2. Dr Miloš Matić, vanredni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Kragujevcu, uža naučna oblast: Fiziologija životinja i čoveka i molekularna biologija; 3. Dr Jelena Gavrić, viši naučni saradnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu, naučna oblast: Biologija.
Datum odbrane disertacije:

Posvećeno mojim roditeljima

Zahvalnica

Želela bih da iskoristim ovu priliku da se zahvalim svima koji su doprineli da ova disertacija ugleda svetlost dana.

Srdačno se zahvaljujem svom mentoru, prof. dr Branki Ognjanović, koja mi je otvorila vrata nauke i prenela ljubav prema fiziologiji, na dugogodišnjoj saradnji i prijateljstvu, neizmernoj pomoći i savetima u svako doba dana i noći, kao i za pronalaženje rešenja u svim izazovima kroz koje sam prolazila u toku izrade ove doktorske disertacije. Posebno želim da joj se zahvalim na veri u mene da istrajem do kraja.

Izuzetnu zahvalnost dugujem prof. dr Pavlu Maškoviću, na ukazanom poverenju, za svu naučnu i prijateljsku podršku i razumevanje u svakom trenutku izrade ove doktorske disertacije. Takođe bih želela da mu se zahvalim na pozitivnoj energiji i istraživačkoj posvećenosti, koji su bili velika inspiracija u mom naučno-istraživačkom radu.

Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Milošu Matiću, na stručnim savetima i korisnim sugestijama tokom izrade ovog rada. Zahvaljujem mu se na dugogodišnjoj saradnji, naučnim diskusijama i prenetom znanju.

Izražavam veliku zahvalnost dr Jeleni Gavrić, na konstruktivnim savetima, posvećenosti i strpljenju tokom celokupnog naučno-istraživačkog rada. Takođe, želela bih da joj se zahvalim na znanju koje mi je prenela u toku laboratorijskog rada.

Veliko hvala dugujem prof. dr Vesni Stanković, koja me uvela u naučno-istraživačko polje histologije, na lepoj saradnji, znanju koje mi je prenela tokom izrade disertacije i posvećenom vremenu.

Zahvaljujem se kolegama i kolegamicama sa Prirodno-matematičkog fakulteta, a posebno dr Ani Obradović i Milici Paunović, na saradnji i podršci.

Zahvaljujem se kolegama i prijateljima dr Filipu Grboviću i Mariji Jovanović na bezrezervnoj podršci, pomoći i pozitivnoj energiji, koji su mi veoma značili tokom izrade disertacije.

Autor

APSTRAKT

Hlorpirifos (CPF) i imidakloprid (IMI) su insekticidi koji se široko upotrebljavaju u zaštiti biljaka. *Viscum album* L. je semiparazitska biljka koja ima tradicionalnu upotrebu u lečenju brojnih bolesti. Ciljevi ove doktorske disertacije su ispitivanje ekstrakata listova imele (VAE) na toksičnost izazvanu CPF i IMI u *in vitro* i *in vivo* uslovima. Dobijeni rezultati pokazuju da CPF i IMI ispoljavaju citotoksične efekte, dok kotretmani sa VAE dovode do povećanja vijabilnosti ćelija. CPF smanjuje RBC i Hb, dok IMI smanjuje broj PLT u odnosu na kontrolu. CPF i IMI dovode do povećanja ALT, AST, LDH i bilirubina. Holesterol i trigliceridi su povećani kod CPF i IMI grupe, a koncentracija glukoze je povećana u CPF grupi u poređenju sa kontrolom. Aktivnost AChE je smanjena u jetri CPF i IMI grupe. Povišena koncentracija LPO je konstatovana u jetri i testisu nakon tretmana CPF, i u jetri u IMI grupi. Koncentracija GSH u CPF i IMI grupi su smanjene u jetri, a koncentracija vitamina C je povećana u jetri CPF grupe i jetri i testisu IMI grupe u poređenju sa kontrolom. CPF i IMI dovode i do promena aktivnosti SOD, CAT, GSH-Px, GR i GST, i izazivaju patomorfološke promene jetre i bubrega. VAE ublažava hematotoksične efekte, smanjuje aktivnosti ALT i AST, koncentraciju glukoze, ukupnog holesterola i triglicerida i koncentraciju LPO. Ispitivani ekstrakt dovodi do stabilizacije promena aktivnosti SOD, CAT, GSH-Px, GR i GST, i delimično ublažava patološke promene u jetri i bubrezima. Ova doktorska disertacija pruža detaljniji uvid u toksično delovanje CPF i IMI. Iz dobijenih rezultata došlo se do novih saznanja o protektivnom potencijalu VAE, i njenim mehanizmima delovanja, što predstavlja značajan doprinos postojećim naučnim podacima.

Ključne reči: insekticidi; hlorpirifos; imidakloprid; *Viscum album* L.; oksidativni stres; antioksidativna zaštita; hepatotoksičnost; nefrotoksičnost;

ABSTRACT

Chlorpyrifos (CPF) and imidacloprid (IMI) are insecticides widely used to protect plants. *Viscum album* L. is a semi-parasitic plant with a traditional use in treating numerous diseases. This doctoral dissertation aims to test mistletoe leaf extracts (VAE) for toxicity caused by CPF and IMI in *in vitro* and *in vivo* conditions. The results show that CPF and IMI exhibit cytotoxic effects, while co-treatments with VAE increased cell viability. CPF decreases RBC and Hb, while IMI decreases PLT count compared to control. CPF and IMI increase ALT, AST, LDH and bilirubin. Cholesterol and triglycerides were increased in the CPF and IMI groups, and glucose concentration was raised in the CPF group compared to the control. AChE activity was decreased in the liver of the CPF and IMI groups. An increased concentration of LPO was noted in the liver and testis after CPF treatment, and in the liver in the IMI group. The concentration of GSH in the CPF and IMI group was decreased in the liver, and the concentration of vitamin C was increased in the liver of the CPF group and the liver and testis of the IMI group compared to the control. CPF and IMI also lead to changes in the activities of SOD, CAT, GSH-Px, GR and GST, and cause pathomorphological changes in the liver and kidneys. VAE alleviates hematotoxic effects, reduces ALT and AST, glucose concentration, total cholesterol and triglycerides, and LPO. The extract stabilizes changes in the activities of SOD, CAT, GSH-Px, GR and GST, and partially alleviates the pathological changes in the liver and kidneys. This research provides a more detailed insight into the toxic effects of CPF and IMI. The obtained results have contributed to new knowledge about the protective potential of VAE and its mechanisms of action, which represents a significant contribution to existing scientific data.

Keywords: insecticides; chlorpyrifos; imidacloprid, *Viscum album* L., oxidative stress; antioxidative defense; hepatotoxicity; nephrotoxicity;

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1. Pesticidi	2
1.1.1. Organofosforna jedinjenja	5
1.1.2. Mehanizam delovanja organofosfata	7
1.1.2.1. Struktura i katalitička funkcija holinesteraza	8
1.2. Hlorpirifos	13
1.2.1. Metabolizam hlorpirifosa	14
1.2.2. Toksični efekti hlorpirifosa	15
1.3. Neonikotinoidni insekticidi	17
1.3.1. Mehanizam delovanja neonikotinoida	20
1.3.2. Imidaklopid	22
1.3.2.1. Metabolizam imidakloprida	23
1.3.2.2. Toksičnost imidakloprida	25
1.4. Slobodni radikali	28
1.4.1. Superoksid radikal (O_2^{\bullet})	29
1.4.2. Vodonik peroksid (H_2O_2)	30
1.4.3. Hidroksil radikal (OH^{\bullet})	30
1.4.4. Azot oksid (NO^{\bullet})	31
1.4.5. Peroksinitritni anjon ($OONO^-$)	31
1.5. Oksidativni stres	32
1.5.1. Posledice oksidativnog stresa	33
1.6. Antioksidativna zaštita	34
1.6.1. Superoksid-dismutaza (SOD)	35
1.6.2. Katalaza (CAT)	36
1.6.3. Glutation peroksidaza (GSH-Px)	36
1.6.4. Glutation reduktaza (GR)	37
1.6.5. Glutation-S-transferaza (GST)	37
1.6.6. Glutation	38
1.6.7. Vitamin C (Askorbinska kiselina)	38
1.6.8. Fenolna jedinjenja	39
1.7. Imela, <i>Viscum album</i> L.	40
1.7.1. Hemijski profil <i>Viscum album</i> L.	42

1.8. Biološka aktivnost i mehanizam delovanja <i>Viscum album</i>	43
1.8.1. Antitumorsko i imunomodulatorno delovanje	43
1.8.2. Hipoglikemijsko i hipolipidemijsko delovanje <i>Viscum album</i>	45
1.8.3. Hepatoprotektivno delovanje <i>Viscum album</i>	47
1.8.4. Antioksidativno delovanje <i>Viscum album</i>	48
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	49
3. MATERIJAL I METODE	52
3.1. Sakupljanje biljnog materijala i priprema ekstrakata	53
3.2. Kvalitativno određivanje fenolnih jedinjenja u ekstraktu lista	54
3.2.1. Određivanje ukupnog sadržaja fenola	54
3.2.2. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida	54
3.2.3. Određivanje sadržaja kondenzovanih tanina	55
3.2.4. Određivanje sadržaja galotanina	55
3.3. HPLC analiza ekstrakta lista.....	56
3.4. Ispitivanje antioksidativnog potencijala ekstrakta lista	56
3.4.1. Određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti.....	57
3.4.2. Određivanje antioksidativne aktivnosti merenjem nivoa DPPH [•] radikala.....	57
3.4.3. Određivanje antioksidativne aktivnosti na nivou inhibicije lipidne peroksidacije .	58
3.4.4. Određivanje sposobnosti neutralizacije hidroksil radikala	59
3.4.5. Određivanje antioksidativne aktivnosti merenjem nivoa ABTS ^{•+} radikala	59
3.5. Ispitivanje citotoksičnosti u <i>in vitro</i> uslovima.....	60
3.5.1. Dizajn <i>in vitro</i> eksperimenta	61
3.5.2. Čelijska linija – MRC-5	61
3.5.2.1. Odmrzavanje ćelija.....	62
3.5.2.2. Pasažiranje ćelija	62
3.5.2.3. Brojanje ćelija	62
3.5.3. Ispitivanje vijabilnosti ćelija MTT testom.....	63
3.6. <i>In vivo</i> eksperimenti.....	64
3.6.1. Eksperimentalne životinje.....	64
3.6.2. Eksperimentalni protokol <i>in vivo</i>	64
3.6.3. Žrtvovanje životinja i priprema uzoraka.....	66
3.6.4. Analize hematoloških i biohemijskih parametara.....	66
3.6.5. Priprema uzoraka tkiva homogenizacijom.....	68
3.6.5.1. Određivanje koncentracije proteina u tkivima	68
3.6.6. Određivanje aktivnosti enzima antioksidativnog sistema zaštite.....	69

3.6.6.1. Određivanje aktivnosti SOD	69
3.6.6.2. Određivanje aktivnosti CAT	70
3.6.6.3. Određivanje aktivnosti GSH-Px	70
3.6.6.4. Određivanje aktivnosti GR	71
3.6.6.5. Određivanje aktivnosti GST	71
3.6.7. Određivanje neenzimskih komponenti antioksidativnog sistema zaštite	72
3.6.7.1. Određivanje koncentracije glutationa	72
3.6.7.2. Određivanje koncentracije vitamina C	73
3.6.8. Određivanje aktivnosti holinesteraza	74
3.6.8.1. Određivanje aktivnosti acetilholinesteraze	74
3.6.8.2. Određivanje aktivnosti holinesteraze	75
3.6.9. Određivanje parametara redoks statusa	75
3.6.9.1. Određivanje koncentracije superoksid radikala	75
3.6.9.2. Određivanje koncentracije vodonik peroksida	76
3.6.9.3. Određivanje koncentracije nitrita	76
3.6.10. Određivanje koncentracije lipidnih peroksida	77
3.6.11. Histopatološka analiza isečaka jetre i bubrega	77
3.7. Statistička obrada podataka	78
4. REZULTATI	79
4.1. Hemijski profil i biološka aktivnost ekstrakta	80
4.2. Ispitivanje ćelijske vijabilnosti MTT testom	83
4.3. Promena telesne mase i mase organa životinja	90
4.4. Hematološki parametri	90
4.5. Biohemijski parametri	91
4.6. Aktivnost enzima AChE u jetri, bubregu i testisu	94
4.7. Parametri oksidativnog stresa u jetri, bubregu i testisu	96
4.7.1. Koncentracije ROS i RNS u tkivima	96
4.7.1.1. Koncentracija superoksid anjon radikala ($O_2^{\cdot-}$)	96
4.7.1.2. Koncentracija vodonik peroksida (H_2O_2)	98
4.7.1.3. Koncentracija nitrita (NO_2^-)	99
4.7.2. Koncentracija LPO	101
4.8. Parametri antioksidativnog sistema zaštite u jetri, bubregu i testisu	103
4.8.1. Neenzimske komponente antioksidativne zaštite	103
4.8.2. Enzimi antioksidativnog sistema zaštite u jetri, bubregu i testisu	108
4.8.3. Histopatološka analiza isečaka jetre i bubrega	118

5. DISKUSIJA	122
5.1. Fitohemijske analize ekstrakta lista imele	124
5.2. <i>In vitro</i> tretman	126
5.3. <i>In vivo</i> tretman	128
5.3.1. Uticaj tretmana na hematološke parametre	129
5.3.2. Uticaj tretmana na biohemijske parametre u serumu	131
5.3.3. Ispitivanje AChE kao markera neurotoksičnosti	137
5.3.4. Efekti ispitivanih tretmana na parametre oksidativnog stresa	139
5.3.5. Parametri antioksidativne zaštite	143
6. ZAKLJUČCI	150
7. LITERATURA	154

A decorative border of green leaves and white berries, likely mistletoe, framing the page. The leaves are elongated and pointed, with visible veins. The berries are small, round, and white with a slight blue tint. The border is positioned around the perimeter of the page, leaving a large white central area.

1. UVOD

1.1. Pesticidi

Zelena revolucija je dovela do povećanja proizvodnje hrane, ali je i pokrenula mnoge ekološke probleme sa porastom upotrebe agrohemijskih, uključujući pesticide (Mulla i sar., 2020). Prema jednoj od definicija, pesticidi (engl. *pest* = štetočina) su biocidi, supstance ili mešavina supstanci, koje su namenjene za prevenciju, suzbijanje, uništavanje, ili smanjenje količine štetočina (Levine, 2007; Janjić, 2009; Abubakar i sar., 2020).

Danas se pod pojmom pesticidi podrazumevaju veoma različita jedinjenja hemijskog (organska i neorganska) ili biološkog porekla, koja se koriste za sprečavanje, uništavanje ili suzbijanje štetnih organizama, kao što su insekti ili glodari i neželjene vrste biljaka, koji smanjuju prinose tokom proizvodnje biljnih kultura ili kvalitet dobijenih plodova i namirnica (Tano, 2011). Savremena poljoprivreda se ne može zamisliti bez primene pesticida i mera zaštite bilja, i bez njihove primene u svetu biljna proizvodnja bi ostvarila samo oko 30% od potencijalnih prinosa. Pesticidi se takođe primenjuju i u šumarstvu i drvenoj industriji, prehrambenoj industriji (poboljšava se zdravstvena bezbednost i kvalitet namirnica), kao i u veterini i komunalnoj higijeni za suzbijanje mikroorganizama, insekata, nematoda i glodara koji prenose bolesti (Jokanović, 2010).

Još od antičkih vremena, čovek je zbog svojih osnovnih potreba pokušavao da pronađe i primeni efikasne metode za uzgajanje poljoprivrednih kultura i zaštitu useva. Grčki pesnik Homer je u svom delu "Odiseja" još 1.000 godine p.n.e. opisao upotrebu sumpora za suzbijanje insekata. U Kini su u periodu oko 900. godine p.n.e. korišćeni sumpor kao fungicidno sredstvo, ali i arsen, živa i biljni derivati kao insekticidi. U Persiji su još pre 2.000 godina počeli da se primenjuju prvi pesticidi kao ekstrakti iz cvetova nekih vrsta hrizantema koje imaju insekticidna svojstva (Levine, 2007; Abubakar i sar., 2020).

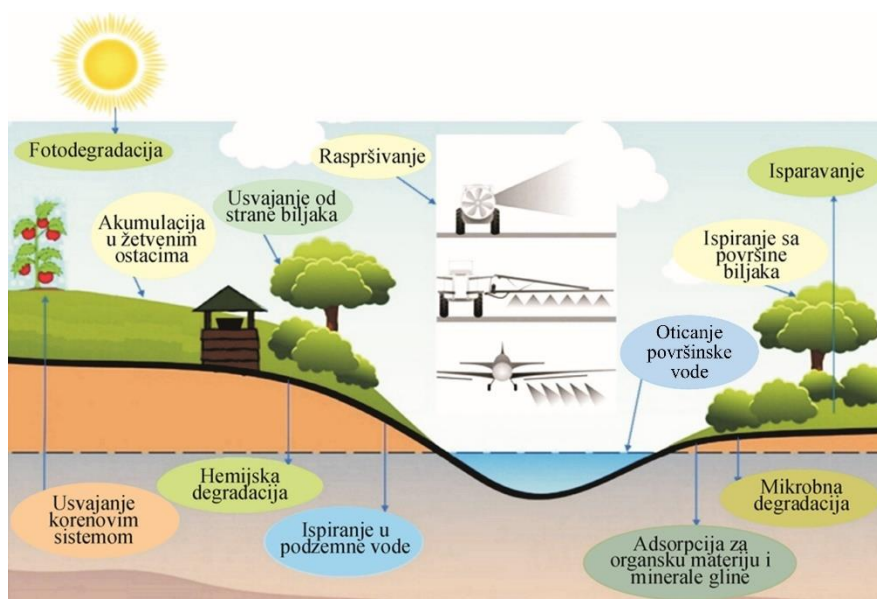
Početak 16. veka u upotrebi su se pojavile preteče prvih pesticida, "para-pesticidi" – za suzbijanje insekata su korišćena neorganska sredstva, sumpor, olovo, živa i jedinjenja arsena; krajem 17. veka koristio se nikotin (ekstrakt iz lišća biljke duvana – *Nicotiana tabacum*) kao veoma efikasan insekticid; u 18. veku za zaštitu od štetnih insekata su korišćeni naftalin i naftna ulja; početkom 19. veka jedinjenja olovnog arsenata i fluorida; a početkom 20. veka korišćene su soli arsena, kao i bakar(II)-sulfat u zaštiti vinove loze i za selektivno uništavanje korova (Levine, 2007). Ove supstance su se koristile sve do pojave sintetičkih pesticida.

Najpoznatiji i najviše korišćeni pesticid u svetu je dihlor-difenil-trihloretan (DDT). Sintetisan je 1874. godine, a njegove hemijske osobine i insekticidnost je otkrio 1939. godine Paul Miler (Paul Müller) u Švajcarskoj. Miler je 1948. godine dobio Nobelovu nagradu za medicinu zbog tog otkrića, i veoma efikasne primene DDT-a za suzbijanje insekata prenosioca bolesti, npr. tifusa, žute groznice i malarije, što je posredno spasilo milione života vojnika i civila u toku Drugog svetskog rata (Yu, 2015; Abubakar i sar., 2020). DDT i slična organohlorna jedinjenja su tokom naredne dve decenije mnogo korišćena, a kao posledica su bili ne samo pojava rezistentnosti mnogih štetnih organizama, već su uočeni i negativni efekti: akumulacija u masnom tkivu ljudi, prenošenje i biomagnifikacija u lancu ishrane i dugo zadržavanje u životnoj sredini. DDT je bio u upotrebi sve do 1972. godine, a zatim se zabranjuje njegovo korišćenje protiv štetočina na poljoprivrednim kulturama, ali se i dalje koristi u nekim zemljama jer su efikasni protiv komaraca i insekata koji prenose malariju i druge tropske bolesti. Upotreba manje toksičnih organofosfata, karbamata i piretroida počinje sedamdesetih godina 20. veka, a od devedesetih godina i upotreba neonikotinoida (Jokanović, 2010; Teodorović i Kaišarević, 2015; Šeremešić i sar., 2017).

Pesticidi su danas sastavni deo savremenog života. Proizvođači i istraživači sintetišu nova jedinjenja pesticida kako bi zadovoljili globalnu potražnju. U idealnom slučaju, primenjeni pesticidi bi trebalo da budu toksični samo za ciljne organizme, a istovremeno biorazgradivi i ekološki prihvatljivi. Svi pesticidi imaju određeni stepen toksičnosti za pojedine žive organizme, što je i uslov njihove efikasnosti (Iyaniwura, 1991; Stanley, i sar., 2016). Problem neselektivnosti u njihovom delovanju na ciljne biljne i životinjske vrste može da dovede do ispoljavanja njihove toksičnosti i na vrstama koje nisu ciljne. Većina pesticida može da dovede do uništavanja korisnih insekata, kao što su oprašivači, ali i drugih beskičmenjaka, riba i ptica, a negativni efekti se zapažaju i kod drugih životinja, uključujući i čoveka. Procenjeno je da samo oko 0,1% pesticida dospeva do ciljnih organizama, a preostala količina dovodi do zagađenja zemljišta, vode i vazduha (Janjić, 2009; Jokanović, 2010; Gill i Garg, 2014).

Značajnije kontaminacije registruju se pri sistematskom korišćenju visokotoksičnih pesticida, uglavnom organohlornih jedinjenja. Ova jedinjenja se slabo razlažu u vodi i zemljištu, i njihova dugotrajna primena dovodi do akumulacije u organizmima životinja i u biljkama, kao i do ispoljavanja značajnih toksičnih efekata (Gill i Garg, 2014). Međutim, smanjivanje ili prestanak korišćenja pesticida može da dovede do povećanog razmnožavanja štetnih organizama.

Pesticidi ispoljavaju štetne efekte na životnu sredinu putem kontaminacije ne samo na mestu primene, već i van nje različitim disperzivnim putevima. Moguća kontaminacija pesticidima dešava se ispiranjem u podzemne vode, površinskim oticanjem, usvajanjem putem korenovog sistema biljaka, isparavanjem i ispuštanjem u vazduh (Slika 1) (Meftaul i sar., 2020).



Slika 1. Shematski prikaz rasprostriranja pesticida u životnoj sredini

(preuzeto iz: Meftaul i sar., 2020, i modifikovano)

U poslednjih 30 godina značajna su ekotoksikološka i monitoring ispitivanja zagađenja životne sredine, kao i ispitivanja efekata pesticida na akvatične ekosisteme, na pticama i divljim životinjama. Pesticidi su ušli i u lanac ishrane i došlo je do njihove bioakumulacije. Pokazani su toksični efekti pesticida kod mnogih vrsta ptica, posebno kod vrsta ptica koje se hrane ribom, kao i kod grabljivica koje se nalaze na kraju lanca ishrane (Gill i Garg, 2014). Pored toga,

tretiranjem travnjaka, drveća, žbunja i cveća u gradskim sredinama, ljudi, kućni ljubimci i ostali neciljni organizmi suočavaju se sa kratkoročnim i dugoročnim izlaganjem pesticidima (Meftaul i sar., 2020). Budući da komercijalni preparati pesticida sadrže i toksične aditive nepoznatih koncentracija, ispitivanje njihove potencijalne toksičnosti na neciljne organizme su tema od velikog značaja u pogledu zaštite zdravlja ljudi i očuvanja životne sredine (van de Merwe i sar., 2018). Kako bi se shvatila opasnost od upotrebe pesticida, izvršila procena rizika i razvile strategije zaštite, neophodno je poznavanje puteva njihovog rasprostiranja u životnoj sredini, kao i poznavanje mehanizama njihovog delovanja (Meftaul i sar., 2020).

Mnogobrojna jedinjenja pesticida se veoma razlikuju u pogledu fizičko-hemijskih osobina, rastvorljivosti u vodi i biološkim svojstvima. Za ispoljavanje delovanja pesticida veoma su značajni apsorpcija, transport, biotransformacija molekula, kao i interakcije sa ćelijskim makromolekulima. Odgovor biološkog sistema na ekspoziciju pesticidima zavisi od načina njihovog ulaska u organizam, a pored akutnih efekata ispituju se i hronični efekti, koji zavise od perioda latencije, pojedinačnih ili dugotrajnih izlaganja (Tano, 2011; Gill i Garg, 2014).

Usled nekontrolisane i nepravilne primene, kao i lake dostupnosti, pesticidi predstavljaju značajan rizik po zdravlje ljudi i uzročnici su akutnih trovanja usled profesionalne i neprofesionalne izloženosti (Mostafalou i Abdollahi, 2012; Gill i Garg, 2014). Svetska zdravstvena organizacija (*World Health Organization*, WHO) procenjuje da je 70% trovanja ljudi pesticidima u svetu posledica profesionalne izloženosti, a intoksikacija pesticidima može se ispoljiti akutno i hronično. Hroničnom trovanju su izloženi ljudi koji se bave proizvodnjom, transportom i primenom pesticida, ali i veći deo populacije zbog korišćenja hrane koja je zagađena pesticidima (Gill i Garg, 2014; Dalmolin i sar., 2020).

Poslednjih decenija, istraživanja su usmerena na sintezu novih jedinjenja pesticida manjeg stepena toksičnosti i sa novim mehanizmom delovanja, koja mogu imati veliki značaj i primenu u poljoprivredi, šumarstvu, veterini, komunalnoj higijeni i medicini. Pesticidi predstavljaju veoma brojnu i heterogenu grupu jedinjenja, a mogu se klasifikovati na različite načine, i to: prema hemijskoj strukturi, fizičkom stanju, na osnovu porekla, prema načinu prodiranja u organizam i mehanizmu delovanja, prema nameni, odnosno vrsti organizma (*target organism*) na koji deluju, prema toksičnosti koju preporučuje WHO (WHO, 2019). Pesticidi se prema *hemijskoj strukturi* mogu podeliti u 3 glavne grupe:

- 1) neorganska jedinjenja (sumpora, bakra, žive, barijuma, fluora, kao i borati i hlorati),
- 2) organska jedinjenja (raznovrsna grupa jedinjenja koja imaju veliku fiziološku aktivnost),
- 3) pesticidi prirodnog porekla (jedinjenja koja sintetišu biljke, životinje, bakterije i gljive: esencijalna ulja, biljni ekstrakti, antibiotici ili fitocidi).

- Pesticidi se prema nameni, odnosno *ciljnom organizmu* na koji deluju, dele na više grupa:

akaricide (grinje), algicide (alge), avicide (ptice), baktericide (bakterije), fungicide (gljive), herbicide (korovske biljke), insekticide (insekti), larvicide (larve insekata), moluskocide (puževi), nematocide (nematode), ovicide (jaja insekata i grinja), piscicide (ribe), repelente (odbijaju insekte), rodenticide (glodari), termiticide (termiti) i viricide (viruse) (Abubakar i sar., 2020).

- Pesticidi se prema *kategoriji toksičnosti* dele na grupe: Ia - izrazito toksični, Ib - visoko toksični, II - umereno toksični, III - malo ili verovatno netoksični. Toksičnost se izražava kao srednja letalna doza LD₅₀ (mg/kg) (peroralni, dermalni), ili srednja letalna koncentracija LC₅₀

($\mu\text{L/kg}$) (inhalacioni), a predstavljaju količinu toksične supstance koja izaziva 50% smrtnosti tretiranih organizama u kratkom vremenskom periodu (24 časa) (Jokanović, 2010).

Najvažnije grupe insekticida su: organofosforna jedinjenja (engl. *organophosphorus insecticides*), organohlorna jedinjenja (engl. *organochlorine insecticides*), karbamati (engl. *carbamate insecticides*), piretrini (insekticidi biljnog porekla), sintetisani piretroidi, bioinsekticidi (entomopatogeni) i neonikotinoidi. Najbrojniji insekticidi imaju direktno dejstvo na nervni sistem insekata, dok insekticidi najnovije generacije deluju posredno i specifično na insekte, kao regulatori rasta insekata (IGRs), utiču na sintezu hitina i njihovo presvlačenje, imitiraju feromone, ili odvrćaju insekte od hrane (Janjić, 2009; King i Aaron, 2015).

Među insekticidima dugo godina su dominirala organohlorna jedinjenja (npr. DDT), ali se zbog njihove dugotrajne perzistencije i biomagnifikacije, liposolubilnosti, bioakumulacije, niskog stepena biotransformacije i degradacije sve više zamenjuju organofosfornim jedinjenjima, karbamatima, insekticidima biljnog porekla, kao i neonikotinoidima (Janjić, 2009; Chambers i sar., 2010; Rezende-Teixeira i sar., 2022).

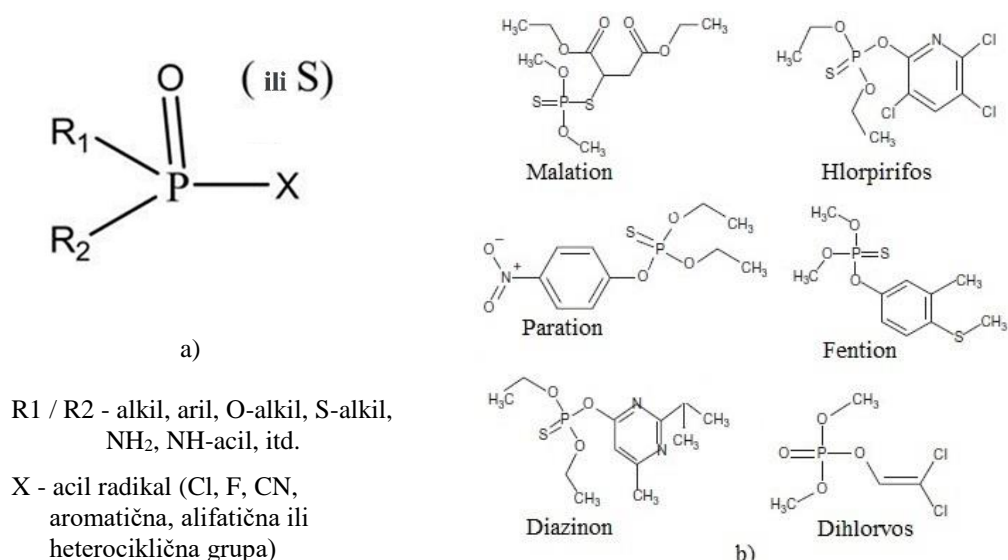
1.1.1. Organofosforna jedinjenja

Organofosforna jedinjenja (OFJ) predstavljaju veliku grupu pesticida, koji su se zbog širokog spektra fizičko-hemijskih i bioloških osobina najčešće koristili u poljoprivredi, industriji i domaćinstvima. Imaju različite namene i koriste se ne samo u poljoprivredi kao insekticidi za suzbijanje fitofagnih insekata, kao herbicidi, fungicidi, defolijanti, akaricidi i nematocidi, već se koriste i kao sredstva u suzbijanju ekto parazita kod domaćih životinja, u komunalnoj higijeni i u medicini. Najtoksičniji predstavnici ovih jedinjenja su bojni otrovi (Vx otrovi, sarin, tabun) (Munro, 1994; Janjić, 2009; Jokanović, 2010).

Organofosfati su po hemijskom sastavu najčešće estri fosforne kiseline. Sastoje se od centralnog atoma fosfora (P) i fosforne (P=O) ili tiofosforne (P=S) veze, R1 i R2 radikala koji su vezani za fosfor preko kiseonika (O) i acil grupe, tj. odlazeće grupe (X) koja predstavlja kiselu komponentu (F, Cl, CN, fenolni ili enolni ostatak) (Jokanović, 2010; Balali-Mood i sar., 2012; Sharma i sar., 2020). Organofosfati se dobijaju kada se vodonikovi atomi fosforne kiseline zamene organskim radikalima poput metil, etil ili fenil radikala. Pored toga, kiseonik se može zameniti sumporom, ugljenikom ili azotom kako bi se dobili različiti derivati (Yu, 2015).

Osnovna hemijska struktura svih organofosfata opisana je Šrederovom formulom (Slika 2a), gde su kiseonik ili sumpor vezani dvostrukim vezama za fosfor (petovalentni), radikali R1 i R2 predstavljaju alkil, alkoksi, alkiltio ili amino grupe, a supstituent na X je acil radikal, anjon neorganske ili organske kiseline (Cl, F, CN, CH_3COO i dr.), ili neki kiseliniski ostatak (enol grupa, aromatična, alifatična ili heterociklična grupa). Reaktivnost organofosfata zavisi od složene hemijske strukture i prisustva funkcionalnih grupa, ali su značajne i razlike u mehanizmu interakcije sa enzimima na koje deluju. Elektrofilnost atoma fosfora je bitna za biološka dejstva ovih jedinjenja. Organofosfati koji poseduju dvostruke veze između atoma fosfora i kiseonika imaju veću elektrofilnost, pa su i visoko reaktivni (Antonijević i Stojiljković, 2007).

Na osnovu ove hemijske strukture (Slika 2a) sintetisan je veliki broj OFJ sa većom ili manjom toksičnošću. Neki od predstavnika su: malation, hlorspirifos, paration, fention, diazinon, dihlorsvos, fenitroton, dimetoat, kumafos, foksim, acefat i dr. (Slika 2b) (Yu, 2015; Sharma i sar., 2020).



Slika 2. a) Strukturna formula organofosfata; b) Najčešće korišćeni organofosforini insekticidi

Francuski hemičari Žan Luj Lasanj (Jean Louis Lassaigne) i Filip de Klermon (Philip de Clermont) zaslužni su za sintezu prvih organofosfata u 19. veku, dok se inicijalni razvoj organofosfata kao insekticida i bojnih otrova početkom 20. veka prvenstveno pripisuje nemačkom hemičaru Žerardu Šrederu (Gerhard Schröder) (Terry, 2012). Prema Yang i sar. (2020) svetsko tržište vezano za organofosfate ima predviđenu godišnju stopu rasta od 5,5% između 2018. i 2023. godine, a tako je uvećan i asortiman komercijalno dostupnih jedinjenja.

OFJ imaju širok spektar biološkog delovanja, kratkoživeći su, nisu perzistentni, brzo se metabolišu i ekskretuju iz organizma. Većina OFJ se brzo razgrađuje i ispoljava niži intenzitet kontaminacije vode, zemljišta i vazduha, ne podležu bioakumulaciji, kao ni biomagnifikaciji, i zbog svih navedenih osobina ranije je to smatrano njihovom prednošću, posebno nakon smanjenja ili prestanka korišćenja mnogih organohlornih jedinjenja (Janjić, 2009; Čolović i sar., 2013). Međutim, organofosfati zbog neselektivnosti i nespecifičnog dejstva mogu da dovedu do ispoljavanja toksičnosti i na neciljnim vrstama, što sa ekotoksikološkog aspekta predstavlja veliki problem. Neka od jedinjenja (npr. paration, terbufos i forat) veoma su otrovna za ljude i domaće životinje, ali i za neke korisne organizme (npr. insekti oprašivači, divlje životinje, a posebno ptice i sisari), i zato se smanjuje njihova primena u zaštiti biljaka, posebno u Evropi i SAD (Janjić, 2009; Triassi i sar., 2019; Sharma i sar., 2020).

Poslednjih godina upotreba organofosfatnih insekticida je smanjena i ograničena uglavnom na oblast poljoprivrede, gde se široko primenjuju za uništavanje štetnih insekata na voću i povrću, kao i za zaprašivanje komaraca, muva, bubašvaba i životinjskih parazita. Različita istraživanja su pokazala da na osnovu akutne srednje letalne doze (LD₅₀), organofosfati spadaju u veoma toksične pesticide za ptice i sisare (Paramveer i sar., 2010; Mostafalou i Abdollahi, 2012).

Organofosforini insekticidi mogu da ispolje toksične efekte usled akutnog trovanja, koja su povećana uporedo sa sve ekspanzivnijom proizvodnjom i neracionalnom primenom u poljoprivredi (profesionalna izloženost), ili štetnog delovanja rezidua OFJ na opštu populaciju preko vode i hrane, usled kontaminacija poljoprivrednih proizvoda ostacima organofosfata (voće, povrće, čajevi i dr.) (Dar i sar., 2020).

Organofosfati se u organizam mogu uneti ingestijom, inhalacijom i preko kože. Većina organofosfata su uljaste tečnosti i lako isparavaju na sobnoj temperaturi, pa se u profesionalnim

uslovima u vidu gasa, para i aerosola najbrže resorbuju inhalacijom preko sluzokože i respiratornog epitela, kao i preko kože. Glavni putevi unošenja za opštu populaciju su ingestija i koža, a u mnogo manjem procentu inhalacija. Distribucija i stepen apsorpcije organofosfata u organizmu je različit i zavisi od vrste OFJ i načina njihovog unošenja u organizam, jer različitim transportom dospevaju u krv i prelaze u tkiva. Distribucija OFJ zavisi i od stepena lipofilnosti i afiniteta prema pojedinim tkivima. Prenose se lipoproteinima i deponuju u masnom tkivu, ali i u drugim tkivima bogatim lipidima. Veći afinitet prema nervnom sistemu ispoljavaju lipofilna OFJ. Jetra i bubrezi imaju najveći značaj u metabolizmu i ekskreciji OFJ u organizmu. Nisu stabilna jedinjenja i lako hidrolizuju, brzo se metabolišu u manje liposolubilna jedinjenja, a proces eliminacije zavisi od hidrosolubilnosti nastalih metabolita, koji u različitim reakcijama menjaju strukturu i solubilnost jedinjenja (Jokanović, 2010; Blain, 2011; Zlatković, 2016; Kaushal i sar., 2021).

1.1.2. Mehanizam delovanja organofosfata

Za različita ispitivanja odnosa doze i efekta OFJ u organizmu značajno je poznavanje i vrlo složenih mehanizama njihovog delovanja. Apsorpcija, transport, kao i biotransformacija molekula organofosfata značajni su za ispoljavanje delovanja OFJ. Svoje efekte u organizmu ostvaruju inhibicijom aktivnosti enzima holinesteraza (ChE) i to kovalentnim vezama za aktivno mesto enzima - ireverzibilna (kovalentna ili progresivna) inhibicija, ili nekovalentnim interakcijama - reverzibilna inhibicija. Neka OFJ ovaj efekat inhibicije postižu neposredno po ulasku u organizam i nazivaju se *direktni inhibitori holinesteraze* (foksim, dihlorvos i trihlorfon). Međutim, postoje i OFJ koja se prvo metabolišu u jetri i drugim organima i tkivima u toksične metabolite, a zatim inhibiraju enzime holinesteraza - *indirektni inhibitori* (dimetoat, hlorporifos, malation, fention, fenitrotion i dr.) (Marrs, 2001).

Zahvaljujući primeni inhibitora otkriveni su vrlo složeni mehanizmi delovanja enzimskih sistema. Inhibicija enzimske aktivnosti može nastati kao rezultat vezivanja molekula karbamata, organofosfata ili njihovih metabolita za funkcionalne grupe aktivnog centra enzima, čime ga blokiraju i onemogućavaju interakciju sa pravim supstratom (Fukuto, 1990). OFJ koja imaju sumpor vezan koordinatno-kovalentnom vezom za atom fosfora nisu toksikološki aktivna i nisu inhibitori ChE. Da bi OFJ postala biološki aktivna moraju spontanom reakcijama, ili u reakcijama biotransformacije, da pređu u odgovarajuće oksoanaloge (npr. malation prelazi u malaokson, paration u paraokson). U reakcijama biotransformacije OFJ sumpor se zamenjuje kiseonikom i mogu da nastanu veoma toksični metaboliti (indirektni inhibitori), ali mogu da nastanu i jedinjenja koja više nisu inhibitori ChE (Bosak, 2006; Rezende-Teixeira i sar., 2022).

Osnovni procesi biotransformacije organofosfata su oksidacija, redukcija, hidroliza i konjugacija, a svi ovi hemijski procesi se mogu podeliti na aktivacione i deaktivacione. U procesima oksidacije i redukcije OFJ, koji se najvećim delom odvijaju u jetri, mogu da nastanu i toksičniji metaboliti, dok procesom hidrolize se značajno smanjuje ili gubi toksičnost primarnog OFJ, a konjugacijom se organizam brani od njegovih toksičnih efekata. Veliki broj specifičnih enzima učestvuje u svim ovim procesima i razgrađuje OFJ, a nalaze se u jetri, na membrani endoplazmatičnog retikuluma: citohrom-P450 oksigenaze (CYP450) i flavin-mono-oksigenaze (FMO). Ovi enzimi prve faze biotransformacije, nazvani MFO (*microsomal mixed function oxidases*), učestvuju u reakcijama oksidacije, redukcije i hidrolize (Jokanović, 2001; Bosak, 2006; Jokanović, 2010; Singh, 2012).

Organofosfati su po hemijskoj strukturi estri, i u procesima biotransformacije učestvuju i dve grupe enzima esteraza, koje deluju na istoj estarskoj ili halogenidnoj vezi, ali imaju

različit mehanizam delovanja. Prvu grupu čine serinske esteraze, tj. esteraze koje u aktivnom centru imaju serin: acetilholinesteraza (AChE), butirilholinesteraza (BuChE), karboksilesteraza (CarbE) i neurotoksična esteraza ili esteraza povezana s neuropatskim delovanjem OFJ (engl. *neuropathy target esterase*, NTE). Ove serinske esteraze organofosfati inhibiraju ireverzibilno i zato aktivnost ovih esteraza predstavlja specifičan biomarker toksičnosti za OFJ i koristi se u proceni težine intoksikacije kod akutnih trovanja, kao i u proceni rizika po zdravlje ljudi kod hroničnih ekspozicija. Esteraze druge grupe imaju glavnu ulogu u procesu detoksikacije, a to su esteraze fosforinih triestara: arildialkifosfataza (paraoksonaza - PON1) i diizopropilfluorofosfataza (DFP-aza). Ove fosfortriesteraze vrše hidrolizu molekula OFJ, vrlo brzo se defosforilišu i imaju veliki značaj u smanjenju koncentracije slobodnih OFJ u organizmima sisara nakon trovanja organofosfatima (enzimi u antidotskoj terapiji). U drugoj fazi biotransformacije organofosfata sledi brza faza konjugacije u kojoj nastaju hidrosolubilna jedinjenja, koja se lako izlučuju iz organizma putem urina (Bosak, 2006; Chambers i sar., 2010; Jokanović, 2010; Testai i sar., 2010).

U reakciji hidrolize OFJ, koja može da bude spontana ili enzimska, odvajaju se one grupe čija je veza sa fosforom najslabija (tj. acil, odlazeća grupa X). Organofosfati koji imaju slobodnu hidroksilnu grupu (-OH) nisu biološki aktivni i ne inhibiraju AChE. Ni OFJ koja umesto kiseonika, vezanog za središnji atom fosfora, imaju atom sumpora nisu inhibitori enzima AChE (Jokanović, 2010; Čolović i sar., 2013; Lazarević-Pašti i Čolović, 2016).

OFJ inhibiraju i druge fiziološki važne enzime kao što su natrijum-kalijum ATP-aza, mijeloperoksidaza, sukcinat dehidrogenaza, a utiču i na promene koncentracija kateholamina, γ -amino buterne kiseline, regulaciju hormona, inflamaciju i dr. Deluju i na mnoge biohemijske procese u organizmu u koje su uključeni inhibirani enzimi, na primer enzimi koji se sintetišu u jetri (Anićijević i sar., 2019). OFJ mogu uzrokovati odloženi neurotoksični efekat tako što dovode do fosforilacije i dealkilacije proteina prisutnog u neuronima (neurotoksična esteraza), što uzrokuje klinički sindrom "organofosfatima izazvana naknadna polineuropatija" (OPINP) (Čolović i sar., 2013).

1.1.2.1. Struktura i katalitička funkcija holinesteraza

Molekuli pojedinih insekticida iz grupe OFJ i karbamata imaju sličan primarni mehanizam delovanja, koji se zasniva na inhibiciji aktivnosti enzima ChE, a to je i glavni uzrok akutne toksičnosti ovih jedinjenja. Inhibitori ChE se prema načinu delovanja mogu podeliti u dve grupe: ireverzibilne i reverzibilne inhibitore (Yu, 2015; Rezende-Teixeira i sar., 2022).

Dva najvažnija tipa holinesteraza su AChE i BuChE, enzimi iz grupe hidrolaza, koji su veoma slični po hemijskoj strukturi, ali se razlikuju po katalitičkoj aktivnosti i lokaciji u tkivima. AChE se nalazi u nervnom sistemu (siva masa mozga) i ima značajnu ulogu u neurotransmisiji, ali se nalazi i u krvi, gde je vezana za membrane eritrocita, kao i u amnionskoj tečnosti i placenti. BuChE je prisutna u gotovo svim tkivima i u krvi. Njena fiziološka uloga nije poznata, ali neki ogledi na životinjama kojima nedostaje AChE su pokazali da BuChE može delimično da zameni aktivnost AChE, ali može i da hidrolizuje razne estre biljnog porekla (Dave, 2000; Čokuđraš i sar., 2003; Jokanović, 2009; Jokanović, 2010; Pohanka, 2011; Pohanka, 2014).

Oba enzima imaju značajnu ulogu u organizmu i predmet su istraživanja u oblasti toksikologije, biohemije i biomedicine, a pogodni su kao biomarkeri kontaminacije organofosfatima i karbamatima. Značajne razlike u toksičnosti ovih, strukturno različitih grupa

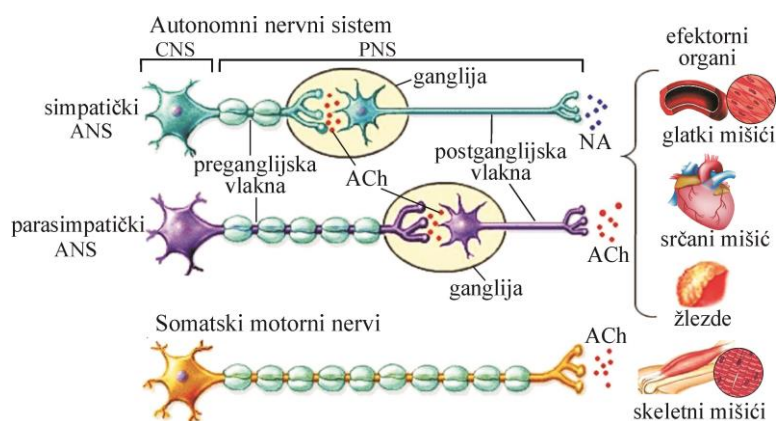
jedinjenja, kod ljudi i drugih životinjskih vrsta mogu se objasniti inhibicijom i drugih serinskih hidrolaza, kao i direktnim efektima OFJ na holinergične receptore. Ove reakcije se dešavaju različitom brzinom zbog razlika u katalitičkoj aktivnosti i afinitetu enzima koji učestvuju u metaboličkoj aktivaciji ovih jedinjenja (Bosak, 2006; Jokanović, 2009; Jokanović, 2010; Čolović i sar., 2013; King i Aaron, 2015).

Acetilholinesteraza (AChE)

Fiziološka funkcija enzima AChE je hidroliza neurotransmitera acetilholina (ACh), koji je neophodan u sinaptičkoj transmisiji u centralnom (CNS) i perifernom nervnom sistemu (PNS).

ACh je neophodan hemijski medijator u transdukciji signala (prenos akcionog potencijala) u holinergičnim sinapsama između preganglijskih i postganglijskih nervnih vlakana (simpatičkih i parasimpatičkih), kao i između nervnih vlakana i efektornih ćelija (glatki mišići, srce, žlezde i mišićne ćelije skeletnih mišića) (Slika 3) (Ognjanović i Matić, 2022).

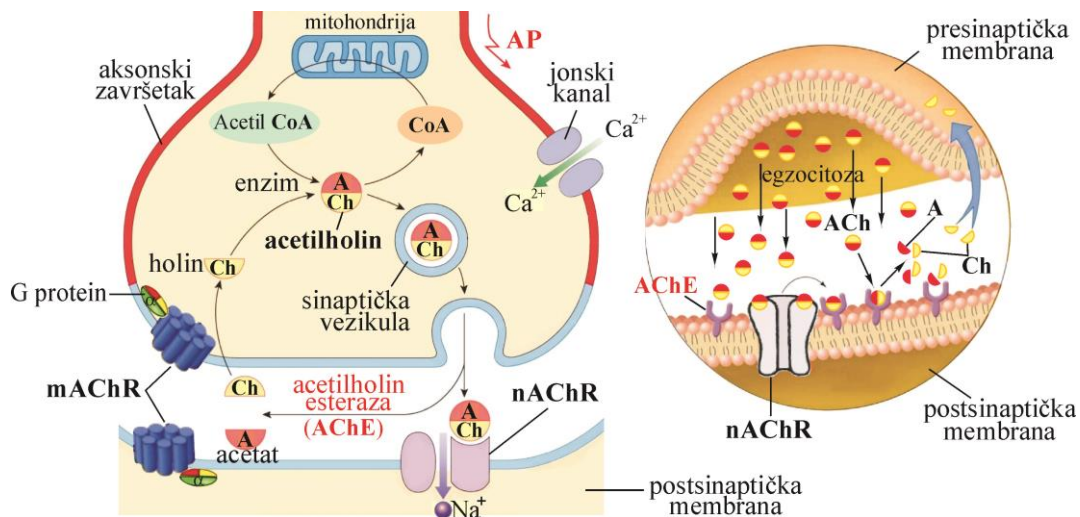
ACh se sintetise u citoplazmi presinaptičkih nervnih završetaka iz acetil koenzima A (acetil CoA) i holina (Ch) u prisustvu enzima holin acetiltransferaze (ChAT), a zatim se pakuje u specifične male sinaptičke vezikule. Nervne ćelije ne sintetisu Ch, pa je sinteza ACh zavisna od Ch unetog hranom (naročito je prisutan u hrani bogatoj lecitinom i proteinima). Za sintezu ACh su potrebni i koenzimi koji nastaju od vitamina B₁ (Jokanović, 2010; Čolović i sar., 2013).



Slika 3. Shema organizacije autonomnog nervnog sistema

(preuzeto iz: Ognjanović i Matić, 2022, i modifikovano)

Nakon ekscitacije presinaptičkog neurona, ACh se oslobađa iz vezikula u sinaptičku pukotinu i ispoljava efekte tek posle vezivanja za holinergične receptore (AChR), koji se nalaze na površini postganglijskih vlakana ili efektornih ćelija (Slika 4). ACh deluje preko dva tipa receptora: nikotinski (nAChR) i muskarinski (mAChR), a naziv su dobili po alkaloidima nikotinu i muskarinu koji ih aktiviraju. ACh ima najčešće ekscitatorni efekat vezivanjem za jonotropne nAChR, koji se nalaze u ganglijama autonomnog nervnog sistema i nervno-mišićnim sinapsama. mAChR se nalaze u CNS i efektornim tkivima i organima (glatkim mišićima, srcu i sekretornim žlezdama), a pripadaju grupi receptora koji su vezani za G protein. ACh, vezivanjem za ove metabotropne muskarinske receptore, može da izazove njihovu ekscitaciju, ali može da ima i inhibitorni efekat na srčanim mišićnim ćelijama (Jokanović, 2010; Pohanka, 2011).



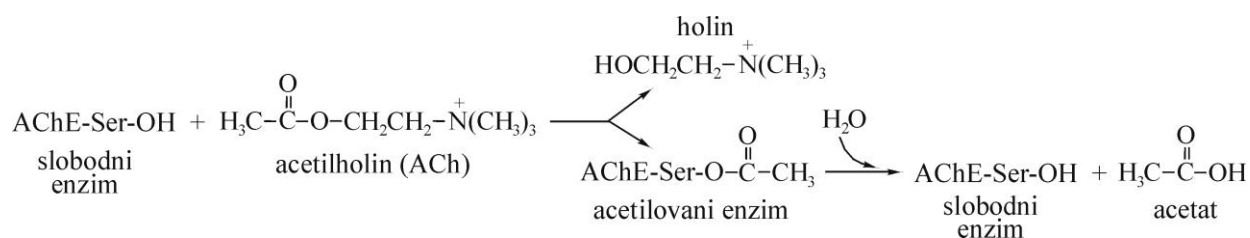
Slika 4. Sinaptička transmisija ACh

(preuzeto iz: Ognjanović i Matić, 2022, i modifikovano)

Signalizacija ACh se prekida dejstvom enzima AChE, koja katalizuje hidrolizu ACh na acetat i holin. U fiziološkim uslovima ACh se veoma brzo razlaže, pa ne dolazi do njegove akumulacije u sinapsama. Svaki molekul AChE može da razloži oko 5.000 molekula ACh u sekundi. Nakon hidrolize ACh, Ch se iz sinaptičke pukotine prenosi nazad u presinaptičku ćeliju posredstvom CHT1 kanala, koji je Na^+ -zavisni kotransporter, i ponovo ulazi u novi ciklus sinteze ACh. Deo ACh se hidrolizuje i pre vezivanja za receptore, a deo se uklanja difuzijom (Jokanović, 2010; Pohanka, 2011; Čolović i sar., 2013).

U molekulu AChE aktivno mesto enzima se sastoji iz anjonskog i estarskog dela. Anjonski deo enzima čini glutaminska kiselina sa $-\text{COOH}$ grupom, koja privlači trimetil-amonijum radikal ACh. Estarski deo enzima se sastoji od tri aminokiseline i, u aktivnom centru, na dnu 2 nm dubokog žleba, nalazi se serin, koji sa glutaminskom kiselinom i histidinom čini trijadu koja vrši katalitičku funkciju enzima. Prvi korak u hidrolizi predstavlja acetilovanje serina u aktivnom centru enzima, i u reakciji $-\text{OH}$ grupe serina sa acetil grupom ACh nastaje nestabilni kompleks enzim-acetilholin. Iz ovog kompleksa se odvaja molekul holin hidrolizom i nastaje acetilovani enzim. Nakon toga, acetilovani enzim se veoma brzo regeneriše hidrolizom estarske veze i nastaju slobodni enzim i acetat (Slika 5). U ovoj reakciji deacetilovanja katalizator je $-\text{OH}$ grupa tirozina i imidazolijum jon histidina. Ako je inhibirana hidroliza ACh, dolazi do njegove akumulacije u holinergičnim sinapsama nervnih i mišićnih ćelija u CNS i/ili PNS, pojačana je desenzibilizacija receptora na postsinaptičkoj membrani, čime je onemogućen prenos sledećeg nervnog impulsa (Bosak, 2006; Yu, 2015; Čolović i sar., 2013; Cavalcante i sar., 2020).

Mehanizam interakcije enzima AChE, kao i drugih esteraza, sa inhibitorima kao što su OFJ i karbamati analogan je mehanizmu fiziološke reakcije enzima (Yu, 2015). Toksikološko i farmakološko dejstvo inhibitora AChE sastojе se u inaktivaciji enzimske aktivnosti koja predstavlja dozno i vremenski zavisnu reakciju, a odvija se u nekoliko faza. Inhibicija AChE zavisi od afiniteta OFJ prema enzimu i brzine fosforilacije enzima.



Slika 5. Mehanizam hidrolize ACh i interakcije sa AChE

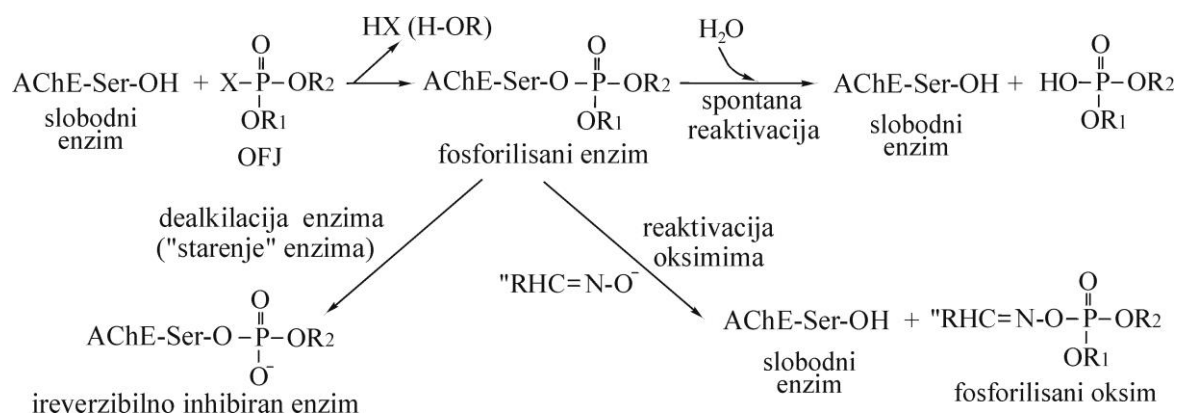
(preuzeto iz: Bosak, 2006, i modifikovano)

Prvi korak u hidrolizi predstavlja acetilovanje serina u aktivnom centru enzima i odvajanje holina. Acetilovani enzim se zatim hidrolizuje i nastaju slobodni enzim i acetat (sirćetna kiselina).

OFJ imaju sličnu strukturu kao ACh, a inhibicija AChE se odigrava vezivanjem OF molekula za aktivno mesto enzima uz oslobađanje "odlazeće" grupe (HX, H-OR). Tom prilikom dolazi do predaje fosfatne grupe enzimu, formiranja kovalentne veze između -OH grupe serina i ostatka OFJ, što dovodi do fosforilacije enzima (Slika 6). Nastali kompleks AChE-OF se veoma sporo spontano hidrolizuje, a fosforilisani enzim AChE zbog inaktivacije ne može da hidrolizuje ACh (Pohanka, 2011; Čolović i sar., 2013; Cavalcante i sar., 2020; Dar i sar., 2020; Kaushal i sar., 2021).

Razlika između hidrolize ACh (Slika 5) i hidrolize OFJ (Slika 6) jeste u brzini reakcije sa vodom, jer je deacetilovanje enzima mnogo brže od defosforilacije enzima, koja se često naziva i spontanom reaktivacijom (Bosak, 2006; Yu, 2015).

Spontana reaktivacija kompleksa AChE-OF (fosforilisanog enzima) (Slika 6) se odvija defosforilacijom inhibiranog enzima malom brzinom, koja je znatno sporija u odnosu na inhibiciju enzima. Za većinu organofosfata ovaj proces spontane reaktivacije je veoma spor i potrebno je nekoliko sati ili dana, a brzina reakcije zavisi od strukture OFJ koje je vezano za AChE. Proces spontane reaktivacije može se ubrzati u prisustvu oksima, nukleofilnih jedinjenja koja razgrađuju fosforilisane enzime, vezuju za sebe fosfatnu grupu organofosfata i nastaje fosforilisani oksim. Oksimi mogu da deluju i kao antidoti u terapiji trovanja OFJ i neophodno je da se primene što pre, jer stepen reaktivacije zavisi od koncentracije i dužine prisustva oksima u blizini aktivnog centra AChE. Produkti hidrolize organofosfata više nisu inhibitori AChE (Antonijević i Stojiljković, 2007; Yu, 2015; Dar i sar., 2020).



Slika 6. Mehanizam interakcije AChE sa organofosfatom

(preuzeto iz: Bosak, 2006, i modifikovano)

Međutim, oksimi su neefikasni ako dođe do poslednje faze fosforilacije AChE, jer deo inhibiranih enzima vremenom ne može da se reaktivira i nastaje tzv. “starenje” fosforilisanog enzima (proces koji dovodi do trajne inaktivacije AChE). U ovoj reakciji dealkilacije, kompleks AChE-OF gubi jednu alkil grupu (R_1) vezanu za fosfor, i formira se stabilniji fosforil-enzim oksianjon koji ne može da se reaktivira, i nastaje ireverzibilno inhibirana AChE. Ova reakcija “starenja” predstavlja neenzimsku vremenski zavisnu transformaciju, a brzina zavisi od mnogih faktora poput temperature, pH i hemijske strukture OFJ (Jokanović i Kosanović, 2010; Yu, 2015; Dar i sar., 2020; Kaushal i sar., 2021).

Posle inhibicije AChE, njena aktivnost se može obnoviti i nadoknaditi, pored spontane reaktivacije i brže reaktivacije oksimima, jedino sintezom novih molekula enzima - “*de novo*” sinteza AChE. U ćelijama NS se obavlja sinteza AChE, a aksonskim transportom se prenosi do nervnih završetaka. U eritrocitima se ovaj enzim ne sintetise, a njegova aktivnost se obnavlja stvaranjem novih ćelija u koštanoj srži eritropoezom i ulaskom u krvotok (Jokanović i Kosanović, 2010; Jokanović, 2010; Pohanka, 2011; Tsai i Lein, 2021).

Zbog nemogućnosti fosforilisane AChE da hidrolizuje neurotransmiter ACh, njegova koncentracija u holinergičnim sinapsama se povećava do toksičnog nivoa, što dovodi do preterane neuroekscitacije (produžene stimulacije i desenzitizacije) postsinaptičke membrane. Usled produženog vezivanja ACh za postsinaptičke nikotinske i muskarinske receptore dolazi do prestanka sinaptičke transmisije i stimulacije. Pošto su ovi receptori lokalizovani u većini organa dolazi do “holinergičnog sindroma”, koji uključuje znojenje, salivaciju i lučenje suza, mučninu, pojačanu bronhijalnu sekreciju, bronhokonstrikciju, miozu, bradikardiju, abdominalne grčeve, dijareju, tremor, intenzivne kontrakcije skeletnih mišića i različite efekte na CNS. Kod akutnog trovanja OFJ u kliničkoj slici, u zavisnosti od stepena inhibicije AChE, razlikuju se: muskarinski efekti usled stimulacije parasimpatikusa (blago trovanje, aktivnost AChE je 40-60%), nikotinski efekti usled stimulacije, a zatim i paralize vegetativnih ganglija i skeletnih mišića, kao i centralni efekti usled stimulacije, a zatim depresije određenih delova CNS (kod umerenog trovanja aktivnost AChE je 20-40% i teškog trovanja aktivnost AChE je < 20%) (Jokanović i Kosanović, 2010; Yu, 2015; Kaushal i sar., 2021; Ganie i sar., 2022).

Neki organofosfati, pored akutnog antiholinesteraznog dejstva, koje zavisi od nivoa aktivnosti enzima AChE, mogu da izazovu i druge toksične efekte. To su: intermedijarni sindrom (IMS) – predstavlja poremećaj nervno-mišićnih sinapsi i javlja se kod većine pacijenata između prvog i četvrtog dana nakon trovanja; sindrom OPINP – dolazi do ataksije i paralize ekstremiteta i javlja se 6 do 20 dana nakon trovanja; sindrom “hronični organofosfatima izazvan neuropsihijatrijski poremećaj” (COPIND) – efekti na nervni sistem posle dugotrajne ekspozicije OFJ, koji se javlja kasnije i traje veoma dugo bez holinergičnih simptoma, nije povezan sa inhibicijom AChE; kao i ostali toksični efekti koji utiču na psihičke funkcije i ponašanje ljudi i životinja (Jokanović i Kosanović, 2010; Kaushal i sar., 2021).

Organofosfati koji sadrže P=O vezu (okso oblici) su tzv. direktni inhibitori AChE, koji toksične efekte ispoljavaju veoma brzo (već posle nekoliko minuta), a zavise od doze i puteva unošenja. Analogna OFJ koja sadrže P=S vezu (tio oblici) su indirektni inhibitori AChE - sama nisu toksična, ali tek posle metaboličke aktivacije (koja se uglavnom odvija u jetri), prelaze u toksične okson oblike, pa njihovi toksični efekti nastaju sporo i traju mnogo duže, i do nekoliko dana posle ekspozicije. Kod sisara, metabolizam tio OFJ u odgovarajući okson se odvija biotransformacijom u prisustvu izoenzima CYP450, a zatim procesom hidrolize i kovalentnim vezivanjem za proteine. Kod insekata mehanizam aktivacije OFJ u odgovarajuće oksone u prisustvu CYP450 je takođe dominantan. Međutim, kod insekata nema hidrolize ovih jedinjenja i zato je toksičnost OFJ selektivno veća u poređenju sa sisarima (Jokanović, 2010; Čolović i sar., 2013; Yu, 2015; Kaushal i sar., 2021; Rezende-Teixeira i sar., 2022).

Butirilholinesteraza (BuChE)

BuChE (serumska) ili pseudoholinesteraza takođe hidrolizuje ACh, ali i druge biološki važne estre kao što su butirilholin i propionilholin, koji se koriste u biohemijskim metodama kao supstrati. U poređenju sa AChE ima znatno manju katalitičku aktivnost prema ACh i razlaže oko 1.000 molekula/sekundi. BuChE je glikoprotein i sintetise se u jetri, oslobađa u cirkulaciju i putem krvi odlazi u gotovo sva tkiva u organizmu. U većoj količini se nalazi u plazmi, jetri i glija ćelijama. Poluživot ovog enzima u serumu je relativno kratak i iznosi oko 10 dana. Fiziološka uloga BuChE nije sasvim razjašnjena, ali je pokazano da postoji snižena aktivnost kod određenih patoloških stanja organizma (oboljenje jetre, akutna infekcija, hronična anemija, karcinom i dr). Na aktivnost BuChE mogu da utiču i neki fiziološki faktori, kao što su uzrast, pol i trudnoća, ali i uticaj starenja (tek posle 70. godine života) (Pohanka, 2011; Marsillach i sar., 2013).

Određeni lekovi (antibiotici, kortikosteroidi, kontraceptivi i dr), kao i trovanje izazvano organofosfatima, može da dovede do smanjenja aktivnosti BuChE. Ima važnu odbrambenu ulogu protiv raznih toksičnih estara biološkog porekla, ali hidrolizuje i veliki broj estara prirodnih i sintetskih baza: morfina (heroin), kokaina, prokaina, salicilne kiseline i atropina (Jokanović, 2010; Čolović i sar., 2013).

Kod trovanja uzrokovanih organofosfatima, veoma je važno da se pored aktivnosti AChE odredi i aktivnost BuChE, iz više razloga: u organizmu BuChE ima oko 10 puta više od AChE i predstavlja značajnu rezervu u zaštiti AChE, ima veći afinitet prema najvećem broju OFJ, služi kao veoma osetljiv marker za ekspoziciju, kao i za procenu težine stepena trovanja OFJ (Jokanović, 2010; Marsillach i sar., 2013).

1.2. Hlorpirifos

Zbog velike efikasnosti, među OFJ najviše korišćeni insekticid je hlorpirifos (Chlorpyrifos – CPF, O,O-dietil-O-3,5,6-trihlor-2-piridinil-fosforotioat). Pripada hlorovanim tiofosfatima iz grupe inhibitora AChE sa kontaktnim i digestivnim delovanjem. Koristi se kao insekticid, akaricid i nematocid u zaštiti velikog broja značajnih poljoprivrednih kultura kao što su kukuruz, pšenica, šećerna repa, uljana repica, krompir, jabuka, grožđe, breskva, citrusno voće, orasi i razne ukrasne biljke. Takođe je značajan i za uništavanje larvi i adultnih oblika komaraca, insekata u domaćinstvu, mrava, parazita kod domaćih životinja, ali i kao sredstvo protiv plesni za konzerviranje drva. CPF se najčešće koristi u poljoprivredi kao folijarni sprej, koji se nanosi na listove biljaka pre sađenja kultura direktno prskanjem iz vazduha ili sa zemlje, ili tretiranjem semena biljaka (Testai i sar., 2010; Teodorović i Kaišarević, 2015).

CPF je zbog široke primene prisutan svuda u životnoj sredini, pa su i ljudi i životinje u velikoj meri izloženi ovom insekticidu, najčešće prilikom upotrebe ili kontakta, udisanja kontaminirane prašine, ili vazduha u blizini tretiranih površina, ali i preko mogućih ostataka (rezidua) u vodi za piće i hrani. Može biti izuzetno otrovan za korisne insekte i pčele, ali i toksičan za ptice i sisare (Eaton i sar., 2008; Uchendu i sar., 2012; Teodorović i Kaišarević, 2015).

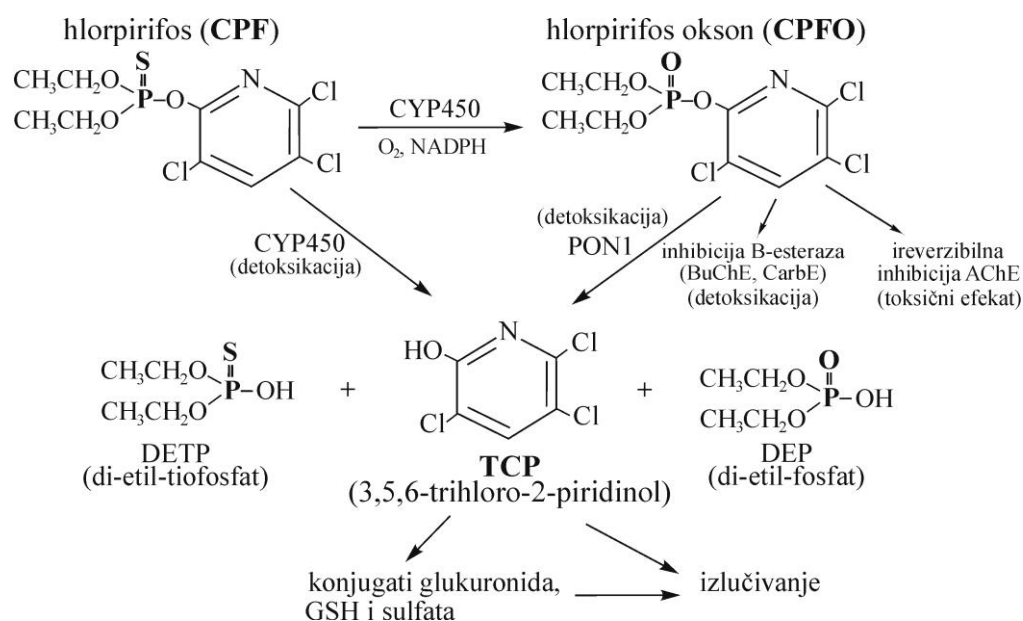
CPF je kristalna supstanca bele boje, mirisa sličnog merkaptanu. Dobro se rastvara u organskim rastvaračima, ali je slabo rastvorljiv u vodi (oko 1 mg/L). Razgrađuje se polako u zemljištu u aerobnim i anaerobnim uslovima i umereno je perzistentan. Ima poluživot između 60 i 120 dana ali u zavisnosti od tipa zemljišta i drugih ekoloških faktora, može u tretiranom zemljištu da se zadrži i dve godine. Razgrađuje se hemijskom hidrolizom i fotodegradacijom,

ali podleže i mikrobiološkoj razgradnji (Testai, 2010; Teodorović i Kaišarević, 2015; Supreeth i sar., 2016).

1.2.1. Metabolizam hlorthirifosa

CPF je umereno rastvorljiv u mastima, i u organizam se unosi ingestijom i inhalacijom i brzo se apsorbuje, dok se preko kože slabo apsorbuje (kod ljudi samo oko 2%). U mnogim eksperimentalnim istraživanjima, koja su izvedena na različitim životinjama, pokazano je da se CPF posle ulaska u cirkulaciju distribuira po celom organizmu i prelazi u tkiva. CPF se kod pacova i drugih vrsta životinja izlučuje urinom (preko 80%) u toku 48 sati i samo male količine ostaju u tkivima kao što su jetra, masno tkivo, pluća i mozak (Jokanović i Kosanović, 2010; Kaushal i sar., 2021).

CPF u reakciji aktivacije, koja se uglavnom odvija u jetri, prelazi u toksični metabolit hlorthirifos okson (CPFO) (Slika 7). To je reakcija oksidativne desulfuracije, u kojoj se sumpor vezan za fosfor u P=S obliku zamenjuje kiseonikom (P=O), a zatim nastaje toksični metabolit CPFO, koji je snažniji inhibitor AChE i BuChE od samog CPF (Chambers i sar., 2010; Testai i sar., 2010; Yu, 2015).



Slika 7. Metabolizam hlorthirifosa

(preuzeto iz: Testai i sar., 2010, i modifikovano)

Oksidacijom CPF može da započne, pored reakcije desulfuracije, i reakcija oksidativne hidrolize ili dearilacije, u kojoj se eliminiše aril grupa i nastaje 3,5,6-trihloro-2-piridinol (TCP), koji više nije inhibitor AChE i di-etil-tiofosfat (DETP). Reakcija dealkilacije, koja se odvija na molekulu CPF ili njegovom oksonu, je reakcija u kojoj se jedan od ugljenikovih atoma u alkoksi grupi oksiduje do aldehida i uklanja, ostavljajući hidroksilnu grupu povezanu sa fosforom. Nastali oksidovani molekul je formaldehid u slučaju metoksi grupe, ili acetaldehid u slučaju etoksi grupe (Chambers i sar., 2010; Testai i sar., 2010). Sve tri CYP-posredovane reakcije (desulfuracije, dearilacije i dealkilacije) odvijaju se i kod insekata i kod sisara pomoću enzimskog sistema CYP450 (CYP 2B6, 2C9, 2C19 i 3A4). Za razliku od desulfuracije, koja dovodi do velikog povećanja akutne toksičnosti CPFO, dearilacija i dealkilacija su reakcije

detoksikacije u kojima učestvuju, pored CYP450, i PON1 i sistem glutaciona. Kod ljudi i životinja postoji velika varijacija u procesu detoksikacije CPF (Bosak, 2006; Jakanović, 2010; Flaskos, 2012; Čolović i sar., 2013; Lazarević-Pašti i Čolović, 2016).

Katalitičku hidrolizu fosfata/oksona katalizuju fosfotriesteraze. Jedan od glavnih puteva uključuje hidrolizu fosfatnih veza između fosfora i ostatka molekula CPFO pomoću A-esteraza (PON1), pri čemu se formiraju TCP i di-etil-fosfat (DEP). Nekatalitička hidroliza fosfata/oksona se javlja kada ova jedinjenja fosforilišu serinske esteraze poput CarbE, BuChE pa čak i AChE. Sve ove esteraze spadaju u B-esteraze, hidrolaze koje inhibiraju organofosfati. Sisari imaju potentnu A-esterazu, ali kod većine ptica ona nije mnogo efikasna, pa je CPF toksičniji za ptice u poređenju sa sisarima (Chambers i sar., 2010; Testai i sar., 2010; Teodorović i Kaišarević, 2015).

Reakcija faze II biotransformacije (detoksikacija) CPF je brza faza konjugacije u kojoj se uklanjaju njegovi metaboliti nastali u reakcijama prve faze. Konjugaciju CPFO vrše glutation-S-transferaze sa redukovanim glutationom, a konjugaciju TCP glukuronil-transferaze i sulfo-transferaze, pri čemu se formiraju odgovarajući glukuronidi i sulfatni konjugati, hidrosolubilna jedinjenja koja se lako izlučuju iz organizma (Chambers i sar., 2010; Testai i sar., 2010).

Glavno mesto metabolizma CPF je jetra, jer se CYP450 uglavnom nalazi u jetri. Neke forme ove citohrom-P450 oksigenaze se nalaze i u drugim tkivima, pa se CPF može metabolički aktivirati i u mozgu, plućima, bubrezima i intestinumu. Glavni put eliminacije CPF je ekskrecija urinom, pri čemu je TCP najzastupljeniji metabolit, zajedno sa DETP, GSH konjugatima, sulfatima i glukuronidima. Ostaci hlorspirifosa mogu se detektovati merenjem nivoa TCP, DETP ili DEP u krvi ili urinu (Choi i sar., 2006; Ganie i sar., 2022).

1.2.2. Toksični efekti hlorspirifosa

Hlorspirifos ima širok spektar delovanja, a prema stepenu toksičnosti pripada II klasi jedinjenja sa umereno toksičnim dejstvom (WHO, 1997). Vrlo brzo se apsorbuje, a toksični efekti su posledica indirektno inaktivacije enzima AChE, jer posle metaboličke aktivacije u jetri, pomoću enzima CYP450, CPF prelazi u toksičniji CPFO, koji je mnogo snažniji inhibitor ChE od samog CPF (Testai i sar., 2010; Teodorović i Kaišarević, 2015; Yu, 2015).

Primarni način toksičnog delovanja CPF kod insekata, životinja i ljudi je ireverzibilna inhibicija aktivnosti AChE. Inhibirana AChE ne vrši fiziološku ulogu hidrolize ACh, pa dolazi do nagomilavanja velikih količina ovog neurotransmitera u sinapsama. Usled produženog vezivanja ACh za postsinaptičke receptore uzrokuje se hiperstimulacija mAChR i nAChR, a kasnije i prestanak transmisije nervnog impulsa i stimulacije u svim holineričnim sinapsama CNS i/ili PNS. Pored akutnog antiholinesteraznog dejstva, koje se ispoljava kao holinerični sindrom (muskarinski, nikotinski i centralni efekti), CPF može da izazove i druge toksične efekte, koji ne zavise od aktivnosti AChE. Kod subhroničnog i hroničnog izlaganja CPF glavnim mehanizmom toksičnosti smatra se oksidativni stres (Ranjbar i sar., 2005; Yu, 2015; Kaushal i sar., 2021; Ganie i sar., 2022).

Podaci pokazuju da je AChE kod ljudi osetljivija u poređenju sa životinjama, bez obzira na način izlaganja i unosa CPF u organizam (inhalacija, oralno, ili dermalno). Kod profesionalno izloženih radnika koji se bave proizvodnjom, transportom, prometom i primenom pesticida, određivanje aktivnosti AChE u eritrocitima i BuChE u serumu ili plazmi, u poređenju sa vrednostima pre ekspozicije, može poslužiti kao dobar biološki pokazatelj

efekta OFJ i potvrda dijagnoze trovanja. Intoksikacija se može ispoljiti akutno i hronično, a stepen inhibicije AChE određuje težinu trovanja, dok serumska BuChE samo ukazuje na kontakt sa organofosfatima (Jokanović, 2010). Ukoliko je aktivnost ovih enzima kao biomarkera izloženosti OFJ smanjena za više od 30% došlo je do trovanja. Ali, na trovanje OFJ i karbamatima može da ukaže i prisustvo metabolita ovih jedinjenja u krvi i/ili urinu. Simptomi trovanja se ne moraju pojaviti odmah, a terapija se zasniva na sprečavanju resorpcije otrova, farmakološkom tretmanu i opštim pomoćnim merama (Jokanović, 2010; Wang i sar., 2010; Supreeth i Raju, 2017).

Kod životinja i ljudi, pored inhibicije AChE, koja ima ključnu ulogu u ispoljavanju toksičnog delovanja CPF, mnogobrojna istraživanja potvrđuju da se ovim mehanizmom ne mogu objasniti različiti simptomi (Terry, 2012; Burke i sar., 2017). Pokazano je da CPF utiče na aktivnost brojnih enzima, na receptore i druge fiziološki važne proteine, ali dovodi i do nastanka oksidativnog stresa i oksidativnih oštećenja u mnogim tkivima, promena vrednosti neenzimskih antioksidanata i aktivnosti enzima antioksidativne zaštite, kao i do pojave mnogih bolesti (Kalender i sar., 2012; Lee i sar., 2015; Tanvir i sar., 2016; Costa, 2018; Khalaf i El-Mansy, 2019; Li i sar., 2019). CPF može kod akutnog i hroničnog trovanja (izlaganje niskim dozama) izazvati niz toksičnih efekata u organizmu, kao što su: oštećenje jetre i poremećaj metaboličke funkcije, toksično delovanje na nervni sistem i ponašanje, psihomotorne funkcije, poremećaje učenja i pamćenja, funkciju endokrinih žlezda, zatim uticaj na reprodukciju i razvoj, imuni sistem, izazivanje genotoksičnosti, mutagenosti itd. (Ali i sar., 2009; ElMazoudy i sar., 2011; Lee i sar., 2015; Ventura i sar., 2016; Gómez-Canela i sar., 2017; Silver i sar., 2017; Berg i sar., 2020; Perez-Fernandez i sar., 2020).

Brojna ekotoksikološka i biomonitoring ispitivanja su pokazala rasprostranjenost organofosforinih insekticida u životnoj sredini i njihovo prisustvo u površinskim vodama, kao i štetne efekte i dugotrajne posledice kod vodenih organizama, ptica i divljih životinja (Gill i Garg, 2014; Teodorović i Kaišarević, 2015). U biomonitoring studijama su ispitivani i bioakumulacija CPF kod nekih vodenih organizama, kao i kumulativni fiziološki efekti. Prema podacima US EPA (2006) u tkivima riba i vodenih beskičmenjaka CPF se akumulira do koncentracija koje prelaze vrednosti za akutnu LC₅₀ za mnoge osetljive vrste ptica i malih sisara, koji se hrane ovim vodenim organizmima u blizini tretiranih površina (Watts, 2013). Na primer, ostrige, koje zbog nedostatka esteraza i monooksigenaza imaju smanjen metabolički kapacitet, iz vode bioakumuliraju CPF i preko 200 puta (Hill, 2003). Subletalni efekti CPF se manifestuju kod ptica u smanjenoj sposobnosti letenja, promenama u migracionom ponašanju i u reprodukciji, u smanjenju brojnosti usled negativnog uticaja na fiziološke procese, kao i na histopatološke promene u tkivima i organima imunog sistema, a bilo je i više slučajeva masovnog uginuća ptica, kod kojih je aktivnost AChE bila smanjena i preko 50% (Watts, 2013; Ahmad i sar., 2015; Miladinović i sar., 2021). Takođe, kod riba i žaba toksični efekti CPF se ispoljavaju smanjenom aktivnošću AChE, smanjenom sposobnosti plivanja, rasta, kao i hematološkim i histopatološkim promenama, poremećajima endokrinog sistema i izazivanjem genotoksičnosti (Mehler i sar., 2008; US EPA, 2009; Altun i sar., 2017; Gómez-Canela i sar., 2017; Ibrahim i sar., 2019; Raibeemol i Chitra, 2020; Rutkoski i sar., 2020; Zhao i sar., 2021a).

CPF je opasan po životnu sredinu i veoma je toksičan za pčele i druge korisne insekte, ribe, ptice i sisare, i umereno toksičan za gliste, vodozemce i vodene beskičmenjake (US EPA, 2006; Vučinić i sar., 2014; Teodorović i Kaišarević, 2015). Akutna toksičnost CPF zavisi od čistoće preparata kao i od načina unošenja u organizam. Akutna toksičnost CPF za neciljne vrste iznosi: posle oralnog unosa LD₅₀ za glodare (miševi i pacovi) je od 50 do 300 mg/kg, za ptice 30-490 mg/kg, za ribe sunčanice LC₅₀ iznosi 0,002-0,2 mg/L i oko 0,40 mg/L za pastrmke,

dok za kišne gliste LC_{50} iznosi 200 mg/L i za pčele od 0,07 do 0,1 μg /jedinki pčele (kontaktno), a za alge i zooplankton EC_{50} iznosi 0,1-0,16 μg /L (Teodorović i Kaišarević, 2015).

CPF, prisutan u preparatima koji se koriste protiv buva i drugih ektoparazita kod kućnih ljubimaca i domaćih životinja u veterini, može imati štetne efekte i izazvati smanjenje aktivnosti ChE i nakon nekoliko nedelja od tretmana (Boone i sar., 2001).

U poređenju sa sisarima, CPF je mnogo toksičniji za ptice, kao što su fazani, prepelice, vrapci, golubovi, pilići (LD_{50} iznosi od 8,5 do 20 mg/kg) i patke (LD_{50} iznosi od 130 do 200 mg/kg), a razlog je veća osetljivost ptica koje imaju mnogo niži nivo enzima A-esteraza (paraoksonaze) u jetri. Ove A-esterase efikasno hidrolizuju OFJ koja ih ne inhibiraju. Selektivni toksični efekti OFJ se objašnjavaju odsustvom A-esteraza kod različitih vrsta insekata (Bosak, 2006; US EPA, 2006; Vučinić i sar., 2014; Teodorović i Kaišarević, 2015; Rezende-Teixeira i sar., 2022).

U mnogim zemljama, uključujući i zemlje EU i Srbiju, CPF i preparati koji sadrže ovu aktivnu supstancu se i dalje koriste bez obzira na potencijalnu toksičnost. Međutim, proizvođači pesticida sve više sintetišu nove i manje štetne proizvode.

1.3. Neonikotinoidni insekticidi

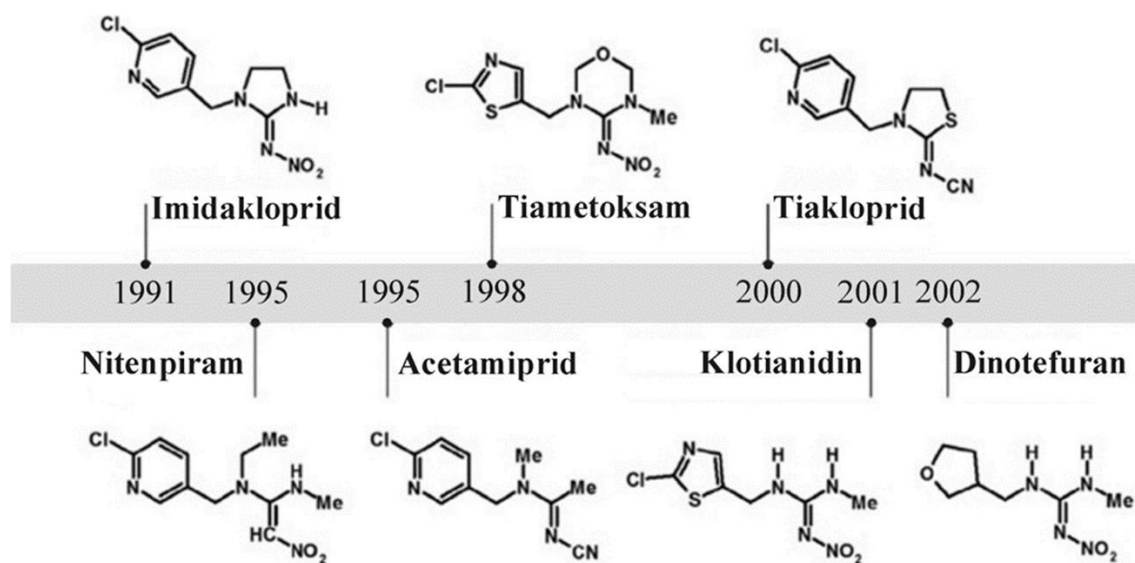
Neonikotinoidni insekticidi ili neonikotinoidi predstavljaju grupu sintetičkih insekticida (analozi prirodnog insekticida nikotina), koji su prvi put uvedeni u upotrebu 90-ih godina 20. veka. Brzo su postali najrasprostranjeniji i najviše korišćeni insekticidi širom sveta u poljoprivredi, veterini i kućnoj upotrebi zbog svoje velike efikasnosti u suzbijanju štetnih insekata i jednostavne primene. U 2014. godini njihova primena je bila veća od 25% globalnog tržišta insekticida (Bass i sar., 2015). Primenjuju se u obliku sprejeva, folijarno, natapanjem, a najčešće tretiranjem semena i zemljišta. Neonikotinoidi su relativno mali molekuli i dobro su rastvorljivi u vodi, a nizak potencijal isparljivosti ovih insekticida ukazuje na to da će tokom primene prskanjem samo u kratkom periodu biti prisutni u gasovitom obliku (Bonmatin i sar., 2015). Neonikotinoidi su sistemski insekticidi širokog spektra i deluju kontaktno i digestivno. Koriste se za zaštitu velikog broja useva od štetnih insekata u povrtarstvu i voćarstvu, kao i šećerne repe, pamuka i pirinča (Katić i sar., 2021). Zbog specifičnog mehanizma delovanja, velike selektivnosti i manje toksičnosti za toplokrvne organizme i životnu sredinu, ova grupa insekticida ima mnoge prednosti i predstavljaju zamenu za konvencionalne grupe insekticida, kao što su hlorisani ugljovodonici, organofosforni insekticidi, karbamati i piretroidi (Han i sar., 2018). Svrstani su u blago i umereno toksične pesticide prema klasifikaciji Svetske zdravstvene organizacije (WHO, 2019).

Neonikotinoidi se mogu podeliti na osnovu hemijske strukture na N-nitroguanidine (imidakloprid, tiametoksam, klotianidin i dinotefuran), nitrometilene (nitenpiram i nitiazin) i N-cijanoamidine (acetamiprid i tiakloprid) (Motaung, 2020) (Slika 8). Imidakloprid, nitenpiram, tiakloprid i acetamiprid imaju hlorpiridinsku komponentu, tiametoksam i klotianidin imaju hlorotiazolnu grupu, a struktura dinotefurana uključuje tetrahidrofuran (Thompson i sar., 2020).

Neonikotinoidi se, kao agonisti nAChR, snažno vezuju za ove postsinaptičke receptore u CNS insekata, uzrokujući pri niskim koncentracijama ekscitaciju i nervnu stimulaciju, dok pri visokim koncentracijama dovode do blokade receptora, paralize i do uginuća insekata. Ova jedinjenja imaju veći afinitet i jače se vezuju za nAChR kod insekata (sto i više puta) nego kod

kičmenjaka, što je osnova njihovog selektivnog dejstva, pa su selektivno toksičniji za insekte (Tomizawa i Casida, 2005; Goulson, 2013).

Zbog ovog specifičnog načina delovanja i selektivne aktivnosti u suzbijanju insekata koji su razvili rezistentnost na druge grupe insekticida (organofosfate, karbamate i piretroide), neonikotinoidi se preporučuju za tretman nekih vrsta žitarica, kao i voća i povrća. Kao kontaktno aktivni i sistemični insekticidi imaju manje toksične efekte na korisne insekte nego ostali insekticidi, kao i nisku toksičnost za sisare. Njihova primena u biljnoj proizvodnji daje dobre rezultate i veoma su efikasni u suzbijanju i kontroli različitih vrsta biljnih vaši, a posebno vrsta iz reda Heteroptera, Tripsa (*Trips tabaci*), krompirove zlatice (*Leptinotarsa decemlineata*) i drugih vrsta štetnih insekata koji sišu sokove, grizu i žvaću. Međutim, mnogi ukazuju da su ti insekticidi štetni po pčele i druge oprašivače (Casida i Durkin, 2013; Goulson, 2013; Sheets i sar., 2016; Wang i sar., 2018).



Slika 8. Neonikotinoidni insekticidi i godina uvođenja na tržište

(preuzeto iz: Bass i sar., 2015, i modifikovano)

Nedavna istraživanja pokazuju da su neonikotinoidi sveprisutni u životnoj sredini, što je rezultat njihove sve veće upotrebe, velike mobilnosti i relativno dugog poluživota u vodi i zemljištu. Literaturni podaci pokazuju da se poluživot neonikotinoida u zemljištu kreće od 1 dana do čak 19 godina (Thompson i sar., 2020). Podaci dobijeni na osnovu eksperimenata pokazuju da različito vreme poluživota neonikotinoida u životnoj sredini zavisi od mnogih faktora kao što su način i količina primene preparata, prisustvo ili odsustvo biljnog pokrivača, temperatura, tip zemljišta i pH, sadržaj organske materije, kao i upotreba đubriva. Njihova široka rasprostranjenost predstavlja velike rizike po biodiverzitet i dinamiku populacija korisnih organizama (Goulson, 2013; Hladik i sar., 2018). Kao jedinjenja sa visokom rastvorljivošću u vodi, neonikotinoidi često kontaminiraju površinske i podzemne vode, što predstavlja veliki rizik po životnu sredinu (Thompson i sar., 2020).

Neonikotinoidi se često otkrivaju u prehrambenim proizvodima, pa se na taj način direktno ili indirektno povećava verovatnoća izloženosti sisara, uključujući i čoveka. Američko ministarstvo poljoprivrede otkrilo je prisustvo neonikotinoida u 12 od 19 uzoraka voća i povrća (USDA, 2014, 2016). Takođe, dokazano je prisustvo i kontaminacija neonikotinoidima i njihovim metabolitima u vodi za piće, mleku i medu (Seccia i sar., 2008; Klarich i sar., 2017; Mitchell i sar., 2017). Sadržaj ostataka neonikotinoida može biti smanjen, ali ne i potpuno

eliminisan preradom prehrambenih proizvoda. Studija Romeh i sar. (2009) je ispitivala proizvode od paradajza, i rezultati su pokazali da je obrada hrane promenila koncentraciju ostataka neonikotinoida. Takođe, ustanovljeno je da su koncentracije imidakloprida bile znatno niže na opranom paradajzu, što ukazuje da se određeni deo ovih supstanci može mehanički ukloniti.

Neonikotinoidi su izuzetno efikasni kao biljni sistemici za kontrolu insekata koji se hrane sisanjem biljnih sokova. Biljke ih apsorbuju iz zemljišta korenom i preko provodnog sistema transportuju u sva tkiva (koren, stablo, izdanke, listove, cvetove i plodove) i tako štite sve delove biljke, gde se mogu zadržati duže vreme (Zhang i sar., 2018). Iz ove grupe jedinjenja tiametoksam i acetamiprid su detektovani u listovima i plodovima trešnje i dve nedelje nakon primene (Hoffmann i sar., 2010). Ova svojstva neonikotinoida povećavaju verovatnoću zagađenja životne sredine i izloženost neciljnih organizama. Na primer, u aerobnim zemljištima neonikotinoidi mogu biti vrlo postojani, imaju poluzivot nekoliko meseci ili čak godina, a mogu da se akumuliraju ako se više puta koriste (Han i sar., 2018). U studiji koju su sprovedli Hladik i Kolpin (2016), najmanje jedan neonikotinoid je detektovan u 63% od 48 uzoraka površinske vode, pri čemu je imidakloprid bio najčešće detektovani neonikotinoid (37%).

Zbog sve veće upotrebe neonikotinoida na globalnom nivou i perzistentnosti, utvrđen je njihov nepovoljan uticaj na oprašivače i smanjenje obima oprašivanja, kao i povezanost sa CCD (engl. *Colony Collaps Disorder*) sindromom kod pčela, tj. pojavom „naglog nestanka“ pčela iz košnica, što nastaje kao posledica subletalnih trovanja pčela (Hladik i sar., 2014). Rezultati brojnih istraživanja sprovedenih poslednjih petnaestak godina pokazala su da neonikotinoidi koji se translociraju u biljna tkiva iz tla, čak i u niskim dozama, mogu pored delovanja na štetne insekte da utiču negativno na neciljne vrste insekata, i da dovedu do smanjenja populacije korisnih insekata u prirodnim ekosistemima, kao što su npr. medonosne pčele i da smanje prinose u pčelarstvu (Woodcock i sar., 2016; Sgolastra i sar., 2020). Pokazano je da, i godinu dana nakon izlaganja, neonikotinoidi mogu da utiču na opstanak celih kolonija divljih pčela. Takođe, pokazano je i da ovi insekticidi izazivaju i promene u ponašanju u potrazi za hranom, smetnje pri orijentaciji, utiču na socijalni život zajednice, smanjenu sposobnost učenja, termoregulaciju, imunološki odgovor, na smanjenu sposobnost razmnožavanja, kao i na povećanu smrtnost jedinki (Woodcock i sar., 2016; Main i sar., 2020; Sgolastra i sar., 2020). Visoki nivoi ostataka neonikotinoida se mogu detektovati u polenu i pčelinjem vosku (Mullin i sar., 2010; Jabot i sar., 2015).

Na osnovu različitih istraživanja, pokazano je da, pored štetnog uticaja na pčele, neonikotinoidi mogu štetno da deluju i na druge neciljne organizme poput leptira, bumbara, vodenih insekata, mnogobrojnih vrsta kopnenih i vodenih beskičmenjaka i kičmenjaka (Slika 9) (Forister i sar., 2016; Thompson i sar., 2020; Malhotra i sar., 2021). Ptice su takođe podložne neonikotinoidima, uključujući i direktno unošenje tretiranog semena, kao i preko kontaminiranih insekata i vodenih organizama u lancu ishrane (Hladik i sar., 2018).

Kao rezultat ovih negativnih efekata, upotreba neonikotinoida na otvorenom polju (engl. *open-field crops*) je sada zabranjena u EU i ograničena u nekim oblastima SAD, Filipina i Kanade (Sgolastra i sar., 2020). Međutim, primena neonikotinoida i dalje je rasprostranjena širom sveta. Pošto se na tržištu nalazi veliki broj preparata, kod izbora insekticida, kao i drugih pesticida, od velikog je značaja korišćenje preparata koji imaju različite mehanizme delovanja da ne bi došlo do rezistencije (Janjić, 2009). Potrebna je i pravilna primena insekticida u proizvodnji zdravstveno bezbedne hrane, kao i očuvanje životne sredine.



Slika 9. Model organizmi vrsta beskičmenjaka i kičmenjaka koji se koriste za proučavanje toksičnosti neonicotinoida

(preuzeto iz: Malhotra i sar., 2021, i modifikovano)

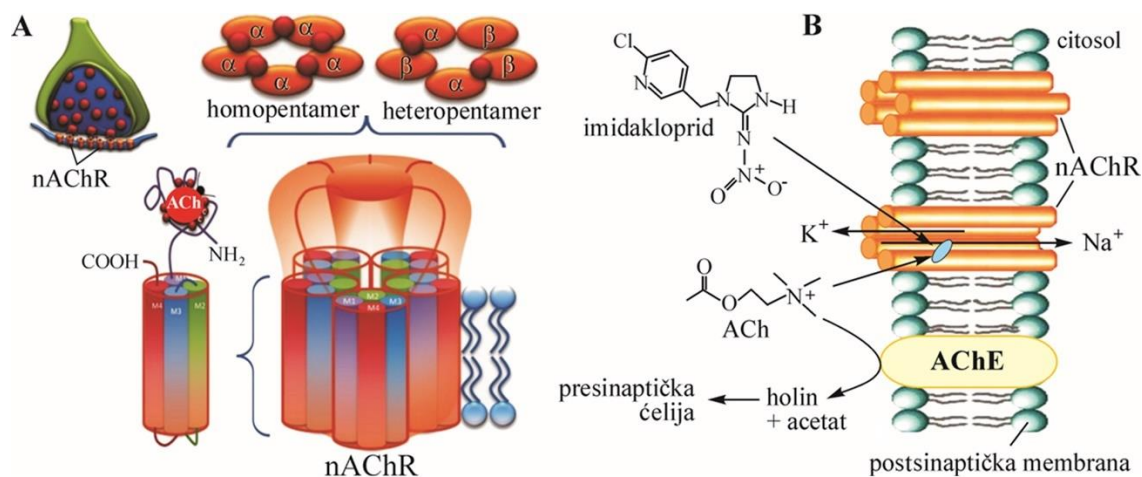
1.3.1. Mehanizam delovanja neonicotinoida

Neonicotinoide su organski insekticidi, i imaju različite strukturne karakteristike, koje doprinose povećanoj selektivnosti kod insekata u odnosu na kičmenjake. U poređenju sa nikotinom, neonicotinoidni insekticidi su ireverzibilni agonisti nAChR. Ovi receptori su dobili naziv po alkaloidu nikotinu, koji se za njih vezuje kao agonist. Neonicotinoide i nikotinoide su slični po strukturi, a razlike ispoljavaju u mehanizmu delovanja, zbog ciljnog mesta vezivanja i jonizacije pri fiziološkoj pH. Neonicotinoide (tj. imidakloprid) nisu jonizovani i pokazuju selektivnost prema nAChR insekata, dok nikotinoide (tj. nikotin) su pozitivno naelektrisani i selektivni su prema nAChR sisara. Neonicotinoide su kategorisani kao kompetitivni modulatori nAChR od strane IRAC (*Insecticide Resistance Action Committee*). Insekticidna svojstva neonicotinoide mogu se pripisati njihovom agonističkom delovanju na nAChR insekata, koji pripadaju superfamiliji ligandnih jonskih kanala (Tomizawa i Casida, 2003; Malhotra i sar., 2021).

Neuronski nAChR su integralni membranski proteini, koji se nalaze u različitim regionima CNS i PNS. Kod insekata se obično nalaze na presinaptičkim i postsinaptičkim nervnim završecima, na ćelijskim telima interneurona, senzornih i motornih neurona, dok se kod sisara nAChR nalaze u mozgu, ganglijama i skeletnim mišićima (Yu, 2015). nAChR su heterogena porodica katjonskih ligand zavisnih jonskih kanala, čije otvaranje kontroliše endogeni neurotransmiter ACh (Slika 4). Različiti podtipovi nAChR imaju pentamernu strukturu, koja se sastoji od homomerne ili heteromerne kombinacije 12 različitih subjedinica ($\alpha 2$ - $\alpha 10$, $\beta 2$ - $\beta 4$), koje su raspoređene oko centralne katjonske pore (Gotti i Clementi, 2004; Crossthwaite i sar., 2017). Svaka subjedinica ima veliki ekstracelularni N-terminalni domen koji sadrži mesto vezivanja za ACh, 4 trans-membranska domena (TMD) i uvećanu intracelularnu petlju između TMD3 i 4, koja sadrži mesta za modifikaciju kanala putem fosforilacije. Funkcionalni nAChR sadrži 5 subjedinica sa drugim transmembranskim domenima (TMD2) koji okružuju pore kanala (Slika 10-A). Zbog složenosti strukture, koju daju brojne subjedinice koje formiraju ove receptore i različitih kombinacija subjedinica, ovi receptori se razlikuju po farmakološkim i biofizičkim svojstvima, kao i po ćelijskoj i subćelijskoj lokalizaciji u mozgu. Neuronski nAChR doprinose širokom spektru moždanih aktivnosti i utiču na brojne fiziološke funkcije, međutim poremećaj holinergične

neurotransmisije može da dovede do različitih bolesti, koje uključuju i disfunkciju nAChR tokom razvoja i starenja (Gotti i Clementi, 2004; Gotti i sar., 2006; Crossthwaite i sar., 2017).

U normalnim fiziološkim uslovima, ACh se vezuje za nAChR, dolazi do konformacione promene receptora i otvaranja kanala, propuštajući jone Na^+ i K^+ , a to dovodi do depolarizacije postsinaptičke membrane i stvaranja akcionih potencijala. Sinaptička signalizacija se prekida delovanjem enzima AChE, koji brzo vrši hidrolizu ACh i ne dolazi do njegove akumulacije u sinapsama (Crossthwaite i sar., 2017; Casida, 2018).



Slika 10. Mehanizam delovanja neonikotinoidea

A - Nikotinski nAChR (preuzeto iz: Crossthwaite i sar., 2017, i modifikovano);

B - Interakcija imidakloprida sa nAChR (preuzeto iz: Tomizawa and Casida, 2003, i modifikovano)

Neonikotinoide su neurotoksična jedinjenja, koja deluju kao agonisti na postsinaptičkim nAChR kod insekata (Slika 10-B) i izazivaju isti efekat kao ACh, ali na nefunkcionalan način. Vezivanjem za receptorna mesta za ACh, ovi insekticidi blokiraju prenošenje nervnih impulsa i normalan ćelijski odgovor u sinapsama CNS insekata (Tomizawa i Casida, 2003). Za razliku od ACh koji napušta receptore, neonikotinoide ostaju trajno vezani i dovode do blokade nAChR insekata, što pokreće agonističku aktivaciju, koju ne poništava enzim AChE, koji ove insekticide ne hidrolizuje. U zavisnosti od strukture liganada i podtipova nAChR, neonikotinoide vezivanjem za ove receptore pokazuju različite efekte, kao što su delimična do superagonistička, alosterična i antagonistička modulacija. Neprestana aktivacija receptora dovodi do prekomerne stimulacije holinergičnih sinapsi, do hiperekscitacije, desenzitizacije, konvulzije, paralize i do uginuća tretiranih insekata (Yu, 2015; Casida, 2018; Houchat i sar., 2020; Malhotra i sar., 2021).

Neuronski nAChR insekata i sisara su strukturno različiti, a selektivno delovanje neonikotinoidea je zbog razlika u vezivanju za različite podtipove nAChR u nervnom sistemu kod kičmenjaka u odnosu na insekte (Sheets, 2002; Simon-Delso i sar., 2015). U brojnim publikacijama su opisani mehanizmi delovanja neonikotinoide in-sekticida, koji se odnose na modulaciju sinaptičke aktivnosti i na aktivaciju nAChR, i to homomernih $\alpha 7$ sa malim afinitetom i heteromernih $\alpha 4\beta 2$ receptora visokog afiniteta, pošto su oni najviše zastupljeni u nervnom sistemu sisara. Pokazano je da imidakloprid i slična jedinjenja imaju veoma mali afinitet za vezivanje za neuronske $\alpha 7$ i $\alpha 4\beta 2$ nAChR pacova (Gotti i sar., 2006; Houchat i sar., 2020). Alfa i ne-alfa subjedinice nAChR doprinose interakcijama imidakloprida sa ovim receptorima. Elektrostatičke interakcije nitroiminske grupe i azota u imidaklopridu sa

određenim aminokiselinama nAChR imaju verovatno ključnu ulogu u određivanju selektivne toksičnosti imidakloprida (Matsuda i sar., 2001).

Različiti mehanizmi mogu aktivirati regulaciju $\alpha 7$ i $\alpha 4\beta 2$ receptora. Za heteromerne $\alpha 4\beta 2$ receptore odnos subjedinica koje formiraju receptore može imati uticaj na farmakološka svojstva receptora. Dugotrajno izlaganje $\alpha 4\beta 2$ receptora nikotinu dovodi do povećanja broja vezivnih mesta na površini ćelije, dok se $\alpha 7$ receptor brzo desenzibilise nikotinom kao odgovor na visoke koncentracije agonista i ima visoku relativnu permeabilnost za kalcijum. Poznato je da nikotin ima nizak afinitet za $\alpha 7$ receptore, i za njihovu regulaciju su potrebne visoke doze nikotina (Crossthwaite i sar., 2017; Houchat i sar., 2020).

Elektrofiziološke studije su pokazale da je sposobnost vezivanja neonikotinoida za neuronske nAChR insekata sa mnogo većim afinitetom od nikotina i ACh i u pozitivnoj korelaciji sa njihovom agonističkom i insekticidnom aktivnošću (Simon-Delso i sar., 2015). Toksičniji su za insekte zbog njihove hemijske strukture, interakcije na mestu vezivanja na odgovarajućim nAChR insekata, kao i zbog njihove hidrofobnosti, što poboljšava propustljivost integumenta insekata i tako povećava efikasnost u suzbijanju širokog spektra štetnih insekata u različitim razvojnim stadijumima (Tomizawa i sar., 2001). I kod drugih vrsta beskičmenjaka postoji veliki broj nAChR, koji imaju veći afinitet prema neonikotinoidnim insekticidima, a to i objašnjava veću selektivnu toksičnost ovih jedinjenja za te organizme (Tomizawa i Casida, 2005).

Slaba propustljivost krvno-moždane barijere dodatni je faktor koji smanjuje toksičnost ovih insekticida kod kičmenjaka (Yamamoto i sar., 1995). Međutim, nedavna istraživanja su pokazala da metaboliti neonikotinoida takođe mogu da blokiraju nAChR nervnih ćelija i kod kičmenjaka. U nekim studijama su pokazani različiti potencijalno toksični efekti na životinje, pa čak i na ljude uključujući hepatotoksičnost, nefrotoksičnost, reproduktivnu toksičnost i citotoksičnost. Pokazano je da neonikotinoidi tiametoksam i klotianidin mogu da dovedu do oslobađanja dopamina u strijatumu pacova, a takođe mogu da izazovu oksidativni stres, što dovodi do neurotoksičnosti (de Oliveira i sar., 2010; Wang i sar., 2018).

Kod ljudi nakon ingestije neonikotinoida dolazi do ispoljavanja različitih simptoma poput pneumonije i respiratorne insuficijencije, zatim efekata na CNS (agitacija, konfuzija i koma) i kardiovaskularni sistem (tahikardija, palpitacija i ventrikularna fibrilacija). Metaboliti dobijeni iz nekih neonikotinoida (imidakloprid i tiakloprid) su snažniji agonisti nAChR od njihovih matičnih jedinjenja, a samim tim verovatno i toksičniji (Gupta i Milatovic, 2014).

1.3.2. Imidakloprid

Imidakloprid (Imidacloprid – **IMI**, [1-(6-hloro-3-piridilmetil)-N-nitro-imidazolidin-2-iliden-amin]) je hlorisani analog nikotina i prvi neonikotinoidni insekticid predstavljen 1991. godine. Zauzima 41,5% celokupnog tržišta neonikotinoida, koji najvećim delom zamenjuje mnogo toksičnije insekticide kao što su OFJ i metilkarbamati. IMI je najčešće korišćeni neonikotinoidni insekticid sa kontaktnim i digestivnim delovanjem. Ima visoko selektivno insekticidno delovanje pri malim dozama primene i nisku toksičnost za sisare. IMI ima široku upotrebu takođe i zbog svog odličnog sistemskog svojstva, brzog unosa i distribucije u biljkama (Toor i sar., 2013; Teodorović i Kaišarević, 2015; Katić i sar., 2021). Primenuje se za pripremu zemljišta i tretiranje semena pre sadnje, ili za prskanje useva poput žitarica, hmelja, uljane repice, duvana, krompira, paradajza, paprike, crnog luka i dr. Ima veliku primenu u zaštiti mnogih kultura od štetnih insekata u ratarstvu i hortikulturi, a koristi se i kao folijarni

sprej u voćnjacima u zaštiti jabuka, krušaka itd. Takođe se koristi i za suzbijanje mušica i drugih štetnih insekata na farmama i u urbanim sredinama, ali i u očuvanju zdravlja ljudi (kontrola komaraca, bubašvaba, termita, itd.) (Mitić i Savčić-Petrić, 2002; Abu Zeid sar., 2019).

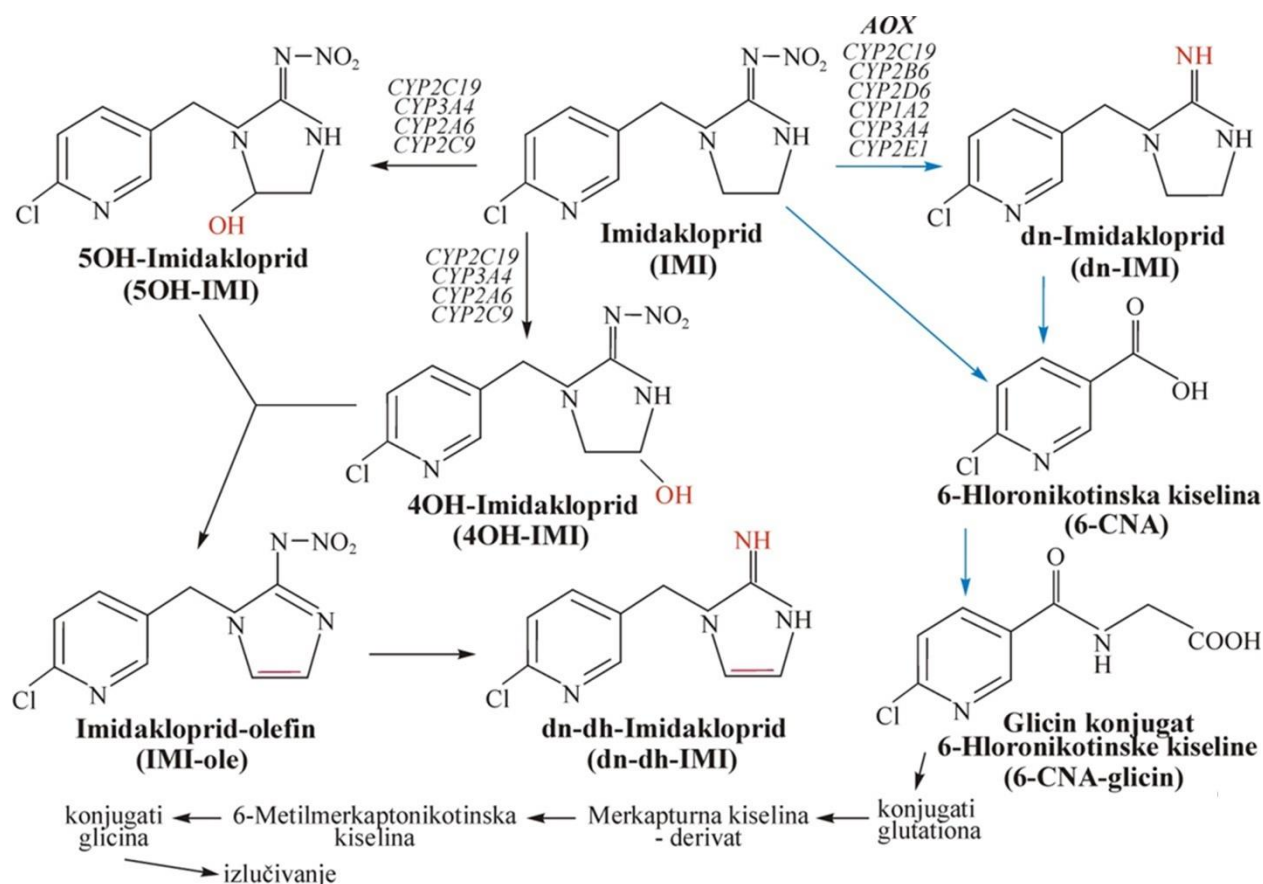
IMI je bezbojna kristalna supstanca sa blagim karakterističnim mirisom na aromatična jedinjenja (Teodorović i Kaišarević, 2015). U poređenju sa organohlornim i organofosforim insekticidima, IMI je relativno dobro rastvorljiv u vodi (0,5-0,6 g/L) (IPCS, 2001; Flores-Céspedes i sar., 2012; Teodorović i Kaišarević, 2015). Može dugo ostati u zemljištu nakon primene, i ustanovljeno je da se zadržava u životnoj sredini sa poluživotom od približno između 100 dana i tri godine u aerobnim uslovima (Fossen, 2006). IMI se razgrađuje fotodegradacijom, ali i mikrobiološka razgradnja u zemljištu ima značajnu ulogu (Teodorović i Kaišarević, 2015). Svetska zdravstvena organizacija (WHO) i Agencija Sjedinjenih država za zaštitu životne sredine (U.S. EPA) su IMI klasifikovale kao "umereno toksično" jedinjenje, koje ima manje toksične efekte na korisne insekte, kao i za sisare i životnu sredinu u poređenju sa ostalim insekticidima (Lonare i sar., 2014).

IMI se zbog specifičnog mehanizma delovanja i insekticidne aktivnosti širokog spektra veoma intenzivno koristi u više od 120 zemalja širom sveta. Pošto predstavlja zamenu za mnoge postojeće insekticide potrebne su detaljnije toksikološke studije koje bi rasvetlile njegov rizik i opasnosti. Takođe, i sve veća upotreba IMI i njegova potencijalna toksičnost u humanoj populaciji dovode do povećanih farmakokinetičkih proučavanja i saznanja o efektima na ne ciljane organizme.

1.3.2.1. Metabolizam imidakloprida

IMI je neonikotinoidni insekticid sa sistemskom aktivnošću, ali i kontaktnim i digestivnim delovanjem. Iako ima relativno malu toksičnost kod kičmenjaka, i oni mogu biti izloženi letalnim dozama IMI, ako se u većoj količini hrane semenom, ili biljkama koje su tretirane ovim insekticidom. IMI se, nakon oralnog uzimanja, brzo apsorbuje iz gastrointestinalnog trakta (92-99%) i distribuira po celom organizmu u skoro svim organima i tkivima, dok je eliminacija brza i nema indikacije o bioakumulaciji u tkivima. Od ukupno unete količine kod pacova i drugih vrsta životinja izlučuje se i do 96% nakon 48 sati. IMI se razgrađuje na veliki broj metabolita, a isti ili slični metaboliti IMI se nalaze kod pacova, koza i kokošaka. Nastali metaboliti nađeni u urinu su 6-hloronikotinska kiselina (6-CNA) i produkti konjugacije 6-CNA sa glicinom (6-CAN-glicin) (Tomizawa i Casida, 2005; Nimako i sar., 2021).

Postoje dva glavna puta metabolizma IMI kod sisara (Slika 11). Prvi uključuje oksidativno cepanje na imidazolidin i 6-CNA, pri čemu se imidazolidinski deo izlučuje urinom. Nikotinski deo se dalje razlaže konjugacijom sa glutationom do derivata merkapturane kiseline, a zatim do metil merkaptonikotinske kiseline. Ovaj deo se takođe konjuguje sa glicinom da bi se formirao konjugat hipurične kiseline za ekskreciju. Drugi put biotransformacije IMI uključuje hidroksilaciju intaktnog molekula u imidazolidinskom prstenu, da bi se dobili 4-hidroksi-IMI (4OH-IMI) i 5-hidroksi-IMI (5OH-IMI), nakon čega sledi eliminacija vode i formiranje nezasićenog metabolita olefina, imidaklopid-olefina (IMI-ole) (Sheets, 2010; Swenson, 2013). Glavni metaboliti identifikovani kod sisara, koji mogu biti od toksikološkog značaja su: 4OH-IMI, 5OH-IMI, 6-CAN, 2-imidazolidon, IMI-ole, guanidin (dn-IMI) i derivati uree (Wang i sar., 2018).



Slika 11. Putevi metabolizma imidakloprida

(preuzeto iz: Nimako i sar., 2021, i modifikovano)

Različiti enzimi su uključeni u proces metabolizma neonicotinoida. Istraživanje Schulz-Jander i Casida (2002) je pokazalo da se IMI pretežno metaboliše oksidacijom pomoću citohroma poput CYP3A4, CYP2C19, CYP2A6, CYP2C9, CYP1A2 i dr. IMI se metaboliše i aerobnom nitroredukcijom pomoću aldehyd oksidaze (AOX), enzima koji je veoma važan u metabolizmu ksenobiotika, a prisutan je najviše u jetri (Swenson, 2013; Wang i sar., 2018). Glavni metaboliti IMI, poput 6-CAN i 2-imidazolidona, značajno doprinose ukupnoj toksičnosti IMI zbog njihovih nekovalentnih interakcija sa biopolimerima. Iako IMI pokazuje odličan bezbedonosni profil, njegov metabolit dn-IMI ima preko 300 puta jači afinitet za nAChR sisara i ispoljava veću toksičnost, koja je povezana sa agonističkim dejstvom na nAChR u mozgu u odnosu na IMI (Wang i sar., 2018).

IMI se kod sisara posle ingestije brzo apsorbuje i distribuira iz plazme u tkiva i organe. Kod pacova najveća koncentracija u plazmi se primećuje nakon 2,5 sata, dok se najveće koncentracije ovog insekticida i njegovih metabolita u tkivu postižu približno 12 sati nakon početne izloženosti, sa posebno visokim koncentracijama u jetri. Farmakokinetičke studije nisu bile dostupne za direktno određivanje brzine absorpcije iz kože i putem inhalacije. IMI ili njegovi metaboliti mogu da prolaze i kroz krvno-moždanu barijeru (Mohamed i sar., 2009; Kapoor i sar., 2014; Katić i sar., 2021).

1.3.2.2. Toksičnost imidakloprida

IMI predstavlja novu generaciju neurotoksičnih insekticida, a prema stepenu akutne toksičnosti pripada II kategoriji jedinjenja sa umereno toksičnim dejstvom, i zato je klasifikovan kao pesticid opšte upotrebe (WHO, 2019). U.S. EPA je za IMI odredila oralnu hroničnu referentnu dozu (RfD) od 0,057 mg/kg/dan. Takođe, sugerisano je da IMI, klotianidin i tiametoksam mogu da izazovu štetne efekte kod velikog broja ugroženih i zaštićenih vrsta (U.S. EPA, 2021a-c). IMI je na listi potencijalnih zagađivača kopnenih i vodenih ekosistema, kao i podzemnih voda, na osnovu njegove visoke rastvorljivosti u vodi, mobilnosti i postojanosti u zemljištu. Može da bude prisutan i u životnim namirnicama, a takođe može predstavljati i rizik po zdravlje ljudi (Lonare i sar., 2014; Schmidt i sar., 2022).

IMI i strukturno slični neonicotinoidi su kompetitivni modulatori nAChR i pokazuju selektivniju toksičnost i specifično delovanje na nervni sistem insekata u odnosu na sisare. IMI je po hemijskoj strukturi sličan i ima zajednički način delovanja sa alkaloidom nikotinom. Kao agonisti ACh vezuju se za postsinaptičke nAChR u CNS insekata (Slika 10-B), izazivaju ireverzibilnu blokadu ovih receptora, koji predstavljaju glavno ciljno mesto za vezivanje i delovanje insekticida, i odgovorni su za brzu ekscitatornu neurotransmisiju (Sheets, 2002; Tomizawa i Casida, 2003). Toksičnost je zasnovana na interferenciji neurotransmisije u nikotinskom holinergičnom nervnom sistemu, odnosno smanjenju ili ometanju prolaska jona kroz nAChR, što rezultuje delimičnom supresijom jonskih struja izazvanih vezivanjem ACh. IMI kao agonist i antagonist nAChR sisara ima dvostruko delovanje, i ovi efekti zahtevaju dalja eksperimentalna istraživanja (Tomizawa i Casida, 2009; Crossthwaite i sar., 2017; Casida, 2018; Qu i sar., 2022).

U poređenju sa nikotinom, IMI ima veću efikasnost u suzbijanju štetnih insekata, a takođe ima i daleko manju toksičnost za organizam ljudi i životnu sredinu (Crossthwaite i sar., 2017; Wang i sar., 2018; Nimako i sar., 2021). Na osnovu vrednosti LD₅₀ i podataka o vezivanju za nAChR insekata i sisara, pokazane su razlike u specifičnosti podtipa nAChR receptora. Na osnovu akutnih vrednosti LD₅₀, nikotin je 5 puta toksičniji za pacove (53 mg/kg) od kućne muve (272 mg/kg), a IMI je 20 puta manje toksičan za pacove (450 mg/kg) od kućne muve (22 mg/kg). Prema tome, veći afinitet vezivanja za nAChR insekata ima IMI, a relativno mali afinitet za nAChR sisara, i to glavne neuronske podtipove $\alpha 4\beta 2$ i $\alpha 7$. Nikotin se slabo vezuje za nAChR insekata i jače za nAChR sisara (Gotti i Clementi, 2004; Crossthwaite i sar., 2017; Houchat i sar., 2020).

Prema najnovijim istraživanjima, IMI pored delovanja na štetne insekte, u zaštiti biljaka i životinja, u prirodnim ekosistemima može da deluje negativno i na korisne vrste insekata i oprašivače, kao što su npr. medonosne pčele (Woodcock i sar., 2016). Imidakloprid ne izaziva samo povećanu smrtnost insekata, već uzrokuje i subletalne efekte, zbog njihove široke primene na terenu. Posle izlaganja subletalnim dozama imidakloprida, kod insekata se javlja niz fizioloških promena, poremećaja u ponašanju, razvoju i smanjenoj sposobnosti razmnožavanja, što ima uticaja na kontrolu štetnih insekata i funkcionisanje agroekosistema (Blacquièrè i sar., 2012; Main i sar., 2020).

Insekti imaju dvofazni odgovor na dozu insekticida. Izlaganje malim dozama može stimulisati biološke procese koji povećavaju preživljavanje i reprodukciju. Na primer, male doze IMI povećavaju fekunditet kod biljnih vaši *Aphis glycines*, *Myzus persicae* i *Aphis gossypii* iz reda Hemiptera (Bantz i sar., 2018; Li i sar., 2018). Sa druge strane, subletalne doze IMI mogu izazvati smanjeno razmnožavanje, odložen razvoj i smanjenu sposobnost kretanja ili učenja kod štetnih insekata, korisnih insekata, kao i kod drugih neciljnih organizama (Li i sar., 2018; Malhotra i sar., 2021; Siregar i sar., 2021). Na primer, kod korisnih insekata, kao

što su pčele i bumbari, subletalne koncentracije IMI (LC₁₀ i LC₃₀) mogu izazivati smanjeno razmnožavanje i trajanje razvoja, promene u telesnoj težini, ponašanju, cirkadijalnom ritmu i spavanju, učenju i pamćenju, kao i u orijentaciji u potrazi za hranom. Slično, hronična izloženost IMI može da dovede do promena funkcija mitohondrija u mozgu, akumulacije lipida, kao i do promene vida i kretanja kod vinskih mušica (*Drosophila melanogaster*) (Martelli i sar., 2020; Qu i sar., 2022). Svi ovi efekti mogu da dovedu kod štetnih insekata do otpornosti i rezistencije na insekticide. Jedan od mehanizama rezistencije je metabolička detoksikacija, a nastaje pojačanom regulacijom enzima za detoksikaciju, kao što su CYP450 monooksigenaze, glutation-S-transferaze i esteraze (Zhang i sar., 2016; Qu i sar., 2022). Takođe, i tačkasta mutacija nAChR je još jedan faktor povezan sa otpornošću na neonicotinoidne insekticide. Promene koje se odnose na funkciju mitohondrija, metabolizam lipida, funkciju neurona i imunitet su osnovni molekularni mehanizmi fizioloških poremećaja, kao i poremećaja ponašanja kod insekata (Chen i sar., 2017; Chen i sar., 2021; Lv i sar., 2021).

Iako se prvobitno smatralo da su manje toksični za sisare od tradicionalnih insekticida, novija istraživanja na animalnim modelima i na ćelijskom nivou pokazuju da IMI može da uzrokuje različite biohemijske i fiziološke promene, i da izazove niz toksičnih efekata na neciljne organizme beskičmenjaka i kičmenjaka, uključujući i čoveka (Tomizawa i Casida, 2005; Schmidt, 2018; Katić i sar., 2021). Istraživanja pokazuju da metaboliti mogu biti toksičniji od samog IMI. Metabolit ole-IMI ispoljava veću toksičnost u odnosu na IMI kod insekata, dok metabolit dn-IMI ima slabije delovanje na nervni sistem insekata, ali veći na nervni sistem sisara u poređenju sa IMI. Ustanovljeno je i da metabolit 2-imidazolidon može izazvati tumore u kombinaciji sa nitratom, a pokazano je da dovodi i do genetičkih oštećenja (Broznić i sar., 2008; Crossthwaite i sar., 2017; Nimako i sar., 2021).

IMI ispoljava svoju aktivnost na nervni sistem i dovodi do ireverzibilne blokade postsinaptičkih nAChR i smanjenja holinergične sinaptičke transmisije. Neurotoksični efekti se manifestuju poremećajima u ponašanju, smanjenjem pokretljivosti, degenerativnim promenama u Purkinjeovim ćelijama i promenama aktivnosti enzima AChE, koja je zabeležena u plazmi i mozgu riba, ptica i sisara (Lonare i sar., 2014; Topal i sar., 2017; Abu Zeid i sar., 2019). Rezultati Burke i sar. (2018) pokazuju da izlaganje insekticidu IMI tokom ranog perioda razvika izaziva dugotrajne promene u ponašanju i moždanim funkcijama kod miševa. Kod pacova su pokazane i neurobihevirolne promene, koje su povezane sa smanjenom neurotransmisijom i apoptotskim promenama u mozgu (Abd-Elhakim i sar., 2018).

Rezultati dobijeni u *in vivo* istraživanjima su pokazali da IMI u akutnim tretmanima dovodi do nastanka oksidativnog stresa i oksidativnih oštećenja u mnogim tkivima kao što su jetra, mozak i bubrezi kod ptica i sisara (Yardimci i sar., 2014; Lohiya i sar., 2017; Poliserpi i sar., 2021). Mehanna i sar. (2022) su u studiji na mužjacima pacova potvrdili da oksidativni stres doprinosi nastanku reproduktivne toksičnosti izazvane insekticidom IMI. U *in vitro* studiji na humanoj ćelijskoj liniji prostate (WPM-Y.1) pokazano je da IMI u niskim koncentracijama izaziva oksidativni stres i lipidnu peroksidaciju (Abdel-Halim i Osman, 2020). Uloga IMI na nastanak oksidativnog stresa zabeležena je i kod akvatičnih organizama, kao što su račići (*Penaeus monodon*) (Butcherine i sar., 2022), krabe (*Eriocheir sinensis*) (Hong i sar., 2020), ribe *Oncorhynchus mykiss* i *Prochilodus lineatus* (Topal i sar., 2017; Vieira i sar., 2018), i dr.

Akutna oralna toksičnost IMI za glodare varira u zavisnosti od vrste i LD₅₀ iznosi od 130 do 2000 mg/kg. Najveća toksičnost i najvažniji simptomi, poput gastrointestinalnih smetnji, tremora i otežanog disanja, javljaju se posle oralnog unošenja IMI. Međutim, štetni efekti ovog insekticida su značajno manji u slučaju udisanja ili kontakta sa kožom, u odnosu na oralno unošenje. IMI nema efekte iritanta, ne nadražuje oči i ne dolazi do oštećenja i iritacije kože (Teodorović i Kaišarević, 2015; Chen i sar., 2021). Akutna toksičnost IMI kod pacova i

LD₅₀ se razlikuju i zavise od načina unošenja u organizam: oralna LD₅₀ je 379-648 mg/kg, dermalna LD₅₀ >5000 mg/kg i inhalaciona LC₅₀ >0,069 mg/L. Miševi su osetljiviji na akutnu oralnu toksičnost imidakloprida u odnosu na pacove, i LD₅₀ iznosi između 130 i 168 mg/kg. Posle akutnog oralnog tretmana imidaklopridom kod pacova i miševa javljaju se klinički simptomi koji su karakteristični za intoksikaciju nikotinom, kao što su smanjena koordinacija, tremor, grčevi i respiratorne smetnje. Isti klinički simptomi su primećeni i kod pacova 4 sata nakon izlaganja IMI putem inhalacije (Solecki, 2001; Tomizawa i Casida, 2005; Tomizawa i Casida, 2009).

Različite ekotoksikološke studije i biomonitoring su pokazali da je IMI opasan po životnu sredinu. Pošto je efikasan u veoma niskim dozama, može se primenjivati u tretmanu zemljišta u niskim koncentracijama, što je mnogo manje od drugih insekticida. Međutim, IMI ima dug poluživot u zemljištu i dobro se rastvara u vodi, tako da omogućava kontinuiranu dostupnost za usvajanje od strane biljaka (Zhang i sar., 2018). Pokazano je da, pored štetnog uticaja na pčele i druge oprašivače, IMI može štetno da deluje i na druge neciljne organizme, a najviše su ugroženi bumbari, leptiri, kao i mnogobrojne vrste beskičmenjaka i kičmenjaka koje žive u zemljištu, kao što su kišne gliste, korisne artropode, sitni glodari koji se hrane žitom, ali i ptice. Takođe, usled dobrog rastvaranja u vodi, u vodenim ekosistemima su ugroženi i bentosni vodeni insekti, kao i druge vrste beskičmenjaka i kičmenjaka. Štetan je za zooplankton i EC₅₀ za dafnije iznosi 85 mg/L, dok je veoma toksičan za organizme dna, npr. za hironomide EC₅₀ iznosi 0,06 mg/L (Teodorović i Kaišarević, 2015; Malhotra i sar., 2021; Siregar i sar., 2021; Schmidt i sar., 2022). IMI je toksičan za ptice, a akutna oralna toksičnost se razlikuje kod različitih vrsta i LD₅₀ iznosi od 30 do 280 mg/kg. Veoma je toksičan za pčele pri direktnom kontaktu i pri vrlo malim koncentracijama, a akutna oralna LD₅₀ iznosi 18 ng/jedinki pčele (Matsuda i sar., 2001; Iwasa i sar., 2004; Tomizawa and Casida, 2009).

Evropska komisija (*European Commission*) je 2013. godine na osnovu istraživanja Evropske agencije za bezbednost hrane (*European Food Safety Authority*, EFSA) donela uredbu za dvogodišnju zabranu primene tri vrste neonikotinoide - IMI, tiametoksama i klotianidina, i u izveštaju objavila da su "potencijalno štetni za pčele kada se koriste na usevima koji privlače oprašivače". Ograničena je njihova upotreba za tretiranje semena, nanošenje u zemlju (granule) i folijarno tretiranje u kulturama kao što su uljana repica, suncokret, kukuruz, soja i pamuk, a koje su privlačne za pčele (Matsuda, 2001; EFSA, 2018). Najveći pomori pčela dešavaju se u periodu cvetanja biljaka, jer se toksične količine insekticida prenose na polen i nektar, što ukazuje da su ovi insekticidi veoma štetni, a to je dovelo do zabrane njihove upotrebe (Underwood i sar., 2017). U istraživanjima je pokazano da IMI značajno doprinosi smanjenju kolonija pčela, a u slučaju da pčele u košnice prenesu zagađen polen i nektar, može se naći i u medu, mleču i drugim proizvodima. Rezultati pokazuju da pčele postaju osetljivije na parazite i patogene usled negativnog efekta neonikotinoide, što dovodi do velikih posledica na opstanak pčelinjeg društva (Johnson, 2015; Orčić i sar., 2017; Kojić i sar., 2019). Takođe, Evropska agencija za bezbednost hrane ističe značaj procene uticaja zagađenja životne sredine na stanje populacije i zdravlje pčela i drugih vrsta beskičmenjaka i kičmenjaka, što uključuje monitoring studije, terenske i laboratorijske testove (Rortais i sar., 2017; Underwood i sar., 2017).

1.4. Slobodni radikali

Kiseonik je ključni element za život na Zemlji jer igra dominantnu ulogu u kontrolisanoj oksidaciji molekula koji sadrže ugljenik, što kasnije dovodi do stvaranja energije koja je neophodna za opstanak svih aerobnih organizama (Sen i sar., 2010). Aerobne ćelije se neprestano sreću sa takozvanim paradoksom kiseonika: sa jedne strane, kiseonik je neophodan za aerobni način života, dok sa druge strane, on može biti visoko toksičan za ćelije (Đuračková, 2014). Ova osobina kiseonika povezana je sa činjenicom da molekularni oblik ima dva nesparena elektrona i slabo je reaktivan, dok svaki atom kiseonika ima jedan nesparesni valentni elektron i veoma je reaktivan. Aerobni metabolizam u ćelijama i najveća potrošnja kiseonika se odvija preko elektron-transportnog lanca u mitohondrijama, a oksidativnom fosforilacijom se stvaraju različiti slobodni radikali, koji su neophodni za normalno funkcionisanje ćelije (Halliwell i Gutteridge, 2007; Tvrdá i Benko, 2020).

Stvaranje slobodnih radikala ili reaktivnih vrsta je neophodno za međućelijske signalne kaskade koje regulišu različite fiziološke funkcije. Slobodni radikali predstavljaju važan deo mnogih bioloških procesa neophodnih za pravilno funkcionisanje organizma. Mogu delovati kao posrednici i regulatori metabolizma, npr. mogu indukovati ćelijsku diferencijaciju, proliferaciju i migraciju, mogu da aktiviraju gene i indukuju apoptozu utičući na sintezu, oslobađanje ili inaktivaciju endotel-produkujućeg relaksirajućeg faktora (engl. *Endothelium-Derived Relaxing Factor*, EDRF). Slobodni radikali mogu da stimulišu transport glukoze u ćelije, ali i da utiču na međućelijski i unutarćelijski prenos signala (Łuszczewski i sar., 2007). Međutim, kada nivo slobodnih radikala postane previše visok zbog prekomerne produkcije, ili zbog sniženog antioksidativnog zaštitnog kapaciteta, dolazi do nastanka oksidativnog stresa. Posledice povećanog oksidativnog stresa, koji dovodi i do promene ravnoteže oksido-redukcionih procesa i redoks senzitivnih signalnih puteva u ćeliji, mogu da budu i jedan od faktora koji vodi ka nastanku brojnih patoloških procesa i oboljenja u organizmu (Halliwell i Gutteridge, 2007; Tvrdá i Benko, 2020).

Slobodni radikal se definiše kao bilo koji atom, molekul ili fragment atoma ili molekula, koji sadrži najmanje jedan nesparesni elektron i ispoljava, u nekoj meri, nezavisno postojanje (Đuračková, 2014). Slobodni radikali mogu da nastanu adicijom elektrona na neutralni atom ili molekul, ili gubitkom jednog elektrona iz neutralnog atoma ili molekula. Mogu da nastanu homolizom kovalentnih veza, što dovodi do stvaranja reaktivnih intermedijera, koji su uglavnom nestabilni i visoko reaktivni. Ovaj proces zahteva energiju kao što je toplota, UV zračenje, ili jonizujuća radijacija. Oni mogu biti ili donori ili akceptori elektrona od drugih molekula, tako da se mogu ponašati kao oksidanti ili kao reduktanti (Đuračková, 2014; Phaniendra i sar., 2015). Slobodni radikali poseduju jedan nesparesni elektron, elektrofilni su i napadaju mesta sa povećanom gustinom elektrona, koja su uglavnom prisutna u jedinjenjima sa atomima azota (proteini i nukleinske kiseline) i dvostrukim vezama ugljenika (fosfolipidi i polinezasićene masne kiseline). Tokom ove razmene elektrona formiraju se novi radikali iz prethodno neradikalnih molekula, odnosno sekundarni slobodni radikali, i može doći do lančanih reakcija, koje dovode do brojnih strukturnih, biohemijskih i funkcionalnih promena biomolekula. U ćelijama, modifikacija molekula sa jednim elektronom može proizvesti slobodne radikale sumpora, kiseonika, ugljenika i azota (Halliwell i Gutteridge, 2007; Tvrdá i Benko, 2020). Reaktivnost slobodnih radikala negativno je korelisana sa njihovim poluživotom. Kada je slobodni radikal kratkoživeći onda je reaktivniji, odnosno nestabilniji (Đukić, 2008).

Najčešći i biološki najvažniji su slobodni radikali kiseonika ili reaktivne vrste kiseonika (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) i slobodni radikali azota ili reaktivne vrste azota (engl. *Reactive Nitrogen Species*, RNS). ROS i RNS se dalje mogu klasifikovati u dve grupe jedinjenja, radikali i neradikali. Radikali su vrste koje sadrže najmanje jedan nespareni valentni elektron: superoksid radikal ($O_2^{\bullet-}$), hidrosil radikal (OH^{\bullet}), peroksil radikal (RO_2^{\bullet}), alkoksil radikal (RO^{\bullet}), hidroperoksil radikal (HO_2^{\bullet}), azot oksid (NO^{\bullet}) i azot dioksid (NO_2^{\bullet}). Neradikalske vrste nisu slobodni radikali same po sebi: vodonik peroksid (H_2O_2), hipohlorasta kiselina ($HOCl$), ozon (O_3), singlet kiseonik (1O_2), azotasta kiselina (HNO_2), azot trioksid (N_2O_3), azot tetraoksid (N_2O_4), nitril jon (NO_2^+), peroksinitrit ($ONOO^-$), peroksiazotna kiselina ($ONOOH$), alkil peroksinitrit ($ROONO$), nitrozil anjon (NO^-), nitrozil katjon (NO^+), nitril hlorid (NO_2Cl), ali lako mogu dovesti do reakcija oksidacije u živim sistemima (Halliwell i Gutteridge, 2007; Tvrdá i Benko, 2020).

Slobodni radikali se u organizmu mogu proizvoditi na različite načine (Đukić, 2008):

1) u fiziološkim uslovima u toku:

- a) oksidativne fosforilacije u mitohondrijama (ćelijsko disanje),
- b) oksido-redukcije u prisustvu metala sa promenljivom valencom (Fe, Cu) i
- c) autooksidacije malih molekula poput dopamina u mozgu;

2) prilikom zapaljenskog procesa – tokom fagocitoze;

3) u raznim bolestima kao što su autoimune, neurodegenerativne, kardiovaskularne i maligne bolesti, u uslovima hipoksije, hiperoksije, ishemije, reperfuzije itd;

4) tokom biotransformacije ksenobiotika (u endoplazmatičnom retikulumu pomoću oksidaza):

- a) u toku metabolizma hrane i lekova, kod izlaganja različitim potencijalno toksičnim jedinjenjima,
- b) pod uticajem spoljnih faktora kao što su UV i jonizujuće zračenje i aerozagađenje;

5) tokom povećane fizičke aktivnosti;

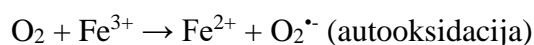
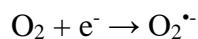
6) prilikom trovanja.

Oksidativna fosforilacija, koja se odigrava u mitohondrijama, predstavlja najznačajniji izvor slobodnih radikala u ćeliji. U mitohondrije sisara dospeva 90% unetog molekuskog kiseonika, gde se u procesu ćelijskog disanja odvija četvoroelektronska redukcija O_2 do H_2O , a energija oslobođena tokom transporta elektrona koristi se za sintezu ATP-a. Zbog slabih veza između elektrona i enzima koji su prenosioci elektrona dolazi do tzv. curenja elektrona i stvaranja radikala. U procesu ćelijskog disanja, 2% molekuskog kiseonika učestvuje u stvaranju radikala, odnosno ne redukuje se u potpunosti do H_2O . Iz ovog razloga se mitohondrijalni respiratorni lanac smatra najznačajnijim izvorom $O_2^{\bullet-}$ (Bondy i Naderi, 1994; Đukić, 2008).

1.4.1. Superoksid radikal ($O_2^{\bullet-}$)

Superoksid radikal ($O_2^{\bullet-}$) nastaje jednoelektronskom redukcijom molekuskog kiseonika (Đukić, 2008). Najčešće se stvara u mitohondrijama posredstvom enzima ksantin oksidaze, lipooksigenaze, ciklooksigenaze, ili NADPH-zavisne oksidaze (Tvrdá i Benko, 2020). Superoksid ne reaguje sa većinom molekula u vodenoj sredini, a njegova reaktivnost sa neradikalnim molekulima zavisi od pH vrednosti. Radikal je jači reduktant nego oksidant. Kao

redukujući agens, $O_2^{\cdot-}$ reaguje sa kompleksima gvožđa, poput citohroma i redukuje Fe^{3+} do Fe^{2+} :



Kao oksidant, $O_2^{\cdot-}$ može da oksiduje jone prelaznih metala poput Cu^+ , Fe^{2+} i Mn^{2+} , zatim dopamin, adrenalin ili askorbat, dovodeći tako do stvaranja vodonik peroksida (Đuračková, 2014). Superoksid radikal reaguje sa drugim superoksid radikalom u reakciji dismutacije, u kojoj se jedan radikal oksiduje do kiseonika dok se drugi redukuje do vodonik peroksida (Tvrdá i Benko, 2020). Primarna toksičnost $O_2^{\cdot-}$ je povezana sa njegovom sposobnošću da pokreće oksidativne lančane reakcije, koje su praćene stvaranjem drugih reaktivnih metabolita poput vodonik peroksida, hidroksil radikala, singlet kiseonika ili peroksinitrita (Halliwell i Gutteridge, 2007; Đuračková, 2014; Phaniendra i sar., 2015).

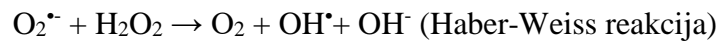
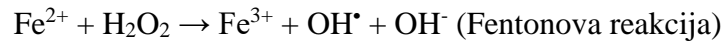
1.4.2. Vodonik peroksid (H_2O_2)

Vodonik peroksid (H_2O_2) je dvoelektronski proizvod redukcije kiseonika, koji može da učestvuje u transdukciji signala, proliferaciji ćelija, diferencijaciji i odgovoru na stres (Đuračková, 2014). Vodonik peroksid prvenstveno nastaje autooksidacijom $O_2^{\cdot-}$, koja može da se odvija enzimskim i neenzimskim putem (Đukić, 2008). Enzimskim putem nastaje u reakciji dismutacije, koju katalizuje enzim superoksid dismutaza (SOD), zatim pod uticajem enzima kao što su glukozo-monoamin i D-oksidaza aminokiselina, ali i tokom oksidacije askorbata i polifenola. Vodonik peroksid nema nesparene elektrone u poslednjoj orbitali i nije radicalske prirode, ali može da dovede do značajnog oštećenja ćelija i pri niskim koncentracijama. Rastvorljiv je u vodi i lako prolazi kroz biomembrane, stoga u biološkim sistemima dopire daleko od mesta produkcije. Pored toga, može direktno oštetiti neke enzime poput gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze (G3PDX) putem oksidacije sulfhidrilne grupe (-SH), vrši oksidaciju DNK, lipida i ketokiselina (Halliwell, 1987; Đukić, 2008; Sen i sar., 2010; Đuračková, 2014; Phaniendra i sar., 2015). Vodonik peroksid ima sposobnost da se akumulira, a glavno mesto produkcije su peroksizomi, u kojima se enzimom katalaza (CAT) neutrališe i time sprečava akumulacija unutar ćelije. U interakciji sa $O_2^{\cdot-}$ ili jonima Cu^+ ili Fe^{2+} nastaje veoma reaktivni OH^{\cdot} radikal (Halliwell i Gutteridge, 2007; Đukić, 2008).

1.4.3. Hidroksil radikal (OH^{\cdot})

Hidroksil radikal (OH^{\cdot}) važi za najpotentniju ROS, i može agresivno reagovati sa organskim i neorganskim molekulima i prouzrokovati ozbiljnije oštećenje ćelije u poređenju sa drugim slobodnim radikalima (Halliwell, 1987; Đuračková, 2014). S obzirom na njegovu visoku reaktivnost, hidroksil radikal stupa u reakciju sa biomolekulima iz svog neposrednog okruženja kao što je DNK (napada purinske i pirimidinske baze, sa guaninom gradi 8-hidroksiguaninski radikal i druge radikale koji su povezani sa nastankom kancera), ili nekim drugim važnim ćelijskim komponentama (Đukić, 2008). Hidroksil radikal nastaje u Fentonovoj reakciji kao rezultat interakcije između H_2O_2 i jona metala (Fe^{2+} ili Cu^+), koji su često povezani u složenim oblicima sa različitim proteinima poput feritina ili ceruloplazmina. U stresnim uslovima, prekomerni $O_2^{\cdot-}$ može da oslobodi ove jone metala iz njihovih kompleksa. Pored

Fentonove reakcije, OH^\bullet može da nastane i u Haber-Weiss reakciji koja se sastoji iz interakcije $\text{O}_2^{\bullet-}$ i H_2O_2 (Tvrdá i Benko, 2020):



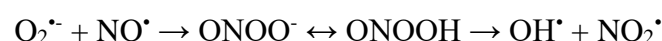
Poznati su i drugi izvori OH^\bullet , kao što su reakcije sa hipohlornom kiselinom, kinonima i semikinonima. Hidroksilni radikali su posebno reaktivni zbog svoje sposobnosti da redukuju disulfidne veze u proteinima, pre svega u fibrinogenu, što rezultira njihovim odvijanjem i ponovnim savijanjem u abnormalne prostorne konfiguracije. Posledice takvih reakcija mogu se prevesti u različite poremećaje kao što su ateroskleroza, rak i neurološke patologije (Lipinski, 2011; Phaniendra i sar., 2015).

1.4.4. Azot oksid (NO^\bullet)

Azot monoksid (NO^\bullet) je bezbojni gas koga sintetišu različite azot oksid sintaze (NOS), dok se L-arginin pretvara u L-citrulin (Tvrdá i Benko, 2020). Sve tri vrste izoformi NOS – neuronalna (nNOS i NOS_1), inducibilna (iNOS i NOS_2) i endotelna NOS (eNOS i NOS_3) su uključene u stvaranje NO^\bullet . Ovaj molekul je rastvorljiv i u vodi i u lipidima, zbog čega je u stanju da lako difunduje kroz ćelijsku membranu i citoplazmu. U fiziološkim uslovima, NO^\bullet je važan unutarćelijski sekundarni glasnik koji učestvuje u održavanju homeostaze, a može nastati i konverzijom nitrita i nitrata u uslovima hipoksije. Ima važnu ulogu u regulaciji ćelijskih redoks stanja i aktivnosti enzima preko nitrozilacije proteina (Koshland, 1992; Wink i Mitchell, 1998). Uključen je u različite biološke procese kao što su: uloga u opuštanju glatkih mišića unutar krvnih sudova i regulacija krvnog pritiska, imunološka regulacija, agregacija trombocita, vazodilatacija pluća, kao i neurotransmisija i odbrambeni mehanizmi (Koshland, 1992). U određenoj meri, NO^\bullet se može smatrati „hvatačem“ slobodnih radikala, iz razloga što stupa u interakciju sa hidroksilnim, peroksilnim ili tiolnim radikalima, što dovodi do stvaranja azotne kiseline, nitrozoperoksila ili nitrozotiola, pri čemu je ovaj poslednji odgovoran za inhibiciju lipidne peroksidacije putem NO^\bullet . Ali, pri visokim koncentracijama, NO^\bullet može učestvovati i u patologiji septičkog šoka, hronične inflamacije, povećanog rizika za onkogenezu, odbacivanje transplantata, astmu, epilepsiju i neurodegenerativne bolesti (Halliwell, 1987).

1.4.5. Peroksinitritni anjon (OONO^-)

Superoksid anjon u endotelnim ćelijama, makrofagama i sinapsozomima u mozgu stupa u reakciju sa NO^\bullet gradeći visoko reaktivno neradikalno jedinjenje – peroksinitrit:



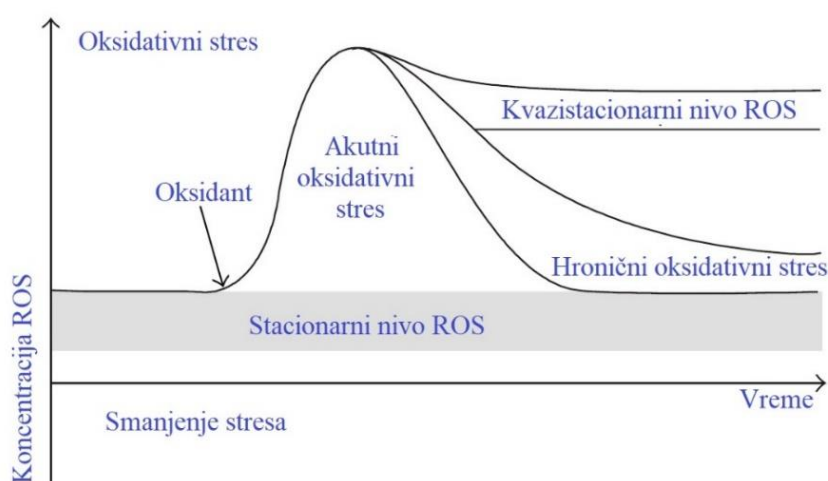
Peroksinitrit je efikasan oksidans tiolnih jedinjenja, a njegovim protonovanjem nastaje peroksiazotna kiselina ($\text{ONO}^\bullet\text{OH}$), koju karakteriše visoka nestabilnost. Produkti degradacije peroksiazotne kiseline su veoma reaktivni radikali OH^\bullet i NO_2^\bullet . Peroksinitrit je duže vreme stabilan i difunduje do ciljnih ćelija gde ispoljava svoju toksičnost (Beckman i sar., 1990;

Stamler i sar., 1992; Đukić, 2008). Peroksinitrit ispoljava širok spektar efekata oštećenja tkiva u rasponu peroksidacije lipida i inaktivacije enzima i jonskih kanala putem proteinske oksidacije i nitracije do inhibicije ćelijskog disanja. Pokazano je takođe da peroksinitrit nitrira i oksiduje adenin, guanin i ksantin nukleozide. Peroksinitrit u niskim koncentracijama izaziva apoptozu, dok pri visokim koncentracijama dovodi do nekroze (Milatovic i sar., 2014). U reakcijama sa metalima u proteinima peroksinitrit dovodi do promena citohroma c, hemoglobina i mioglobina, ali takođe dovodi i do inaktivacije enzima koji su uključeni u metaboličke procese (Halliwell i Gutteridge, 2007).

1.5. Oksidativni stres

ROS i RNS su produkti normalnih metaboličkih procesa u organizmu i imaju važnu ulogu kao signalni molekuli, koji regulišu različite fiziološke procese u ćeliji poput ćelijske signalizacije, metabolizma i regulacije transkripcionih faktora (Bagatini i sar., 2018). Kada je nivo njihovog stvaranja mnogo veći od njihovog uklanjanja tada nastaje oksidativni stres, tj. stanje neravnoteže između reaktivnih vrsta i antioksidativnog zaštitnog sistema (*Antioxidant defence system*, AOS) u smeru stvaranja reaktivnih vrsta. Održavanje redoks stanja u ćelijama je značajno za ćelijsku vijabilnost (Rharass i sar., 2017). Živi organizmi poseduju fino regulisane sisteme za održavanje veoma niskih nivoa ROS, odnosno njihova proizvodnja i eliminacija su dobro izbalansirane, što rezultuje određenim stacionarnim nivoom ROS (Lushchak, 2014). Međutim, pod određenim okolnostima, ova ravnoteža se može poremetiti, i postoji nekoliko razloga za to:

- 1) povećani nivo egzogenih i endogenih jedinjenja, koja ulaze u autooksidaciju zajedno sa proizvodnjom ROS,
- 2) iscrpljivanje rezervi antioksidanata niske molekulske mase,
- 3) inaktivacija antioksidativnih enzima,
- 4) smanjena proizvodnja antioksidativnih enzima i antioksidanata niske molekulske mase,
- 5) kombinacija dva ili više prethodno navedenih faktora.



Slika 12. Dinamika nivoa ROS u biološkim sistemima pod kontrolnim i stresnim uslovima

(preuzeto iz: Lushchak, 2011, i modifikovano)

Povećanje nivoa ROS kao rezultat neravnoteže između procesa njihovog stvaranja i eliminacije, dovodi do nastanka “akutnog oksidativnog stresa”, koji utiče na mnoge biohemijske i fiziološke procese. Posledice ovog povećanja ROS su različite i zavise od nivoa i mesta stvaranja, ali i efikasnosti antioksidativnog sistema (Lushchak, 2014). Ovi procesi su prikazani na Slici 12, gde je demonstrirana indukcija oksidativnog stresa.

U nekim patološkim situacijama ćelija ne može da neutrališe povećanu količinu ROS i vrati ih na početni nivo, čak ni pojačanim delovanjem antioksidanata i odgovarajućih enzima antioksidativne zaštite. Povišen nivo ROS može povećati modifikaciju različitih ćelijskih struktura, kao i redoks potencijal, što u znatnoj meri narušava homeostazu i dovodi do nastanka “hroničnog oksidativnog stresa”, koji ima ulogu u nastanku mnogobrojnih akutnih i hroničnih bolesti (Lushchak, 2011).

1.5.1. Posledice oksidativnog stresa

Tokom oksidativnog stresa slobodni radikali reaguju sa molekulima i dolazi do oksidacije proteina, lipida i nukleinskih kiselina. U tim interakcijama može da dođe do nastanka novih sekundarnih radikala, koji su reaktivniji i dovode do strukturnih i funkcionalnih oštećenja biomolekula, do promena signalne transdukcije, kao i ekspresije gena, a to vodi ka nastanku brojnih patoloških procesa ili smrti ćelije (Halliwell i Gutteridge, 2007; Bagatini i sar., 2018).

Proteini su glavni konstituenti bioloških sistema i imaju važnu ulogu u različitim ćelijskim funkcijama kao što su transdukcija signala, mitoza, ćelijski transportni sistemi, aktivnost šaperona itd. (Singh i sar., 2017). Proteini su glavna meta slobodnih radikala zbog zastupljenosti u ćelijama (preko 70% suve mase većine ćelija) i zbog brze reakcije sa njima i drugim oksidantima (Hawkins i sar., 2009). Visok nivo ROS može da dovede do direktne ili indirektne modifikacije proteina, pri čemu se narušava njihova aktivnost (Davies, 2016). ROS mogu oksidovati aminokiseline cistein i metionin, što dovodi do stvaranja ukrštenih veza ditiola i metionin sulfoksida. Pored toga, reaktivne vrste takođe mogu da dovedu do modifikacije proteina nitracijom tirozina i nitrozacijom aminokiselina sa tiolnom grupom, a to često rezultuje promenom funkcije, ili inhibicijom aktivnosti enzima (Bagatini i sar., 2018). Modifikacija proteina može da dovede do odvijanja molekula proteina i izmenjene konformacije, kao i do promenjene interakcije sa biološkim komponentama. Proteini mogu biti modifikovani direktno kroz nitrozilaciju, karbonilaciju, stvaranje disulfidnih veza i glutationilacije, ili indirektno konjugacijom sa produktima peroksidacije masnih kiselina. Visok nivo ROS može da dovede i do fragmentacije proteina oksidacijom bočnih lanaca ostataka aminokiselina, oksidacijom proteinske okosnice i formiranjem unakrsnih proteinsko-proteinskih veza. U tkivima sa visokim oksidativnim stresom, povećan nivo karbonilovanih proteina se koristi kao marker proteinske oksidacije (Ghosh i sar., 2018). Različite aminokiseline imaju različitu podložnost napadu ROS. Na primer, tiolne grupe, aminokiseline koje sadrže sumpor, kao i ostaci metionina su veoma podložni oksidaciji (Kelly i Mudway, 2003). Konformacione promene, odvijanje i degradacija proteina mogu biti rezultat oksidacije sulfhidrilnih grupa ili metioninskih ostataka proteina. Enzimi koji sadrže metale mogu biti podvrgnuti metal-katalizovanoj oksidaciji, što može dovesti do inaktivacije enzima (Ghosh i sar., 2018).

Kada je povećano stvaranje ROS (iznad homeostatskog opsega) to može izazvati lipidnu peroksidaciju, odnosno oksidativno oštećenje lipida i lipoproteina u membranama

ćelija i subćelijskih organela, kao i molekula koji sadrže lipide. Kao posledica lipidne peroksidacije ćelijske membrane smanjuje se fluidnost i povećava propustljivost za jone, dolazi do inaktivacije receptora i enzima, dok oštećenje membrane lizozoma dovodi do oslobađanja hidrolitičkih enzima, a sve to dovodi do promene strukture i funkcije membrane i utiče na normalno ćelijsko funkcionisanje (Halliwell i Gutteridge, 2007; Ghosh i sar., 2018).

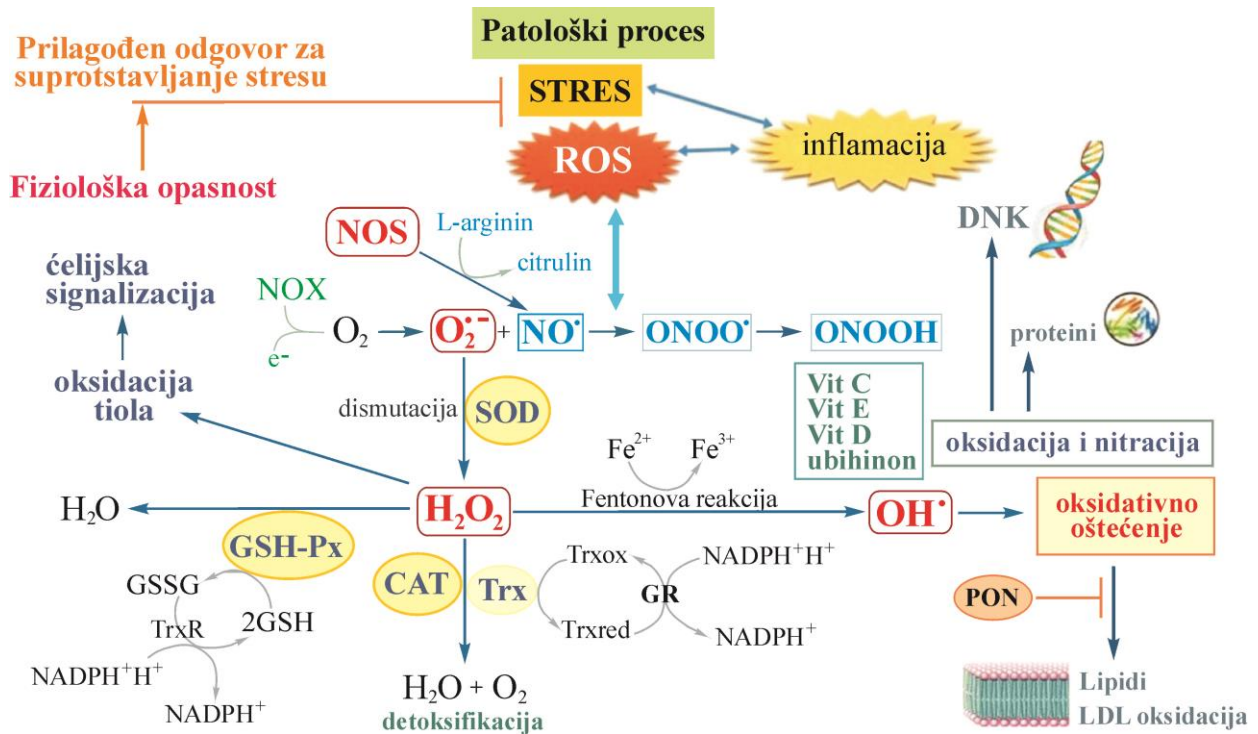
Zbog visoke koncentracije polinezasićenih masnih kiselina (engl. *Polyunsaturated Fatty Acids*, PUFAs) u ćelijama, lipidna peroksidacija je glavni ishod oštećenja izazvanih slobodnim radikalima (Milatovic i sar., 2014). Produkti peroksidacije nezasićenih masnih kiselina kao što su malondialdehid (MDA) i nezasićeni aldehidi, dovode do oštećenja ćelijske membrane i inaktivacije mnogih ćelijskih proteina formiranjem unakrsnih veza (Birben i sar., 2012). Oksidativni stres dodatno je intenziviran produkcijom radikala izvedenih iz lipida, koji mogu međusobno reagovati i oštetiti proteine i DNK (Halliwell i Gutteridge, 2007). Nezasićena dvostruka veza na fosfolipidnim molekulima i estarska veza između glicerola i masne kiseline služe kao uobičajena mesta za oksidaciju izazvanu ROS. Zbog toga su PUFAs fosfolipida membrana naročito osetljive na oksidaciju izazvanu ROS. Neravnoteža u odnosu antioksidant/oksidant može dovesti do peroksidacije mnogih PUFAs što rezultuje cikličnom lančanom reakcijom (Ghosh i sar., 2018).

Reaktivne vrste direktno reaguju sa nukleinskim kiselinama i dovode do oksidativnih oštećenja i strukturnih promena molekula DNK, jer kapaciteti sistema za reparaciju DNK mogu biti premašeni (Bagatini i sar., 2018). Povećani nivo ROS može da dovede do oksidacije dezoksiriboze, do fragmentacije jednog ili oba lanca DNK, brojnih modifikacija u azotnim bazama nukleotida, kao i do unakrsne veze u okviru lanca DNK ili unakrsne veze proteina i DNK. Ova oksidativna oštećenja DNK, koja mogu da budu trenutna ili odložena, dovode do genetskih oštećenja, do grešaka pri replikaciji i genomske nestabilnosti, do grešaka pri translaciji u kodiranim proteinima ili inhibiciji sinteze proteina, zatim do mutacija koje mogu da dovedu do karcinogeneze i starenja ćelija (Halliwell i Gutteridge, 2007; Valko i sar., 2007; Sharma i sar., 2012, Ghosh i sar., 2018). Međutim, svi markeri oksidacije DNK nisu toliko pouzdani u proceni potencijala oksidativnog stresa u ćelijama kao što su to biomarkeri oksidacije proteina i lipida, jer na oštećenje DNK može uticati i nekoliko neoksidativnih faktora, uključujući vrstu, pol, tkivo, ishranu i efikasnost reparacije (Singh i sar., 2017).

1.6. Antioksidativna zaštita

Detoksikacija ROS je neophodna za preživljavanje svih aerobnih oblika života (Madkour i sar., 2020). Izloženost ćelija, tkiva i vanćelijskog matriksa štetnom dejstvu slobodnih radikala izaziva kaskadu reakcija i indukuje aktivaciju više unutrašnjih odbrambenih mehanizama koji obezbeđuju eliminaciju slobodnih radikala i njihovih derivata (Slika 13) (Mirończuk-Chodakowska i sar., 2018; Eddaikra i Eddaikra, 2021). Ovi mehanizmi su:

- 1) Blokiranje proizvodnje slobodnih radikala;
- 2) Uklanjanje oksidanata;
- 3) Pretvaranje toksičnih slobodnih radikala u manje toksične supstance;
- 4) Blokiranje produkcije sekundarnih toksičnih metabolita i medijatora inflamacije;
- 5) Blokiranje lančane propagacije sekundarnih oksidanata;
- 6) Popravljanje oštećenih molekula;
- 7) Inicijacija i pojačavanje endogenog antioksidativnog zaštitnog sistema.



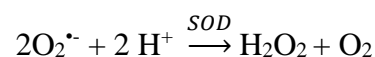
Slika 13. Mehanizmi antioksidativne zaštite

(preuzeto iz: Eddaikra i Eddaikra, 2021, i modifikovano)

Svi ovi mehanizmi zajedno deluju u cilju zaštite organizma od oksidativnog stresa (Adwas i sar., 2019). Antioksidanti su molekuli koji u malim koncentracijama mogu sprečiti ili odložiti oksidaciju supstrata kao što su proteini, lipidi, DNK i RNK (Halliwell, 1990). Antioksidanti su prisutni uglavnom u biljnom svetu, pa je hrana glavni izvor egzogenih antioksidanata čoveka. S druge strane, telo sintetishe endogene antioksidante, koji su esencijalni molekuli za borbu protiv slobodnih radikala. Antioksidanti imaju veliki afinitet vezivanja za slobodne radikale, i značajnu ulogu u održavanju prooksidativno/antioksidativne ravnoteže (Casas-Grajales i Muriel, 2017). Antioksidativna zaštita predstavlja prvu liniju odbrane od oksidativnog stresa. Endogena antioksidativna zaštita uključuje antioksidativne enzime i neenzimske molekule, koji su obično raspoređeni unutar citoplazme i različitih ćelijskih organela (Rahal i sar., 2014). Egzogeni antioksidanti prisutni su u voću, povrću, čaju, kafi, orašastim plodovima i proizvodima od žitarica (Mirończuk-Chodakowska i sar., 2018). Enzimi antioksidativnog sistema su: superoksid-dismutaza (SOD), katalaza (CAT) i enzimi glutation ciklusa (glutation-peroksidaza – GSH-Px, glutation-reduktaza – GR i glutation-S-transferaza – GST) (Halliwell i Gutteridge, 2007).

1.6.1. Superoksid-dismutaza (SOD)

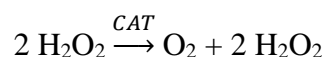
Superoksid dismutaza je metaloprotein koji ima ključnu ulogu u dismutaciji $O_2^{\bullet-}$, i predstavlja jednu od prvih linija odbrane od štetnih efekata ROS koji su nastali u mitohondrijama. U živim sistemima, mogu da reaguju dva $O_2^{\bullet-}$ radikala, ali takođe $O_2^{\bullet-}$ može da reaguje i sa NO^{\bullet} (Birben i sar., 2012; Eddaikra i Eddaikra, 2021). U hemijskoj reakciji dismutacije jedan $O_2^{\bullet-}$ se redukuje do manje reaktivnog molekula H_2O_2 , a drugi $O_2^{\bullet-}$ se oksiduje do molekuskog kiseonika, prema sledećoj reakciji:



SOD je prisutan u svim tkivima, a njegova naročita aktivnost detektovana je u mozgu (Đukić i Tasić, 2008). Kod ljudi su opisane tri izoenzimske forme ovog enzima: citosolna SOD1 (CuZn-SOD), mitohondrijalna SOD2 (Mn-SOD) i ekstracelularna SOD3 (EC-SOD) (Chistiakov sar., 2004; Candas i Li, 2014). Ovi različiti oblici SOD ispoljavaju slične funkcije, ali se razlikuju po osobinama njihovih kvaternih proteinskih struktura, mestu delovanja i lokaciji u ćelijama (Miao i Clair, 2009; Bresciani i sar., 2013). CuZn-SOD se sastoji od homodimera koji sadrži bakar i cink i nalazi se pretežno u intracelularnom prostoru. Mn-SOD postoji u obliku tetramera koji sadrži mangan i nalazi se u mitohondrijama. EC-SOD je tetramer koji sadrži bakar i cink i nalazi se isključivo u ekstracelularnim prostorima (Zelko i sar., 2002; Banks i Andersen, 2019).

1.6.2. Katalaza (CAT)

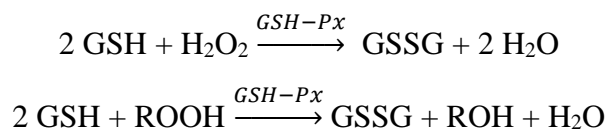
Vodonik peroksid, koji je produkovan delovanjem superoksid dismutaza ili delovanjem oksidaza, poput ksantin oksidaze, redukuje se do vode putem katalaze i glutathion-peroksidaze (Birben i sar., 2012). Katalaza je enzim koji je sačinjen od četiri polipeptidna lanca i sadrži četiri porfirinske hem grupe koje mu omogućavaju da reaguje sa H_2O_2 (Adwas i sar., 2019). U ćeliji je lokalizovan najviše u peroksizomima, gde je važan za uklanjanje H_2O_2 koga stvaraju oksidaze uključene u β -oksidaciju masnih kiselina, proces disanja i katabolizam purina (Vašková i sar., 2012). Reakcija razgradnje H_2O_2 do molekuskog kiseonika i vode je dvostepena i podrazumeva vezivanje dva molekula H_2O_2 za katalazu (Đukić i Tasić, 2008):



Katalaza takođe vezuje NADPH kao redukcionu ekvivalent za sprečavanje oksidativne inaktivacije enzima putem H_2O_2 dok se redukuje do vode (Birben i sar., 2012). Prisutna je i u bakterijskim i u eukariotskim ćelijama. Pošto H_2O_2 deluje kao supstrat za specifičnu reakciju u stvaranju hidroksil radikala, smatra se da je primarna uloga katalaze u ćelijskim antioksidativnim zaštitnim mehanizmima smanjenje akumulacije H_2O_2 . Povišena ekspresija katalaze čini ćelije otpornijim na toksičnost H_2O_2 i oksidativno posredovanim oštećenjima (Adwas i sar., 2019).

1.6.3. Glutathion peroksidaza (GSH-Px)

Glutathion peroksidaze, homotetramerni proteini rastvorljivi u vodi, koji su prisutni na različitim mestima u telu u različitim izoformama, katalizuju redukciju peroksida (-ROOH) uz pomoć redukovanog glutathiona (Sadi i Sadi, 2010). U ovom procesu, H_2O_2 se redukuje do vode, a organski peroksidi se pretvaraju u manje toksičan oblik, alkohole. Aktivnost GSH-Px povezana je sa oksidacijom glutathiona:

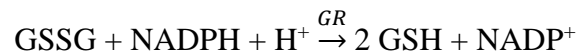


Kod nižih koncentracija H_2O_2 ($<10^{-6}$ mol/L) i normalnih vrednosti GSH, GSH-Px ima ključnu ulogu u detoksikaciji tkiva od H_2O_2 (Đukić i Tasić, 2008). Aktivna mesta glutathion-

peroksidaza sadrže jone selena u obliku selenocisteina i klasifikovani su u 5 izoformi prema njihovoj ekspresiji u različitim tkivima i mestu u ćelijama. Citosolna i mitohondrijalna forma (GSH-Px1) redukuje H₂O₂ i hidroperokside masnih kiselina koristeći GSH. GSH-Px4 se nalazi u membrani i citoplazmi ćelija i direktno redukuje hidroperokside fosfolipida, masnih kiselina i holesterola, koji nastaju usled oksidacije lipoproteina i peroksidacije membrana. GSH-Px1 i GSH-Px4 su prisutni i funkcionišu kao antioksidativni enzimi u većini tkiva. Jetra, bubreg i eritrociti pretežno sadrže GSH-Px1, dok epitelne ćelije bubrega i testisi pokazuju pojačanu ekspresiju enzima GSH-Px4. Druge dve izoforme, GSH-Px2 i GSH-Px3 eksprimirane su u gastrointestinalnom traktu i bubrezima. GSH-Px5 izražena je u epididimisu i utvrđeno je da je nezavisna od selena (Sadi i Sadi, 2010).

1.6.4. Glutation reduktaza (GR)

Glutation reduktaza katalizuje reakciju redukcije oksidovanog glutationa (GSSG) u redukovani glutation (GSH) u prisustvu koenzima NADPH:



Ovaj enzim omogućava ćeliji da održi odgovarajući nivo ćelijskog GSH. Glutation reduktaza je flavoprotein koji sadrži dva FAD molekula kao prostetičnu grupu, koja se može redukovati pomoću NADPH. GR je jedan od termostabilnih enzima i pripada sistemu antioksidativne zaštite koji štiti organizam od hemijskog i oksidativnog stresa. Nedostatak GR se karakteriše hemolizom zbog povećane propustljivosti membrana eritrocita za H₂O₂ i doprinosi nastanku oksidativnog stresa. Aktivnost GR odražava fiziološke potrebe ćelije, naročito u oksidativnom stresu (Đukić i Tasić, 2008; Adwas i sar., 2019).

1.6.5. Glutation-S-transferaza (GST)

Glutation-S-transferaze su dimerni multifunkcionalni enzimi koji sadrže dve polipeptidne subjedinice i imaju ključnu ulogu u ćelijskoj detoksikaciji (Sadi i Sadi, 2010). U procesu detoksikacije, GST katalizuje reakciju konjugacije GSH sa elektrofilnim i hidrofobnim jedinjenjima koja mogu biti endogenog porekla, kao što su proizvodi oksidativno modifikovane DNK, lipidni hidroperoksidi i proizvodi terminalne faze lipidne peroksidacije, ali i egzogenog porekla poput kancerogena, antikancerogenih lekova, pesticida i drugih ksenobiotika (Alin i sar., 1985; Beutler i Eaton, 1992). U ćelijama, pored selen-zavisne neutralizacije H₂O₂ pomoću GSH-Px, neke izoforme GST takođe imaju seleno-samostalnu peroksidaznu aktivnost na organskim hidroksiperoksidazama. Kod svih eukariota postoji više različitih izoformi GST prisutnih u citoplazmi i u membranskim organelama sa različitim specifičnostima supstrata i katalitičkim funkcijama. Glutation-S-transferaze sisara su kategorisane u najmanje 7 izoformi. Alfa, mi i pi (α, μ i π) klasa enzima je najrasprostranjenija kod sisara, a nivoi ovih formi se često povećavaju izlaganjem ksenobioticima. Sigma forma (σ) ima ulogu u sintezi prostaglandina (Jowsey i sar., 2001). Teta, pi i tau (θ, π i τ) imaju peroksidaznu aktivnost u redukciji organskih hidroperoksida masnih kiselina do odgovarajućih alkohola.

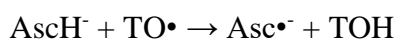
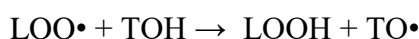
1.6.6. Glutacion

Glutacion je tripeptid po strukturi, sačinjen od tri aminokiseline: glicina, cisteina i glutaminske kiseline, i prisutan je u svim biljnim i životinjskim ćelijama. U fiziološkim uslovima sintetišu ga različita tkiva, ali najintenzivnija sinteza se vrši u hepatocitima. Glutacion je u ćelijama prisutan u dva redoks oblika, kao redukovani (GSH) i oksidovani (GSSG) glutacion. U životinjskim ćelijama odnos GSH/GSSG je glavni parametar oksidativnog stresa i redoks statusa organizma. U fiziološkim uslovima, GSH (tiolna forma) čini do 98% ukupnog pula glutaciona u ćeliji, a ostatak je GSSG (disulfidna forma). Zbog višestruke uloge koju GSH ima u antioksidativnoj zaštiti, veoma je važno održavanje optimalnog fiziološkog odnosa GSH/GSSG. Odnos GSH/GSSG se smanjuje u stanju oksidativnog stresa, nakon povećane fizičke aktivnosti, sa starenjem, a ima i značajnu ulogu u etiologiji neurodegenerativnih bolesti (Valko i sar., 2007; Mirończuk-Chodakowska i sar., 2018; Eddaikra i Eddaikra, 2021).

Glutacion je glavni i najzastupljeniji hidrosolubilni antioksidant, koji je u visokim koncentracijama (1-10 mM) prisutan u citoplazmi, jedru i mitohondrijama. Glutacion u svom redukovanom obliku učestvuje u nekoliko nivoa odbrane od ROS/RNS. Antioksidativna uloga GSH je usmerena na direktno uklanjanje (kao "čistač") reaktivnih vrsta, kao što su $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$, H_2O_2 i organski radikali ($\cdot RO$). Zbog prisustva tiolne grupe (-SH) u molekulu i reverzibilne oksidacije, glutacion ima sposobnost zaštite drugih tiolnih grupa u proteinima od oksidativnog oštećenja. Glutacion je kofaktor za enzime GSH-Px (uklanja H_2O_2 i druge perokside) i GST (nastaju manje reaktivni konjugati GSH koji omogućavaju ekskreciju ksenobiotika i detoksikaciju). Takođe, GSH kao donor elektrona ima ulogu u regeneraciji drugih neenzimskih antioksidanata, vitamina C i E, u njihove aktivne oblike (Halliwell i Gutteridge, 2007; Valko i sar., 2007; Mirończuk-Chodakowska i sar., 2018). Pored toga, štiti ćelije od apoptoze interakcijom sa proapoptotskim i antiapoptotskim signalnim putevima, a takođe može da reguliše i aktivira nekoliko transkripcionih faktora kao što su AP-1, NF- κ B i Sp-1 (Birben i sar., 2012).

1.6.7. Vitamin C (Askorbinska kiselina)

Vitamin C je snažan redukujući agens, hidrosolubilna je i ima brojne biološke funkcije. Uključen je u prvu liniju antioksidativne odbrane, štiti fosfolipide i proteine ćelijskih membrana od oksidativnog oštećenja, kao kofaktor može da donira elektrone u različitim neenzimskim i enzimskim reakcijama, učestvuje u signalingu, u regulaciji diferencijacije i rasta ćelije, u jačanju funkcije imunog sistema, u resorpciji nehemskog gvožđa, sintezi holesterola itd. (Pehlivan, 2017). Vitamin C kao antioksidant direktno uklanja reaktivne vrste kiseonika kao što su $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , OH^{\cdot} , 1O_2 i LOOH, i ima veliki značaj u zaštiti ćelije od oksidativnog oštećenja. Takođe, vitamin C reaguje i sa drugim antioksidantima, kao što su glutacion, vitamin E i koenzim Q. Efikasan je kao donor elektrona u reakciji regeneracije vitamina E (α -tokoferola) iz α -tokoferol radikala (TO^{\cdot}):



U oksido-redukcionim reakcijama, tokom uklanjanja slobodnih radikala, vitamin C se oksiduje u dehidroaskorbinsku kiselinu (DAsA), a redukcijom DAsA može ponovo da nastane askorbinska kiselina dejstvom enzima glutacion-zavisne dehidroaskorbat reduktaze. U ovoj reakciji dva molekula GSH se oksiduju do GSSG. Međutim, visoke koncentracije vitamina C

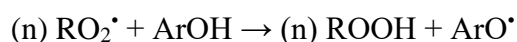
moгу da ispolje i prooksidativne efekte u prisustvu metalnih jona Cu^{2+} ili Fe^{3+} (Athar i sar., 2008; Gill i Tuteja, 2010; Pehlivan, 2017).

1.6.8. Fenolna jedinjenja

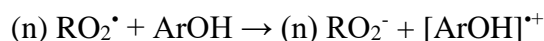
Fenolna jedinjenja imaju aromatični prsten sa jednom ili više hidroksilnih grupa. To su sekundarni metaboliti koji potiču iz pentozno-fosfatnog, šikimatnog ili fenilpropanoidnog puta u biljkama. Široko su rasprostranjeni u biljnom carstvu, od jednostavnih fenolnih kiselina do složenih materija kao što su tanini. Nalaze se uglavnom u svim delovima biljaka, uključujući vegetativne organe, kao i u cvetovima, plodovima, cvastima itd. Polovina ovih fenolnih bioaktivnih jedinjenja su flavonoidi (Shrinet i sar., 2021).

Fenolna jedinjenja mogu delovati kao antioksidanti na više načina. Fenolne hidroksilne grupe su dobri donori vodonika, a antioksidanti koji su donori vodonika mogu reagovati sa reaktivnim vrstama kiseonika i azota i prekinuti ciklus stvaranja novih radikala. Interakcija hidroksilnih grupa fenola sa π -elektronima benzenovog prstena daje molekulima posebna svojstva, a posebno sposobnost stvaranja slobodnih radikala koji su stabilizovani delokalizacijom. Formiranje ovih relativno dugoživećih radikala može da modifikuje radikalima izazvane procese oksidacije. Antioksidativni kapacitet fenolnih jedinjenja takođe se pripisuje njihovoj sposobnosti da heliraju jone metala uključene u proizvodnju slobodnih radikala (Pereira i sar., 2009). Fenolna jedinjenja često imaju snažne interakcije sa proteinima zbog njihovih hidrofobnih benzenoidnih prstenova i potencijala fenolnih hidroksilnih grupa da vežu vodonik. Fenolna jedinjenja deluju kao antioksidanti zahvaljujući svojoj sposobnosti da inhibiraju neke enzime uključene u produkciju slobodnih radikala, poput različitih izoformi CYP, lipooksigenaza, ciklooksigenaze i ksantin oksidaze (Cos i sar., 1998; Parr i Bolwell, 2000).

Fenolna jedinjenja kao primarni antioksidanti deluju preko dva mehanizma: transfer vodonikovog atoma (engl. *hydrogen-atom transfer*-HAT) i transfer elektrona (engl. *single-electron transfer*-SET). HAT mehanizam odigrava se kada antioksidativno jedinjenje hvata slobodne radikale doniranjem vodonikovih atoma:



Radikal koji nastaje tokom ove reakcije je stabilniji od RO_2^{\bullet} . SET mehanizam odigrava se u slučajevima kada antioksidant prenosi jedan elektron kako bi pomogao u smanjenju potencijalnih ciljnih jedinjenja (Amarowicz i Pegg, 2019):



Fenolna jedinjenja su primarno kategorisana u nekoliko klasa koje uključuju fenolne kiseline, flavonoide, tanine, stilbene i lignine (Shrinet i sar., 2021).

Fenolne kiseline su klasa fenolnih jedinjenja koja se nalaze u voću i povrću i mogu da se podele u dve grupe: jedinjenja izvedena iz hidroksibenzojeve kiseline i jedinjenja izvedena iz hidroksicimetne kiseline. Fenolna jedinjenja izvedena iz hidroksibenzojeve kiseline karakteriše jedna karboksilna grupa, a njeni najčešći derivati su *p*-hidroksibenzojeva, galna, protokatehinska i vanilinska kiselina. Jedinjenja izvedena iz hidroksicimetne kiseline karakterišu dva ugljenikova skeleta sa najmanje jednim vodonikovim molekulom koji može da

bude zamenjen hidroksilnom grupom. Među njima su najzastupljenije *p*-hidroksicimetna, *p*-kumarinska, kafeinska i ferulinska kiselina (de Araújo i sar., 2021).

Flavonoidi su najveća grupa fenolnih jedinjenja i široko su rasprostranjeni u biljkama, posebno u voću. Njihove strukture se sastoje iz dva aromatična prstena, koja su povezana zajedno sa mostom od tri ugljenikova atoma koji formiraju oksigenisani heterocikl. Njihove biološke aktivnosti, uključujući antioksidativnu aktivnost, zavise značajno od strukturnih razlika i obrazaca glikozilacije (Mrduljaš i sar., 2017). Studije o derivatima flavonoida su pokazale širok spektar antibakterijske, antiinflamatorne, antikancerogene i antialergijske aktivnosti.

Antioksidativno svojstvo flavonoida je bio prvi proučavani mehanizam delovanja u pogledu njihovog zaštitnog dejstva protiv kardiovaskularnih bolesti. Pokazano je da flavonoidi efikasno uklanjaju većinu slobodnih radikala koji uzrokuju oksidativna oštećenja i nastanak različitih bolesti. Antioksidativni mehanizam uključuje smanjenje stvaranja ROS inhibiranjem enzima, helacijom mikroelemenata koji su uključeni u produkciju slobodnih radikala, hvatanjem reaktivnih vrsta, up-regulacijom i zaštitom antioksidativne odbrane. Više od 4000 flavonoida je identifikovano, i mogu se podeliti na halkone, antocijanine, flavone, izoflavone, flavanone, flavonole i flavanole (Nunes i sar., 2012).

Antioksidativno delovanje fenolnih kiselina zavisi od broja i položaja hidroksilnih grupa u odnosu na karboksilnu grupu, i raste sa povećanjem stepena hidroksilacije. Hidroksicimetne kiseline pokazuju veću antioksidativnu aktivnost jer sadrže -COOH grupu u rezonanciji sa -CH grupom, što omogućava veću sposobnost doniranja protona i sposobnost stabilizacije radikala u poređenju sa hidroksibenzojevom kiselinom (Shrinet i sar., 2021).

1.7. Imela, *Viscum album* L.

Rod *Viscum* obuhvata od 70 do 120 vrsta koje naseljavaju tropske i suptropske regione Afrike, Madagaskara, Azije i Australije, kao i zone umereno-kontinentalne i umereno-maritimne klime Evrope, Azije i južne Afrike. Sve vrste roda *Viscum* rastu u vidu grma, a vodu, kao i hranljive materije, dobijaju putem organa haustorijuma, koji pričvršćuje parazita za domaćina i stvara provodni most ksilem-ksilem/ksilem-floem između obe biljke (Maul i sar., 2019; Krasylenko i sar., 2020). Vrste roda *Viscum* zadržavaju u većoj ili manjoj meri sposobnost vršenja fotosinteze. Listovi su veliki i kožasti ili ljuskasti, cvetovi jednopolni, složeni u zbijene sedeće cvasti, a plodovi okrugle bobice (Diklić, 1972; Maul i sar., 2019). Rod je zastupljen u Evropi sa dve vrste, od kojih se jedna javlja u Srbiji – *Viscum album* L. (bela imela) (Diklić, 1972).

Bela (evropska) imela, *Viscum album* L. (Slika 14) je višegodišnja zimzelena biljna vrsta koja je rasprostranjena širom Evrope, u Aziji i na bliskom istoku (zapadni Iran). Ova vrsta ima žbunastu životnu formu i dostiže prečnik i do 1 m. *V. album* je poluparazitska vrsta na različitim drvenastim biljkama, kako na listopadnim, tako i na četinarskim vrstama. Veoma često se može videti na hrastu, crnoj topoli, kestenu, ali i jabuci, kruški, a nešto ređe na boru i omorici. Studija Barney i sar. (1998) je pokazala da u prirodnim uslovima 384 biljne vrste mogu biti domaćini za *V. album*.

V. album ima duguljaste i uske listove koji su jezičastog oblika, tvrdi i kožasti, zimzeleni i naspramno postavljeni. To je dvodoma biljka, koja cveta u periodu od februara do maja i oprašuje se insektima. Ženski i muški cvetovi su neupadljive žućkastozelene boje. Plod je bobica, veličine zrna graška, u početku zelene boje, kasnije bele do žućkaste, sa sluzavim

tkivom i 1-2 semena. Bele bobice raznosi veliki broj ptica, koje se uglavnom njima hrane. Posebno svojstvo bobice imele je sluzava supstanca viscin, koja se snažno može zalepiti za koru domaćina (Diklić, 1972; Kahle-Zuber, Doris, 2008; Ćebović, 2008). Taksonomska pripadnost vrste *Viscum album* L. data je u Tabeli 1.



Slika 14. Evropska imela (*Viscum album* L.)

(preuzeto sa: <https://pixels.com/featured/european-mistletoe-common-mistletoe-viscum-album-bildagentur-online.html>)

Tabela 1. Sistematika biljne vrste *Viscum album* L.

Carstvo (Regnum)	Plantae
Klasa (Classis)	Magnoliopsida
Red (Ordo)	Santalales
Porodica (Familia)	Santalaceae
Rod (Genus)	<i>Viscum</i>
Vrsta (Species)	<i>Viscum album</i> L.

Vrsta *V. album* je široko poznata kao lekovita biljka koja ima dugu istoriju korišćenja. Upotreba ove vrste kao leka datira još od drevnog keltskog naroda. Prema Gaju Pliniju ova biljka se smatrala protivotrovom i postala “pravo čudo” zahvaljujući sposobnosti da “izleči svaku bolest”. Infuzija imele tradicionalno je korišćena kao lek kod visokog krvnog pritiska, vrtoglavice i osipa. U periodu od 23. do 79. godine pre nove ere Plinije je objasnio delotvorno dejstvo imele kod lečenja neplodnosti, čireva i epilepsije. Tokom 18. veka, imela se primenjivala kod slabosti srca i edema. Kasnije se koristila za lečenje grčeva, urinarnih poremećaja, srčanih oboljenja, delirijuma, histerije, neuralgije, nervnog oštećenja i mnogih drugih tegoba proizašlih iz oslabljenog i poremećenog stanja nervnog sistema. Rudolf Štajner, osnivač antropozofije, preporučio je imelu za lečenje raka na osnovu zapažanja da je imela, poput raka, parazitska i letalna za domaćina, a švajcarske i nemačke klinike koje su osnovane sa ciljem da sprovedu ovu ideju i dalje aktivno koriste preparat imele. Štajner i Ita Vegman smatrali su da bi se aktivni terapijski sastojak trebalo ekstrahovati u dve sezone (leto i zima) da bi se dobilo efikasnije terapijsko dejstvo, uzimajući u obzir odbrambeni sistem biljke i sintezu različitih supstanci tokom godine (Singh i sar., 2016; Valle i sar., 2021). Prva naučna publikacija o lekovitosti imele datira iz 1933. godine (Kaelin, 1933). Uprkos jakoj istorijskoj

pozadini kod upotrebe imele, naučna zajednica je u 19. veku odbacila imelu kao lek, a interesovanje se ponovo pobudilo u 20. veku, kada je Gaultier pokazao oralnu i potkožnu primenu svežeg ekstrakta *V. album* za lečenje problema vezanih za poremećaj krvnog pritiska kod životinja i čoveka (Singh i sar., 2016). Takođe, *V. album* je često primenjivana i u drugim delovima sveta. U Japanu se ova vrsta koristila za lečenje hipertenzije, spazma srca, reumatskog bola, kao i kod lečenja promrzlina. U Indiji, čajevi pripremani od listova imele koristili su se za lečenje dijabetesa. U Africi, vrste roda *Viscum* bile su lek za stomadne tegobe. U tradicionalnoj medicini Egipta ova biljka je korišćena za lečenje epilepsije, arterioskleroze i bolesti arterija srca i kao hipotenziv (Bussing, 2000; Lev i sar., 2011; Committee on Herbal Medicinal Products, 2012).

1.7.1. Hemijski profil *Viscum album* L.

Veliki broj metabolita izolovanih iz bele imele obuhvataju: hetero-dimerne glikoproteine, polisaharide, lektine, amine, triterpene, viskotoksine, alkaloidne, lipide, peptide, ciklitole i flavonoide. Sintaza pojedinih alkaloida, kao i nekih drugih jedinjenja koja su prethodno navedena, ne dešava se isključivo u biljnim organima *V. album*, već ih ova biljka preuzima od domaćina (Singh i sar., 2016).

Velika, heterogena grupa jedinjenja prisutnih u *V. album* su **lektini**, koji imaju sposobnost specifičnog i reverzibilnog vezivanja šećera i složenih ugljenih hidrata (ML-I, ML-II i ML-III). Nalaze se pretežno u izdancima i haustorijumu imele (Felenda i sar., 2019). Lektini se klasifikuju kao tip II ribozom-inaktivirajućih proteina, koji se sastoje od dva peptidna lanca, A-lanca koji se sastoji od tri različita domena i B-lanca sa dva domena sličnih konfiguracija. Lanci su povezani disulfidnim mostom. Lanac A inhibira sintezu proteina razgradnjom 28S rRNA u ribozomima eukariotskih ćelija i takođe ubrzava apoptozu, dok lanac B ima sposobnost vezivanja za receptore koji se nalaze na ćelijskoj površini, što omogućava proteinu da uđe u ćeliju (Kienle i Kiene, 2010; Nazaruk i Orlikowski, 2015; Singh i sar., 2016). ML-I, koji je još poznat kao viskumin, ima svojstvo specifičnog vezivanja D-galaktoze i našao je široku primenu u onkologiji i imunologiji zbog svojih imunomodulatornih i citotoksičnih osobina (Čebović, 2008).

Viskotoksini su amfipatični polipeptidi sa 46 aminokiselinskih ostataka, i sadrže 3 ili 4 disulfidna mosta. U zavisnosti od sekvence aminokiselina, postoji 6 izomernih jedinjenja: A2, A3 i B (viskotoksini) i A1, 1-PS i produkt njegove transformacije U-PS. Najveće koncentracije viskotoksina prisutne su u listovima *V. album* (Felenda i sar., 2019), a sastav i struktura ovih jedinjenja varira u zavisnosti od biljke domaćina (Nazaruk i Orlikowski, 2015). Istraživanjem 3D strukture viskotoksina dobijene su informacije o specifičnom mestu za vezivanje fosfata, a takođe se pretpostavlja da mesto za vezivanje fosfata i amfipatična struktura viskotoksina doprinose citotoksičnosti u eukariotskim ćelijama, čime se menja integritet ćelijske membrane. Pored njihove visoke strukturne homologije, biološki efekti viskotoksina mogu varirati u zavisnosti od njihovih različitih izoformi. Viskotoksini pokazuju visoku strukturnu i farmakološku povezanost sa zmijskim (kobrinim) kardiotoxinima (Singh i sar., 2016).

Ugljeni hidrati imele uključuju oligo- i polisaharide. Različiti tipovi polisaharida su identifikovani u bobicama u odnosu na listove. Visoko metilovani homogalakturonan, pektin, i arabinogalaktan su karakteristični za listove i izdanke, dok su bobice bogate ramnogalakturonanima, arabinogalaktanima i malim količinama ksiloglukana. Sadržaj polisaharida varira od vrste domaćina. Na primer, inozitol (58%) je identifikovan u ranoj fazi lipe, dok je u kasnijoj galaktoza bila dominantan polisaharid (44%). Iako nije pokazan efekat izolovanih polisaharida imele, kao kod izolovanih lektina i viskotoksina, ne isključuje se njihov efekat u

kompletnom ekstraktu, kao posledica različitih tipova međusobnih interakcija komponenti (Singh i sar., 2016; Tišma, 2016).

Terpenoidi predstavljaju klasu jedinjenja koja su zastupljena u *V. album*, naročito u njenim listovima (Ćebović, 2008). *V. album* je bogata triterpenima: β -amirin acetat, oleanolna kiselina, betulinska kiselina, i smešom fitosterola (stigmasterol i β -sitosterol) i njihovih glikozida. Triterpeni predstavljaju značajnu grupu jedinjenja sa dokazanim antikancerogenim dejstvom (Nazaruk i Orlikowski, 2015).

Fenolna jedinjenja (fenolne kiseline, flavonoidi i fenilpropanoidi) predstavljaju jednu od najzastupljenijih klasa supstanci prisutnih kod biljaka, sa značajnom zastupljenošću kod *V. album* (Urech i Baumgartner, 2015). Koncentracije fenolnih kiselina i fenilpropanoida kod *V. album* su pod značajnim uticajem biljke domaćina. Fenolne kiseline, uključujući protokatehinsku, p-hidroksibenzojevu, kafeinsku, salicilnu, ferulinsku i sinapinsku kiselinu, su prisutne u slobodnom obliku ili su vezane u vidu estara ili glikozida (Nazaruk i Orlikowski, 2015). Vicaş i sar. (2011) su ispitivali sadržaj fenolnih jedinjenja kod imele sa različitih domaćina u tri različita perioda i utvrdili su da se značajne razlike u sadržaju fenolnih jedinjenja javljaju i u zavisnosti od vremena (sezone) sakupljanja (uzorkovanja). Takođe je pokazano da je sadržaj fenolnih jedinjenja veći u vodenim ekstraktima u odnosu na etanolne. Fenilpropanoidi izolovani iz listova i izdanaka uključivali su koniferin, siringin, koniferil alkohol i siringenin 4-*O*- β -D-apiozil(1 \rightarrow 2)- β -D-glukozid, eleuterozid E i siringarezinol-*O*-glukozid (Nazaruk i Orlikowski, 2015). Da se u listovima imele nalaze brojni flavonoidi ustanovili su još Becker i Exner (1980), koji su utvrdili postojanje kvercetina, kao i njegovih 7 derivata. U epikutikularnom vosku (na spoljašnjoj strani lista) različitih podvrsta imele detektovani su kvercetin, kempferol i njihovi mono-, di- i trimetiletri (Haas, 2003).

1.8. Biološka aktivnost i mehanizam delovanja *Viscum album*

1.8.1. Antitumorsko i imunomodulatorno delovanje

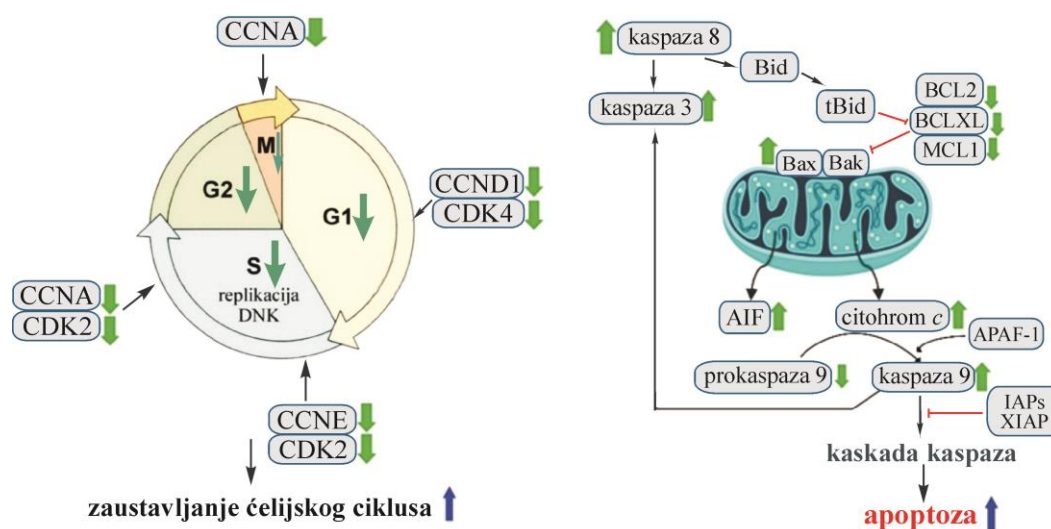
Brojne naučne studije su pokazale da ekstrakti imele ispoljavaju različite biološke efekte uključujući antioksidativni, antidijabetski, antiinflamatorni, imunostimulativni i antihipertenzivni efekat (Suveren i sar., 2017).

Najveći broj istraživanja imele je vezan za antikancerogeno delovanje. Još od 1917. godine preparati imele se primenjuju u terapiji kancera i danas su najčešće korišćeni lek u komplementarnoj medicini u lečenju tumora (Felenda i sar., 2019). Na tržištu se nalaze brojni preparati imele kao što su Iscador, Helixor, Eurixor, Isorel i ABNOBA viscum. U brojnim studijama pokazano je da terapija imelom poboljšava kvalitet života, produžava život, smanjuje neželjene efekte konvencionalnih terapija (radioterapije i hemoterapije) i dovodi do regresije tumora (Khil i sar., 2007; Kienle i Kiene, 2010). Naučnici i lekari su ukazali na značajne korisne efekte terapijom ekstrakta imele i njenih izolovanih komponenti. Ranija istraživanja pokazala su da lektini izolovani iz imele indukuju apoptozu kod različitih tumorskih ćelija (Janssen i sar., 1993; Hostanska i sar., 1996; Büssing i Schietzel, 1999). Khil i sar. (2007) su pokazali da lektini iz imele dovode do apoptoze ćelija kancera kolona u uslovima *in vitro* i *in vivo* putem aktivacije kaspaza i inhibicije antiapoptotskih proteina. Schaller i sar. (1996) su ispitivali potencijalnu citotoksičnost šest izolovanih viskotoksina na ćelije Yoshida sarkoma i zaključili da postoje razlike u njihovoj citotoksičnosti, koje potiču iz njihovog kvalitativnog i kvantitativnog sastava. Kasnije je ustanovljeno da pored lektina i viskotoksina i druge aktivne

komponente imele imaju antikancerogena svojstva. Delebinski i sar. (2015) su ustanovili da triterpenske kiseline imaju ulogu u indukovanju apoptoze u ćelijskoj liniji humane akutne mijeloidne leukemije. Melo i sar. (2018), međutim, smatraju da bi fenolna jedinjenja identifikovana u imeli, koja uključuju hlorogensku i kafeinsku kiselinu, mogla takođe doprineti antiproliferativnim i antiapoptotskim efektima tinktura *V. album*.

Ispitivanja preparata imele i izolovanih jedinjenja iz ekstrakata *V. album* (poput lektina i viskotoksina) ukazala su na snažniji antiproliferativni efekat kompletnog ekstrakta u odnosu na pojedinačna jedinjenja, najverovatnije usled njihovog sinergističkog dejstva (Twardziok i sar., 2016; Kleinsimon i sar., 2017; Felenda i sar., 2019). Ekstrakti, kao i njihove izolovane komponente, utiču na imuni sistem, što je od velike važnosti u tretmanu lečenja kancera. Stoga postoji mogućnost da u budućnosti imunoterapija zameni konvencionalnu (Nazaruk i Orlikowski, 2015). Smatra se da je antikancerogeno delovanje imele povezano sa imunomodulatornom aktivnošću kao što su povećanje sazrevanja i aktivacije dendritskih ćelija, povećanje leukocita, eozinofila i granulocita, sekrecije citokina, kao i povećanje aktivnosti NK ćelija (Tabiasco i sar., 2002; Huber, 2005; Elluru i sar., 2008; Huber, 2011; Steinborn i sar., 2017; Oei i sar., 2019). Preparati imele mogu da doprinesu pojačavanju humoralnog i ćelijskog odgovora kod pacijenata koji boluju od raka, putem uticaja na poboljšanje stanja imunoloških parametara u krvi (Gardin, 2009).

Mehanizam antikancerogenog delovanja imele prikazan je na Slici 15. Imela deluje preko dva signalna puta – PI3K/AKT i MAPK. PI3K/AKT put je odgovoran za rast i opstanak kancernih ćelija. *V. album* izaziva apoptozu inhibicijom fosforilacije AKT. MAPK put je posredovan preko ERK, p38 i JNK. Imela pojačava aktivaciju p38 i JNK1 i smanjuje ERK, što dovodi do apoptoze i zaustavljanja ćelijskog ciklusa tumorskih ćelija. Pored toga, snižava “down”-regulacijom cikline (CCND1, CCNE i CCNA) i ciklin-zavisne proteinske kinaze (CDK4, CDK2), inhibišući ćelijski ciklus. *V. album* “up”-reguliše proapoptotske proteine (Bax) i “down”-reguliše inhibitore apoptoze (IAPs) poput BCL2, BCL2L1, MCL1 i XIAP. Na kraju, dolazi i do oslobađanja citohroma *c* i do pokretanja kaspaza, što rezultuje apoptozom (Szurpnicka i sar., 2020).



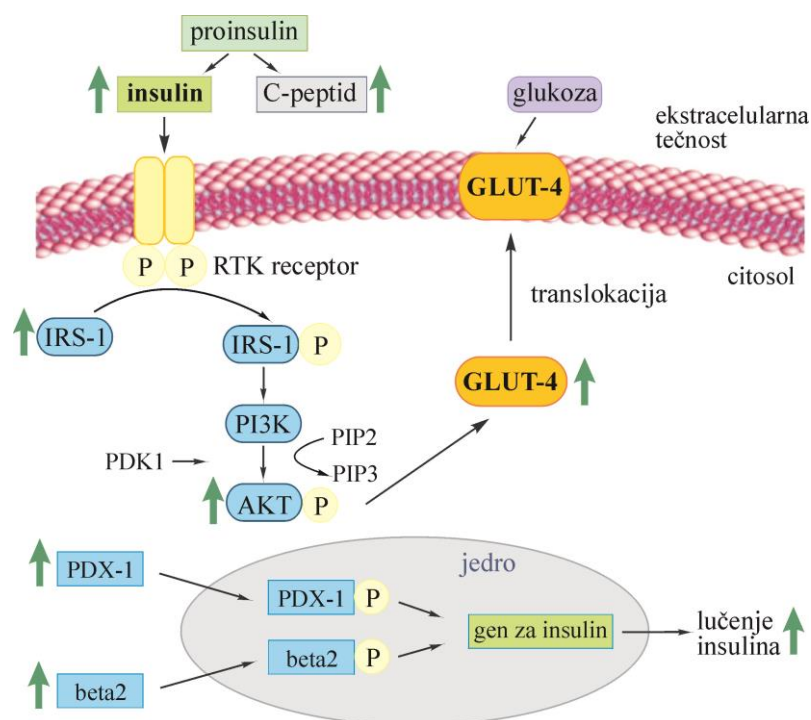
Slika 15. Mehanizam antitumorskog delovanja *V. album*

(preuzeto iz: Szurpnicka i sar., 2020, i modifikovano)

1.8.2. Hipoglikemijsko i hipolipidemijsko delovanje *Viscum album*

Tradicionalna upotreba *V. album* kao antidijabetskog leka potvrđena je u brojnim *in vitro* i *in vivo* studijama. Gray i Flatt (1999) su utvrdili da vodeni ekstrakt imele ima stimulatívni efekat na sekreciju insulina iz klonalnih B-ćelija, i da je porast dozno-zavisan. Pored toga, ustanovili su da temperatura ekstrakta ne utiče na sekreciju insulina, a kako lektina nema u zagrejanom ekstraktu pretpostavlja se da neke druge aktivne materije, poput flavonoida, imaju antidijabetski efekat. Shahaboddin i sar. (2011) su zabeležili značajno smanjenje glukoze u krvi i povećanje insulina u serumu pacova kod kojih je aloksanom izazvana hiperglikemija. Studija Orhana i sar. (2005) pokazala je da su antidijabetska svojstva koja je imela ispoljila na pacove kod kojih je dijabetes indukovano streptozotocinom zavisna od biljke domaćina. Gallagher i sar. (2002) su pokazali da vodeni ekstrakti nekoliko biljaka, kao i ekstrakta imele, inhibiraju difuziju glukoze koristeći *in vitro* model apsorpcije glukoze.

Mehanizam antidijabetske aktivnosti imele prikazan je na Slici 16. Imela pojačava lučenje insulina i prekursora insulina, C-peptida. Insulin se vezuje za receptor tirozin kinaze (RTK). Aktivirani receptor zatim fosforiliše IRS-1 protein, što dovodi do aktivacije PI3K, koja katalizuje adiciju fosfatne grupe na PIP2 pri čemu nastaje PIP3. PIP3 onda aktivira PDK1 koji dovodi do fosforilacije AKT, pomeranja transportera glukoze GLUT-4 do membrane i ulaska glukoze. Imela pojačava ekspresiju GLUT-4, IRS-1 i AKT. Proteinska frakcija imele povećava odgovor transkripcionih faktora PDX-1 i beta2 (neuroD). PDX-1 i beta2 postaju fosforilisani i regulišu transkripciju gena za insulin (Szurpnicka i sar., 2020).

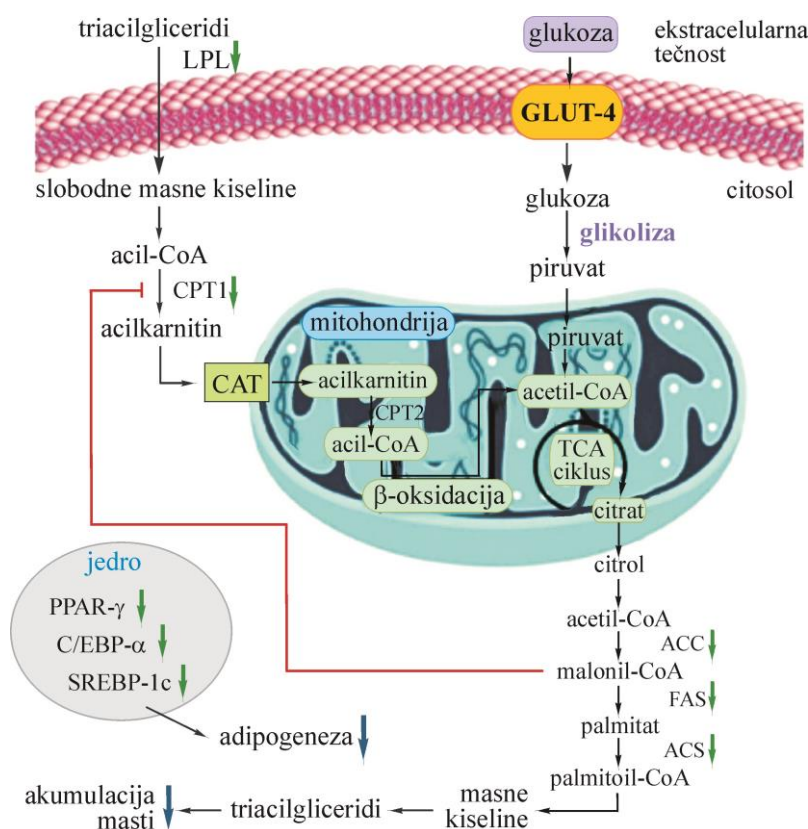


Slika 16. Mehanizam hipoglikemijskog delovanja *V. album*

(preuzeto iz: Szurpnicka i sar., 2020, i modifikovano)

Rezultati studije Adaramoye i sar. (2012) pokazali su da *V. album* doprinosi značajnom poboljšanju lipidnog profila u serumu pacova kod kojih je streptozotocinom indukovana dijabetes. Od 61 ispitivane biljke od medicinskog značaja *V. album* je pokazala značajno inhibitorno dejstvo na pankreasnu lipazu (Lee i sar., 2012). Utvrđeno je da imela smanjuje biosintezu holesterola supresijom ekspresije SREBP-1c i FAS, koji su uključeni u regulaciju sinteze masnih kiselina kod ovarijektomisanih ženki pacova (Kim i sar., 2015).

Mehanizam mogućeg hipolipidemijskog delovanja *V. album* je prikazan na Slici 17. Lipoproteinska lipaza (LPL) konvertuje triacilgliceride do slobodnih masnih kiselina. Masne kiseline se zatim premeštaju u ćeliju i pretvaraju u acil-CoA. Karnitinska palmitoiltransferaza 1 (CPT1) pretvara acil-CoA u acilkarnitin, koji se transportuje u mitohondrije pomoću CAT. Karnitinska palmitoiltransferaza 2 (CPT2) pretvara acilkarnitin ponovo u acil-CoA, i onda acil-CoA ulazi u ciklus trikarbonskih kiselina (TCA ciklus). Citrat izlazi iz mitohondrije i konvertuje se u acetil-CoA, koji se karboksiluje do malonil-CoA. FAS prolazi kroz redukcionu sintezu palmitata, koji se pretvara u palmitoil-CoA što dovodi do stvaranja triacilglicerida. Pored toga, malonil-CoA inhibira CPT1. Imela smanjuje ekspresiju FAS, acil-CoA sintaze (ACC), acil-CoA sintetaze (ACS) i LPL, i smanjuje ekspresiju SREBP-1c, C/EBP- α i PPAR- γ mRNA (Szurpnicka i sar., 2020).



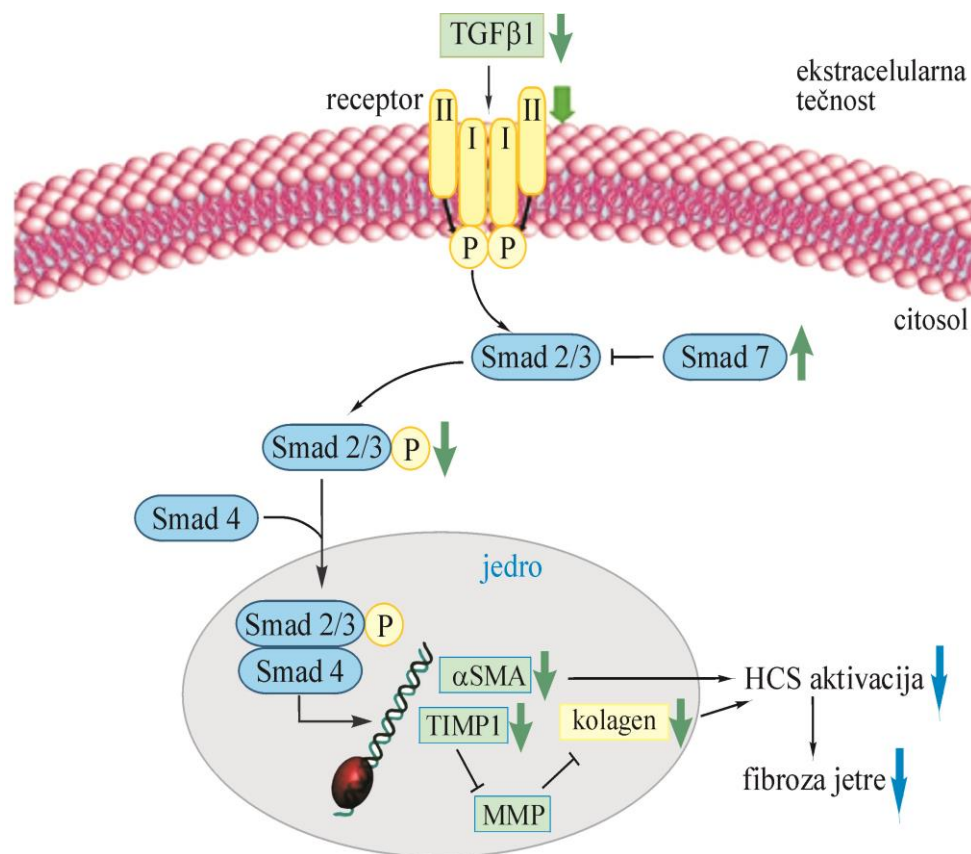
Slika 17. Mehanizam hipolipidemijskog delovanja *V. album*

(preuzeto iz: Szurpnicka i sar., 2020, i modifikovano)

1.8.3. Hepatoprotektivno delovanje *Viscum album*

Glavni indikatori oštećenja jetre su enzimi aspartat aminotransferaza (AST), alanin aminotransferaza (ALT) i alkalna fosfataza (ALP). *V. album* ima sposobnost da smanji aktivnost ovih enzima, što je pokazano u više studija (Abdel-Salam i sar., 2010; Ogbonnanya i sar., 2010; Yusuf i sar., 2015). Takođe, imela je pokazala poboljšanje u morfološkim promenama izazvanim ugljen-tetrahloridom i paracetamolom (Abdel-Salam i sar., 2010; Yusuf i sar., 2015).

Mehanizam hepatoprotektivnog delovanja *V. album* nije u potpunosti razjašnjen, ali bi mogao biti posredovan TGF- β /Smad putem, koji je prikazan na Slici 18. TGF β 1 se vezuje za svoj receptor, koji se sastoji od dve subjedinice tipa I i dve subjedinice tipa II. Subjedinica tip II fosforiliše subjedinicu tip I, koja onda fosforiliše Smad2 i Smad3. Fosforilisani Smad2 i 3 vezuju se za Smad4 i zajedno prenose u jedro gde regulišu ekspresiju ciljnih gena. Smad7 je inhibitorni Smad koji negativno reguliše aktivaciju Smad 2/3 (Szurpnicka i sar., 2020).



Slika 18. Mehanizam hepatoprotektivne aktivnosti *V. album*

(preuzeto iz: Szurpnicka i sar., 2020, i modifikovano)

1.8.4. Antioksidativno delovanje *Viscum album*

Biljke koje imaju veliki medicinski značaj često su bogate fenolnim jedinjenjima (Akinmoladun i sar., 2007). Fenolna jedinjenja imaju izražena antioksidativna delovanja i štite od slobodnih radikala (Oluwaseun i Ganiyu, 2008). Antioksidativna aktivnost fenolnih jedinjenja uglavnom je posledica njihovih redoks svojstava, koja im omogućavaju da deluju kao redukcionni agensi, donori vodonika, "hvatači" slobodnih radikala, posrednici za neutralizaciju singlet kiseonika i helatori metala (Alia i sar., 2003; Amić i sar., 2003; Ademiluyi, 2006). Rezultati Sengul i sar. (2009) su pokazali da od 8 ispitivanih medicinskih biljaka *V. album* ispoljava najjaču antioksidativnu aktivnost (82,23%). Ustanovljeno je da antioksidativna svojstva imele variraju u zavisnosti od biljke domaćina, doba godine kada se sakupljaju delovi biljke imele, ali i od rastvarača koji se koristi tokom procesa ekstrakcije (Önay-Uçar i sar., 2006; Majeed i sar., 2021). Stefanucci i sar. (2020) su ispitivali antioksidativnu aktivnost ekstrakta ploda, lista i semena *V. album* i dobijeni rezultati DPPH i ABTS testova pokazali su da ekstrakt lista ispoljava najveću sposobnost "hvatanja" DPPH• radikala (49,0 mg TE/g) i ABTS⁺ radikala (75,44 mg TE/g). Studija Kim i sar. (2010) je pokazala da lektin izolovan iz *V. album* uklanja slobodne radikale, smanjuje oksidativni stres i inhibira lipidnu peroksidaciju *in vitro*, u ćelijskoj liniji LLC-PK₁.

A decorative border of green leaves and white berries, likely mistletoe, framing the page. The leaves are elongated and pointed, with visible veins. The berries are small, round, and white with a slight blue tint. The border is positioned around the top, bottom, and sides of the page, leaving a large white central area.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Upotreba pesticida je povećana sa rastom svetske populacije, kao i povećanom proizvodnjom hrane i smanjenjem štetočina i bolesti. Njihovo prekomerno korišćenje može dovesti do rizika ne samo za ljudsko zdravlje već i za neciljne organizme i životnu sredinu. Ispitivanje potencijalne toksičnosti dva najviše korišćena insekticida hlorspirifosa (CPF) i imidakloprida (IMI) je od velikog značaja u pogledu očuvanja životne sredine i zaštite zdravlja ljudi. Utvrđeno je da ovi insekticidi mogu ispoljiti toksične efekte koji zavise od primenjene doze, njihovog toksičnog potencijala, toksikokinetičkih i toksikodinamičkih osobina, kao i hemijskih karakteristika, itd.

CPF spada u klasu organofosfornih insekticida, a primarni mehanizam delovanja zasniva se na ireverzibilnoj inhibiciji aktivnosti enzima AChE, a kasnije i prestanak holinergične sinaptičke transmisije i stimulacije nervnog sistema.

IMI je neonikotinoidni insekticid sa sistemskom aktivnošću, ali i kontaktnim i digestivnim delovanjem. Ima veliku selektivnost i specifičan mehanizam delovanja na nervni sistem insekata u odnosu na sisare. U poređenju sa nikotinom, IMI i strukturno slični neonikotinoidi su kompetitivni modulatori i ireverzibilni agonisti postsinaptičkih nAChR.

Evropska imela, *Viscum album* L. je višegodišnja zimzelena, poluparazitska biljka koja raste na različitim vrstama četinarskog i listopadnog drveća širom Evrope. Primenjuje se u tradicionalnoj ali i komplementarnoj medicini u lečenju različitih bolesti. Imela sadrži različita biološki aktivna jedinjenja, među kojima su viskotoksini, lektini i jedinjenja iz klase fenola. Ovi sekundarni metaboliti imele ispoljavaju različite biološki značajne efekte, kao što su antitumorska svojstva, antiinflamatorni, imunomodulatorni i antioksidativni efekti, zbog čega se ovoj biljci može pripisati važan medicinski značaj.

Na osnovu hipoteze i predmeta istraživanja disertacije, koji se odnose na ispitivanje efekata ekstrakata biljne vrste *Viscum album* L. na toksičnost izazvanu insekticidima CPF i IMI u *in vitro* i *in vivo* uslovima, definisani su ciljevi istraživanja, koji obuhvataju:

- Sakupljanje, sušenje i dobijanje ekstrakata listova imele (metoda ultrazvučne ekstrakcije);
- Kvalitativno određivanje sadržaja biološki aktivnih jedinjenja u ekstraktu lista imele (spektrofotometrijske metode):
 - ukupni fenoli,
 - ukupni flavonoidi,
 - kondenzovani tanini, i
 - galotanini;
- Identifikacija i kvantitativno određivanje fenolnih jedinjenja u ekstraktu listova imele (HPLC-DAD analiza);
- Određivanje biohemijskog potencijala i antioksidativne aktivnosti ekstrakata listova imele primenom testova:
 - za ukupnu antioksidativnu aktivnost,
 - na nivou DPPH• radikala,
 - na nivou inhibicije lipidne peroksidacije,
 - na nivou hidroksil radikala (OH•),
 - na nivou ABTS^{•+} radikala;

- Ispitivanje vijabilnosti ćelija MRC-5 linije (humana ćelijska linija zdravih fibroblasta pluća) i određivanje citotoksičnosti primenom MTT testa u *in vitro* uslovima:
 - pojedinačni tretmani insekticida CPF i IMI i ekstrakata listova imele,
 - kotretmani insekticida i ekstrakata listova imele u izabranim koncentracijama;
- *In vivo* ispitivanje toksičnosti subletalnih doza insekticida CPF i IMI, kao i zaštitni efekat ekstrakata lista imele u pojedinačnim i kombinovanim tretmanima kod subakutno tretiranih pacova Wistar soja:
 - određivanje hematoloških parametara u krvi (broj eritrocita (RBC), broj leukocita (WBC), hematokrit (Hct), koncentracija hemoglobina (Hb) i broj trombocita (Plt));
 - određivanje biohemijskih parametara u serumu (ukupni proteini, albumini, glukoza, ukupni holesterol, trigliceridi, alanin aminotransferaza (ALT), aspartat aminotransferaza (AST), laktat dehidrogenaza (LDH), bilirubin, kreatinin i urea);
 - određivanje aktivnosti enzima holinesteraze (ChE) u serumu, i acetilholinesteraze (AChE) (u odabranim tkivima);
 - određivanje parametara redoks statusa u odabranim tkivima (jetra, bubrezi, testisi):
 - ❖ parametri oksidativnog stresa (superoksid anjon radikal ($O_2^{\bullet-}$), vodonik peroksid (H_2O_2), azot monoksid (NO), lipidni peroksidi (LPO)),
 - ❖ enzimi antioksidativnog sistema zaštite (superoksid-dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation-peroksidaza (GSH-Px), glutation reduktaza (GR), glutation-S-transferaza (GST)),
 - ❖ neenzimske komponente antioksidativnog sistema (redukovani glutation (GSH), oksidovani glutation (GSSG) i vitamin C),
 - ispitivanje histopatoloških promena u jetri i bubrezima.

A decorative border of green leaves and white berries surrounds the central text. The leaves are elongated and pointed, with visible veins. The berries are small, round, and white, clustered together on thin stems.

3. MATERIЈAL I METODE

Eksperimentalna istraživanja za potrebe izrade ove doktorske disertacije obavljena su u laboratoriji za Eksperimentalnu fiziologiju i Ćelijsku i molekularnu biologiju Instituta za biologiju i ekologiju Prirodno-matematiĉkog fakulteta Univerziteta u Kragujevcu, u laboratoriji za hemiju Agronomskog fakulteta u Ćaĉku Univerziteta u Kragujevcu i na Odeljenju za patologiju i histologiju Univerzitetskog kliniĉkog centra u Kragujevcu.

3.1. Sakupljanje biljnog materijala i priprema ekstrakata

U eksperimentalnom delu su ispitivani ekstrakti lista biljne vrste *Viscum album* L. (bela imele). Korišćeni su sveži listovi bele imele, sakupljeni sa kruške (*Pyrus communis* L.) u septembru 2016. godine na planini Zlatibor (opština Ćajetina), na nadmorskoj visini od 815 m. Listovi imele su zatim prirodno sušeni na vazduhu oko 30 dana, bez izlaganja direktnoj sunĉevoj svetlosti. Osušeni listovi su usitnjeni u blenderu, a zatim odloženi u papirne kese i ĉuvani na tamnom i dobro provetrenom mestu do pripreme ekstrakata.



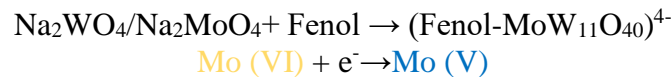
Slika 19. Bela imele (*Viscum album* L.) (Foto: M. Milošević)

Za ekstrakciju aktivnih komponenti iz listova imele korišćena je metoda ultrazvuĉne ekstrakcije. Uzorak osušenih listova mase 10 g stavljen je u volumetrijski balon u koji je dodato 250 mL redestilovane vode. Sadržaj je sonifikovan u trajanju od 30 min. pri frekvenciji od 40 kHz i energiji ultrazvuka 90% (snage 216W). Dobijeni ekstrakt je proĉeđen pomoću Whatman N°1 filter papira, koncentrovan do suve mase korišćenjem rotacionog vakuum uparivaĉa (Devarot, Elektromedicina, Slovenija) i osušen na temperaturi od 40°C. Suvi ostatak je stavljen u staklene boĉice i ĉuvan u frižideru (4°C) do upotrebe. Prinos suvog ekstrakta listova imele iznosio je 25,15 g na 100 g suvog biljnog materijala. Za odreĉivanje hemijskog sastava u ekstraktu lista imele korišćene su spektrofotometrijske metode za odreĉivanje sadržaja jedinjenja fenolnog tipa i HPLC metoda za kvalitativnu i kvantitativnu analizu sadržaja fenola.

3.2. Kvalitativno određivanje fenolnih jedinjenja u ekstraktu lista

3.2.1. Određivanje ukupnog sadržaja fenola

Za određivanje ukupnog sadržaja fenola u ekstraktu lista *Viscum album* L. korišćena je metoda koja se zasniva na merenju redukcionog kapaciteta polifenola u reakciji sa *Folin-Ciocalteu* reagensom (smeša Na_2WO_4 i Na_2MoO_4) (Singleton i Rossi, 1965). U baznoj sredini fenolna jedinjenja disocijacijom daju proton i fenoksidni anjon, koji redukuje *Folin-Ciocalteu* reagens (žuti kompleks), pri čemu nastaje jon $(\text{Fenol-MoW}_{11}\text{O}_{40})^{4-}$ plave boje. Ova hemijska reakcija je prikazana jednačinom:



Intenzitet plave boje se određuje spektrofotometrijskim merenjem apsorbanca na 765 nm i proporcionalan je ukupnoj količini fenolnih jedinjenja u uzorku ekstrakta lista.

Korišćeni rastvori:

- 1) 0,2 M *Folin-Ciocalteu* reagens
- 2) 7,5% NaHCO_3
- 3) standardni rastvor galne kiseline (1 mg/mL)
- 4) vodeni rastvor ekstrakta lista *Viscum album* L.

Procedura:

Reakciona smeša dobijena mešanjem 0,5 mL vodenog rastvora ekstrakta lista sa 2,5 mL *Folin-Ciocalteu* reagensa i 2 mL NaHCO_3 inkubirana je 15 min. u mraku na 45°C. Vrednosti apsorbanca su očitavane spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 765 nm u poređenju sa slepom probom kojoj se doda 0,5 mL destilovane vode umesto uzorka ekstrakta lista. Za konstrukciju kalibracione krive (zavisnost apsorbanca i koncentracije), korišćeni su standardni rastvori galne kiseline (koncentracija od 0,1 mg/mL do 1 mg/mL). Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktu lista određen je prema dobijenoj jednačini kalibracione krive galne kiseline. Rezultat je izražen u mg ekvivalenta galne kiseline na g suve mase ekstrakta i prikazan kao srednja vrednost tri uzastopna merenja svakog uzorka (mg GKE/g \pm SD).

3.2.2. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida

Za određivanje sadržaja ukupnih flavonoida u ekstraktu lista korišćena je metoda prema Brighente i sar. (2007), koja se zasniva na osobini flavonoida da sa jonima metala poput Al^{3+} grade metalo-komplekse. Intenzitet boje metalnih kompleksa koristi se za kvantifikaciju flavonoida u ispitivanom uzorku, a apsorbanca se meri spektrofotometrijski na 415 nm.

Korišćeni rastvori:

- 1) 2% AlCl_3
- 2) standardni rastvor rutina (1 mg/mL)
- 3) vodeni rastvor ekstrakta lista *Viscum album* L.

Procedura:

Za konstrukciju kalibracione krive korišćeni su standardni rastvori rutina (koncentracija od 0,02 do 0,1 mg/mL). U 0,5 mL vodenog rastvora ekstrakta lista (ili standardnog rastvora rutina) doda se 0,5 mL 2% AlCl_3 i inkubira 60 min. na sobnoj temperaturi. Apsorbance su očitavane spektrofotometrijski na 415 nm u poređenju sa slepom probom (bez dodavanja AlCl_3). Dobijeni rezultat na osnovu jednačine kalibracione krive rutina izražen je u mg ekvivalenta rutina na g suve mase ekstrakta i prikazan kao srednja vrednost tri uzastopna merenja svakog uzorka (mg RUE/g \pm SD).

3.2.3. Određivanje sadržaja kondenzovanih tanina

Za određivanje kondenzovanih tanina (proantocijanidina) u ekstraktu lista korišćena je metoda Vermerrisa i Nicholsona (2006), koja se zasniva na reakciji selektivnog taloženja kondenzovanih tanina pomoću formaldehida i floroglucinola.

Korišćeni rastvori:

- 1) floroglucinol (1,3,5-benzotriazol, $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3$)
- 2) hlorovodonična kiselina (u odnosu $\text{HCl}/\text{H}_2\text{O}=2:5$) (Rastvor A)
- 3) formaldehid (HCHO), 13 mL 37% HCHO razblaženog vodom do 100 mL (Rastvor B)
- 4) vodeni rastvor ekstrakta lista *Viscum album* L.

Procedura:

Za određivanje kondenzovanih tanina u ekstraktima lista, neophodno je prvo odrediti ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja *Folin-Ciocalteu* metodom. Svakom ekvivalentu galne kiseline prisutnom u ekstraktu doda se 0,5 mol-ekvivalenta floroglucinola. Zatim se u 2 mL rastvora ekstrakta doda po 1 mL rastvora A i rastvora B. Ovako pripremljena smeša se inkubira 24 sata u mraku na sobnoj temperaturi da bi se istaložili tanini. Rastvor se procedi, a u supernatantu se određuje ukupna količina neistaloženih fenolnih jedinjenja. Dobijeni talog sadrži kondenzovane tanine kao i poznatu količinu floroglucinola. Sadržaj kondenzovanih tanina izračunava se kao razlika ukupnih fenolnih jedinjenja u ekstraktu i supernatantu. Rezultat je izražen u mg ekvivalenta galne kiseline na g suve mase ekstrakta i prikazan kao srednja vrednost tri uzastopna merenja svakog uzorka (mg GKE/g \pm SD).

3.2.4. Određivanje sadržaja galotanina

Kvantitativno određivanje sadržaja galotanina je prema metodi koju su opisali Vermerris i Nicholson (2006), korišćenjem kalijum jodata (KIO_3) koji reaguje sa galoil estrima. Tokom ove reakcije prvo nastaje jedinjenje crvene boje, a na kraju reakcije žute boje. Intenzitet boje crvenog jedinjenja se očitava na spektrofotometru na talasnoj dužini od 550 nm.

Korišćeni rastvori:

- 1) kalijum jodat (KIO_3 , zasićeni rastvor)
- 2) standardni rastvor galne kiseline (1 mg/mL)
- 3) vodeni rastvor ekstrakta lista *Viscum album* L.

Procedura:

U 3,5 mL ekstrakta lista doda se 1,5 mL zasićenog rastvora kalijum jodata, a zatim se smeša inkubira 40 min. na 40°C. Za standard je korišćena galna kiselina. U toku inkubacije dolazi do nastanka jedinjenja crvene boje, a promena apsorbance (do postizanja maksimalne vrednosti) se prati spektrofotometrijski na 550 nm. Ukupna količina galotanina koja se nalazi u uzorku izražava se u mg ekvivalenta galne kiseline na g suve mase ekstrakta (mg GKE/g \pm SD). Rezultat je prikazan kao srednja vrednost tri uzastopna merenja za svaki uzorak.

3.3. HPLC analiza ekstrakta lista

Tečna hromatografija visokih performansi (engl. *HPLC*–, *high-performance liquid chromatography*) je analitička metoda za izolaciju, identifikaciju i kvantifikaciju hemijskog sastava biljnih ekstrakata. Identifikacija i kvantifikacija polifenolnih jedinjenja u ekstraktu lista *Viscum album* L. određena je na HPLC sistemu (Agilent-1200 sa UV-Vis DAD detektorom za multi detekciju talasnih dužina).

Procedura:

Kolona je termostatirana na 25°C, injekciona zapremina svih uzoraka je bila 5 μ L i izvršeno je odvajanje u koloni Agilent-Eclipse XDBC-18 4.6 \times 150 mm. Kao mobilna faza za linearni gradijent korišćeni su sledeći rastvarači:

- rastvarač A – H₂O i 2% HCOOH
- rastvarač B – 80% ACN, 2% HCOOH i H₂O

Komponente su razdvojene primenom linearnog gradijenta po sledećoj šemi: 0-10 min. 0% B, 10-28 min. povećanje na 0-25% B, 28-30 min. 25% B, 30-35 min. povećanje na 25-50% B, 35-40 min. povećanje 50-80% B, i u poslednjih 5 min. se smanjuje na 80-0% B. Protok mobilne faze podešen je na 0,8 mL/min.

Identifikacija polifenolnih jedinjenja prisutnih u ekstraktu lista je izvršena poređenjem retencionih vremena standarda i uzoraka pomoću apsorpcionih spektara pikova, metodom spoljašnjeg standarda. Od osnovnog standardnog rastvora koncentracije 1,0 mg/mL rastvorenog u metanolu pripremljena je serija razblaženja odgovarajućih masenih koncentracija. Zatim su konstruisane kalibracione krive i na osnovu površine pikova koji su dobijeni izračunata je ukupna količina polifenolnih jedinjenja u ekstraktu lista. U zavisnosti od masene koncentracije standarda izračunati su rezultati. Iz dobijenih jednačina linearne zavisnosti izračunate su masene koncentracije komponenti u ekstraktu lista. Sadržaj polifenolnih jedinjenja je izražen u μ g po g suvog ekstrakta (μ g/g).

3.4. Ispitivanje antioksidativnog potencijala ekstrakta lista

Za ispitivanje antioksidativnog potencijala ekstrakta lista imele (*Viscum album* L.) korišćene su sledeće metode:

- ukupna antioksidativna aktivnost,
- antioksidativna aktivnost na nivou DPPH[•] radikala,
- antioksidativna aktivnost na nivou inhibicije lipidne peroksidacije,
- antioksidativna aktivnost na nivou hidroksil radikala (OH[•]), i
- antioksidativna aktivnost na nivou ABTS^{•+} radikala.

3.4.1. Određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti

Ukupna antioksidativna aktivnost ispitivanog ekstrakta lista imele određena je fosfomolibdenskom metodom prema Prieto i sar. (1999). Metoda se zasniva na redukciji jona Mo(VI) do jona Mo(V), prilikom koje nastaje fosfat-Mo(V) kompleks u kiseloj sredini u prisustvu antioksidanta. Jedinjenje koje nastaje ovom reakcijom je zelene boje, a apsorbancija je očitavana na 695 nm. Askorbinska kiselina je korišćena kao standardni antioksidant.

Korišćeni rastvori:

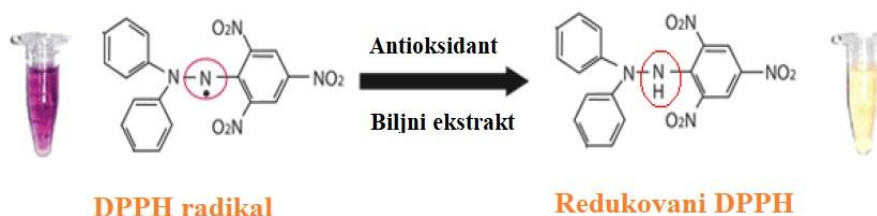
- 1) fosfomolibden reagens (28 mM natrijum-fosfat (Na_3PO_4) i 4 mM amonijum-molibdat ($(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$) u 0,6 M sumpornoj kiselini (H_2SO_4))
- 2) standardni rastvor askorbinske kiseline (1 mg/mL)
- 3) vodeni rastvor ekstrakta lista *Viscum album* L.

Procedura:

Za konstrukciju kalibracione krive korišćeni su standardni rastvori askorbinske kiseline (koncentracija od 0,1 do 2,0 mg/mL). U epruvete sa zapušačem se dodaje 0,3 mL uzorka (ekstrakt lista i standard) i 3 mL fosfomolibden reagensa. Za slepu probu se umesto uzorka dodaje 0,3 mL destilovane vode. Svi uzorci se inkubiraju 90 min. na 95°C i nakon hlađenja do sobne temperature, apsorbance se očitavaju spektrofotometrijski na 695 nm u poređenju sa slepom probom. Vrednosti ukupne antioksidativne aktivnosti u ekstraktu lista su određene prema dobijenoj jednačini kalibracione krive standardnog rastvora askorbinske kiseline. Dobijeni rezultat je prikazan kao srednja vrednost tri uzastopna merenja svakog uzorka i izražena je u mg askorbinske kiseline na g ekstrakta (mg AKE/g \pm SD).

3.4.2. Određivanje antioksidativne aktivnosti merenjem nivoa DPPH• radikala

DPPH metoda se najčešće koristi za ispitivanje antioksidativnog kapaciteta biljnih ekstrakata (Kumarasamy i sar., 2007), a pouzdana je zahvaljujući činjenici da je ljubičasto obojeni DPPH• stabilan u radikalskoj formi. Reakcija neutralizacije DPPH• (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikala zasniva se na prenosu elektrona sa antioksidanta na radikal, što dovodi do stvaranja intermedijernog radikala koji preuzima proton, neutrališe se i prelazi u DPPH-H (Slika 20). Tokom ove reakcije boja rastvora prelazi iz ljubičaste u žutu, a stepen promene intenziteta ljubičaste boje srazmeran je antioksidativnom kapacitetu ekstrakta i meri se spektrofotometrijski na 517 nm.



Slika 20. Redukcija DPPH•.

Korišćeni rastvori:

- 1) rastvor DPPH (80 µg/mL)
- 2) standardni rastvori antioksidanata (askorbinska kiselina, galna kiselina i β-hidroksitoluol)
- 3) vodeni rastvor ekstrakta lista *Viscum album* L. (1 mg/mL)

Procedura:

U 100 mL etanola rastvori se 8 mg DPPH, tako da koncentracija bude 80 µg/mL. Kao referentni standardi korišćeni su askorbinska kiselina, galna kiselina i β-hidroksitoluol. Od osnovnog rastvora ekstrakta i standarda napravljena je serija od 10 razblaženja zapremine 2 mL. U 2 mL uzorka (ekstrakt i standard) doda se 2 mL rastvora DPPH i ostavi u mraku 30 minuta. Uporedo se priprema i slepa proba sa etanolom umesto uzorka. Intenzitet obojenja i sposobnost neutralizacije DPPH• radikala se određuje spektrofotometrijski merenjem apsorbance na 517 nm. Sposobnost "hvatanja" DPPH• radikala je izračunata primenom sledeće formule:

$$[\% \text{ neutralizacije}] = \frac{A_{\text{kontrola}} - A_{\text{uzorka}}}{A_{\text{kontrola}}} \times 100$$

Vrednost IC₅₀ je definisana kao koncentracija ispitivanog uzorka koja neutrališe 50% DPPH radikala i izražava se u µg/mL ekstrakta. Sve probe i kontrole su ispitivane u tri uzastopna ponavljanja, a rezultat je izražen kao srednja vrednost IC₅₀ ± SD.

3.4.3. Određivanje antioksidativne aktivnosti na nivou inhibicije lipidne peroksidacije

Inhibicija stvaranja lipidnih peroksida u ekstraktu određuje se tiocijanatnom metodom koju su opisali Hsu i saradnici (2008), a zasnovana je na Fe-katalizovanoj reakciji razlaganja hidroperoksida u kojoj se Fe²⁺ oksiduje do Fe³⁺. Količina nastalog Fe³⁺ jona se određuje reakcijom sa tiocijanatom, a intenzitet crvene boje proporcionalan je količini Fe³⁺ jona u uzorku, kao i količini lipidnih peroksida i stepenu lipidne peroksidacije. Prisutni antioksidanti smanjuju intenzitet boje rastvora, što ukazuje na njihovu sposobnost da inhibiraju oksidaciju linolne kiseline.

Korišćeni rastvori:

- 1) emulzija linolne kiseline (0,2804 g linolne kiseline i 0,2804 g Tween-40 kao emulgatora u 50 mL 40 mM fosfatnog pufera, 0,2 M, pH 7.0)
- 2) standardi antioksidanata (1 mg/mL, askorbinska kiselina, α-tokoferol i β-hidroksitoluol)
- 3) amonijum-tiocijanat (30% NH₄SCN)
- 4) vodeni rastvor ekstrakta lista *Viscum album* L. (1 mg/mL)

Procedura:

Pripremljena je serija standardnih rastvora antioksidanata i uzoraka. U 0,5 mL uzorka (ekstrakt i standard) doda se 2,5 mL emulzije linolne kiseline, i smeša se inkubira 72 sata u mraku na temperaturi od 37°C. Nakon toga se odmeri 0,1 mL alikvota reakcionog rastvora i pomeša sa 4,7 mL etanola, 0,1 mL FeCl₂ i 0,1 mL amonijum-tiocijanata. Apsorbanca ovako dobijene smeše se očitava na talasnoj dužini od 500 nm. Kontrola se priprema sa metanolom umesto uzorka. Kao standardi antioksidanata su uzeti askorbinska kiselina, α-tokoferol i β-

hidroksitoluol. Rezultat je prikazan kao srednja vrednost tri uzastopna merenja svakog uzorka, a procenat inhibicije lipidne peroksidacije linolne kiseline je dobijen pomoću formule:

$$[\% \text{ inhibicije}] = \frac{A_{kontrola} - A_{uzorka}}{A_{kontrola}} \times 100$$

Korišćenjem softvera za analizu podataka Origine 8 dobijena je IC₅₀ vrednost koja se izražava u µg/mL ekstrakta.

3.4.4. Određivanje sposobnosti neutralizacije hidroksil radikala

Za određivanje sposobnosti ekstrakta da neutrališe hidroksil radikale (OH[•]) korišćena je modifikovana metoda Hinneburg-a i sar. (2006). OH[•] radikal je najreaktivniji slobodni radikal kiseonika, a nastaje Fentonovom reakcijom između Fe³⁺ jona i H₂O₂ u prisustvu redukujućeg agensa (askorbinska kiselina). OH[•] radikal zatim oksiduje 2-deoksi-D-ribozu, a nastali produkti reaguju sa TBA (tiobarbiturna kiselina) i daju rastvorima ružičastu boju.

Korišćeni rastvori:

- 1) 5,6 mM 2-deoksi-D-riboza
- 2) 50 mM KH₂PO₄-NaOH pufer, pH 7,4
- 3) 1 mM FeCl₃
- 4) 1 mM EDTA
- 5) 10 mM H₂O₂
- 6) 1 mM standardi antioksidanata (askorbinska kiselina i β-hidroksitoluol)
- 7) 2,8% TCA sa 1% TBA
- 8) vodeni rastvor ekstrakta lista *Viscum album* L. (1 mg/mL)

Procedura:

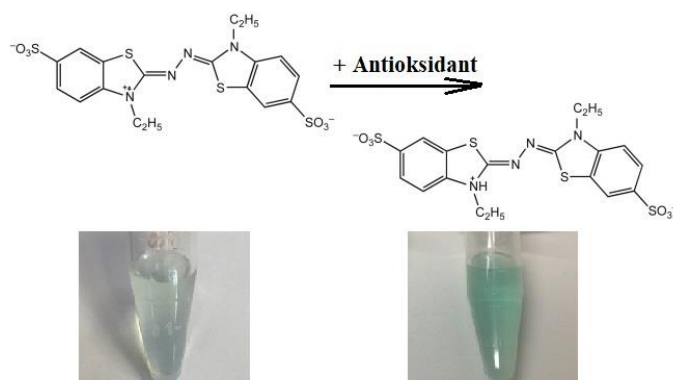
Kao standardi antioksidanata su uzeti askorbinska kiselina i β-hidroksitoluol. Napravljena je serija razblaženja ekstrakta lista i standarda. Reakcionoj smeši od 100 µL ekstrakta ili standarda rastvorenih u vodi dodato je 500 µL 2-deoksi-D-riboze u 50 mM KH₂PO₄-NaOH puferu (pH 7,4), 200 µL smeše (100 µL FeCl₃ i 100 µL EDTA u odnosu 1:1 v/v rastvora), 100 µL H₂O₂ i 100 µL vodenog rastvora askorbinske kiseline. Kontrolni je dodata destilovana H₂O umesto uzorka ekstrakta. Epruvete su mućkane na vorteks mešalici i inkubirane 30 min. na 50°C. Nakon inkubacije u svaku epruvetu je dodato po 1 ml 2,8% TCA i 1 ml 1,0% TBA. Uzorci su centrifugirani i zagrevani u vodenom kupatilu 30 min. na 50°C. Nakon hlađenja, apsorbance rastvora su očitavane spektrofotometrijski na 532 nm. IC₅₀ vrednosti su izračunate na prethodno opisan način, a vrednosti inhibicije OH[•] radikala su izražene u procentima iz apsorpcije kontrolnog i ispitivanog uzorka korišćenjem obrasca:

$$[\% \text{ inhibicije}] = \frac{A_{kontrola} - A_{uzorka}}{A_{kontrola}} \times 100$$

3.4.5. Određivanje antioksidativne aktivnosti merenjem nivoa ABTS^{•+} radikala

Za određivanje stepena neutralizacije ABTS^{•+} radikala (2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonata) u prisustvu antioksidanata korišćena je metoda koju su opisali

Re i sar. (1999). Metoda se zasniva na obezbojavanju rastvora stabilnog ABTS^{•+} radikala (tamno zelene boje) (Slika 21), koji je dobijen oksidacijom sa kalijum persulfatom (K₂S₂O₈) u prisustvu nekih antioksidanata, a smanjenje apsorbance rastvora su očitavane spektrofotometrijski na 734 nm.



Slika 21. ABTS hemijska reakcija sa antioksidantom

Korišćeni rastvori:

- 1) 7 mM ABTS
- 2) 2,45 mM K₂S₂O₈ (rastvoren u vodi)
- 3) rastvori standardnih antioksidanata
- 4) vodeni rastvor ekstrakta lista *Viscum album* L. (1 mg/mL)

Procedura:

Da bi nastao ABTS^{•+} radikal, pomešani su vodeni rastvori 7 mM ABTS i 2,45 mM K₂S₂O₈ i ostavljeni 16 sati u mraku na sobnoj temperaturi. Dobijeni ABTS^{•+} rastvor je razblažen metanolom da bi se dobio radni rastvor apsorbance 0,7 na 734 nm. Napravljena je serija razblaženja rastvora ekstrakta i standardnih antioksidanata. U 900 μL radnog rastvora doda se 100 μL uzorka (ekstrakta i standarda). Kontrola se priprema sa metanolom umesto uzorka. Reakciona smeša se inkubira 30 min. u mraku, a apsorbance uzorka su očitavane na 734 nm. IC₅₀ vrednosti su izračunate na prethodno opisan način, a vrednosti inhibicije ABTS^{•+} radikala su izražene u procentima iz apsorpcije kontrolnog i ispitivanog uzorka korišćenjem obrasca:

$$[\% \text{ inhibicije}] = \frac{A_{\text{kontrola}} - A_{\text{uzorka}}}{A_{\text{kontrola}}} \times 100$$

3.5. Ispitivanje citotoksičnosti u *in vitro* uslovima

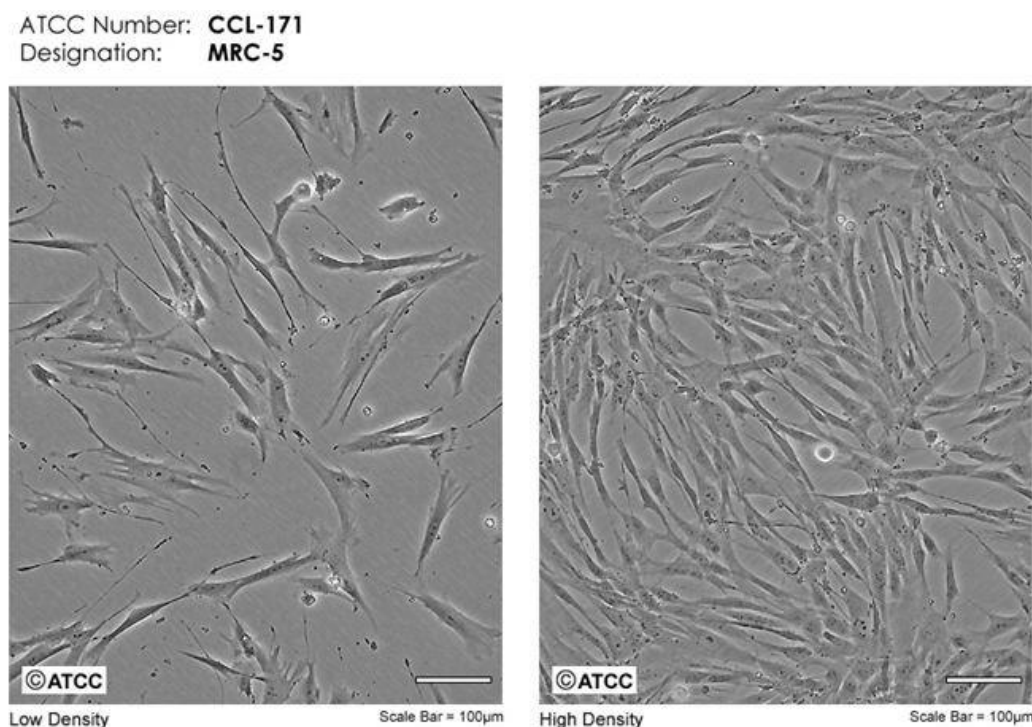
U eksperimentima sa ćelijskim linijama neophodni su kontrolisani uslovi (adekvatna koncentracija CO₂, kao i temperatura, vlažnost vazduha i odgovarajuća pH vrednost), koji obezbeđuju najpovoljniju sredinu za rast i razvoj ćelija. Pri gajenju ćelija su neophodni i sterilni uslovi, koji se postižu radom u laminarnoj komori, u kojoj je obezbeđeno vertikalno strujanje vazduha kroz filter koji omogućava prečišćavanje vazduha, kao i korišćenje UV lampe i 96% etanola za sterilisanje radnih površina, kako ne bi došlo do kontaminacije mikroorganizmima. Takođe, za rad se uvek koristi sterilisano laboratorijsko posuđe i pribor.

3.5.1. Dizajn *in vitro* eksperimenta

U *in vitro* eksperimentima za pojedinačne tretmane je korišćena serija rastvora dva insekticida hlorpirifosa (Chlorpyrifos – CPF) i imidakloprida (Imidacloprid – IMI) u koncentracijama 25, 50, 100, 200 i 300 μM , koje su izabrane na osnovu studija Zhao i saradnika (2019) i Bizerra i saradnika (2020). Takođe, za pojedinačne tretmane je korišćena i serija vodenih rastvora ekstrakta lista imele *Viscum album* L. u sledećim koncentracijama: 10, 20, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 600 i 800 $\mu\text{g/mL}$. Nakon serije eksperimenata pojedinačnih tretmana, za kombinovane tretmane ekstrakta i insekticida odabrane su po tri koncentracije (50, 100 i 300 μM) CPF i IMI, kao i tri koncentracije (100, 300 i 600 $\mu\text{g/mL}$) rastvora ekstrakta lista imele. U eksperimentu su urađena tri ponavljanja za sve pojedinačne i kombinovane tretmane insekticidima i ekstraktima u trajanju od 24 i 72 sata.

3.5.2. Čelijska linija – MRC-5

U *in vitro* eksperimentima je korišćena čelijska linija humanih zdravih fibroblasta pluća, (engl. „*human lung fibroblasts*“ – MRC-5) (Slika 22), nabavljena iz repozitorijuma čelijskih kultura kompanije ATCC (engl. *American Type Culture Collection*).



Slika 22. Morfološki izgled ćelija MRC-5 ćelijske linije

(preuzeto sa: <https://www.atcc.org/products/ccl-171>)

MRC-5 ćelije su izduženog, vretenastog oblika, a karakteriše ih sposobnost brze deobe (prolifracije) i adhezije za plastičnu površinu. Čelije se gaje u sterilnim flaskovima površine 25 cm^2 i 75 cm^2 u hranljivom medijumu (engl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* – DMEM) u kome rastu i razmnožavaju se. DMEM medijum je sa visokim sadržajem glukoze (4,5 g/L), kome je dodato 10% fetalnog goveđeg seruma (FBS), i antibiotika 100 $\mu\text{g/mL}$

streptomycina i 100 IU/mL penicilina. Čelije se gaje u inkubatoru u kome je podešena vlažnost vazduha na 95%, temperatura od 37°C i 5% koncentracija CO₂.

3.5.2.1. Odmrzavanje ćelija

Ćelijska linija fibroblasta pluća zamrznuta je u medijumu za krioprezervaciju, koji sadrži 20% FBS i 5% DMSO (dimetil-sulfoksid). Čelije se drže u mikrotubama za zamrzavanje u kontejnerima sa tečnim azotom na temperaturi –196°C. Krioprezervacijom se smanjuje rizik od kontaminiranja mikroorganizmima i drugim ćelijskim linijama, ali i od promena u morfologiji ćelija.

Nakon odmrzavanja, ćelije (zapremine 1 mL) se resuspenduju u 5 mL DMEM medijuma zbog toksičnosti koju na ćelije ima medijum za krioprezervaciju. Zatim se ova suspenzija ćelija centrifugira 10 min. na 1000×g, supernatant se aspirira pomoću vakuum pumpe, a istaložene ćelije se resuspenduju u 5 mL DMEM medijuma i prebace se u mali flask površine 25 cm². Medijum se zameni nakon 24 sata da bi se odstranio mogući ostatak krioprezervansa.

3.5.2.2. Pasažiranje ćelija

Ćelije uzimaju hranljive materije iz medijuma i, deleći se, popunjavaju površinu flaska. Posle izvesnog broja deoba potrebno je prebaciti ćelije u novi flask, odnosno izvršiti pasažu ćelija i smanjiti njihovu koncentraciju. Pasažiranje ćelija se vrši kada pokrivenost dostigne 80–90% površine flaska. Da bi se ćelije odlepile sa površine flaska, ali i da bi se raskinule veze između susednih ćelija, pre svakog pasažiranja, ali i pre zasejavanja ćelija potrebno ih je tripsinizirati primenom tripsina i EDTA (Freshney, 1983). Tripsinom se raskidaju peptidne veze, a EDTA ima ulogu u vezivanju jona magnezijuma i kalcijuma neophodnih za formiranje međućelijskih veza. U procesu tripsinizacije ćelije u flasku se ispiraju dodavanjem 1 mL 0,25% tripsin-EDTA, a onda se dodaje 1 mL tripsin-EDTA za flask od 25 cm² ili 2 ml za flask od 75 cm². Prati se postepeno odlepljivanje ćelija od površine flaska, i nakon 3-5 minuta u flasku se nalazi razređena koncentracija ćelija. Odmah nakon tripsinizacije se vrši proces pasažiranja tako što se određena zapremina suspenzije ćelija prebaci u novi flask, i u oba flaska se doda 5 ili 10 mL DMEM medijuma da bi se neutralisalo dejstvo tripsina.

3.5.2.3. Brojanje ćelija

Pre početka eksperimenta treba odrediti broj ćelija kao i njihovu vijabilnost, odnosno procenat živih ćelija koji se određuje hemocitometrijski. Prilikom brojanja ćelija koristi se boja tripan plavo (engl. *trypan blue*). Žive ćelije su nepropustljive za ovu boju, i prilikom dodavanja boje neće se obojiti. Kod mrtvih ćelija, gde je integritet membrane narušen, dolazi do propuštanja plave boje u citoplazmu ćelija, pa se posmatranjem pod mikroskopom mogu uočiti plavo obojene mrtve ćelije za razliku od živih ćelija.

Suspenzija ćelija se pomeša sa tripan plavom bojom u odnosu 1:1, odnosno po 10 µL. Zatim se ova smeša sipa u *Neubauerovu* komoru za brojanje ćelija. Za brojanje se koristi svetlosni invertni mikroskop. Čelije se broje u 3 velika dijagonalna kvadrata (0,0003 mm²), i

izračunava se srednja vrednost koja se koristi prilikom preračuna da bi se odredio broj ćelija na 1 mL suspenzije, pri čemu se u obzir uzimaju i razblaženje i dimenzije komore.

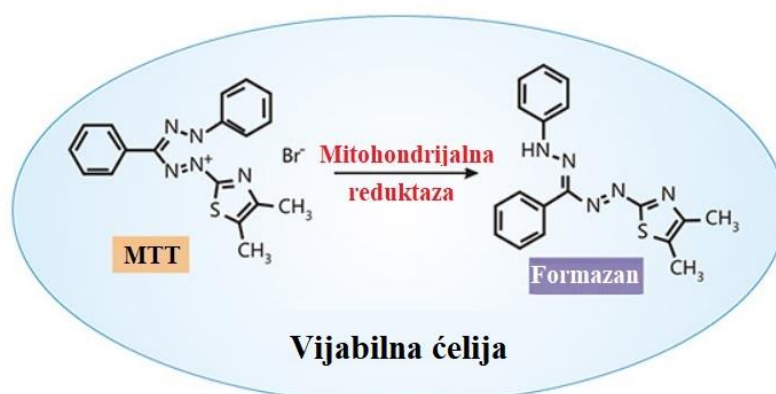
Za određivanje broja vijabilnih ćelija koriste se sledeće formule:

Broj ćelija/mL = srednja vrednost broja ćelija iz tri kvadrata \times razblaženje bojom $(2) \times 10^4$
(korekcionni faktor, dubina komore i zapremina u 1 mL)

% živih ćelija = broj živih ćelija/ukupan broj ćelija (žive i mrtve) \times 100

3.5.3. Ispitivanje vijabilnosti ćelija MTT testom

Za ispitivanje vijabilnosti ćelija, kao i za određivanje citotoksičnosti ispitivanih supstanci koristi se kolorimetrijski MTT test (Mosmann, 1983). Da bi se utvrdilo da li ekstrakt lista imele ispoljava ili ne štetne efekte na zdrave ćelije fibroblasta, sprovedeno je ispitivanje stepena biokompatibilnosti, tj. biološkog odgovora ćelija na ispitivani ekstrakt i njegova bezbedna primena kao potencijalnog terapeutika, primenom MTT testa. Takođe, i za ispitivanje nivoa citotoksičnosti insekticida CPF i IMI korišćen je MTT test. Metoda se zasniva na reakciji MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromida] jedinjenja (tetrazolijumova so žute boje), koje se redukuje do ljubičasto obojenog formazana [5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-formazan] u prisustvu enzima živih ćelija, mitohondrijalne reduktaze (Slika 23).



Slika 23. MTT esej (preuzeto sa: <https://www.cusabio.com/c-21030.html>)

Nakon određivanja broja MRC-5 ćelija i zasejavanja u mikrotitarske ploče sa 96 bunarića (po bunariću 10,000 (1×10^4) ćelija), ćelije se inkubiraju 24 sata u inkubatoru (37°C, 5% CO₂, 95% vlažnosti). Zatim se ćelije tretiraju sa 100 μ L rastvora CPF i IMI, kao i sa 100 μ L rastvora ekstrakta lista imele, pojedinačno i u kombinaciji (opisano u 3.5.1. Dizajn *in vitro* eksperimenta), dok se kontrolnim (netretiranim) ćelijama doda 100 μ L DMEM-a, i ćelije se ponovo inkubiraju 24 i 72 sata. Nakon isteka vremena inkubacije u svaki bunarić doda se po 20 μ L MTT (koncentracije 5 mg/mL) i ćelije se inkubiraju 4 sata na 37°C. U ovoj reakciji žuto obojena so MTT prelazi u ljubičasti formazan u prisustvu enzima mitohondrijalne reduktaze, koja se nalazi samo u vijabilnim (živim) ćelijama. Dobijeni formazan se rastvara dodavanjem po 20 μ L DMSO u svaki bunarić, a intenzitet boje proporcionalan je količini vijabilnih ćelija. ApSORBANCE se očitavaju na 550 nm na ELISA čitaču (ELISA reader Optic System RT2100-C).

Ćelijska vijabilnost se izražava procentualno (%), kada se podeli apsorbancija ćelija koje su tretirane (A_{uzorka}) sa apsorbancijom kontrolnih (netretiranih) ćelija i taj broj pomnoži sa 100. Softer (CalcuSyn, BIOSOFT, Cambridge, UK) je korišćen za izračunavanje IC_{50} vrednosti, koje pokazuju citotoksične efekte (koncentracije tretmana koje inhibiraju rast ćelija za 50%).

$$[\% \text{ vijabilnosti ćelija}] = \frac{A_{uzorka}}{A_{kontrola}} \times 100$$

3.6. *In vivo* eksperimenti

3.6.1. Eksperimentalne životinje

U *in vivo* eksperimentima ove studije ispitivani su toksični efekti insekticida CPF i IMI, kao i mogući protektivni efekti ekstrakta lista imele na mužjacima pacova Wistar soja. Životinje su nabavljene sa Odeljenja za uzgoj laboratorijskih i eksperimentalnih životinja na Vojnomedicinskoj akademiji u Beogradu, starosti 8 nedelja i težine 220 ± 50 g. Čuvane su u plastičnim kavezima (po dve jedinke u svakom kavezu) u vivarijumu Instituta za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Kragujevcu. Životinje su gajene u kontrolisanim laboratorijskim uslovima pri temperaturi $20-22^{\circ}C$ i 12-časovnom ciklusu svetlost/mrak, dobijale su briketiranu hranu za glodare (Veterinarski zavod, Subotica) i vodu *ad libitum*.

Eksperimentalna istraživanja sprovedena su u skladu sa Zakonom o dobrobiti životinja i principima dobre laboratorijske prakse na osnovu direktiva Saveta Evrope (*European Council Directive*, 86/609/EEC) o zaštiti životinja koje se koriste u eksperimentalne i druge naučne svrhe, a odobrena su od strane Etičke komisije za zaštitu dobrobiti ogleđnih životinja Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Kragujevcu.

3.6.2. Eksperimentalni protokol *in vivo*

Period aklimatizacije životinja je trajao sedam dana pre početka tretmana, a tokom ogleda životinje su dobijale hranu i vodu *ad libitum*. Nakon isteka ovog perioda životinjama je ponovo izmerena telesna masa i 48 jedinki je podeljeno u 8 eksperimentalnih grupa, u svakoj grupi po 6 životinja ($n = 6$), na sledeći način:

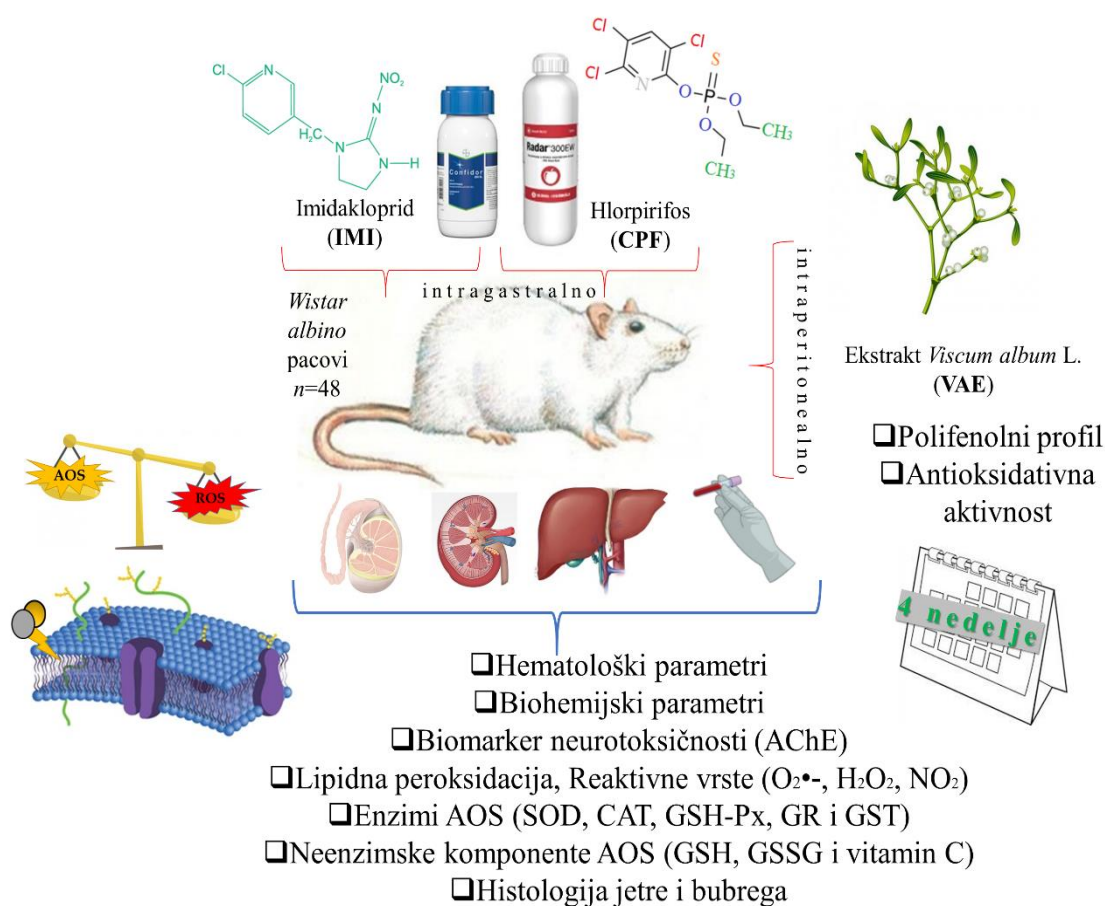
1. **Kontrola** je primala fiziološki rastvor (0,5 mL);
2. **CPF** grupa je tretirana samo hlorpirifosom (Chlorpyrifos – CPF), doza 10 mg/kg/dan, odnosno 35 mg/kg po tretmanu;
3. **IMI** grupa je tretirana samo imidaklopridom (Imidacloprid – IMI), doza 20 mg/kg/dan, odnosno 70 mg/kg po tretmanu;
4. **VAE1** grupa je dobijala ekstrakt imele (*Viscum album* ekstrakt – VAE) u dozi 100 mg/kg/dan, odnosno 350 mg/kg po tretmanu;
5. **CPF+VAE1** grupa je tretirana kao grupa 2, i dobijala je i ekstrakt imele u dozi 100 mg/kg/dan, odnosno 350 mg/kg po tretmanu (kao grupa 4);

6. **CPF+VAE2** grupa je tretirana kao grupa 2, i dobijala je i ekstrakt imele u dozi od 50 mg/kg/dan, odnosno 175 mg/kg po tretmanu;

7. **IMI+VAE1** grupa je tretirana kao grupa 3, i dobijala je i ekstrakt imele u dozi 100 mg/kg/dan, odnosno 350 mg/kg po tretmanu (kao grupa 4);

8. **IMI+VAE2** grupa je tretirana kao grupa 3, i dobijala je i ekstrakt imele u dozi od 50 mg/kg/dan, odnosno 175 mg/kg po tretmanu.

Životinje su tretirane pre podne između 9:00 i 10:00 dva puta nedeljno u toku 4 nedelje, pri čemu je kontrola dobijala fiziološki rastvor (0,5 mL) putem intragastralne sonde *per os* (*p.o.*), CPF i IMI su davani u zapremini od 2 mL *p.o.*, a vodeni rastvor ekstrakta lista imele (VAE1 i VAE2) je davan intraperitonealno (*i.p.*) u zapremini od 0,5 mL. Tretman dva puta sedmično je izabran prema studiji Elsharkawy i saradnika (2013). Akutna oralna LD₅₀ za CPF je kod pacova 229 mg/kg t.m. (WHO, 2009), dok je za IMI 450 mg/kg t.m. (Tomlin i Tomlin, 1997). Izabrane koncentracije za CPF i IMI su u skladu sa studijama Albasher i sar. (2020) i Vohra i sar. (2014).



Slika 24. Shematski prikaz *in vivo* tretmana

3.6.3. Žrtvovanje životinja i priprema uzoraka

Nakon 48 sati od završetka tretmana u trajanju od 4 nedelje životinjama je ponovo izmerena telesna masa. Zatim je svaka životinja anestezirana etrom i žrtvovana dekapitacijom.

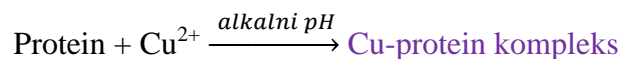
Za određivanje hematoloških parametara puna krv je sakupljena u mikrotube koje sadrže K-EDTA kao antikoagulans. Analize su obavljene istog dana u akreditovanoj biohemijskoj laboratoriji u Kragujevcu. Za određivanje biohemijskih parametara uzorkovana je krv bez upotrebe antikoagulansa, uzorci su ostavljeni na sobnoj temperaturi i centrifugirani 10 min. na 1000×g. Nakon centrifugiranja izdvojen je serum, zamrznut i čuvan do izvođenja analiza. U serumu su određivani svi biohemijski parametri u akreditovanoj laboratoriji u Beogradu. Jetra, bubrezi i testisi su izdvojeni, merena je masa svakog organa, a zatim su isprani u fiziološkom rastvoru, u kome su zamrznuti na -80°C do izvođenja potrebnih analiza. Delovi tkiva jetre, bubrega i testisa su prema protokolu pripremani za određivanje proteina, AChE, enzima antioksidativnog sistema zaštite, redukovanog (GSH) i oksidovanog (GSSG) glutationa, vitamina C, LPO i reaktivnih vrsta ROS i RNS. Za histopatološke analize su odvojeni uzorci tkiva jetre i bubrega i odmah su fiksirani u 4% formalinu.

3.6.4. Analize hematoloških i biohemijskih parametara

Hematološke analize su obuhvatile određivanje broja eritrocita (RBC - *Red Blood Cells*), koncentracije hemoglobina (Hb), hematokrita (Hct), broja leukocita (WBC - *White Blood Cells*) i trombocita (Plt - *Platelet*). Analize su sprovedene korišćenjem standardnih metoda i protokola na automatizovanom hematološkom analizatoru *Horiba Medical ABX Micros 60* (Japan).

Biohemijske analize u serumu obuhvatile su određivanje sledećih parametara: koncentracije ukupnih proteina, albumina, glukoze, ukupnog holesterola, triglicerida, bilirubina, uree, kreatinina, kao i aktivnosti alanin aminotransferaze (ALT), aspartat aminotransferaze (AST), laktat dehidrogenaze (LDH) i holinesteraze (ChE). Sve biohemijske analize su određene na automatskom analizatoru *Cobas Integra 400+* (Roche Diagnostics, Switzerland), korišćenjem dijagnostičkih setova i prema kliničkim protokolima.

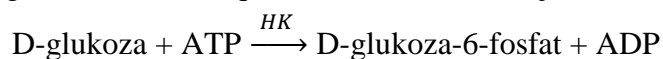
Ukupni proteini određivani su kolorimetrijskom metodom, koja se zasniva na reakciji dvovalentnog bakra i peptidnih veza proteina u alkalnom rastvoru, pri čemu se formira karakteristični ljubičasto obojeni biuretski kompleks:

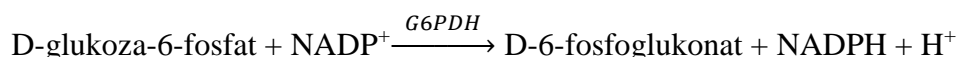


Na-K-tartarat sprečava taloženje bakar hidroksida, a kalijum jodid sprečava autoredukciju bakra. Intenzitet obojenja je direktno proporcionalan koncentraciji proteina i određuje se merenjem porasta apsorbanca na 552 nm. Ukupni proteini su izraženi u g/L.

Albumini – Za određivanje albumina u serumu korišćena je imunoturbidimetrijska metoda. Albumin formira precipitat sa specifičnim antiserumom što se određuje turbidimetrijski na 340 nm.

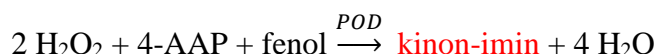
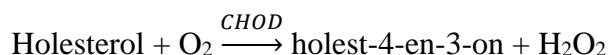
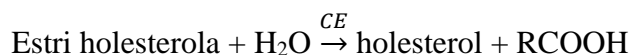
Glukoza – Heksokinaza (HK) katalizuje fosforilaciju glukoze pomoću ATP-a kako bi se formirali glukoza-6-fosfat i ADP. Zatim, enzim glukoza-6-fosfat dehidrogenaza (G6PDH) katalizuje oksidaciju glukoza-6-fosfata pomoću NADP⁺ i nastaje NADPH:





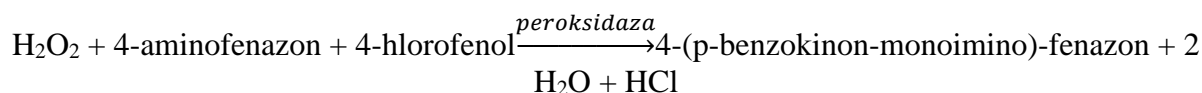
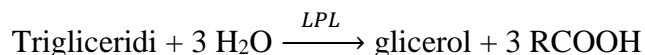
Koncentracija nastalog NADPH je direktno proporcionalna koncentraciji glukoze, određuje se praćenjem povećanja apsorbance na 340 nm i izražena je u mmol/L.

Ukupan holesterol – Holesterol je u serumu prisutan pretežno u obliku holesterol estara. Estri holesterola se cepaju pod uticajem holesterol esteraze, dajući slobodan holesterol i masne kiseline. Holesterol oksidaza zatim katalizuje oksidaciju holesterola u holest-4-en-3-on i vodonik-peroksid. U prisustvu peroksidaze formirani vodonik-peroksid utiče na oksidativno spajanje fenola i 4-aminoantipirina (4-AAP) u crvenu kinon-iminsku boju:

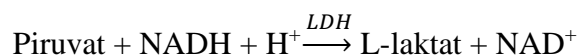
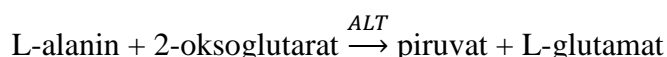


Intenzitet formiranog obojenja je direktno proporcionalan koncentraciji holesterola, a određuje se merenjem povećanja apsorbance na 512 nm i izražen je u mmol/L.

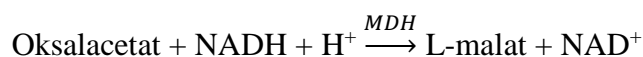
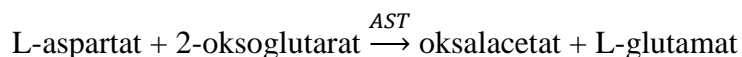
Trigliceridi – Metoda za određivanje triglicerida se bazira na korišćenju lipoproteinske lipaze iz mikroorganizama za brzu i kompletnu hidrolizu triglicerida do glicerola, nakon čega sledi oksidacija u dihidroksiaceton fosfat i vodonik-peroksid. Nastali vodonik-peroksid zatim reaguje sa 4-aminofenazonom i 4-hlorofenolom pod katalitičkim dejstvom peroksidaze i formira crveno obojenje. Intenzitet crvene boje je direktno proporcionalan koncentraciji triglicerida i meri se fotometrijski. Trigliceridi su izraženi u mmol/L.



ALT katalizuje reakciju između L-alanina i 2-oksoglutarata. Nastao piruvat se redukuje uz pomoć NADPH u reakciji katalizovanoj LDH da bi se formirao L-laktat i NAD^+ . Stepen oksidacije NADH je direktno proporcionalan katalitičkoj aktivnosti ALT, što se određuje merenjem pada apsorbance na 340 nm i izražena je u J/L.

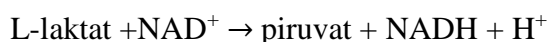


AST u uzorku katalizuje transfer amino grupe između L-aspartata i 2-oksoglutarata, pri čemu se formiraju oksalacetat i L-glutamat. Oksalacetat reaguje sa NADH u prisustvu malat dehidrogenaze (MDH) i formira se L-malat i NAD^+ :

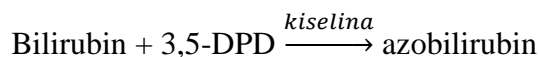


Stepen oksidacije NADH je direktno proporcionalan katalitičkoj aktivnosti AST i detektuje se merenjem pada apsorbance pri talasnoj dužini od 340 nm i izražena je u J/L.

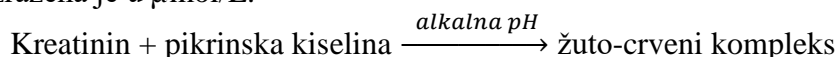
LDH u uzorku katalizuje konverziju L-laktata do piruvata, pri čemu se NAD^+ redukuje do NADH. Stepen oksidacije NADPH je direktno proporcionalan katalitičkoj aktivnosti LDH, a apsorbance se meri na 340 nm i izražena je u J/L.



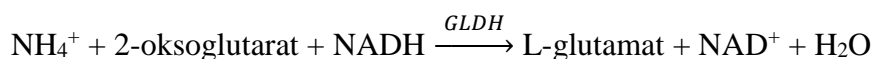
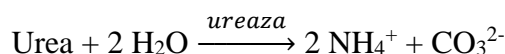
Bilirubin – Ukupni bilirubin u prisustvu odgovarajućeg rastvarajućeg agensa reaguje sa 3,5-dihlorofenil diazonijumom (3,5-DPD) u jako kiseljoj sredini i formira azobilirubin. Intenzitet formirane crvene boje je direktno proporcionalan ukupnom bilirubinu i meri se fotometrijski.



Kreatinin – U alkalnom rastvoru, kreatinin formira žuto-crveni kompleks sa pikratom. Brzina stvaranja boje proporcionalna je koncentraciji kreatinina u uzorku, a apsorbansa se meri na 520 nm i izražena je u $\mu\text{mol/L}$.



Urea – Dejstvom enzima ureaze molekul uree se hidrolizuje i nastaju amonijak i ugljen-dioksid. Zatim, u reakciji amonijaka sa 2-oksoglutaratom u prisustvu glutamat dehidrogenaze (GLDH) i koenzima NADH nastaje L-glutamat i NAD^+ . U ovoj reakciji dva mola NADH se oksiduju do NAD^+ za svaki mol hidrolizovane uree:



Stepen smanjenja koncentracije NADPH je direktno proporcionalan koncentraciji uree u uzorku, a detektuje se merenjem apsorbance na 340 nm i izražena je u mmol/L .

3.6.5. Priprema uzoraka tkiva homogenizacijom

Uzorci tkiva jetre, bubrega i testisa, koji su čuvani na -80°C , korišćeni su za pripremanje homogenata (10%) i određivanje parametara oksidativno-antioksidativnog statusa. Odmereno je po 500 mg ispitivanih uzoraka tkiva, koji su usitnjeni na ledu, a zatim homogenizerom (*IKA ULTRA-TURRAX T18 basic*, Germany) homogenizovani na ledu u 5 mL saharoznog pufera (koji sadrži 0,25 M saharozu, 0,1 M EDTA i 0,05 M Tris-HCl, pH 7.4). Odnos tkiva i pufera je bio 1:10 (w/v). Dobijeni homogenati su sonifikovani ultrasoničnim homogenizerom (*Bandelin Sonoplus HD2070*, Germany) na frekvenciji od 20 KHz u tri ponavljanja od 10 sekundi i zatim centrifugirani (*JANETZKI K-24*, Germany) 30 minuta na $15,000 \times g$ na $+4^\circ\text{C}$. Izdvojeni supernatanti tkiva su zamrznuti i čuvani na -80°C do daljih analiza.

3.6.5.1. Određivanje koncentracije proteina u tkivima

Kako bi se odredila aktivnost enzima u jetri, bubregu i testisu, potrebno je odrediti koncentraciju proteina prema metodi Lowry i sar. (1951). Ova metoda zasniva se na reakciji peptidnih veza proteina i Cu^{2+} jona u alkalnoj sredini (dolazi do redukcije Cu^{2+} u Cu^+ jon), kao i reakciji fosfomolibdensko-fosfovolframskog reagensa (*Folin-Ciocalteu*) sa kompleksom Cu^+ -protein, kao i sa aromatičnim aminokiselinama triptofanom, tirozinom i cisteinom, koje su prisutne u proteinima. Kao proizvod reakcije nastaje jedinjenje plave boje sa maksimumom apsorpcije pri talasnoj dužini od 500 nm. Intenzitet boje je srazmeran koncentraciji proteina prisutnih u supernatantu tkiva.

Korišćeni rastvori:

- 1) 0,2 N NaOH
- 2) reagens I (2 % Na₂CO₃ + 0,2 N NaOH)
- 3) 0,13 M CuSO₄ · 5H₂O
- 4) 0,13 M K-Na-tartarat
- 5) reagens II (1 mL 0,13 M CuSO₄·5H₂O + 1 mL 0,13 M K,Na-tartarat, dopuniti do 100 mL Reagensom I)
- 6) *Folin-Ciocalteu* reagens (razblažen u odnosu 1:2 sa destilovanom vodom)
- 7) standardni rastvor goveđeg seruma albumina (BSA- *Bovine Serum Albumin*)

Procedura:

Da bi se odredila koncentracija proteina konstruisana je kalibraciona kriva. Za pravljenje serije razblaženja (koncentracija 100, 200, 300, 400, 500, 600 i 700 µg/mL) korišćen je kao standard goveđi serum albumin (engl. *Bovine Serum Albumin*, BSA) rastvoren u destilovanoj vodi (10 mg BSA u 10 mL dH₂O).

Za analize su korišćeni uzorci supernatanta ispitivanih tkiva određenog razblaženja kako bi dobijena koncentracija proteina bila u opsegu kalibracione krive. U epruvete se odmeri 3 mL reagens II, zatim se doda po 0,1 mL razblaženog uzorka i 0,1 mL 0,2 N NaOH. Epruvete se promućkaju i inkubiraju 15 min. na sobnoj temperaturi. Zatim se u epruvete doda 0,6 mL razblaženog *Folin-Ciocalteu* reagensa, dobro se promućkaju i inkubiraju na sobnoj temperaturi 30 min. Standardni rastvori albumina i slepa proba se pripremaju istovetno (umesto uzorka tkiva dodaje se ista zapremina rastvora BSA, ili dH₂O za slepu probu). Vrednosti apsorbanci se očitavaju spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 500 nm u poređenju sa slepom probom. Koncentracije proteina u uzorcima ispitivanih tkiva izračunavaju se korišćenjem kalibracione krive i izražene su u mg proteina/mL homogenata tkiva (mg/mL).

3.6.6. Određivanje aktivnosti enzima antioksidativnog sistema zaštite

3.6.6.1. Određivanje aktivnosti SOD

Za određivanje aktivnosti enzima superoksid-dismutaze (SOD) u tkivima jetre, bubrega i testisa korišćena je pirogalolska metoda prema Marklund i Marklund (1974), koja se zasniva na sposobnosti enzima SOD da inhibira spontanu autooksidaciju pirogalola u baznoj sredini.

Korišćeni rastvori:

- 1) Tris-HCl pufer (1 M Tris-HCl + 5 mM EDTA), pH 8,0 (podešava se sa 10% HCl)
- 2) pirogalol (10 mM pirogalol u 10 mM HCl)

Procedura:

U kivetu se doda 100 µL Tris-HCl pufera, zatim 10 µL uzorka (supernatanta tkiva), 20 µL rastvora pirogalola i na kraju 1 mL destilovane vode. Slepa proba se priprema bez uzorka tkiva. Promene apsorbanci se mere na spektrofotometru u toku 4 minuta, na talasnoj dužini od 420 nm. Aktivnost SOD se dobija na osnovu promena apsorbanci uzoraka i slepe probe na sledeći način:

$$\text{SOD} \left(\frac{J}{mg} \right) = \frac{2 \times (\Delta A \text{ slepe probe} - \Delta A \text{ uzorka})}{V \text{ uzorka (ml)} \times \Delta A \text{ slepe probe} \times \text{konc. proteina} \left(\frac{mg}{ml} \right)}$$

Dobijene vrednosti aktivnosti enzima SOD su izražene u jedinicama (J) po mg proteina u supernatantu tkiva (J/mg proteina).

3.6.6.2. Određivanje aktivnosti CAT

Aktivnost enzima katalaze (CAT) određena je u supernatantima jetre, bubrega i testisa metodom koja se zasniva na merenju brzine razgradnje H_2O_2 na H_2O i O_2 uz pomoć CAT, a meri se spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 230 nm (Beutler, 1982).

Korišćeni rastvori:

- 1) Tris-HCl pufer (1 M Tris-HCl + 5 mM EDTA), pH 8,0 (podešava se sa 10% HCl)
- 2) 10 mM H_2O_2

Procedura:

U kvarcnu kivetu se doda 50 μL Tris-HCl pufera i 5-10 μL uzorka u zavisnosti od tkiva. Za jetru i bubrege su prethodno pravljena razblaženja ($R=21$). Na kraju se dodaje 1 mL 10 mM H_2O_2 . Smanjenje apsorbance usled potrošnje H_2O_2 je proporcionalno aktivnosti enzima CAT u uzorku tkiva, i prati se u toku 2,5 minuta na talasnoj dužini od 230 nm. U ovoj metodi koristi se 10 mM H_2O_2 , jer ova koncentracija sprečava stvaranje većeg broja mehurića u kiveti tokom oslobađanja O_2 . Da bi se dobila 10 mM H_2O_2 izmeri se apsorbance 0,9 mL 1 M fosfatnog pufera (pH 7,0) koji je prethodno razblažen sa dH_2O u odnosu 1:10, pri čemu je dobijena vrednost OD_1 . Nakon toga se doda 0,1 mL 30% rastvora H_2O_2 razblaženog sa dH_2O u odnosu 1:100 i očitana vrednost apsorbance je OD_2 . Koncentracija razblaženog H_2O_2 se dobija na osnovu primene obrasca: $C = 141 \text{ mM} \times (\text{OD}_2 - \text{OD}_1)$. Koncentracija od 10 mM se podešava razblaženjem 30% rastvora H_2O_2 sa dH_2O u odnosu $C/10$. Aktivnost CAT dobija se na osnovu promene apsorbance i milimolarnog ekstinkcionog koeficijenta (za H_2O_2 na 230 nm iznosi 0,071), a prema sledećoj formuli:

$$\text{CAT} \left(\frac{\text{J}}{\text{mg}} \right) = \frac{R \times \Delta A}{\text{konc. proteina} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) \times V \text{ uzorka (ml)} \times \varepsilon}$$

Aktivnost enzima CAT izražava se u jedinicama po miligramu proteina (J/mg proteina).

3.6.6.3. Određivanje aktivnosti GSH-Px

Za određivanje aktivnosti enzima glutation peroksidaze (GSH-Px) u supernatantima jetre, bubrega i testisa korišćena je metoda Tamura i sar. (1982). Metoda se zasniva na zajedničkoj aktivnosti enzima GSH-Px i GR. GSH-Px redukcijom H_2O_2 i organskih hidroperoksida katalizuje oksidaciju GSH u GSSG, a zatim u prisustvu GR katalizuje se redukcija GSSG u GSH, pri čemu se oksiduje koenzim NADPH u NADP^+ .

Korišćeni rastvori:

- 1) 0,2 mM NADPH (rastvoren u 1% NaHCO_3)
- 2) 1 mM GSH
- 3) 1 mM NaN_3
- 4) 1mM EDTA
- 5) 0,5 M fosfatni pufer (0,5 M K_2HPO_4 + 0,5 M KH_2PO_4), pH 7,0
- 6) 0,03 M t-butil hidroperoksid
- 7) GR (100 J./mL)

Procedura:

U kvarcnu kivetu se dodaje redom 1,6 mL dH₂O, 0,6 mL NADPH, 0,3 mL rastvora GSH, 0,1 mL NaN₃ (koji ima sposobnost da inaktivira CAT), 0,1 mL EDTA, 0,3 mL 0,5 M fosfatnog pufera (pH 7,0), zatim 0,1 mL t-butil hidroperoksida i određena zapremina uzorka (15 µL supernatanta jetre i bubrega, ili 50 µL supernatanta testisa). Reakcija započinje kada se doda 5 µL GR. Za slepu probu se koriste svi rastvori izuzev uzorka. Promene apsorbanca uzorka i slepe probe se očitavaju u toku 3 minuta pri talasnoj dužini od 340 nm. Aktivnost enzima se izračunava na osnovu promena apsorbanca i molarnog ekstincionog koeficijenta za koenzim NADPH koji iznosi $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

$$\text{GSH-Px} \left(\frac{\text{J}}{\text{mg}} \right) = \frac{(\Delta A \text{ uzorka} - \Delta A \text{ slepe probe}) \times 1.5 \times 1000}{6.22 \times V \text{ (ml)} \times \text{konc. proteina} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right)}$$

Aktivnost enzima GSH-Px se izražava u J/mg proteina, i ova jedinica aktivnosti predstavlja količinu nmol NADPH koja je oksidovana u jednom minutu (nmol NADPH/min).

3.6.6.4. Određivanje aktivnosti GR

Za određivanje aktivnosti enzima glutation reduktaze (GR) korišćena je metoda prema Glatzle i sar. (1974). Metoda se zasniva na redukciji GSSG u GSH u prisustvu koenzima NADPH, koju katalizuje GR. Aktivnost GR se prati preko oksidacije NADPH u NADP⁺ spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 340 nm.

Korišćeni rastvori:

- 1) 0,5 M fosfatni pufer (0,5 M K₂HPO₄ + 0,5 M KH₂PO₄), pH 7,4
- 2) 2 mM GSSG
- 3) 0,5 mM EDTA
- 4) 0,1 mM NADPH (rastvoren u 1% NaHCO₃)

Procedura:

U kvarcnu kivetu za očitavanje na spektrofotometru se dodaje 0,6 mL fosfatnog pufera (pH 7,4), zatim 0,1 mL GSSG, 0,1 mL EDTA, 2 mL dH₂O i uzorak tkiva (10 µL supernatanta jetre i bubrega, odnosno 100 µL supernatanta testisa). Dodavanjem 0,1 mL NADPH započinje reakcija. Za slepu probu se koriste svi rastvori osim uzorka. U toku 3 minuta mere se promene apsorbanca uzorka i slepe probe. Aktivnost enzima GR se dobija na osnovu promena vrednosti apsorbanca i molarnog ekstincionog koeficijenta koji za NADPH na 340 nm iznosi $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, a izražava se u J/mg proteina. Jedinica aktivnosti GR predstavlja broj nmol NADPH koji se oksiduje u jednom minutu (nmol NADPH/min).

$$\text{GR} \left(\frac{\text{J}}{\text{mg}} \right) = \frac{(\Delta A \text{ uzorka} - \Delta A \text{ slepe probe})}{6.22 \times V \text{ uzorka (ml)} \times \text{konc. proteina} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right)}$$

3.6.6.5. Određivanje aktivnosti GST

Za određivanje aktivnosti enzima glutation-S-transferaze (GST) u ispitivanim tkivima korišćena je metoda Habig i sar. (1974). Princip ove metode se zasniva na katalizi reakcije vezivanja 1-hloro-2,4-dinitro-benzena (CDNB) za -SH grupu aminokiseline cisteina iz GSH

pomoću enzima GST, tokom koje nastaje CDNB-GSH konjugat. Formirajem ovog konjugata beleži se porast apsorbance koja je proporcionalna aktivnosti GST ispitivanog uzorka, a meri se spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 340 nm.

Korišćeni rastvori:

- 1) 0,5 M fosfatni pufer (0,5 M K₂HPO₄ + 0,5 M KH₂PO₄), pH 6,5
- 2) 25 mM CDNB u 95% etanolu
- 3) 20 mM GSH

Procedura:

U kvarcnu kivetu se prvo doda 1 mL dH₂O, zatim 50 µL CDNB rastvora u 95% etanolu, 300 µL fosfatnog pufera (pH 6,5), 150 µL GSH i na kraju se doda uzorak (supernatanti tkiva: 10 µL jetre, 20 µL bubrega i 5 µL testisa) kojim otpočinje reakcija. Slepa proba se priprema bez uzorka tkiva. Promene apsorbanci uzorka i slepe probe se očitavaju spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 340 nm u toku 3 minuta. Aktivnost enzima GST se preračunava na osnovu promene apsorbanci i korišćenjem molarnog ekstinkcionog koeficijenta za CDNB-GSH konjugat koji iznosi 9,6×10³ M⁻¹cm⁻¹. Dobijene vrednosti se izražavaju u J/mg proteina i predstavljaju broj nmol CDNB-GSH konjugata koji je nastao u jednom minutu, odnosno nmol CDNB-GSH/min.

$$\text{GST} \left(\frac{\text{J}}{\text{mg}} \right) = \frac{(\Delta A \text{ uzorka} - \Delta A \text{ slepe probe}) \times 1.5 \times 1000}{9.6 \times V \text{ uzorka (ml)} \times \text{konc. proteina} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right)}$$

3.6.7. Određivanje neenzimskih komponenti antioksidativnog sistema zaštite

3.6.7.1. Određivanje koncentracije glutationa

Za određivanje koncentracija redukovano (GSH) i oksidovanog (GSSG) glutationa u ispitivanim tkivima dodato je 125 µL 10% sulfosalicilne kiseline u 250 µL homogenata. Uzorci su centrifugirani 5 min. na 10.000 rpm na +4°C, a dobijeni supernatanti tkiva se koriste za dalje analize.

Za određivanje ukupnog i redukovano glutationa (GSH) korišćena je metoda Baker i sar. (1990) uz izvesne modifikacije. Metoda je zasnovana na oksidaciji redukovane forme glutationa (GSH) uz pomoć sulfidnog reagensa (5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoeva kiselina), DTNB), pri čemu se gradi žuto jedinjenje (5'-tio-2-nitrobenzoeva kiselina, TNB) i oksidovani glutation (GSSG, glutation disulfid).

Ukupni glutation

Korišćeni rastvori:

- 1) Fosfat-EDTA pufer (100 mM fosfat + 1 mM EDTA, pH 7,4)
- 2) reakciona smeša (150 µL fosfat-EDTA pufer (pH 7,4) + 0,7 U glutation reduktaze (GR)/mL reakcione smeše + 1 mM NADPH + 1 mM DTNB)
- 3) rastvor GSH kao standard

Procedura:

Za konstrukciju kalibracione krive korišćena je serija rastvora GSH kao standarda (koncentracije 15, 30, 45, 60 i 100 $\mu\text{mol/mL}$). U svaki bunarić mikrotitar ploče se doda po 50 μL supernatanta tkiva i po 100 μL reakcione smeše, napravljene neposredno pre početka analize. Na isti način je urađen protokol za standardne rastvore i slepu probu (bez uzorka tkiva). Da bi se dobile vrednosti ukupnog glutaciona reakcionoj smeši je dodat GR koji redukuje GSSG u GSH u prisustvu koenzima NADPH. Ploče se inkubiraju 5 min. na sobnoj temperaturi, nakon čega se apsorbance očitavaju na 405 nm na ELISA čitaču (ELISA reader Optic System, Model 2100-C; Biotech SL, Spain). Određen je ekstinkcioni koeficijent (F) na osnovu vrednosti apsorbanci i koncentracija serije standardnih rastvora GSH dobijen prema jednačini kalibracione krive:

$$F = (A1/C1 + A2/C2 + \dots + A5/C5)/5$$

$$\text{nmol GSH} = A/F$$

Koncentracije ukupnog GSH su izračunate na osnovu vrednosti apsorbanci uzoraka i ekstinkcionog koeficijenta F, a izražene su u nmol GSH/mg tkiva.

Redukovani glutation (GSH)

Korišćeni rastvori:

- 1) Fosfat-EDTA pufer (100 mM fosfat + 1 mM EDTA, pH 7,4)
- 2) reakciona smeša (150 μL fosfat-EDTA pufer (pH 7,4) + 1 mM NADPH + 1 mM DTNB)

Procedura:

U bunariće mikrotitar ploče se doda po 50 μL supernatanta tkiva (jetre, bubrega i testisa), zatim se doda po 100 μL reakcione smeše (bez dodavanja GR) pripremljene pre početka analize. Ploče se zatim inkubiraju 5 min. na sobnoj temperaturi, a zatim se apsorbance očitavaju na 405 nm na ELISA čitaču. Za izračunavanje koncentracije GSH potrebno je konstruisati kalibracionu krivu na osnovu vrednosti apsorbanci serije poznatih koncentracija GSH. Koncentracije redukovanog GSH su izražene u nmol/mg tkiva.

Koncentracije oksidovanog glutaciona (GSSG) su izražene u nmol/mg tkiva, a dobijaju se oduzimanjem vrednosti redukovanog glutaciona od ukupnog glutaciona.

3.6.7.2. Određivanje koncentracije vitamina C

Princip dinitrofenilhidrazinske metode (Omaye i sar., 1979), koja je korišćena za određivanje koncentracije vitamina C u tkivima, zasniva se na oksidaciji askorbinske kiseline (AsA, Vit C) u dehidroaskorbinsku kiselinu (DAsA) pomoću aktivnog uglja, a zatim DAsA spontano prelazi u diketogulonsku kiselinu. U prisustvu rastvora 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNFH) diketogulonska kiselina gradi derivat bis-2,4-dinitro-fenilhidrazon, koji se rastvara u sumpornoj kiselini, dajući postojanu crveno-braonkastu boju, a apsorbance se očitavaju spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 540 nm. Uloga aktivnog uglja, koji se dodaje uzorcima tkiva pored oksidacije AsA u DAsA, ima i ulogu u obezbojavanju rastvora.

Korišćeni rastvori:

- 1) 6% trihlorsirćetna kiselina (TCA)
- 2) 9 N sumporna kiselina (H₂SO₄)
- 3) 85% sumporna kiselina (H₂SO₄)
- 4) 2,4-DNFH-tiokarbamidni reagens: rastvor 2,4-dinitrofenilhidrazina i tiouree (1 g 2,4-DNFH i 2 g (NH₂)₂CS rastvori se u 50 ml 9N H₂SO₄, filtrira Whatman N°12 filter papirom i čuva na +4°C u tamnoj boci)
- 5) aktivni ugalj
- 6) standardni rastvor askorbinske kiseline (C₆H₈O₆, Merck)

Procedura:

Da bi se odredila koncentracija vitamina C konstruisana je kalibraciona kriva. Za pravljenje serije razblaženja (koncentracija 8-80 µg/mL) korišćena je askorbinska kiselina (20 mg) rastvorena u 10 mL 6% TCA. Očitavanjem vrednosti apsorbanaci standardnih rastvora različitih koncentracija konstruisana je kalibraciona kriva.

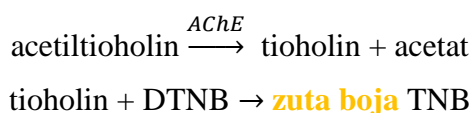
Na vagi se odmeri 100 mg tkiva (jetre i testisa) i pripreme homogenati sa 6 mL TCA, koji se zatim centrifugiraju 15 min. na 1500×g. Dobijenim supernatantima, koji se izdvoje u čiste epruvete, doda se 0,1 g aktivnog uglja i nakon mućkanja i inkubacije od 10 min. na sobnoj temperaturi rastvor se filtrira Whatman N°12 filter papirom. U epruvete sa zapušačem odmeri se 2 mL filtrata (uzorak tkiva i standard) i doda po 0,5 mL 2,4-DNFH-tiokarbamidnog reagensa. Za slepu probu se umesto uzorka doda 2 mL 6% TCA. Svi uzorci se inkubiraju 10 min. na 100°C, a zatim se epruvete prenesu u ledeno vodeno kupatilo (na 0°C) i brzo ohlade. Nagrađeni hidrazoni rastvaraju se dodavanjem po 2,5 mL 85% H₂SO₄ (kap po kap uz mešanje). Epruvete se zatim inkubiraju 10 min. na sobnoj temperaturi. Vrednosti apsorbanaci se očitavaju spektrofotometrijski na 540 nm u poređenju sa slepom probom. Koncentracije vitamina C u uzorcima ispitivanih tkiva izračunavaju se korišćenjem kalibracione krive standardnih rastvora i izražene su u µg% Vit C, odnosno µg Vit C na 100 mg tkiva.

$$\mu\text{g sa krive} \times 1.5 \times \frac{100}{\text{masa tkiva (mg)}} = \mu\text{g} \frac{\text{Vit C}}{100} \text{mg tkiva}$$

3.6.8. Određivanje aktivnosti holinesteraza

3.6.8.1. Određivanje aktivnosti acetilholinesteraze

Metoda koja je korišćena za određivanje aktivnosti acetilholinesteraze (AChE) opisali su Ellman i sar. (1961). Princip metode se zasniva na hidrolizi supstrata (acetiltioholin jodida, AthChI) katalitičkom aktivnošću enzima AChE, i nastaju tioholin i acetat (sirćetna kiselina). U reakciji tioholina sa reagensom DTNB nastaje jedinjenje žute boje (5'-tio-2-nitrobenzoeva kiselina, TNB). Enzimska aktivnost se određuje porastom intenziteta žute boje TNB spektrofotometrijski na 406 nm.



Korišćeni rastvori:

- 1) 0,05 M fosfatni pufer (pH 7,9)
- 2) 0,25 mM DTNB
- 3) 0,156 M AthChI

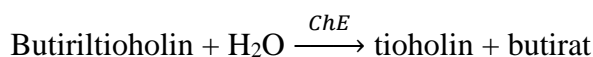
Procedura:

U kvarcnu kivetu se odmeri 3 mL fosfatnog pufera i doda se 0,1 mL acetiltioholin jodida (AthChI) i uzorak (15 μ L supernatanta jetre, a po 20 μ L supernatanta bubrega i testisa). Slepa proba se priprema bez uzorka tkiva. Promena apsorbance se prati na talasnoj dužini od 406 nm u toku 1 min, čemu prethodi pauza od 1 min. Aktivnost enzima se preračunava prema slepoj probi i izražava se u μ mol/min/g tkiva.

$$AChE = \frac{(\Delta A \text{ uzorka} - \Delta A \text{ slepe probe}) \times 1.56 (\text{zapremina kivete u ml}) \times 1000}{13.33 \left(\frac{cm}{\mu mol}\right) \times 1 (cm) \times V \text{ uzorka (ml)} \times 1.67 \left(\frac{mg}{ml}\right)}$$

3.6.8.2. Određivanje aktivnosti holinesteraze

Aktivnost enzima holinesteraze (ChE) u serumu je određena po metodi koju su opisali Schmidt i sar. (1992). Holinesteraza katalizuje hidrolizu supstrata butiriltioholina (butiriltioholin jodida) do tiholina i butirata. Tioholin smanjuje žuti heksacijanoferat (III) do skoro bezbojnog heksacijanoferata (II). Obezbojavanje rastvora se meri spektrofotometrijski na talasnim dužinama između 405 i 415 nm. Aktivnosti enzima ChE u serumu su izražene u jedinicama (J) po litru (J/L).

**3.6.9. Određivanje parametara redoks statusa**

Za određivanje koncentracija reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) i azota (RNS) u tkivima jetre, bubrega i testisa vršena je ekstrakcija 200 μ L homogenata tkiva uz dodavanje 100 μ L 3 M perhlorne kiseline (PCA) i 400 μ L 20 mM EDTA. Uzorci su inkubirani 15 min. na ledu (0°C), a zatim centrifugirani 5 min. na 10000 rpm na +4°C. Dobijeni supernatanti tkiva (~1 mL) su neutralisani sa 2 M K₂CO₃ (~150 μ L) i koriste se za dalje analize.

3.6.9.1. Određivanje koncentracije superoksid radikala

Za određivanje koncentracije superoksid radikala (O₂⁻) u uzorcima tkiva korišćena je metoda Auclair i Voisin (1985). Metoda se zasniva na redukciji nitroblu-tetrazolijuma (NBT) do nitroblu-formazana plave boje u prisustvu O₂⁻ radikala. Količina redukovano formazana je proporcionalna koncentraciji O₂⁻ koji se stvara u biološkim i hemijskim sistemima.

Korišćeni rastvori:

- 1) 50 mM Tris-HCl pufer (pH 8,6)
- 2) 0,1 mM EDTA
- 3) 0,1 mM NBT
- 4) 0,1 mg/mL gelatin
- 5) reakciona smeša (50 mM Tris-HCl pufer (pH 8.6) + 0,1 mM EDTA + 0,1 mM NBT + 0,1 mg/mL gelatin)

Procedura:

U bunariće mikrotitar ploče se dodaje po 190 μL reakcione smeše napravljene neposredno pre početka analize. Ploče se inkubiraju 5 min. na sobnoj temperaturi, a zatim se apsorbance (A_1) očitavaju na 550 nm na ELISA čitaču (ELISA reader Optic System, Model 2100-C; Biotech SL, Spain). Zatim se u svaki bunarić dodaje po 10 μL supernatanta tkiva i ploče se inkubiraju 5 min. na sobnoj temperaturi, a zatim se očitavaju apsorbance (A_2) na 550 nm na ELISA čitaču.

Koncentracija $\text{O}_2^{\cdot-}$ radikala se preračunava kao razlika vrednosti apsorbanci ($A_2 - A_1$) podeljene sa molarnim ekstinkcionim koeficijentom koji za 1 $\mu\text{mol/mL}$ monoformazana iznosi $15 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ i izražava se u nmol/mg tkiva.

3.6.9.2. Određivanje koncentracije vodonik peroksida

Za određivanje koncentracije vodonik peroksida (H_2O_2) u uzorcima tkiva korišćena je kolorimetrijska metoda Pick i Keisari (1980). Metoda se zasniva na sposobnosti H_2O_2 da oksiduje fenol crveno (*Phenol Red*) u prisustvu peroksidaze rena (engl. *horseradish peroxidase* – HRPO) kao katalizatora.

Korišćeni rastvori:

- 1) 0,28 mM fenol crveno (*phenol red solution* - PRS)
- 2) peroksidaza rena – HRPO tip II enzim (1 J./mL)
- 3) 1 M NaOH
- 4) reakciona smeša [0,28 mM fenol crveno (PRS) + peroksidaza rena (1 J./mL)]

Procedura:

U bunariće mikrotitar ploče se dodaje po 50 μL supernatanta tkiva i 50 μL reakcione smeše napravljene neposredno pre početka analize. Ploče se inkubiraju 60 min. na 37°C , a zatim se dodaje u svaki bunarić po 10 μL 1 M NaOH. Serija standardnih rastvora H_2O_2 (koncentracija 2,5, 5, 10 i 20 nmol/mL) i slepa proba su prošli istu proceduru. Vrednosti apsorbanci se očitavaju na 600 nm na ELISA čitaču (ELISA reader Optic System, Model 2100-C; Biotech SL, Spain) u poređenju sa slepom probom. Koncentracije H_2O_2 u uzorcima ispitivanih tkiva izračunavaju se korišćenjem kalibracione krive standardnih rastvora i izražene su u nmol/mg tkiva.

3.6.9.3. Određivanje koncentracije nitrita

Koncentracija nitrita (NO_2^-), kao indikatora NO, određena je kolorimetrijskom metodom prema Green i sar. (1982). Metoda se zasniva na oksidaciji NO u NO_2^- koji u reakciji sa sulfanil-amidnom kiselinom i N-1-naftiletildiamin dihidrochloridom (NED) daje stabilno azotno jedinjenje purpurne boje.

Korišćeni rastvori:

- 1) sulfanilamidni reagens (1% sulfanilamid + 5% fosforna kiselina)
- 2) 0,1% N-1-naftiletildiamin dihidrochlorid [N-(1-Naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride – NED]

Procedura:

U bunariće mikrotitar ploče doda se po 50 μL supernatanta tkiva i 50 μL sulfanilamidnog reagensa napravljene neposredno pre početka analize. Ploče se inkubiraju 10 min. na sobnoj temperaturi, a zatim se doda u svaki bunarić po 50 μL NED i ponovo inkubiraju 10 min. na sobnoj temperaturi, zaštićeni od svetla. Serije standardnih rastvora nitrita (100 mM) u koncentracijama od 1,56 μM , 3,13 μM , 6,25 μM , 12,5 μM , 50 μM i 100 μM su prošli kroz istu proceduru. Vrednosti apsorbanci se očitavaju na 550 nm na ELISA čitaču (ELISA reader Optic System, Model 2100-C; Biotech SL, Spain) u poređenju sa slepom probom. Koncentracije nitrita u uzorcima ispitivanih tkiva izračunavaju se korišćenjem kalibracione krive standardnih rastvora i izražene su u nmol/mg tkiva.

3.6.10. Određivanje koncentracije lipidnih peroksida

Određivanje koncentracije lipidnih peroksida (LPO) u tkivima jetre, bubrega i testisa rađeno je prema metodi Rehnrona i sar. (1980), koja se zasniva na reakciji krajnjih proizvoda procesa lipidne peroksidacije (malondialdehida – MDA) sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA). Za određivanje koncentracije LPO u ispitivanim tkivima odmereno je 100 mg tkiva i homogenizovano u 1 mL 1,15% KCl (odnos 1:10). Dobijeni homogenati tkiva se koriste za dalje analize.

Korišćeni rastvori:

- 1) 40% TCA
- 2) 0,3% NaOH
- 3) 0,6% TBA (u 0,3% NaOH)

Procedura:

U 300 μL homogenata ispitivanih tkiva je dodato 100 μL 40% TCA. Uzorci su inkubirani 15 min. na ledu (0°C), a zatim centrifugirani 10 min. na 1000 \times g na 4°C. Dobijeni supernatanti tkiva se odmere i u svaki uzorak od 300 μL doda se po 100 μL TBA, sadržaj se dobro promućka i inkubira u vodenom kupatilu 15 min. na 100°C. Za slepu probu se umesto uzorka doda ista zapremina TCA. Uzorci su zatim ohlađeni na sobnoj temperaturi, a vrednosti apsorbanci se očitavaju na ELISA čitaču (ELISA reader Optic System, Model 2100-C; Biotech SL, Spain) na 530 nm. Koncentracija LPO se preračunava kao razlika vrednosti apsorbanci uzorka i slepe probe uz korišćenje molarnog ekstinkcionog koeficijenta za MDA ($1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) i izražava se u nmol MDA/mg tkiva.

$$\text{MDA (nmol/mg tkiva)} = \Delta A \times R \times 10^6 / \epsilon$$

3.6.11. Histopatološka analiza isečaka jetre i bubrega

Da bi se ispitao uticaj tretmana insekticidima i ekstraktima lista imele na strukturu tkiva jetre i bubrega, delovi tkiva su korišćeni za histopatološke analize. Odvojeni su uzorci tkiva jetre i jedan bubreg i fiksirani u 4% rastvoru formalina u toku 24 sata. Nakon fiksacije, uzorci tkiva se ispiraju vodom, a zatim se prenose u automatizovani tkivni procesor (TP1050, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Germany), u kome se vrši uklanjanje vode, odnosno

dehidratacija tkiva kroz seriju rastvora alkohola rastućih koncentracija (50%, 70%, 96% i 100%). Zatim, uzorci tkiva se stavljaju u organski rastvarač ksilol, koji omogućava da se strukture u tkivu bolje vide, a predstavlja ujedno i medijum u kome se parafin dobro rastvara. Uzorci tkiva se zatim tretiraju parafinom, stavljaju se u modlice u koje se uliva rastopljeni parafin, i kalupe se u parafinske blokove. Nakon hlađenja, kada parafin očvrne, kalup sa parafinom se postavlja na mikrotom (Leica RM2035, Austria), uređaj za sečenje tkivnih preseka. Dobijeni preseki debljine 4-6 μm se stavljaju na predmetnu pločicu, ali pošto se parafin još uvek nalazi u tkivu neophodno je njegovo izvlačenje (deparafinizacija) rastvaranjem u organskom rastvaraču ksilolu. Nakon toga vrši se rehidratacija tkiva kroz seriju opadajućih koncentracija rastvora alkohola (100%, 96% i 70%). Uzorci tkiva su zatim isprani dH_2O i ovaj postupak omogućava da boje bolje prodru u tkivo.

Tkivni preseki se zatim boje hematoksilinom i eozinom (H&E bojenje), a višak boje se ispira. Kako bi se dobio trajni preparat, tkivni presek se ponovo dehidriše alkoholima i prekrije pokrovnom pločicom, koja se lepi nevedenim medijumom (*Canada balsam*). Postupak pripreme ovakvih preparata za histopatološke analize ima za cilj očuvanje morfoloških struktura tkiva koje su približne nativnom uzorku.

Ovako dobijeni histološki preparati jetre i bubrega eksperimentalnih životinja su posmatrani pod svetlosnim mikroskopom (Zeiss, Axioskop 40). Korišćenjem računara i softvera preparati su analizirani u cilju uočavanja narušenih struktura i histopatoloških promena u ispitivanim tkivima. Fotografije svakog preparata napravljene su pri uvećanju od 100 puta (Glišić i Stanković, 2017).

3.7. Statistička obrada podataka

Statistička analiza rezultata u ovoj doktorskoj disertaciji urađena je korišćenjem SPSS softverskog paketa (IBM-SPSS 23 za Windows, Čikago, IL, SAD). Za utvrđivanje postojanja statistički značajnih razlika između ispitivanih grupa (kontrolnih i eksperimentalnih) primenjena je jednofaktorijalna analiza varijanse (one-way analysis ANOVA), a zatim su korišćeni post-hoc testovi da bi se ustanovile statistički značajne razlike između srednjih vrednosti, a korišćeni su Tukey's/Dunnett's T3 testovi. U svim testovima kriterijum za statističku značajnost je $p < 0,05$. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška. Dobijeni rezultati su prikazani tabelarno i grafički, a histopatološke analize su prikazane u vidu tabela i mikrografija. IC_{50} vrednosti su preračunate iz kalibracione krive dozne zavisnosti korišćenjem softvera za analizu podataka (CalcuSyn, BIOSOFT, Velika Britanija).

A decorative border of green leaves and white berries surrounds the central text. The leaves are elongated and pointed, with visible veins. The berries are small, round, and white, clustered together on thin stems.

4. REZULTATI

4.1. Hemijski profil i biološka aktivnost ekstrakta

Nakon dobijanja ekstrakta ispitivane biljne vrste, imele (*Viscum album* L.), određen je sadržaj ukupnih fenola, zatim sadržaj ukupnih flavonoida, kondenzovanih tanina i galotanina i ukupna antioksidativna aktivnost, a rezultati su prikazani u Tabeli 2.

Tabela 2. Sadržaj fenolnih jedinjenja i ukupna antioksidativna aktivnost ekstrakta lista *Viscum album* L.

Ekstrakt	Sadržaj
Ukupni fenoli (mg GAE/g)	94,38 ± 0,62
Ukupni flavonoidi (mg RUE/g)	65,24 ± 0,23
Kondenzovani tanini (mg GAE/g)	44,65 ± 0,09
Galotanini (mg GAE/g)	29,64 ± 0,38
Ukupna antioksidativna aktivnost (mg AKE/g)	128,65 ± 0,92

Rezultati ukupnih fenola, kondenzovanih tanina i galotanina u ekstraktu lista *Viscum album* L. izraženi su u mg ekvivalenta galne kiseline po gramu suve mase ekstrakta (mg GAE/g ± SD). Sadržaj ukupnih fenola iznosi 94,38 ± 0,62 mg GAE/g, što predstavlja značajnu količinu ukupnih fenola u ekstraktu lista. Sadržaj kondenzovanih tanina (44,65 ± 0,09 mg GAE/g) je za oko 45% manji u odnosu na sadržaj ukupnih fenola, dok je sadržaj galotanina (29,64 ± 0,38 mg GAE/g) za oko 60% manji u odnosu na sadržaj ukupnih fenola u ekstraktu lista. Rezultat ukupnih flavonoida izražen je u mg ekvivalenta rutina po gramu suve mase ekstrakta (mg RUE/g). Zabeležena je znatno niža vrednost ukupnih flavonoida (65,24 ± 0,23 mg RUE/g) i za oko 30% je manja u odnosu na sadržaj ukupnih fenola u ekstraktu lista *Viscum album* L.

Vrednost ukupne antioksidativne aktivnosti u ekstraktu lista izražena je u mg askorbinske kiseline na g suvog ekstrakta (mg AKE/g ± SD) i iznosi 128,65 ± 0,92, što je u saglasnosti sa ukupnim sadržajem fenolnih jedinjenja.

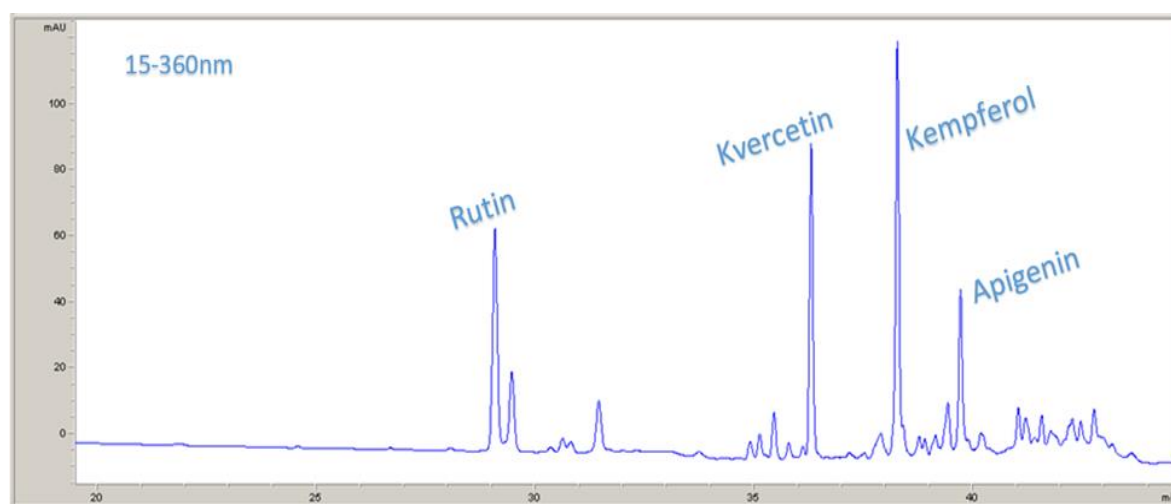
Rezultati antioksidativnog potencijala ekstrakta lista imele određeni su primenom testova, koji se zasnivaju na različitim mehanizmima ispoljavanja antioksidativne aktivnosti: na nivou DPPH[•] radikala, na nivou inhibicije lipidne peroksidacije, na nivou hidroksil radikala (OH[•]), i na nivou ABTS^{•+} radikala, a prikazani su u Tabeli 3. Rezultati su izraženi u µg/mL ekstrakta kao IC₅₀ vrednosti i definisane kao koncentracije ispitivanih uzoraka koje neutrališu 50% slobodnih radikala. Antioksidativna aktivnost ekstrakta lista upoređivana je sa standardima antioksidanata galnom kiselinom, askorbinskom kiselinom, BHT i α-tokoferolom. Treba naglasiti da niža vrednost IC₅₀ ukazuje na veću antioksidativnu aktivnost ispitivanog ekstrakta imele, odnosno bolju sposobnost inhibiranja štetnog procesa lipidne peroksidacije u ćelijama.

Tabela 3. Antioksidativni potencijal ekstrakta lista *Viscum album* L.

Uzorak	IC ₅₀ (μg/mL)			
	DPPH [•]	Lipidna peroksidacija	OH [•]	ABTS ^{•+}
<i>Viscum album</i> L.	7,28 ± 0,83	18,11 ± 0,82	22,02 ± 0,83	5,09 ± 0,23
Galna kiselina	3,79 ± 0,69	255,43 ± 11,68	59,14 ± 1,10	1,96 ± 0,41
Askorbinska kiselina	6,05 ± 0,34	> 1000	160,55 ± 2,31	10,98 ± 0,95
BHT	15,61 ± 1,26	1,00 ± 0,23	33,92 ± 0,79	7,23 ± 0,87
α-tokoferol	-	0,48 ± 0,05	-	-

Zabeleženo je da ekstrakt lista *Viscum album* L. ima najveći stepen inhibicije ABTS^{•+} radikala (5,09 ± 0,23 μg/mL), zatim DPPH[•] radikala (7,28 ± 0,83 μg/mL), a znatno manji stepen inhibicije lipidne peroksidacije (18,11 ± 0,82 μg/mL) i OH[•] radikala (22,02 ± 0,83 μg/mL). Rezultati pokazuju da ekstrakt lista imele ima veću antioksidativnu aktivnost na nivou DPPH[•] radikala u poređenju sa standardom BHT, a takođe ispoljava i veću aktivnost na nivou inhibicije lipidne peroksidacije u odnosu na galnu i askorbinsku kiselinu. Ekstrakt je pokazao veću antioksidativnu aktivnost u pogledu hvatanja OH[•] radikala u odnosu na sve ispitivane standarde. ABTS^{•+} test je pokazao da galna kiselina ispoljava najveću aktivnost na nivou ABTS^{•+} radikala, dok je ekstrakt lista imele pokazao veću antioksidativnu aktivnost na nivou ABTS^{•+} radikala u poređenju sa askorbinskom kiselinom i BHT.

Za kvantitativnu analizu sastava polifenolnih jedinjenja u ekstraktu lista imele korišćena je HPLC-DAD tehnika. Rezultati su dobijeni preko kalibracione krive referentnih standarda, a na osnovu površine pikova dobijena je ukupna količina polifenolnih jedinjenja. Na Slici 25 dat je hromatogram najdominantnijih komponenti prisutnih u ekstraktu lista *Viscum album* L.

**Slika 25.** Hromatogram ekstrakta lista *Viscum album* L.

U Tabeli 4 prikazane su jednačine kalibracionih kriva, regresioni koeficijent (R^2), raspon ili opseg (μg/μL), vreme retencije (RT/min), limit detekcije (LOD/μg/μL) i limit kvantifikacije (LOQ/μg/μL) za svaki standard.

Tabela 4. Analitički parametri za 15 fenolnih jedinjenja korišćenih za HPLC-DAD analizu

Jedinjenje	Kalibraciona kriva	(R ²)	Opseg (µg/µL)	RT* (min)	LOD** (µg/µL)	LOQ*** (µg/µL)
<i>p</i> -Hidroksibenzojeva kiselina	$y = 9934.4x + 0.1$	0.9998	0.006-50.000	17.65	0,003	0,010
Kafeinska kiselina	$y = 32,241.5x - 0.1$	1.0000	0.001-34.000	21.19	0,009	0,030
Vanilinska kiselina	$y = 10,781.0x + 0.5$	0.9995	0.006-30.000	22.15	0,003	0,010
Hlorogenska kiselina	$y = 10,491.8x - 0.5$	0.9998	0.050-26.200	22.25	0,035	0,116
<i>p</i> -kumarinska kiselina	$y = 16,239.7x - 0.8$	0.9997	0.042-20.000	24.83	0,042	0,140
Ferulna kiselina	$y = 24,685.7x - 0.7$	0.9998	0.035-22.000	27.35	0,029	0,097
Sinapinska kiselina	$y = 13,332.5x + 1.1$	0.9998	0.040-22.200	29.11	0,032	0,106
Rutin	$y = 4589.0x - 0.7$	0.9999	0.067-17.000	29.30	0,052	0,173
Apigenin-glikozid	$y = 4289.0x - 0.7$	0.9999	0.060-26.000	32.21	0,052	0,173
Ruzmarinska kiselina	$y = 5385.2x + 0.7$	0.9998	0.025-20.000	33.58	0,018	0,060
Kvercetin	$y = 10,336.2x + 0.3$	0.9996	0.045-20.000	36.50	0,033	0,110
Luteolin	$y = 15,958.6x - 0.2$	0.9998	0.045-7.200	37.31	0,030	0,100
Naringenin	$y = 14,797.5x + 1.0$	1.0000	0.065-32.000	37.85	0,055	0,183
Kempferol	$y = 13,636.5x + 0.1$	0.9997	0.040-27.000	38.29	0,029	0,097
Apigenin	$y = 6229.8x + 1.2$	0.9996	0.055-16.000	40.10	0,045	0,150

* vreme retencije, ** limit detekcije, *** limit kvantifikacije

Rezultati u Tabeli 5 pokazuju sadržaj polifenolnih jedinjenja u ekstraktu lista imele, izražen u µg/g i %. Kvantitativnom analizom je utvrđen sledeći sastav: kafeinska kiselina, hlorogenska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, ferulna kiselina, rutin, apigenin-glikozid, kvercetin, kempferol i apigenin. U ekstraktu lista imele nisu detektovani *p*-hidroksibenzojeva kiselina, vanilinska kiselina, sinapinska kiselina, luteolin i naringenin.

Najviše zastupljeni flavonoidi su rutin (4,467 µg/g ili 37,6%), kempferol (2,229 µg/g ili 18,8%), kvercetin (2,145 µg/g ili 18,1%), apigenin (1,874 µg/g ili 15,8%) i apigenin-glikozid (0,792 µg/g ili 6,7%). Od polifenolnih kiselina najzastupljenija je *p*-kumarinska kiselina (1,1% ili 0,125 µg/g), kafeinska kiselina (0,8% ili 0,090 µg/g), a potom ferulna kiselina (0,6% ili 0,076 µg/g) i hlorogenska kiselina (0,5% ili 0,060 µg/g).

Tabela 5. Sadržaj polifenolnih jedinjenja u ekstraktu lista imele

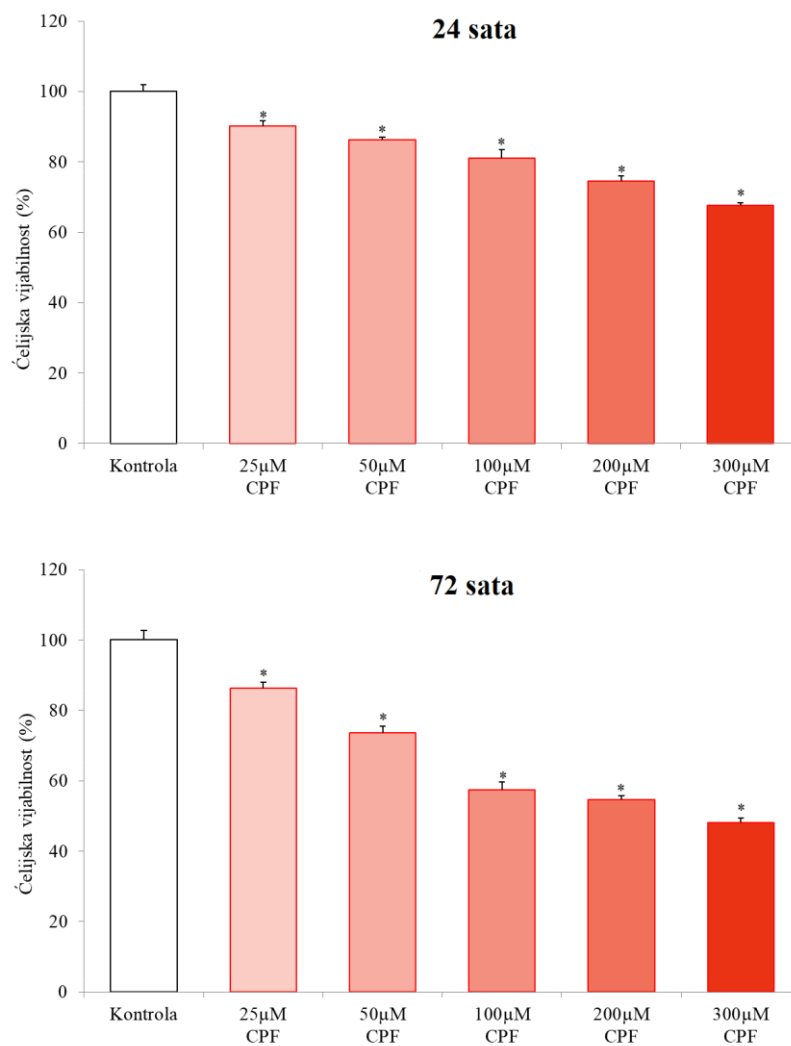
Jedinjenje	Sadržaj ($\mu\text{g/g}$)	Sadržaj (%)
<i>p</i> -Hidroksibenzojeva kiselina	ND	ND
Kafeinska kiselina	0,090	0,8
Vanilinska kiselina	ND	ND
Hlorogenska kiselina	0,060	0,5
<i>p</i> -kumarinska kiselina	0,125	1,1
Ferulna kiselina	0,076	0,6
Sinapinska kiselina	ND	ND
Rutin	4,467	37,6
Apigenin-glikozid	0,792	6,7
Ruzmarinska kiselina	ND	ND
Kvercetin	2,145	18,1
Luteolin	ND	ND
Naringenin	ND	ND
Kempferol	2,229	18,8
Apigenin	1,874	15,8
Σ	11,858	100

ND – nije detektovano

4.2. Ispitivanje ćelijske vijabilnosti MTT testom

Primenom MTT testa prvo je ispitivan nivo citotoksičnosti insekticida hlorpirifosa (CPF) i imidakloprida (IMI) na vijabilnost ćelija fibroblasta pluća (MRC-5) u *in vitro* tretmanima. Ćelije su inkubirane sa rastućim koncentracijama (25, 50, 100, 200 i 300 μM) insekticida u kratkotrajnom tretmanu (period od 24 sata) i dugotrajnom tretmanu (period od 72 sata). Takođe, za pojedinačne tretmane je korišćena i serija vodenih rastvora ekstrakta lista imele, *Viscum album* L., u sledećim koncentracijama: 10, 20, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 600 i 800 $\mu\text{g/mL}$. Nakon serije eksperimenata pojedinačnih tretmana, za kombinovane tretmane ekstrakta i insekticida odabrane su po tri koncentracije CPF i IMI (50, 100 i 300 μM), kao i tri koncentracije rastvora ekstrakta lista imele (100, 300 i 600 $\mu\text{g/mL}$). I u kombinovanim tretmanima ćelije su inkubirane u trajanju od 24 i 72 sata.

Rezultati analize vijabilnosti MRC-5 ćelija prikazani u Tabeli 6 i na Grafiku 1 pokazuju da u svim primenjenim koncentracijama u kratkotrajnom (24 sata) i dugotrajnom (72 sata) tretmanu insekticid CPF dovodi do dozno-zavisnog smanjenja vijabilnosti. Najmanja koncentracija CPF od 25 μM smanjuje vijabilnost na $90,25 \pm 1,50\%$, dok je najveća koncentracija od 300 μM dovela do značajnog smanjenja vijabilnosti na $67,62 \pm 0,70\%$ u odnosu na kontrolu ($100 \pm 2,00\%$). Nakon tretmana od 72 sata CPF takođe dovodi do dozno-zavisnog smanjenja vijabilnosti MRC-5 ćelija, i najmanja koncentracija od 25 μM smanjuje vijabilnost na $86,32 \pm 1,61\%$, dok najveća koncentracija CPF (300 μM) značajno smanjuje vijabilnost na $48,16 \pm 1,34\%$ u poređenju sa netretiranim kontrolnim ćelijama ($100 \pm 2,69\%$).

Grafik 1. Vijabilnost ćelija MRC-5 linije nakon kratkotrajnog i dugotrajnog tretmana insekticidom CPF

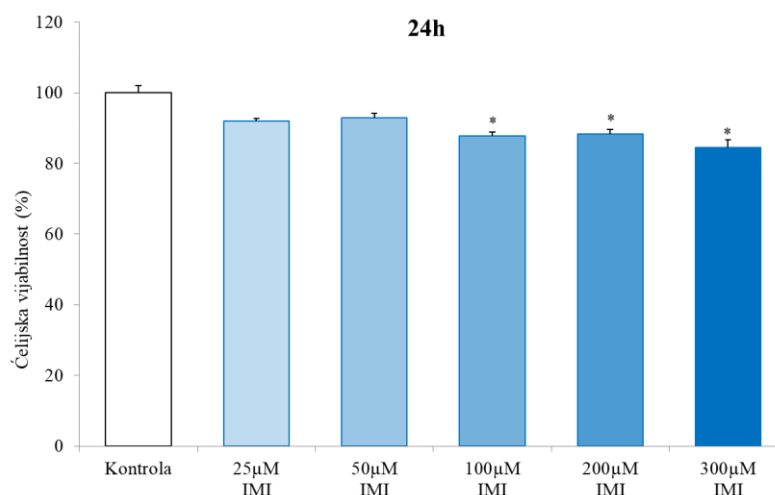
*Statistički značajno u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$).

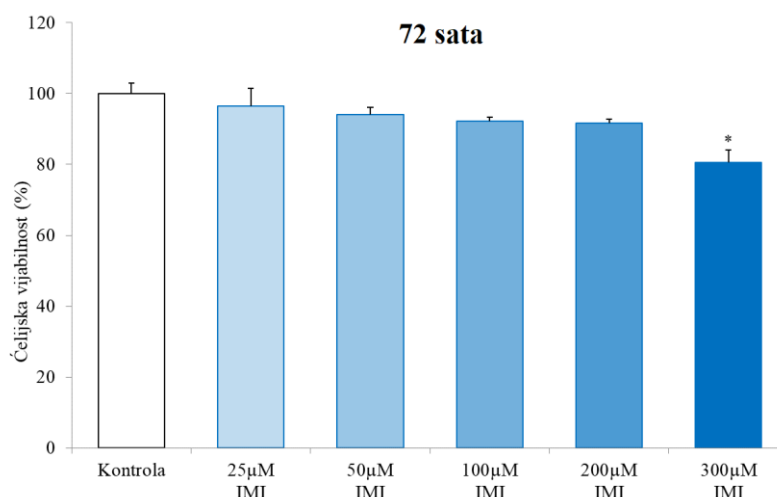
Tabela 6. Efekti insekticida CPF i IMI na vijabilnost ćelija MRC-5 linije u kratkotrajnom i dugotrajnom tretmanu

	Ćelijska vijabilnost (% kontrole)			
	CPF		IMI	
	24 sata	72 sata	24 sata	72 sata
Kontrola	100,00 ± 2,00	100,00 ± 2,69	100,00 ± 1,97	100,00 ± 2,99
25µM	90,25 ± 1,50*	86,32 ± 1,61*	91,99 ± 0,77	96,54 ± 4,99
50µM	86,34 ± 0,77*	73,65 ± 1,91*	92,87 ± 1,27	94,07 ± 2,02
100µM	81,11 ± 2,36*	57,37 ± 2,25*	87,70 ± 1,15*	92,21 ± 1,21
200µM	74,60 ± 1,47*	54,57 ± 1,09*	88,35 ± 1,30*	91,62 ± 1,13
300µM	67,62 ± 0,70*	48,16 ± 1,34*	84,45 ± 2,30*	80,56 ± 3,60*

*Statistički značajno u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$).

Za insekticid IMI su korišćene iste koncentracije pri proceni ćelijske vijabilnosti, a rezultati su prikazani u Tabeli 6 i na Grafiku 2. Posle kratkotrajnog tretmana pokazano je da koncentracije 25 i 50 ne smanjuju značajno vijabilnost u odnosu na kontrolu ($100 \pm 1,97\%$), dok su koncentracije 100 µM ($87,70 \pm 1,15\%$), 200 µM ($88,35 \pm 1,30\%$) i 300 µM ($84,45 \pm 2,30\%$) izazvale smanjenu vijabilnost, koja je bila značajna u odnosu na netretirane ćelije. U dugotrajnom tretmanu samo najveća koncentracija od 300 µM IMI dovodi do značajnog smanjenja vijabilnosti ćelija na $80,56 \pm 3,60\%$ u odnosu na kontrolu ($100 \pm 2,99\%$).

Grafik 2. Vijabilnost ćelija MRC-5 linije nakon kratkotrajnog i dugotrajnog tretmana insekticidom IMI



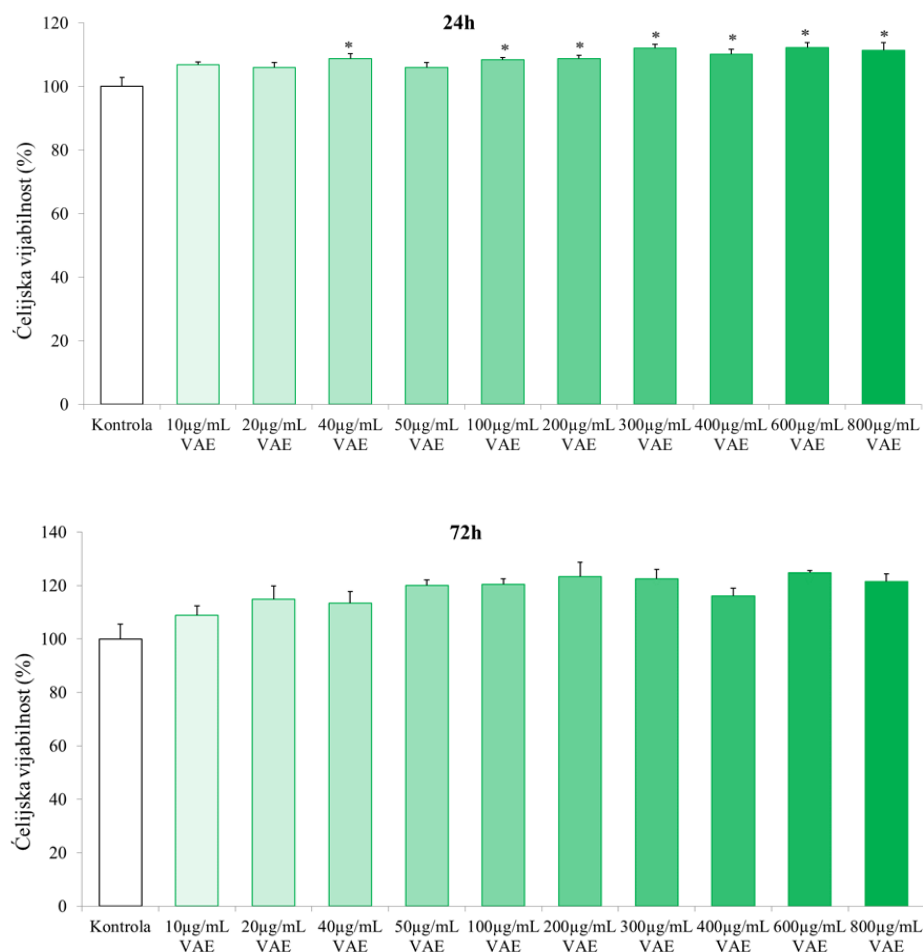
*Statistički značajno u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$).

Ispitivan je i uticaj ekstrakta lista imele (VAE) na ćelijsku vijabilnost u kratkotrajnom (24 sata) i dugotrajnom (72 sata) tretmanu, a rezultati su prikazani u Tabeli 7 i na Grafiku 3. Pokazano je da nakon tretmana od 24 sata više koncentracije ekstrakta VAE statistički značajno povećavaju vijabilnost MRC-5 ćelija u odnosu na kontrolu ($100 \pm 2,92\%$), osim koncentracija od 10, 20 i 50 $\mu\text{g/mL}$. Rezultati vijabilnosti ćelija i nakon tretmana od 72 sata pokazuju da VAE u svim ispitivanim koncentracijama povećavaju vijabilnost ćelija, ali bez statističke značajnosti.

Tabela 7. Efekti VAE u rastućim koncentracijama na vijabilnost ćelija MRC-5 linije u kratkotrajnom i dugotrajnom tretmanu

	Ćelijska vijabilnost (% kontrole)	
	VAE	
	24 sata	72 sata
Kontrola	$100,00 \pm 2,92$	$100,00 \pm 5,55$
10 $\mu\text{g/mL}$	$106,86 \pm 0,93$	$108,77 \pm 3,65$
20 $\mu\text{g/mL}$	$105,90 \pm 1,58$	$114,91 \pm 4,87$
40 $\mu\text{g/mL}$	$108,75 \pm 1,50^*$	$113,48 \pm 4,22$
50 $\mu\text{g/mL}$	$105,90 \pm 1,62$	$119,95 \pm 2,19$
100 $\mu\text{g/mL}$	$108,34 \pm 0,73^*$	$120,44 \pm 1,99$
200 $\mu\text{g/mL}$	$108,83 \pm 1,01^*$	$123,36 \pm 5,32$
300 $\mu\text{g/mL}$	$112,09 \pm 1,20^*$	$122,52 \pm 3,54$
400 $\mu\text{g/mL}$	$110,15 \pm 1,60^*$	$116,04 \pm 2,87$
600 $\mu\text{g/mL}$	$112,19 \pm 1,63^*$	$124,75 \pm 0,84$
800 $\mu\text{g/mL}$	$111,40 \pm 2,33^*$	$121,39 \pm 2,95$

*Statistički značajno u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$).

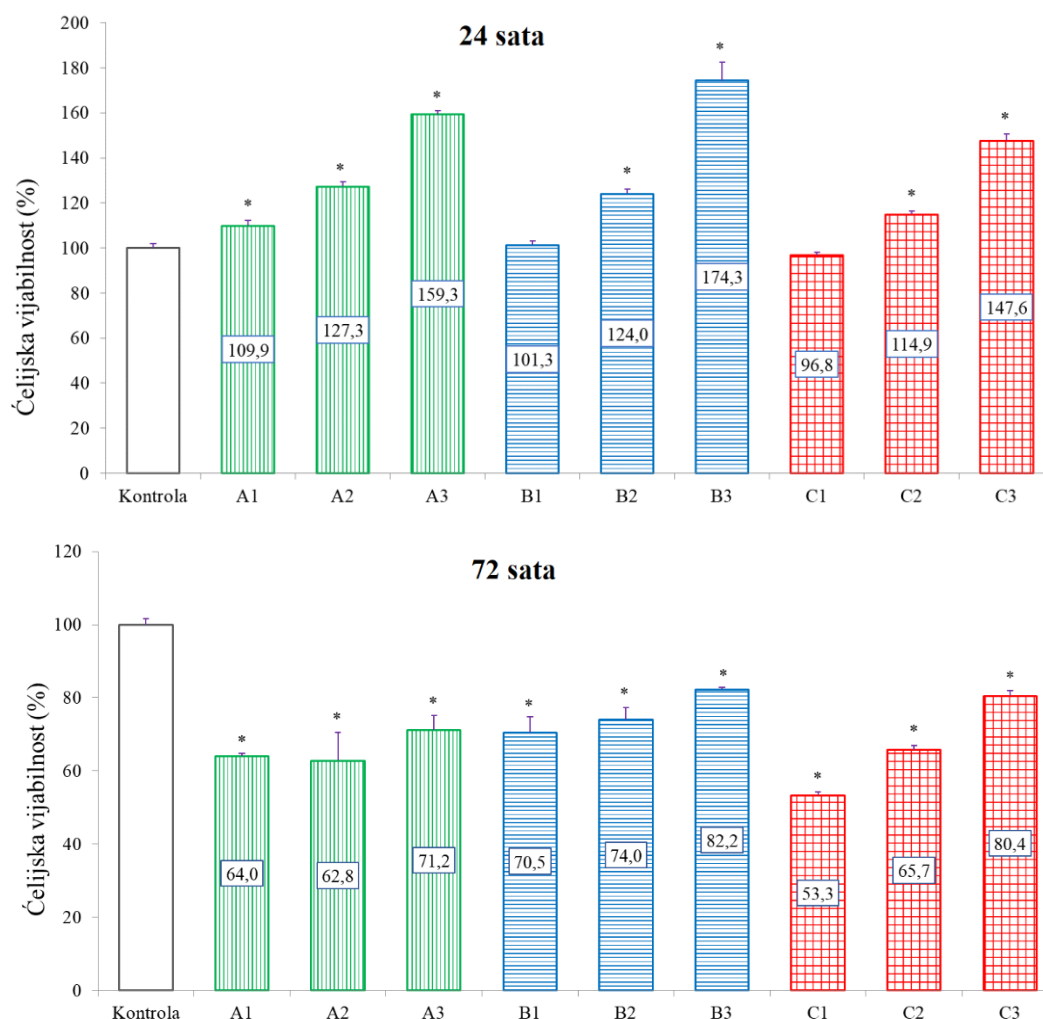
Grafik 3. Vijabilnost ćelija MRC-5 linije nakon kratkotrajnog i dugotrajnog tretmana VAE

*Statistički značajno u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$).

Ispitivani su i kotretmani izabranih koncentracija oba insekticida (CPF i IMI) i ekstrakta VAE na ćelijsku vijabilnost (Grafici 4 i 5).

Rezultati pokazuju da kotretmani CPF i VAE u svim primenjenim koncentracijama nakon 24 sata dovode do dozno-zavisnog statistički značajnog povećanja vijabilnosti MRC-5 ćelija u odnosu na kontrolu, osim CPF u koncentracijama od 100 µM i 300 µM u kombinaciji sa najmanjom koncentracijom ekstrakta (100 µg/mL), koji nisu izazvali promenu vijabilnosti ćelija (Grafik 4).

U dugotrajnim (72 sata) kotretmanima CPF i ekstrakta imele u sve tri ispitivane koncentracije insekticida (50 µM, 100 µM i 300 µM) i ekstrakta imele (100 µg/mL, 300 µg/mL i 600 µg/mL) vijabilnost ćelija bila je značajno smanjena u odnosu na kontrolu ($100,00 \pm 1,57$) (Grafik 4).

Grafik 4. Vijabilnost ćelija MRC-5 linije nakon kratkotrajnog i dugotrajnog kotretmana CPF i VAE

*Statistički značajno u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$).

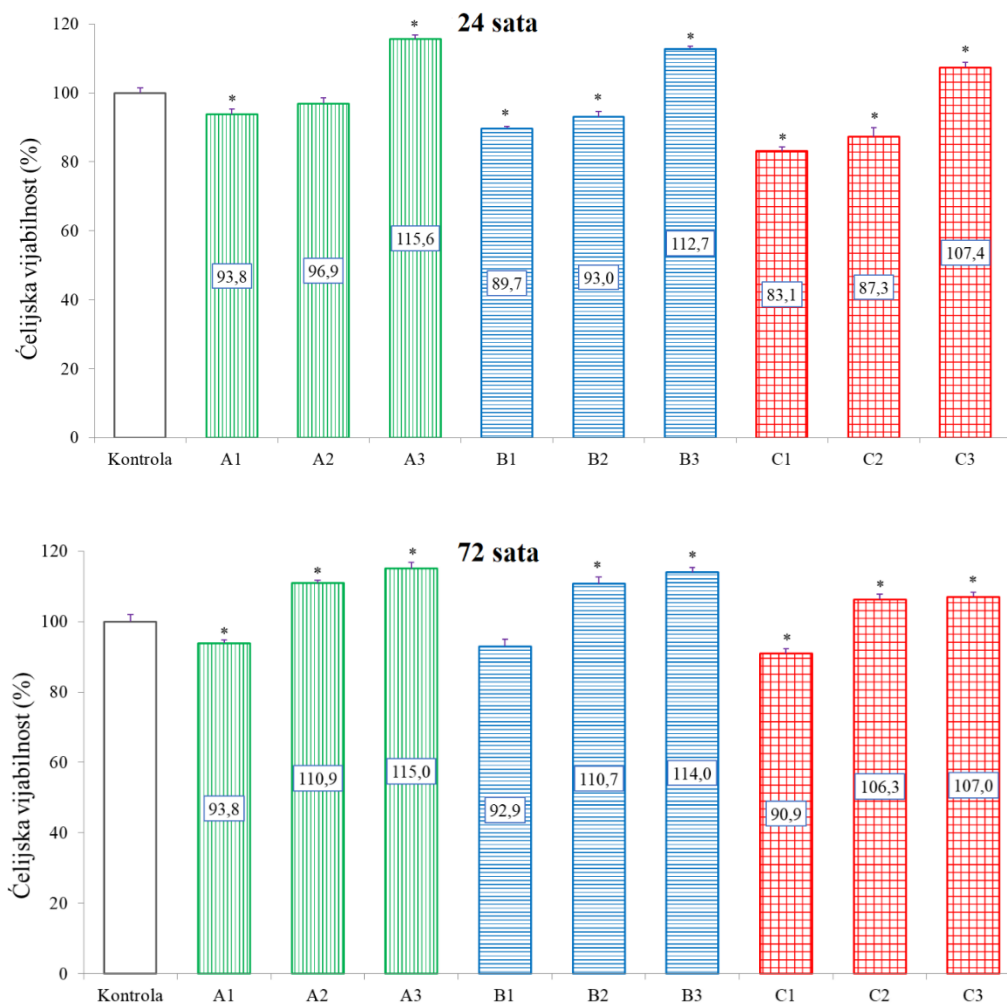
Grupa A1: 50 μM CPF + 100 $\mu\text{g/mL}$ VAE; **A2:** 50 μM CPF + 300 $\mu\text{g/mL}$ VAE; **A3:** 50 μM CPF + 600 $\mu\text{g/mL}$ VAE;

Grupa B1: 100 μM CPF + 100 $\mu\text{g/mL}$ VAE; **B2:** 100 μM CPF + 300 $\mu\text{g/mL}$ VAE; **B3:** 100 μM CPF + 600 $\mu\text{g/mL}$ VAE;

Grupa C1: 300 μM CPF + 100 $\mu\text{g/mL}$ VAE; **C2:** 300 μM CPF + 300 $\mu\text{g/mL}$ VAE; **C3:** 300 μM CPF + 600 $\mu\text{g/mL}$ VAE.

Takođe, ispitivani su i kotretmani insekticida IMI u tri koncentracije (50 μM , 100 μM i 300 μM) i ekstrakta VAE u tri koncentracije (100 $\mu\text{g/mL}$, 300 $\mu\text{g/mL}$ i 600 $\mu\text{g/mL}$) (Grafik 5).

Insekticid IMI je nakon 24 sata u sve tri koncentracije (50 μM , 100 μM i 300 μM) u kotretmanu sa koncentracijama 100 $\mu\text{g/mL}$ i 300 $\mu\text{g/mL}$ ekstrakta VAE doveo do statistički značajnog smanjenja vijabilnosti MRC-5 ćelija. Međutim, IMI je u sve tri koncentracije u kotretmanu sa najvećom koncentracijom od 600 $\mu\text{g/mL}$ ekstrakta VAE doveo do statistički značajnog povećanja vijabilnosti ćelija i to 50 μM IMI na $115,61 \pm 1,09\%$, 100 μM IMI na $112,73 \pm 0,90\%$ i 300 μM IMI na $107,40 \pm 1,38\%$ u odnosu na kontrolu ($100,00 \pm 1,45\%$).

Grafik 5. Vijabilnost ćelija MRC-5 linije nakon kratkotrajnog i dugotrajnog kotretmana IMI i VAE

*Statistički značajno u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$).

Grupa A1: 50 μ M IMI + 100 μ g/mL VAE; **A2:** 50 μ M IMI + 300 μ g/mL VAE; **A3:** 50 μ M IMI + 600 μ g/mL VAE;

Grupa B1: 100 μ M IMI + 100 μ g/mL VAE; **B2:** 100 μ M IMI + 300 μ g/mL VAE; **B3:** 100 μ M IMI + 600 μ g/mL VAE;

Grupa C1: 300 μ M IMI + 100 μ g/mL VAE; **C2:** 300 μ M IMI + 300 μ g/mL VAE; **C3:** 300 μ M IMI + 600 μ g/mL VAE.

Nakon perioda od 72 sata, IMI je u koncentracijama 50 μ M i 300 μ M u kotretmanu sa najmanjom izabranom koncentracijom 100 μ g/mL ekstrakta VAE doveo do statistički značajnog smanjenja vijabilnosti MRC-5 ćelija (A1 - $93,8 \pm 0,95\%$ i C1 - $90,9 \pm 1,45\%$) u odnosu na kontrolu ($100,00 \pm 1,99\%$). Međutim, rezultati kotretmana IMI u sve tri koncentracije sa većim koncentracijama ispitivanog ekstrakta (300 μ g/mL i 600 μ g/mL) su pokazali statistički značajno povećanje vijabilnosti MRC-5 ćelija (A2 i A3, B2 i B3, C2 i C3).

4.3. Promena telesne mase i mase organa životinja

U Tabeli 8 data je procentualna vrednost promene telesne mase životinja nakon efekta tretmana, a najveći prirast zabeležen je kod tretiranih grupa IMI+VAE2 ($32,64 \pm 2,55\%$), VAE1 ($19,68 \pm 2,37\%$) i CPF+VAE2 ($18,37 \pm 1,54\%$) u poređenju sa kontrolom ($10,06 \pm 1,01\%$). Jetra, bubrezi i testisi su nakon žrtvovanja izmereni, a odnos njihovih masa i telesne mase na kraju eksperimenta su takođe dati u Tabeli 8, i nisu zabeležene značajne promene.

Tabela 8. Promena telesne mase (t.m.) i odnosi telesne mase i mase ispitivanih tkiva kontrolne i tretiranih grupa

Eksperimentalne grupe	Parametar			
	Promena telesne mase (%)	Odnos jetra/t.m. $\times 1000$	Odnos bubreg/t.m. $\times 1000$	Odnos testis/t.m. $\times 1000$
Kontrola	$10,06 \pm 1,01$	$24,09 \pm 0,24$	$7,22 \pm 0,29$	$9,53 \pm 0,33$
CPF	$5,49 \pm 0,64$	$32,54 \pm 0,37$	$7,13 \pm 0,18$	$9,71 \pm 0,26$
IMI	$11,96 \pm 3,12$	$30,56 \pm 1,44$	$6,98 \pm 0,30$	$8,64 \pm 1,37$
VAE1	$19,68 \pm 2,37$	$28,97 \pm 0,93$	$6,83 \pm 0,20$	$10,50 \pm 0,48$
CPF + VAE1	$8,98 \pm 1,54$	$28,74 \pm 0,1$	$5,59 \pm 0,11$	$8,31 \pm 0,21$
CPF + VAE2	$18,37 \pm 1,54$	$30,03 \pm 1,40$	$6,85 \pm 0,39$	$8,86 \pm 0,36$
IMI + VAE1	$8,08 \pm 2,47$	$29,45 \pm 0,42$	$6,95 \pm 0,19$	$10,13 \pm 0,42$
IMI + VAE2	$32,64 \pm 2,55$	$38,13 \pm 1,54$	$7,14 \pm 0,25$	$9,36 \pm 0,39$

4.4. Hematološki parametri

Rezultati hematoloških parametara prikazani su u Tabeli 9. Broj eritrocita (RBC) je značajno smanjen u grupi tretiranoj sa CPF ($6,18 \pm 0,10 \times 10^{12}/L$) u odnosu na kontrolu ($7,26 \pm 0,07 \times 10^{12}/L$). U grupi CPF+VAE1 ($7,53 \pm 0,12 \times 10^{12}/L$) broj RBC je značajno povećan u odnosu na CPF grupu, dok u grupi CPF+VAE2 ($6,67 \pm 0,15 \times 10^{12}/L$) broj RBC pokazuje značajnu razliku u odnosu na kontrolu i grupu tretiranu sa CPF. IMI, kao i kotretmani IMI+VAE1 i IMI+VAE2 nisu doveli do značajnih promena u broju RBC. Grupa VAE1 pokazala je značajnu razliku ($7,18 \pm 0,12 \times 10^{12}/L$) u broju RBC u odnosu na CPF grupu. Koncentracija hemoglobina (Hb) značajno je snižena u CPF grupi ($132,0 \pm 2,6$ g/L) i grupi CPF+VAE2 ($127,5 \pm 2,1$ g/L) u odnosu na kontrolnu vrednost ($143,8 \pm 2,6$ g/L). U grupi CPF+VAE1 ($143,2 \pm 1,3$ g/L) koncentracija Hb je značajno povećana u odnosu na grupu koja je dobijala CPF. Kotretman insekticida CPF i VAE1 uzrokovao je povećanje hematokrita (Hct) ($44,37 \pm 0,49\%$) u odnosu na kontrolu ($39,82 \pm 0,80\%$) i CPF ($40,83 \pm 0,90\%$). Broj leukocita (WBC) je značajno povećan u grupi tretiranoj CPF ($5,10 \pm 0,22 \times 10^9/L$) i CPF+VAE2 ($4,62 \pm 0,31 \times 10^9/L$) u odnosu na kontrolnu grupu ($2,98 \pm 0,26 \times 10^9/L$). Grupe VAE1 ($2,32 \pm 0,30 \times 10^9/L$) i CPF+VAE1 ($3,93 \pm 0,15 \times 10^9/L$) pokazale su smanjen broj WBC u odnosu na CPF

grupu. Broj trombocita (PLT) je značajno smanjen u grupi IMI ($873,0 \pm 27,1 \times 10^9/L$) u odnosu na kontrolu ($1090,0 \pm 32,7 \times 10^9/L$), dok je u grupi VAE1 broj PLT ($1138,3 \pm 51,4 \times 10^9/L$) značajno povećan u odnosu na IMI grupu.

Tabela 9. Hematološki parametri kontrolne i eksperimentalnih grupa

Eksperimentalne grupe	Parametar				
	RBC ($\times 10^{12}/L$)	Hb (g/L)	Hct (%)	WBC ($\times 10^9/L$)	PLT ($\times 10^9/L$)
Kontrola	$7,26 \pm 0,07$	$143,8 \pm 2,6$	$39,82 \pm 0,80$	$2,98 \pm 0,26$	$1090,0 \pm 32,7$
CPF	$6,18 \pm 0,10^*$	$132,0 \pm 2,6^*$	$40,83 \pm 0,90$	$5,10 \pm 0,22^*$	$1042,0 \pm 37,5$
IMI	$7,01 \pm 0,16$	$136,5 \pm 1,3$	$41,98 \pm 1,38$	$3,10 \pm 0,38$	$873,0 \pm 27,1^*$
VAE1	$7,18 \pm 0,12^\#$	$137,8 \pm 1,9$	$41,20 \pm 0,51$	$2,32 \pm 0,30^\#$	$1138,3 \pm 51,4^\S$
CPF + VAE1	$7,53 \pm 0,12^\#$	$143,2 \pm 1,3^\#$	$44,37 \pm 0,49^{*\#}$	$3,93 \pm 0,15^\#$	$1071,5 \pm 31,5$
CPF + VAE2	$6,67 \pm 0,15^{*\#}$	$127,5 \pm 2,1^*$	$40,42 \pm 0,79$	$4,62 \pm 0,31^*$	$970,3 \pm 8,2$
IMI + VAE1	$7,41 \pm 0,10$	$135,5 \pm 0,9$	$42,82 \pm 0,46$	$3,92 \pm 0,26$	$1017,8 \pm 42,4$
IMI + VAE2	$6,94 \pm 0,37$	$133,0 \pm 1,5$	$41,10 \pm 1,13$	$2,98 \pm 0,13$	$950,0 \pm 15,5$

*Statistički značajno u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$).

^\#Statistički značajno u poređenju sa CPF grupom ($p < 0,05$).

^\SStatistički značajno u poređenju sa IMI grupom ($p < 0,05$).

4.5. Biohemijski parametri

Rezultati biohemijskih parametara u serumu pacova kontrolne i eksperimentalnih grupa prikazani su u Tabelama 10-13.

Tretmani sa insekticidima CPF i IMI, kao i ekstraktom VAE1 nisu doveli do statistički značajne promene ukupnih proteina u serumu u odnosu na kontrolu. Zabeleženo je značajno smanjenje albumina u serumu kod tretiranih grupa CPF+VAE1 ($20,44 \pm 2,08$ g/L) i CPF+VAE2 ($24,01 \pm 1,61$ g/L) u poređenju sa kontrolom ($44,83 \pm 1,70$ g/L) i grupom koja je tretirana samo CPF ($43,52 \pm 1,00$ g/L) (Tabela 10).

Nivo glukoze je kod životinja kojima je aplikovan CPF bio značajno povišen ($10,12 \pm 0,59$ mmol/L) u odnosu na kontrolnu vrednost ($7,10 \pm 0,36$ mmol/L). Grupe koje su pored CPF dobijale i imelu u većoj dozi CPF+VAE1 ($6,49 \pm 0,15$ mmol/L) i u manjoj dozi CPF+VAE2 ($6,97 \pm 0,32$ mmol/L) pokazale su dozno-zavisno smanjenje nivoa glukoze u odnosu na CPF. Ostale eksperimentalne grupe nisu pokazale značajne promene u odnosu na kontrolu. Ukupni holesterol je bio značajno povišen u grupama koje su dobijale samo CPF ($2,30 \pm 0,13$ mmol/L) i samo IMI ($2,34 \pm 0,09$ mmol/L) u odnosu na kontrolu ($1,93 \pm 0,04$ mmol/L). Vrednosti ukupnog holesterola su značajno smanjene u odnosu na kontrolu i na CPF grupu u grupama koje su dobijale pored CPF i ekstrakt, CPF+VAE1 ($1,33 \pm 0,10$ mmol/L) i CPF+VAE2 ($1,29 \pm 0,07$ mmol/L) (Tabela 10).

Trigliceridi su značajno povišeni u grupama koje su dobijale samo CPF ($0,51 \pm 0,03$ mmol/L) ili samo IMI ($0,47 \pm 0,03$ mmol/L) u odnosu na kontrolnu vrednost ($0,33 \pm 0,01$ mmol/L). Grupa CPF+VAE1 imala je trigliceride smanjene ($0,33 \pm 0,04$ mmol/L) u odnosu na CPF grupu, dok je grupa IMI+VAE1 imala smanjene trigliceride ($0,37 \pm 0,02$ mmol/L) u odnosu na IMI tretman. Kod pacova koji su dobijali samo ekstrakt imele (VAE1) trigliceridi su bili značajno smanjeni ($0,37 \pm 0,03$ mmol/L) u odnosu na tretmane sa CPF ili IMI (Tabela 10).

Tabela 10. Efekti VAE na biohemijske parametre pacova tretiranih insekticidima CPF i IMI

Eksperimentalne grupe	Parametar				
	Ukupni proteini (g/L)	Albumini (g/L)	Glukoza (mmol/L)	Ukupni holesterol (mmol/L)	Trigliceridi (mmol/L)
Kontrola	$56,88 \pm 3,00$	$44,83 \pm 1,70$	$7,10 \pm 0,36$	$1,93 \pm 0,04$	$0,33 \pm 0,01$
CPF	$64,38 \pm 0,46$	$43,52 \pm 1,00$	$10,12 \pm 0,59^*$	$2,30 \pm 0,13^*$	$0,51 \pm 0,03^*$
IMI	$64,45 \pm 1,96$	$41,40 \pm 1,31$	$7,87 \pm 0,10$	$2,34 \pm 0,09^*$	$0,47 \pm 0,03^*$
VAE1	$63,85 \pm 0,98$	$43,60 \pm 0,39$	$7,60 \pm 0,36^\#$	$1,73 \pm 0,07^\S$	$0,37 \pm 0,03^\#\S$
CPF + VAE1	$45,85 \pm 4,70$	$20,44 \pm 2,08^\#\#$	$6,49 \pm 0,15^\#$	$1,33 \pm 0,10^\#\#$	$0,33 \pm 0,04^\#$
CPF + VAE2	$49,78 \pm 4,27$	$24,01 \pm 1,61^\#\#$	$6,97 \pm 0,32^\#$	$1,29 \pm 0,07^\#\#$	$0,45 \pm 0,04$
IMI + VAE1	$54,98 \pm 2,24$	$35,55 \pm 1,86$	$7,85 \pm 0,25$	$1,95 \pm 0,13$	$0,37 \pm 0,02^\S$
IMI + VAE2	$54,92 \pm 2,79$	$37,17 \pm 3,55$	$8,02 \pm 0,21$	$1,74 \pm 0,20$	$0,42 \pm 0,02$

*Statistički značajno u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$).

^\#Statistički značajno u poređenju sa CPF grupom ($p < 0,05$).

^\SStatistički značajno u poređenju sa IMI grupom ($p < 0,05$).

Značajno povećanje aktivnosti enzima ALT u serumu u odnosu na kontrolu ($32,17 \pm 0,95$ J/L) zabeleženo je u grupama CPF ($44,50 \pm 1,65$ J/L) i IMI ($44,67 \pm 1,73$ J/L). Aktivnost ALT u grupi CPF+VAE1 bila je značajno manja ($29,33 \pm 3,53$ J/L) u odnosu na grupu CPF, dok je kod grupe IMI+VAE1 zabeleženo smanjenje aktivnosti ALT ($34,67 \pm 2,19$ J/L) u odnosu na životinje kojima je aplikovan samo IMI (Tabela 11).

Aktivnost enzima AST je značajno povećana kod pacova kojima je aplikovan CPF ($168,3 \pm 10,7$ J/L) u odnosu na kontrolu ($110,0 \pm 2,6$ J/L), dok je kod pacova tretiranih VAE1 ($117,5 \pm 9,6$ J/L) i CPF+VAE1 ($109,8 \pm 5,3$ J/L) aktivnost AST značajno smanjena u odnosu na tretman CPF. Porast aktivnosti LDH u serumu pacova je statistički značajan u grupama koje su tretirane CPF ($1505,2 \pm 104,6$ J/L) ili IMI ($1415,8 \pm 24,7$ J/L) u odnosu na kontrolu ($925,7 \pm 155,2$ J/L). Značajno povećanje bilirubina zabeleženo je u serumu životinja tretiranih CPF ($4,10 \pm 0,50$ μ mol/L), CPF+VAE1 ($3,40 \pm 0,23$ μ mol/L), CPF+VAE2 ($3,27 \pm 0,37$ μ mol/L), IMI ($3,63 \pm 0,26$ μ mol/L) i IMI+VAE1 ($3,43 \pm 0,24$ μ mol/L) u odnosu na kontrolne vrednosti ($1,87 \pm 0,18$ μ mol/L) (Tabela 11).

Tabela 11. Aktivnost enzima ALT, AST i LDH i količina bilirubina u serumu kontrolne i eksperimentalnih grupa

Eksperimentalne grupe	Parametar			
	ALT (J/L)	AST (J/L)	LDH (J/L)	Bilirubin ($\mu\text{mol/L}$)
Kontrola	32,17 \pm 0,95	110,0 \pm 2,6	925,7 \pm 155,2	1,87 \pm 0,18
CPF	44,50 \pm 1,65*	168,3 \pm 10,7*	1505,2 \pm 104,6*	4,10 \pm 0,50*
IMI	44,67 \pm 1,73*	130,2 \pm 5,2	1415,8 \pm 24,7*	3,63 \pm 0,26*
VAE1	39,83 \pm 2,36	117,5 \pm 9,6 [#]	936,0 \pm 113,5	1,47 \pm 0,56 [#]
CPF + VAE1	29,33 \pm 3,53 [#]	109,8 \pm 5,3 [#]	966,2 \pm 100,4	3,40 \pm 0,23*
CPF + VAE2	36,83 \pm 4,70	116,8 \pm 11,2	1135,2 \pm 178,8	3,27 \pm 0,37*
IMI + VAE1	34,67 \pm 2,19 [§]	110,7 \pm 9,1	1029,3 \pm 135,0	3,43 \pm 0,24*
IMI + VAE2	39,50 \pm 3,18	126,5 \pm 7,9	1066,5 \pm 112,8	3,17 \pm 0,44

*Statistički značajno u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$).

[#]Statistički značajno u poređenju sa CPF grupom ($p < 0,05$).

[§]Statistički značajno u poređenju sa IMI grupom ($p < 0,05$).

Nivo uree značajno je povišen u serumu životinja koje su dobijale CPF (8,57 \pm 0,75 mmol/L) u odnosu na kontrolne životinje (3,90 \pm 0,30 mmol/L). Zabeleženo je značajno smanjenje uree u grupama CPF+VAE1 (4,23 \pm 0,20 mmol/L) i CPF+VAE2 (4,42 \pm 0,14 mmol/L), kao i u grupi koja je dobijala samo VAE1 (5,15 \pm 0,20 mmol/L) u odnosu na CPF. Vrednosti kreatinina u serumu životinja koje su tretirane CPF ili IMI nisu bile statistički značajno povećane u odnosu na kontrolu (Tabela 12).

U eksperimentalnim grupama koje su tretirane insekticidima CPF i IMI, kao i ekstraktom VAE1 i VAE2 u kotretmanu promene aktivnosti ChE u serumu nisu statistički značajne (Tabela 13).

Tabela 12. Efekti VAE na ureu i kreatininu u serumu pacova tretiranih sa CPF i IMI

Eksperimentalne grupe	Parametar	
	Urea (mmol/L)	Kreatinin ($\mu\text{mol/L}$)
Kontrola	3,90 \pm 0,30	25,83 \pm 2,18
CPF	8,57 \pm 0,75*	30,17 \pm 1,74
IMI	5,05 \pm 0,26	27,17 \pm 2,12
VAE1	5,15 \pm 0,20 [#]	24,67 \pm 1,45
CPF + VAE1	4,23 \pm 0,20 [#]	25,50 \pm 1,98
CPF + VAE2	4,42 \pm 0,14 [#]	23,17 \pm 1,66
IMI + VAE1	5,07 \pm 0,36	23,50 \pm 1,48
IMI + VAE2	4,70 \pm 0,35	24,00 \pm 1,98

*Statistički značajno u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$).

[#]Statistički značajno u poređenju sa CPF grupom ($p < 0,05$).

Tabela 13. Efekti VAE na aktivnost ChE u serumu pacova tretiranih sa CPF i IMI

Eksperimentalne grupe	Parametar
	ChE (J/L)
Kontrola	168,17 ± 6,76
CPF	145,50 ± 20,39
IMI	233,17 ± 28,65
VAE1	188,83 ± 25,18
CPF + VAE1	155,33 ± 13,07
CPF + VAE2	129,00 ± 14,00
IMI + VAE1	153,67 ± 13,58
IMI + VAE2	156,00 ± 10,61

4.6. Aktivnost enzima AChE u jetri, bubregu i testisu

U Tabeli 14 i na Grafiku 6 date su vrednosti aktivnosti enzima AChE izmerene u ispitivanim tkivima. Aktivnost enzima AChE u jetri inhibirana je u grupama CPF ($0,16 \pm 0,02$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ tkiva) i IMI ($0,13 \pm 0,01$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ tkiva) u odnosu na kontrolu ($0,36 \pm 0,02$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ tkiva). Značajno smanjenje aktivnosti AChE u odnosu na kontrolu zabeleženo je i u kotretmanima CPF+VAE1 ($0,22 \pm 0,02$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ tkiva), CPF+VAE2 ($0,17 \pm 0,01$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ tkiva), IMI+VAE1 ($0,20 \pm 0,02$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ tkiva) i IMI+VAE2 ($0,25 \pm 0,02$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ tkiva). Aktivnost AChE je značajno veća u grupi VAE1 ($0,37 \pm 0,02$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ tkiva) u poređenju sa grupama tretiranim samo CPF ili IMI, ali vrednost je približna kontroli.

U bubregu i testisu su zabeležene male promene aktivnosti AChE kod eksperimentalnih grupa u odnosu na kontrolu, ali te promene nisu statistički značajne.

Tabela 14. Vrednosti aktivnosti AChE ispitivanih tkiva pacova u kontroli i eksperimentalnim grupama

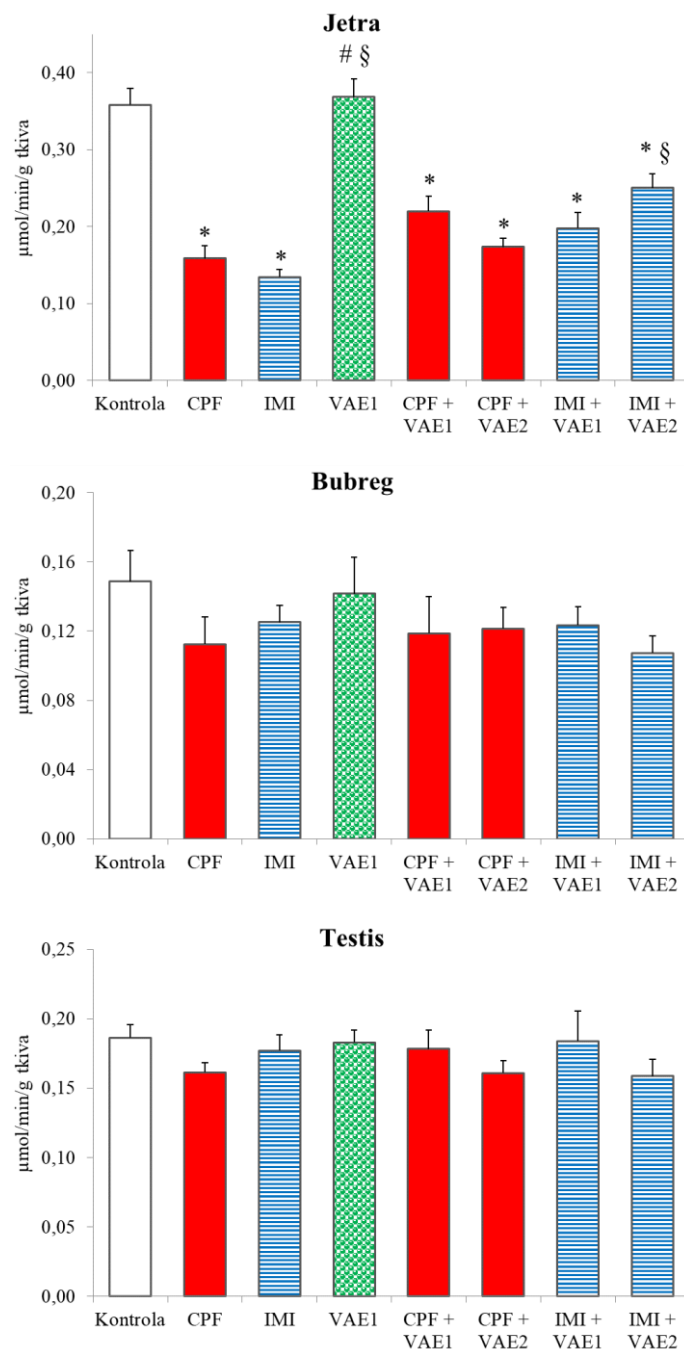
Parametar	AChE ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ tkiva)		
	Jetra	Bubreg	Testis
Kontrola	$0,36 \pm 0,02$	$0,15 \pm 0,02$	$0,19 \pm 0,01$
CPF	$0,16 \pm 0,02^*$	$0,11 \pm 0,02$	$0,16 \pm 0,01$
IMI	$0,13 \pm 0,01^*$	$0,13 \pm 0,01$	$0,18 \pm 0,01$
VAE1	$0,37 \pm 0,02^{\#\S}$	$0,14 \pm 0,02$	$0,18 \pm 0,01$
CPF + VAE1	$0,22 \pm 0,02^*$	$0,12 \pm 0,02$	$0,18 \pm 0,01$
CPF + VAE2	$0,17 \pm 0,01^*$	$0,12 \pm 0,01$	$0,16 \pm 0,01$
IMI + VAE1	$0,20 \pm 0,02^*$	$0,12 \pm 0,01$	$0,18 \pm 0,02$
IMI + VAE2	$0,25 \pm 0,02^{\#\S}$	$0,11 \pm 0,01$	$0,16 \pm 0,01$

*Statistički značajno u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$).

#Statistički značajno u poređenju sa CPF grupom ($p < 0,05$).

§Statistički značajno u poređenju sa IMI grupom ($p < 0,05$).

Grafik 6. Efekti VAE na aktivnost enzima AChE u ispitivanim tkivima pacova tretiranih insekticidima CPF i IMI



*Statistički značajno u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$).

#Statistički značajno u poređenju sa CPF grupom ($p < 0,05$).

§Statistički značajno u poređenju sa IMI grupom ($p < 0,05$).

4.7. Parametri oksidativnog stresa u jetri, bubregu i testisu

4.7.1. Koncentracije ROS i RNS u tkivima

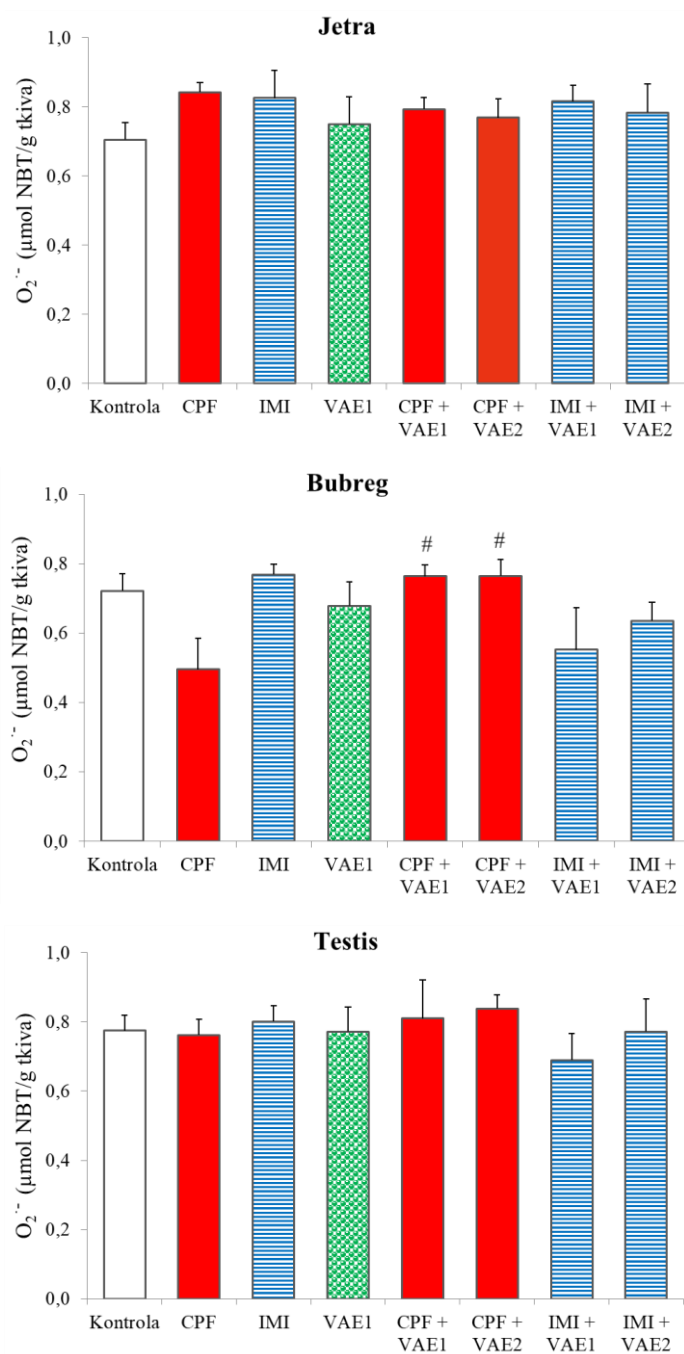
4.7.1.1. Koncentracija superoksid anjon radikala ($O_2^{\bullet-}$)

Rezultati iz Tabele 15 i Grafika 7 pokazuju da se koncentracije $O_2^{\bullet-}$ u jetri pacova tretiranih insekticidom CPF ili IMI nisu statistički značajno razlikovale u poređenju sa kontrolom. U bubregu, u grupama CPF+VAE1 ($0,76 \pm 0,03 \mu\text{mol NBT/g tkiva}$) i CPF+VAE2 ($0,77 \pm 0,05 \mu\text{mol NBT/g tkiva}$), pokazane su značajno veće koncentracije $O_2^{\bullet-}$ radikala ($0,76 \pm 0,03 \mu\text{mol NBT/g tkiva}$ i $0,77 \pm 0,05 \mu\text{mol NBT/g tkiva}$) u poređenju sa CPF grupom ($0,50 \pm 0,09 \mu\text{mol NBT/g tkiva}$), ali vrednosti su približne kontroli ($0,72 \pm 0,05 \mu\text{mol NBT/g tkiva}$). U testisu nije bilo statistički značajnih razlika u koncentracijama $O_2^{\bullet-}$ radikala među grupama.

Tabela 15. Koncentracija superoksid anjon radikala ($O_2^{\bullet-}$) u ispitivanim tkivima pacova kontrolne i eksperimentalnih grupa

Parametar	$O_2^{\bullet-}$ ($\mu\text{mol NBT/g tkiva}$)		
	Jetra	Bubreg	Testis
Kontrola	$0,71 \pm 0,05$	$0,72 \pm 0,05$	$0,78 \pm 0,04$
CPF	$0,84 \pm 0,03$	$0,50 \pm 0,09$	$0,76 \pm 0,05$
IMI	$0,83 \pm 0,08$	$0,77 \pm 0,03$	$0,80 \pm 0,04$
VAE1	$0,75 \pm 0,08$	$0,68 \pm 0,07$	$0,77 \pm 0,07$
CPF + VAE1	$0,79 \pm 0,03$	$0,76 \pm 0,03^{\#}$	$0,81 \pm 0,11$
CPF + VAE2	$0,77 \pm 0,05$	$0,77 \pm 0,05^{\#}$	$0,84 \pm 0,04$
IMI + VAE1	$0,82 \pm 0,05$	$0,55 \pm 0,12$	$0,69 \pm 0,08$
IMI + VAE2	$0,78 \pm 0,08$	$0,64 \pm 0,05$	$0,77 \pm 0,10$

[#]Statistički značajno u poređenju sa CPF grupom ($p < 0,05$).

Grafik 7. Efekti VAE na koncentraciju superoksid anjon radikala ($O_2^{\cdot-}$) u ispitivanim tkivima tretiranih insekticidima CPF i IMI

[#]Statistički značajno u poređenju sa CPF grupom ($p < 0,05$).

4.7.1.2. Koncentracija vodonik peroksida (H₂O₂)

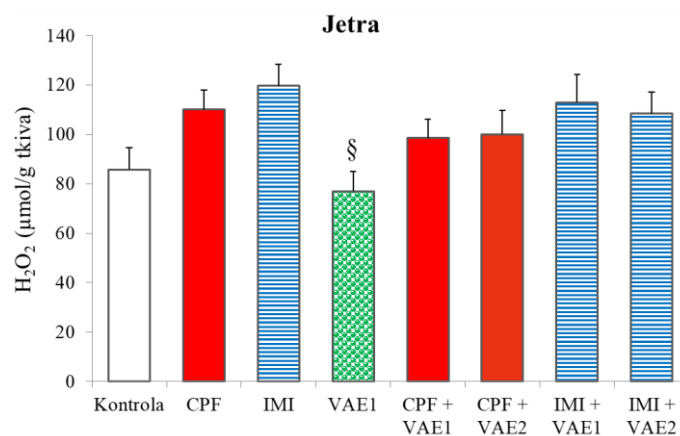
Koncentracije H₂O₂ u ispitivanim tkivima su prikazane u Tabeli 16 i na Grafiku 8. Zabeležene su povećane koncentracije H₂O₂ u jetri u grupama koje su tretirane CPF (110,0 ± 8,0 μmol/g tkiva) i IMI (119,7 ± 8,8 μmol/g tkiva) u odnosu na kontrolu (85,7 ± 8,8 μmol/g tkiva), koje nisu bile statistički značajne, dok je najmanja vrednost zabeležena u grupi VAE1 (77,0 ± 7,9 μmol/g tkiva). U bubregu i testisu takođe nije bilo statistički značajnih razlika u koncentracijama H₂O₂ među grupama.

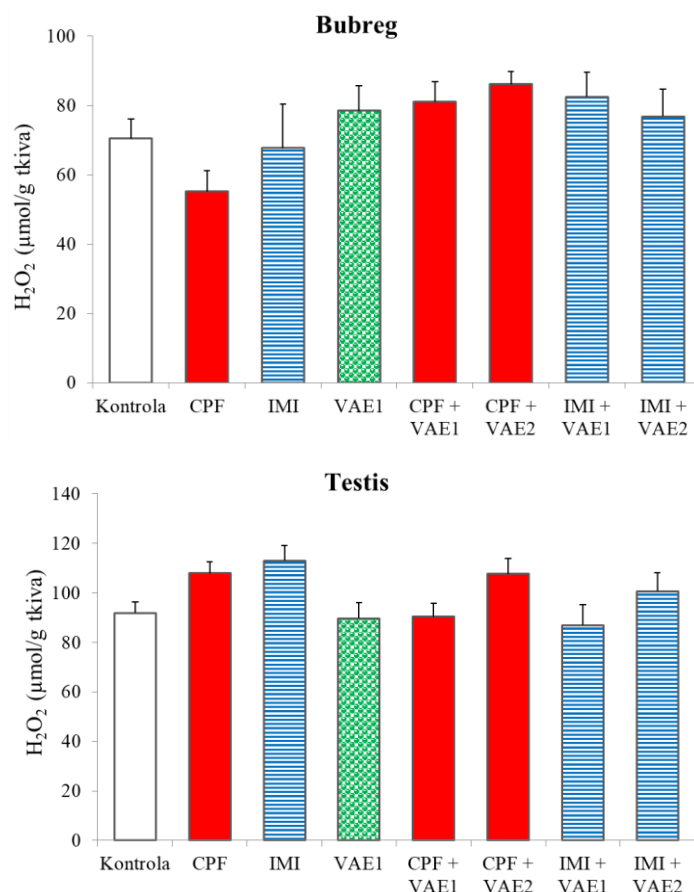
Tabela 16. Koncentracija vodonik peroksida (H₂O₂) u ispitivanim tkivima pacova kontrolne i eksperimentalnih grupa

Parametar Eksperimentalne grupe	H ₂ O ₂ (μmol/g tkiva)		
	Jetra	Bubreg	Testis
Kontrola	85,7 ± 8,8	70,5 ± 5,6	91,8 ± 4,4
CPF	110,0 ± 8,0	55,2 ± 6,1	107,8 ± 4,8
IMI	119,7 ± 8,8	67,7 ± 12,7	113,0 ± 5,9
VAE1	77,0 ± 7,9 [§]	78,5 ± 7,2	89,7 ± 6,3
CPF + VAE1	98,5 ± 7,5	81,0 ± 5,9	90,3 ± 5,4
CPF + VAE2	100,0 ± 9,6	86,2 ± 3,7	107,7 ± 6,2
IMI + VAE1	112,8 ± 11,5	82,5 ± 7,1	86,8 ± 8,4
IMI + VAE2	108,3 ± 8,8	76,8 ± 7,9	100,7 ± 7,5

[§]Statistički značajno u poređenju sa IMI grupom (p<0,05).

Grafik 8. Efekti VAE na koncentraciju vodonik peroksida (H₂O₂) u ispitivanim tkivima tretiranih insekticidima CPF i IMI





§Statistički značajno u poređenju sa IMI grupom ($p < 0,05$).

4.7.1.3. Koncentracija nitrita (NO_2^-)

U Tabeli 17 i Grafiku 9 prikazane su koncentracije NO_2^- u ispitivanim tkivima. U jetri su povećane koncentracije NO_2^- u grupama CPF ($244,5 \pm 25,7 \mu\text{mol/g tkiva}$) i IMI ($241,0 \pm 25,5 \mu\text{mol/g tkiva}$), IMI+VAE1 ($263,8 \pm 18,4 \mu\text{mol/g tkiva}$) i IMI+VAE2 ($262,1 \pm 23,0 \mu\text{mol/g tkiva}$) u odnosu na kontrolu ($196,5 \pm 11,9 \mu\text{mol/g tkiva}$), ali ova povećanja nisu statistički značajna.

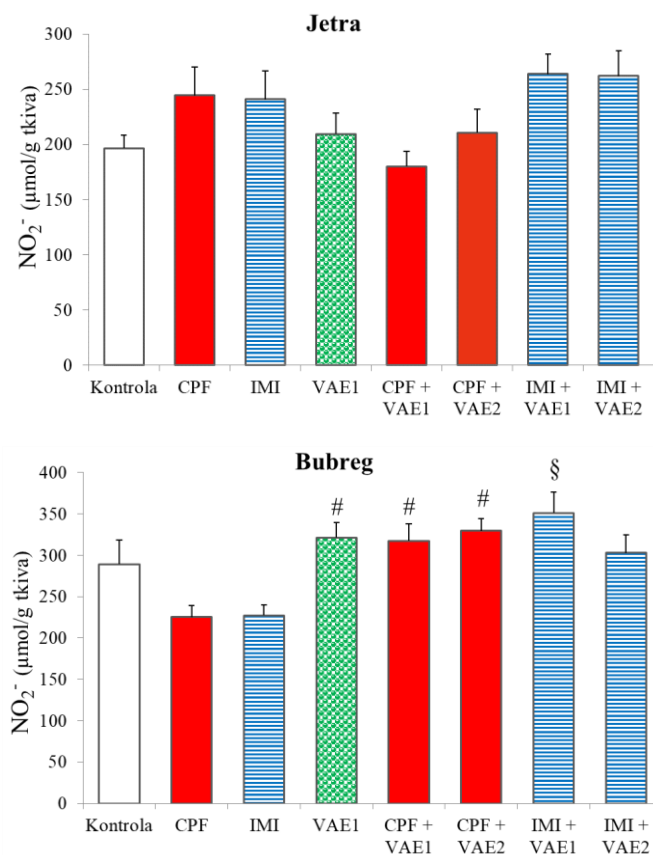
U bubregu su snižene vrednosti NO_2^- u grupama CPF ($225,1 \pm 13,9 \mu\text{mol/g tkiva}$) i IMI ($227,1 \pm 13,1 \mu\text{mol/g tkiva}$) u odnosu na kontrolu ($289,0 \pm 29,5 \mu\text{mol/g tkiva}$), ali ove promene nisu bile statistički značajne. U grupama VAE1 ($321,4 \pm 18,4 \mu\text{mol/g tkiva}$), CPF+VAE1 ($317,5 \pm 20,4 \mu\text{mol/g tkiva}$) i CPF+VAE2 ($329,5 \pm 14,4 \mu\text{mol/g tkiva}$) su povećane koncentracije NO_2^- u odnosu na CPF grupu ($225,1 \pm 13,9 \mu\text{mol/g tkiva}$), dok su vrednosti NO_2^- u grupi IMI+VAE1 ($351,3 \pm 25,2 \mu\text{mol/g tkiva}$) povećane u odnosu na IMI grupu ($227,1 \pm 13,1 \mu\text{mol/g tkiva}$). U testisu nisu zabeležene značajne razlike u koncentracijama NO_2^- između grupa.

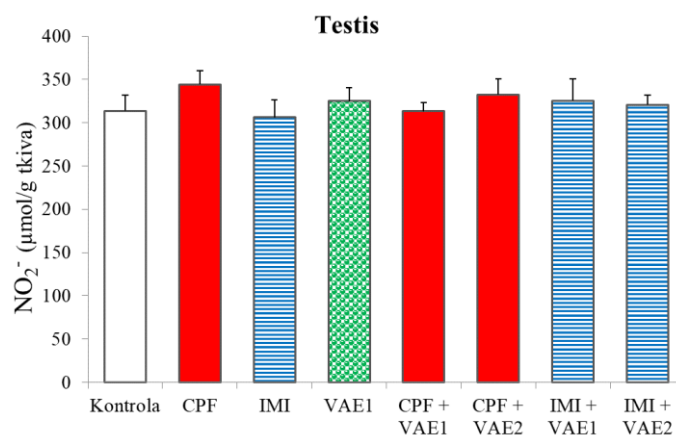
Tabela 17. Koncentracija nitrita (NO_2^-) u ispitivanim tkivima pacova kontrolne i eksperimentalnih grupa

Parametar	NO_2^- ($\mu\text{mol/g}$ tkiva)		
	Jetra	Bubreg	Testis
Kontrola	196,5 ± 11,9	289,0 ± 29,5	313,6 ± 18,2
CPF	244,5 ± 25,7	225,1 ± 13,9	344,4 ± 15,5
IMI	241,0 ± 25,5	227,1 ± 13,1	306,2 ± 20,1
VAE1	209,4 ± 19,2	321,4 ± 18,4 [#]	324,9 ± 15,3
CPF + VAE1	180,0 ± 14,1	317,5 ± 20,4 [#]	313,5 ± 9,5
CPF + VAE2	210,6 ± 21,5	329,5 ± 14,4 [#]	332,6 ± 18,4
IMI + VAE1	263,8 ± 18,4	351,3 ± 25,2 [§]	325,5 ± 25,5
IMI + VAE2	262,1 ± 23,0	302,9 ± 21,8	320,8 ± 10,9

[#]Statistički značajno u poređenju sa CPF grupom ($p < 0,05$).

[§]Statistički značajno u poređenju sa IMI grupom ($p < 0,05$).

Grafik 9. Efekti VAE na koncentraciju nitrita (NO_2^-) u ispitivanim tkivima tretiranih insekticidima CPF i IMI



#Statistički značajno u poređenju sa CPF grupom ($p < 0,05$).

§Statistički značajno u poređenju sa IMI grupom ($p < 0,05$).

4.7.2. Koncentracija LPO

Koncentracije LPO u ispitivanim tkivima prikazane su u Tabeli 18 i na Grafiku 10. Rezultati pokazuju da je nakon subakutnog tretmana došlo do porasta LPO u jetri jedinki u grupama CPF ($1,70 \pm 0,15$ nmol MDA/mg tkiva) i IMI ($1,97 \pm 0,23$ nmol MDA/mg tkiva) u odnosu na kontrolne jedinke ($0,99 \pm 0,04$ nmol MDA/mg tkiva). U grupi IMI+VAE1 ($1,01 \pm 0,06$ nmol MDA/mg tkiva) zabeleženo je značajno smanjenje LPO u odnosu na grupu tretiranu sa IMI. Životinje koje su dobijale samo VAE1 imale su značajno nižu vrednost LPO u jetri ($0,94 \pm 0,10$ nmol MDA/mg tkiva) u odnosu na grupe CPF i IMI, ali vrednost je približna kontroli. U bubregu nisu zabeležene statistički značajne razlike u koncentracijama LPO između grupa.

U testisu, u grupi tretiranoj CPF, koncentracija LPO je značajno povećana ($1,55 \pm 0,11$ nmol MDA/mg tkiva) u poređenju sa kontrolnim vrednostima ($1,02 \pm 0,09$ nmol MDA/mg tkiva). U grupi sa kotretmanom CPF+VAE1 ($1,00 \pm 0,10$ nmol MDA/mg tkiva) zabeleženo je značajno smanjenje LPO u odnosu na grupu CPF.

Tabela 18. Koncentracija LPO u ispitivanim tkivima pacova kontrolne i eksperimentalnih grupa

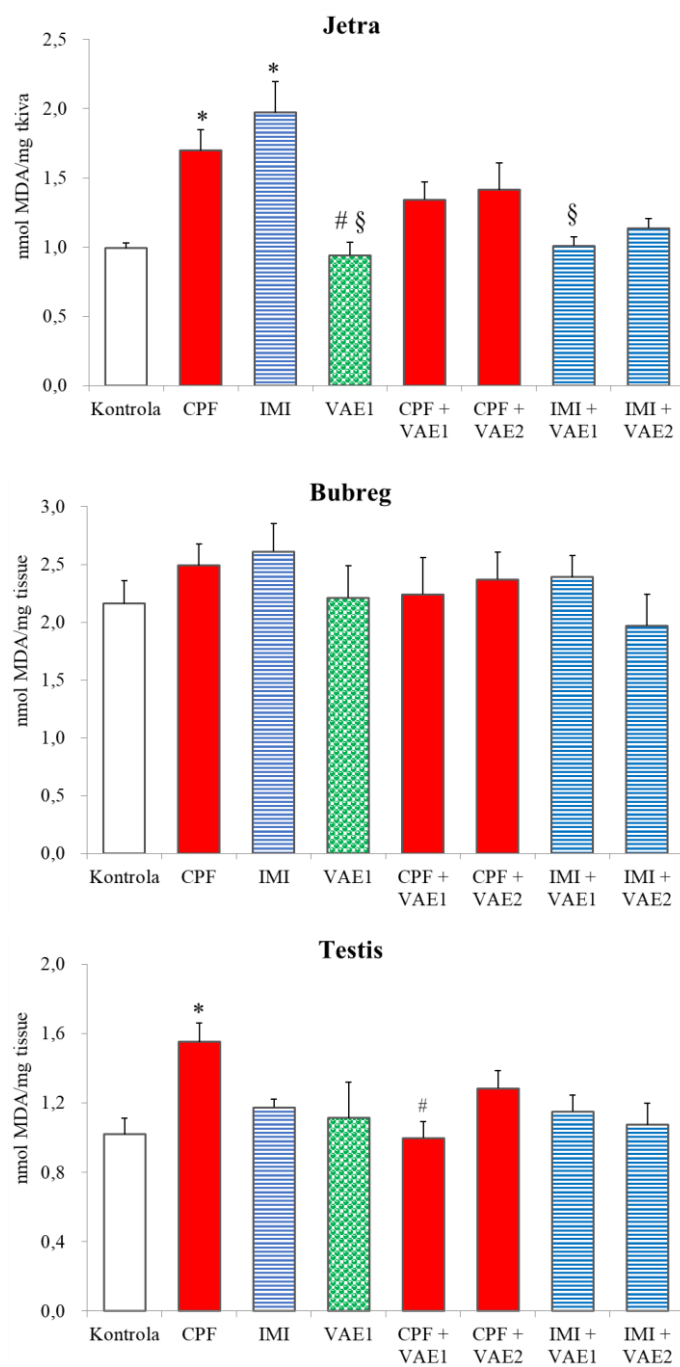
Parametar	LPO (nmol MDA/mg tkiva)		
	Jetra	Bubreg	Testis
Kontrola	$0,99 \pm 0,04$	$2,16 \pm 0,20$	$1,02 \pm 0,09$
CPF	$1,70 \pm 0,15^*$	$2,49 \pm 0,19$	$1,55 \pm 0,11^*$
IMI	$1,97 \pm 0,23^*$	$2,61 \pm 0,24$	$1,17 \pm 0,05$
VAE1	$0,94 \pm 0,10^{#\S}$	$2,21 \pm 0,28$	$1,11 \pm 0,21$
CPF + VAE1	$1,34 \pm 0,13$	$2,24 \pm 0,32$	$1,00 \pm 0,10^{\#}$
CPF + VAE2	$1,41 \pm 0,19$	$2,37 \pm 0,23$	$1,28 \pm 0,10$
IMI + VAE1	$1,01 \pm 0,06^{\S}$	$2,39 \pm 0,19$	$1,15 \pm 0,10$
IMI + VAE2	$1,14 \pm 0,07$	$1,97 \pm 0,27$	$1,07 \pm 0,13$

*Statistički značajno u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$).

#Statistički značajno u poređenju sa CPF grupom ($p < 0,05$).

§Statistički značajno u poređenju sa IMI grupom ($p < 0,05$).

Grafik 10. Efekti VAE na koncentraciju LPO u ispitivanim tkivima tretiranih insekticidima CPF i IMI



*Statistički značajno u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$).

#Statistički značajno u poređenju sa CPF grupom ($p < 0,05$).

4.8. Parametri antioksidativnog sistema zaštite u jetri, bubregu i testisu

4.8.1. Neenzimske komponente antioksidativne zaštite

Koncentracije GSH, GSSG i vitamina C u ispitivanim tkivima prikazane su u Tabelama 19-22 i na Graficima 11-14.

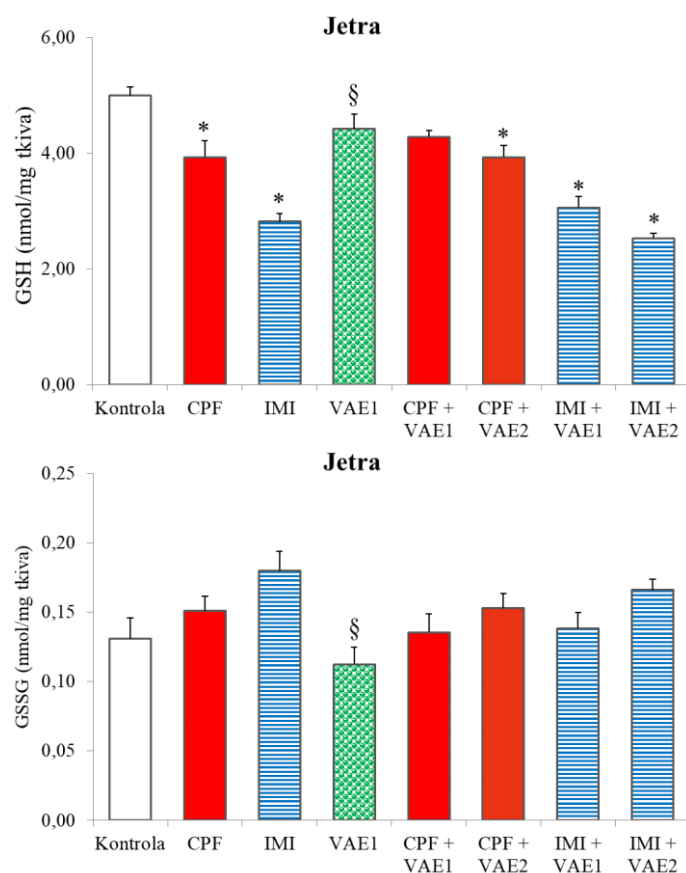
Koncentracija GSH u jetri pacova tretiranih sa CPF ($3,93 \pm 0,28$ nmol/mg tkiva) ili IMI ($2,82 \pm 0,14$ nmol/mg tkiva) je značajno smanjena u poređenju sa kontrolom ($4,99 \pm 0,15$ nmol/mg tkiva). Grupe CPF+VAE2 ($3,93 \pm 0,20$ nmol/mg tkiva), IMI+VAE1 ($3,06 \pm 0,19$ nmol/mg tkiva) i IMI+VAE2 ($2,53 \pm 0,09$ nmol/mg tkiva) takođe su pokazale značajnu razliku u koncentraciji GSH u odnosu na kontrolu. Grupa koja je dobijala samo ekstrakt (VAE1) pokazala je značajno povećanje koncentracije GSH ($4,42 \pm 0,25$ nmol/mg tkiva) u odnosu na IMI grupu (Tabela 19 i Grafik 11). Koncentracija GSSG u jetri nije se statistički značajno razlikovala u grupama CPF i IMI u odnosu na kontrolne vrednosti. Jedino je grupa koja je dobijala ekstrakt imele (VAE1) pokazala značajnu razliku ($0,11 \pm 0,012$ nmol/mg tkiva) u odnosu na IMI grupu ($0,18 \pm 0,014$ nmol/mg tkiva) (Tabela 19 i Grafik 11).

Tabela 19. Koncentracija GSH i GSSG u jetri pacova u kontrolnoj i eksperimentalnim grupama

Eksperimentalne grupe	Jetra	
	GSH (nmol/mg tkiva)	GSSG (nmol/mg tkiva)
Kontrola	$4,99 \pm 0,15$	$0,13 \pm 0,015$
CPF	$3,93 \pm 0,28^*$	$0,15 \pm 0,011$
IMI	$2,82 \pm 0,14^*$	$0,18 \pm 0,014$
VAE1	$4,42 \pm 0,25^{\S}$	$0,11 \pm 0,012^{\S}$
CPF + VAE1	$4,28 \pm 0,11$	$0,14 \pm 0,014$
CPF + VAE2	$3,93 \pm 0,20^*$	$0,15 \pm 0,010$
IMI + VAE1	$3,06 \pm 0,19^*$	$0,14 \pm 0,012$
IMI + VAE2	$2,53 \pm 0,09^*$	$0,17 \pm 0,008$

*Statistički značajno u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$).

\S Statistički značajno u poređenju sa IMI grupom ($p < 0,05$).

Grafik 11. Efekti VAE na koncentraciju GSH i GSSG u jetri pacova tretiranih sa CPF i IMI

*Statistički značajno u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$).

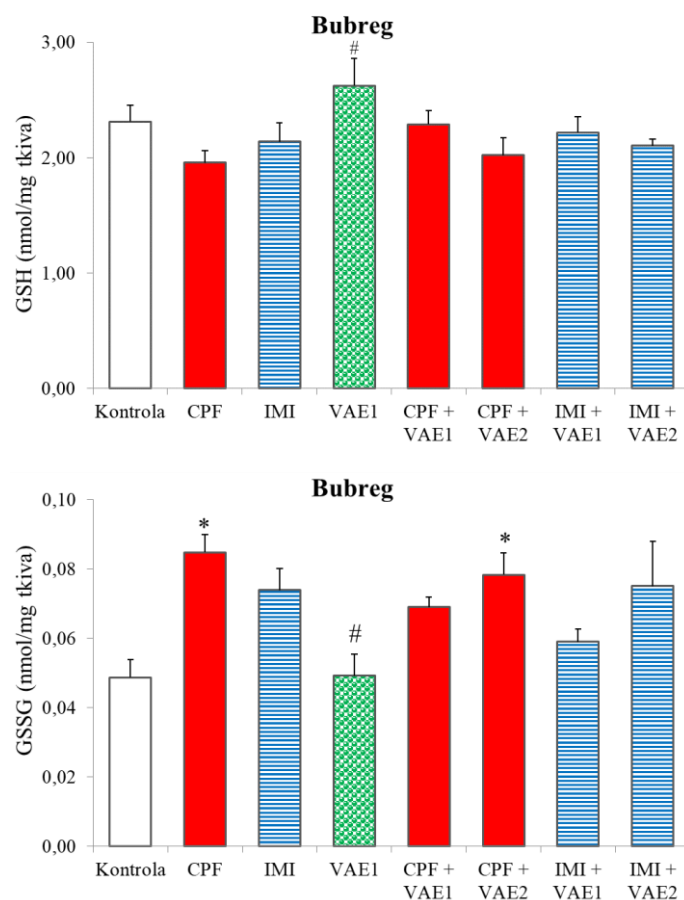
§Statistički značajno u poređenju sa IMI grupom ($p < 0,05$).

Tabela 20. Koncentracija GSH i GSSG u bubregu pacova u kontrolnoj i tretiranim grupama

Eksperimentalne grupe	Bubreg	
	GSH (nmol/mg tkiva)	GSSG (nmol/mg tkiva)
Kontrola	2,31 ± 0,15	0,05 ± 0,005
CPF	1,96 ± 0,11	0,08 ± 0,005*
IMI	2,14 ± 0,16	0,07 ± 0,006
VAE1	2,62 ± 0,24#	0,05 ± 0,006#
CPF + VAE1	2,29 ± 0,12	0,07 ± 0,003
CPF + VAE2	2,02 ± 0,15	0,08 ± 0,006*
IMI + VAE1	2,22 ± 0,13	0,06 ± 0,004
IMI + VAE2	2,10 ± 0,06	0,08 ± 0,013

*Statistički značajno u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$).

#Statistički značajno u poređenju sa CPF grupom ($p < 0,05$).

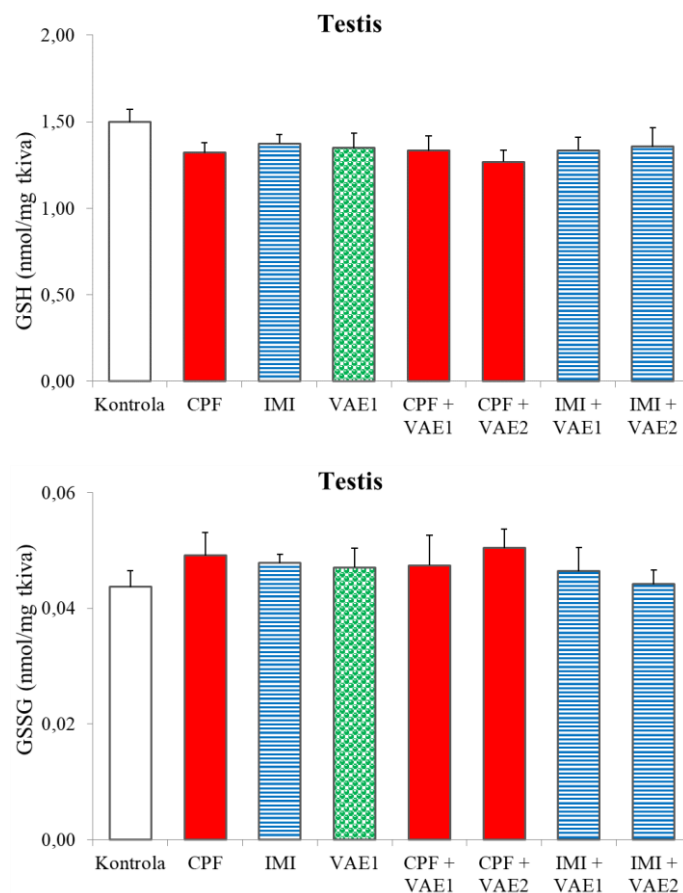
Grafik 12. Efekti VAE na koncentraciju GSH i GSSG u bubregu pacova tretiranih sa CPF i IMI

*Statistički značajno u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$).

#Statistički značajno u poređenju sa CPF grupom ($p < 0,05$).

Tabela 21. Koncentracija GSH i GSSG u testisu pacova u kontrolnoj i tretiranim grupama

Eksperimentalne grupe	Testis	
	GSH (nmol/mg tkiva)	GSSG (nmol/mg tkiva)
Kontrola	1,50 ± 0,08	0,04 ± 0,003
CPF	1,32 ± 0,06	0,05 ± 0,004
IMI	1,37 ± 0,05	0,05 ± 0,002
VAE1	1,35 ± 0,09	0,05 ± 0,003
CPF + VAE1	1,33 ± 0,09	0,05 ± 0,005
CPF + VAE2	1,27 ± 0,07	0,05 ± 0,003
IMI + VAE1	1,34 ± 0,08	0,05 ± 0,004
IMI + VAE2	1,36 ± 0,11	0,04 ± 0,002

Grafik 13. Efekti VAE na koncentraciju GSH i GSSG u testisu pacova tretiranih sa CPF i IMI

U bubregu pacova tretiranih sa CPF i IMI zabeležena je snižena koncentracija GSH u odnosu na kontrolu, ali bez statističke značajnosti. Samo u grupi VAE1 pokazana je značajna razlika koncentracije GSH ($2,62 \pm 0,24$ nmol/mg tkiva) u odnosu na CPF grupu ($1,96 \pm 0,11$ nmol/mg tkiva). Koncentracija GSSG u bubregu bila je značajno povećana u grupi CPF ($0,08 \pm 0,005$ nmol/mg tkiva) i CPF+VAE2 ($0,08 \pm 0,006$ nmol/mg tkiva) u poređenju sa kontrolnom grupom ($0,05 \pm 0,005$ nmol/mg tkiva), dok je grupa tretirana VAE1 pokazala značajno smanjen GSSG ($0,05 \pm 0,006$ nmol/mg tkiva) u poređenju sa CPF grupom (Tabela 20 i Grafik 12).

U testisu nisu zabeležene statistički značajne razlike u koncentracijama GSH i GSSG između eksperimentalnih grupa (Tabela 21 i Grafik 13).

U Tabeli 22 i na Grafiku 14 prikazani su rezultati efekata tretmana na koncentracije vitamina C u jetri i testisu. Koncentracija vitamina C značajno je povećana u jetri u grupama CPF ($30,37 \pm 1,63$ $\mu\text{g}\%$) i IMI ($39,37 \pm 2,67$ $\mu\text{g}\%$) u odnosu na kontrolu ($15,58 \pm 1,46$ $\mu\text{g}\%$). Takođe, povećana koncentracija vitamina C zabeležena je i u kotretmanima CPF+VAE1 ($25,94 \pm 1,85$ $\mu\text{g}\%$), CPF+VAE2 ($28,71 \pm 2,57$ $\mu\text{g}\%$), IMI+VAE1 ($32,28 \pm 1,53$ $\mu\text{g}\%$) i IMI+VAE2 ($37,37 \pm 3,00$ $\mu\text{g}\%$) u poređenju sa kontrolnim vrednostima. Koncentracija vitamina C između grupa IMI i VAE1 ($22,35 \pm 2,53$ $\mu\text{g}\%$) pokazuje značajne razlike. U testisu je koncentracija vitamina C značajno povećana kod jedinki tretiranih sa IMI ($60,37 \pm 3,89$ $\mu\text{g}\%$) i jedinki iz grupa CPF+VAE1 ($69,66 \pm 2,34$ $\mu\text{g}\%$), CPF+VAE2 ($62,30 \pm 2,43$ $\mu\text{g}\%$) i IMI+VAE2 ($64,09 \pm 1,62$ $\mu\text{g}\%$) u odnosu na kontrolu ($45,40 \pm 2,56$ $\mu\text{g}\%$), dok je koncentracija vitamina C u grupi CPF+VAE1 bila povišena i u odnosu na CPF grupu ($53,16 \pm 1,62$ $\mu\text{g}\%$).

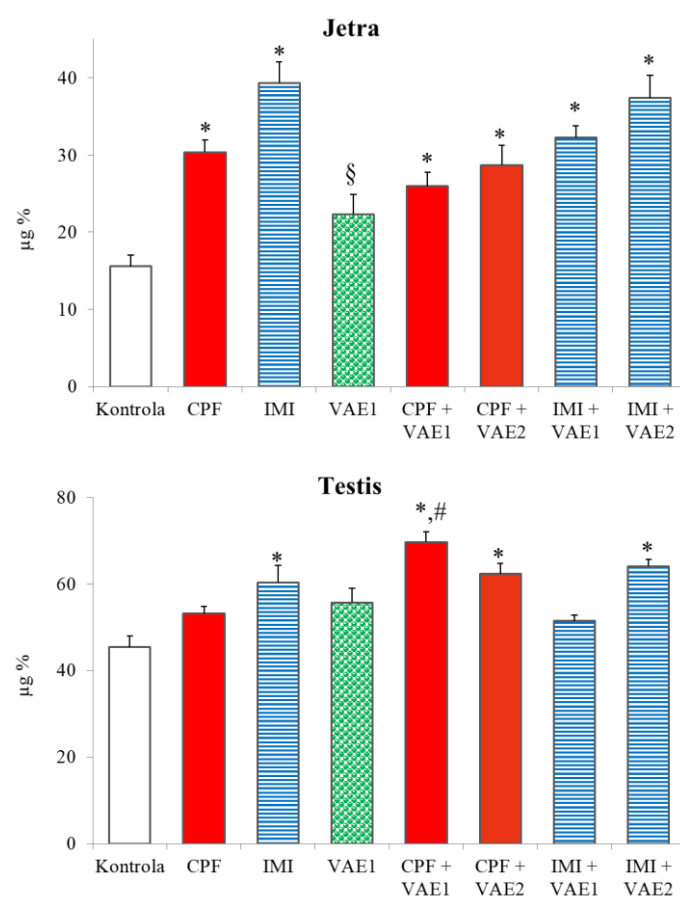
Tabela 22. Koncentracija vitamina C u ispitivanim tkivima pacova u kontroli i eksperimentalnim grupama

Parametar	Vitamin C ($\mu\text{g}\%$)	
	Jetra	Testis
Kontrola	15,58 \pm 1,46	45,40 \pm 2,56
CPF	30,37 \pm 1,63*	53,16 \pm 1,62
IMI	39,37 \pm 2,67*	60,37 \pm 3,89*
VAE1	22,35 \pm 2,53 \S	55,68 \pm 3,26
CPF + VAE1	25,94 \pm 1,85*	69,66 \pm 2,34* $\#$
CPF + VAE2	28,71 \pm 2,57*	62,30 \pm 2,43*
IMI + VAE1	32,28 \pm 1,53*	51,40 \pm 1,42
IMI + VAE2	37,37 \pm 3,00*	64,09 \pm 1,62*

*Statistički značajno u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$).

$\#$ Statistički značajno u poređenju sa CPF grupom ($p < 0,05$).

\S Statistički značajno u poređenju sa IMI grupom ($p < 0,05$).

Grafik 14. Efekti VAE na koncentraciju vitamina C u ispitivanim tkivima tretiranih sa CPF i IMI

*Statistički značajno u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$).

$\#$ Statistički značajno u poređenju sa CPF grupom ($p < 0,05$).

\S Statistički značajno u poređenju sa IMI grupom ($p < 0,05$).

4.8.2. Enzimi antioksidativnog sistema zaštite u jetri, bubregu i testisu

Rezultati aktivnosti enzima SOD u ispitivanim tkivima prikazani su u Tabeli 23 i na Grafiku 15.

Aktivnost SOD u jetri pacova značajno je povećana u grupama koje su tretirane CPF ($22,74 \pm 0,84$ J/mg proteina) i IMI ($24,02 \pm 1,36$ J/mg proteina) u odnosu na kontrolu ($16,90 \pm 0,69$ J/mg proteina). Tretman CPF+VAE1 pokazao je značajno smanjenje aktivnosti SOD u jetri ($19,30 \pm 0,75$ J/mg proteina) u odnosu na grupu tretiranu samo CPF, dok je u grupi IMI+VAE1 aktivnost SOD bila smanjena ($18,71 \pm 0,67$ J/mg proteina) u odnosu na IMI grupu. Životinje koje su dobijale samo ekstrakt (VAE1) pokazale su značajnu razliku u aktivnosti SOD ($15,82 \pm 0,67$ J/mg proteina) u odnosu na životinje koje su dobijale samo insekticide CPF ili IMI.

Oba insekticida su dovela do značajnog povećanja aktivnosti SOD u bubregu, u CPF grupi ($60,37 \pm 2,95$ J/mg proteina) i IMI grupi ($50,08 \pm 3,93$ J/mg proteina) u odnosu na kontrolu ($24,80 \pm 1,40$ J/mg proteina). U grupama VAE1 ($33,57 \pm 2,91$ J/mg proteina), CPF+VAE1 ($24,31 \pm 1,95$ J/mg proteina) i CPF+VAE2 ($24,11 \pm 1,43$ J/mg proteina) zabeležena je značajno snižena aktivnost SOD u odnosu na CPF grupu. Smanjena je aktivnost SOD i u grupama IMI+VAE1 ($25,55 \pm 1,74$ J/mg proteina) i IMI+VAE2 ($24,87 \pm 2,67$ J/mg proteina) u odnosu na IMI grupu.

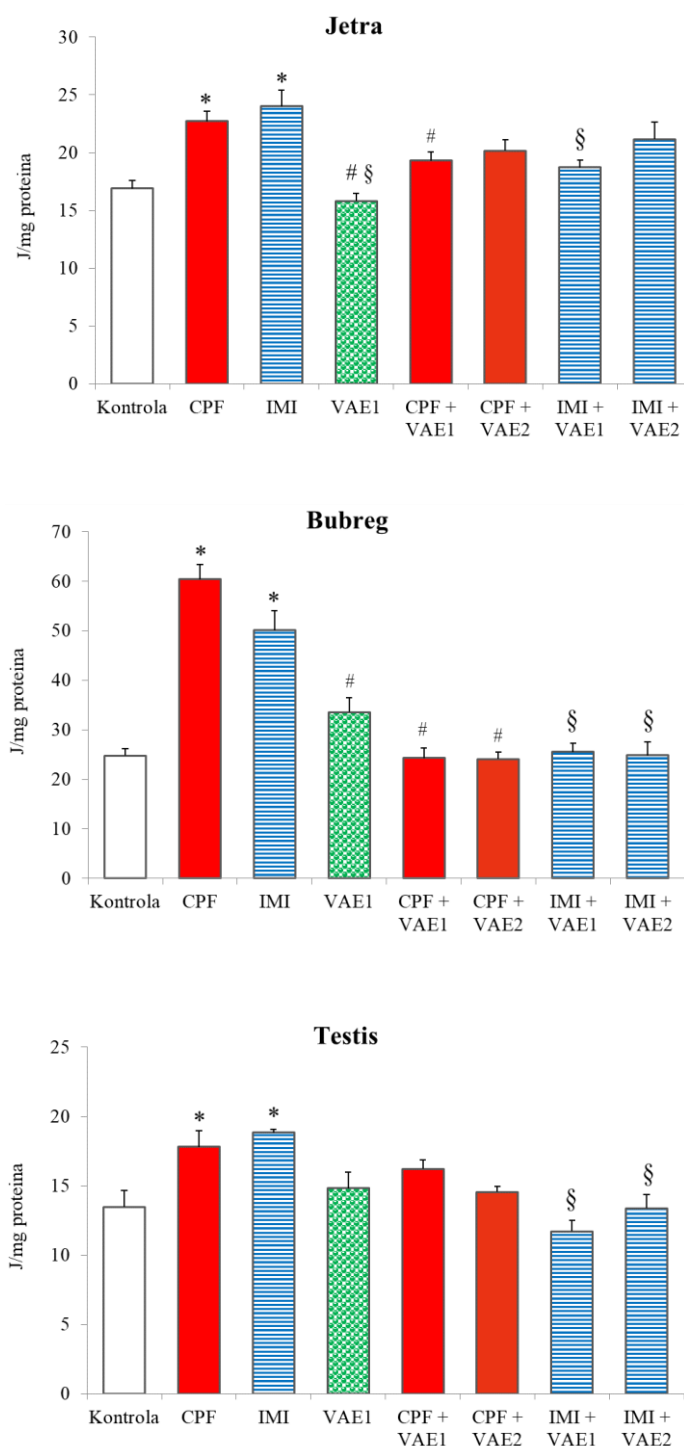
Tabela 23. Aktivnosti SOD u ispitivanim tkivima pacova u kontroli i eksperimentalnim grupama

Parametar	SOD (J/mg proteina)		
	Jetra	Bubreg	Testis
Kontrola	$16,90 \pm 0,69$	$24,80 \pm 1,40$	$13,48 \pm 1,20$
CPF	$22,74 \pm 0,84^*$	$60,37 \pm 2,95^*$	$17,81 \pm 1,17^*$
IMI	$24,02 \pm 1,36^*$	$50,08 \pm 3,93^*$	$18,85 \pm 0,22^*$
VAE1	$15,82 \pm 0,67^{*\#}$	$33,57 \pm 2,91^{\#}$	$14,82 \pm 1,15$
CPF + VAE1	$19,30 \pm 0,75^{\#}$	$24,31 \pm 1,95^{\#}$	$16,23 \pm 0,63$
CPF + VAE2	$20,17 \pm 0,96$	$24,11 \pm 1,43^{\#}$	$14,55 \pm 0,43$
IMI + VAE1	$18,71 \pm 0,67^{\#}$	$25,55 \pm 1,74^{\#}$	$11,71 \pm 0,82^{\#}$
IMI + VAE2	$21,15 \pm 1,53$	$24,87 \pm 2,67^{\#}$	$13,37 \pm 0,98^{\#}$

*Statistički značajno u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$).

[#]Statistički značajno u poređenju sa CPF grupom ($p < 0,05$).

[§]Statistički značajno u poređenju sa IMI grupom ($p < 0,05$).

Grafik 15. Efekti VAE na aktivnost SOD u ispitivanim tkivima pacova tretiranih insekticidima CPF i IMI

*Statistički značajno u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$).

#Statistički značajno u poređenju sa CPF grupom ($p < 0,05$).

§Statistički značajno u poređenju sa IMI grupom ($p < 0,05$).

Aktivnost SOD u grupama CPF ($17,81 \pm 1,17$ J/mg proteina) i IMI ($18,85 \pm 0,22$ J/mg proteina) bila je značajno povećana u odnosu na kontrolu ($13,48 \pm 1,20$ J/mg proteina), dok je

zabeležena značajno snižena aktivnost SOD u grupama IMI+VAE1 ($11,71 \pm 0,82$ J/mg proteina) i IMI+VAE2 ($13,37 \pm 0,98$ J/mg proteina) u poređenju sa IMI grupom.

Efekti tretmana insekticidima CPF i IMI i ekstrakta lista imele VAE1 i 2 u kotretmanu na aktivnost CAT u jetri, bubregu i testisu prikazani su u Tabeli 24 i na Grafiku 16.

Aktivnost CAT u jetri životinja iz CPF grupe bila je značajno smanjena ($272,6 \pm 15,22$ J/mg proteina), dok je u grupi IMI bila značajno povišena ($448,18 \pm 16,11$ J/mg proteina) u poređenju sa kontrolom ($401,9 \pm 6,7$ J/mg proteina). Kotretmani CPF+VAE1 ($436,5 \pm 20,44$ J/mg proteina) i CPF+VAE2 ($425,4 \pm 11,41$ J/mg proteina) pokazali su značajno povećanje aktivnosti CAT u jetri u odnosu na CPF grupu. Grupe VAE1 ($373,1 \pm 9,54$ J/mg proteina) i IMI+VAE1 ($364,0 \pm 10,38$ J/mg proteina) imale su smanjenu aktivnost CAT u odnosu na IMI.

U bubregu su izmerene povišene vrednosti CAT u grupama CPF ($583,9 \pm 23,2$ J/mg proteina) i IMI ($551,9 \pm 60,6$ J/mg proteina) u odnosu na kontrolu ($250,7 \pm 17,7$ J/mg proteina). Kotretmani CPF+VAE1 ($117,7 \pm 9,3$ J/mg proteina) i CPF+VAE2 ($190,2 \pm 21,1$ J/mg proteina), kao i IMI+VAE1 ($174,0 \pm 13,4$ J/mg proteina) i IMI+VAE2 ($207,5 \pm 34,4$ J/mg proteina) doveli su do značajnog smanjenja aktivnosti CAT u bubregu u odnosu na grupe CPF i IMI. Grupa VAE1 ($241,8 \pm 20,4$ J/mg proteina) ima smanjenu aktivnost CAT u odnosu na CPF i IMI grupu.

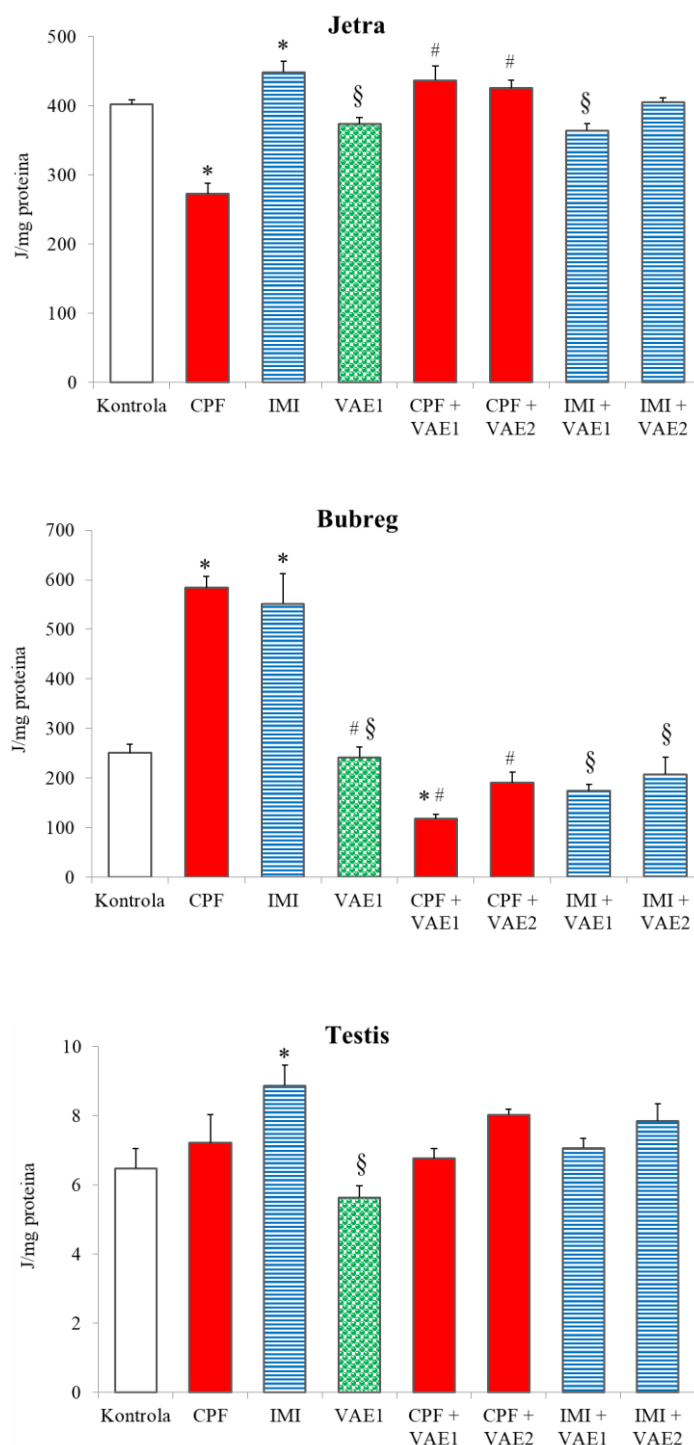
Tabela 24. Aktivnosti CAT u ispitivanim tkivima pacova u kontroli i eksperimentalnim grupama

Parametar	CAT (J/mg proteina)		
	Jetra	Bubreg	Testis
Kontrola	$401,9 \pm 6,7$	$250,7 \pm 17,7$	$6,4 \pm 0,5$
CPF	$272,6 \pm 15,2^*$	$583,9 \pm 23,1^*$	$7,2 \pm 0,8$
IMI	$448,1 \pm 16,1^*$	$551,9 \pm 60,6^*$	$8,8 \pm 0,6^*$
VAE1	$373,1 \pm 9,5^\S$	$241,8 \pm 20,4^{\#\S}$	$5,6 \pm 0,3^\S$
CPF + VAE1	$436,5 \pm 20,4^\#$	$117,7 \pm 9,3^{*\#}$	$6,7 \pm 0,3$
CPF + VAE2	$425,4 \pm 11,4^\#$	$190,2 \pm 21,1^\#$	$8,0 \pm 0,1$
IMI + VAE1	$364,0 \pm 10,3^\S$	$174,0 \pm 13,4^\S$	$7,0 \pm 0,2$
IMI + VAE2	$404,9 \pm 6,3$	$207,5 \pm 34,4^\S$	$7,8 \pm 0,5$

*Statistički značajno u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$).

#Statistički značajno u poređenju sa CPF grupom ($p < 0,05$).

§Statistički značajno u poređenju sa IMI grupom ($p < 0,05$).

Grafik 16. Efekti VAE na aktivnost CAT u ispitivanim tkivima pacova tretiranih insekticidima CPF i IMI

*Statistički značajno u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$).

#Statistički značajno u poređenju sa CPF grupom ($p < 0,05$).

§Statistički značajno u poređenju sa IMI grupom ($p < 0,05$).

Aktivnost CAT u testisu kod pacova posle tretmana sa IMI pokazala je značajno povećanje ($8,8 \pm 0,6$ J/mg proteina) u poređenju sa kontrolnom grupom ($6,4 \pm 0,5$ J/mg

proteina), dok je u grupi VAE1 značajno smanjena ($5,6 \pm 0,3$ J/mg proteina) u odnosu na IMI grupu.

Promene u aktivnosti enzima GSH-Px u ispitivanim tkivima pacova nakon tretmana date su u Tabeli 25 i na Grafiku 17.

Izražena redukcija aktivnosti enzima GSH-Px zabeležena je u jetri životinja koje su tretirane sa CPF ($64,06 \pm 4,52$ J/mg proteina) u odnosu na kontrolu ($99,35 \pm 1,76$ J/mg proteina), dok je u grupi tretiranoj sa IMI značajno povećana aktivnost ovog enzima ($159,62 \pm 7,18$ J/mg proteina). U grupama VAE1 ($105,23 \pm 8,38$ J/mg proteina) i CPF+VAE1 ($119,39 \pm 12,07$ J/mg proteina) zabeležene su značajno povećane vrednosti GSH-Px u odnosu na CPF grupu, dok su grupe VAE1 i IMI+VAE1 ($102,82 \pm 12,31$ J/mg proteina) pokazale smanjenu aktivnost GSH-Px u odnosu na IMI grupu.

Povećana aktivnost GSH-Px u bubregu zapaža se u grupama CPF ($83,46 \pm 5,48$ J/mg proteina) i IMI ($126,26 \pm 8,07$ J/mg proteina) u odnosu na kontrolu ($57,67 \pm 3,45$ J/mg proteina). U grupi CPF+VAE1 aktivnost GSH-Px bila je značajno niža ($42,28 \pm 3,33$ J/mg proteina) u odnosu na CPF grupu. U grupama VAE1 ($62,00 \pm 6,34$ J/mg proteina) i IMI+VAE1 ($40,30 \pm 4,12$ J/mg proteina) vrednosti GSH-Px su bile značajno niže u odnosu na IMI grupu. U grupi IMI+VAE2 zabeležene su značajno niže vrednosti GSH-Px ($32,20 \pm 4,46$ J/mg proteina) u poređenju sa kontrolom i IMI grupom.

Aktivnost GSH-Px u testisu značajno je smanjena u grupama VAE1 ($2,95 \pm 0,23$ J/mg proteina), CPF+VAE1 ($3,50 \pm 0,45$ J/mg proteina) i CPF+VAE2 ($2,60 \pm 0,22$ J/mg proteina) u odnosu na CPF grupu, dok je njen porast zabeležen u grupi IMI+VAE2 ($5,49 \pm 0,43$ J/mg proteina) u odnosu na IMI grupu ($2,19 \pm 0,25$ J/mg proteina) i kontrolu ($3,92 \pm 0,28$ J/mg proteina).

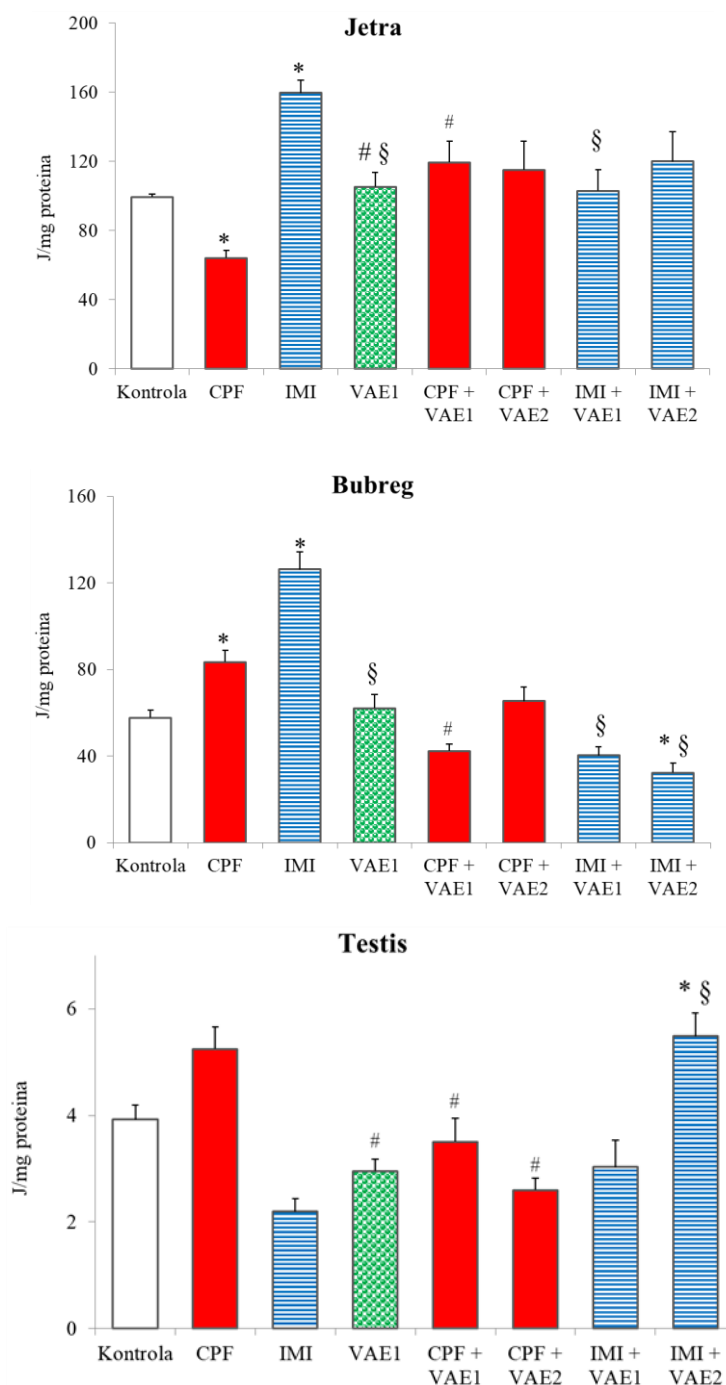
Tabela 25. Aktivnosti GSH-Px u ispitivanim tkivima pacova u kontroli i eksperimentalnim grupama

Parametar	GSH-Px (J/mg proteina)		
	Jetra	Bubreg	Testis
Kontrola	$99,35 \pm 1,76$	$57,67 \pm 3,45$	$3,92 \pm 0,28$
CPF	$64,06 \pm 4,52^*$	$83,46 \pm 5,48^*$	$5,25 \pm 0,41$
IMI	$159,62 \pm 7,18^*$	$126,26 \pm 8,07^*$	$2,19 \pm 0,25$
VAE1	$105,23 \pm 8,38^{\#§}$	$62,00 \pm 6,34^{\$}$	$2,95 \pm 0,23^{\#}$
CPF + VAE1	$119,39 \pm 12,07^{\#}$	$42,28 \pm 3,33^{\#}$	$3,50 \pm 0,45^{\#}$
CPF + VAE2	$115,02 \pm 16,51$	$65,37 \pm 6,37$	$2,60 \pm 0,22^{\#}$
IMI + VAE1	$102,82 \pm 12,31^{\$}$	$40,30 \pm 4,12^{\$}$	$3,03 \pm 0,50$
IMI + VAE2	$119,95 \pm 17,08$	$32,20 \pm 4,46^{*\$}$	$5,49 \pm 0,43^{*\$}$

*Statistički značajno u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$).

#Statistički značajno u poređenju sa CPF grupom ($p < 0,05$).

§Statistički značajno u poređenju sa IMI grupom ($p < 0,05$).

Grafik 17. Efekti VAE na aktivnost GSH-Px u jetri, bubregu i testisu pacova tretiranih insekticidima CPF i IMI

*Statistički značajno u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$).

#Statistički značajno u poređenju sa CPF grupom ($p < 0,05$).

§Statistički značajno u poređenju sa IMI grupom ($p < 0,05$).

Aktivnosti enzima GR u ispitivanim tkivima pacova prikazane su u Tabeli 26 i na Grafiku 18. Aktivnost GR u jetri životinja tretiranih sa CPF bila je smanjena ($5,87 \pm 1,17$ J/mg proteina), dok je porast aktivnosti ovog enzima zabeležen u IMI grupi ($24,24 \pm 1,77$ J/mg proteina) u odnosu na kontrolne životinje ($16,68 \pm 0,53$ J/mg proteina). U grupama VAE1 ($18,32 \pm 1,65$ J/mg proteina), CPF+VAE1 ($24,38 \pm 2,37$ J/mg proteina) i CPF+VAE2 ($21,91 \pm$

3,04 J/mg proteina) zabeleženo je značajno povećanje aktivnosti enzima GR u odnosu na CPF grupu.

Aktivnost GR u bubregu značajno je povećana u grupi tretiranoj insekticidom CPF ($174,87 \pm 14,09$ J/mg proteina) u poređenju sa kontrolom ($99,84 \pm 12,31$ J/mg proteina). U grupama VAE1 ($126,10 \pm 10,96$ J/mg proteina), CPF+VAE1 ($61,99 \pm 2,96$ J/mg proteina) i CPF+VAE2 ($68,31 \pm 7,76$ J/mg proteina) zabeležene su značajno smanjene aktivnosti GR u bubregu u poređenju sa CPF grupom, dok su kod grupa IMI+VAE1 ($73,43 \pm 10,68$ J/mg proteina) i IMI+VAE2 ($50,62 \pm 7,77$ J/mg proteina) zabeležene značajno niže aktivnosti GR u odnosu na životinje tretirane sa IMI. U testisu pacova nisu zabeležene značajne promene u aktivnosti enzima GR između eksperimentalnih grupa.

Tabela 26. Aktivnosti GR u ispitivanim tkivima pacova u kontroli i eksperimentalnim grupama

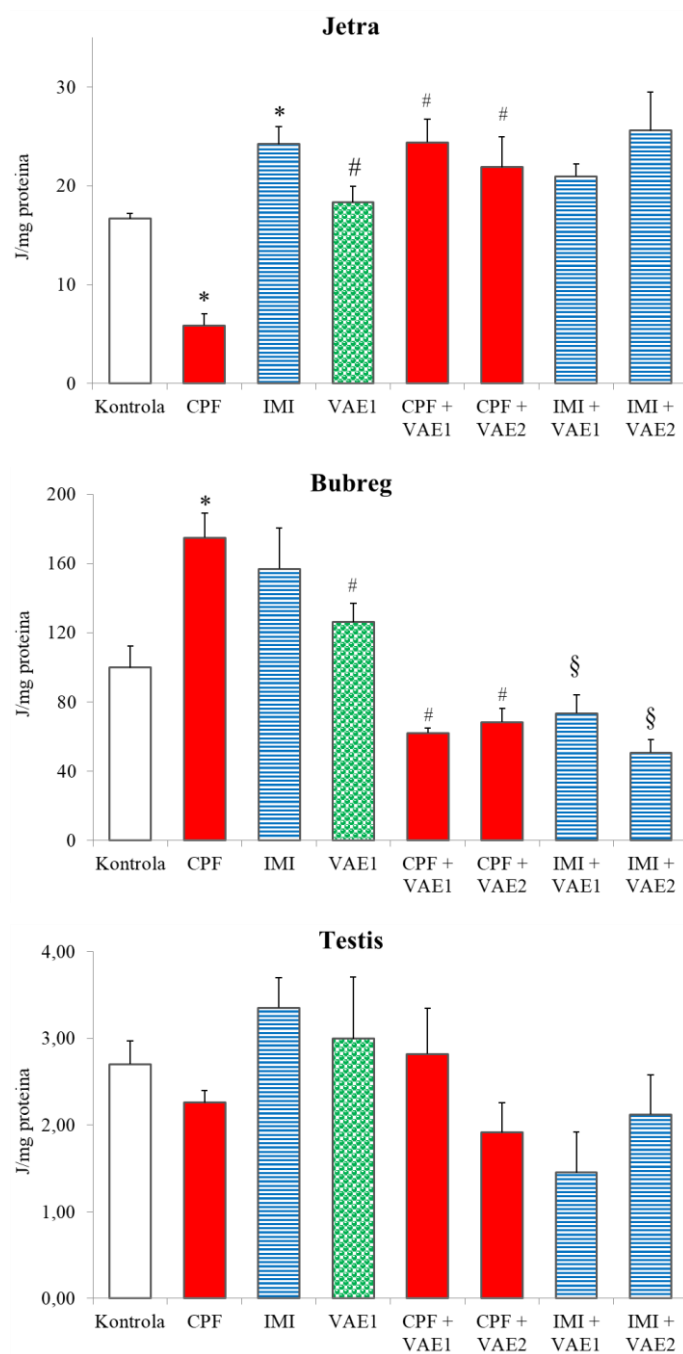
Parametar	GR (J/mg proteina)		
	Jetra	Bubreg	Testis
Kontrola	$16,68 \pm 0,53$	$99,84 \pm 12,31$	$2,70 \pm 0,26$
CPF	$5,87 \pm 1,17^*$	$174,87 \pm 14,09^*$	$2,26 \pm 0,14$
IMI	$24,24 \pm 1,77^*$	$156,88 \pm 23,72$	$3,35 \pm 0,35$
VAE1	$18,32 \pm 1,65^\#$	$126,10 \pm 10,96^\#$	$3,00 \pm 0,71$
CPF + VAE1	$24,38 \pm 2,37^\#$	$61,99 \pm 2,96^\#$	$2,82 \pm 0,53$
CPF + VAE2	$21,91 \pm 3,04^\#$	$68,31 \pm 7,76^\#$	$1,92 \pm 0,34$
IMI + VAE1	$20,95 \pm 1,26$	$73,43 \pm 10,68^\S$	$1,45 \pm 0,47$
IMI + VAE2	$25,58 \pm 3,94$	$50,62 \pm 7,77^\S$	$2,12 \pm 0,46$

*Statistički značajno u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$).

^\#Statistički značajno u poređenju sa CPF grupom ($p < 0,05$).

^\SStatistički značajno u poređenju sa IMI grupom ($p < 0,05$).

Grafik 18. Efekti VAE na aktivnost GR u jetri, bubregu i testisu pacova tretiranih insekticidima CPF i IMI



*Statistički značajno u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$).

#Statistički značajno u poređenju sa CPF grupom ($p < 0,05$).

§Statistički značajno u poređenju sa IMI grupom ($p < 0,05$).

Promene u aktivnosti enzima GST u jetri, bubregu i testisu životinja date su u Tabeli 27 i na Grafiku 19. Aktivnosti GST u jetri značajno su povećane u grupama CPF ($381,3 \pm 24,5$) i IMI ($468,7 \pm 20,2$ J/mg proteina), kao i u grupama kotretmana IMI+VAE1 ($360,6 \pm 25,2$ J/mg proteina) i IMI+VAE2 ($435,8 \pm 36,3$ J/mg proteina) u odnosu na kontrolu ($236,9 \pm 17,4$ J/mg

proteina). U grupi CPF+VAE1 došlo je do smanjenja aktivnosti GST ($280,9 \pm 9,4$ J/mg proteina) u poređenju sa CPF grupom. Grupa VAE1 imala je značajno niže vrednosti GST ($249,4 \pm 10,3$ J/mg proteina) u odnosu na grupu CPF i IMI.

Aktivnost GST u bubregu bila je značajno povećana u grupama CPF ($131,6 \pm 6,3$ J/mg proteina) i IMI ($131,6 \pm 6,7$ J/mg proteina) u poređenju sa kontrolom ($84,3 \pm 8,1$ J/mg proteina). Grupa VAE1 imala je različite vrednosti GST ($41,7 \pm 3,4$ J/mg proteina) u poređenju sa grupama kontrola, CPF i IMI. Kod životinja iz grupe CPF+VAE1 smanjena je aktivnost GST ($48,5 \pm 2,0$ J/mg proteina) u poređenju sa kontrolom i CPF grupom, dok je kod grupe CPF+VAE2 zabeleženo smanjenje aktivnosti ovog enzima ($54,1 \pm 3,4$ J/mg proteina) u odnosu na grupu CPF. Zabeležena je smanjena aktivnost GST u grupi IMI+VAE1 ($62,0 \pm 7,9$ J/mg proteina) u odnosu na životinje tretirane sa IMI, dok je u grupi IMI+VAE2 zapažena smanjena aktivnost GST ($33,7 \pm 2,7$ J/mg proteina) u odnosu na grupu kontrola i IMI.

U testisu kod životinja iz grupe CPF izmerene su značajno povišene vrednosti GST ($681,8 \pm 28,5$ J/mg proteina) u odnosu na kontrolu ($518,8 \pm 29,5$ J/mg proteina). Kotretmani CPF+VAE1 ($384,1 \pm 21,8$ J/mg proteina) i CPF+VAE2 ($264,2 \pm 14,3$ J/mg proteina) pokazali su izrazito smanjenje u aktivnosti GST u odnosu na kontrolu i CPF grupu, dok su vrednosti GST u grupama IMI+VAE1 ($162,2 \pm 11,3$ J/mg proteina) i IMI+VAE2 ($267,7 \pm 39,9$ J/mg proteina) bile značajno niže u poređenju sa vrednostima kontrolne grupe.

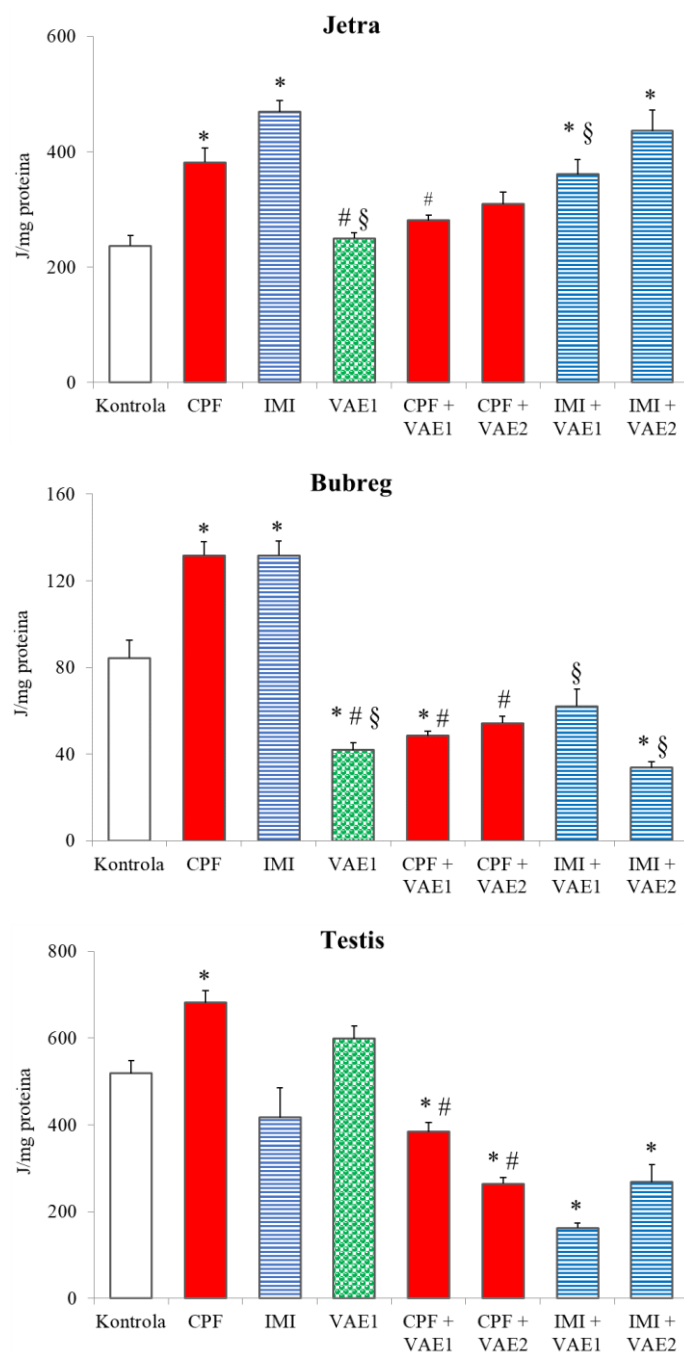
Tabela 27. Aktivnosti GST u ispitivanim tkivima pacova u kontroli i eksperimentalnim grupama

Parametar	GST (J/mg proteina)		
	Jetra	Bubreg	Testis
Eksperimentalne grupe			
Kontrola	$236,9 \pm 17,4$	$84,3 \pm 8,1$	$518,8 \pm 29,5$
CPF	$381,3 \pm 24,5^*$	$131,6 \pm 6,3^*$	$681,8 \pm 28,5^*$
IMI	$468,7 \pm 20,2^*$	$131,6 \pm 6,7^*$	$416,8 \pm 69,3$
VAE1	$249,4 \pm 10,3^{*\#}$	$41,7 \pm 3,4^{*\#}$	$598,5 \pm 28,9$
CPF + VAE1	$280,9 \pm 9,4^\#$	$48,5 \pm 2,0^{*\#}$	$384,1 \pm 21,8^{*\#}$
CPF + VAE2	$309,1 \pm 20,3$	$54,1 \pm 3,4^\#$	$264,2 \pm 14,3^{*\#}$
IMI + VAE1	$360,6 \pm 25,2^{*\#}$	$62,0 \pm 7,9^\#$	$162,2 \pm 11,3^*$
IMI + VAE2	$435,8 \pm 36,3^*$	$33,7 \pm 2,7^{*\#}$	$267,7 \pm 39,9^*$

*Statistički značajno u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$).

[#]Statistički značajno u poređenju sa CPF grupom ($p < 0,05$).

[§]Statistički značajno u poređenju sa IMI grupom ($p < 0,05$).

Grafik 19. Efekti VAE na aktivnost GST u jetri, bubregu i testisu pacova tretiranih insekticidima CPF i IMI

*Statistički značajno u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$).

#Statistički značajno u poređenju sa CPF grupom ($p < 0,05$).

§Statistički značajno u poređenju sa IMI grupom ($p < 0,05$).

4.8.3. Histopatološka analiza isečaka jetre i bubrega

Potencijalni protektivni efekti *Viscum album* L. na tretmane insekticidima CPF i IMI ispitivani su i analizom morfoloških promena izabranih tkiva. Rezultati histopatološke analize isečaka jetre i bubrega prikazani su u Tabeli 28 i 29, i na Slici 26 i 27, koje su snimljene pri uvećanju mikroskopa od 100 puta. Intenzitet morfoloških promena označen je kao: odsustvo promene (-), blaga promena (+), umerena promena (++) i izražena promena (+++).

Histopatološki nalaz uzoraka tkiva jetre kontrolne grupe koja nije bila tretirana pokazuje normalnu histološku strukturu hepatocita sa blagom kongestijom i infiltracijom u nekim uzorcima. Kod životinja tretiranih sa CPF zapažene su sledeće promene: abnormalna ćelijska morfologija sa balonskom degeneracijom u nekim uzorcima i blagom fokalnom i konfluentnom nekrozom. Takođe se uočavaju blaga kongestija i hiperplazija Kupferovih ćelija i umerena infiltracija limfocita. Životinje tretirane sa IMI pokazuju umerenu kongestiju, hidropsnu degeneraciju, fokalnu nekrozu i sinusoidalnu infiltraciju limfocita, blagu hiperplaziju Kupferovih ćelija i konfluentnu nekrozu.

Tabela 28. Histopatološke promene u tkivu jetre pacova kontrolne i eksperimentalnih grupa

Histopatološki parametri	Eksperimentalne grupe							
	Kontrola	CPF	IMI	VAE1	CPF+VAE1	CPF+VAE2	IMI+VAE1	IMI+VAE2
Kongestija	+	+	++	+	++	++	++	++
Oticanje ćelije-hidropsna degeneracija-balonska degeneracija	-	++	++	+	+	++	+	+
Fokalna nekroza	-	+	++	-	-	+	-	+
Konfluentna nekroza	-	+	+	-	-	-	-	-
Hiperplazija Kupferovih ćelija	-	+	+	-	-	-	-	-
Portni, periportni i sinusoidalni inflamatorni infiltrat sa limfocitima	+	++	++	-	+	+	+	+

Legenda: bez promena (-), promena lakog (+), umerenog (++) i teškog (+++) intenziteta.

Kotretman sa većom i manjom dozom imele (CPF+VAE1 i CPF+VAE2) doveo je do ublažavanja promena koje je uzrokovao CPF. Kod kotretmana sa obe doze imele zapaža se umerena kongestija, blaga do umerena hidropsna degeneracija i blaga do umerena infiltracija limfocita. Samo u grupi CPF+VAE2 prisutna je blaga fokalna nekroza. Kod životinja tretiranih sa IMI u kotretmanu sa većom dozom imele (VAE1, 350mg/kg) uočavaju se umerena kongestija i slab limfocitni infiltrat, dok se hidropsna degeneracija i fokalna nekroza zapažaju samo u nekim uzorcima jetre. Kod jedinki kotretiranih sa manjom dozom imele (VAE2, 175mg/kg) zapaža se umerena kongestija, slaba hidropsna degeneracija, fokalna nekroza i

infiltracija limfocita u portnim prostorima. Isečci jetre u grupi u kojoj je aplikovan samo ekstrakt imele ukazuju na blagu kongestiju, infiltraciju limfocita i oticanje ćelija.

U bubregu kontrolne grupe pokazana je blaga kongestija i hidropsna degeneracija epitela kanalića i to samo kod nekih jedinki. Kod jedinki kojima je davan CPF pored blage kongestije zapažaju se i blaga atrofija glomerula, nekroza i deskvamacija epitela tubula i atrofija epitela tubula. Prisutan je i slab eozinofilni sadržaj u lumenu kanalića i krvarenje u intersticijumu. Hidropsna degeneracija epitela kanalića je umerenog intenziteta. Kod jedinki kojima je davan IMI takođe se zapažaju blaga kongestija, atrofija glomerula i umerena hidropsna degeneracija, kao i slab sadržaj eozinofila u lumenu kanalića i intersticijalni edem. Nekroza i deskvamacija epitela tubula i atrofija epitela tubula su izraženije za razliku od grupe koja je primala CPF.

Grupe kojima je pored CPF aplikovan ekstrakt imele u većoj i manjoj dozi (CPF+VAE1 i CPF+VAE2) ispoljile su umerenu kongestiju, zatim blagu atrofiju glomerula, nekrozu i deskvamaciju epitela tubula, atrofiju epitela tubula i intersticijalni edem. Hidropsna degeneracija epitela kanalića u grupi sa većom dozom imele (CPF+VAE1) je bila blaga, dok je u grupi sa manjom dozom imele (CPF+VAE2) bila zapažena degeneracija umerenog intenziteta. Slab eozinofilni materijal bio je prisutan kod grupe CPF+VAE2.

Tabela 29. Histopatološke promene u tkivu bubrega pacova kontrolne i eksperimentalnih grupa

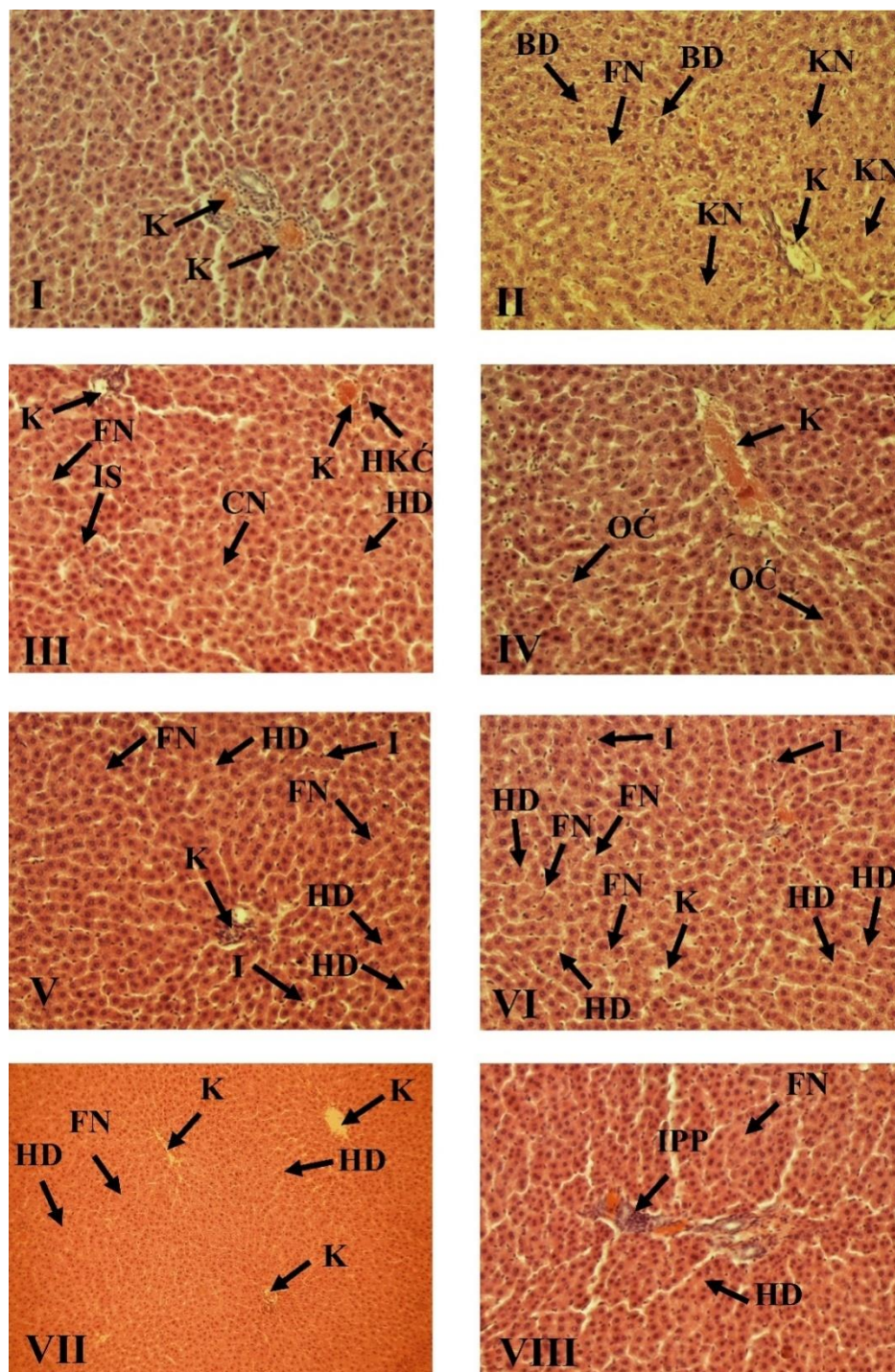
Histopatološki parametri	Eksperimentalne grupe							
	Kontrola	CPF	IMI	VAE1	CPF+VAE1	CPF+VAE2	IMI+VAE1	IMI+VAE2
Kongestija	+	+	+	+	++	++	+	++
Glomeruloskleroza-hijalinoza-atrofija glomerula i proširenje subkapsularnog Boumanovog prostora	-	+	+	-	+	+	+	+
Hidropsna degeneracija epitela kanalića	+	++	++	+	+	++	+	+
Nekroza i deskvamacija epitela tubula	-	+	++	+	+	+	+	+
Atrofija epitela tubula	-	+	++	-	+	+	+	+
Eozinofilan sadržaj u lumenu kanalića	-	+	+	-	-	+	+	+
Krvarenje u intersticijumu	-	+	+	+	+	+	+	+

Legenda: bez promena (-), promena lakog (+), umerenog (++) i teškog (+++) intenziteta.

U kotretmanu IMI sa većom (350 mg/kg) i manjom (175mg/kg) dozom ekstrakta imele zapažaju se blaga atrofija glomerula, hidropsna degeneracija epitela kanalića, nekroza i deskvamacija epitela tubula i atrofija epitela tubula, kao i prisustvo eozinofilnog materijala u lumenu kanalića i intersticijalni edem. U grupi IMI+VAE1 zabeležena je blaga kongestija, za razliku od IMI+VAE2, gde je kongestija bila umerenog intenziteta. Grupa koja je primala samo

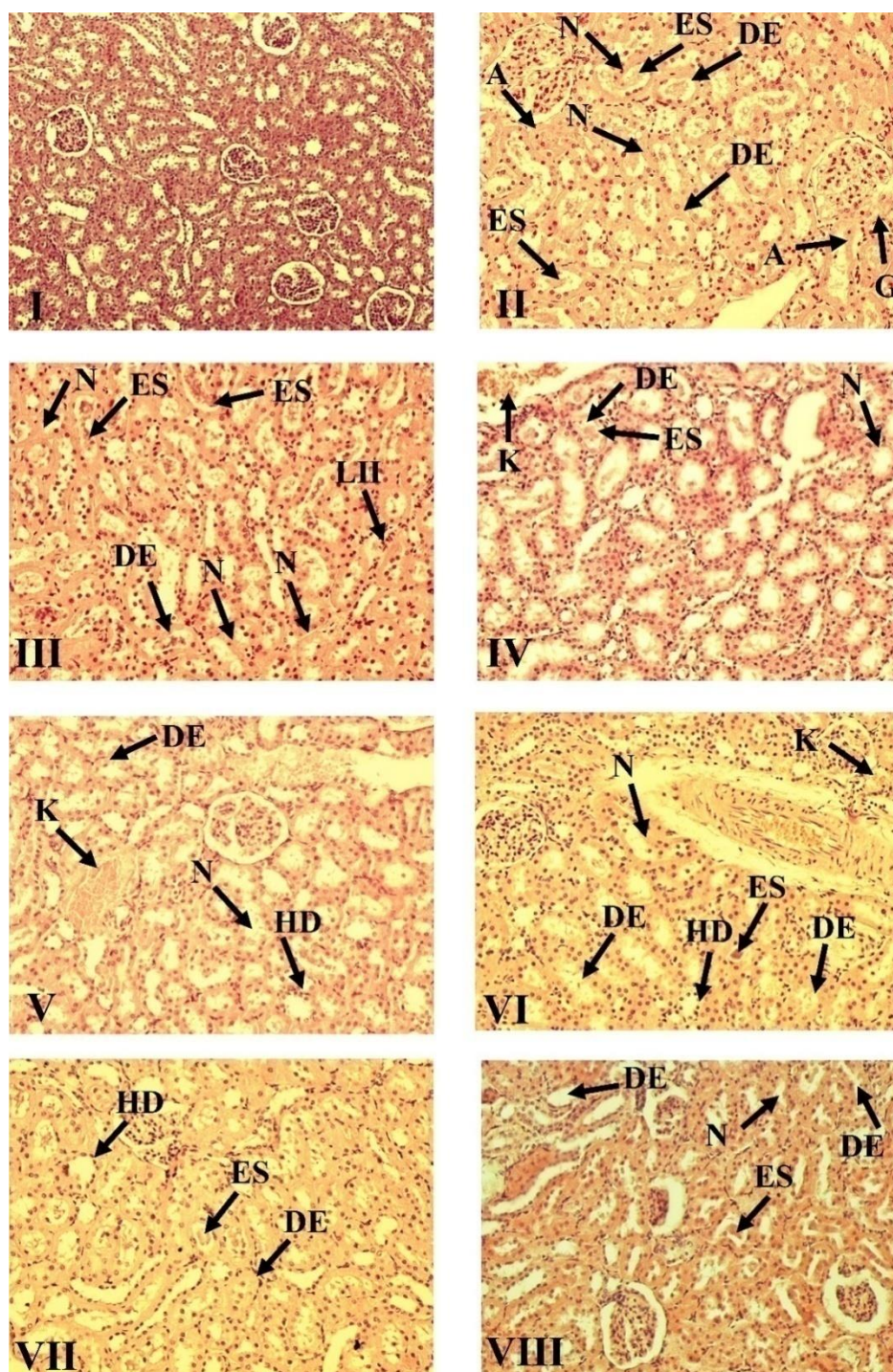
imelu (VAE1) ispoljila je blagu kongestiju, hidropsnu degeneraciju, nekrozu i deskvamaciju epitela tubula i intersticijalni edem kod nekih jedinki.

Slika 26. Mikrografije isečaka tkiva jetre pacova kontrolne i eksperimentalnih grupa



Legenda: I – Kontrola (0,5 mL NaCl); II – CPF (35 mg/kg); III – IMI (70 mg/kg); IV – VAE (350 mg/kg); V – CPF (35 mg/kg) + VAE1 (350 mg/kg); VI – CPF (35 mg/kg) + VAE2 (175 mg/kg); VII – IMI (70 mg/kg) + VAE1 (350 mg/kg); VIII – IMI (70 mg/kg) + VAE2 (175 mg/kg).

Strelice: K – kongestija; OČ – oticanje ćelije; HD – hidropsna degeneracija; BD – balonska degeneracija; FN – fokalna nekroza; KN – konfluentna nekroza; HKČ – hiperplazija Kupferovih ćelija; I – infiltracija limfocita; IPP – infiltracija portnih prostora, IS – infiltracija sinusoida.

Slika 27. Mikrografije isečaka tkiva bubrega pacova kontrolne i eksperimentalnih grupa

Legenda: I – Kontrola (0,5 mL NaCl); II – CPF (35 mg/kg); III – IMI (70 mg/kg); IV – VAE (350 mg/kg); V – CPF (35 mg/kg) + VAE1 (350 mg/kg); VI – CPF (35 mg/kg) + VAE2 (175 mg/kg); VII – IMI (70 mg/kg) + VAE1 (350 mg/kg); VIII – IMI (70 mg/kg) + VAE2 (175 mg/kg).

Strelice: K – kongestija; G – glomeruloskleroza; A – atrofija epitela tubula; DE – deskvamacija epitela; HD – hidropsna degeneracija; N – nekroza; ES – eozinofilni sadržaj, LII – limfocitna infiltracija u intersticijumu.

A decorative border of green leaves and white berries, likely mistletoe, framing the page. The leaves are elongated and pointed, with visible veins. The berries are small, round, and white with a slight blue tint. The border is positioned around the edges of the page, leaving a large white central area.

5. DISKUSIJA

Zagađenje životne sredine ima veliki uticaj u nastanku brojnih bolesti biljaka, životinja i ljudi. Jedan od glavnih faktora zagađenja životne sredine je velika i neracionalna primena pesticida u poljoprivredi, koji su namenjeni za uništavanje ili suzbijanje brojnih štetnih organizama i korova, a ostaci se mogu detektovati u vazduhu, vodi, zemljištu i sedimentu (Gill i Garg, 2014). Ispitivanje potencijalne toksičnosti pesticida na neciljne organizme je od velikog značaja u pogledu očuvanja životne sredine i zaštite zdravlja ljudi. Pesticidi predstavljaju značajan rizik po zdravlje ljudi usled lake dostupnosti, kao i nekontrolisane i nepravilne primene (van de Merwe i sar., 2018; Zeng i sar., 2021). Utvrđeno je da mnogi pesticidi mogu ispoljiti toksične efekte koji zavise od doze pojedinih jedinjenja, njihovog toksičnog potencijala, kao i hemijskih karakteristika, toksikokinetičkih i toksikodinamičkih osobina, itd. Takođe, dolazi do ispoljavanja toksičnih efekata i usled akutnog trovanja, koje može da bude namerno ili slučajno, usled profesionalne ili neprofesionalne izloženosti, ali i usled štetnog delovanja rezidua pesticida koje su prisutne u vodi ili hrani (Zeng i sar., 2021; Ganie i sar., 2022).

Veliku grupu pesticida predstavljaju organofosforna jedinjenja (OFJ), koja su najčešće korišćena zbog širokog spektra fizičko-hemijskih i bioloških osobina u poljoprivredi, industriji i domaćinstvima. Hlorpirifos (CPF) je hlorovano organofosfatno jedinjenje i najviše korišćeni insekticid zbog velike efikasnosti u zaštiti mnogih poljoprivrednih kultura od brojnih štetnih insekata. Prisutan je svuda u životnoj sredini, pa su i životinje i ljudi izloženi CPF, najčešće prilikom upotrebe ili kontakta, udisanja kontaminiranog vazduha u blizini tretiranih površina, ali i preko mogućih rezidua u hrani ili vodi. Iako ne dolazi do biomagnifikacije, CPF ulazi u lanac ishrane i može biti izuzetno toksičan za pčele i druge korisne insekte, kao i za različite vrste beskičmenjaka i kičmenjaka (Uchendu i sar., 2012; Watts, 2013; Vučinić i sar., 2014; Rezende-Teixeira i sar., 2022).

Insekticid CPF se zbog toksičnosti i sve većeg razvoja rezistencije u poslednjih nekoliko godina sve manje koristi. Istraživanja su usmerena na sintezu novih jedinjenja pesticida sa manjim stepenom toksičnosti i sa novim mehanizmom delovanja, koja mogu imati veliki značaj i primenu u poljoprivredi, veterini, medicini i komunalnoj higijeni.

Neonikotinoidi su sistemični insekticidi širokog spektra koji, zbog velike selektivnosti i manje toksičnosti za životnu sredinu, imaju mnoge prednosti i predstavljaju zamenu za konvencionalne grupe insekticida, kao što su organohlorna jedinjenja, organofosforni insekticidi, karbamati i piretroidi (Janjić, 2009; Rezende-Teixeira i sar., 2022). Neonikotinoidi su selektivno toksičniji za insekte, imaju veći afinitet i jače se vezuju za nAChR kod insekata nego kod kičmenjaka, što je osnova njihovog selektivnog dejstva (Tomizawa i Casida, 2005).

Imidakloprid (IMI) se zbog specifičnog mehanizma delovanja i insekticidne aktivnosti širokog spektra veoma intenzivno koristi širom sveta. U poređenju sa nikotinom, IMI i strukturno slični neonikotinoidi su kompetitivni modulatori i ireverzibilni agonisti nAChR i pokazuju specifično delovanje na nervni sistem insekata u odnosu na sisare. Sve veća upotreba IMI i njegova potencijalna toksičnost u humanoj populaciji dovode do povećanih farmakokinetičkih proučavanja i saznanja o efektima na neciljne organizme. Novija istraživanja pokazuju da IMI može da uzrokuje različite biohemijske i fiziološke promene i da izazove niz toksičnih efekata (Tomizawa i Casida, 2009; Casida, 2018; Schmidt, 2018; Katić i sar., 2021; Qu i sar., 2022).

Kod intoksikacije organofosfatima dolazi do blokiranja fiziološke funkcije enzima AChE i hiperstimulacije nAChR i mAChR, a kasnije i do prestanka sinaptičke transmisije. U terapiji akutnog trovanja se, pored dekontaminacije, koriste i specifični lekovi kao što su farmakološki antidoti atropin i oksimi. Atropin je antagonist mAChR na postganglijskim

nervnim vlaknima parasimpatikusa i uklanja efekte akumulacije ACh, dok oksimi deluju na enzimski sistem i reaktiviraju inhibirane holinesteraze. Osim antidota, u konvencionalnoj terapiji se uspešno primenjuje i diazepam i drugi antikonvulzivi. Međutim, u brojnim kliničkim i eksperimentalnim studijama je pokazano da ovi lekovi nisu potpuno efikasni i dovoljni u terapiji trovanja OFJ i mogu ispoljiti neželjene efekte zbog dugotrajnog korišćenja. Na primer, u osnovnoj terapiji pacijenti primaju veoma visoku dozu atropina, koji ispoljava efekte i na nAChR i dovodi do antiholinergičkog delirijuma, dok brzo davanje visoke doze oksima pacijentima može dovesti do povraćanja, tahikardije i dijastolne hipertenzije (Jokanović, 2010; Zeng i sar., 2021). Shodno tome, pronalaženje novih efikasnih agenasa protiv toksičnih efekata pesticida i dalje je aktuelna tema.

Poslednjih godina, velika pažnja je usmerena na značaj biljaka i njihovih metabolita zbog antioksidativnih i antiinflamatornih svojstava, kao i njihove uloge u primarnoj zdravstvenoj zaštiti. Uprkos trendovima molekularne biologije i hemije, koji obezbeđuju brzu eskalaciju sintetizovanih *de novo* lekova, biljke i dalje ostaju tradicionalni izvor lekovitih jedinjenja (Al-Attar, 2015). Lekoviti značaj biljaka pripisuje se obilju fitokonstituenata, koji uključuju alkaloidne, flavonoide, vitamine, tanine i terpenoide. Ova jedinjenja imaju terapeutska svojstva u lečenju različitih metaboličkih bolesti zahvaljujući biološkim aktivnostima poput detoksikacije toksičnih enzima, inhibicije ćelijskog oštećenja, regulacije genske ekspresije, antimikrobnog i antiinflamatornog delovanja (Majeed i sar., 2021). Takođe, u nekim istraživanjima je pokazano da uzimanje prirodnih antioksidanata može da smanji rizik od velikog broja zdravstvenih komplikacija kao što su rak, neurodegenerativni poremećaji i dijabetes (Pohl i Lin, 2018; Hrelia i sar., 2020). Značajna protektivna uloga koju imaju prirodni antioksidanti u održavanju zdravlja ljudi rezultat je njihovog redukcionog potencijala u neutralizaciji ROS i RNS zbog njihove tendencije doniranja vodonika, čime se sprečavaju oksidativna oštećenja koja ovi radikali uzrokuju (Majeed i sar., 2021).

U ovoj doktorskoj disertaciji cilj istraživanja je ispitivanje efekata ekstrakata lista bele imele (*Viscum album* L.) na toksičnost izazvanu insekticidima CPF i IMI u *in vitro* i *in vivo* tretmanima. U prvom delu istraživanja su obuhvatila analizu fitohemijskog sastava ekstrakata lista bele imele (VAE), sa akcentom na jedinjenja iz grupe polifenola, kao i ispitivanje farmakološkog delovanja i antioksidativnog potencijala ekstrakata. Drugi deo istraživanja obuhvata ispitivanje i upoređivanje mehanizma toksičnosti dva najviše korišćena insekticida iz različitih klasa, iz klase organofosfata – CPF i iz klase neonicotinoida – IMI. U *in vitro* eksperimentu ispitivana je citotoksičnost pojedinačnih tretmana insekticida CPF i IMI i ekstrakata listova imele, kao i kotretmani insekticida i ekstrakata listova imele u izabranim koncentracijama. U *in vivo* eksperimentu ispitivani su efekti subakutnog tretmana CPF, IMI i kotretmana sa ekstraktom lista imele na hematološko-biohemijske parametre, parametre neurotoksičnosti, oksidativno-antioksidativnog statusa, kao i histopatološke promene u jetri i bubrezima mužjaka pacova soja Wistar albino.

5.1. Fitohemijske analize ekstrakta lista imele

Ekstrakcija biljnog materijala je prvi i veoma važan korak u analitičkom procesu različitih studija koje se bave sekundarnim metabolitima biljaka. Takođe, antioksidativna aktivnost biljnih ekstrakata zavisi i od izbora tipa ekstrakcije. Za razliku od konvencionalnih tehnika ekstrakcije kao što je sokslet ekstrakcija, koja uključuje toksične organske rastvarače koji ostaju u određenom udelu u ekstraktu nakon isparavanja, razvijene su nove nekonvencionalne tehnike ekstrakcije, poput ultrazvučne ekstrakcije, u kojima se koriste netoksični rastvarači poput vode (Mašković i sar., 2018). Kvalitativno određivanje ukupnog sadržaja polifenola, kao i karakterizacija biološki aktivnih jedinjenja koja su prisutna u ispitivanom biljnom ekstraktu pružaju nam uvid u fitohemijski sastav ekstrakata, ali i ukazuju

na biološku aktivnost biljne vrste, ili njenih delova. Iz tog razloga, u okviru istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji, za ekstrakciju aktivnih komponenti iz listova bele imele, *Viscum album* L., sakupljenih sa kruške (*Pyrus communis* L.), korišćena je metoda ultrazvučne ekstrakcije. Rezultati istraživanja pokazuju (Tabela 2) da sadržaj ukupnih fenola iznosi $94,38 \pm 0,62$ mg GAE/g, što predstavlja značajnu količinu ukupnih fenola u vodenom ekstraktu lista imele. Međutim, zabeležena je manja vrednost ukupnih flavonoida za oko 30% ($65,24 \pm 0,23$ mg RUE/g), sadržaj kondenzovanih tanina za oko 45% ($44,65 \pm 0,09$ mg GAE/g), dok je sadržaj galotanina manji za oko 60% ($29,64 \pm 0,38$ mg GAE/g) u odnosu na sadržaj ukupnih fenola u ekstraktu lista. U ekstraktu lista imele je određena i vrednost ukupne antioksidativne aktivnosti koja iznosi $128,65 \pm 0,92$ mg AKE, što je u saglasnosti sa ukupnim sadržajem fenolnih jedinjenja.

Pietrzak i sar. (2013) su ispitivali ekstrakte imele (sa vrste *Abies alba* Mill.), dobijene različitim tipovima ekstrakcije (ultrazvučna ekstrakcija, maceracija, maceracija uz mešanje, ubrzana ekstrakcija rastvaračem i ekstrakcija pod refluksom). Njihovi rezultati su pokazali da je sastav flavonoida i fenolnih kiselina varirao u zavisnosti od tipa ekstrakcije, pri čemu je pokazano da je najveća količina polifenola detektovana u ekstraktu imele dobijenom uz primenu metode ultrazvučne ekstrakcije ($57,673$ GAE/g).

Imela je ispitivana u pogledu apsorpcije nutrijenata, vode i metabolita iz biljke domačina (Oluwaseun i Ganiyu, 2008; Vicaş i sar., 2011). Otkriveno je da se metabolički profil ove biljke značajno menja u odnosu na tip domačina na kome raste, a to utiče i na njenu antioksidativnu aktivnost i može se pripisati razlikama u pogledu sadržaja polifenolnih jedinjenja (Majeed i sar., 2021). Sengul i sar. (2009) su poredili metanolne ekstrakte nadzemnih delova 8 medicinskih biljaka, među kojima i *Viscum album* L., i pokazali da je njen ekstrakt na drugom mestu po količini ukupnih fenola. Majeed i sar. (2021) su određivali sadržaj ukupnih fenola u vodenim, metanolnim i etanolnim ekstraktima različitih delova imele sa tri biljne vrste (*Populus ciliata* L., *Juglans regia* L. i *Ulmus villosa* L), a rezultati ove studije su pokazali da je najveći sadržaj fenolnih jedinjenja bio prisutan u etanolnom ekstraktu bobice i metanolnom ekstraktu izdanka imele sa *Populus ciliata* L. Stefanucci i sar. (2020) poredili su ekstrakte imele lista, ploda i semena i dobili rezultate koji pokazuju da je ekstrakt lista najbogatiji polifenolima. Iz rezultata navedenih studija (Stefanucci i sar., 2020; Majeed i sar., 2021) može se zaključiti da tip rastvarača i deo biljke od koga je pravljen ekstrakt imaju značajan uticaj na dobijeni sadržaj polifenola. Vicaş i sar. (2011) su poredili sadržaj ukupnih fenola iz vodenih i metanolnih ekstrakata imele dobijene iz listova i pokazali da je najveći sadržaj polifenola bio prisutan u vodenom ekstraktu lista. Takođe, utvrđeno je da količina fenola varira u odnosu na godišnje doba, i da je imela bogatija fitonutrijentima u maju nego u decembru (Vicaş i sar., 2011).

Tečna hromatografija visokih performansi (HPLC) koristi se kako bi se dobio detaljniji uvid u sastav ekstrakta, odnosno kako bi se kvantifikovala fenolna jedinjenja prisutna u ispitivanom biljnom materijalu. Ovom kvantitativnom analizom utvrđen je sadržaj polifenolnih jedinjenja u ekstraktu lista imele i prikazan u Tabeli 5, dok je na Slici 25 dat hromatogram najdominantnijih komponenti. Najviše zastupljeni flavonoidi su rutin (37,6%), kempferol (18,8%) i kvercetin (18,1%), a iz podklase flavona apigenin (15,8%). Takođe, pored flavonoida, ekstrakt sadrži i sekundarne metabolite koji pripadaju hidroksicimetnim kiselinama: *p*-kumarinska kiselina, kafeinska kiselina, ferulna kiselina i hlorogenska kiselina, ali u znatno manjoj količini. Ovi sekundarni metaboliti, kao i sadržaj i količina pojedinih polifenolnih jedinjenja u ekstraktu lista imele ukazuju i na njihovu potencijalnu biološku i farmakološku aktivnost, ali i na antioksidativni potencijal, zbog čega se ovoj biljci može pripisati važan medicinski značaj.

Biljni ekstrakti su bogati polifenolnim jedinjenjima, koja stupaju u međusobne interakcije, a da bi se stekao uvid u antioksidativni potencijal ekstrakata, potrebno je primeniti nekoliko *in vitro* metoda sa različitim mehanizmima. U ovoj doktorskoj disertaciji za ispitivanje antioksidativnog potencijala ekstrakata lista imele korišćeni su testovi, koji se zasnivaju na različitim mehanizmima ispoljavanja antioksidativne aktivnosti: „hvatanju“ i deaktivaciji slobodnih radikala (DPPH[•], OH[•] i ABTS^{•+} radikala) i inhibiciji lipidne peroksidacije, a rezultati kao IC₅₀ vrednosti su prikazani u Tabeli 3. Antioksidativna aktivnost ekstrakta lista upoređivana je sa standardima antioksidanata galnom kiselinom, askorbinskom kiselinom, BHT i α-tokoferolom. Zabeleženo je da ekstrakt lista imele ima najveći stepen inhibicije ABTS^{•+} radikala (5,09 μg/mL), zatim DPPH[•] radikala (7,28 μg/mL), a znatno manji stepen inhibicije lipidne peroksidacije (18,11 μg/mL) i OH[•] radikala (22,02 μg/mL). Niže IC₅₀ vrednosti ukazuju na veću antioksidativnu aktivnost ispitivanog ekstrakta imele, odnosno veću neutralizaciju slobodnih radikala i bolje inhibiranje štetnog procesa lipidne peroksidacije u ćelijama. Pokazana je veća antioksidativna aktivnost ekstrakta lista na nivou DPPH[•] radikala (7,28 μg/mL) u poređenju sa standardom BHT (15,61 μg/mL), a takođe i veća aktivnost na nivou inhibicije lipidne peroksidacije (18,11 μg/mL) u odnosu na galnu (255,43 μg/mL) i askorbinsku kiselinu (> 1000 μg/mL). Veća antioksidativna aktivnost ekstrakta lista je pokazana i u pogledu hvatanja OH[•] radikala (22,02 μg/mL) u odnosu na sve ispitivane standarde (BHT 33,92 μg/mL, galna kiselina 59,14 μg/mL, askorbinska kiselina 160,55 μg/mL). ABTS^{•+} test je pokazao da galna kiselina (1,96 μg/mL) ispoljava najveću aktivnost na nivou ABTS^{•+} radikala, dok je ekstrakt lista imele pokazao veću antioksidativnu aktivnost na nivou ABTS^{•+} radikala (5,09 μg/mL) u poređenju sa askorbinskom kiselinom (10,98 μg/mL) i BHT (7,23 μg/mL).

Stefanucci i sar. (2020) su za ispitivanje antioksidativnog potencijala u ekstraktima lista, ploda i semena imele primenili metode inhibicije DPPH[•] i ABTS^{•+} radikala. Za oba testa ekstrakti lista imele su pokazali najbolji rezultat, odnosno ekstrakt lista je u poređenju sa ispitivanim ekstraktima ploda i semena ispoljio najbolju antioksidativnu aktivnost u pogledu neutralizacije slobodnih radikala. Takođe, primenom DPPH testa ustanovljeno je da postoje variranja u kapacitetu neutralizacije slobodnih radikala u zavisnosti od biljke domaćina i tipa rastvarača koji je korišćen za pripremu ekstrakata. U studiji Majeed i sar. (2021) bolji potencijal u „hvatanju“ slobodnih radikala ispoljili su metanolni i etanolni ekstrakti u poređenju sa vodenim. Ekstrakt imele je ispoljio i značajan potencijal u inhibiciji lipidne peroksidacije, u odnosu na standarde - galnu i askorbinsku kiselinu, zahvaljujući efektima polifenola. Međusobna interakcija polifenola i lipidnog dvosloja predstavlja jedan od mehanizama u zaštiti od oksidacije membrane. Polifenolna jedinjenja koja se nalaze u nepolarnom delu lipidnog dvosloja, svojim antioksidativnim delovanjem i interakcijom sa slobodnim radikalima inhibiraju propagaciju procesa lipidne peroksidacije, ili povećavaju fluidnost membrane (Oteiza i sar., 2005).

5.2. *In vitro* tretman

U *in vitro* eksperimentima ove doktorske disertacije korišćena je MRC-5 ćelijska linija (ćelije humanih zdravih fibroblasta pluća) za ispitivanje metaboličke aktivnosti ćelija, kao i ćelijske vijabilnosti, proliferacije i citotoksičnosti. Poznato je da su vijabilnost ćelija i oštećenja DNK povezani sa mehanizmima toksičnosti pesticida (Şenyildiz i sar., 2018). Za ispitivanje vijabilnosti MRC-5 ćelija, kao i za određivanje citotoksičnosti ispitivanih insekticida CPF i IMI primenjen je kolorimetrijski MTT test. Takođe, MTT test je primenjen i da bi se utvrdilo da li vodeni ekstrakt lista imele ispoljava ili ne štetne efekte na MRC-5 ćelijsku liniju fibroblasta. Sprovedeno je ispitivanje stepena biokompatibilnosti, tj. biološkog odgovora ćelija na ispitivani ekstrakt lista imele i njegova bezbedna primena kao potencijalnog terapeutika.

Prvo je ispitivan nivo citotoksičnosti insekticida CPF i IMI u *in vitro* tretmanima, a MRC-5 ćelije su inkubirane sa rastućim koncentracijama (25, 50, 100, 200 i 300 μM) insekticida CPF i IMI u kratkotrajnom tretmanu (24 sata) i dugotrajnom tretmanu (72 sata). Takođe, za pojedinačne tretmane je korišćena i serija od deset rastvora ekstrakta lista imele u rastućim koncentracijama od 10, 20, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 600 i 800 $\mu\text{g/mL}$. Nakon serije eksperimenata pojedinačnih tretmana, za kombinovane tretmane ekstrakta i insekticida odabrane su po tri koncentracije CPF i IMI (50, 100 i 300 μM), kao i tri koncentracije rastvora ekstrakta lista imele (100, 300 i 600 $\mu\text{g/mL}$). I u kombinovanim tretmanima ćelije su inkubirane u trajanju od 24 i 72 sata.

Rezultati (Tabela 6, Grafik 1 i 2) pokazuju da su kratkotrajni i dugotrajni tretmani (24 i 72 sata) insekticidima CPF i IMI doveli do smanjene vijabilnosti MRC-5 ćelija i pokazana je dozna i vremenska zavisnost. Takođe, postoji i značajna razlika u efektu citotoksičnosti između ispitivanih insekticida CPF i IMI u svim primenjenim koncentracijama. Tretmani CPF su pokazali veće citotoksične efekte i doveli su do dozno-zavisnog smanjenja vijabilnosti ćelija u odnosu na IMI u oba vremenska tretmana (24 i 72 sata). Najveći citotoksični efekti su zabeleženi nakon tretmana od 72 sata CPF u koncentracijama od 100, 200 i 300 μM i značajno je smanjena vijabilnost ćelija na 57,37%, 54,57% i 48,16%. Zabeležena je i značajna razlika u ćelijskoj vijabilnosti između kratkotrajnog (24 sata) i dugotrajnog (72 sata) tretmana insekticidom CPF. Manje koncentracije IMI (25 i 50 μM) nisu ispoljile citotoksične efekte na ćelijama MRC-5 linije u tretmanu od 24 sata, kao i koncentracije IMI od 25, 50, 100 i 200 μM nakon tretmana od 72 sata u odnosu na kontrolu.

Želježić i sar. (2016) poredili su citotoksične efekte CPF i IMI na ćelije humanih limfocita i dobili isti trend kao u ovoj studiji. Li i sar. (2015) ispitivali su efekte CPF na različitim ćelijskim linijama (HeLa, HEK293 i *Drosophila S2*), i pokazali da ovaj insekticid ispoljava citotoksične efekte i dovodi do smanjenja ćelijske vijabilnosti i indukovanja ćelijske apoptoze. Takođe, i u studiji Dai i sar. (2015), CPF je izazvao smanjenje vijabilnosti ćelija SH-SY5Y linije, a pokazani su dozno i vremenski zavisni efekti, tj. zavisnost u odnosu na koncentraciju i dužinu trajanja tretmana. Studija Zhang i sar. (2021) bavila se ispitivanjem toksičnih efekata TCP, glavnog metabolita insekticida CPF, na humanu ćelijsku liniju HepG2 i pokazano je da TCP inhibira ćelijsku proliferaciju, a takođe dovodi i do apoptoze i oštećenja DNK. Ovaj metabolit CPF je postojaniji u životnoj sredini u odnosu na matično jedinjenje i može izazvati ozbiljne rizike po zdravlje ljudi. Smanjena ćelijska vijabilnost nakon tretmana neonikotinoidima zabeležena je u studiji Baysal i Atlı-Eklioğlu (2021), gde su IMI i acetamiprid (ACE) doveli do smanjenja procenta živih ćelija pojedinačno i u kotretmanu kod HT-29 ćelijske linije.

Ispitivan je i uticaj ekstrakta lista imele (VAE) na ćelijsku vijabilnost u kratkotrajnom (24 sata) i dugotrajnom (72 sata) tretmanu (Tabela 7 i Grafik 3), kako bi se pokazalo da li ovaj ekstrakt ispoljava citotoksične efekte na zdravu ćelijsku MRC-5 liniju. Rezultati pokazuju da u svim ispitivanim koncentracijama u tretmanima od 24 i 72 sata ekstrakt dovodi do blagog (pri nižim koncentracijama), ili značajnog (pri višim koncentracijama) porasta vijabilnosti ćelija i ne ispoljava efekte citotoksičnosti u odnosu na kontrolu, što ukazuje na njegov proliferativni efekat.

Ispitivani su i kotretmani izabranih koncentracija (50, 100 i 300 μM) oba insekticida (CPF i IMI) i ekstrakta VAE (100, 300 i 600 $\mu\text{g/mL}$) na ćelijsku vijabilnost (Grafik 4 i 5). Rezultati pokazuju da kotretmani CPF i VAE u svim primenjenim koncentracijama nakon 24 sata dovode do dozno-zavisnog statistički značajnog povećanja vijabilnosti MRC-5 ćelija u odnosu na kontrolu, osim CPF u koncentracijama od 100 μM (B1) i 300 μM (C1) u kombinaciji sa najmanjom koncentracijom ekstrakta (100 $\mu\text{g/mL}$), koji nisu izazvali promenu vijabilnosti

ćelija. U dugotrajnim (72 sata) kotretmanima pokazano je da sve tri ispitivane koncentracije insekticida CPF i ekstrakta imele značajno smanjuju vijabilnost ćelija u odnosu na kontrolu. Takođe, značajno smanjenje vijabilnosti MRC-5 ćelija zabeleženo je i u kotretmanima sve tri koncentracije (50, 100 i 300 μM) insekticida IMI sa koncentracijom 100 i 300 $\mu\text{g/mL}$ VAE nakon 24 sata, kao i sa koncentracijom 100 $\mu\text{g/mL}$ VAE nakon 72 sata. Međutim, rezultati su pokazali doznu zavisnost i značajno veći proliferativni efekat i veću vijabilnost MRC-5 ćelija nakon kotretmana najveće koncentracije VAE od 600 $\mu\text{g/mL}$ sa sve tri koncentracije CPF samo nakon 24 sata, dok je u kotretmanu sa IMI pokazana dozna zavisnost i povećana ćelijska vijabilnost u oba vremenska tretmana (24 i 72 sata). Ovi smanjeni citotoksični efekti insekticida CPF i IMI, kao i značajan porast vijabilnosti ćelija i bolji proliferativni efekti ekstrakta lista imele u primenjenoj najvećoj koncentraciji mogu se objasniti i znatno većom količinom prisutnih fenolnih jedinjenja, koja su u direktnoj korelaciji i sa pojedinačnim fitojedinjenjima koja stupaju u razne međusobne interakcije, čiji su mehanizmi delovanja i sinergistički efekti složeni. HPLC analiza je pokazala da je ekstrakt lista imele bogat flavonoidima, pri čemu su najviše zastupljeni rutin, kempferol, kvercetin i apigenin (Tabela 5). Sadržaj i količina ovih fitojedinjenja u ekstraktima lista imele ukazuju i na njihovu multifunkcionalnost, kao i na potencijalnu biološku aktivnost u *in vitro* i *in vivo* tretmanima (Del Rio i sar., 2013; Enogieru i sar., 2018; Xu i sar., 2019).

U literaturi nema dovoljno podataka koji bi mogli da pomognu u rasvetljavanju proliferatornog efekta ekstrakta imele. Više studija je potvrdilo delotvoran efekat rutina na preživljavanje ćelija (Zhou i sar., 2016; Sun i sar., 2017a). Smatra se da signalni put PI3K/Akt ima značajnu ulogu u inhibiranju apoptoze i uslovljavanju preživljavanja ćelija (Sun i sar., 2017a). Sun i sar. (2017a) su povezali inhibiciju apoptoze u Lejdigovim ćelijama izazvanom H_2O_2 sa aktivacijom PI3K/Akt signalnog puta posredstvom rutina u pretretmanu. U studiji Miao i sar. (2021) pokazano je da kvercetin dovodi do smanjenja apoptoze izazvane insekticidom IMI, ublažava promenu potencijala membrane mitohondrija i, shodno tome, povećava nivo Bcl-2 i smanjuje ekspresiju Cyt c, BAX, kaspaza 9 i 3 (koje imaju ulogu u izazivanju apoptoze) u ćelijskoj liniji hepatocita riblje vrste *Ctenopharyngodon idella*. Takođe, zabeleženo je da pretretman kvercetinom može da smanji ćelijsku smrt uzrokovanu organofosfatom dihlorvosom (Salem i sar., 2016). I drugi podaci iz literature pokazuju da rutin i kvercetin imaju veoma veliku biološku aktivnost i antioksidativni potencijal (Enogieru i sar., 2018; Xu i sar., 2019).

Apigenin, još jedan flavonoid zastupljen u ekstraktu imele, doprineo je značajnom porastu vijabilnosti ćelija i smanjenom citotoksičnom efektu insekticida edifenfosa u humanim limfocitima periferne krvi (Ahmad i sar., 2019a). Pored flavonoida kojima ekstrakt obiluje, i neke druge komponente bi mogle imati zaštitni efekat na ćelije. Lektin prisutan u korejskoj imeli (*Viscum album coloratum*) ublažio je citotoksične efekte i povećao vijabilnost u renalnim ćelijama epitela tubula (LLC-PK₁) u kojima je indukovano oksidativni stres (Kim i sar., 2010).

5.3. *In vivo* tretman

U *in vivo* eksperimentima ove studije ispitivani su toksični efekti subletalnih doza insekticida CPF i IMI, kao i mogući protektivni efekti ekstrakta lista imele u pojedinačnim i kombinovanim tretmanima kod subakutno tretiranih pacova Wistar soja. U toku tretmana u periodu od 4 nedelje u svim eksperimentalnim grupama kod životinja nisu primećeni klinički znaci trovanja poput salivacije, lakrimacije, dijareje, konvulzije ili paralize. Nije zabeležena statistički značajna promena u telesnoj masi, kao ni mase ispitivanih tkiva (jetra, bubrezi i testisi) (Tabela 8), što ukazuje da nije došlo do opšte toksičnosti. Međutim, u prethodnim studijama primećeno je značajno smanjenje telesne mase i smanjenje ili povećanje mase organa

životinja tretiranih insekticidima (Alaa-Eldin i sar., 2016; Milošević i sar., 2018; El-Gendy i sar., 2019; Abdel-Razik i sar., 2021). Nepromenjena masa pacova koji su izloženi insekticidima CPF i IMI u odnosu na kontrolnu grupu životinja potvrđuje da doze koje su korišćene u ovom istraživanju nisu uticale na fiziološke indekse pacova (Zhao i sar., 2021b). Uginuće jedinki zabeleženo je u grupi pacova koji su dobijali samo CPF, i to u prvoj i drugoj nedelji tretmana (po jedna jedinka), što ukazuje da je ova doza CPF subletalna. Nakon toga do kraja eksperimentalnog perioda nije zabeležen ni jedan letalan ishod, što bi se moglo pripisati adaptaciji životinja na ispitivane doze insekticida.

5.3.1. Uticaj tretmana na hematološke parametre

Analize hematoloških parametara se često koriste za određivanje zdravstvenog statusa organizma i za određivanje nivoa stresa usled delovanja faktora životne sredine, ishrane, ksenobiotika i patoloških faktora. Takođe, promene u biohemijskom i ćelijskom sastavu krvi, kao i morfološke promene ćelija krvi ukazuju na neke bolesti koje mogu da budu hematološke i nehematološke (Khalifa i Alkhalaf, 2020).

U ovom istraživanju, rezultati pokazuju da je tretman subletalnom dozom insekticida CPF doveo do promena nekih hematoloških parametara. Značajno je smanjen broj eritrocita (RBC), koncentracije Hb, dok je značajno povećan broj leukocita (WBC) (Tabela 9). I u drugim studijama je pokazano da je došlo do smanjenja broja RBC i koncentracije Hb nakon tretmana CPF (Goel i sar., 2006), fenitrotonom (Milošević i sar., 2017), kao i drugim pesticidima (Qureshi i sar., 2016). Kod akutnog i hroničnog trovanja (usled izlaganja niskim dozama), CPF može izazvati niz toksičnih efekata u organizmu, ali dovesti i do nastanka oksidativnog stresa i oksidativnih oštećenja u mnogim tkivima (Costa, 2018; Khalaf i El-Mansy, 2019; Li i sar., 2019). Smanjenje koncentracije Hb i broja RBC ukazuju na anemiju kao posledicu oksidativnih oštećenja membrane RBC, oksidacije Hb u methemoglobin i povećanog oslobađanja O_2^- , koji je u tom procesu nastao i može da dovede do oksidacije mnogih biomolekula, kao i fosfolipida ćelijske membrane. Takođe, smanjena koncentracija Hb može biti povezana sa smanjenjem veličine RBC, smanjenom koncentracijom gvožđa u serumu i poremećenom biosintezom hema u koštanoj srži, kao i posledica povećane brzine razlaganja RBC i/ili smanjene brzine produkcije RBC i redukcije ukupnog broja RBC (El-Gendy i sar., 2019; Kurt i sar., 2021).

Eritrociti su osetljiviji na lipidnu peroksidaciju i oksidativna oštećenja od drugih ćelija, a zbog direktne povezanosti sa molekulskim kiseonikom izloženi su delovanju slobodnih radikala, kao i metalnim jonima koji katalizuju oksidativne reakcije. Takođe, imaju i membrane koje sadrže velike količine nezasićenih masnih kiselina (PUFAs) i podložne su povećanoj lipidnoj peroksidaciji (Ambali i sar., 2011a). Pokazano je da su velike promene u strukturi i funkciji ćelijske membrane, kao što su gubitak esencijalnih masnih kiselina, povećana permeabilnost i fluidnost membrane, kao i inaktivacija enzima koji su vezani za membranu, uzrokovane lipidnom peroksidacijom. Može da dođe i do oštećenja membranskog skeleta eritrocita, do deformacije ćelija i povećanog razlaganja, kao i do hemolize (Kurt i sar., 2021). Takođe, faktori koji su odgovorni za povećanu osetljivost RBC na lipidnu peroksidaciju jesu i nemogućnost popravljavanja oštećenja membrane i regeneracije membranskih lipida i proteina, kao i molekula Hb, jer RBC nemaju sposobnost sinteze proteina, kao i zbog manje količine enzima antioksidativne zaštite u plazmi (Ambali i sar., 2011a). Jetra ima važnu ulogu u regeneraciji eritrocita, a smanjenje broja RBC može biti povezano i sa disfunkcijom jetre koja nastaje nakon tretmana insekticidima (El-Gendy i sar., 2019). Ambali i sar. (2011a) su pokazali da je tretman CPF doveo do povećane koncentracije MDA i lipidne peroksidacije u RBC. U našoj prethodnoj studiji (Milošević i sar., 2017) pokazano je da su pacovi koji su tretirani organofosfatom fenitrotonom imali smanjen broj RBC, koncentraciju Hb i Hct, kao i smanjene

vrednosti eritrocitnih indeksa MCH i MCHC, koji ukazuju na anemiju i povećano oštećenje RBC. Smanjenje vrednosti hematoloških parametara može se takođe javiti i kao posledica smanjenja hematopoeze ili inhibicije formiranja eritrocita, kao i ubrzane destrukcije eritrocita (Qureshi i sar., 2016).

Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da tretman insekticidom IMI pojedinačno i u kotretmanu sa ekstraktom lista imele nije doveo do značajnih promena hematoloških parametara, dok je CPF pokazao hematotoksičnost. Kod životinja koje su u kotretmanu dobijale pored insekticida CPF i ekstrakt lista imele, zabeleženi su povećani broj RBC i koncentracija Hb u odnosu na grupu koja je dobijala samo CPF. Prisutni flavonoidi u ekstraktu lista imele ukazuju na njihovo hematoprotektivno delovanje i na antioksidativni potencijal. Takođe, pokazano je da flavonoidi mogu da povećaju produkciju RBC tako što stimulišu sekreciju eritropoetina. Pokazano je da se antioksidativne aktivnosti flavonoida u ekstraktu lista imele zasnivaju na uklanjanju i deaktivaciji slobodnih radikala i inhibiciji lipidne peroksidacije. Polifenolna jedinjenja se vezuju sa lipidnim dvoslojem i utiču povoljno na fluidnost membrane eritrocita, sprečavaju oksidativna oštećenja i hemolizu koja je indukovana lipidnom peroksidacijom (Oteiza i sar., 2005; Martínez i sar., 2012; Pasdar i sar., 2020). Iako sama priroda vezivanja polifenola za površinu RBC nije još potpuno razjašnjena, pretpostavlja se da se vezuju preko hidroksilnih grupa, hidrofobnih interakcija vodoničnim vezama, i prisustvom metoksi grupe u C-prstenu flavonoida. U biološkim membranama i u modelima membrana, interakcija između flavonoida i fosfolipidnog dvosloja dovodi do njihovog vezivanja za lipidno-vodeni međusloj, ili transporta u hidrofobno jezgro membrane (Koren i sar., 2010).

Rezultati i u drugim istraživanjima pokazuju pozitivne efekte flavonoida na hematološke parametre. Selvakumar i sar. (2013) su pokazali da je kvercetin kod Wistar pacova tretiranih polihlorovanim bifenilima (PCB) značajno povećao vrednosti hematoloških parametara (RBC, Hb i Hct). Mladenović i sar. (2014) su dobili slične rezultate i pokazano je da su kvercetin i epikatehin u kotretmanu sa bakrom kod pacova doveli do povećanja broja RBC, koncentracija Hb, Hct, kao i eritrocitnih indeksa MCV i MCH u odnosu na grupu koja je dobijala samo bakar.

Povećanje broja WBC može biti posledica toksičnih efekata pesticida na krvni sistem i krvne elemente, aktivacije odbrambenog mehanizma i imunog sistema organizma kao patološkog odgovora na prisustvo mnogih toksičnih materija, ali i odbrane organizma od mnogih bolesti izazvanih patogenim mikroorganizmima (Khalifa i Alkhalaf, 2020). Rezultati ovog istraživanja pokazuju najveći porast broja WBC nakon tretmana CPF, kao i kotretmana sa ekstraktom lista imele u grupi CPF+VAE2 u odnosu na kontrolu (Tabela 9). Leukocitoza, kao posledica povećanog broja WBC u krvi, može biti direktno proporcionalna stepenu izlaganja subletalnoj dozi CPF, kao i nivou stresnog stanja organizma ili posledica reakcije u stanjima prisustva bola, ali i aktivacije imunog odgovora koji može biti povezan sa oštećenjem jetre. Pokazano je i da organofosforni insekticidi izazivaju krvarenje, infiltraciju inflamatornih ćelija, oštećenje tkiva i nekrozu, što može izazvati povećanje WBC (Elsharkawy i sar., 2013; Uzun i Kalender, 2013). Ova mogućnost je podržana histopatološkom analizom, koja je pokazala postojanje nekroze i inflamatornog infiltrata sa limfocitima u grupama tretiranim insekticidima (Tabela 28 i Slika 26). Infiltracija inflamatornih leukocita se smatra istaknutim odgovorom tkiva koje se suočava sa bilo kojim štetnim uticajem (El-Shenawy i sar., 2014). Pored toga, utvrđeno je da se urođene imune ćelije, odnosno Kupferove ćelije, aktiviraju kao posledica akutne smrti ćelija jetre, kao i da ove inflamatorne ćelije mogu da promovišu početna oštećenja jetre (Jaeschke i Ramachandran, 2011). Hiperplazija Kupferovih ćelija u jetri zapaža se nakon tretmana insekticidima CPF i IMI (Tabela 28 i Slika 26).

Dobijeni rezultati su u skladu i sa rezultatima drugih istraživanja. Aroonvilairat i sar. (2018) su u krvi pacova tretiranih sa miksom pesticida (CPF, cipermetrin i kaptan) zabeležili povećan broj leukocita, kao i neutrofila, a smanjenje eozinofila i limfocita. U studiji Ibtissem i sar. (2017), kod pacova tretiranih fungicidom metiltiofanatom, ustanovljen je povećan broj limfocita, što ukazuje na aktivaciju imunog odgovora.

Rezultati ove disertacije pokazuju da kotretman CPF i ekstrakta lista imele u većoj dozi (CPF+VAE1) dovodi do smanjenja broja WBC (Tabela 9). Sadržaj i količina pojedinih polifenolnih jedinjenja u ekstraktu lista imele ukazuju na njihovu potencijalnu biološku i farmakološku aktivnost, ali pokazuju i hepatoprotektivni efekat, što se može zapaziti analizom histopatoloških promena koje su ublažene u kotretmanu sa biljnim ekstraktom (Tabela 28 i Slika 26).

Broj trombocita (PLT) je značajno smanjen u odnosu na kontrolu samo u grupi nakon tretmana IMI (Tabela 9). PLT imaju ključnu ulogu u koagulaciji krvi, a smanjenje njihovog broja može se pripisati poremećaju sistema koagulacije krvi i hemostaze (Saoudi i sar., 2011). Trombocitopenija može nastati usled smanjene proizvodnje ili povećane destrukcije trombocita, a ovi poremećaji su posledica delovanja brojnih faktora (toksične supstance, lekovi, virusne infekcije i oštećenje tkiva) i nekih oboljenja (bolesti hematopoeznih organa, slezine i slično), i najčešće su imunološki posredovani (Barger, 2003; Aster i Bougie, 2007). Trombocitopenija može nastati i kao posledica oksidativnog oštećenja membrana PLT (Ambali i sar, 2011a).

5.3.2. Uticaj tretmana na biohemijske parametre u serumu

U organizmu postoji ravnoteža između proizvodnje i potrošnje energije. Kada se ova ravnoteža naruši, kod sisara, uključujući i čoveka, javljaju se metabolički poremećaji. U poslednje vreme, veliki broj ljudi ima neki od metaboličkih poremećaja, uključujući gojaznost, dijabetes i neke bolesti jetre (He i sar., 2020). Epidemiološke studije su pokazale da pesticidi kod akutnog i hroničnog trovanja mogu izazvati niz toksičnih efekata u organizmu, kao što su oštećenja tkiva i poremećaj metaboličkih funkcija (Xiao i sar., 2017).

Metabolizam ugljenih hidrata je narušen kod grupe nakon tretmana CPF, na šta ukazuje porast koncentracije glukoze u serumu (Tabela 10). Mehanizmi koji su uključeni u nastanak hiperglikemije, odnosno povećane koncentracije glukoze izazvane organofosfatima istražuju se intenzivno poslednjih godina. Jedan od izučavanih mehanizama kod hiperglikemije izazvane organofosfatima je aktivacija hipotalamo-hipofizno-adrenalne ose (HPA), koja reguliše proces sinteze i sekrecije glukokortikoida preko adrenalnog korteksa. U toku stresnog odgovora, hipotalamus dovodi do oslobađanja kortikotropin-oslobađajućeg hormona (engl. *corticotropin releasing hormone*, CRH), koji stimuliše hipofizu da oslobađa adrenokortikotropni hormon (ACTH). ACTH zatim stimuliše sekreciju glukokortikoida iz adrenalne žlezde. Glukokortikoidni hormoni (najčešće kortizol kod čoveka i kortikosteron kod glodara) povećavaju nivo glukoze indukcijom puta glukoneogeneze (Acker i Nogueira, 2012). Organofosfati mogu da izazovu aktivaciju HPA puta i da dovedu do povećanja kortikosterona u plazmi (Joshi i Rajini, 2009; 2012). Literaturni podaci pokazuju da je hiperglikemija jedan od poznatih simptoma toksičnosti insekticida. Acker i Nogueira (2012) su nakon akutnog tretmana insekticidom CPF zabeležili povećanje glukoze u plazmi i nivoa glikogena u jetri, kao i aktivaciju HPA puta, i povećanje enzima TAT i G6P-aze u jetri, koji su uključeni u put glukoneogeneze. Ambali i sar. (2011b) su zabeležili visoku koncentraciju glukoze kod pacova koji su dobijali CPF i Pb u toku 9 nedelja. Autori ove studije smatraju da bi hiperglikemijski odgovor kod životinja mogao da bude usled povećane lipidne peroksidacije u pankreasu, što

dovodi do razgradnje insulina, koji ima ključnu ulogu u regulaciji koncentracije glukoze u krvi. Slično, poznato je da OFJ povećavaju glikogenolizu putem inhibicije aktivnosti insulina i stimulacijom aktivnosti glukagona (Rahimi i Abdollahi, 2007). Pored toga, povišena koncentracija glukoze u serumu povećava nivo peroksida u Langerhansovim ostrvcima pankreasa, koja su siromašna antioksidativnom aktivnošću. Ovo glukotoksično stanje uzrokuje smanjenje nivoa dva regulatorna proteina PDX-1 i MafA, koji se normalno vezuju za promotor insulina i stimulišu transkripciju gena za insulin. Smanjenje nivoa ova dva proteina dovodi i do smanjenja aktivnosti promotora za insulin, ekspresije gena za insulin i njegove sekrecije. OFJ mogu uzrokovati insulinsku rezistenciju inhibicijom transporta glukoze u skeletne mišiće preko uticaja na signalni put insulina (Ambali i sar., 2011b). Takođe, s obzirom na to da je CPF inhibitor aktivnosti enzima AChE, prolongirana stimulacija izazvana ACh mogla bi dovesti do smanjene osetljivosti β -ćelija u pankreasu na glukozu (Gilon i Henquin, 2001). S tim u vezi, inhibicija AChE bi mogla imati delimičnu ulogu u hiperglikemiji izazvanoj organofosfatima. Hiperglikemija se može smatrati mehanizmom koji dovodi do razvoja oksidativnog stresa nakon trovanja organofosfatima, jer se usled hiperglikemije stvaraju krajnji produkti glikacije (Ambali i sar., 2011b).

Hiperglikemija izaziva autooksidaciju glukoze, glikaciju proteina i aktivaciju metabolizma poliola. Ove promene ubrzavaju stvaranje ROS i povećavaju oksidativne modifikacije lipida, DNK i proteina u različitim tkivima. Oksidativni stres može imati važnu ulogu u nastanku komplikacija kod dijabetesa kao što su nefropatija, neuropatija i katarakta sočiva. Glikacione reakcije se javljaju *in vivo* kao i *in vitro* i povezane su sa hroničnim komplikacijama dijabetesa melitusa (diabetes mellitus), kao i bolestima vezanim za starenje (Meghana i sar., 2007; Hussein i Abu-Zinadah, 2010).

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da nakon tretmana samo insekticidom IMI, kao i u kotretmanu sa ekstraktom lista imele nije došlo do značajnih promena koncentracije glukoze u serumu, dok je samo tretman CPF doveo do hiperglikemije u poređenju sa kontrolom. Ovaj porast glukoze su ublažili kotretmani sa VAE i doveli do normalizacije nivoa glukoze, što ukazuje na hipoglikemijski efekat flavonoida koji su prisutni u ekstraktu lista imele (Tabela 10).

U prethodnim studijama pokazano je da su hipoglikemijski efekti biljnih ekstrakata povezani sa efektima prisutnih fenolnih jedinjenja koji mogu da oponašaju insulin (molekularna mimikrija) (Gray i Flatt, 1999; Patel i sar., 2012), dovedu do stimulacije biosinteze/lučenja insulina (Rajasekaran i sar., 2004), do neutralizacije slobodnih radikala (Triastuti i sar., 2009) i regeneracije β -ćelija u pankreasu (Daisy i sar., 2011). Rezultati ove doktorske disertacije su u skladu sa rezultatima studija Adaramoye i sar. (2012), koji su pokazali da je metanolni ekstrakt imele ispoljio hipoglikemijske efekte u pacovima kod kojih je dijabetes indukovano streptozotocinom. Smanjeni nivo glukoze, koji se u ovoj disertaciji zapaža u obe grupe sa kotretmanima (CPF+VAE1 i CPF+VAE2) i pokazuje doznu zavisnost, može se pripisati procesima kao što su supresija hepatičke glukoneogeneze, stimulirana glikoliza i oslobađanje insulina (Ohiri i sar., 2003). U studiji Ohiri i sar. (2003) ekstrakt imele u dozama 100 mg/kg i 200 mg/kg, davan intraperitonealno, značajno je smanjio nivo glukoze kod aloksanom izazvanog dijabetesa kod zečeva. Autori ove studije su zaključili da uočeni hipoglikemijski efekat kod dijabetičnih zečeva ukazuje na pankreasne i ekstrapankreasne mehanizme delovanja, koji pored supresije glukoneogeneze uključuju pojačanu sintezu glikogena i smanjenje apsorpcije glukoze preko tankog creva, kao i povećano preuzimanje u perifernim tkivima (Chikezie i Iheanacho, 2014). Iako precizan mehanizam delovanja ekstrakata imele u pogledu smanjenja koncentracije glukoze nije poznat, ovi hipoglikemijski efekti mogli bi se pripisati bioaktivnim jedinjenjima prisutnim u ekstraktu. Hlorogenska

kiselina, koja pripada hidroksicimetnim kiselinama, prisutna je u ispitivanom ekstraktu imele u značajnom udelu (Tabela 5). Li i koautori (2009) su hranili zlatne hrčke hranom bogatom mastima i, nakon 8 nedelja tretmana, u grupi koja je dobijala i hlorogensku kiselinu zabeležili su smanjenu koncentraciju glukoze i povećanu osetljivost za insulin u odnosu na kontrolne hrčke, što ukazuje na hipoglikemijsko i insulinsko senzibilizirajuće dejstvo hlorogenske kiseline. Takođe i ferulična kiselina, prisutna u ekstraktu, ispoljava hipoglikemijsko dejstvo, što je pokazano u studiji koju su sprovedeli Chowdhury i sar. (2016), a u kojoj je pokazano da ferulična kiselina kod dijabetičnih pacova u znatnoj meri smanjuje nivo glukoze, a povećava nivo insulina u krvi.

Rezultati ove doktorske disertacije (Tabela 10) pokazuju da su tretmani samo insekticidima, CPF i IMI, doveli do povećanja ukupnog holesterola i triglicerida u serumu pacova. Promene lipidnog statusa i povećan nivo ova dva parametra mogu da se pripišu efektima insekticida na permeabilnost membrana ćelija jetre, kao i na stimulisano lipolizu i sintezu masnih kiselina (Uzun i Kalender, 2013). Pored toga, povećanje nivoa holesterola u serumu može se javiti zbog njegove povećane sinteze u jetri, ili blokiranja žučnih kanala jetre, što smanjuje ili zaustavlja sekreciju holesterola u duodenum (holestaza) i može biti pokazatelj oštećenja jetre (El-Demerdash i Nasr, 2014).

S obzirom na to da je jetra primarni organ detoksikacije u telu koji deluje putem P450-posredovane enzimske katalize, moguće je da ovu biokatalizu pesticidi inhibiraju, što može biti jedan od uzroka hiperholesterolemije (Al-Attar, 2015; He i sar., 2020). Stoga, povećana količina pesticida i egzogenih toksina putuje iz jetre u druga, mastima bogata, tkiva, kao što je adipozno tkivo, i time uzrokuje brojne, mnogo štetnije, efekte na energetske metabolizam i druge telesne funkcije. Pored akumulacije u jetri, neki insekticidi se mogu rastvoriti i akumulirati u adipoznom tkivu (He i sar., 2020). Rezultati Sun i sar. (2017b) pokazali su da IMI može da doprinese povećanom stvaranju masnih naslaga kod ženki miševa, koje je izazvano hranom sa visokim udelom masti i da pojača adipogenezu u 3T3-L1 adipocitima preko AMPK α -posredovanog puta. Takođe, u nedavnoj studiji na 3T3-L1 mišjim preadipocitima pokazano je da organofosforni insekticid diazinon dovodi do akumulacije lipida i aktivira adipogene signalne puteve (Smith i sar., 2018). Povećan nivo triglicerida predstavlja dobar dokaz povećane sinteze glicerida u jetri, koja je direktno proporcionalna koncentraciji masnih kiselina i glicerofosfata (Tanvir i sar., 2015). Povećanje triglicerida u serumu može se takođe pripisati inhibiciji aktivnosti enzima lipaze hepatskih triglicerida i lipoproteina plazme (El-Demerdash i Nasr, 2014). Acker i Nogueira (2012) su zabeležili hiperlipidemiju nakon samo jednog tretmana CPF (50 mg/kg), i pokazali da izloženost ovom insekticidu može predstavljati faktor rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti. Povećan nivo LDL-TC (engl. *low density level cholesterol*, loš holesterol), triglicerida i smanjen nivo HDL-TC (engl. *high density level cholesterol*, dobar holesterol) izmereni su kod japanskih prepelica nakon tretmana od 30 dana sa neonikotinoidom IMI (Emam i sar., 2018). ElMazoudy i sar. (2011) su povećan nivo holesterola u serumu nakon tretmana CPF pripisali smanjenoj koncentraciji androgena, što je dovelo do poremećaja u spermatogenezi.

Kod grupa koje su pored CPF dobijale i ekstrakt lista imele došlo je do značajnog smanjenja ukupnog holesterola i to ispod kontrolnih vrednosti, dok je kod kotretmana sa IMI nivo holesterola smanjen i približan kontroli. S druge strane, samo veća doza ekstrakta imele u kotretmanu sa insekticidima je smanjila nivo triglicerida u odnosu na grupu koja je dobijala samo CPF ili IMI (Tabela 10). U studiji Avcı i sar. (2006) ekstrakt imele je smanjio nivo holesterola, triglicerida i LDL-holesterola, a povećao HDL-holesterol u serumu kod miševa kojima je davana hrana sa visokim sadržajem holesterola bez izazivanja oštećenja želuca, što ukazuje na moćnu hipoholesterolemijsku aktivnost imele. S tim u vezi se može zaključiti da

ova biljka ispoljava povoljne efekte na navedene parametre i može smanjiti rizik od ateroskleroze i kardiovaskularnih bolesti. Ekstrakt imele može da ublaži disregulaciju metabolizma lipida i stabilizuje nivo lipida u cirkulaciji i u jetri, smanjujući biosintezu holesterola supresijom SREBP-1c (Slika 17) i povećanjem iskorišćavanja masnih kiselina (Kim i sar., 2015; Szurpnicka i sar., 2020). Pankreasna lipaza je enzim koga luči pankreas, a koji ima ključnu ulogu u apsorpciji triglicerida u tankom crevu. Istraživanje Lee i sar. (2012) pokazalo je da imele deluje inhibitorno na lipazu. Studija Abdel-Sattar i sar. (2011), koja se bavila ispitivanjem saudijske imele (*Viscum schimperi*) na dijabetičnim pacovima, pokazala je da metanolni ekstrakt ove vrste dovodi do povećanja nivoa HDL-C i smanjenja ukupnog holesterola, triglicerida i LDL-C u serumu, što bi moglo biti usled delimično obnovljene funkcije β -ćelija pankreasa i povećanog nivoa insulina. I rezultati u ovoj disertaciji su u saglasnosti sa literaturnim podacima. Pokazano je da promenama u vrednostima holesterola i triglicerida u serumu kod grupa koje su u kotretmanima sa insekticidima dobijale i ekstrakt lista imele najverovatnije doprinose različita bioaktivna fenolna jedinjenja. Na primer, hlorogenska i *p*-kumarinska kiselina, koje su prisutne u ekstraktu imele, predstavljaju jedinjenja sa snažnom sposobnošću regulacije metabolizma lipida, ispoljavajući antihiperlipidemijski efekat, što je pokazano u nedavnim istraživanjima (Chen i sar., 2019; Shen i sar., 2019). Kempferol, flavonoid prisutan u ekstraktu imele, može da spreči oksidaciju LDL holesterola i interakciju sa slobodnim radikalima, i može imati zaštitnu ulogu u prevenciji ateroskleroze (Calderón-Montaño i sar., 2011). Apigenin takođe može doprineti smanjivanju nivoa holesterola i triglicerida, što se može pripisati glikozidima koji inhibiraju apsorpciju i biosintezu holesterola, a sa druge strane podstiču izlučivanje holesterola i lučenje insulina, čime se suprimira mobilizacija slobodnih masnih kiselina (Dou i sar., 2020).

Jetra je prvi organ koji učestvuje u procesu biotransformacije nakon unošenja toksina, kao što su pesticidi i metali, pa je shodno tome zabeleženo da se toksični odgovori javljaju češće u jetri u poređenju sa drugim organima, a efekti se registruju na osnovu analiza i promena biohemijskih parametara u krvi (Raina i sar., 2015). Enzimi iz seruma (ALT, AST, LDH i GGT), kao i nivo totalnog bilirubina koriste se u određivanju disfunkcije jetre, a povišeni nivoi enzima u serumu ukazuju na oslobađanje iz ćelija i direktno su povezani sa stepenom oštećenja i gubitkom funkcionalnog integriteta ćelijske membrane u jetri (Mansour i Mossa, 2010; Tanvir i sar., 2016).

Transaminaze ALT i AST su važni enzimi u biološkim procesima, imaju i ulogu u katabolizmu i biosintezi aminokiselina, a smatraju se glavnim markerima citolize jetre (Selmi i sar., 2018). Naši rezultati pokazuju da je tretman insekticidom CPF doveo do povećanja aktivnosti enzima ALT i AST u serumu u odnosu na kontrolu (Tabela 11). Ove promene ukazuju na oštećenja u jetri, poremećaju biosinteze ovih enzima, kao i na promene u strukturi i propustljivosti membrane hepatocita, što dovodi do povećanog oslobađanja ovih enzima u cirkulaciju iz oštećenih ćelija jetre (Tanvir i sar., 2015). Uzrok povećanja aktivnosti ALT i AST može biti i posledica oksidativnih oštećenja i povećanog stvaranja slobodnih radikala koji izazivaju hepatotoksičnost (Abdelkhalek i sar., 2017). Tokom metabolizma u jetri, CPF se aktivira posredstvom CYP450 kroz reakciju desulfuracije i nastaje toksični CPFO koji se reakcijom dearilacije deaktivira, što rezultuje formiranju metabolita TCP. Pored CYP450, u reakcijama detoksikacije učestvuju i PON1 (A-esteraza) i sistem glutationa, a glavni put eliminacije CPF je ekskrecija urinom, pri čemu je TCP najzastupljeniji metabolit (Jokanović, 2010; Wang i sar., 2010; Supreeth i Raju, 2017). Kopjar i sar. (2018) su nakon izlaganja pacova niskim dozama CPF u plazmi i mozgu detektovali koncentracije i CPF i metabolita TCP. Povećani nivoi ovog metabolita, ali i drugih reaktivnih intermedijera ometaju normalno funkcionisanje jetre, na šta ukazuje povećana aktivnost aminotransferaza u serumu (Raina i sar., 2015).

Takođe, i u grupi koja je dobijala samo insekticid IMI, zabeležene su povećane aktivnosti ALT i AST u serumu (Tabela 11), usled destruktivnih promena u hepatocitima i rupture ćelijske membrane. Abu Zeid i sar. (2019) smatraju da bi ove promene u aktivnosti enzima mogle biti zbog akumulacije metabolita IMI u jetri. Prilikom biotransformacije IMI u jetri stvara se veliki broj metabolita kao što su olefin, 4OH-IMI, 5OH-IMI, 6-CAN, dn-IMI i urea metaboliti. Najveće koncentracije insekticida IMI i njegovih metabolita u jetri postižu se približno 12 sati nakon početne izloženosti (Bizerra i sar., 2020; Nimako i sar., 2021). Chao i Casida (1997) su pokazali da biološka aktivacija IMI do njegovog metabolita dn-IMI, koji ispoljava veći afinitet vezivanja za nAChR sisara u poređenju sa insektima, može doprineti njegovoj većoj toksičnosti kod sisara u odnosu na IMI. Narušavanje normalne funkcije hepatocita je u korelaciji sa histomorfološkim promenama parenhima jetre (hidropsna degeneracija, fokalna i konfluentna nekroza), koje se uočavaju kod jedinki koje su bile tretirane sa CPF ili IMI (Tabela 28 i Slika 26). Nekoliko studija je pokazalo da su aktivnosti transaminaza povećane kod životinja nakon izlaganja pesticidima (Mossa i Abbassy, 2012; Mossa i sar., 2015; Abdelkhalek i sar., 2017; Milošević i sar., 2018).

Enzim LDH katalizuje pretvaranje laktata u piruvat, a povećani nivo u serumu predstavlja indikator funkcionalne deficijencije jetre i toksičnih efekata u tkivima (Abu Zeid i sar., 2019). Promene u aktivnosti LDH kod pacova tretiranih insekticidima može biti usled velikog oštećenja membrana hepatocita i povećanog oslobađanja u sistemsku cirkulaciju, usled promena metabolizma ugljenih hidrata i proteina, a takođe može ukazivati i na metaboličke poremećaje i predstavlja jasan odgovor protiv iscrpljivanja energetske depoa (Nasr i sar., 2016). Rezultati ove disertacije pokazuju da je došlo do povećanja aktivnosti ovog enzima u serumu u grupama koje su tretirane samo CPF i IMI (Tabela 11). Porast aktivnosti enzima ALT, AST i LDH u serumu kao rezultat toksičnog delovanja insekticida, koji je zabeležen u ovoj studiji, u skladu je sa literaturnim podacima (Mansour i Mossa, 2010; Tanvir i sar., 2015; Milošević i sar., 2018; Abu Zeid i sar., 2019).

Bilirubin je najvažniji metabolit hem grupe i produkt razgradnje Hb. Predstavlja marker hepatobilijarnog oštećenja i metaboličke funkcije jetre (Jayusman i sar., 2014), a povišena vrednost bilirubina u serumu je važan klinički pokazatelj težine nekroze, dok njegova akumulacija predstavlja meru vezivanja, konjugacije i ekskretornog kapaciteta ćelija jetre (Tanvir i sar., 2016). Najveća količina bilirubina nastaje razgradnjom eritrocitnog hema nakon oslobađanja Hb iz eritrocita, i to nakon 120 dana života eritrocita u krvi, u retikuloendotelnom sistemu. Manja količina bilirubina može da nastane i razgradnjom drugih hem proteina i to mioglobina, katalaze, peroksidaze i citohroma. Bilirubin je toksičan za CNS i može izazvati niz neuroloških simptoma koji se nazivaju akutna bilirubinska encefalopatija (Effiong i sar., 2014).

Nakon tretmana insekticidima zabeležena je povećana koncentracija bilirubina u serumu usled hemolize i razgradnje Hb iz eritrocita, kao i smanjenim preuzimanjem od strane jetre (El-Demerdash i Nasr, 2014; Tanvir i sar., 2015). I u ovoj studiji, nakon tretmana CPF ili IMI, zabeležene su povećane vrednosti bilirubina u serumu (Tabela 11), kao i smanjen broj RBC i Hb usled hemolize. Takođe, pokazano je da ovi insekticidi imaju prooksidativne efekte i izazivaju oksidativna oštećenja eritrocita i hepatocita. I u našim prethodnim istraživanjima su pokazani slični rezultati nakon tretmana fenitroionom (Milošević i sar., 2017; 2018).

U ovom istraživanju su, takođe, ispitivani i hepatoprotektivni efekti ekstrakta lista imele na metaboličke i ekskretorne funkcije jetre merenjem aktivnosti enzima (ALT, AST i LDH), kao markera hepatocelularnog oštećenja jetre, kao i vrednosti bilirubina u serumu (Tabela 11). U grupi koja je dobijala samo ekstrakt lista imele nije bilo značajnih razlika ovih ispitivanih biohemijskih parametara u odnosu na kontrolu. Međutim, pokazano je da kotretmani CPF ili IMI sa ekstraktom lista imele u obe koncentracije smanjuju aktivnosti ovih enzima u poređenju

sa vrednostima grupa koje su dobijale samo insekticide. Flavonoidi prisutni u ekstraktu imele su ublažili hepatotoksične efekte insekticida i ispoljili zaštitni potencijal protiv oštećenja jetre, održavajući integritet membrane hepatocita i smanjujući time oslobađanje ovih enzima u cirkulaciju. Ekstrakt u obe ispitivane doze u kotretmanu sa insekticidima nije značajno uticao na promenu vrednosti bilirubina u odnosu na vrednosti grupa koje su dobijale samo CPF ili IMI. Sa druge strane, Effiong i sar. (2014) su pokazali da u grupi pacova koji su dobijali hranu bogatu natrijum hloridom dolazi do značajnog porasta bilirubina u serumu, dok je u grupi koja je dobijala i ekstrakt lista imele vrednost bilirubina značajno smanjena.

Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa literaturnim podacima, u kojima je pokazano da polifenoli prisutni u različitim biljnim ekstraktima koji su ispitivani, poput kvercetina, rutina, kempferola, apigenina, katehina, hlorogenske kiseline i drugih, imaju sposobnost da ublaže oštećenja jetre uzrokovana toksičnim agensima, kao što su paracetamol, živa hlorid, (HgCl₂), kao i pesticidi, što je pokazano u različitim istraživanjima (Yang i sar., 2013; El-Shafey i sar., 2015; Mossa i sar., 2015; Caglayan i sar., 2019a; Mondal i sar., 2021). Abdel-Salam i sar. (2010) su takođe ispitivali protektivne efekte imele (VAE) na transaminaze iz seruma kod pacova tretiranih CCl₄, gde je smanjenje aktivnosti ovih enzima u serumu pokazalo dozno-zavisni trend. Može se zaključiti da polifenolna jedinjenja mogu da smanje nekrozu i stabilizuju membrane hepatocita, kao i da pruže zaštitu od peroksidativnih oštećenja jetre kod različitih eksperimentalnih model organizama.

Histopatološke lezije se koriste kao indikatori u proceni stanja organizama koji su izloženi polutantima. Histopatološki biomarker u monitoringu životne sredine je od značaja, s obzirom da omogućava ispitivanje specifičnih ciljnih organa koji su odgovorni za vitalne funkcije. Promene koje su uočene u ovim vitalnim organima obično se lakše identifikuju u poređenju sa funkcionalnim, i mogu se koristiti kao simptomi upozorenja na zdravlje organizma (Zidan, 2015). U ovom istraživanju, histopatološke analize su pokazale blaže promene u morfologiji ćelija jetre, koje se ogledaju u smanjenju stepena hidropsne degeneracije, fokalne nekroze i odsustvu konfluentne nekroze kod jedinki koje su dobijale pored insekticida (CPF ili IMI) i ekstrakt imele, pri čemu je veća doza ekstrakta ispoljila bolji protektivni efekat na ispitivane morfološke promene (Tabela 28, Slika 26).

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je kod pacova koji su dobijali samo CPF ili IMI došlo do oštećenja funkcije bubrega, što je potvrđeno povišenim koncentracijama parametara u serumu (urea i kreatinin) (Tabela 12) i histopatološkim lezijama u tkivu bubrega (Tabela 29 i Slika 27). Bubrezi su meta različitih toksičnih jedinjenja, jer imaju visok protok krvi, metabolički su aktivni, mogu da regenerišu reaktivne intermedijere, u njima se koncentrišu toksična jedinjenja, ali i neželjeni krajnji proizvodi metabolizma i osetljivi su na imunološke reakcije. Kreatinin i urea su korisni parametri koji se najčešće određuju zbog procene funkcije bubrega, kao i zbog ranog utvrđivanja nefrotoksičnosti izazvane različitim jedinjenjima, i koriste se kao indeks oštećenja bubrega (El-Gendy i sar., 2019). Urea je krajnji proizvod metabolizma aminokiselina i proteina, a na koncentraciju, pored bubrežne funkcije, utiču i drugi činioci, pa se zato urea određuje zajedno sa kreatininom. Nivoi uree mogu takođe biti povećani drugim faktorima, kao što su dehidratacija, antidiuretici i ishrana, dok je kreatinin više specifičan za oštećenja bubrega (Tanvir i sar., 2016). Izlučivanje kreatinina zavisi pretežno od procesa glomerularne filtracije, i manjim delom od tubularne sekrecije (Mansour i Mossa, 2010). Kreatinin nastaje od kreatina koji je značajan za produkciju energije u mišićima, kao završni produkt katabolizma proteina. Povećan nivo kreatinina može biti u korelaciji sa katabolizmom proteina (El-Gendy i sar., 2019).

Porast kreatinina u serumu u grupama CPF i IMI (Tabela 12), iako nije bio statistički značajan, može ukazivati na oštećenja funkcije glomerula i tubula u bubrezima (Mansour i

Mossa, 2010). Povećanje uree i kreatinina u serumu ukazuje na smanjeni kapacitet bubrega u filtriranju ovih metaboličkih proizvoda, kao i njihovo smanjeno izlučivanje putem urina. Brzina ekskrecije zavisi od koncentracije metabolita u plazmi i brzine filtracije kroz glomerul (Nasr i sar., 2016). Porast nivoa uree može se pripisati konverziji amonijaka do uree kao rezultat povećane sinteze enzima uključenog u produkciju uree (El-Gendy i sar., 2019). Owumi i Dim (2019) su zaključili da povećanje kreatinina u serumu pacova tretiranih sa CPF ukazuje na smanjenu brzinu glomerularne filtracije, dok povišeni nivo uree implicira smanjenu reapsorpciju u bubrežnim tubulima. Kammon i sar. (2010) su pokazali nefrotoksične efekte CPF i IMI kod kokošaka, koji su se manifestovali hemoragijom, nekrozom i vakuolarnom degeneracijom epitela tubula. Kod nilskih tilapija (*Oreochromis niloticus*) intoksikovanih organofosfatom diazinonom nivoi uree i kreatinina u serumu bili su povećani, a zabeležene su i histopatološke promene koje ukazuju na smanjenu glomerularnu filtraciju i bubrežnu disfunkciju (Abbas i sar., 2021). Takođe, sugeriše se da se bubrežna cirkulacija i izlučivanje elektrolita delimično kontrolišu holinergičkim mehanizmom, pa samim tim trovanje organofosfatima narušava funkciju bubrega (Georgiadis i sar., 2018). U ovoj studiji, oba insekticida su dovela do morfoloških promena u bubrezima, ali su ove promene, kao što su hidropsna degeneracija epitela kanalića i nekroza, deskvamacija tubula i atrofija epitela tubula bili izraženiji kod životinja koje su dobijale IMI, iz čega se može zaključiti da IMI ispoljava izraženiju nefrotoksičnost (Tabela 29 i Slika 27).

U ovoj disertaciji rezultati istraživanja pokazuju da je nivo uree značajno smanjen samo kod kotretmana CPF sa obe doze ekstrakta imele u poređenju sa grupom koja je tretirana samo CPF, dok u ostalim eksperimentalnim grupama nije bilo značajnih razlika. Takođe, nisu zabeležene značajne promene nivoa kreatinina nakon kotretmana insekticidom CPF ili IMI i ekstraktom imele u obe doze u odnosu na kontrolu (Tabela 12). Metanolni ekstrakt imele davan dijabetičnim pacovima u dozi 100 mg/kg tokom tri nedelje snizio je povećane nivoe uree (Adaramoye i sar., 2012). Različite supstance su testirane u svrhu potencijalnih nefroprotektivnih agenasa, a neke od njih prisutne su i u ispitivanom ekstraktu imele. Kod pacova koji su tretirani ciklofosamidom, suplementacija sa kvercetinom doprinela je snižavanju biomarkera oštećenja jetre i bubrega, uključujući kreatinin i ureu, i time je potvrđena protektivna aktivnost ovog flavonoida. Smatra se da kvercetin doprinosi prevenciji oštećenja kroz ublažavanje oksidativno-inflamatornog stresa (Ebokaiwe i sar., 2021). Rutin je flavonoid koji je najzastupljeniji u ekstraktu imele ispitivanom u ovoj disertaciji. Studija Caglayan i sar. (2019b), u kojoj su ispitivani nefroprotektivni efekti rutina kod pacova intoksikovanih HgCl₂, potvrdila je sposobnost rutina da znatno ublaži morfološke promene u bubrezima, pri čemu su navedeni efekti bili dozno-zavisni.

5.3.3. Ispitivanje AChE kao markera neurotoksičnosti

Enzimi ChE se često koriste kao biomarkeri za procenu ekotoksikoloških efekata mnogih organofosfata i karbamata, ali i drugih polutanata zahvaljujući njihovoj osetljivosti na ova jedinjenja, kao i zbog ekonomičnosti, i biološke i ekološke relevantnosti (Gonçalves i sar., 2021).

Oba insekticida, CPF i IMI, dovela su do smanjenja aktivnosti AChE u jetri, dok u bubregu i testisu promene aktivnosti ovog enzima nisu bile statistički značajne (Tabela 14 i Grafik 6). Aktivnost ChE u serumu bila je samo neznatno smanjena u CPF grupi, dok je u IMI grupi zabeleženo neznatno povećanje (Tabela 13). Veći deo simptoma nakon intoksikacije organofosfatima najčešće se objašnjava inhibicijom AChE. Aktivnost AChE kao biomarkera za procenu toksičnih efekata organofosfata je proučavana kod mnogih vrsta organizama i predstavlja indeks toksičnosti organofosfata kako u *in vivo*, tako i u *in vitro* studijama (Nasr i sar., 2016). Toksičnost organofosfata je zasnovana na ireverzibilnoj inhibiciji enzima AChE,

koji razlaže neurotransmiter ACh. Inhibicija AChE organofosforinim insekticidima ometa pravilnu neurotransmisiju u holinergičnim sinapsama i neuromuskularnim spojevima. Osim toga, ovaj mehanizam uključuje inhibiciju i drugih nespecifičnih esteraza i isti je za sve insekticide iz grupe organofosfata, pa samim tim i za CPF. Inhibicija aktivnosti enzima AChE izaziva povećanje nivoa endogenog ACh u organizmu i dovodi do njegovog vezivanja za muskarinske i nikotinske receptore u CNS i PNS. Povećanje ACh u CNS narušava balans između neurotransmitera i izaziva pojavu akutne intoksikacije (Al-Attar, 2015). Oksidativnom desulfuracijom CPF nastaje visoko elektrofilni toksični metabolit CPF okson (CPFO), koji pokazuje znatno veći afinitet prema aktivnom mestu serin-zavisnih estarskih hidrolaza u odnosu na matično jedinjenje (Mansour i Mossa, 2010). Metaboliti oksona nastali desulfuracijom nisu samo rastvorljiviji u vodi u odnosu na matična jedinjenja, već su i hemijski reaktivniji i snažniji inhibitori AChE i BuChE od samog CPF (Testai i sar., 2010; Flaskos, 2012; Yu, 2015).

Literaturni podaci pokazuju da je dejstvom CPF značajno inhibirana aktivnost AChE u eritrocitima pacova, a veća promena aktivnosti AChE zabeležena je kod mužjaka nego kod ženki pacova (Mansour i Mossa, 2010). Razlika između mužjaka i ženki pacova može biti posledica većeg metabolizma i bržeg razlaganja ksenobiotika u jetri mužjaka (imaju više citohroma P450). Samim tim, veći kapacitet za oksidativni metabolizam može prouzrokovati da mužjaci određenih sojeva glodara budu manje ili više podložni toksičnosti pesticida u zavisnosti od toga da li oksidativni metabolizam predstavlja put bioaktivacije ili detoksikacije određenog jedinjenja. Chambers i sar. (1994) su pokazali da odrasli mužjaci pacova imaju veću stopu aktivacije metabolita CPFO u jetri, kao i bržu detoksikaciju. Do inhibicije aktivnosti AChE u tkivu jetre može doći i zbog povećane produkcije LPO, što indirektno deluje na enzime koji se vezuju za ćelijsku membranu, kao što je AChE (Mohamed i sar., 2018). Ince i sar. (2017) su tretirali pacove organofosfatnim insekticidom malationom, i nakon 30 dana u serumu i jetri životinja zabeležili inhibiciju AChE, što je u skladu sa rezultatima ove doktorske disertacije. U istraživanju Miladinović (2019) takođe je, u grupi japanskih prepelica koje su dobijale CPF, zapažena inhibicija ChE u tkivu jetre, mozga i u RBC.

IMI i strukturno slični neonikotinoidi nisu inhibitori AChE, već su kompetitivni modulatori nAChR i pokazuju selektivniju toksičnost i specifično delovanje na nervni sistem insekata u odnosu na sisare. IMI je po hemijskoj strukturi sličan i ima zajednički način delovanja sa alkaloidom nikotinom. Kao agonist ACh vezuje se za postsinaptičke nAChR u CNS insekata i izaziva ireverzibilnu blokadu ovih receptora, a njegovo neurotoksično delovanje dovodi do holinergičnih efekata i promene u neurotransmisiji (Tomizawa and Casida, 2003; Annabi i sar., 2015; Sheets i sar., 2016). IMI deluje tako što pobuđuje različite proteine nAChR na način sličan ACh, ali za razliku od ACh, koji se brzo razgrađuje, IMI se ne može inaktivirati, ili se polako inaktivira aktivnošću enzima AChE. IMI kao agonist i antagonist nAChR sisara ima dvostruko delovanje, i ovi efekti zahtevaju dalja eksperimentalna istraživanja (Tomizawa and Casida, 2009; Crossthwaite i sar., 2017; Qu i sar., 2022). Kod sisara, razlike u svojstvima vezivanja za različite podtipove receptora u velikoj meri doprinose mnogo nižoj aktivnosti neonikotinoida u tkivima kičmenjaka u poređenju sa tkivima insekata (Kammon i sar., 2010).

Aktivacija nAChR dovodi do influksa Ca^{2+} , kao i do oslobađanja ROS (Wang i sar., 2018). Rezultati Annabi i sar. (2015) pokazali su da je oralni tretman IMI nakon 28 dana doveo do značajnog povećanja Ca^{2+} u tkivima hipotalamusa i hipofize, ali ne i u tkivu nadbubrežne žlezde pacova. Ovo ukazuje na to da je IMI delovao na CNS kao agonist nAChR, uzrokujući značajno povećanje nivoa Ca^{2+} , i da toksični efekti IMI pokazuju tkivno-specifični odgovor

(Annabi i sar., 2015). dn-IMI, metabolit IMI, takođe može aktivirati nikotinske receptore preko intracelularnog Ca^{2+} -zavisnog mehanizma (Wang i sar., 2018).

U literaturnim podacima se mogu naći različiti rezultati vezani za aktivnost AChE. U prethodnim studijama zabeleženo je smanjenje aktivnosti AChE u RBC, plazmi i mozgu pacova koji su tretirani sa IMI (Kapoor i sar., 2014; Vohra i sar., 2014; Katić i sar., 2021). Sa druge strane, u nekim istraživanjima je pokazano povećanje aktivnosti AChE u plazmi i mozgu usled dejstva IMI (Abou-Donia i sar., 2008; Annabi i sar., 2015; Abu Zeid i sar., 2019). Annabi i sar. (2015) smatraju da povećana aktivnost AChE u hipotalamusu i hipofizi može doprineti neurotoksičnom efektu, koji nastaje kao rezultat smanjenog ACh i smanjene funkcije receptora.

Ekstrakt lista imele je doveo do povećanja aktivnosti AChE u jetri u kotretmanu sa CPF (CPF+VAE1) u poređenju sa CPF grupom, kao i u grupama koje su dobijale IMI (IMI+VAE1 i IMI+VAE2) u poređenju sa IMI grupom. Takođe, aktivnost AChE u jetri je značajno veća u grupi VAE1 u poređenju sa grupama tretiranim samo insekticidima. Zabeležena je i veća vrednost ChE u serumu u grupi VAE1 u odnosu na grupu koja je dobijala samo CPF. Polifenolna jedinjenja prisutna u ekstraktu imele su ispoljila pozitivnu biološku i farmakološku aktivnost i smanjila neurotoksične efekte insekticida u kotretmanu sa biljnim ekstraktom.

5.3.4. Efekti ispitivanih tretmana na parametre oksidativnog stresa

Reaktivne vrste se u fiziološkim uslovima stvaraju u svim ćelijama sisara u procesu ćelijskog disanja. Pošto su ROS citotoksični molekuli čak i kada se proizvode tokom normalnog ćelijskog disanja, oni se neutrališu od strane endogenog odbrambenog sistema (Abdel-Daim i Abdeen, 2018). Veliki broj ksenobiotika ima sposobnost da generiše slobodne radikale u biološkom sistemu, što postavlja pitanje da li je oksidativni stres glavni uzročnik oštećenja tkiva (Lohiya i sar., 2017). Oksidativni stres se definiše kao neravnoteža između proizvodnje slobodnih radikala i reaktivnih metabolita i njihove eliminacije zaštitnim mehanizmima koji se nazivaju antioksidanti. Oksidativno oštećenje je povezano sa stvaranjem ROS i može se javiti kada su antioksidativni i detoksikacioni sistemi deficitarni i nisu u stanju da neutrališu aktivne intermedijere koje proizvode ksenobiotici i njihovi metaboliti (Yonar, 2018). Kada postoji neravnoteža između proizvodnje ROS i antioksidanata, ćelija postaje podložnija oštećenjima izazvanim oksidativnim stresom. ROS mogu da napadnu ćelijske membrane i druge ćelijske molekule izazivajući peroksidaciju lipida, oksidaciju proteina i oštećenja DNK, što može dovesti do bolesti poput kancera, ateroskleroze, dijabetesa i bolesti bubrega (Abdel-Daim i Abdeen, 2018). ROS mogu da dovedu i do modifikacije aktivnosti enzima, a oštećenjem membranskih transportnih proteina mogu izazvati poremećenu homeostazu jona u ćeliji, kao i promene u koncentraciji intraćelijskog Ca^{2+} i K^{+} . ROS mogu direktno da deluju na konformaciju ali i aktivnost svih molekula koji sadrže sulfhidrilnu (-SH) grupu oksidacijom njihovog tiolnog dela. Kombinovani efekat svih ovih promena nastalih pod uticajem ROS može na kraju da dovedu do ćelijske disfunkcije, kao i do smrti ćelija (Ambali i sar., 2011a).

Lipidi su prekursori za hormone, koriste se za skladištenje energije, imaju istaknutu ulogu glasnika i regulatora inflamacije, i jedna su od najpodložnijih meta slobodnih radikala (Padma i sar., 2012). Lipidna peroksidacija se smatra važnim indikatorom oksidativnog oštećenja ćelijskih struktura. Nastaje kao rezultat oksidativnog oštećenja PUFAs bioloških membrana, što dovodi do narušene funkcije membrane, strukturnog integriteta, smanjene fluidnosti membrane i inaktivacije enzima vezanih za membranu (Tanvir i sar., 2016). Usled povećanog oksidativnog stresa, PUFAs se oksiduju do lipidnih hidroperoksida i, u poslednjoj fazi razlaganjem peroksidnih jedinjenja, nastaje reaktivni malondialdehid (MDA). Povećana količina MDA je važan biomarker lipidne peroksidacije (Yonar, 2018). Lipidna peroksidacija

je i jedan od molekularnih mehanizama uključenih u toksičnost izazvanu pesticidima i smatra se najosnovnijim mehanizmom ćelijske smrti izazvanom slobodnim radikalima (Aly i sar., 2010; Jaeschke, 2011).

Najčešća ROS koja se stvara u mitohondrijama je $O_2^{\cdot-}$, koji nastaje redukcijom molekulske kiseonika jednim elektronom. RNS su visoko reaktivne vrste izvedene iz inicijalne reakcije $O_2^{\cdot-}$ sa NO (Vanova i sar., 2018). NO je važan signalni molekul koji je povezan sa oksidativnim stresom. Dok pri niskim koncentracijama NO deluje kao antioksidant i signalni molekul u brojnim fiziološkim procesima, pri većim koncentracijama NO može brzo da reaguje sa radikalom kiseonika formirajući toksičniji peroksinitrit. Takođe, NO direktno stupa u interakciju sa lipidima, DNK i proteinima i povezan je sa patofiziologijom ćelija i tkiva posredovanom indukcijom oksidativnog stresa (Raibeemol i Chitra, 2018). Reaktivne vrste mogu nastati kao rezultat metabolizma organofosfata pomoću CYP450, enzima koji katalizuju oksidaciju dodavanjem jednog atoma kiseonika na supstrat (organofosfat). Drugi način stvaranja ROS kod intoksikacije organofosfatima je visoka potrošnja energije u kombinaciji sa inhibicijom oksidativne fosforilacije i povećano oslobađanje glukoze putem glikogenolize u jetri i naknadnim oslobađanjem ATP-a, kako bi se zadovoljile potrebe za energijom. Prekomerna potrošnja energije dovodi do smanjene sposobnosti ćelija u održavanju svog energetskog nivoa. Iz ovog razloga, povećane količine ROS mogu da se generišu u različitim organima, a poremećaj u redoks sistemu ćelije je još jedan od mehanizama uključenih u generisanje reaktivnih vrsta kod izloženosti organofosfatima (Lukaszewicz-Hussain, 2010).

Mnoge studije su pokazale da insekticidi CPF i IMI dovode do nastanka oksidativnog stresa i narušavanja oksidativno/antioksidativne homeostaze u mnogim tkivima. Takođe, promene lipidnog statusa i povećane vrednosti ukupnog holesterola i triglicerida kod pacova tretiranih ovim insekticidima ukazuju na oštećenja ćelijskih membrana i peroksidaciju membranskih lipida (Uzun i Kalender, 2013; El-Demerdash i Nasr, 2014; Tanvir i sar., 2015).

U okviru ove doktorske disertacije, nakon subakutnog *in vivo* tretmana insekticidima CPF ili IMI, kao i kotretmanima sa ekstraktom lista imele, određivani su parametri oksidativnog stresa i sistema antioksidativne zaštite u odabranim tkivima. U Tabelama 15-18 i na Graficima 7-10 prikazani su rezultati efekata tretmana na koncentracije ROS, RNS i LPO u tkivima. Rezultati pokazuju najveće povećanje koncentracije LPO u jetri nakon tretmana insekticidima CPF ili IMI u odnosu na kontrolu. Takođe, nakon tretmana sa CPF ili IMI, zabeleženo je povećanje koncentracija $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 i NO_2^- u jetri. CPF i IMI utiču na prooksidativna oštećenja hepatocita, jer glavno mesto metabolizma ovih insekticida je u jetri, pomoću enzimskog sistema CYP450, a praćeno je nastankom slobodnih radikala koji izazivaju peroksidaciju membranskih lipida, oksidativna oštećenja i hepatotoksičnost. Kao posledica oksidativnih oštećenja hepatocita je i povećana aktivnost enzima transaminaza (AST i ALT) u serumu (Tabela 11).

Takođe, neke forme CYP450 oksigenaze se nalaze i u drugim tkivima, pa se CPF i IMI mogu metabolički aktivirati i u mozgu, bubrezima, plućima i intestinumu. Povećana lipidna peroksidacija i oksidativna oštećenja u jetri zabeležena su i u drugim studijama u kojima je proučavan hepatotoksični efekat insekticida CPF ili IMI (Tanvir i sar., 2015; Lohiya i sar., 2017; Mohamed i sar., 2018; Miladinović, 2019), fenitrotona (Milošević i sar., 2018), cipermetrina (Mossa i sar., 2015), karbofurana (Mondal i sar., 2021), i drugih ksenobiotika (Singh i sar., 2014; Tsai i sar., 2018). Različiti literaturni podaci pokazuju da insekticidi mogu da dovedu do povećanja koncentracije slobodnih radikala i oksidativnih oštećenja u različitim tkivima. Albasher i sar. (2020) su pokazali povećanu koncentraciju LPO i NO u testisu pacova nakon tretmana od 28 dana CPF. Owumi i Dim (2019) su pokazali da je tretman CPF nakon 14 dana doveo do povećanja NO u jetri i bubrezima pacova, dok su Abolaji i sar. (2017)

pokazali da tretman od 35 dana CPF dovodi do povećanja koncentracije H₂O₂, MDA i NO u mozgu, uterusu i jajnicima pacova. I kod japanskih prepelica, nakon tretmana CPF, pokazana je povećana koncentracija MDA i NO u plazmi, tkivu jetre i mozga (Miladinović, 2019). Takođe, Raibeemol i Chitra (2018) su pokazali da CPF dovodi do povećanja produkcije NO u tkivima riba (bubrezima, jetri i slezini). Efekti IMI na proizvodnju NO mogu zavisiti od NADPH ili od interakcija radikala kiseonika sa NOS. Povećana koncentracija Ca²⁺ u plazmi može stimulisati aktivnost NOS zavisnu od kalcijum/kalmodulina (nNOS), što dovodi do stvaranja NO (Duzguner i Erdogan, 2012).

Oksidativni stres često je uzrok muškog infertiliteta (Takeshima i sar., 2021). U ovom istraživanju pokazana je povećana koncentracija LPO i NO₂⁻ u testisima pacova koji su dobijali samo CPF u odnosu na kontrolu (Tabele 17 i 18, Grafici 9 i 10), što ukazuje na veće prooksidativno delovanje CPF. Tkivo testisa je osetljivo na oksidativni stres usled velike količine PUFAs, koje su neophodne za normalan proces spermatogeneze i aktivnost Lejdigovih ćelija, a njihova prekomerna proizvodnja može da poveća oksidativni stres (Bal i sar., 2012). Smatra se da je oksidativni stres u korelaciji sa povećanim kapacitetom za sintezu PUFAs (Gutteridge i sar., 1998). Povećana produkcija slobodnih radikala, kao i lipidna peroksidacija mogu da naruše lipidnu strukturu i oštete integritet membrane spermatozoida i dovedu do gubitka pokretljivosti i disfunkcije spermatozoida (Saber i sar., 2021). Povišen nivo LPO može da uzrokuje smanjenu sintezu androgena u testisima. Visok nivo kortikosterona, koji je nastao u toku oksidativnog stresa, može da dovede do smanjene sinteze testosterona, jer ovaj steroidni hormon ima sposobnost indukcije apoptoze Lejdigovih ćelija (Bal i sar., 2012). U studiji Adedara i sar. (2018) CPF je takođe izazvao lipidnu peroksidaciju u testisima pacova, što je u skladu sa rezultatima dobijenim u ovom istraživanju. U studiji Alaa-Eldin sar. (2017) pokazano je da je CPF izazvao patološke promene testisa poput nekroze, degeneracije i smanjenja broja spermatogenih ćelija u seminiferim tubulima. Ove promene su nastale kao posledica efekta CPF, koji indukuje oksidativni stres i oštećenja reproduktivnog sistema. Organofosforni insekticidi mogu da prođu barijeru između krvi i testisa, nakon čega izazivaju oksidativni stres i peroksidaciju lipida, koja oštećuje biološke membrane testisa i može izazvati degeneraciju spermatogenih i Lejdigovih ćelija, što remeti spermatogenezu i smanjuje broj spermatozoida (Uzun i sar., 2009). U ovom istraživanju IMI nije izazvao povećanje MDA u testisima pacova, ali, sa druge strane, Saber i sar. (2021) su u testisima pacova tretiranih sa IMI izmerili povećanu koncentraciju MDA. Razlika u rezultatima najverovatnije proizlazi iz doza i vremenskog perioda tretiranja, s obzirom da su u eksperimentu Saber i sar. (2021) pacovi tretirani svakoga dana dozom od 22,5 mg/kg IMI u toku 56 dana, što je bio duži period u odnosu na istraživanje ove doktorske disertacije.

Ekstrakt lista imele u primenjenim koncentracijama u kotretmanima sa CPF ili IMI u ovoj studiji doveo je do delimičnog smanjenja koncentracije LPO, ROS i RNS u jetri pacova u poređenju sa jedinkama koje su dobijale samo insecticide, dok su u bubregu i testisu zabeležene vrednosti približne kontrolnoj grupi. Dobijeni rezultati pokazuju da prisutni flavonoidi u ekstraktu lista imele inhibiraju lipidnu peroksidaciju i ukazuju na antioksidativne efekte i aktivnosti koje se zasnivaju na različitim mehanizmima "hvatanja" i deaktivacije slobodnih radikala, koji su pokazani u *in vitro* analizama u odnosu na standarde - galnu i askorbinsku kiselin, BHT i α -tokoferol (Tabela 3). Takođe, jedan od mehanizama u zaštiti od oksidacije membrane je i međusobna interakcija polifenola i lipidnog dvosloja. Antioksidativna aktivnost polifenola je posledica njihovih redoks svojstava, koja im omogućavaju da u interakciji sa slobodnim radikalima inhibiraju proces lipidne peroksidacije (Oteiza i sar., 2005).

Jimoh i sar. (2021) su davali zečevima suplement listova imele i proučavali efekte na reproduktivni potencijal i zaključili da suplement imele povećava antioksidativni profil sperme i smanjuje lipidnu peroksidaciju. *In vitro* i *in vivo* studije su pokazale da ekstrakti imele poseduju snažan antioksidativan kapacitet i mogu da inhibiraju stvaranje LPO (Avcı i sar., 2006; Sengul i sar., 2009). Studija Kim i sar. (2010) je pokazala da lektin izolovan iz *Viscum album* uklanja slobodne radikale, smanjuje oksidativni stres i inhibira lipidnu peroksidaciju *in vitro*. Rezultati brojnih naučnih studija su pokazali da polifenolna jedinjenja koja su prisutna u ispitivanom ekstraktu imele, kao što su rutin, kempferol, kvercetin i apigenin, kao i drugi polifenoli, imaju značajan potencijal kao antioksidativni agensi (Vicaş i sar., 2011; Enogieru i sar., 2018; Xu i sar., 2019; Stefanucci i sar., 2020; Majeed i sar., 2021).

Biljke su razvile metode za zaustavljanje oštećenja prouzrokovana slobodnim radikalima. Sekundarni metaboliti flavonoidi imaju polifenolnu strukturu koja sadrži brojne dvostruke veze i hidroksilne grupe, koje otpuštaju elektrone i mogu da stabilizuju slobodne radikale (Bentz, 2009). Flavonoidi su amfipatični molekuli koji su u stanju da prodru u lipidni dvosloj membrane i da spreče oksidativna oštećenja, pružajući na taj način zaštitu (Ye i sar., 2020). U biološkim membranama i u modelima membrana, interakcija između flavonoida i lipidnog dvosloja dovodi do vezivanja za lipidni dvosloj ili uključivanje u unutrašnjost dvosloja, pri čemu je različita lokacija ili distribucija ovih molekula određena njihovim hemijskim karakteristikama. Smatra se da se flavonoidi mogu koncentrisati blizu površine membrane kako bi uklanjali slobodne radikale kiseonika (Demir i sar., 2011). Flavonoidi poput rutina i kvercetina, kojima je ekstrakt bogat, su snažni “skevendžer” antioksidanti - “hvataju” slobodne radikale i imaju sposobnost da pruže zaštitu od lipidne peroksidacije membrana (Abarikwu i sar., 2017a; Gelen i sar., 2017).

Kvercetin sprečava oksidativno oštećenje i ćelijsku smrt pomoću nekoliko mehanizama, kao što su: uklanjanje slobodnih radikala, “gašenje” singlet kiseonika i sprečavanje peroksidacije lipida (Hassan i sar., 2019). Struktura kvercetina igra važnu ulogu u njegovom antioksidativnom dejstvu. Uočeno je da mu O-dihidroksi struktura u B-prstenu daje veću stabilnost flavonoid radikalima i da učestvuje u elektronskoj delokalizaciji (Padma i sar., 2012). Antioksidativna efikasnost kvercetina može se pripisati i velikoj brzini difuzije kroz membranu, što mu omogućava da uklanja oksiradikale na nekoliko mesta kroz dvosloj membrane (Ben Abdallah i sar., 2013). Kada kvercetin reaguje sa slobodnim radikalom, on donira proton i sam postaje radikal, ali nastali nespareni elektron je delokalizovan, što čini radikal kvercetina slabo reaktivnim (Bentz, 2009). Takođe, sugerise se da kvercetin deluje kao antioksidant tako što inhibira oksidativne enzime poput ksantin oksidaze, lipooksigenaze i NADPH oksidaze. Inhibicija ovih enzima je takođe odgovorna za slabljenje oksidativnog stresa, s obzirom na to da oni imaju ključnu ulogu u početnom procesu oštećenja ćelija izazvanih slobodnim radikalima. Pokazano je da i metaboliti kvercetina mogu inhibirati oksidaciju posredovanu peroksinitritom, slično slobodnom kvercetinu (Yousef i sar., 2010).

Literaturni podaci pokazuju da je rutin, kao najzastupljenije bioaktivno jedinjenje ispitivanog ekstrakta, ispoljio zaštitne efekte kod reproduktivne toksičnosti izazvane različitim toksikantima, zahvaljujući inhibitornim efektima protiv stvaranja reaktivnih vrsta i peroksidacije membrane (Abarikwu i sar., 2017b; Jahan i sar., 2018). Smatra se da rutin uklanja superoksid radikale i da ima sposobnost heliranja jona metala kao što su katjoni gvožđa, koji su uključeni u Fentonovu reakciju, u kojoj se generišu reaktivne vrste. Rutin sprečava peroksidaciju lipida tako što formira inertni kompleks gvožđa, koji nije u stanju da pokrene peroksidaciju lipida (Nafees i sar., 2015; Qu i sar., 2018). Rutin ima sposobnost da potisne procese slobodnih radikala u tri faze: formiranje superoksid anjona, stvaranje hidroksil radikala u Fentonovoj reakciji i formiranje lipidnog peroksi radikala (Qu i sar., 2018). U studiji Zhou i

sar. (2016) pokazano je da je rutin efikasno zaštitio ćelijsku liniju HLEC od oksidativnog stresa izazvanog H₂O₂ i apoptoze. Ova njegova sposobnost uključuje mehanizme vezane za regulaciju proizvodnje ROS, inhibiciju peroksidacije lipida, zaštitu intracelularnog antioksidativnog sistema i njegovu modulaciju kroz Bcl-2/Bax i NF-κB/p65 signalne puteve.

Flavonoid kempferol, zastupljen u ekstraktu u značajnoj količini, doveo je u studiji Tsai i sar. (2018) do smanjenja nivoa lipidne peroksidacije u jetri izazvane paracetamolom kod miševa. To se može pripisati njegovoj odličnoj antioksidativnoj aktivnosti i neutralizaciji reaktivnih vrsta, smanjujući ekspresiju CYP2E1, a povećavajući ekspresiju UGT1A1 i inaktivirajući RIP1, JNK i ERK signalne puteve, čime je blokirana amplifikacija oksidativnog stresa. Takođe, kempferol može da inhibira aktivnost enzima koji produkuju ROS, kao što je ksantin oksidaza (Calderón-Montaño i sar., 2011).

5.3.5. Parametri antioksidativne zaštite

Organizam u fiziološkim uslovima raspolaže sa nekoliko mehanizama antioksidativne zaštite, koji štite ćelije od oksidativnog stresa i oksidativnih oštećenja izazvanim slobodnim radikalima. Sistem antioksidativne zaštite (AOS) obuhvata primarnu i sekundarnu zaštitu i efikasno snižava nivo ROS i RNS do fiziološkog nivoa, koji ne mogu da ugroze funkciju ćelije i izazovu oksidativni stres. Primarnu antioksidativnu zaštitu čine neenzimski antioksidanti i grupa enzima AOS. Antioksidant je svaka supstanca koja odlaže, sprečava ili uklanja oksidativno oštećenje ciljnog molekula (Halliwell, 2007). Valko i sar. (2005) dali su definiciju po kojoj je antioksidant svaka supstanca sposobna da spreči oksidaciju. Utvrđeno je da mnoga jedinjenja poseduju antioksidativnu aktivnost, a svako od ovih jedinjenja ima specifične aktivnosti i često deluju sinergistički kako bi se poboljšao ukupni antioksidativni kapacitet organizma (Uchendu i sar., 2012).

Pokazano je da insekticidi CPF i IMI utiču na aktivnost brojnih enzima, na receptore i druge fiziološki važne proteine, ali dovode i do nastanka oksidativnog stresa i oksidativnih oštećenja u mnogim tkivima (Tanvir i sar, 2016; Costa, 2018; Khalaf i El-Mansy, 2019; Li i sar., 2019). U istraživanjima ove disertacije u *in vivo* eksperimentima posmatrani su efekti oštećenja jetre, bubrega i testisa nakon subakutnog tretmana insekticidima CPF i IMI, kao i antioksidativni potencijal ekstrakta lista imele. Određivani su biomarkeri oksidativnog stresa, koji u reakcijama sa reaktivnim vrstama menjaju endogeni nivo AOS i ukazuju na promene redoks ravnoteže u tkivima. Ispitivani parametri sistema antioksidativne zaštite u odabranim tkivima su neenzimski antioksidanti GSH i vitamin C, kao i enzimi SOD, CAT, GSH-Px, GR i GST.

Neenzimske komponente antioksidativnog sistema čine prvenstveno tioli, GSH, vitamini C i E, mokraćna kiselina, ceruloplazmin, β-karoten i ubihinon (Uchendu i sar., 2012). GSH deluje kao multifunkcionalni intracelularni neenzimski antioksidant i štiti ćelije od reaktivnih vrsta kiseonika (Djeffal i sar., 2015). Tokom metaboličkog delovanja GSH, veoma je važno održavanje optimalnog fiziološkog odnosa GSH/GSSG. GSH je važan biomarker oksidativnog stresa, i ima višestruku ulogu: kao kofaktor za enzim GSH-Px uklanja H₂O₂ i hidroperokside, kao supstrat za GST omogućava detoksikaciju mnogih ksenobiotika ili njihovih metabolita u jetri, kao donor elektrona ima ulogu u regeneraciji vitamina C i E, kao i ulogu u održavanju intracelularne redoks ravnoteže u ćelijama sisara. Nivo GSH se smanjuje u uslovima oksidativnog stresa, kao i odnos GSH/GSSG, dok se povećava GSSG (Ojha i Srivastava, 2012; Nasr i sar., 2016). GSH, zbog prisustva tiolne grupe (-SH) u molekulu i reverzibilne oksidacije, ima sposobnost zaštite drugih tiolnih grupa u proteinima od oksidativnog oštećenja. Takođe, GSH je uključen i u regulaciju permeabilnosti unutrašnje membrane mitohondrija i funkcije enzima (Katanić i sar., 2017). GSH i drugi proteini koji

sadrže tiol imaju ključnu ulogu u ćelijskoj odbrani od toksičnog delovanja pesticida (Djeffal i sar., 2015). GSH se većim delom sintetiše u jetri, odakle se transportuje do bubrega krvotokom. Bubrezi su glavni organi koji preuzimaju GSH iz krvi (oko 80%) (Kuang i sar., 2017). Smanjenje GSH može biti izazvano posredstvom tri mehanizma: oksidacijom reaktivnim vrstama; konjugacijom sa proteinima ili elektrofilima, i ekstruzijom kroz ćelijsku membranu. U ovakvim uslovima, ćeliji je potrebna dopuna GSH sintezom “*de novo*” ili katabolizmom (Salyha i Salyha, 2018).

Dobijeni rezultati pokazuju da je tretman insekticidom CPF ili IMI doveo do najveće redukcije nivoa GSH u jetri, a povećao nivo GSSG u odnosu na kontrolu (Tabele 19-21, Grafici 11-13). Samo nakon kotretmana sa većom dozom ekstrakta lista imele (CPF+VAE1 i IMI+VAE1), povećan je nivo GSH u jetri u poređenju sa grupama koje su dobijale samo CPF ili IMI, ali ove vrednosti su bile manje od fizioloških vrednosti u kontrolnoj grupi. Ove promene ukazuju na oksidativna oštećenja u jetri kao glavni razlog toksičnih efekata insekticida, a praćena su i povećanom produkcijom slobodnih radikala i lipidne peroksidacije, kao i povećanom aktivnosti enzima transaminaza ALT i AST u serumu. Takođe, ovo smanjenje nivoa GSH je i zbog nastanka konjugata GSH koji omogućavaju ekskreciju CPF i IMI i njihovih metabolita, kao i detoksikaciju reaktivnih vrsta koje nastaju nakon izlaganja insekticidima. Pokazano je da smanjenje nivoa GSH intenzivira lipidnu peroksidaciju i uzrokuje veće oksidativno oštećenje ćelija (Abdel-Razik i sar., 2021). Ovi rezultati su u saglasnosti sa drugim literaturnim podacima u kojima je pokazano da je nakon izlaganja CPF nivo GSH smanjen zbog konjugacije reaktivnih metabolita CPF sa GSH tokom II faze metabolizma (Mekonnen i sar., 2019), kao i zbog povećanih nivoa biomarkera oksidativnog stresa (El-Sayed i sar., 2018). U bubregu je nakon tretmana CPF neznatno smanjen nivo GSH, a povećan nivo GSSG, dok je kotretman sa ekstraktom lista imele vratio koncentraciju GSH na fiziološki nivo.

Vitamin C (askorbinska kiselina) je hidrosolubilni antioksidant, ima brojne biološke funkcije i uključen je u prvu liniju antioksidativne odbrane. Za čoveka vitamin C je esencijalni nutrijent, ne može da se sintetiše već se uzima putem hrane. Neke vrste sisara kao što je pacov, mogu da sintetišu vitamin C, a sinteza se odvija isključivo u hepatocitima, i zatim prenosi do drugih ćelija i organa preko specifičnih transportera (Mardones i sar., 2012). Vitamin C reaguje sa produktima lipidne peroksidacije i poseduje sposobnost u “hvatanju” slobodnih radikala i zaštiti membrana od peroksidativnih oštećenja (Pehlivan, 2017). Smatra se da je glavna razlika u direktnom “hvatanju” slobodnih radikala između vitamina C i GSH u njihovoj reaktivnosti sa $O_2^{\cdot-}$, za koju je ustanovljeno da je preko 100 puta viša za vitamin C u odnosu na GSH (Zhitkovich, 2020). Vitamin C antioksidativno delovanje ostvaruje i u reakciji sa drugim antioksidantima kao što su GSH, vitamin E i koenzim Q (Sminorff i Wheeler, 2000; Pehlivan, 2017). Naša ranija istraživanja su pokazala da se suplementacija vitamina C i Se pokazala kao efikasna kod fenitroionom uzrokovanog oštećenja jetre (Milošević i sar., 2018).

Rezultati u ovoj doktorskoj disertaciji (Tabela 22 i Grafik 14) pokazuju da su grupe koje su dobijale samo CPF ili IMI imale povećanu koncentraciju vitamina C u jetri i u testisu. Ekstrakt lista imele u kotretmanu sa insekticidima nije značajno promenio koncentracije vitamina C u jetri i u testisu u poređenju sa grupama koje su dobijale samo CPF ili IMI, ali ove vrednosti su bile povećane u odnosu na fiziološke vrednosti u kontrolnoj grupi. Za ovo povećanje koncentracije vitamina C postoji nekoliko mogućih objašnjenja, a to su: aktivan transport i distribucija vitamina C u tkivima, povećana potreba za ovim vitaminom i povećana biosinteza u cilju zaštite od oksidativnog stresa (Zloch i Ginter, 1995). Povećana koncentracija vitamina C zabeležena je u bubrezima i jetri u prethodnim studijama (Jurczuk i sar., 2007; Spodniewska i Zasadowski, 2008).

Organizmi u uslovima stresa koriste antioksidativne enzime da se prilagode stresu okoline, a njihove izmenjene aktivnosti zavise od doze, vrste i načina izlaganja toksikantu (Raibeemol i Chitra, 2018). Kada egzogeni polutanti uđu u organizam, oni dovode do niza toksičnih efekata, kao i do stvaranja velikih količina ROS i oksidativnih oštećenja, a enzimi antioksidativnog sistema zaštite (poput SOD i CAT u prvoj liniji odbrane) se aktiviraju da eliminišu prekomernu količinu radikala kako bi se umanjili štetni efekti. U slučajevima kada unutrašnji nivo polutanata raste usled kontinuiranog perioda izlaganja, slobodni radikali koji se stvaraju u povećanim količinama ne mogu biti u potpunosti neutralisani, pa je samim tim ravnoteža ROS narušena, pri čemu se kao posledica javlja citotoksičnost, a odražava se u smanjenoj, ili ponekad inhibiranoj, aktivnosti enzima antioksidativne zaštite (Ge i sar., 2015).

U ovoj doktorskoj disertaciji rezultati pokazuju da je tretman subletalnom dozom insekticida CPF ili IMI doveo do promena aktivnosti enzima antioksidativnog zaštitnog sistema. U ispitivanim tkivima jetri, bubregu i testisu aktivnost SOD je bila značajno povećana u grupama koje su tretirane insekticidom CPF ili IMI u odnosu na kontrolu (Tabela 23 i Grafik 15). Aktivnosti enzima CAT značajno su povećane u jetri, bubregu i testisu pacova nakon tretmana IMI u odnosu na kontrolu. U jetri grupe koja je tretirana CPF aktivnost CAT je bila inhibirana, dok je u bubregu bila povišena, kada se ove vrednosti uporede sa kontrolnim (Tabela 24 i Grafik 16). Povećanje aktivnosti enzima SOD i CAT može biti posledica uklanjanja slobodnih radikala ($O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2) i može se odnositi na povišen oksidativni stres u tkivima nakon tretmana insekticidom CPF ili IMI. SOD i CAT su veoma važni enzimi antioksidativnog sistema koji štite od toksičnih efekata metabolizma kiseonika, pri čemu SOD katalizuje konverziju $O_2^{\cdot-}$ do H_2O_2 , koga potom CAT prevodi u vodu. S tim u vezi, ovi antioksidativni enzimi mogu da ublaže oksidativna oštećenja i toksične efekte reaktivnih vrsta (Nasr i sar., 2016). Povećana aktivnost ova dva enzima, usled prekomerne proizvodnje reaktivnih vrsta, u skladu je sa rezultatima prethodnih *in vivo* i *in vitro* studija sa insekticidima (Kalender sar., 2012; Ince i sar., 2017; Baysal i Atlı-Eklioğlu, 2021).

EL-Gendy i sar. (2010) su zabeležili povećane aktivnosti SOD i CAT u jetri miševa tretiranih sa IMI, koje ukazuju na povećanu produkciju ROS i oksidativna oštećenja. I kod akvatičnih organizama detektovana je povećana aktivnost CAT u hepatopankreasu (Ge i sar., 2015; Butcherine i sar., 2022). I u drugim studijama je pokazano da insekticidi mogu da dovedu do povećanja aktivnosti SOD i CAT, zajedno sa povećanom koncentracijom LPO, koja ukazuje na povećano stvaranje reaktivnih vrsta i oksidativna oštećenja u različitim tkivima (Kopjar i sar., 2018; Miladinović, 2019; Aljadani i sar., 2020).

Brojne studije su pokazale inhibitorni efekat insekticida na aktivnost enzima SOD i CAT. Različite vrednosti ovih enzima mogu biti posledica razlika u dužini trajanja tretmana, načinu doziranja i koncentraciji insekticida. Saber i sar. (2021) su pokazali smanjenu aktivnost SOD i CAT u testisima kod pacova tretiranih oralno svakoga dana insekticidom IMI (22,5 mg/kg/danu) u studiji koja je trajala 56 dana. Takođe, Mohamed i sar. (2018) su zabeležili pad aktivnosti SOD i CAT kod pacova tretiranih subkutano CPF (18 mg/kg/danu) u periodu od 14 dana.

GSH-Px je opšti naziv porodice enzima sa peroksidaznom aktivnošću, čija je glavna biološka uloga da zaštiti ćelije od oksidativnog oštećenja (Ashour i sar., 2017). Biološka funkcija enzima GSH-Px je da redukuje H_2O_2 i lipidne hidroperoksidi u tkivima koristeći GSH kao esencijalni supstrat (Kalender i sar., 2012). Dobijeni rezultati pokazuju da je aktivnost GSH-Px u grupi koja je dobijala CPF bila značajno niža u jetri, dok je u bubregu i testisu povećana. U grupi koja je dobijala IMI aktivnost ovog enzima je značajno povećana u jetri i u bubregu u poređenju sa kontrolnim vrednostima (Tabela 25 i Grafik 17). Ovi rezultati su u skladu sa prethodnim studijama (EL-Gendy i sar., 2010; Uzun i Kalender, 2013; Hou i sar.,

2014). Razlike u aktivnosti GSH-Px u jetri i bubregu pacova tretiranih CPF možda potiču od metaboličkih razlika između ova dva organa, što dovodi do različitih antioksidativnih kapaciteta. Na aktivnost GSH-Px mogu uticati i nivoi GSH. Postepeno smanjivanje aktivnosti GSH-Px u jetri pacova koji su dobijali CPF može biti posledica iscrpljivanja raspoloživog GSH, koji je potreban za smanjenje štetnog uticaja ROS i akumulacije produkata lipidne peroksidacije (Salyha i Salyha, 2018; Yonar, 2018). U studiji Selmi i sar. (2018), kod miševa tretiranih organofosfatom malationom, pored inhibicije aktivnosti enzima GSH-Px zapažena je i smanjena genska ekspresija GPx-4 u jetri, što ukazuje na poremećaj redoks ravnoteže.

GR ima važnu ulogu u antioksidativnoj zaštiti i omogućava ćeliji da održi odgovarajući nivo GSH. Ovaj enzim katalizuje konverziju oksidovanog glutationa nazad u redukovani oblik, odražava fiziološke potrebe ćelije i koristi se kao biomarker kod životinja pod oksidativnim stresom (Ullah i sar., 2018). Rezultati u ovom istraživanju pokazuju da je u jetri pacova tretiranih CPF aktivnost GR inhibirana, dok je u grupi koja je dobijala IMI došlo do indukcije aktivnosti ovog enzima. U bubregu se zapaža povećanje aktivnosti GR u grupi koja je tretirana CPF u odnosu na kontrolu, a u testisu nema značajnih promena aktivnosti GR u svim tretiranim grupama (Tabela 26 i Grafik 18). Velika razlika u aktivnosti GR u jetri između grupa CPF i IMI mogla bi se pripisati različitom delovanju insekticida na ovo tkivo. Povećani nivoi GR u jetri životinja koje su dobijale IMI verovatno predstavljaju ćelijski adaptivni odgovor koji služi za zaštitu ćelija od oksidativnog stresa. Smanjena aktivnost GR u jetri životinja koje su dobijale CPF može biti posledica smanjenja sadržaja NADP i NADPH uzrokovanog malfunkcijom mitohondrija, koje su istovremeno mesto formiranja i meta hidroksilnog radikala – najreaktivnijeg proizvoda konverzije H_2O_2 (Salyha i Salyha, 2018). U renalnom tkivu pacova tretiranih organofosfatom aktivnost GR takođe je bila povišena (Sharma i Sangha, 2014), što korelira sa rezultatima ove doktorske disertacije.

Kao glavni enzim faze II biotransformacije, GST igra ključnu ulogu u sistemu detoksikacije i metabolizma ksenobiotika, stimuliše kombinaciju elektrofilnog metabolita i glutationa, što može poboljšati njegovu hidrofobnost i dovesti do lakše ekskrecije (Sharma i Sangha, 2014; Yan i sar., 2015). Pored toga, GST može prekinuti autokatalitički lanac peroksidacije lipida smanjenjem hidroperoksida, koji propagiraju lančane reakcije lipidne peroksidacije. Podgrupa GST izoenzima sa preferencijom za nezasićene karbonile (npr. 4-HNE i akrolein) može efikasno detoksikovati ove toksične krajnje proizvode peroksidacije lipida. Dakle, enzim GST ne samo da dopunjuje GSH-Px u smanjenju peroksidacije lipida neutralizacijom H_2O_2 , već i štiti ćelije od toksičnih krajnjih produkata lipidne peroksidacije (Vieira i sar., 2018). Takođe, GST direktno inaktivira ROS preko -SH grupa. Aktivnost GST je obično povećana zbog metabolizma pesticida i drugih ksenobiotika (Yan i sar., 2015). GST deluje tako što brzo metabolise insekticide u netoksične produkte (Sharma i Sangha, 2014).

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je aktivnost GST značajno povećana u jetri i bubregu u grupama koje su dobijale CPF ili IMI u odnosu na kontrolu, dok je u testisu značajno povećanje aktivnosti GST zabeleženo samo kod jedinki koje su dobijale CPF (Tabela 27 i Grafik 19). Ovo povećanje aktivnosti enzima GST u korelaciji je sa smanjenjem nivoa GSH, kao i njegove uloge u konjugaciji metabolita CPF sa redukovanim GSH, pri čemu se formiraju hidrosolubilna jedinjenja koja se lako izlučuju iz organizma (Ahmed i Nasr, 2015; Tsai i Lein, 2021; Rezende-Teixeira i sar., 2022). Povećanje aktivnosti GST nakon tretmana sa IMI je najverovatnije posledica indukovano procesa detoksikacije putem kombinacije intracelularnog GSH i štetnih metabolita, poput produkata lipidne peroksidacije i oksidativne degradacije DNK. Takođe, povećana produkcija ROS izazvana insekticidom IMI može biti uzrok aktivacije GST (Ge i sar., 2015). Povećanje aktivnosti GST zabeleženo je i u istraživanju Miladinović (2019) u plazmi, jetri i mozgu japanskih prepelica koje su tretirane insekticidom CPF. EL-Gendy i sar. (2010) su takođe pokazali povećanje aktivnosti GST u jetri miševa nakon

tretmana sa IMI. Indukovana aktivnost GST može odražavati ulogu ovog enzima u zaštiti od toksičnosti peroksidacije lipida izazvanom ksenobiotičima (Yonar, 2018). Poliserpi i sar. (2021) detektovali su kod ptica smanjenje aktivnosti GST u plazmi, jetri, mozgu i mišićima. Kod životinja koje su pod hemijski indukovanim stresom moguća je i povećana i smanjena aktivnost GST u zavisnosti od hemijskog jedinjenja, doze i vremenskog perioda izlaganja.

U fiziološkim uslovima za održavanje homeostaze ćelija neophodno je da postoji odgovarajuća ravnoteža u aktivnostima enzima i nivoima intracelularnih neenzimskih komponenti antioksidativnog sistema i produkcije reaktivnih vrsta kiseonika (Kashyap i sar., 2018). Mnoga istraživanja su usmerena na sintezu veštačkih antioksidanata, kao i na izolovanje prirodnih antioksidanata iz delova različitih biljnih vrsta. Ispitivanje farmakološkog delovanja i antioksidativnog potencijala biljnih ekstrakata zavisi i od rastvarača i od izbora tipa ekstrakcije, a primarni cilj je njihova primena kao potencijalnih prirodnih nutraceutika (Mašković i sar., 2018; Veličković, 2021). Biljni ekstrakti su bogati polifenolnim jedinjenjima, koja stupaju u međusobne interakcije i imaju dominantnu ulogu pri antioksidativnom delovanju. Preporučuje se povećanje unosa antioksidanata u zdravoj ishrani koji pomažu u održavanju oksidativno/antioksidativnog statusa, kao i u prevenciji i terapiji mnogih bolesti (Szurpnicka i sar., 2020).

U ovoj doktorskoj disertaciji, da bi se ispitao fitohemijski profil ekstrakta lista bele imele *Viscum album* L., kao i antioksidativni kapacitet ispitivanog ekstrakta, primenjeni su *in vitro* testovi koji su zasnovani na inhibiciji lipidne peroksidacije, na „hvatanju“ i deaktivaciji slobodnih radikala (Tabele 2, 3 i 5 i Slika 25). Rezultati u *in vivo* eksperimentima pokazuju da polifenolna jedinjenja u ekstraktu lista imele imaju protektivne efekte i smanjuju oksidativni stres i oksidativna oštećenja u tkivima, koja su uzrokovana subakutnim tretmanom CPF i IMI. Takođe, nakon kotretmana ekstrakta lista imele sa CPF ili IMI pokazano je da polifenolna jedinjenja utiču i na nivo endogenih antioksidanata i aktivnost mnogih enzima AOS.

Ekstrakt imele je u kotretmanima sa insekticidima CPF ili IMI doveo do dozno-zavisnog smanjenja, odnosno stabilizacije aktivnosti SOD u jetri, pri čemu je veća doza imele ispoljila bolji efekat. U bubregu je ekstrakt imele u kotretmanu doveo do značajnog smanjenja aktivnosti SOD u odnosu na grupe koje su dobijale samo CPF ili IMI, vraćajući ih na vrednosti kontrolne grupe. U testisu su kotretmani imele i insekticida IMI doveli do smanjenja povišenih aktivnosti SOD, dok kod grupa koje su dobijale CPF i ekstrakt imele nije došlo do značajnih promena u aktivnosti SOD (Tabela 23 i Grafik 15).

Aktivnost CAT u jetri je značajno povećana nakon kotretmana ekstrakta lista imele (obe doze) i CPF u poređenju sa grupom koja je dobijala samo CPF, za razliku od IMI pacova, kod kojih je samo veća doza ispoljila značajan efekat. Ekstrakt imele je u kotretmanima sa CPF ili IMI doveo do značajnog smanjenja aktivnosti CAT u bubregu (koje su bile dozno-zavisne), u odnosu na grupe koje su dobijale samo insekticide. U testisu se ne zapažaju značajne promene aktivnosti ovog enzima u grupama koje su dobijale insekticid CPF ili IMI i ekstrakt u većoj ili manjoj dozi (Tabela 24 i Grafik 16).

Nema dovoljno literaturnih podataka koji se odnose na izučavanje antioksidativnog potencijala ekstrakta imele u *in vivo* studijama. S obzirom na njegovu složenu strukturu, i mnoštvo fenolnih jedinjenja sa visokom antioksidativnom aktivnošću, njegovi efekti mogu da se objasne na osnovu efekata pojedinačnih komponenti, za koje je potvrđeno antioksidativno delovanje. Od polifenolnih jedinjenja koja su najviše zastupljena u ispitivanom ekstraktu imele, pored rutina i kempferola, značajni su i kvercetin i apigenin.

Flavonoidi su moćni antioksidanti i poznato je da moduliraju aktivnosti različitih enzima zbog njihove interakcije sa brojnim biomolekulima (de David i sar., 2011). Kvercetin

je jedan od najefikasnijih antioksidanata među flavonoidima. Antioksidativni karakter kvercetina povezan je sa njegovom hemijskom strukturom, posebno sa prisustvom i pozicijom hidroksil (-OH) grupe i B prstena kateholnog tipa. Strukturna svojstva kvercetina i njegov snažni antioksidativni kapacitet su posledica prisustva: 1) orto-dihidroksi ili kateholne grupe u B-prstenu, 2) $C_2=C_3$ -dvostruke veze i 3) supstitucije hidroksilne grupe na pozicijama 3 i 5 (Ozgen i sar., 2016). Pored toga, kvercetin se smatra moćnim antioksidantom zbog svoje sposobnosti da interaguje i prodre kroz lipidni dvosloj, da helira jone metala, da „hvata“ i neutrališe slobodne radikale, kao i da inhibira lipidnu peroksidaciju (Ben Abdallah i sar., 2013). Rezultati ove disertacije potvrđuju prethodne studije, u kojima je pokazano da kvercetin može da modulira aktivnost antioksidativnih enzima u različitim tkivima (de David i sar., 2011; Yousef i sar., 2010; Uzun i Kalender, 2013).

Značajan udeo u ekstraktu lista imele zauzima apigenin, flavonoid za koga je poznato da poseduje razne biološke efekte zahvaljujući hemoprotektivnim i antioksidativnim svojstvima. Sposobnost apigenina da poboljša antioksidativni zaštitni sistem može se objasniti sledećim mehanizmima: 1) sam apigenin uklanja slobodne radikale zbog prisustva -OH grupa na 4, 5. i 7. poziciji njegove strukture, i 2) apigenin takođe deluje tako što povećava aktivnost enzima AOS. Antioksidativno svojstvo koje poseduje apigenin pripisuje mu se zbog prisustva dvostruke veze ($C_2=C_3$) između atoma ugljenika u C prstenu. Takođe, i B prsten apigenina poseduje -OH grupu na 4. poziciji koja doprinosi antioksidativnom efektu (Ahmad i sar., 2019b). Pored toga, apigenin se smatra aktivatorom pregnan X receptora (PXR), čija ekspresija je povezana sa čišćenjem toksičnih supstanci iz organizma (Tsaroucha i sar., 2016). Sposobnost apigenina da normalizuje aktivnosti enzima SOD i CAT pokazana je u nedavnim istraživanjima (Telange i sar., 2017; Wu i sar., 2021).

Ekstrakt imele je uticao i na enzime glutation ciklusa (GSH-Px, GR i GST). Aktivnost GSH-Px u jetri je značajno povećana nakon kotretmana ekstrakta lista imele i CPF u poređenju sa grupom koja je dobijala samo CPF, dok su kotretmani ekstrakta imele i IMI doveli do smanjenja povišenih aktivnosti GSH-Px u poređenju sa grupom koja je dobijala samo IMI, pri čemu su veće doze pokazale bolji efekat. U bubregu su kotretmani ekstrakta imele i insekticida CPF ili IMI doveli do smanjenja povišenih aktivnosti GSH-Px. U testisu je aktivnost GSH-Px značajno smanjena nakon kotretmana ekstrakta lista imele (obe doze) i CPF u poređenju sa grupom koja je dobijala samo CPF, dok je kotretman manje doze ekstrakta imele i IMI (IMI+VAE2) doveo do povećanja aktivnosti GSH-Px u poređenju sa kontrolom i grupom koja je dobijala samo IMI (Tabela 25 i Grafik 17).

Aktivnost GR u jetri je značajno povećana samo nakon kotretmana ekstrakta lista imele (obe doze) i CPF u poređenju sa grupom koja je dobijala samo CPF, dok u grupama koje su pored IMI dobijale ekstrakt nije bilo značajnih promena. U bubregu se zapaža značajno smanjenje i stabilizacija aktivnosti GR u svim grupama koje su pored insekticida CPF i IMI dobijale i ekstrakt imele, dok u testisu nije bilo značajnijih promena u aktivnosti ovog enzima (Tabela 26 i Grafik 18).

U jetri je ekstrakt imele u kotretmanima sa CPF ili IMI doveo do dozno-zavisnog smanjenja aktivnosti GST, pri čemu je veća doza ekstrakta imele ispoljila bolji efekat. Kotretmani ekstrakta imele (obe doze) i insekticida CPF ili IMI su doveli do značajnog smanjenja povišenih aktivnosti GST u bubregu i testisu u poređenju i sa kontrolom i grupama koje su dobijale samo insekticide (Tabela 27 i Grafik 19).

S obzirom na to da u literaturi ne postoji dovoljno podataka o antioksidativnom delovanju imele, efekti koje je ekstrakt ispoljio na aktivnost antioksidativnih enzima mogu se uporediti sa drugim ekstraktima biljaka koji su bogati polifenolnim jedinjenjima. Aktivnosti

GSH-Px i GR u jetri pacova vratile su se skoro na približno kontrolne vrednosti nakon suplementacije ekstrakta lista *Moringa oleifera*, u kome je identifikovano prisustvo flavonoida kempferola i kvercetina (Singh i sar., 2014). Hidroksilne grupe kvercetina i kempferola lako doniraju elektron slobodnim radikalima i efikasno vrše njihovu neutralizaciju. Pored toga, prisustvo hidroksilnih grupa povećava njihov antioksidativni potencijal kroz intermolekulske vodonične veze, što dovodi do obnavljanja antioksidativnog sistema (Singh i sar., 2014). Ekstrakt celera bogat flavonoidima apigeninom, kempferolom i kvercetinom smanjio je aktivnost enzima GSH-Px, koja je bila povećana delovanjem organofosfata dihlorvosa kod pacova, što je u skladu sa istraživanjem ove doktorske disertacije (Cao i sar., 2012). Poznatno je da kvercetin modulira aktivnosti različitih enzima zbog njegovih interakcija sa raznim biomolekulima (Hou i sar., 2014), što može objasniti smanjenje GSH-Px enzima u grupama koje su pored insekticida CPF ili IMI dobijale ekstrakt imele. Kempferol povećava antioksidativni potencijal modulacijom ekspresije hem oksigenaze (HO-1), enzima čija ekspresija povećava otpornost ćelija na oksidativna oštećenja (Sharma i sar., 2021). Rezultati studije Yang i sar. (2013), koji su pokazali da apigenin povećava aktivnost GR u oštećenoj jetri, i samim tim dovodi do biotransformacije oksidovane forme glutationa GSSG u redukovani GSH oblik, u skladu su sa rezultatima ovog istraživanja. Drugim rečima, protektivni efekat apigenina na oštećenja jetre povezan je uglavnom sa povećanjem GSH preko povećanja aktivnosti GR.

Prisutna fenolna jedinjenja u ekstraktu imele, kao što su rutin, kempferol, kvercetin i apigenin, kao i drugi polifenoli, zbog svojih antioksidativnih svojstava, mogu ublažiti oksidativna oštećenja u tkivima. Jetra je glavni organ u ćelijskoj detoksikaciji, a ključnu ulogu ima enzim GST koji katalizuje reakciju konjugacije GSH sa elektrofilnim i hidrofobnim jedinjenjima koja mogu biti endogenog porekla, ali i egzogenog porekla poput različitih ksenobiotika, kancerogena, lekova i pesticida (Alin i sar., 1985; Beutler i Eaton, 1992; Sadi i Sadi, 2010). Takođe, u jetri se odvija i metabolizam flavonoida aktivnošću enzima GST u procesima sulfuracije, metilacije i glukuronidacije koji su zajednički i za metabolizam CPF i za metabolizam IMI (D'Archivio i sar., 2007; Wang i sar., 2018; Nimako i sar., 2021; Tsai i Lein, 2021; Rezende-Teixeira i sar., 2022). Flavonoidi imaju značajnu ulogu i u zaštiti ćelija, a glavni mehanizam je i modifikacija aktivnosti enzima GST, kao glavnog enzima faze II biotransformacije (D'Archivio i sar., 2007). Flavonoidi ispoljavaju i modulatorno delovanje u ćelijama i učestvuju u signalnim putevima preko signalnih kaskada protein kinaza C (PKC), Akt/protein kinaza B (Akt/PKB), tirozin kinaza, MAP kinaza i lipidnih fosfoinozimid 3-kinaza (PI3-kinaza) (Williams i sar., 2004).

Dobijeni rezultati u ovoj disertaciji pokazuju da se zaštitno delovanje ekstrakta lista imele *Viscum album* L. može pripisati raznovrsnim bioaktivnim jedinjenjima, koja ispoljavaju antiinflamatorne, imunomodulatorne, antioksidativne i citoprotektivne efekte. Polifenolna jedinjenja prisutna u ekstraktu lista imele, među kojima su jedinjenja poput flavonoida i hidroksicimetnih kiselina, ispoljavaju i sinergističko delovanje na parametre oksidativno-antioksidativnog statusa u ćelijama odabranih tkiva pacova Wistar soja u uslovima oksidativnog stresa. Zbog širokog spektra biohemijskih i farmakoloških dejstava, posebno treba istaknuti ulogu fenolnih jedinjenja u prevenciji i terapiji mnogih bolesti, zbog čega se ovoj biljci može pripisati važan medicinski značaj.

A decorative border of green leaves and white berries frames the page. The leaves are elongated and pointed, with visible veins. The berries are small, round, and white, clustered together on thin stems. The border is positioned around the top, bottom, and sides of the page, leaving a central white area for the text.

6. ZAKLJUČCI

Prema rezultatima koji su proizašli iz eksperimentalnog dela ove doktorske disertacije, u kojoj su ispitivani potencijalni protektivni efekti ekstrakata biljne vrste *Viscum album* L. (VAE) sa drveta kruške na toksične efekte izazvane subakutnim tretmanom insekticida hlornpirifosa (CPF) i imidakloprida (IMI) *in vitro* i *in vivo*, izvedeni su sledeći zaključci:

1. Primenom hromatografije visokih performansi, kao i spektrofotometrijskih metoda u cilju određivanja antioksidativnog potencijala VAE, ustanovljeno je da je ispitivani ekstrakt bogat polifenolnim jedinjenjima, među kojima su najdominantniji rutin, kempferol, kvercetin i apigenin. Rezultati antioksidativnog kapaciteta praćenjem aktivnosti na nivou DPPH[•] radikala, inhibicije lipidne peroksidacije, OH[•] radikala i ABTS^{•+} radikala pokazali su da VAE raspolaze znatnim antioksidativnim potencijalom.

2. U *in vitro* eksperimentima na MRC-5 ćelijama, korišćenjem MTT eseja za procenu nivoa citotoksičnosti tretmana insekticidima CPF i IMI u kratkotrajnom i dugotrajnom tretmanu u rastućim koncentracijama, pokazalo se da CPF ispoljava veću citotoksičnost u odnosu na IMI.

3. Kotretmani CPF i VAE u izabranim koncentracijama pokazuju da ispitivani ekstrakt u kratkotrajnom tretmanu dovodi do povećanja vijabilnosti pri skoro svim kombinacijama CPF i VAE, dok kod dugotrajnog tretmana kotretmani CPF i VAE dovode do drastičnog pada vijabilnosti MRC-5 ćelija. IMI je u kotretmanu sa VAE u periodu od 24 sata doveo do smanjenja vijabilnosti u kombinacijama nižih i srednjih izabranih koncentracija IMI i VAE, dok se povećanje vijabilnosti zapaža pri kombinaciji najvećih ispitivanih koncentracija IMI i VAE. Kotretmani u trajanju od 72 sata doveli su do smanjenja vijabilnosti kod kombinacije najmanjih koncentracija IMI i VAE, dok se znatna povećanja zapažaju kod ćelija koje su tretirane srednjim i višim koncentracijama IMI i VAE.

4. U *in vivo* eksperimentima, nakon tretmana CPF, pacovi su imali smanjen broj RBC i smanjenu koncentraciju Hb, što ukazuje na anemiju i hemolizu RBC. CPF je doveo i do povećanja WBC. Povećanje broja WBC nastalo je usled aktiviranja imunog sistema kako bi se prevazišao toksični efekat CPF, ali je i posledica oštećenja jetre, kod koje je zabeležena promena u vidu infiltracije leukocita. Sa druge strane, insekticid IMI je doveo do smanjenja broja PLT. Ekstrakt imele je ublažio promene RBC, Hb i WBC, što ukazuje na njegovo hematoprotektivno delovanje.

5. Povećanja koncentracije glukoze delovanjem CPF, a ukupnog holesterola i triglicerida delovanjem CPF ili IMI ukazuju na razvoj metaboličkih poremećaja. Ekstrakt imele je u kotretmanima sa insekticidima doveo do smanjenja navedenih parametara. Dobijeni rezultati potvrđuju da imela ispoljava hipoglikemijske i hipolipidemijske efekte zahvaljujući prisustvu polifenolnih jedinjenja.

6. Biohemijski markeri hepatocelularnog oštećenja (ALT, AST, LDH i ukupni bilirubin) su povećani pod uticajem insekticida CPF i IMI, što je pokazatelj oštećenja hepatocita i narušavanja funkcije jetre. Histopatološka analiza isečaka jetre je potvrdila da su ispitivani insekticidi doveli do ispoljavanja toksičnosti na tkivo jetre. Ekstrakt imele davan životinjama nakon insekticida je ublažio promene ALT i AST na dozno-zavisian način.

7. Povećanje uree i kreatinina konstatovano nakon tretiranja insekticidima CPF ili IMI ukazuje na poremećaj funkcije bubrega. Morfološke promene u tkivu bubrega su bile više izražene kod grupe IMI, što implicira da ovaj insekticid izaziva veću nefrotoksičnost. Ekstrakt imele je doveo do stabilizacije uree u serumu kod jedinki koje su intoksikovane insekticidom CPF, dok je kod jedinki koje su dobijale ekstrakt i IMI zabeleženo smanjenje patomorfoloških promena bubrega.

8. U jetri životinja intoksikovanih insekticidom CPF ili IMI aktivnost enzima AChE je inhibirana, što potvrđuje neurotoksičnost oba ispitivana agensa, dok se u tkivima bubrega i testisa ne zapažaju izraženije promene. Suplementacija ekstraktom imele u obe doze delimično je ublažila promene aktivnosti AChE.

9. Insekticid CPF doveo je do značajnog povećanja koncentracije LPO i koncentracije ROS i RNS ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 i NO_2^-) u ispitivanim tkivima, a najveća promena je zabeležena u jetri životinja tretiranih CPF ili IMI. Suplementacija ekstrakta imele je u određenoj meri ublažila promene navedenih parametara oksidativnog stresa, što se može pripisati sposobnosti deaktivacije slobodnih radikala i inhibicije procesa lipidne peroksidacije.

10. Oba insekticida su dovela do značajnih promena u koncentraciji GSH u jetri, dok u bubregu i testisu nema značajnih promena. Koncentracija vitamina C je značajno povećana u jetri i testisu u IMI grupi, i u jetri u grupi koja je dobijala CPF. Ekstrakt imele nije bitno uticao na koncentracije GSH i vitamina C.

11. Oba insekticida (CPF i IMI) su dovela do promena aktivnosti enzima antioksidativne zaštite (SOD, CAT, GSH-Px, GR i GST) u sva tri ispitivana tkiva. Najveće promene aktivnosti ovih enzima su izmerene u jetri, a najmanje u testisu. Ekstrakt imele je u većoj meri stabilizovao promene u aktivnosti ispitivanih enzima.

OPŠTI ZAKLJUČAK

Sprovedena istraživanja ove doktorske disertacije pokazala su da insekticidi iz dve različite klase, organofosfata – CPF, i neonicotinoidea – IMI, dovode do ispoljavanja citotoksičnih efekata na MRC-5 ćelijsku liniju, pri čemu je izraženije smanjenje vijabilnosti ćelija konstatovano pod uticajem CPF. Nakon *in vivo* subakutnog tretmana mužjaka pacova Wistar albino soja, u krvi CPF grupe životinja zabeležen je trend smanjenja RBC i Hb, što ukazuje na hematotoksičnost ovog insekticida, za razliku od IMI grupe, gde je konstatovano jedino smanjenje PLT. Povišene aktivnosti enzima ALT, AST i LDH u serumu jedinki tretiranih sa CPF ili IMI, zajedno sa patomorfološkim promenama u isečcima tkiva jetre pokazuju da je pod uticajem ova dva insekticida došlo do oštećenja jetre. Povećanje uree u serumu, kao i morfološke promene u tkivu bubrega, pokazuju da su oba insekticida nefrotoksični agensi. Ispitivani insekticidi izazvali su i porast ukupnog holesterola i triglicerida, a CPF je doveo i do povećanja glukoze. Smanjena aktivnost AChE konstatovana u jetri potvrđuje tvrdnje da su oba insekticida neurotoksična. Indukcija oksidativnog stresa, koja se manifestuje povećanom koncentracijom LPO i promenama koncentracija ROS i RNS, zapaža se kod tretmana oba insekticida, a najizraženija je u jetri. Aktivnosti enzima SOD i CAT, i enzima glutacion ciklusa (GSH-Px, GR i GST) promenjene su u CPF i IMI grupi. Promene u aktivnosti navedenih enzima takođe impliciraju da je došlo do oksidativnog stresa, na koji je odbrambeni sistem životinja reagovao uglavnom povećanom aktivnošću enzima. Promene neenzimskih komponenti antioksidativnog sistema zaštite, koje se ogledaju u smanjenju koncentracije GSH u jetri i povećanju koncentracije vitamina C, takođe ukazuju na oksidativni stres protiv koga su ćelije pokrenule mehanizme odbrane. Iz dobijenih rezultata može se zaključiti da su oba insekticida indukovala toksične efekte u krvi, jetri, bubregu i testisu, ali su najizraženije promene zabeležene u jetri. Premda se očekivalo da će, na osnovu mehanizma delovanja, IMI ispoljiti značajno manje štetne efekte na pacove u odnosu na CPF, rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da su efekti oba insekticida ispoljila toksično delovanje, koje je malo izraženije bilo u CPF grupi.

In vitro deo eksperimenta je pokazao da ekstrakt imele deluje protektivno na MRC-5 ćelije tretirane insekticidima CPF i IMI, tako što dovodi do povećanja njihove vijabilnosti. Kod pacova intoksikovanih insekticidima, VAE je ublažio promene hematoloških i biohemijskih parametara, delimično smanjio koncentraciju LPO, stabilizovao promene antioksidativnih enzima i ublažio oštećenja jetre i bubrega. U većem broju ispitivanih parametara javlja se dozna-zavisnost, tojest veća doza VAE je ispoljila bolje efekte. Protektivna delovanja ovog ekstrakta bi, zbog složenosti njegove strukture, mogla da se pripišu sinergističkom efektu različitih komponenti kojima imela obiluje. Uvidom u literaturne podatke može se videti da fenolna jedinjenja detektovana u ekstraktu, poput rutina, kempferola, kvercetina, apigenina, kao i kafeinske kiseline i hlorogenske kiseline imaju blagotvorna dejstva protiv različitih toksikanata, zahvaljujući antioksidativnim svojstvima i neutralizaciji slobodnih radikala. Ova doktorska disertacija pruža bolji uvid u potencijal ekstrakata biljne vrste *Viscum album* L., odnosno bele imele, ali i otvara vrata novim, detaljnijim istraživanjima njenog složenog mehanizma delovanja i terapijske primene.

A decorative border of green leaves and white berries frames the page. The leaves are elongated and pointed, with visible veins. The berries are small, round, and white, clustered together on thin stems. The border is positioned around the edges of the page, leaving a large white central area.

7. LITERATURA

- Abarikwu SO, Njoku R, Lawrence CJ, Charles IA, Ikewuchi JC. (2017a): Rutin ameliorates oxidative stress and preserves hepatic and renal functions following exposure to cadmium and ethanol. *Pharmaceutical Biology* 55, 2161–2169.
- Abarikwu SO, Olufemi PD, Lawrence CJ, Wekere FC, Ochulor AC, Barikuma AM. (2017b): Rutin, an antioxidant flavonoid, induces glutathione and glutathione peroxidase activities to protect against ethanol effects in cadmium-induced oxidative stress in the testis of adult rats. *Andrologia* 49, e12696.
- Abbas EA, Mowafy RE, Khalil AA, Sdeek FA. (2021): The potential role of the dietary addition of bentonite clay powder in mitigating diazinon-induced hepatorenal damage, oxidative stress, and pathological alterations in Nile tilapia. *Aquaculture* 533, 736182.
- Abdel-Daim MM, Abdeen A. (2018): Protective effects of rosuvastatin and vitamin E against fipronil-mediated oxidative damage and apoptosis in rat liver and kidney. *Food and Chemical Toxicology* 114, 69–77.
- Abd-Elhakim YM, Mohammed HH, Mohamed WAM. (2018): Imidacloprid impacts on neurobehavioral performance, oxidative stress, and apoptotic events in the brain of adolescent and adult rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66, 13513–13524.
- Abdel-Halim KY, Osman SR. (2020): Cytotoxicity and oxidative stress responses of imidacloprid and glyphosate in human prostate epithelial WPM-Y.1 cell line. *Journal of Toxicology* 2020, 4364650.
- Abdelkhalek NKM, Eissa IAM, Ahmed E, Kilany OE, El-Adl M, Dawood MAO, Hassan AM, Abdel-Daim M. (2018): Protective role of dietary *Spirulina platensis* against diazinon-induced Oxidative damage in Nile tilapia; *Oreochromis niloticus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 54, 99–104.
- Abdel-Razik RK, Mosallam EM, Hamed NA, Badawy MEI, Abo-El-Saad MM. (2021): Testicular deficiency associated with exposure to cypermethrin, imidacloprid, and chlorpyrifos in adult rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 87, 103724.
- Abdel-Salam OM, Sleem AA, Shaffie NM. (2010): Effect of *Viscum album* on acute hepatic damage caused by carbon tetrachloride in rats. *Turkish Journal of Medical Sciences* 40, 421–426.
- Abdel-Sattar EA, Elberry AA, Harraz FM, Ghareib SA, Nagy AA, Gabr SA. (2011): Antihyperglycemic and hypolipidaemic effects of the methanolic extract of Saudi mistletoe (*Viscum schimperi* Engl.). *Journal of Advanced Research* 2, 171–177.
- Abolaji AO, Ojo M, Afolabi TT, Arowoogun MD, Nwawolor D, Farombi EO. (2017): Protective properties of 6-gingerol-rich fraction from *Zingiber officinale* (Ginger) on chlorpyrifos-induced oxidative damage and inflammation in the brain, ovary and uterus of rats. *Chemico-Biological Interactions* 270, 15–23.
- Abou-Donia MB, Goldstein LB, Bullman S, Tu T, Khan WA, Dechkovskaia AM, Abdel-Rahman AA. (2008): Imidacloprid induces neurobehavioral deficits and increases expression of glial fibrillary acidic protein in the motor cortex and hippocampus in offspring rats following in utero exposure. *Journal of Toxicology and Environmental Health A* 71, 119–130.
- Abu Zeid EH, Alam RTM, Ali SA, Hendawi MY. (2019): Dose-related impacts of imidacloprid oral intoxication on brain and liver of rock pigeon (*Columba livia domestica*), residues analysis in different organs. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 167, 60–68.

- Abubakar Y, Tijjani H, Egbuna C, Adetunji CO, Kala S, Kryeziu TL, Ifemeje JC, Patrick-Iwuanyanwu KC. (2020): Pesticides, history, and classification. In: Egbuna C, Sawicka B. (eds). *Natural Remedies for Pest, Disease and Weed Control*. Academic Press, 29–42.
- Acker CI, Nogueira CW. (2012): Chlorpyrifos acute exposure induces hyperglycemia and hyperlipidemia in rats. *Chemosphere* 89, 602–608.
- Adaramoye O, Amanlou M, Habibi-Rezaei M, Pasalar P, Moosavi-Movahedi A. (2012): Methanolic extract of African mistletoe (*Viscum album*) improves carbohydrate metabolism and hyperlipidemia in streptozotocin-induced diabetic rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 5, 427–433.
- Adedara IA, Owoeye O, Ajayi BO, Awogbindin IO, Rocha JBT, Farombi EO. (2018): Diphenyl diselenide abrogates chlorpyrifos-induced hypothalamic-pituitary-testicular axis impairment in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 503, 171–176.
- Ademiluyi AO. (2006): Nutritional and in vitro antioxidant investigations of selected fermented underutilized legumes. M. Tech Thesis, Federal University of Technology, Akure, Nigeria.
- Adwas AA, Elsayed ASI, Azab AE, Quwaydir FA. (2019): Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body. *Journal of Applied Biotechnology and Bioengineering* 6, 43–47.
- Ahmad A, Zafar A, Ahmad M. (2019a): Mitigating effects of apigenin on edifenphos-induced oxidative stress, DNA damage and apoptotic cell death in human peripheral blood lymphocytes. *Food and Chemical Toxicology* 127, 218–227.
- Ahmad A, Kumari P, Ahmad P. (2019b): Apigenin attenuates edifenphos-induced toxicity by modulating ROS-mediated oxidative stress, mitochondrial dysfunction and caspase signal pathway in rat liver and kidney. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 159, 163–172.
- Ahmad MZ, Khan A, Javed MT, Hussain I. (2015): Impact of chlorpyrifos on health biomarkers of broiler chicks. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 122, 50–58.
- Ahmed MM, Nasr SA. (2015): Protective effect of broccoli and ferulic acid on imidacloprid-induced hepatotoxicity in rat. *The Egyptian Journal of Biochemistry & Molecular Biology* 33, 115.
- Akinmoladun AC, Ibukun EO, Afor E, Akinrinlola BL, Onibon TR, Akinboboye AO, Obuotor EM, Farombi EO. (2007): Chemical constituents and antioxidant activity of *Alstonia boonei*. *African Journal of Biotechnology* 6, 1197–1201.
- Alaa-Eldin EA, El-Shafei DA, Abouhashem NS. (2017): Individual and combined effect of chlorpyrifos and cypermethrin on reproductive system of adult male albino rats. *Environmental Science and Pollution Research* 24, 1532–1543.
- Al-Attar AM. (2015): Effect of grapeseed oil on diazinon-induced physiological and histopathological alterations in rats. *Saudi Journal of Biological Sciences* 22, 284–292.
- Albasher G, Albrahim T, Alsultan N, Alfaraj S, Alharthi MS, Kassab RB, Moneim AEA. (2020): Red beetroot extract mitigates chlorpyrifos-induced reprotoxicity associated with oxidative stress, inflammation, and apoptosis in rats. *Environmental Science and Pollution Research* 27, 3979–3991.
- Ali D, Nagpure NS, Kumar S, Kumar R, Kushwaha B, Lakra WS. (2009): Assessment of genotoxic and mutagenic effects of chlorpyrifos in freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch)

using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Food and Chemical Toxicology* 47, 650–656.

Alia M, Horcajo C, Bravo L, Goya L. (2003): Effect of grape antioxidant dietary fiber on the total antioxidant capacity and the activity of liver antioxidant enzymes in rats. *Nutrition Research* 23, 1251–1267.

Alin P, Danielson UH, Mannervik B. (1985): 4-Hydroxyalk-2-enals are substrates for glutathione transferase. *FEBS Letters* 179, 267–70.

Altun S, Özdemir S, Arslan H. (2017): Histopathological effects, responses of oxidative stress, inflammation, apoptosis biomarkers and alteration of gene expressions related to apoptosis, oxidative stress, and reproductive system in chlorpyrifos-exposed common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Environmental Pollution* 230, 432–443.

Aly N, EL-Gendy K, Mahmoud F, El-Sebae AK. (2010): Protective effect of vitamin C against chlorpyrifos oxidative stress in male mice. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 97, 7–12.

Aljadani NA, Elnaggar MHR, Assaggaff AI. (2020): The role of fish oil and evening primrose oil against the toxicity of fenitrothion pesticide in male rats. *International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences* 9, 108–122.

Amarowicz R, Pegg RB. (2019): Natural antioxidants of plant origin. *Advances in Food and Nutrition Research* 90, 1–81.

Ambali SF, Ayo JO, Esievo KA, Ojo SA. (2011a): Hemotoxicity induced by chronic chlorpyrifos exposure in wistar rats: mitigating effect of vitamin C. *Veterinary Medicine International* 2011, 945439.

Ambali SF, Shuaib K, Edeh R, Orijei BC, Shittu M, Akande M. (2011b): Hyperglycemia induced by subchronic co-administration of chlorpyrifos and lead in Wistar rats: Role of pancreatic lipoperoxidation and alleviating effect of vitamin C. *Biology and Medicine* 3, 6–14.

Amić D, Davidović-Amić D, Bešlo D, Trinajstić N. (2003): Structure-Radical scavenging activity relationship of flavonoids. *Croatia Chemica Acta* 76, 55–61.

Anićijević VJ, Lazarević-Pašti TD, Anićijević DDV, Karkalić RM. (2019): Esters of organophosphorus acids - Toxicity, application and removal from the environment. *Scientific Technical Review* 69, 15–29.

Annabi A, Dhouib IB, Lamine AJ, El Golli N, Gharbi N, El Fazâa S, Lasram MM. (2015): Recovery by N-acetylcysteine from subchronic exposure to Imidacloprid-induced hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis tissues injury in male rats. *Toxicology Mechanisms and Methods* 25, 524–531.

Antonijević B, Stojiljković MP. (2007): Unequal efficacy of pyridinium oximes in acute organophosphate poisoning. *Clinical Medicine & Research* 5, 71–82.

Aroonvilairat S, Tangjarukij C, Sornprachum T, Chaisuriya P, Siwadune T, Ratanabanangkoon K. (2018): Effects of topical exposure to a mixture of chlorpyrifos, cypermethrin and captan on the hematological and immunological systems in male Wistar rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 59, 53–60.

Ashour MB, Ahmed OM, Asran AEMA, Ali MA. (2017): Assessment of the Preventive Effects of *Salvia officinalis* and *Ruta graveolens* ethanolic leaf extracts on chlorpyrifos- and methomyl-

induced renal toxicity and oxidative stress in albino rats. *International Journal of Prevention and Treatment* 6, 34–44.

Aster RH, Bougie D. (2007): Drug-induced immune thrombocytopenia. *The New England Journal of Medicine* 9, 580–587.

Athar H, Khan A, Ashraf M (2008): Exogenously applied ascorbic acid alleviates salt induced oxidative stress in wheat. *Environmental and Experimental Botany* 63, 224–231.

Auclair C, Voisin E. (1985): Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenwald RA. (ed). *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. Boca Raton, FL, USA, CRC Press, pp. 123–132.

Avcı G, Kupeli E, Eryavuz A, Yesilada E, Kucukkurt I. (2006): Antihypercholesterolaemic and antioxidant activity assessment of some plants used as remedy in Turkish folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 107, 418–423.

Bagatini MD, Jaques JAS, de Oliveira CS, de Oliveira GA, Pillat MM, Mânica A, Moser CS, dos Santos LD, Ulrich H. (2018): Oxidative Stress: Noxious but also vital, novel prospects in oxidative and nitrosative stress. *IntechOpen*.

Baker D, Wuestehube L, Schekman R, Botstein D, Segev N. (1990): GTP-binding Ypt1 protein and Ca^{2+} function independently in a cell-free protein transport reaction. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 87, 355–359.

Bal R, Türk G, Tuzcu M, Yilmaz O, Kuloglu T, Gundogdu R, Gür S, Agca A, Ulas M, Cambay Z, Tuzcu Z, Gencoglu H, Guvenc M, Ozsahin AD, Kocaman N, Aslan A, Etem E. (2012): Assessment of imidacloprid toxicity on reproductive organ system of adult male rats. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 47, 434–444.

Balali-Mood M, Balali-Mood K, Moodi M, Balali-Mood B. (2012): Health aspects of organophosphorous pesticides in asian countries. *Iranian journal of public health* 41, 1.

Banks CJ, Andersen JL. (2019): Mechanisms of SOD1 regulation by posttranslational modifications. *Redox Biology* 26, 101270.

Bantz A, Camon J, Froger J, Goven D, Raymond V. (2018): Exposure to sublethal doses of insecticide and their effects on insects at cellular and physiological levels. *Current Opinion in Insect Science* 30, 73–78.

Barger AM. (2003): The complete blood cell count: a powerful diagnostic tool. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice* 33, 1207–1222.

Barney CW, Hawksworth FG, Geils BW. (1998): Hosts of *Viscum album*. *European Journal of Forest Pathology* 28, 187–208.

Bass C, Denholm I, Williamson MS, Nauen R. (2015): The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 121, 78–87.

Baysal M, Atlı-Eklioğlu Ö. (2021): Comparison of the toxicity of pure compounds and commercial formulations of imidacloprid and acetamiprid on HT-29 cells: Single and mixture exposure. *Food and Chemical Toxicology* 155, 112430.

Becker H, Exner J. (1980): Vergleichende untersuchungen von Misteln verschiedener Wirtsbaume an hand der flavonoide und Phenolcarbonsauren. *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie* 97, 417–428.

- Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. (1990): Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 87, 1620–1624.
- Ben Abdallah F, Fetoui H, Zribi N, Fakhfakh F, Keskes L. (2013): Quercetin attenuates lambda cyhalothrin-induced reproductive toxicity in male rats. *Environmental Toxicology* 28, 673–680.
- Bentz AB. (2009): A review of quercetin: chemistry, antioxidant properties, and bioavailability. *Journal of Young Investigators* 6, 391–415.
- Berg EL, Ching TM, Bruun DA, Rivera JK, Careaga M, Ellegood J, Lerch JP, Wöhr M, Lein PJ, Silverman JL. (2020): Translational outcomes relevant to neurodevelopmental disorders following early life exposure of rats to chlorpyrifos. *Journal of Neurodevelopmental Disorders* 12, 40.
- Beutler TM, Eaton DL. (1992): Glutathione-S-transferases: Amino acid sequence comparison classification and phylogenetic relationship. *Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews. Part C* 10, 181–203.
- Beutler, E. (1982): Catalase. In: Beutler E. (ed). *Red Cell Metabolism, a Manual of Biochemical Methods*. New York, Grune and Stratton, pp. 105–106.
- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. (2012): Oxidative stress and antioxidant defense. *The World Allergy Organization Journal* 5, 9–19.
- Bizerra PFV, Guimarães ARJS, Miranda CA, Constantin RP, Utsunomiya KS, Gilgioni EH, Constantin J, Ishii-Iwamoto EL, Maioli MA, Mingatto FE. (2020): Enhanced cytotoxicity of imidacloprid by biotransformation in isolated hepatocytes and perfused rat liver. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 164, 183–190.
- Blacquièrre T, Smagghe G, van Gestel CAM, Mommaerts V. (2012): Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology* 21, 973–992.
- Blain PG. (2011): Organophosphorus poisoning (acute). *BMJ Clinical Evidence* 2011, 2102.
- Bondy SC, Naderi S. (1994): Contribution of hepatic cytochrome P-450 systems to the generation of reactive oxygen species. *Biochemical Pharmacology* 48, 155–159.
- Bonmatin JM, Giorio C, Girolami V, Goulson D, Kreuzweiser DP, Krupke C, Liess M, Long E, Marzaro M, Mitchell EAD, Noome DA, Simon-Delso N, Tapparo A. (2015): Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 35–67.
- Boone JS, Tyler JW, Chambers JE. (2001): Transferable residues from dog fur and plasma cholinesterase inhibition in dogs treated with a flea control dip containing chlorpyrifos. *Environmental Health Perspectives* 109, 1109–1114.
- Bosak A. (2006). Organophosphorus compounds: Classification and enzyme reactions. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 57, 445–457.
- Bresciani G, Cruz IBM, de Paz JA, Cuevas MJ, González-Gallego J. (2013): The MnSOD Ala16Val SNP: Relevance to human diseases and interaction with environmental factors. *Free Radical Research* 47, 781–792.

- Brighente IMC, Dias M, Verdi LG, Pizzolatti MG. (2007): Antioxidant activity and total phenolic content of some Brazilian species. *Pharmaceutical Biology* 45, 156–161.
- Broznić D, Marinić J, Tota M, Jurešić GČ, Milin Č. (2008): Kinetic evaluation of imidacloprid degradation in mice organs treated with olive oil polyphenols extract. *Croatica Chemica Acta* 81, 203–209.
- Burke AP, Niibori Y, Terayama H, Ito M, Pidgeon C, Arsenault J, Camarero PR, Cummins CL, Mateo R, Sakabe K, Hampson DR. (2018): Mammalian susceptibility to a neonicotinoid insecticide after fetal and early postnatal exposure. *Scientific Reports* 8, 16639.
- Burke RD, Todd SW, Lumsden E, Mullins RJ, Mamczarz J, Fawcett WP, Gullapalli RP, Randall WR, Pereira EFR, Albuquerque EX. (2017): Developmental neurotoxicity of the organophosphorus insecticide chlorpyrifos: from clinical findings to preclinical models and potential mechanisms. *Journal of Neurochememistry* 142, 162–177.
- Büssing A, Schietzel M. (1999): Apoptosis-inducing properties of *Viscum album* L. extracts from different host trees, correlate with their content of toxic mistletoe lectins. *Anticancer Research* 19, 23–28.
- Bussing A. (2000): Mistletoe. The genus *Viscum*. Hardwood Academic Publishers, Amsterdam.
- Butcherine P, Kelaher BP, Benkendorff K. (2022): Assessment of acetylcholinesterase, catalase, and glutathione S-transferase. *Aquatic Toxicology* 242, 106050.
- Caglayan C, Kandemir FM, Darendelioglu E, Yildirim S, Kucukler S, Dortbudak MB. (2019a): Rutin ameliorates mercuric chloride-induced hepatotoxicity in rats via interfering with oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 56, 60–68.
- Caglayan C, Kandemir FM, Yildirim S, Kucukler S, Eser G. (2019b): Rutin protects mercuric chloride-induced nephrotoxicity via targeting of aquaporin 1 level, oxidative stress, apoptosis and inflammation in rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 54, 69–78.
- Calderón-Montaña JM, Burgos-Morón E, Pérez-Guerrero C, López-Lázaro M. (2011): A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 11, 298–344.
- Candas D, Li JJ. (2014): MnSOD in oxidative stress response-potential regulation via mitochondrial protein influx. *Antioxidants & Redox Signalling* 20, 1599–1617.
- Cao J, Zhang X, Wang Q, Jia L, Zhang Y, Zhao X. (2012): Influence of flavonoid extracts from celery on oxidative stress induced by dichlorvos in rats. *Human & Experimental Toxicology* 31, 617–625.
- Casas-Grajales S, Muriel P. (2017): The liver, oxidative stress, and antioxidants. In: Muriel P. (ed), *Liver Pathophysiology*, Academic Press, Boston, pp. 583–604.
- Casida JE, Durkin KA. (2013): Neuroactive insecticides: Targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *The Annual Review of Entomology* 58, 99–117.
- Casida JE. (2018): Neonicotinoids and other insect nicotinic receptor competitive modulators: Progress and prospects. *Annual Review of Entomology* 63, 125–144.

- Cavalcante SFdA, Simas ABC, Barcellos MC, de Oliveira VGM, Sousa RB, Cabral PAdM, Kuča K, França TCC. (2020): Acetylcholinesterase: The “Hub” for Neurodegenerative Diseases and Chemical Weapons Convention. *Biomolecules* 10, 414.
- Chambers JE, Ma T, Boone JS, Chambers HW. (1994): Role of detoxification pathways in acute toxicity levels of phosphorothionate insecticides in the rat. *Life Sciences* 54, 1357–1364.
- Chambers JE, Meek EC, Chambers HW. (2010): The metabolism of organophosphorus insecticides, In: Krieger R. (ed). *Handbook of Pesticide Toxicology*. Third ed, Academic Press, USA, pp. 1399–1407.
- Chao SL, Casida JE. (1997): Interaction of imidacloprid metabolites and analogs with the nicotinic acetylcholine receptor of mouse brain in relation to toxicity. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 58, 77–88.
- Chen X, Li F, Chen A, Ma K, Liang P, Liu Y, Song D, Gao X. (2017): Both point mutations and low expression levels of the nicotinic acetylcholine receptor $\beta 1$ subunit are associated with imidacloprid resistance in an *Aphis gossypii* (Glover) population from a Bt cotton field in China. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 141, 1–8.
- Chen YR, Tzeng DTW, Yang, EC. (2021): Chronic effects of imidacloprid on honey bee worker development-molecular pathway perspectives. *International Journal Molecular Sciences* 22, 11835.
- Chen Z, Yang Y, Mi S, Fan Q, Sun X, Deng B, Wu G, Li Y, Zhou Q, Ruan Z. (2019): Hepatoprotective effect of chlorogenic acid against chronic liver injury in inflammatory rats. *Journal of Functional Foods* 62, e103540.
- Chikezie PC, Iheanacho KME. (2014): Comparative hypoglycemic property of aqueous and ethanolic extracts of *Viscum album* (Mistletoe) and their effects on body and organ weights of diabetic rats (*Rattus norvegicus*). *Pharmacognosy Communications* 4, 1–19.
- Chistiakov AD, Savost'anov KV, Turakulov RI, Titovich EV, Zilberman LI, Kuraeva TL, Dedov II, Nosikov VV. (2004): A new type 1 diabetes susceptibility locus containing the catalase gene (chromosome 11p13) in a Russian population. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 20, 219–224.
- Choi K, Joo H, Rose RL, Hodgso E. (2006): Metabolism of chlorpyrifos and chlorpyrifos oxon by human hepatocytes. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 20, 279–291.
- Chowdhury S, Ghosh S, Rashid K, Sil PC. (2016): Deciphering the role of ferulic acid against streptozotocin-induced cellular stress in the cardiac tissue of diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology* 97, 187–198.
- Çokuğraş AN. (2003): Butyrylcholinesterase: structure and physiological importance. *Turkish Journal of Biochemistry* 28, 54–61.
- Committee on Herbal Medicinal Products (2012): Assessment report on *Viscum album* L., herba. Committee on Herbal Medicinal Product, London.
- Cos P, Ying L, Calomme M, Hu JP, Cimanga K, Poel BV, Pieters L Vlietinck AJ, Berghe DV. (1998): Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of Natural Products* 61, 71–76.
- Costa LG. (2018): Organophosphorus compounds at 80: Some old and new issues. *Toxicological Sciences* 162, 24–35.

- Crossthwaite AJ, Bigot A, Camblin P, Goodchild J, Lind RJ, Slater R, Maienfisch P. (2017): The invertebrate pharmacology of insecticides acting at nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of Pesticide Science* 42, 67–83.
- Čolović MB, Krstić DZ, Lazarević-Pašti TD, Bondžić AM, Vasić VM. (2013): Acetylcholinesterase inhibitors: Pharmacology and toxicology. *Current Neuropharmacology* 11, 315–335.
- Ćebović TN. (2008): Uticaj ekstrakata imele (*Viscum album* L.) sa različitih domaćina na stvaranje slobodnih radikala kiseonika i aktivnost antioksidativnih enzima. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Beograd.
- Dai H, Deng Y, Zhang J, Han H, Zhao M, Li Y, Zhang C, Tian J, Bing G, Zhao L. (2015): PINK1/Parkin-mediated mitophagy alleviates chlorpyrifos-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *Toxicology* 334, 72–80.
- Daisy P, Priya CE, Vargese L. (2011): A study on the regenerative potential of the root and leaf extracts of *Elephantopus scaber* L.: An anti-diabetic approach. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 5, 1832–1837.
- Dalmolin SP, Dreon DB, Thiesen FV, Dallegrave E. (2020): Biomarkers of occupational exposure to pesticides: Systematic review of insecticides. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 75, 103304.
- Dar MA, Kaushik G, Francisco J, Chiu JF. (2020): Pollution status and biodegradation of organophosphate pesticides in the environment. In: Pardeep S, Ajay K, Anwasha B. (eds), Abatement of Environmental Pollutants, Elsevier, Amsterdam, pp. 25–66.
- D'Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. (2007): Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita* 43, 348–361.
- Dave KR, Syal AR, Katyare SS. (2000): Tissue cholinesterases. A comparative study of their kinetic properties. *Zeitschrift fur Naturforschung C, Journal of biosciences* 55, 100–108.
- Davies MJ. (2016): Protein oxidation and peroxidation. *Biochemical Journal* 473, 805–825.
- de Araújo FF, Farias DP, Neri-Numa IA, Pastore GM. (2021): Polyphenols and their applications: An approach in food chemistry and innovation potential. *Food Chemistry* 338, 127535.
- de David C, Rodrigues G, Bona S, Meurer L, González-Gallego J, Tuñón MJ, Marroni NP. (2011): Role of quercetin in preventing thioacetamide-induced liver injury in rats. *Toxicologic Pathology* 39, 949–957.
- de Oliveira IM, Nunes BVF, Barbosa DR, Pallares AM, Faro LRF. (2010). Effects of the neonicotinoids thiametoxam and clothianidin on in vivo dopamine release in rat striatum. *Toxicology letters*, 192, 294–297.
- Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JPE, Tognolini M, Borges G, Crozier A. (2013): Dietary (poly)phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & Redox Signaling* 18, 1818–1892.
- Delebinski CI, Twardziok M, Kleinsimon S, Hoff F, Mulsow K, Rolff J, Jäger S, Eggert A, Seifert G. (2015): A natural combination extract of *Viscum album* L. containing both triterpene acids and lectins is highly effective against AML in vivo. *PLoS ONE* 10, e0133892.

- Demir F, Uzun FG, Durak D, Kalender Y. (2011): Subacute chlorpyrifos-induced oxidative stress in rat erythrocytes and the protective effects of catechin and quercetin. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 99, 77–81.
- Diklić N. (1972): Rod *Viscum L.* 1754. In: V. Josifović M. (ed). Flora SR Srbije, Srpska akademija nauka i umetnosti, Beograd, pp. 391–392.
- Djefal A, Messarah M, Boumendjel A, Kadeche L, Feki AE. (2015): Protective effects of vitamin C and selenium supplementation on methomyl-induced tissue oxidative stress in adult rats. *Toxicology and Industrial Health* 31, 31–43.
- Dou X, Zhou Z, Ren R, Xu M. (2020): Apigenin, flavonoid component isolated from *Gentiana veitchiorum* flower suppresses the oxidative stress through LDLR-LCAT signaling pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 128, 110298.
- Đuračková Z. (2014): Free radicals and antioxidants for non-experts. In: Laher I. (ed). Systems biology of free radicals and antioxidants. Springer, Berlin. pp. 3–38.
- Duzguner V, Erdogan S. (2012): Chronic exposure to imidacloprid induces inflammation and oxidative stress in the liver & central nervous system of rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 104, 58–64.
- Đukić M. (2008): Reaktivne hemijske vrste i oksidativni stres. In: Đukić M. (ed). Oksidativni stres – prooksidansi i antioksidansi. Mono i Manjana, Beograd, pp. 3-29.
- Đukić MM, Tasić Lj. (2008): Antioksidativna zaštita i preparati sa antioksidativnim delovanjem. In: Đukić M. (ed). Oksidativni stres – prooksidansi i antioksidansi. Mono i Manjana, Beograd, 59–81.
- Eaton DL, Daroff RB, Autrup H, Bridges J, Buffler P, Costa LG, Coyle J, McKhann G, Mobley WC, Nadel L, Neubert D, Hermann RS, Spencer PS. (2008): Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment. *Critical Reviews Toxicology* 38, 1–125.
- Ebokaiwe AP, Obasi DO, Njoku RCC, Olusanya SOO, Kalu WO. (2021): Cyclophosphamide instigated hepatic-renal oxidative/inflammatory stress aggravates immunosuppressive indoleamine 2,3-dioxygenase in male rats: Abatement by quercetin. *Toxicology* 464, 153027.
- Eddaikra A, Eddaikra N. (2021). Endogenous Enzymatic Antioxidant Defense and Pathologies, Antioxidants - Benefits, Sources, Mechanisms of Action, Viduranga Waisundara, IntechOpen.
- Effiong OO, Udo NV, Monday EN. (2013): Reduction in serum bilirubin concentration following administration of crude leaf extract of *Viscum album* (Mistletoe) in high salt fed rats. *Journal of Pharmaceutical Research International* 4, 352–361.
- EFSA (2018): Evaluation of the data on clothianidin, imidacloprid and thiamethoxam for the updated risk assessment to bees for seed treatments and granules in the EU. Technical report; Approved: 01 February 2018.
- El-Demerdash FM, Nasr HM. (2014): Antioxidant effect of selenium on lipid peroxidation, hyperlipidemia and biochemical parameters in rats exposed to diazinon. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 28, 89–93.
- El-Gendy K, Osman K, EL-Din EE, EL-Seedy A. (2019): Role of biomarkers in the evaluation of cadmium and ethoprophos combination in male mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 72, 103267.

- EL-Gendy KS, Aly NM, Mahmoud FH, Kenawy A, El-Sebae AKH. (2010): The role of vitamin C as antioxidant in protection of oxidative stress induced by imidacloprid. *Food and Chemical Toxicology* 48, 215–221.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres VJR, Featherstone RM. (1961): Determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7, 88–95.
- Elluru SR, van Huyen JPD, Delignat S, Kazatchkine MD, Friboulet A, Kaveri SV, Bayry J. (2008): Induction of maturation and activation of human dendritic cells: a mechanism underlying the beneficial effect of *Viscum album* as complimentary therapy in cancer. *BMC Cancer* 8, 161.
- ElMazoudy RH, Attia AA, El-Shenawy NS. (2011): Protective role of propolis against reproductive toxicity of chlorpyrifos in male rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 101, 175–181.
- El-Sayed NM, Ahmed AAM, Selim MAA. (2018): Cytotoxic effect of chlorpyrifos is associated with activation of Nrf-2/HO-1 system and inflammatory response in tongue of male Wistar rats. *Environmental Science and Pollution Research* 25, 12072–12082.
- El-Shafey MM, Abd-Allah GM, Mohamadin AM, Harisa GI, Mariee AD. (2015): Quercetin protects against acetaminophen-induced hepatorenal toxicity by reducing reactive oxygen and nitrogen species. *Pathophysiology* 22, 49–55.
- Elsharkawy EE, Yahia D, El-Nisr NA. (2013): Sub-chronic exposure to chlorpyrifos induces hematological, metabolic disorders and oxidative stress in rat: Attenuation by glutathione. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 35, 218–227.
- El-Shenawy NS, AL-Harbi MS, Hamza RZ. (2014): Effect of vitamin E and selenium separately and in combination on biochemical, immunological and histological changes induced by sodium azide in male mice. *Experimental and Toxicologic Pathology* 67, 65–76.
- Emam H, Ahmed E, Abdel-Daim M. (2018): Antioxidant capacity of omega-3-fatty acids and vitamin E against imidacloprid-induced hepatotoxicity in Japanese quails. *Environmental Science and Pollution Research* 25, 11694–11702.
- Enogieru AB, Haylett W, Hiss DC, Bardien S, Ekpo OE. (2018): Rutin as a potent antioxidant: implications for neurodegenerative disorders. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2018, 6241017.
- Felenda JE, Turek C, Stintzing FC. (2019): Antiproliferative potential from aqueous *Viscum album* L. preparations and their main constituents in comparison with ricin and purothionin on human cancer cells. *Journal of Ethnopharmacology* 236, 100–107.
- Flaskos J. (2012): The developmental neurotoxicity of organophosphorus insecticides: A direct role for the oxon metabolites. *Toxicology Letters* 209, 86–93.
- Flores-Céspedes F, Figueredo-Flores CI, Daza-Fernandez I, Vidal-Peña F, Villafranca-Sánchez M, Fernández-Pérez M. (2012): Preparation and characterization of imidacloprid lignin–polyethylene glycol matrices coated with ethylcellulose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 1042–1051.
- Forister ML, Cousens B, Harrison JG, Anderson K, Thorne JH, Waetjen D, Nice CC, De Parsia M, Hladik ML, Meese R, van Vliet H, Shapiro AM. (2016): Increasing neonicotinoid use and the declining butterfly fauna of lowland California. *Biology Letters* 12, 20160475.

- Fossen M. (2006): Environmental Fate of Imidacloprid. California Department of Pesticide Regulation, pp 1–16.
- Freshney RI. (1983): Culture of animal cells: A Manual of Basic Techniques. Alan R. Liss, Inc. New York.
- Fukuto TR. (1990): Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environmental health perspectives* 87, 245–254.
- Gallagher AM, Flatt PR, Duffy G, Abdel-Wahab YHA. (2003): The effects of traditional antidiabetic plants on in vitro glucose diffusion. *Nutrition Research* 23, 413–424.
- Ganie SY, Javaid D, Hajam YA, Reshi MS. (2022): Mechanisms and treatment strategies of organophosphate pesticide induced neurotoxicity in humans: A critical appraisal. *Toxicology* 472, 153181.
- Gardin NE. (2009): Immunological response to mistletoe (*Viscum album* L.) in cancer patients: A four-case series. *Phytotherapy Research* 23, 407–411.
- Ge W, Yan S, Wang J, Zhu L, Chen A, Wang J. (2015): Oxidative stress and DNA damage induced by imidacloprid in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63, 1856–1862.
- Gelen V, Şengül E, Gedikli S, Atila G, Uslu H, Makav M. (2017): The protective effect of rutin and quercetin on 5-FU-induced hepatotoxicity in rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 7, 647–653.
- Georgiadis G, Mavridis C, Belantis C, Zisis IE, Skamagkas I, Fragkiadoulaki I, Heretis I, Tzortzis V, Psathakis K, Tsatsakis A, Mamoulakis C. (2018): Nephrotoxicity issues of organophosphates. *Toxicology* 406–407, 129–136.
- Ghosh N, Das A, Chaffee S, Roy S, Sen CK. (2018): Reactive oxygen species, oxidative damage, and cell death. In: Immunity and Inflammation in Health and Disease. Academic Press, Cambridge, pp. 45–55.
- Gill SS, Tuteja N. (2010): Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48, 909–930.
- Gill, HK, Garg, H. (2014): Pesticides: Environmental impacts and management strategies. In: Larramendy ML, Soloneski S. (eds). Pesticides - Toxic aspects. IntechOpen.
- Gilon P, Henquin JC. (2001): Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic beta-cell function. *Endocrine Review* 22, 565–604.
- Glatzle D, Vuilleumier JP, Weber F, Decker K. (1974): Glutathione reductase test with whole blood, a convenient procedure for the assessment of the riboflavin status in humans. *Experientia* 30, 665–667.
- Glišić R, Stanković S. (2017): Teorija i praksa histoloških tehnika. Prirodno-matematički fakultet, Kragujevac.
- Goel A, Dani V, Dhawan DK. (2006): Role of zinc in mitigating the toxic effects of chlorpyrifos on hematological alterations and electron microscopic observations in rat blood. *BioMetals* 19, 483–492.

- Gómez-Canela C, Prats E, Piña B, Tauler R. (2017): Assessment of chlorpyrifos toxic effects in zebrafish (*Danio rerio*) metabolism. *Environmental Pollution* 220, 1231–1243.
- Gonçalves AM, Rocha CP, Marques JC, Gonçalves FJ. (2021): Enzymes as useful biomarkers to assess the response of freshwater communities to pesticide exposure – A review. *Ecological Indicators* 122, 107303.
- Gotti C, Clementi F. (2004): Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Progress in Neurobiology* 74, 363–396.
- Gotti C, Zoli M, Clementi F. (2006): Brain nicotinic acetylcholine receptors: Native subtypes and their relevance. *Trends in Pharmacological Sciences* 27, 482–491.
- Goulson D. (2013): An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology* 50, 977–987.
- Gray AM, Flatt PR. (1999): Insulin-secreting activity of the traditional antidiabetic plant *Viscum album* (mistletoe). *Journal of Endocrinology* 160, 409–414.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. (1982): Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry* 126, 131–138.
- Gupta RC, Milatovic D. (2014): Chapter 23 – Insecticides. In: Gupta RC. (ed). *Biomarkers in Toxicology*. Academic Press, 389–407.
- Gutteridge JM, Quinlan GJ, Yamamoto Y. (1998): Hypothesis: are fatty acid patterns characteristic of essential fatty acid deficiency indicative of oxidative stress? *Free Radical Research* 28, 109–114.
- Haas K, Bauer M, Wollenweber E. (2003): Cuticular waxes and flavonol aglycones of mistletoes. *Zeitschrift für Naturforschung* 58, 464–470.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. (1974): Glutathione-S-transferase. *Journal of Biological Chemistry* 249, 7130–7139.
- Halliwell B, Gutteridge J. (2007): *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, Oxford.
- Halliwell B. (1987): Oxidants and human disease: some new concepts. *The FASEB Journal* 1, 358–364.
- Halliwell B. (1990): How to characterize a biological antioxidant. *Free Radical Research Communications* 9, 1–32.
- Han W, Tian Y, Shen X. (2018): Human exposure to neonicotinoid insecticides and the evaluation of their potential toxicity: An overview. *Chemosphere* 192, 59–65.
- Hassan AS, El-Ela FIA, Abdel-Aziz AM. (2019): Investigating the potential protective effects of natural product quercetin against imidacloprid-induced biochemical toxicity and DNA damage in adults rats. *Toxicology Reports* 6, 727–735.
- Hawkins CL, Morgan PE, Davies MJ. (2009): Quantification of protein modification by oxidants. *Free Radical Biology and Medicine* 46, 965–988.
- He B, Ni Y, Jin Y, Fu Z. (2020): Pesticides-induced energy metabolic disorders. *Science of the Total Environment* 729, 139033.

- Hill E. (2003): Wildlife toxicology of organophosphorus and carbamate pesticides. In: Hoffman DJ, Rattner BA, Burton GA, Cairns J. (eds). *Handbook of Ecotoxicology*. CRC Press Lewis Publishers, Boca Raton, Florida USA.
- Hinneburg I, Dorman HJD, Hiltunen R. (2006): Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chemistry* 97, 122–129.
- Hladik ML, Kolpin DW, Kuivila KM. (2014): Widespread occurrence of neonicotinoid insecticides in streams in a high corn and soybean producing region, USA. *Environmental Pollution* 193, 189–196.
- Hladik ML, Kolpin DW. (2016): First national-scale reconnaissance of neonicotinoid insecticides in streams across the USA. *Environmental Chemistry* 13, 12–20.
- Hladik ML, Main AR, Goulson D. (2018): Environmental risks and challenges associated with neonicotinoid insecticides. *Environmental Science & Technology* 52, 3329–3335.
- Hoffmann EJ, Vandervoort C, Wise JC. (2010): Plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) adult mortality and associated fruit injury after exposure to field aged insecticides on tart cherry branches. *Journal of Economic Entomology* 103, 1196–1205.
- Hong Y, Huang Y, Wu S, Yang X, Dong Y, Xu D, Huang Z. (2020): Effects of imidacloprid on the oxidative stress, detoxification and gut microbiota of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Science of the Total Environment* 729, 138276.
- Hostanska K, Hajto T, Fischer J, Lentzen H, Sütterlin B, Saller R. (1996): A natural immunity-activating plant lectin. *Viscum album* agglutinin-I, induces apoptosis in human lymphocytes, monocytes, monocytic THP-1 cells and murine thymocytes. *Nature Immunity* 15, 295–311.
- Hou Y, Zeng Y, Li S, Qi L, Xu W, Wang H, Zhao X, Sun C. (2014): Effect of quercetin against dichlorvos induced nephrotoxicity in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology* 66, 211–218.
- Houchat J-N, Cartereau A, Le Mauff A, Taillebois E, Thany SH. (2020): An overview on the effect of neonicotinoid insecticides on mammalian cholinergic functions through the activation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 17, 3222.
- Hrelia P, Sita G, Ziche M, Ristori E, Marino A, Cordaro M, Molteni R, Spero V, Malaguti M, Morroni F, Hrelia S. (2020): Common protective strategies in neurodegenerative disease: Focusing on risk factors to target the cellular redox system. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2020, 8363245.
- Hsu C, Chiang B, Chen Y, Yang J, Liu C. (2008): Improving the antioxidant activity of buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn) sprout with trace element water. *Food Chemistry* 108, 633–641.
- Huber R, Lüdtke H, Wieber J, Beckmann C. (2011): Safety and effects of two mistletoe preparations on production of Interleukin-6 and other immune parameters - a placebo controlled clinical trial in healthy subjects. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 11, 116.
- Huber R, Rostock M, Goedel R, Lüdtke R, Urech K, Buck S, Klein R. (2005): Mistletoe treatment induces GM-CSF- and IL-5 production by PBMC and increases blood granulocyte- and eosinophil counts: a placebo controlled randomized study in healthy subjects. *European Journal of Medical Research* 10, 411–418.

- Hussein HK, Abu-Zinadah OA. (2010): Antioxidant effect of curcumin extracts in induced diabetic wistar rats. *International Journal of Zoological Research* 6, 266–276.
- Ibrahim RE, El-Houseiny W, Behairy A, Mansour MF, Abd-Elhakim YM. (2019): Ameliorative effects of *Moringa oleifera* seeds and leaves on chlorpyrifos-induced growth retardation, immune suppression, oxidative stress, and DNA damage in *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 505, 225–234.
- Ibtissem BA, Hajer BS, Ahmed H, Awatef E, Choumous K, Ons B, Mounir ZK, Najiba Z. (2017): Oxidative stress and histopathological changes induced by methylthiophanate, a systemic fungicide, in blood, liver and kidney of adult rats. *African Health Sciences* 17, 154–163.
- Ince S, Arslan-Acaroz D, Demirel HH, Varol N, Ozyurek HA, Zemherie F, Kucukkurt I. (2017): Taurine alleviates malathion induced lipid peroxidation, oxidative stress, and proinflammatory cytokine gene expressions in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 96, 263–268.
- IPCS International Programme on Chemical Safety Toxicological evaluations: Imidacloprid, 2001; <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2001pr07.htm>, 2011.
- Iwasa T, Motoyama N, Ambrose JT, Roe RM. (2004): Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Protection* 23, 371–378.
- Iyaniwura TT. (1991): Non-target and environmental hazards of pesticides. *Reviews on environmental health* 9, 161–176.
- Jabot C, Fieu M, Giroud B, Bulete A, Casabianca H, Vulliet E. (2015): Trace-level determination of pyrethroid, neonicotinoid and carboxamide pesticides in bees wax using dispersive solid-phase extraction followed by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 95, 240–257.
- Jaeschke H, Ramachandran A. (2011): Reactive oxygen species in the normal and acutely injured liver. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 55, 227–228.
- Jaeschke H. (2011): Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 26, 173–179.
- Jahan S, Munawar A, Razak S, Anam S, Ain QU, Ullah H, Afsar T, Abulmeaty M, Almajwal A. (2018): Ameliorative effects of rutin against cisplatin-induced reproductive toxicity in male rats. *BMC Urology* 18, 107.
- Janssen O, Scheffler A, Kabelitz D. (1993): In vitro effects of mistletoe extracts and mistletoe lectins. Cytotoxicity towards tumor cells due to induction of programmed cell death (apoptosis). *Arzneimittelforschung* 43, 1221–1227.
- Janjić V. (2009): Mehanizam delovanja pesticida. Društvo za zaštitu bilja Srbije, Akademija nauka i umetnosti Republike Srpske, Institut za pesticide i zaštitu životne sredine, Beograd, Banja Luka.
- Jayusman PA, Budin SB, Ghazali AR, Taib IS, Louis SR. (2014): Effects of palm oil tocotrienol-rich fraction on biochemical and morphological alterations of liver in fenitrothion-treated rats. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 27, 1873–1880.

- Jimoh OA, Oyeyemi WA, Okin-Aminu HO, Oyeyemi BF. (2021): Reproductive characteristics, semen quality, seminal oxidative status, steroid hormones, sperm production efficiency of rabbits fed herbal supplements. *Theriogenology* 168, 41–49.
- Johnson RM. (2015): Honey bee toxicology. *Annual Review of Entomology* 60, 415–434.
- Jokanović M, Kosanović M. (2010): Neurotoxic effects in patients poisoned with organophosphorus pesticides. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 29, 195–201.
- Jokanović M. (2001): Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology* 166, 139–160.
- Jokanović M. (2009): Medical treatment of acute poisoning with organophosphorus and carbamate pesticides. *Toxicology Letters* 190, 107–115.
- Jokanović M. (2010): Toksikologija. Princip-Press-Portal, Beograd.
- Joshi AKR, Rajini PS. (2009): Reversible hyperglycemia in rats following acute exposure to acephate, an organophosphorus insecticide: role of gluconeogenesis. *Toxicology* 257, 40–45.
- Joshi AKR, Rajini PS. (2012): Hyperglycemic and stressogenic effects of monocrotophos in rats: evidence for the involvement of acetylcholinesterase inhibition. *Experimental and Toxicologic Pathology* 64, 115–120.
- Jowsey IR, Thomson AM, Flanagan JU, Murdock PR, Moore GBT, Meyer DJ, Murphy GJ, Smith SA, Hayes JD. (2001): Mammalian class sigma glutathione S-transferases: catalytic properties and tissue-specific expression of human and rat GSH-dependent prostaglandin D2 synthases. *Biochemical Journal* 359, 507–516.
- Jurczuk M, Brzóška MM, Moniuszko-Jakoniuk J. (2007): Hepatic and renal concentrations of vitamins E and C in lead- and ethanol-exposed rats. An assessment of their involvement in the mechanisms of peroxidative damage. *Food and Chemical Toxicology* 45, 1478–1486.
- Kaelin W, Die VDK. (1933): Hippokrates Z. prakt. *Heilkunde* 4, 325.
- Kahle-Zuber, D. (2008): Biology and evolution of the European mistletoe (*Viscum album*). Doktorska disertacija, Cirih.
- Kalender Y, Kaya S, Durak D, Uzun FG, Demir F. (2012): Protective effects of catechin and quercetin on antioxidant status, lipid peroxidation and testis-histoarchitecture induced by chlorpyrifos in male rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 33, 141–148.
- Kammon AM, Brar RS, Banga HS, Sodhi S. (2010): Patho-biochemical studies on hepatotoxicity and nephrotoxicity on exposure to chlorpyrifos and imidacloprid in layer chickens. *Veterinarski Arhiv* 80, 663–672.
- Kapoor U, Srivastava MK, Trivedi P, Garg V, Srivastava LP. (2014): Disposition and acute toxicity of imidacloprid in female rats after single exposure. *Food and Chemical Toxicology* 68, 190–195.
- Kashyap D, Sharma A, Tuli HS, Sak K, Garg VK, Buttar HS, Setzer WN, Sethi G. (2018): Apigenin: A natural bioactive flavone-type molecule with promising therapeutic function. *Journal of Functional Foods* 48, 457–471.
- Katanić J, Matić S, Pferschy-Wenzig EM, Kretschmer N, Boroja T, Mihailović V, Stanković V, Stanković N, Mladenović M, Stanić S, Mihailović M, Bauer R. (2017): *Filipendula ulmaria*

extracts attenuate cisplatin-induced liver and kidney oxidative stress in rats: *In vivo* investigation and LC-MS analysis. *Food & Chemical Toxicology* 99, 86–102.

Katić A, Kašuba V, Kopjar N, Lovaković BT, Čermak AMM, Mendaš G, Micek V, Milić M, Pavičić I, Pizent A, Žunec S, Želježić D. (2021): Effects of low-level imidacloprid oral exposure on cholinesterase activity, oxidative stress responses, and primary DNA damage in the blood and brain of male Wistar rats. *Chemico-Biological Interactions* 338, 109287.

Kaushal J, Khatri M, Arya SK. (2021): A treatise on Organophosphate pesticide pollution: Current strategies and advancements in their environmental degradation and elimination. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 207, 111483.

Kelly FJ, Mudway IS. (2003): Protein oxidation at the air-lung interface. *Amino Acids* 25, 375–396.

Khalaf HA, El-Mansy AAE. (2019): The possible alleviating effect of saffron on chlorpyrifos experimentally induced cardiotoxicity: Histological, immunohistochemical and biochemical study. *Acta Histochemica* 121, 472–483.

Khalifa FK, Alkhalaf MA. (2020): Effects of black seed and thyme leaves dietary supplements against malathion insecticide-induced toxicity in experimental rat model. *Journal of King Saud University – Science* 32, 914–919.

Khil L, Kim W, Lyu S, Park WB, Yoon J, Jun H. (2007): Mechanisms involved in Korean mistletoe lectin-induced apoptosis of cancer cells. *World Journal of Gastroenterology* 13, 2811–2818.

Kienle GS, Kiene, H. (2010): Influence of *Viscum album* L (European Mistletoe) extracts on quality of life in cancer patients: A systematic review of controlled clinical studies. *Integrative Cancer Therapies* 9, 142–157.

Kim BK, Choi MJ, Park KY, Cho EJ. (2010): Protective effects of Korean mistletoe lectin on radical-induced oxidative stress. *Biological Pharmaceutical Bulletin* 33, 1152–1158.

Kim MJ, Park J, Kwon DY, Yang HJ, Kim DS, Kang S, Shin BK, Moon NR, Song B, Kim J, Park S. (2015): The supplementation of Korean mistletoe water extracts reduces hot flushes, dyslipidemia, hepatic steatosis, and muscle loss in ovariectomized rats. *Experimental Biology and Medicine* 240, 477–487.

King AM, Aaron CK. (2015): Organophosphate and carbamate poisoning. *Emergency Medicine Clinics of North America* 33, 133–151.

Klarich, KL, Pflug NC, DeWald EM, Hladik ML, Kolpin DW, Cwiertny DM, LeFevre GH. (2017): Occurrence of neonicotinoid insecticides in finished drinking water and fate during drinking water treatment. *Environmental Science & Technology Letters* 4, 168–173.

Kleinsimon S, Kauczor G, Jaeger S, Eggert A, Seifert G, Delebinski C. (2017): *Viscum*TT induces apoptosis and alters IAP expression in osteosarcoma in vitro and has synergistic action when combined with different chemotherapeutic drugs. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 17, 26.

Kojić KD, Purać SJ, Nikolić VT, Orčić MS, Vujanović D, Ilijević K, Vukašinović LE, Blagojević PD. (2019): Oxidative stress and the activity of antioxidative defense enzymes in overwintering honey bees. *Entomologia Generalis* 39, 33–44.

- Kopjar N, Žunec S, Mendaš G, Micek V, Kašuba V, Mikolić A, Lovaković BT, Milić M, Pavičić I, Čermak AMM, Pizent A, Vrdoljak AL, Želježić D. (2018): Evaluation of chlorpyrifos toxicity through a 28-day study: Cholinesterase activity, oxidative stress responses, parent compound/metabolite levels, and primary DNA damage in blood and brain tissue of adult male Wistar rats. *Chemico-Biological Interactions* 279, 51–63.
- Koren E, Kohen R, Ginsburg I. (2010): Polyphenols enhance total oxidant-scavenging capacities of human blood by binding to red blood cells. *Experimental Biology and Medicine* 235, 689–699.
- Koshland Jr. DE. (1992): The molecule of the year. *Science* 258, 1861.
- Krasylenko Y, Sosnovsky Y, Atamas N, Popov G, Leonenko V, Janošíková K, Sytschak N, Rydlo K, Sytnyk D. (2020): The European mistletoe (*Viscum album* L.): distribution, host range, biotic interactions and management worldwide with special emphasis on Ukraine. *Botany* 98, 499–516.
- Kuang W, Zhang X, Zhu W, Lan Z. (2017): Ligustrazine modulates renal cysteine biosynthesis in rats exposed to cadmium. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 54, 125–132.
- Kumarasamy Y, Byres M, Cox PJ, Jaspars M, Nahar L, Sarker SD. (2007): Screening seeds of some Scottish plants for free radical scavenging activity. *Phytotherapy Research* 21, 615–621.
- Kurt BO, Konukoglu D, Kalayci R, Ozdemir S. (2021): Investigation of the protective role of selenium in the changes caused by chlorpyrifos in trace elements, biochemical and hematological parameters in rats. *Biological Trace Element Research* 200, 228–237.
- Lazarević-Pašti T, Čolović M. (2016): Organophosphorus insecticides: Toxic effects and detoxification, In: Willkinson N. (ed). Organophorous pesticides. Nova science Publishers, New York, USA, p.87.
- Lee I, Eriksson P, Fredriksson A, Buratovic S, Viberg H. (2015): Developmental neurotoxic effects of two pesticides: Behavior and biomolecular studies on chlorpyrifos and carbaryl. *Toxicology and Applied Pharmacology* 288, 429–438.
- Lee YM, Kim YS, Lee Y, Kim J, Sun H, Kim JH, Kim JS. (2012): Inhibitory activities of pancreatic lipase and phosphodiesterase from Korean medicinal plant extracts. *Phytotherapy Research* 26, 778–782.
- Lev E, Ephraim M, Ben-Arye E. (2011): European and Oriental mistletoe: from mythology to contemporary integrative cancer care. *European Journal of Integrative Medicine* 3, 133–137.
- Levine MJ. (2007): Pesticides: A toxic time bomb in our midst. First ed., Praeger Publishers Inc., Westport.
- Li D, Huang Q, Lu M, Zhang L, Yang Z, Zong Z, Tao L. (2015): The organophosphate insecticide chlorpyrifos confers its genotoxic effects by inducing DNA damage and cell apoptosis. *Chemosphere* 135, 387–393.
- Li J, Pang G, Ren F, Fang B. (2019): Chlorpyrifos-induced reproductive toxicity in rats could be partly relieved under high-fat diet. *Chemosphere* 229, 94–102.
- Li S, Chang C, Ma F, Yu C. (2009): Modulating effects of chlorogenic acid on lipids and glucose metabolism and expression of hepatic peroxisome proliferator-activated receptor- α in golden hamsters fed on high fat diet. *Biomedical and Environmental Sciences* 22, 122–129.

- Li W, Lu Z, Li L, Yu Y, Dong S, Men X, Ye B. (2018): Sublethal effects of imidacloprid on the performance of the bird cherry-oat aphid *Rhopalosiphum padi*. *PLoS ONE* 13, e0204097.
- Lipinski B. (2011): Hydroxyl radical and its scavengers in health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2011, 809696.
- Lohiya A, Kumar V, Punia JS. (2017): Imidacloprid induced oxidative stress and histopathological changes in liver of rats. *Indian Journal of Animal Research* 51, 531–536.
- Lonare M, Kumar M, Raut S, Badgujar P, Doltade S, Telang A. (2014): Evaluation of imidacloprid-induced neurotoxicity in male rats: a protective effect of curcumin. *Neurochemistry International* 78, 122–129.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randal RJ. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265–267.
- Lukaszewicz-Hussain A. (2010): Role of oxidative stress in organophosphate insecticide toxicity – Short review. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 98, 145–150.
- Lushchak VI. (2014): Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions* 224, 164–175.
- Lushchak VI. (2011): Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology* 101, 13–30.
- Łuszczewski A, Matyska-Piekarska E, Trefler J, Wawer I, Łacki J, Sliwińska-Stańczyk P. (2007): Reactive oxygen species - physiological and pathological function in the human body. *Reumatologia* 45, 284–289.
- Lv N, Ma K, Li R, Liang P, Liang P, Gao X. (2021): Sublethal and lethal effects of the imidacloprid on the metabolic characteristics based on high-throughput non-targeted metabolomics in *Aphis gossypii* Glover. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 212, 111969.
- Madkour LH. (2020): Effects of interactions between antioxidant defense therapy and ROS. In: Madkour LH (ed). *Reactive oxygen species (ROS), nanoparticles, and endoplasmic reticulum (ER) stress-induced cell death mechanisms*. Academic Press, pp. 645–691.
- Main AR, Webb EB, Goyne KW, Mengel D. (2020): Reduced species richness of native bees in field margins associated with neonicotinoid concentrations in non-target soils. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 287, 106693.
- Majeed M, Pirzadah TB, Mir MA, Hakeem KR, Alharby HF, Alsamadany H, Bamagoos AA, Rehman RU. (2021): Comparative study on phytochemical profile and antioxidant activity of an epiphyte, *Viscum album* L. (white berry mistletoe), derived from different host trees. *Plants* 10, 1191.
- Malhotra N, Chen KHC, Huang JC, Lai HT, Uapipatanakul B, Roldan MJM, Macabeo APG, Ger TR, Hsiao CD. (2021): Physiological effects of neonicotinoid insecticides on non-target aquatic animals - an updated review. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 9591.
- Mansour SA, Mossa AH. (2010): Oxidative damage, biochemical and histopathological alterations in rats exposed to chlorpyrifos and the antioxidant role of zinc. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 96, 14–23.
- Mardones L, Zúñiga FA, Villagrán M, Sotomayor K, Mendoza P, Escobar D, González M, Ormazabal V, Maldonado M, Oñate G, Angulo C, Concha II, Reyes AM, Cárcamo JG, Barra

- V, Vera JC, Rivas CI. (2012): Essential role of intracellular glutathione in controlling ascorbic acid transporter expression and function in rat hepatocytes and hepatoma cells. *Free Radical Biology & Medicine* 52, 1874–1887.
- Marklund S, Marklund G. (1974): Involvement of superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry* 47, 469–474.
- Marrs TC. (2001): Organophosphates: History, Chemistry, Pharmacology. In: Karalliedde L, Feldman S, Henry J, Marrs TC, (eds). *Organophosphates and Health*. First ed. Imperial College Press, London, UK, pp. 1–36.
- Marsillach J, Costa LG, Furlong CE (2013): Protein adducts as biomarkers of exposure to organophosphorus compounds. *Toxicology* 307, 46–54.
- Martelli F, Zhongyuan Z, Wang J, Wong CO, Karagas NE, Roessner U, Rupasinghe T, Venkatachalam K, Perry T, Bellen HJ, Batterham P. (2020): Low doses of the neonicotinoid insecticide imidacloprid induce ROS triggering neurological and metabolic impairments in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117, 25840–25850.
- Martínez V, Ugartondo V, Vinardell MP, Torres JL, Mitjans M. (2012): Grape epicatechin conjugates prevent erythrocyte membrane protein oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 4090–4095.
- Mašković PZ, Veličković V, Đurović S, Zeković Z, Radojković M, Cvetanović A, Švarc-Gajić J, Mitić M, Vujić J. (2018): Biological activity and chemical profile of *Lavatera thuringiaca* L. extracts obtained by different extraction approaches. *Phytomedicine* 38, 118–124.
- Matsuda K, Buckingham SD, Kleier D, Rauh JJ, Grauso M, Sattelle DB. (2001): Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* 22, 573–580.
- Maul K, Krug M, Nickrent DL, Müller KF, Quandt D, Wicke S. (2019): Morphology, geographic distribution, and host preferences are poor predictors of phylogenetic relatedness in the mistletoe genus *Viscum* L. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 131, 106–115.
- Meftaul IM, Venkateswarlu K, Dharmarajan R, Annamalai P, Megharaj M. (2020): Pesticides in the urban environment: A potential threat that knocks at the door. *Science of the Total Environment* 711, 134612.
- Meghana K, Sanjeev G, Ramesh B. (2007): Curcumin prevents streptozotocin-induced islet damage by scavenging free radicals: a prophylactic and protective role. *European Journal of Pharmacology* 577, 183–191.
- Mehanna S, Issa MY, Hassan NH, Hussien AM, Ibrahim MA, Hassanen EI. (2022): *Origanum majorana* essential oil improves the rat's sexual behavior and testicular oxidative damage induced by imidacloprid via modulating the steroidogenesis pathways. *Saudi Pharmaceutical Journal* 30, 1315–1326.
- Mehler WT, Schuler LJ, Lydy MJ. (2008): Examining the joint toxicity of chlorpyrifos and atrazine in the aquatic species: *Lepomis macrochirus*, *Pimephales promelas* and *Chironomus tentans*. *Environmental Pollution* 152, 217–224.

- Mekonnen TF, Panne U, Koch M. (2019): Glucosylation and glutathione conjugation of chlorpyrifos and fluopyram metabolites using electrochemistry/mass spectrometry. *Molecules* 24, 898.
- Melo MNO, Oliveira AP, Wicikowski AF, Carvalho RS, Castro JL, Gomes de Oliveira FA, Pereira HMG, Feo da Veiga V, Capella MMA, Rocha L, Holandino C. (2018): Phenolic compounds from *Viscum album* tinctures enhanced antitumor activity in melanoma murine cancer cells. *Saudi Pharmaceutical Journal* 26, 311–322.
- Miao L, Clair DKS. (2009): Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radical Biology and Medicine* 47, 344–356.
- Miao Z, Miao Z, Wang S, Shi X, Xu S. (2021): Quercetin antagonizes imidacloprid-induced mitochondrial apoptosis through PTEN/PI3K/AKT in grass carp hepatocytes. *Environmental Pollution* 290, 118036.
- Miladinović ĐĆ, Crnić AP, Peković S, Dacić S, Ivanović S, Santibanez JF, Čupić V, Borozan N, Miljaković EA, Borozan S. (2021): Recovery of brain cholinesterases and effect on parameters of oxidative stress and apoptosis in quails (*Coturnix japonica*) after chlorpyrifos and vitamin B1 administration. *Chemico-Biological Interactions* 333, 109312.
- Miladinović ĐĆ. (2019): Ispitivanje antioksidativnog i antiinflamatornog potencijala vitamina B1 kod japanskih prepelica (*Coturnix japonica*) subakutno tretiranih hlorpirifosom. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Beograd.
- Milatovic D, Zaja-Milatovic S, Gupta RC. (2014): Biomarkers of oxidative/nitrosative stress and neurotoxicity. In: Gupta RC. (ed). Biomarkers in Toxicology Academic Press/Elsevier, Amsterdam, pp. 863–881.
- Milošević MD, Paunović MG, Matić MM, Ognjanović BI, Saičić ZS. (2018): Role of selenium and vitamin C in mitigating oxidative stress induced by fenitrothion in rat liver. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 106, 232–238.
- Milošević MD, Paunović MG, Matić MM, Ognjanović BI, Saičić ZS. (2017): The ameliorating effects of selenium and vitamin C against fenitrothion induced blood toxicity in Wistar rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 56, 204–209.
- Mirończuk-Chodakowska I, Witkowska AM, Zujko ME. (2018): Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Advances in Medical Sciences* 63, 68–78.
- Mitchell EAD, Mulhauser B, Mulo M, Mutabazi A, Glauser G, Aebi A. (2017): A worldwide survey of neonicotinoids in honey. *Science* 358, 109–111.
- Mitić NV, Savčić-Petrić SLj. (2002): Pesticidi u poljoprivredi i šumarstvu u Jugoslaviji. Društvo za zaštitu bilja Srbije, Beograd.
- Mladenović JM, Paunović MG, Matić MM, Knežević VS, Ognjanović BI, Štajn AŠ, Saičić ZS. (2014): Copper-induced changes of lipid peroxidation and haemato-biochemical parameters in blood of rats: protective role of flavonoids. *Archives of Biological Sciences* 66, 3, 1271–1279.
- Mohamed F, Gawarammana I, Robertson TA, Roberts MS, Palangasinghe C, Zawahir S, Jayamanne S, Kandasamy J, Eddleston M, Buckley NA, Dawson AH, Roberts DM. (2009): Acute human self-poisoning with imidacloprid compound: a neonicotinoid insecticide. *PLoS One* 4, e5127.

- Mohamed WR, Mehany ABM, Hussein RM. (2018): Alpha lipoic acid protects against chlorpyrifos-induced toxicity in Wistar rats via modulating the apoptotic pathway. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 59, 17–23.
- Mondal M, Hossen MS, Rahman MA, Saha S, Sarkar C, Bhoumik NC, Kundu SK. (2021): Antioxidant mediated protective effect of *Bridelia tomentosa* leaf extract against carbofuran induced oxidative hepatic toxicity. *Toxicology Reports* 8, 1369–1380.
- Mosmann T. (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65, 55–63.
- Mossa AH, Abbassy MA. (2012): Adverse haematological and biochemical effects of certain formulated insecticides in male rats. *Research Journal of Environmental Toxicology* 6, 160–168.
- Mossa AH, Ibrahim FM, Mohafrash SMM, Baker DHA, Gengaihi SE. (2015): Protective effect of ethanolic extract of grape pomace against the adverse effects of cypermethrin on weanling female rats. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2015, 381919.
- Mostafalou S, Abdollahi M. (2012): Concerns of environmental persistence of pesticides and human chronic diseases. *Clinical and Experimental Pharmacology* S5, e002.
- Motaung TE. (2020): Chloronicotinyl insecticide imidacloprid: Agricultural relevance, pitfalls and emerging opportunities. *Crop Protection* 131, 105097.
- Mrduljaš N, Krešić G, Bilušić T. (2017): Polyphenols: Food sources and health benefits. InTech.
- Mulla SI, Ameen F, Talwar MP, Eqani SAMAS, Bharagava RN, Saxena G, Tallur PN, Ninnekar HZ. (2020): Organophosphate Pesticides: Impact on environment, toxicity, and their degradation. In: Saxena G, Bharagava R. (eds). *Bioremediation of Industrial Waste for Environmental Safety*. Springer, Singapore, pp. 265–290.
- Mullin CA, Frazier M, Frazier JL, Ashcraft S, Simonds R, VanEngelsdorp D, Pettis JS. (2010): High levels of miticides and agrochemicals in north American apiaries: implications for honey bee health. *PLoS One* 5, e9754.
- Munro N. (1994): Toxicity of the organophosphate chemical warfare agents GA, GB, and VX: implications for public protection. *Environmental health perspectives* 102, 18–37.
- Nafees S, Rashid S, Ali N, Hasan SK, Sultana S. (2015): Rutin ameliorates cyclophosphamide induced oxidative stress and inflammation in Wistar rats: Role of NFjB/MAPK pathway. *Chemico-Biological Interactions* 231, 98–107.
- Nasr HM, El-Demerdash F, El-Nagar WA. (2016): Neuro and renal toxicity induced by chlorpyrifos and abamectin in rats. *Environmental Science and Pollution Research* 23, 1852–1859.
- Nazaruk J, Orlikowski P. (2015): Phytochemical profile and therapeutic potential of *Viscum album* L. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters* 30, 373–385.
- Nimako C, Ikenaka Y, Akoto O, Fujioka K, Taira K, Arizono K, Kato K, Takahashi K, Nakayama SMM, Ichise T, Ishizuka M. (2021): Simultaneous quantification of imidacloprid and its metabolites in tissues of mice upon chronic low-dose administration of imidacloprid. *Journal of Chromatography A* 1652, 462350.

- Nunes XP, Silva FS, Almeida JRGS, de Lima JT, Ribeiro LAA, Júnior LJ, Filho JMB. (2012): Biological oxidations and antioxidant activity of natural products, phytochemicals as nutraceuticals – Global approaches to Their Role. In: Rao V. (ed). Nutrition and Health. InTech.
- Oei SL, Thronicke A, Schad F. (2019): Mistletoe and immunomodulation: insights and implications for anticancer therapies. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine* 2019, 5893017.
- Ogbonnanya AE, Mounmbegna EP, Monago CC. (2010): Effect of ethanolic extract of mistletoe (*Viscum album* L.) leaves on paracetamol- induced hepatotoxicity in rats. *Journal of Pharmacy Research* 3, 1888–1891.
- Ognjanovič B, Matic M. (2022): Osnove neurofiziologije. Prirodno-matematički fakultet, Kragujevac.
- Ohiri FC, Esimone CO, Nwafor SV, Okoli CO, Ndu OO. (2003): Hypoglycemic properties of *Viscum album* (Mistletoe) in alloxan-induced diabetic animals. *Pharmaceutical Biology* 41, 184–187.
- Ojha A, Srivastava N. (2012): Redox imbalance in rat tissues exposed with organophosphate pesticides and therapeutic potential of antioxidant vitamins. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 75, 230–241.
- Oluwaseun AA, Ganiyu O. (2008): Antioxidant properties of methanolic extracts of mistletoes (*Viscum album*) from cocoa and cashew trees in Nigeria. *African Journal of Biotechnology* 7, 3138–3142.
- Omaye ST, Turnbull JD, Sauberlich HE. (1979): Selected methods for the determination of ascorbic acid in animal cells, tissues and fluids. *Methods in Enzymology* 62, 3–11.
- Önay-Uçar E, Karagöz A, Arda N. (2006). Antioxidant activity of *Viscum album* ssp. *album*. *Fitoterapia* 77, 556–560.
- Orčić S, Nikolić T, Purać J, Šikoparija B, Blagojević DP, Vukašinović E, Plavša N, Stevanović J, Kojić D. (2017): Seasonal variation in the activity of selected antioxidant enzymes and malondialdehyde level in worker honey bees. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 165, 120–128.
- Orhan DD, Aslan M, Sendogdu N, Ergun F, Yesilada E. (2005): Evaluation of the hypoglycemic effect and antioxidant activity of three *Viscum album* subspecies (European mistletoe) in streptozotocin-diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 98, 95–102.
- Oteiza PI, Erlejmán AG, Verstraeten SV, Keen CL, Fraga CG. (2005): Flavonoid–membrane interactions: a protective role of flavonoids at the membrane surface? *Clinical & Developmental Immunology* 12, 19–25.
- Owumi SE, Dim UJ. (2019): Manganese suppresses oxidative stress, inflammation and caspase-3 activation in rats exposed to chlorpyrifos. *Toxicology Reports* 6, 202–209.
- Ozgen S, Kilinc OK, Selamoğlu Z. (2016): Antioxidant Activity of Quercetin: A Mechanistic Review. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology* 4, 1134–1138.
- Padma VV, Lalitha G, Shirony NP, Baskaran R. (2012): Effect of quercetin against lindane induced alterations in the serum and hepatic tissue lipids in wistar rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2, 910–915.

- Paramveer DS, Chanchal MK, Paresh M, Ran A, Shrivastava B, Nema RK. (2010): Effective alternative methods of LD₅₀ help to save number of experimental animals. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 2, 450–453.
- Parr AJ, Bolwell GP. (2000): Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 985–1012.
- Pasdar Y, Oubari F, Zarif MN, Abbasi M, Pourmahmoudi A, Hosseinikia M. (2020): Effects of quercetin supplementation on hematological parameters in non-alcoholic fatty liver disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Clinical Nutrition Research* 9, 11–19.
- Patel DK, Prasad SK, Kumar R, Hemalatha S. (2012): An overview on antidiabetic medicinal plants having insulin mimetic property. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2, 320–330.
- Pehlivan FE. (2017): Vitamin C: an antioxidant agent. In: Amal H. Hamza (ed), Vitamin C, IntechOpen, pp. 23–35.
- Pereira DM, Valentão P, Pereira JA, Andrade PB. (2009): Phenolics: From chemistry to biology. *Molecules* 14, 2202–2211.
- Perez-Fernandez C, Morales-Navas M, Aguilera-Sáez LM, Abreu AC, Guardia-Escote L, Fernández I, Garrido-Cárdenas JA, Colomina MT, Giménez E, Sánchez-Santed F. (2020): Medium and long-term effects of low doses of chlorpyrifos during the postnatal, preweaning developmental stage on sociability, dominance, gut microbiota and plasma metabolites. *Environmental Research* 184, 109341.
- Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. (2015): Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 30, 11–26.
- Pick E, Keisari Y. (1980): A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *Journal of Immunological Methods* 38, 161–170.
- Pietrzak W, Nowak R, Olech M. (2013): Effect of extraction method on phenolic content and antioxidant activity of mistletoe extracts from *Viscum album* subsp. *abietis*. *Chemical Papers* 68, 976–982.
- Pohanka M. (2011): Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc Czech Republic* 155, 219–230.
- Pohanka M. (2014). Inhibitors of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase meet immunity. *International Journal of Molecular Sciences* 15, 9809–9825.
- Pohl F, Lin PKT. (2018): The Potential Use of Plant Natural Products and Plant Extracts with Antioxidant Properties for the Prevention/Treatment of Neurodegenerative Diseases: In Vitro, In Vivo and Clinical Trials. *Molecules* 23, 3283.
- Poliserpi MB, Cristos D, Pérez-Iglesias JM, Brodeur JC. (2021): Tissue distribution and sublethal effects of imidacloprid in the South American grayish baywing (*Agelaioides badius*). *Chemosphere* 284, 131327.

- Prieto P, Pineda M, Aguilar M. (1999): Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry* 269, 337–341.
- Qu S, Dai C, Lang F, Hu L, Tang Q, Wang H, Zhang Y, Hao Z. (2018): Rutin attenuates vancomycin-induced nephrotoxicity by ameliorating oxidative stress, apoptosis, and inflammation in rats. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 63, e01545–18.
- Qu X, Wang S, Lin G, Li M, Shen J, Wang D. (2022): The synergistic effect of thiamethoxam and synapsin dsRNA targets neurotransmission to induce mortality in *Aphis gossypii*. *International Journal of Molecular Sciences* 23, 9388.
- Qureshi IZ, Bibi A, Shahid S, Ghazanfar M. (2016): Exposure to sub-acute doses of fipronil and buprofezin in combination or alone induces biochemical, hematological, histopathological and genotoxic damage in common carp (*Cyprinus carpio L.*). *Aquatic Toxicology* 179, 103–114.
- Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, Dhama K. (2014): Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: The interplay. *BioMed Research International* 2014, 761264.
- Rahimi R, Abdollahi M. (2007): A review on the mechanisms involved in hyperglycaemia induced by organophosphorus pesticide. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 88, 115–121.
- Raibeemol KP, Chitra KC. (2018): Effects of chlorpyrifos as inducer for oxidative stress in liver, kidney and spleen of freshwater fish, *Pseudotroplus maculatus* (Bloch, 1795). *Research & Reviews: A Journal of Toxicology* 8, 20–29.
- Raibeemol KP, Chitra KC. (2020): Induction of immunological, hormonal and histological alterations after sublethal exposure of chlorpyrifos in the freshwater fish, *Pseudotroplus maculatus* (Bloch, 1795). *Fish and Shellfish Immunology* 102, 1–12.
- Raina R, Baba NA, Verma PK, Sultana M, Singh M. (2015): Hepatotoxicity induced by subchronic exposure of fluoride and chlorpyrifos in Wistar rats: Mitigating effect of ascorbic acid. *Biological Trace Element Research* 166, 157–162.
- Rajasekaran FK, Sivagnanam KR, Subramanian S. (2004): Hypoglycemic effect of Aloe vera gel on streptozotocin-induced diabetes in experimental rats. *Journal of Medicinal Food* 7, 61–66.
- Ranjbar A, Solhi H, Mashayekhi FJ, Susanabdi A, Rezaie A, Abdollahi M. (2005): Oxidative stress in acute human poisoning with organophosphorus insecticides; a case control study. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 20, 88–91.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. (1999): Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26, 1231–1237.
- Rehncrona S, Smits DS, Akesson B, Westerberg E, Seisjo BK. (1980): Peroxidative changes in brain cortical fatty acids and phospholipids, as characterized during Fe²⁺- and ascorbic acid-stimulated lipid peroxidation *in vitro*. *Journal of Neurochemistry* 34, 1630–1638.
- Rezende-Teixeira P, Dusi RG, Jimenez PC, Espindola LS, Costa-Lotufo LV. (2022): What can we learn from commercial insecticides? Efficacy, toxicity, environmental impacts, and future developments. *Environmental Pollution* 300, 118983.

- Rharass T, Lantow M, Gbankoto A, Weiss DG, Panáková D, Lucas S. (2017): Ascorbic acid alters cell fate commitment of human neural progenitors in a WNT/ β -catenin/ROS signaling dependent manner. *Journal of Biomedical Sciences* 24, 78.
- Romeh AA, Mekky TM, Ramadan RA, Hendawi MY. (2009): Dissipation of profenofos, imidacloprid and penconazole in tomato fruits and products. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 83, 812–817.
- Rortais A, Arnold G, Dorne JL, More SJ, Sperandio G, Streissl F, Szentes C, Verdonck F. (2017): Risk assessment of pesticides and other stressors in bees: Principles, data gaps and perspectives from the European Food Safety Authority. *Science of The Total Environment* 587–588, 524–537.
- Rutkoski CF, Macagnan N, Folador A, Skovronski VJ, Amaral AMB, Leitemperger J, Costa MD, Hartmann PA, Müller C, Loro VL, Hartmann MT. (2020): Morphological and biochemical traits and mortality in *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae) tadpoles exposed to the insecticide chlorpyrifos. *Chemosphere* 250, 126162.
- Saber TM, Arisha AH, Abo-Elmaaty AMA, Abdelgawad FE, Metwally MMM, Saber T, Mansour MF. (2021): Thymol alleviates imidacloprid-induced testicular toxicity by modulating oxidative stress and expression of steroidogenesis and apoptosis-related genes in adult male rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 221, 112435.
- Sadi G, Sadi Ö. (2010): Antioxidants and regulation of antioxidant enzymes by cellular redox status. *Turkish Journal and Scientific Reviews* 3, 95–107.
- Salem IB, Boussabbeh M, Graiet I, Rhouma A, Bacha H, Essefi SA. (2016): Quercetin protects HCT116 cells from Dichlorvos-induced oxidative stress and apoptosis. *Cell Stress and Chaperones* 21, 179–186.
- Salyha N, Salyha Y. (2018): Protective role of L-glutamic acid and L-cysteine in mitigation the chlorpyrifos-induced oxidative stress in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 64, 155–163.
- Schaller G, Urech K, Giannattasio M. (1996): Cytotoxicity of different viscotoxins and extracts from the European subspecies of *Viscum album* L. *Phytotherapy Research* 10, 473–477.
- Schmidt E, Gerhardt W, Henkel E, et al. (1992): Proposal of Standard Methods for the Determination of Enzyme Catalytic Concentrations in Serum and Plasma at 37 °C. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 30, 163–170.
- Schmidt S. (2018): Promotional consideration: a potential mechanistic link between neonicotinoid insecticides and hormone-dependent breast cancer. *Environmental Health Perspectives* 126, 114001.
- Schmidt TS, Miller JL, Mahler BJ, Metre PCV, Nowell LH, Sandstrom MW, Carlisle DM, Moran PW, Bradley PM. (2022): Ecological consequences of neonicotinoid mixtures in streams. *Science Advances* 8, eabj8182.
- Schulz-Jander DA, Casida JE. (2002): Imidacloprid insecticide metabolism: Human cytochrome P450 isozymes differ in selectivity for imidazolidine oxidation versus nitroimine reduction. *Toxicology Letters* 132, 65–70.
- Seccia S, Fidente P, Montesano D, Morrìca P. (2008): Determination of neonicotinoid insecticides residues in bovine milk samples by solid-phase extraction clean-up and liquid chromatography with diode-array detection. *Journal of Chromatography A* 1214, 115–120.

- Selmi S, Rtibi K, Grami D, Sebai H, Marzouki L. (2018): Malathion, an organophosphate insecticide, provokes metabolic, histopathologic and molecular disorders in liver and kidney in prepubertal male mice. *Toxicology Reports* 5, 189–195.
- Selvakumar K, Bavithra S, Suganya S, Bhat FA, Krishnamoorthy G, Arunakaran J. (2013): Effect of quercetin on haematobiochemical and histological changes in the liver of polychlorinated biphenyls-induced adult male Wistar rats. *Journal of Biomarkers* 2013, 960125.
- Sen S, Chakraborty R, Sridhar C, Reddy YSR, De B. (2010): Free radicals, antioxidants, diseases and phytochemicals: current status and future prospect. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 3, 91–100.
- Sengul M, Yildiz H, Gungor N, Cetin B, Eser Z, Ercisli S. (2009): Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medical plants. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 22, 102–106.
- Şenyildiz M, Kilinc A, Ozden S. (2018): Investigation of the genotoxic and cytotoxic effects of widely used neonicotinoid insecticides in HepG2 and SH-SY5Y cells. *Toxicology and Industrial Health* 34, 375–383.
- Sgolastra F, Medrzycki P, Bortolotti L, Maini S, Porrini C, Simon-Delso N, Bosch J. (2020): Bees and pesticide regulation: Lessons from the neonicotinoid experience. *Biological Conservation* 241, 108356.
- Shahaboddin M, Pouramir M, Moghadamnia A, Lakzaei M, Mirhashemi S, Motallebi M. (2011): Antihyperglycemic and antioxidant activity of *Viscum album* extract. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 5, 432–436.
- Sharma A, Shukla A, Attri K, Kumar M, Kumar P, Suttee A, Singh G, Barnwal RP, Singla N. (2020): Global trends in pesticides: A looming threat and viable alternatives. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 201, 110812.
- Sharma D, Sangha GK. (2014): Triazophos induced oxidative stress and histomorphological changes in liver and kidney of female albino rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 110, 71–80.
- Sharma N, Biswas S, Al-Dayyan N, Alhegaili AS, Sarwat M. (2021): Antioxidant role of kaempferol in prevention of hepatocellular carcinoma. *Antioxidants* 10, 1419.
- Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M. (2012): Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany* 2012, 217037.
- Sheets L.P. (2002): The Neonicotinoid Insecticides. In: Massaro EJ. (ed). *Handbook of Neurotoxicology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 79-81.
- Sheets LP, Li AA, Minnema DJ, Collier RH, Creek MR, Peffer RC. (2016): A critical review of neonicotinoid insecticides for developmental neurotoxicity. *Critical Reviews in Toxicology* 46, 153–190.
- Sheets LP. (2010): Imidacloprid: A neonicotinoid insecticide, in: R. Krieger (ed). *Handbook of Pesticide Toxicology*. Third ed, Academic Press, USA, pp. 2055–2064.
- Shen Y, Song X, Li L, Sun J, Jaiswal Y, Huang J, Liu C, Yang W, Williams L, Zhang H, Guan Y. (2019): Protective effects of p-coumaric acid against oxidant and hyperlipidemia-an in vitro and in vivo evaluation. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 111, 579–587.

- Shrinet K, Singh RK, Chaurasia AK, Tripathi A, Kumar A. (2021): Bioactive compounds and their future therapeutic applications. In: Sinha R, Häder D. (eds). *Natural Bioactive Compounds*. Academic Press, 337–362.
- Silver MK, Shao Jie, Zhu B, Chen M, Xia Y, Kaciroti N, Lozoff B, Meeker JD. (2017): Prenatal naled and chlorpyrifos exposure is associated with deficits in infant motor function in a cohort of Chinese infants. *Environment International* 106, 248–256.
- Simon-Delso N, Amaral-Rogers V, Belzunces LP, Bonmatin JM, Chagnon M, Downs C, Furlan L, Gibbons DW, Giorio C, Girolami V, Goulson D, Kreutzweiser DP, Krupke CH, Liess M, Long E, McField M, Mineau P, Mitchell EAD, Morrissey CA, Noome DA, Pisa L, Settele J, Stark JD, Tapparo A, Dyck HV, Praagh JV, Van der Sluijs JP, Whitehorn PR, Wiemers M. (2015): Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 5–34.
- Singh BN, Saha C, Galun D, Upreti DK, Bayry J, Kaveri SV. (2016): European *Viscum album*: a potent phytotherapeutic agent with multifarious phytochemicals, pharmacological properties and clinical evidence. *RSC Advances* 6, 23837–23857.
- Singh D, Arya PV, Aggarwal VP, Gupta RS. (2014): Evaluation of antioxidant and hepatoprotective activities of *Moringa oleifera* Lam. leaves in carbon tetrachloride-intoxicated rats. *Antioxidants* 3, 569–591.
- Singh DK. (2012): *Pesticide chemistry and toxicology*. Bentham eBooks.
- Singh P, Kesharwani RK, Keservani RK. (2017): Antioxidants and Vitamins: Roles in cellular function and metabolism. Roles in Cellular Function and Metabolism. In: Bagchi D. (ed). Sustained energy for enhanced human functions and activity. Academic Press, pp. 385–407.
- Singleton VL, Rossi JA. (1965): Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16, 144–158.
- Siregar P, Suryanto ME, Chen KHC, Huang JC, Chen HM, Kurnia KA, Santoso F, Hussain A, Hieu BTN, Saputra F, Audira G, Roldan MJM, Fernandez RA, Macabeo APG, Lai HT, Hsiao CD. (2021): Exploiting the freshwater shrimp *Neocaridina denticulata* as aquatic invertebrate model to evaluate nontargeted pesticide induced toxicity by investigating physiologic and biochemical parameters. *Antioxidants* 10, 391.
- Smirnoff N, Wheeler GL. (2000): Ascorbic acid in plants: Biosynthesis and function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 35, 291–314.
- Smith A, Yu X, Yin L. (2018): Diazinon exposure activated transcriptional factors CCAAT-enhancerbinding proteins α (C/EBP α) and peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) and induced adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 150, 48–58.
- Solecki R. (2001): Pesticide residues in food. Toxicological evaluations – imidacloprid. Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues, JMPR. <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2001pr07.htm/> (accessed 01.06.12).
- Spodniewska A, Zasadovski A. (2008): Content of glutathione and vitamin C in the liver of rats exposed to dimethoate and pyrantel tartrate. *Acta Veterinaria Brno* 77, 355–362.
- Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. (1992): Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 258, 1898–1902.

- Stanley J, Preetha G, Stanley J. (2016): Pesticide toxicity to non-target organisms (Vol. 502). Springer, Berlin, Germany.
- Stefanucci A, Zengin G, Llorent-Martinez EJ, Dimmito MP, Valle AD, Pieretti S, Ak G, Sinan KI, Mollica A. (2020): *Viscum album* L. homogenizer-assisted and ultrasound-assisted extracts as potential sources of bioactive compounds. *Journal of Food Biochemistry* 44, e13377.
- Steinborn C, Klemd AM, Sanchez-Campillo AS, Rieger S, Scheffen M, Sauer B, Garcia-Käufer M, Urech K, Follo M, Ücker A, Kienle GS, Huber R, Gründemann C. (2017): *Viscum album* neutralizes tumor-induced immunosuppression in a human in vitro cell model. *PLoS ONE* 12, e0181553.
- Sun J, Wang H, Liu B, Shi W, Shi J, Zhang Z, Xing J. (2017a): Rutin attenuates H₂O₂-induced oxidation damage and apoptosis in Leydig cells by activating PI3K/Akt signal pathways. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 88, 500–506.
- Sun Q, Qi W, Xiao X, Yang S, Kim D, Yoon KS, Clark JM, Park Y. (2017b): Imidacloprid Promotes high fat diet-induced adiposity in female C57BL/6J mice and enhances adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes via the AMPK α -mediated pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65, 6572–6581.
- Supreeth M, Chandrashekar MA, Sachin N, Raju NS. (2016): Effect of chlorpyrifos on soil microbial diversity and its biotransformation by *Streptomyces* sp. HP-11. *3 Biotech* 6, 147.
- Supreeth M, Raju NS. (2017): Biotransformation of chlorpyrifos and endosulfan by bacteria and fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 101, 5961–5971.
- Suveren E, Baxter GF, Iskit AB, Turker AU. (2017): Cardioprotective effects of *Viscum album* L. subsp. album (European mistletoe) leaf extracts in myocardial ischemia and reperfusion. *Journal of Ethnopharmacology* 209, 203–209.
- Swenson TL. (2013): Neonicotinoid insecticide metabolism and mechanisms of toxicity in mammals. Doktorska disertacija, Univerzitet u Kaliforniji, Berkli.
- Szurpnicka A, Kowalczyk A, Szterk A. (2020): Biological activity of mistletoe: in vitro and in vivo studies and mechanisms of action. *Archives of Pharmacal Research* 43, 593–629.
- Šeremešić S, Vojnov B, Manojlović M, Milošev D, Ugrenović V, Filipović V, Babec B. (2017): Organska poljoprivreda u službi biodiverziteta i zdravlja. *Letopis naučnih radova* 41, 51–60.
- Tabiasco J, Pont F, Fournié J, Vercellone A. (2002): Mistletoe viscotoxins increase natural killer cell-mediated cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry* 269, 2591–2600.
- Takeshima T, Usui K, Mori K, Asai T, Yasuda K, Kuroda S, Yumura Y. (2021): Oxidative stress and male infertility. *Reproductive Medicine and Biology* 20, 41–52.
- Tamura M, Oschino N, Chance B. (1982): Some characteristics of hydrogen and alkylhydroperoxides metabolizing systems in cardiac tissue. *The Journal of Biochemistry* 92, 1019–1031.
- Tano ZJ. (2011): Identity physical and chemical properties of pesticides. In: Pesticides in the Modern World: Trends in Pesticides Analysis, InTech Open, UK, pp. 1–18.
- Tanvir EM, Afroz R, Chowdhury MAZ, Gan SH, Karim N, Islam MN, Khalil MI. (2016): A model of chlorpyrifos distribution and its biochemical effects on the liver and kidneys of rats. *Human and Experimental Toxicology* 35, 991–1004.

- Tanvir EM, Afroz R, Chowdhury MAZ, Khalil MI, Hossain MS, Rahman A, Rashid H, Gan SH. (2015): Honey has a protective effect against chlorpyrifos-induced toxicity on lipid peroxidation, diagnostic markers and hepatic histoarchitecture. *European Journal of Integrative Medicine* 7, 525–533.
- Telange DR, Patil AT, Pethe AM, Fegade H, Anand S, Dave VS. (2017): Formulation and characterization of an apigenin-phospholipid phytosome (APLC) for improved solubility, in vivo bioavailability, and antioxidant potential. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 108, 36–49.
- Teodorović I, Kaišarević S. (2015): Ekotoksikologija. Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad.
- Terry AV. (2012): Functional consequences of repeated organophosphate exposure: Potential non-cholinergic mechanisms. *Pharmacology & Therapeutics* 134, 355–365.
- Testai E, Buratti FM, Di Consiglio E. (2010): Chlorpyrifos. In: Krieger R. (ed). *Handbook of Pesticide Toxicology*. Third ed, Academic Press, USA, pp. 1505–1526.
- Thompson DA, Lehmler H, Kolpin DW, Hladik ML, Vargo JD, Schilling KE, LeFevre GH, Peeples TL, Poch MC, LaDuca LE, Cwiertny DM, Field RW. (2020): A critical review on the potential impacts of neonicotinoid insecticide use: current knowledge of environmental fate, toxicity, and implications for human health. *Environmental Science: Processes & Impacts* 22, 1315–1346.
- Tišma NB. (2016): Ispitivanje imunomodulatornog i citotoksičnog efekta vodenog ekstrakta bele imele (*Viscum album* L.) *in vitro* i u pacijentkinja na terapiji antraciklinskim hemioterapeuticima. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Beograd.
- Tomizawa M, Casida JE. (2003): Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annual Review Entomology* 48, 339–364.
- Tomizawa M, Casida JE. (2005): Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 45, 247–268.
- Tomizawa M, Casida JE. (2009): Molecular recognition of neonicotinoid insecticides: The determinants of life or death. *Accounts of Chemical Research* 42, 260–269.
- Tomizawa M, Cowan A, Casida JE. (2001): Analgesic and toxic effects of neonicotinoid insecticides in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* 177, 77–83.
- Tomlin CD, Tomlin S. (1997): *The Pesticide Manual*, The British Crop Protection Council, Surrey, UK.
- Toor HK, Sangha GK, Khera KS. (2013): Imidacloprid induced histological and biochemical alterations in liver of female albino rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 105, 1–4.
- Topal A, Alak G, Ozkaraca M, Yeltekin AC, Comaklı S, Acil G, Kokturk M, Atamanalp M. (2017): Neurotoxic responses in brain tissues of rainbow trout exposed to imidacloprid pesticide: Assessment of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine activity, oxidative stress and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere* 175, 186–191.
- Triassi M, Nardone A, Giovinetti MC, De Rosa E, Canzanella S, Sarnacchiaro P, Montuori P. (2019): Ecological risk and estimates of organophosphate pesticides loads into the Central Mediterranean Sea from Volturno River, the river of the “Land of Fires” area, southern Italy. *Science of the Total Environment* 678, 741–754.

- Triastuti A, Park H-J, Choi JW. (2009): *Phaleria macrocarpa* suppress nephropathy by increasing renal antioxidant enzyme activity in alloxan induced diabetic rats. *Natural Products Sciences* 15, 167–172.
- Tsai M, Wang Y, Lai Y, Tsou H, Liou G, Ko J, Wang S. (2018): Kaempferol protects against propacetamol-induced acute liver injury through CYP2E1 inactivation, UGT1A1 activation, and attenuation of oxidative stress, inflammation and apoptosis in mice. *Toxicology Letters* 290, 97–109.
- Tsai Y, Lein PJ. (2021): Mechanisms of organophosphate neurotoxicity. *Current Opinion in Toxicology* 26, 49–60.
- Tsaroucha AK, Tsiaousidou A, Ouzounidis N, Tsalkidou E, Lambropoulou M, Giakoustidis D, Chatzaki E, Simopoulos C. (2016): Intraperitoneal administration of apigenin in liver ischemia/reperfusion injury protective effects. *Saudi Journal of Gastroenterology* 22, 415–422.
- Tvrđá E, Benko F. (2020): Free radicals: what they are and what they do. In: Preedy VR. (ed). *Pathology*. Academic Press. 3–13.
- Twardziok M, Kleinsimon S, Rolff J, Jäger S, Eggert A, Seifert G, Delebinski CI. (2016): Multiple active compounds from *Viscum album* L. synergistically converge to promote apoptosis in ewing sarcoma. *PLoS ONE* 11, e0159749.
- U.S. Environmental Protection Agency. (U.S. EPA, 2021a): Clothianidin executive summary for draft biological evaluation.
- U.S. Environmental Protection Agency. (U.S. EPA, 2021b): Imidacloprid executive summary for draft biological evaluation.
- U.S. Environmental Protection Agency. (U.S. EPA, 2021c): Thiamethoxam executive summary for draft biological evaluation.
- Uchendu C, Ambali SF, Ayo JO. (2012): The organophosphate chlorpyrifos, oxidative stress and the role of some antioxidants: a review. *African Journal of Agricultural Research* 7, 2720–2728.
- Ullah S, Li Z, Hasan Z, Khan SU, Fahad S. (2018): Malathion induced oxidative stress leads to histopathological and biochemical toxicity in the liver of rohu (*Labeo rohita*, Hamilton) at acute concentration. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 161, 270–280.
- Underwood E, Darwin G, Gerritsen E. (2017): Pollinator initiatives in EU member states: success factors and gaps. Institute for European Environmental Policy - IEEP.
- Urech K, Baumgartner S. (2015): Chemical Constituents of *Viscum album* L.: implications for the pharmaceutical preparation of mistletoe, mistletoe: from mythology to evidence-based medicine. *Translational Research in Biomedicine* 4, 11–23.
- US EPA (2006): Reregistration Eligibility Decision for Chlorpyrifos. United States Environmental Protection Agency, Washington, D.C.
- US EPA (2009): Memorandum. Chlorpyrifos. Revised Human Health Assessment Scoping Document in Support of Registration Review. February 9. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency, Washington, D.C.

- USDA (2014): Pesticide Data Program: Annual Summary, 2013. US Department of Agriculture.
<https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/2013%20PDP%20Annual%20Summary>.
- USDA (2016): Pesticide Data Program: Annual Summary, 2014. US Department of Agriculture.
<https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/2014%20PDP%20Annual%20Summary.pdf>.
- Uzun FG, Kalender S, Durak D, Demir F, Kalender Y. (2009): Malathion-induced testicular toxicity in male rats and the protective effect of vitamins C and E. *Food and Chemical Toxicology* 47, 1903–1908.
- Uzun FG, Kalender Y. (2013): Chlorpyrifos induced hepatotoxic and hematologic changes in rats: The role of quercetin and catechin. *Food and Chemical Toxicology* 55, 549–556.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. (2007): Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39, 44–84.
- Valko M, Moriss H, Cronin MTD. (2005): Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry* 12, 1161–1208.
- Valle ACV, de Carvalho AC, Andrade RV. (2021): *Viscum album* - Literature Review. *International Journal of Science and Research* 10, 63–71.
- van de Merwe JP, Neale PA, Melvin SD, Leusch FD. (2018): *In vitro* bioassays reveal that additives are significant contributors to the toxicity of commercial household pesticides. *Aquatic Toxicology* 199, 263–268.
- Vanova N, Pejchal J, Herman D, Dlabkova A, Jun D. (2018): Oxidative stress in organophosphate poisoning: role of standard antidotal therapy. *Journal of Applied Toxicology* 38, 1058–1070.
- Vašková J, Vaško L, Kron I. (2012): Oxidative processes and antioxidative metalloenzymes. In: El-Missiry MA. (ed). *Antioxidant Enzyme*. InTech.
- Veličković VM. (2021): Polifenolni profil i biohemijska aktivnost ekstrakata odabranih biljnih vrsta kao izvora potencijalnih prirodnih nutraceutika. Doktorska disertacija, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac.
- Ventura C, Nieto MR, Bourguignon N, Lux-Lantos V, Rodriguez H, Cao G, Randi A, Cocca C, Núñez M. (2016): Pesticide chlorpyrifos acts as an endocrine disruptor in adult rats causing changes in mammary gland and hormonal balance. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 156, 1–9.
- Vermerris W, Nicholson R. (2006): *Phenolic compound biochemistry*. First ed, Dordrecht, Netherlands, Springer.
- Vicaș SI, Rugină D, Socaciu C. (2011): Comparative study about antioxidant activities of *Viscum album* from different host trees, harvested in different seasons. *Journal of Medicinal Plants Research* 5, 2237–2244.
- Vieira CED, Pérez MR, Acayaba RD, Raimundo CCM, Martinez CBR. (2018): DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in different tissues of the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* 195, 125–134.

- Vohra P, Khera KS, Sangha GK. (2014): Physiological, biochemical and histological alterations induced by administration of imidacloprid in female albino rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 110, 50–56.
- Vučinić S, Antonijević B, Brkić D. (2014): Occupational and environmental aspects of organophosphorus compounds. In: Balali-Mood M, Abdollahi M. (eds). Basic and clinical toxicology of organophosphorus compounds. Springer-Verlag, London, pp. 213–244.
- Wang F, Yao J, Chen H, Chen K, Trebše P, Zaray G. (2010): Comparative toxicity of chlorpyrifos and its oxon derivatives to soil microbial activity by combined methods. *Chemosphere* 78, 319–326.
- Wang X, Anadón A, Wu Q, Qiao F, Ares I, Martínez-Larrañaga, Yuan Z, Martínez M. (2018): Mechanism of neonicotinoid toxicity: Impact on oxidative stress and metabolism. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 58, 471–507.
- Watts M. (2013): Chlorpyrifos. Pesticide action network Asia and the Pacific (PAN AP).
- WHO (1997): The WHO recommended classification of pesticides by hazard 1996–1997, International programme on chemical safety, WHO/IPCS/96.3.
- WHO (2019): Recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification, 2019 edition. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Williams RJ, Spencer JP, Rice-Evans C. (2004): Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radical Biology & Medicine* 36, 838–849.
- Wink DA, Mitchell JB. (1998): Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radical Biology and Medicine* 25, 434–456.
- Woodcock BA, Isaac NJB, Bullock JM, Roy DB, Garthwaite DG, Crowe A, Pywell RF. (2016): Impacts of neonicotinoid use on long-term population changes in wild bees in England. *Nature Communications* 7, 12459.
- World Health Organization, WHO specifications and evaluations for public health pesticides, 2009. Chlorpyrifos O,O-diethyl O-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate, http://www.who.int/whopes/quality/Chlorpyrifos_WHO_specs_eval_Mar_2009.pdf, Accessed date: 23 February 2017.
- Wu Q, Li W, Zhao J, Sun W, Yang Q, Chen C, Xia P, Zhu J, Zhou Y, Huang G, Yong C, Zheng M, Zhou E, Gao K. (2021): Apigenin ameliorates doxorubicin-induced renal injury via inhibition of oxidative stress and inflammation. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 137, 111308.
- Xiao X, Clark JM, Park Y. (2017): Potential contribution of insecticide exposure and development of obesity and type 2 diabetes. *Food and Chemical Toxicology* 105, 456–474.
- Xu D, Hu MJ, Wang YQ, Cui YL. (2019): Antioxidant activities of quercetin and its complexes for medicinal application. *Molecules* 24, 1123.
- Yamamoto I, Yabuta G, Tomizawa M, Saito T, Miyamoto T, Kagabu S. (1995): Molecular mechanism for selective toxicity of nicotinoids and neonicotinoids. *Journal of Pesticide Science* 20, 33–40.

- Yan S, Wang J, Zhu L, Chen A, Wang J. (2015): Toxic effects of nitenpyram on antioxidant enzyme system and DNA in zebrafish (*Danio rerio*) livers. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 122, 54–60.
- Yang J, Wang XY, Xue J, Gu ZL, Xie ML. (2013): Protective effect of apigenin on mouse acute liver injury induced by acetaminophen is associated with increment of hepatic glutathione reductase activity. *Food & Function* 4, 939–943.
- Yang KJ, Lee J, Park HL. (2020): Organophosphate pesticide exposure and breast cancer risk: a rapid review of human, animal, and cell-based studies. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 17, 5030.
- Yardimci M, Sevgiler Y, Rencuzogullari E, Arslan M, Buyukleyla M, Yilmaz M. (2014): Sex-, tissue-, and exposure duration-dependent effects of imidacloprid modulated by piperonyl butoxide and menadione in rats. Part I: oxidative and neurotoxic potentials. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 65, 387–398.
- Ye R, Yang J, Hai D, Liu N, Ma L, Lan X, Niu J, Zheng P, Yu J. (2020): Interplay between male reproductive system dysfunction and the therapeutic effect of flavonoids. *Fitoterapia* 147, 104756.
- Yonar ME. (2018): Chlorpyrifos-induced biochemical changes in *Cyprinus carpio*: Ameliorative effect of curcumin. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 151, 49–54.
- Yousef MI, Omar SAM, El-Guendi MI, Abdelmegid LA. (2010): Potential protective effects of quercetin and curcumin on paracetamol-induced histological changes, oxidative stress, impaired liver and kidney functions and haematotoxicity in rat. *Food and Chemical Toxicology* 48, 3246–3261.
- Yu, SJ. (2015): The toxicology and biochemistry of insecticides. Second ed. CRC Press, Boca Raton.
- Yusuf L, Oladunmoye MK, Ogundare AO. (2015): Hepatoprotective effect of methanolic leave extracts of *V. album* on paracetamol-induced laboratory animals. *International Journal of Pharmacology, Phytochemistry and Ethnomedicine* 1, 46–54.
- Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. (2002): Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine* 33, 337–349.
- Zeng X, Du Z, Ding X, Jiang W. (2021): Protective effects of dietary flavonoids against pesticide-induced toxicity: A review. *Trends in Food Science & Technology* 109, 271–279.
- Zhang N, Zhu L, Zhang R, Zhang C, Cheng J, Tao L, Zhang Y, Xu W. (2021): Evaluation of toxicological effects of organophosphorus pesticide metabolites on human HepG2 cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 88, 103741.
- Zhang Q, Li Z, Chang CH, Lou JL, Zhao MR, Lu C. (2018): Potential human exposures to neonicotinoid insecticides: A review. *Environmental Pollution* 236, 71–81.
- Zhang YX, Yang YX, Sun HH, Liu ZW. (2016): Metabolic imidacloprid resistance in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, relies on multiple P450 enzymes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 79, 50–56.
- Zhao G, Li J, Yang F, Yin X, Ren F, Fang B, Pang G. (2021b): Spermogenesis toxicity of imidacloprid in rats, possible role of CYP3A4. *Chemosphere* 282, 131120.

- Zhao L, Tang G, Xiong C, Han S, Yang C, He K, Liu Q, Luo J, Luo W, Wang Y, Li Z, Yang S. (2021a): Chronic chlorpyrifos exposure induces oxidative stress, apoptosis and immune dysfunction in largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Environmental Pollution* 282, 117010.
- Zhao M, Yang P, Zhao L. (2019): Chlorpyrifos activates cell pyroptosis and increases susceptibility on oxidative stress-induced toxicity by miR-181/SIRT1/PGC-1 α /Nrf2 signaling pathway in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: Implication for association between chlorpyrifos and Parkinson's disease. *Environmental Toxicology* 34, 699–707.
- Zhitkovich A. (2020): Nuclear and cytoplasmic functions of vitamin C. *Chemical Research in Toxicology* 33, 2515–2526.
- Zhou YF, Guo B, Ye MJ, Liao RF, Li SL. (2016): Protective effect of rutin against H₂O₂-induced oxidative stress and apoptosis in human lens epithelial cells. *Current Eye Research* 41, 933–942.
- Zidan NEA. (2015): Hepato- and nephrotoxicity in male albino rats exposed to malathion and spinosad in stored wheat grains. *Acta Biologica Hungarica* 66, 133–148.
- Zlatković M. (2016): Uticaj terapijske primene natrijum hidrogenkarbonata na toksikokinetiku organofosfornih insekticida u lečenju bolesnika sa akutnim trovanjem. Vojnomedicinska akademija, Beograd.
- Zloch Z, Ginter E. (1995): Moderate alcohol consumption and vitamin C status in the guinea-pig and the rat. *Physiological Research* 44, 173–178.
- Želježić D, Mladinić M, Žunec S, Vrdoljak AL, Kašuba V, Tariba B, Živković T, Marjanović AM, Pavičić I, Milić M, Rozgaj R, Kopjar N. (2016): Cytotoxic, genotoxic and biochemical markers of insecticide toxicity evaluated in human peripheral blood lymphocytes and an HepG2 cell line. *Food and Chemical Toxicology* 96, 90–106.

Lista skraćenica

- $^1\text{O}_2$ – singlet kiseonik
3,5-DPD – 3,5-dihlorofenil diazonijum
4-AAP – 4-aminoantipirin
4OH-IMI – 4-hidroksi-IMI
5OH-IMI – 5-hidroksi-IMI
6-CAN – 6-hloronikotinska kiselina
ABTS^{**+} – 2,2'-azino-*bis*-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat
acetil CoA – acetil koenzim A
ACh – acetilholin
AChE – acetilholinesteraza
AChR – holinergični receptor
ACS – acil-CoA sintetaza
ALP – alkalna fosfataza
ALT – alanin aminotransferaza
AOS – antioksidativni zaštitni sistem (engl. *Antioxidant defence system*)
AOX – aldehid oksidaza
AST – aspartat aminotransferaza
BSA – goveđi serum albumin (engl. *Bovin Serum Albumin*)
BuChE – butirilholinesteraza
CarbE – karboksilesteraza
CCD – Colony Collaps Disorder
CDNB – 1-hloro-2,4-dinitro-benzen
Ch – holin
ChAT – holin acetiltransferaza
ChE – holinesteraza
CDK – ciklin-zavisna proteinska kinaza
CYP450 – citohrom-P450
CNS – centralni nervni sistem
COPIND – hronični organofosfatima izazvan neuropsihijatrijski poremećaj

CPF – hlorpirifos
CPFO – hlorpirifos okson
CPT1 – karnitinska palmitoiltransferaza 1
CPT2 – karnitinska palmitoiltransferaza 2
DAsA – dehidroaskorbinska kiselina
DDT – dihlor-difenil-trihloretan
DEP – dietil fosfat
DETP – dietil tiofosfat
DFP-aza – diizopropilfluorofosfataza
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO – dimetil-sulfoksid
DNFH – 2,4-dinitrofenilhidrazin
dn-IMI – guanidin
DPPH• – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DTNB – 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoeva kiselina)
EDRF – endotel-produkujući relaksirajući faktor (engl. *Endothelium-Derived Relaxing Factor*)
EFSA – Evropska agencija za bezbednost hrane (engl. *European Food Safety Authority*)
FBS – fetalni goveđi serum
FMO – flavin-mono-oksigenaza
G3PDX – gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza
G6PDH – glukoza-6-fosfat dehidrogenaza
GLDH – glutamat dehidrogenaza
GR – glutation reduktaza
GSH – redukovani glutation
GSH-Px – glutation peroksidaza
GSSG – oksidovani glutation
GST – glutation-S-transferaza
H₂O₂ – vodonik peroksid
Hb – hemoglobin
Hct – hematokrit
HK – heksokinaza

HNO₂ – azotasta kiselina

HO₂^{*} – hidroperoksil radikal

HOCl – hipohlorasta kiselina

HPG – hipotalamus-hipofiza-gonadalna osa

HPLC – tečna hromatografija visokih performansi (engl. *High-Performance Liquid Chromatography*)

HRPO – peroksidaza rena (engl. *horseradish peroxidase*)

IGRs – regulatori rasta insekata

IMI – imidaklopid

IMI-ole – imidaklopid-olefin

IMS – intermedijarni sindrom

IRAC – Insecticide Resistance Action Committee

LDH – laktat dehidrogenaza

LH – luteinizirajući hormon

LPL – lipoproteinska lipaza

mAChR – muskarinski acetilholinski receptor

MDA – malondialdehid

MDH – malat dehidrogenaza

MFO – microsomal mixed function oxidase

MRC-5 – human lung fibroblasts

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromid

N₂O₃ – azot trioksid

N₂O₄ – azot tetraoksid

nAChR – nikotinski acetilholinski receptor

NED – N-1-naftiletildiamin dihidrohlorid

NO⁻ – nitrozil anjon

NO⁺ – nitrozil katjon

NO^{*} – azot oksid

NO₂⁺ – nitril jon

NO₂^{*} – azot dioksid

NO₂Cl – nitril hlorid

NOS – azot oksid sintaza

NTE – neurotoksična esteraza
O₂^{•-} – superoksid radikal
O₃ – ozon
OFJ – organofosforna jedinjenja
OH[•] – hidroksil radikal
ONOO⁻ – peroksinitrit
ONOOH – peroksinitritna kiselina
OPINP – organofosfatima izazvana naknadna polineuropatija
PLT – trombociti
PNS – periferni nervni sistem
PON1 – paraoksonaza 1
PUFAs – polinezasićene masne kiseline (engl. *Polyunsaturated Fatty Acids*)
RBC – eritrociti (engl. *Red Blood Cells*)
RNS – reaktivne vrste azota (engl. *Reactive Nitrogen Species*)
RO[•] – alkoksil radikal
RO₂[•] – peroksil radikal
ROONO – alkil peroksinitrit
ROS – reaktivne vrste kiseonika (engl. *Reactive Oxygen Species*)
RTK – receptor tirozin kinaze
-SH – sulfhidrilna grupa
SOD – superoksid dismutaza
TCA ciklus – ciklus trikarbonskih kiselina
TCP – 3,5,6-trihloro-2-piridinol
TMD – trans-membranski domen
TNB – 5'-tio-2-nitrobenzoeva kiselina
TO• – α-tokoferol radikal
U.S. EPA – agencija Sjedinjenih država za zaštitu životne sredine
VAE – *Viscum album* ekstrakt
WBC – leukociti (engl. *White Blood Cells*)
WHO – Svetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*)
ATCC – American Type Culture Collection

Lista slika

- Slika 1.** Shematski prikaz rasprostiranja pesticida u životnoj sredini
- Slika 2.** a) Strukturna formula organofosfata; b) Najčešće korišćeni organofosforni insekticidi
- Slika 3.** Shema organizacije autonomnog nervnog sistema
- Slika 4.** Sinaptička transmisija ACh
- Slika 5.** Mehanizam hidrolize ACh i interakcije sa AChE
- Slika 6.** Mehanizam interakcije AChE sa organofosfatom
- Slika 7.** Metabolizam hlorspirifosa
- Slika 8.** Neonikotinoidni insekticidi i godina uvođenja na tržište
- Slika 9.** Model organizmi vrsta beskičmenjaka i kičmenjaka koji se koriste za proučavanje toksičnosti neonikotinoida
- Slika 10.** Mehanizam delovanja neonikotinoida
- Slika 11.** Putevi metabolizma imidakloprida
- Slika 12.** Dinamika nivoa ROS u biološkim sistemima pod kontrolnim i stresnim uslovima
- Slika 13.** Mehanizmi antioksidativne zaštite
- Slika 14.** Evropska imela (*Viscum album* L.)
- Slika 15.** Mehanizam antitumorskog delovanja *V. album*
- Slika 16.** Mehanizam hipoglikemijskog delovanja *V. album*
- Slika 17.** Mehanizam hipolipidemijskog delovanja *V. album*
- Slika 18.** Mehanizam hepatoprotektivne aktivnosti *V. album*
- Slika 19.** Bela imela (*Viscum album* L.)
- Slika 20.** Redukcija DPPH'
- Slika 21.** ABTS hemijska reakcija sa antioksidantom
- Slika 22.** Morfološki izgled ćelija MRC-5 ćelijske linije
- Slika 23.** MTT esej
- Slika 24.** Shematski prikaz *in vivo* tretmana
- Slika 25.** Hromatogram ekstrakta lista *Viscum album* L.
- Slika 26.** Mikrografije isečaka tkiva jetre pacova kontrolne i eksperimentalnih grupa
- Slika 27.** Mikrografije isečaka tkiva bubrega pacova kontrolne i eksperimentalnih grupa

Lista tabela

- Tabela 1.** Sistematika biljne vrste *Viscum album* L.
- Tabela 2.** Sadržaj fenolnih jedinjenja i ukupna antioksidativna aktivnost ekstrakta lista *Viscum album* L.
- Tabela 3.** Antioksidativni potencijal ekstrakta lista *Viscum album* L.
- Tabela 4.** Analitički parametri za 15 fenolnih jedinjenja korišćenih za HPLC-DAD analizu
- Tabela 5.** Sadržaj polifenolnih jedinjenja u ekstraktu lista imele
- Tabela 6.** Efekti insekticida CPF i IMI na vijabilnost ćelija MRC-5 linije u kratkotrajnom i dugotrajnom tretmanu

- Tabela 7.** Efekti VAE u rastućim koncentracijama na vijabilnost ćelija MRC-5 linije u kratkotrajnom i dugotrajnom tretmanu
- Tabela 8.** Promena telesne mase (t.m.) i odnosi telesne mase i mase ispitivanih tkiva kontrolne i tretiranih grupa
- Tabela 9.** Hematološki parametri kontrolne i eksperimentalnih grupa
- Tabela 10.** Efekti VAE na biohemijske parametre pacova tretiranih insekticidima CPF i IMI
- Tabela 11.** Aktivnost enzima ALT, AST i LDH i količina bilirubina u serumu kontrolne i eksperimentalnih grupa
- Tabela 12.** Efekti VAE na ureu i kreatinin u serumu pacova tretiranih sa CPF i IMI
- Tabela 13.** Efekti VAE na aktivnost ChE u serumu pacova tretiranih sa CPF i IMI
- Tabela 14.** Vrednosti aktivnosti AChE ispitivanih tkiva pacova u kontroli i eksperimentalnim grupama
- Tabela 15.** Koncentracija superoksid anjon radikala ($O_2^{\bullet-}$) u ispitivanim tkivima pacova kontrolne i eksperimentalnih grupa
- Tabela 16.** Koncentracija vodonik peroksida (H_2O_2) u ispitivanim tkivima pacova kontrolne i eksperimentalnih grupa
- Tabela 17.** Koncentracija nitrita (NO_2^-) u ispitivanim tkivima pacova kontrolne i eksperimentalnih grupa
- Tabela 18.** Koncentracija LPO u ispitivanim tkivima pacova kontrolne i eksperimentalnih grupa
- Tabela 19.** Koncentracija GSH i GSSG u jetri pacova u kontrolnoj i eksperimentalnim grupama
- Tabela 20.** Koncentracija GSH i GSSG u bubregu pacova u kontrolnoj i tretiranim grupama
- Tabela 21.** Koncentracija GSH i GSSG u testisu pacova u kontrolnoj i tretiranim grupama
- Tabela 22.** Koncentracija vitamina C u ispitivanim tkivima pacova u kontroli i eksperimentalnim grupama
- Tabela 23.** Aktivnosti SOD u ispitivanim tkivima pacova u kontroli i eksperimentalnim grupama
- Tabela 24.** Aktivnosti CAT u ispitivanim tkivima pacova u kontroli i eksperimentalnim grupama
- Tabela 25.** Aktivnosti GSH-Px u ispitivanim tkivima pacova u kontroli i eksperimentalnim grupama
- Tabela 26.** Aktivnosti GR u ispitivanim tkivima pacova u kontroli i eksperimentalnim grupama
- Tabela 27.** Aktivnosti GST u ispitivanim tkivima pacova u kontroli i eksperimentalnim grupama
- Tabela 28.** Histopatološke promene u tkivu jetre pacova kontrolne i eksperimentalnih grupa
- Tabela 29.** Histopatološke promene u tkivu bubrega pacova kontrolne i eksperimentalnih grupa

Lista grafika

- Grafik 1.** Vijabilnost ćelija MRC-5 linije nakon kratkotrajnog i dugotrajnog tretmana insekticidom CPF
- Grafik 2.** Vijabilnost ćelija MRC-5 linije nakon kratkotrajnog i dugotrajnog tretmana insekticidom IMI
- Grafik 3.** Vijabilnost ćelija MRC-5 linije nakon kratkotrajnog i dugotrajnog tretmana VAE
- Grafik 4.** Vijabilnost ćelija MRC-5 linije nakon kratkotrajnog i dugotrajnog kotretmana CPF i VAE
- Grafik 5.** Vijabilnost ćelija MRC-5 linije nakon kratkotrajnog i dugotrajnog kotretmana IMI i VAE
- Grafik 6.** Efekti VAE na aktivnost enzima AChE u ispitivanim tkivima pacova tretiranih insekticidima CPF i IMI
- Grafik 7.** Efekti VAE na koncentraciju superoksid anjon radikala ($O_2^{\bullet-}$) u ispitivanim tkivima tretiranih insekticidima CPF i IMI
- Grafik 8.** Efekti VAE na koncentraciju vodonik peroksida (H_2O_2) u ispitivanim tkivima tretiranih insekticidima CPF i IMI
- Grafik 9.** Efekti VAE na koncentraciju nitrita (NO_2^-) u ispitivanim tkivima tretiranih insekticidima CPF i IMI
- Grafik 10.** Efekti VAE na koncentraciju LPO u ispitivanim tkivima tretiranih insekticidima CPF i IMI
- Grafik 11.** Efekti VAE na koncentraciju GSH i GSSG u jetri pacova tretiranih sa CPF i IMI
- Grafik 12.** Efekti VAE na koncentraciju GSH i GSSG u bubregu pacova tretiranih sa CPF i IMI
- Grafik 13.** Efekti VAE na koncentraciju GSH i GSSG u testisu pacova tretiranih sa CPF i IMI
- Grafik 14.** Efekti VAE na koncentraciju vitamina C u ispitivanim tkivima tretiranih sa CPF i IMI
- Grafik 15.** Efekti VAE na aktivnost SOD u ispitivanim tkivima pacova tretiranih insekticidima CPF i IMI
- Grafik 16.** Efekti VAE na aktivnost CAT u ispitivanim tkivima pacova tretiranih insekticidima CPF i IMI
- Grafik 17.** Efekti VAE na aktivnost GSH-Px u jetri, bubregu i testisu pacova tretiranih insekticidima CPF i IMI
- Grafik 18.** Efekti VAE na aktivnost GR u jetri, bubregu i testisu pacova tretiranih insekticidima CPF i IMI
- Grafik 19.** Efekti VAE na aktivnost GST u jetri, bubregu i testisu pacova tretiranih insekticidima CPF i IMI



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of King Saud University – Science

journal homepage: www.sciencedirect.com



Original article

Protective effects of *Viscum album* L. leaf extract on chlorpyrifos-induced hepatotoxicity in Wistar ratsMarija D. Milošević^a, Pavle Z. Mašković^b, Vesna D. Stanković^c, Milica G. Paunović^a, Milan N. Mitić^d, Miloš M. Matic^{a,*}, Branka I. Ognjanović^a^aUniversity of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Biology and Ecology, 34000 Kragujevac, Serbia^bUniversity of Kragujevac, Faculty of Agronomy, Department of Chemistry and Chemical Engineering, 32000 Čačak, Serbia^cUniversity of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Pathology, 34000 Kragujevac, Serbia^dUniversity of NB, Faculty of Science and Mathematics, 18000 NB, Serbia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 February 2021

Revised 16 February 2022

Accepted 4 March 2022

Available online 11 March 2022

Keywords:

Chlorpyrifos

Viscum album L.

Hepatotoxicity

Oxidative stress

ABSTRACT

Objectives: The goal of this study was to examine the antioxidant activity of *Viscum album* L. (VA, European mistletoe) extract (VAE) and to investigate whether VAE could provide protection against chlorpyrifos-induced hepatotoxicity.**Methods:** Male Wistar albino rats were divided into five groups and treated two times per week during four weeks: I group without treatment served as control; II, IV and V group were treated with chlorpyrifos (CPF, 35 mg/kg b.w) via gavage; III and IV group received a higher dose of VAE (350 mg/kg b.w); and V group received a lower dose of VAE (175 mg/kg b.w) intraperitoneally. The extract was obtained by ultrasound-assisted extraction. HPLC-DAD analysis was performed to investigate the chemical composition of the extract, and antioxidant assays to determine its antioxidant activities. Biochemical parameters, antioxidant enzyme activities in liver tissue, and histopathology were also determined.**Results:** The VAE caused significant decrease in glucose, TC, TG, albumins, AST, and ALT compared to CPF-treated rats. The cotreatment with VAE also significantly recovered the antioxidative system parameters (SOD, CAT, GSH-Px, GR, and GST) and alleviated some histopathological changes caused by CPF.**Conclusions:** Our data revealed that the simultaneous VAE administration modulated the negative changes induced by CPF. This study suggests that VAE could be useful in providing protection against hepatotoxicity and oxidative stress due to its antioxidative properties.© 2022 The Authors. Published by Elsevier B.V. on behalf of King Saud University. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Abbreviations: TPC, total phenolic content; TFC, total flavonoid content; CT, condensed tannins; GA, gallotannins; TAC, total antioxidant capacity; DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; ABTS, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid); ILP₅₀, lipid peroxidation activity; OH₅₀, hydroxyl radical scavenging activity; IC₅₀, half maximal inhibitory concentration; LD₅₀, medial lethal dose; BHF, butylated hydroxytoluene; ND, not detected; BD, ballooning degeneration; CN, confluent necrosis; C, congestion; FN, focal necrosis; HD, hydropic degeneration; KCH, Kupffer cell hyperplasia; I, infiltration of lymphocytes.

* Corresponding author at: Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, P.O. Box 60, 34000 Kragujevac, Serbia.

E-mail address: milos.matic@pmf.kg.ac.rs (M.M. Matic).

Peer review under responsibility of King Saud University.



Production and hosting by Elsevier

1. Introduction

The extensive use of synthetic chemicals causes numerous environmental issues (Al-Enizi et al., 2020; Naughton and Terry, 2018; Ubaidullah et al., 2020). Chlorpyrifos (CPF) [O,O-diethyl-o-(3,5,6-trichloro-2-pyridyl) phosphorothionate] is a frequently utilized organophosphate (OP) insecticide against flies, mosquitoes and household pests (Uzun and Kalender, 2013). Exposure to OPs, including CPF, can lead to irreversible inhibition of the enzyme acetylcholinesterase (AChE), which results in overstimulation of the postsynaptic cells (Mohamed et al., 2018). While the inhibition of AChE is a crucial event in OP-toxicity, there is evidence of other mechanisms involved (Naughton and Terry, 2018). One of the molecular mechanisms in CPF intoxication is the overproduction of free radicals, which in turn may induce various organs toxicities (Tanvir et al., 2015). The liver is the primary organ involved in xenobiotic metabolism and first major organ exposed to various

<https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.101957>

1018-3647/© 2022 The Authors. Published by Elsevier B.V. on behalf of King Saud University.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

BIOGRAFIJA

Marija D. Milošević rođena je 20.5.1990. godine u Čačku (Republika Srbija). Osnovnu školu i Gimnaziju završila je u Gornjem Milanovcu. Upisala je Osnovne akademske studije Biologije na Prirodno-matematičkom fakultetu u Kragujevcu 2009/2010. godine. Studije je završila 2014. godine sa prosečnom ocenom na Osnovnim akademskim studijama 8.90 i Master akademskim studijama Biologije 9.58. Doktorske studije Biologije – smer Fiziologija i molekularna biologija upisala je školske 2014/2015. godine na Prirodno-matematičkom fakultetu u Kragujevcu. Bila je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja 2017-2018. godine. U periodu 2015/16, 2016/17, 2020/21. i 2022/23. godine angažovana je u izvođenju vežbi na predmetima Opšta fiziologija, Uporedna fiziologija (osnovne akademske studije Biologije), Ekofiziologija životinja (osnovne akademske studije Ekologije), Fiziologija psihičkih procesa 1 (Psihologija) i Biofizički sistemi i životna sredina (master akademske studije Hemije). Godine 2016. dobila je diplomu kao najbolje ocenjeni saradnik. Marija Milošević se uspešno bavi naučno-istraživačkim radom u laboratoriji za Eksperimentalnu fiziologiju životinja Instituta za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta, gde je zaposlena od 29.10.2018. godine. Od 1.4.2017. angažovana je na projektu Biosensing tehnologije i globalni sistem za kontinuirana istraživanja i integrisano upravljanje ekosistemima. Uspešno saraduje i sa istraživačima Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u Beogradu, sa Fakultetom medicinskih nauka u Kragujevcu, Agronomskim fakultetom u Čačku, i sa Departmanom za farmakologiju i toksikologiju Univerziteta King Saud u Rijadu. U okviru svojih istraživanja bavi se proučavanjem efekata različitih štetnih agenasa, poput lekova, insekticida, ali i delovanja brojnih antioksidanata i biljnih ekstrakata. Rezultate dosadašnjih istraživanja objavila je u naučnim časopisima (9 radova), i u vidu saopštenja na domaćim i međunarodnim naučnim skupovima (20 saopštenja).



ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

„Efekti ekstrakata biljne vrste *Viscum album* L. na toksičnost insekticida hlорpirifosa i imidakloprida kod različitih eksperimentalnih model sistema“

представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

У Крагујевцу, 3.4. 2023. године,



потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:

„Efekti ekstrakata biljne vrste *Viscum album* L. na toksičnost insekticida hlorthirifosa i imidakloprida kod različitih eksperimentalnih model sistema“ истоветне.

У Крагујевцу, 3.4. 2023. године,



потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Марија Д. Милошевић,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

„Efekti ekstrakata biljne vrste *Viscum album* L. na toksičnost insekticida hlорpirifosa i imidakloprida kod različitih eksperimentalnih model sistema“

и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу, 3.4.2023. године,



потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: [http://creativecommons.org/rs/](http://creativecommons.org.rs/)