

Одделение за физиологија и радиобиологија на Институтот за примена на  
нуклеарната енергија  
во земјоделството, ветеринарната медицина и шумарството,  
З е м у н

*во соработка со*

Лабораторија за молекуларна биологија и ендокринологија на Институтот за нуклеарни  
науки „Борис Кидриќ“  
В и н ч а – Б е л г р а д

*и*

Катедра за судска ветеринарна медицина, Факултет за ветеринарна медицина,  
Универзитет во Белград  
Белград

## **ИЗВЕШТАЈ ЗА ТЕСТОТ ЗА ПРЕПАРАТИТЕ ЗА АГРОСТЕМИН НА ТОКСИЧНОСТ**

*Декември 1978 година*

**R E P R I N T**

Врз основа на резултатите од сопствените тестови, документацијата на производителот и податоците од прегледаната стручна литература, дадени се следниве резултати од тестот, како и проценка и мислење за токсиколошките својства на AGROSTEMIN.

**Име на препаратот:** AGROSTEMIN (Досие за патенти бр. 32,749, Сојузна канцеларија за патенти, СФР Југославија).

**Состав на препаратот:** Агростемин е комерцијално име на препаратот, кој е составен од прав од кукољ (*Agrostemma githago*) (50%) и други растенија (културни и плевели).

Препаратот е во форма на прав, има жолтеникаво-сива боја. Тоа е слабо растворлив во вода.

**Хемиски состав:**

Алантоин, %.....	25,90 <sup>*)</sup>
Триптофан, %.....	10,90
Фолна киселина, %.....	1,60
Глицин, %.....	0,42
Аланин, %.....	0,25
Аспарагинска киселина, %.....	0,51
Треонин, %.....	0,21
Серин, %.....	0,24
Глутаминска киселина, %.....	1,09
Пролин, %.....	0,24
Валин, %.....	0,24
Изолеуцин, %.....	0,18
Леацин, %.....	0,35
Фенилаланин, %.....	0,20
<hr/>	
Алантоична киселина, %.....	33,00 <sup>**)</sup>
Орцијаланин, %.....	2,50
Аденин, %.....	5,00

**Намена:** Агростемин е наменет да го стимулира растот и развојот на растенијата од алантоични видови со цел квантитативно и квалитативно да ги подобри приносите.

**Производител:** Ловна и шумарска фарма „Јелен“, НАШИОТ „Биопродукт“, Кнез Милош 55, 11.000 Белград, Југославија.

<sup>\*)</sup> Според Извештајот бр. 15496 од 23 август 1976 година на CIENTEC – FUNDACAO DE CIENCIA E TECNOLOGIA, Порто Алегре, Бразил

<sup>\*\*)</sup> патентното досие бр. 32 749, Сојузна канцеларија за патенти, СФР Југославија

**Предмет на тестирање на токсиколошки својства:** Поради фактот што агростемин е слабо растворлив во вода, не може да се извршат потребните тестови на експериментални животни и ткивна култура. Затоа, главно се користеше за тестирање лиофилизиран воден екстракт од агростемин. На тој начин се доби стерилен и лесно растворлив препарат. Количината на овој препарат е изразена во грамови на почетната тежина на препаратот за агростемин.

Растворувањето на препаратот е извршено во стерилна редистилирана вода непосредно пред употребата на рН на растворот во сите тестови да биде 6,9.

Само во одредени тестови, како што се: тестирање на акумулацијата во системот на синџирот на исхрана и деградација на животната средина, се користеше препаратот агростемин помешан со талк како носач. Агростемин без носачи се користеше во студијата за токсичност на риби.

## СОДРЖИНАТА

<b>ТОКСИКОЛОШКИ СВОЈСТВА .....</b>	<b>6</b>
<b>АКУТНА ТОКСИЧНОСТ.....</b>	<b>6</b>
Одредување на ЛД <sub>50</sub> препаратот даден на стаорци орално.....	6
Определување на ЛД <sub>50</sub> препаратот даден на глвци орално.....	6
Одредување на препаратот на LD <sub>50</sub> преку зајачка кожа.....	7
Определување на подготовката на ЛД <sub>50</sub> по единечно вдишување на стаорци во траење од 1 саат .....	8
<b>ХРОНИЧНА ТОКСИЧНОСТ.....</b>	<b>8</b>
Испитување на иритантниот ефект на препаратот врз очите на зајаците .....	8
Испитување на надрозувачкиот ефект на препаратот врз кожата на зајакот .....	9
Испитување на промените во белите дробови на стаорците и токсичноста поради вдишување на аеросолот на препаратот за 1 час.....	9
Тестирање на токсичност на препаратот даден на кокошки орално .....	10
Испитување на акумулацијата во системот на синцирот на исхрана (токсичен ефект на деградиран производ) .....	10
Одредување на алантоин во луцерка, соја и сончоглед третирани со агростемин, хемиски .....	11
Испитување токсичност на луцерка, соја и сончоглед, третирани со агростемин, на стаорци .....	11
<b>ТЕСТИРАЊЕ НА ПРЕПАРАТОТ НА МУТАГЕНОСТ/КАНЦЕРОГЕНОСТ .....</b>	<b>13</b>
<b>ИСПИТУВАЊЕ НА ТЕРАТОГЕН ЕФЕКТ НА ПРЕПАРАТОТ ВРЗ ЕМБРИОНОТ НА СТАОРЕЦ.....</b>	<b>15</b>
<b>ЧЕТИРИДНЕВНИ СТАТИЧКИ ИСПИТУВАЊЕ НА ТОКСИЧНОСТ АГРОСТЕМИН НА РИБА (КРАП – <i>CARP</i>) .....</b>	<b>18</b>
<b>ИСПИТУВАЊЕ НА ДЕЈСТВОТО НА АГРОСТЕМИН НА ПОЧВАТА.....</b>	<b>19</b>
<b>ПРЕГЛЕД НА РЕЗУЛТАТИТЕ И ЛИТЕРАТУРНИТЕ ПОДАТОЦИ .....</b>	<b>21</b>
<b>ПРЕГЛЕД НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОД ТЕСТОВИТЕ НА ПРЕПАРАТИТЕ НА АГРОСТЕМИН НА ТОКСИЧНОСТ .....</b>	<b>23</b>
<b>ЗАКЛУЧОК И МИСЛЕЊЕ .....</b>	<b>25</b>
<b>ЛИТЕРАТУРА .....</b>	<b>26</b>

**ТАБЕЛИ**

Табела 1: Тест на тестот „plate“ за ефектот на препаратот врз <i>S. typhimurium</i> TA100 .....	14
Табела 2: Тест на тестот „plate“ за ефектот на препаратот врз <i>S. typhimurium</i> TA98 .....	14
Табела 3: Резултати од репродукција на женски стаорци третирани со препарат 9–тиот и жртвувани на 21–от ден од бременоста .....	16
Табела 4: Испитување на ефектот на препаратот, даден интраперитонеално кај жени на 9. ден бременост, до фетусот .....	17
Табела 5: Испитување на хемискиот состав на третирана со агростемин и нетретирана почва .....	20

## ТОКСИКОЛОШКИ СВОЈСТВА

### АКУТНА ТОКСИЧНОСТ

#### Одредување на ЛД<sub>50</sub> препаратот даден на стаорци орално

**Животни.** Стаорци, Вистар, женки, телесна тежина  $227 \pm 14$  грама. После периодот на адаптација од 14 дена, беа направени контролни и 7 експериментални групи од 10 стаорци. За време на експериментот, експерименталните и контролните животни биле чувани во посебни простории.

**Третман.** На животните им беше даден раствор на препаратот во доза: 220, 440, 880, 1760, 3520, 7040 и 14080 мг/кг телесна тежина еднаш на празен стомак преку пластична сонда.

Поради растворливоста на препаратот, поголеми количини од горенаведените не може да се даваат орално на стаорци со наведената телесна тежина.

Контролните животни добија соодветна количина на стерилна рести-стирана вода.

**Резултати.** Во текот на 14 и 30 дена не беа пронајдени промени во општата состојба, намалена телесна тежина или смрт на експериментални и контролни стаорци.

На крајот од експериментот, обдукцијата на животните не покажа видливи промени во внатрешните органи и ткива

Патохистолошките прегледи на жртвуваните животни покажаа дека не се пронајдени патолошки промени во повеќето внатрешни органи и ткива на испитаните стаорци, освен кај неколку лица од експерименталните и контролните групи. Во нив се пронајдени ограничени дистрофични промени во црниот дроб, пролиферација на лимфоратикулохистиоцитични елементи во цревата или знаци на хронична дистрофија на површинскиот дел на кортексот со цилиндрурија на бубрежните канали.

#### Определување на ЛД<sub>50</sub> препаратот даден на глувци орално

**Животни.** Глувци, женки, бели, телесна тежина  $26 \pm 2,1$  гранки. После периодот на адаптација од 14 дена, направени се контролни и 8 експериментални групи од по 10 глувци.

**Третман.** На животните им беше даден раствор на препаратот во доза: 384, 768, 1536, 3072, 6144, 12288, 24576 и 49152 мг/кг телесна тежина еднаш на празен стомак преку пластична сонда.

Контролните животни добија соодветна количина на стерилна редестилирана вода.

**Резултати.** Во текот на 14 и 30 дена не беа пронајдени промени во општата состојба, намалена телесна тежина или смрт на експериментални и контролни глувци.

На крајот од експериментот, обдукцијата на животните не покажа видливи промени во внатрешните органи и ткива.

Патохистолошките прегледи на жртвуваните животни покажале дека повеќето од внатрешните органи и ткива на испитаните глувци не покажале патолошки промени, освен кај неколку лица кои добиле најмала доза на препаратот – 384 мг/кг телесна тежина. Ограничените дистрофични промени забележани во црниот дроб и бубрезите, како и пролиферацијата на лимфоретикулохистиоцитичните елементи, не може да се припишат на токсичниот ефект на изучуваниот препарат.

#### **Одредување на препаратот на LD<sub>50</sub> преку зајачка кожа**

**Животни.** Зајаци, женки, телесна тежина 2820 ± 230 грама. По периодот на адаптација од 14 дена, косата на кожата на грбната страна на вратот беше исечена на површина од околу 25 см. Контролната и 4 експериментални групи се состоеја од по 10 зајаци.

**Третман.** Воден раствор на препаратот, како и стерилна рестистирана вода за време на контролата, се нанесуваше на исечената кожа на животните. Количината на препарати нанесена на кожата на животните била: 0,5, 1,0, 2,0 и 4,0 грама, односно 173, 346, 692 и 1384 мг/кг телесна тежина.

**Резултати.** За време на 1, 14 и 30 дена, не се пронајдени видливи патолошки промени, промени во општата состојба, намалена телесна тежина или смрт на животни на третираната кожа на експериментални и контролни животни.

На крајот од прегледот, не беа пронајдени видливи патоанатомски и патохистолошки промени на кожата и поткожното ткиво, како и на внатрешните органи на обдуцираните животни.

Воден раствор на препаратот не ја иритираше непроменетата кожа на зајаци 24 часа.

Препаратот беше класифициран како практично нетоксичен со апсорпција преку кожата на зајакот.

### **Определување на подготовката на ЛД<sub>50</sub> по единечно вдишување на стаорци во траење од 1 саат**

**Животни.** Стаорци, женки Вистар, телесна тежина  $236 \pm 28$  грама. По периодот на адаптација од 14 дена, беа направени контролни и 4 експериментални групи од 10 стаорци.

**Третман.** Животните беа третирани со аеросол на препаратот растворен во 10 ml стерилна рестистирани вода. Животните се чуваа 1 час во комора во која концентрациите на препаратот беа: 0 (контрола), 145, 290 и 580 mg/m<sup>3</sup> воздух. Фини капки од растворот на препаратот и вода беа вметнати во комората со помош на уредот „Фогмастар“, модел 6208, САД.

**Резултати.** Не се забележани промени во општата состојба за време на третманот од 14 и 30 дена, ниту, пак, имаше смртни случаи од контролни и експериментални стаорци.

На крајот од прегледот, не се пронајдени видливи патолошки промени на белите дробови и внатрешните органи на аутопсичните животни.

Патохистолошките прегледи на експериментални и контролни животни покажаа дека не се пронајдени патолошки промени во белите дробови и другите внатрешни органи и ткива на стаорци. Само во тенкото црево на неколку експериментални и контролни животни има пролиферација на лимфо-ретикулохистиоцитни елементи.

### **ХРОНИЧНА ТОКСИЧНОСТ**

#### **Испитување на иритантниот ефект на препаратот врз очите на зајаци**

**Животни.** Зајаци, женки, телесна тежина  $2740 \pm 185$  грама. После периодот на адаптација од 14 дена, направени се контролни и 2 експериментални групи од 14 животни.

**Третман.** Животните се третирале еднаш дневно, 15 дена со стерилен 1 и 10% воден раствор на препаратот. Растворот на препаратот, како и повторно дестилираната вода (контрола) секогаш се нанесуваа на левото око, додека десното око служеше како автоконтрола. Околу 1 и 10 мг од препаратот беа во 3 капки течност.



**Резултати.** За време на апликацијата, како и следните 60 и 180 дена, појавата на конјуктивата (конјуктивата палпобралис) и зидот на очното јаболко на третираното око на експериментални и контролни животни беше нормална.

По 2,5 и 6 месеци од почетокот на третманот, беа жртвувани 7 животни од секоја група. Патанонатомските и патохистолошките прегледи покажаа дека нема видливи промени на третираното и контролното око, како и на внатрешните органи на третираните и нетретираните животни.

### **Испитување на надразнувачкиот ефект на препаратот врз кожата на зајакот**

**Животни.** Зајаци, женки, телесна тежина  $2910 \pm 215$  грама. По периодот на адаптација од 10 дена, косата на кожата на грбната страна на вратот беше исечена на површина од околу 25 см<sup>2</sup>. Контролната и 4 експериментални групи се состоеја од по 14 зајаци.

**Третман.** Водениот раствор на препаратот, како и стерилната рестистирани вода за време на контролата, се нанесуваа секој втор ден рамномерно на исечената кожа на животните. На секој третман, количината на препарат применета на кожата на животните беше: 0,5, 1,0, 2,0 и 4,0 грама, или 172, 344, 688 и 1376 мг/кг телесна тежина. животните биле третирани 8 пати

**Резултати.** За време на третманот 16, како и следните 60 и 180 дена, не биле забележани видливи патолошки промени на третираната кожа, ниту промени во општата состојба и телесната тежина на експерименталните и контролните животни.

По 2,5 и 6 месеци од почетокот на третманот, беа жртвувани половина од животните од секоја група; не беа пронајдени видливи патоанатомски и патохистолошки промени на кожата и поткожното ткиво и внатрешните органи.

### **Испитување на промените во белите дробови на стаорците и токсичноста поради вдишување на аеросолот на препаратот за 1 час**

**Животни.** Стаорци, Вистар, женки, телесна тежина  $265 \pm 16$  грама. После периодот на адаптација од 14 дена, направени се контролни и 4 експериментални групи од 20 животни.

**Третман.** Групи од 10 животни беа третирани со аеросол на препарат растворен во 10 ml стерилна рестистирани вода. Животните се чуваа 1 час во комора во која концентрациите на препаратот беа: 0 (контрола), 145, 290 и 580 mg/m воздух. Стаорците биле третирани 8 пати секој втор ден.

**Резултати.** За време на третманот, како и во следните 60 и 180 дена, не беа пронајдени промени во општата состојба, намалена телесна тежина или смрт на контролни и експериментални животни.

По 2,5 и 6 месеци од почетокот на третманот, обдукцијата на животните не откри никакви видливи патолошки промени во белите дробови и другите внатрешни органи.

Патохистолошките прегледи покажаа дека немало патолошки промени во белите дробови и другите внатрешни органи и ткива. Само во тенкото црево на неколку третирани и контролирани животни постои ограничена пролиферација на елементи на лимфо-ретикулохистиоцитите.

#### **Тестирање на токсичност на препаратот даден на кокошки орално**

**Кокошки.** За преглед се користени хибридни кокошки Рос, стари 8 дена, со тежина од  $132 \pm 14$  грама. Контролната и 4 експериментални групи се состоеја од по 20 кокошки.

**Третман.** Воден раствор на препаратот им бил даден на кокошките орално со помош на гумена сонда, секој втор ден 16 дена. Индивидуалната доза на препаратот беше: 0 (контрола), 769, 1538, 3076 и 6152 mg/kg телесна тежина на кокошки.

**Резултати.** За време на апликацијата, како и во текот на следните 60 и 180 дена, не беа пронајдени промени во општата состојба, намалена телесна тежина или смрт на експериментални и контролни кокошки.

По 2,5 и 6 месеци од почетокот на третманот, не беа пронајдени видливи патоанатомски и патохистолошки промени во дигестивниот тракт и внатрешните органи на третираните и контролни кокошки.

#### **Испитување на акумулацијата во системот на синцирот на исхрана (токсичен ефект на деградиран производ)**

Испитување на акумулацијата на агростемин во почвата, односно кај култивирани растенија што се користат за консумирање на луѓе и животни, се изврши на следниов начин:

1. Присуство на алантоин во луцерка, соја и сончоглед, третирани со агростемин – хемиско тестирање;
2. Токсичност на овие растенија во експеримент со стаорци.

### **Одредување на алантоин во луцерка, соја и сончоглед третирани со агростемин, хемиски**

**Материјал.** Квантитативно определување на алантоин е извршено кај луцерка, соја и сончоглед. Сушен сончоглед и луцерка на 65 ° C беа мелени и суспендирани во дестилирана вода во сооднос 1:10, и брашно од соја во сооднос 1: 5. Екстракцијата се изведуваше 2 часа на собна температура со мешање. Суспензијата беше центрифугирана на 25,000 x g по филтрација низ неколку слоеви на газа и се филтрираше 30 мин. За утврдување на алантоин се користеше лиофилизиран материјал, со методот на Финк (1963) и Врбачки (1974).

**Резултати.** Компаративните студии за содржината на алантоин во луцерката, сојата и сончогледот третирани со агростемин, како и нетретирана (контрола), покажаа дека методот на споменатите автори во испитуваните растенија не утврдил зголемување на содржината на алантоин поради третманот со агростемин.

### **Испитување токсичност на луцерка, соја и сончоглед, третирани со агростемин, на стаорци**

**Животни.** Стаорци, Вистар, женки, телесна тежина 127 ± 12 грама. По периодот на адаптација од 14 дена, направени се две групи – експериментални и контролни, од по 10 животни, животните ја земаа подготвената храна во форма на прав и вода ad libitum

Третираната луцерка, соја и сончогледи беа земени од експерименталната група за да се подготват оброци за животните. Тие, како и истите култури кои не биле третирани со агростемин (контрола), прво биле сушени на 65 ° C два дена. Сојата потоа се третираше на 105 ° C 2 часа. Другите хранливи материи за добиточна храна беа земени од мелницата за храна.

**Резултати.** Исхраната на стаорци со оброк со 30% хранливи материи, претходно третирани со агростемин 6 месеци, не доведе до промени во општата состојба, губење на тежината и смрт на животните.

На крајот од експериментот, не беа пронајдени видливи патоанатомски и патохистолошки промени во внатрешните органи и ткива на жртвените експериментални и контролни стаорци.

**Состав на оброк:**

<b>Хранливи матери</b>	<b>%</b>
Пченка	55,0
Соја	10,0
Сончоглед	10,0
Луцерка	10,0
Оброк од риба	10,0
NaCl	0,5
Премикс	1,5
Квасец	3,0

## ТЕСТИРАЊЕ НА ПРЕПАРАТОТ НА МУТАГЕНОСТ/КАНЦЕРОГЕНОСТ

Мутагениот/канцероген ефект на препаратот бил испитан со помош на микробиолошкиот тест Ејмс (1971, 1973, 1975). Анализата на салмонела тифимуриум е прилагодена за откривање на потенцијални канцерогени/мутагени со додавање на експерименталниот систем дел од црниот дроб кај стаорците кој содржи микрозомални ензими кои претвораат потенцијален канцероген во активна форма: метаболна активација (Ејмс, 1971).

Откривањето на мутагени без активирање и со метаболичко активирање е извршено со помош на тестот „место“, кој е брз и квалитативен, и тестот „плоча“, кој исто така е квантитативен.

**Третман.** Раствор на препаратот во концентрации од 0,07, 0,7, 7,0 и 35,0 мг е додаден во смесата што содржи микрозомални ензими (+S9, „mix“) или без микрозомална фракција (-S9, „mix“) По инкубација на 3а 15 минути на 37°C смесата се додаваше во агар кој содржи соодветна култура на *S. typhimurium*. Бројот на мутирани бактерии е утврден по 3 дена инкубација на 37°C. Бројот на спонтани возвратници беше утврден во садовите Петри во кои не беше додаден препарат. Како позитивна контрола се користеше ацетиламинофлуорен (2AAF). Пробите беа изведувани во два примерока и повторувани три пати.

**Резултати.** Резултатите прикажани во Табела 1 и **Tablica 2** укажуваат на мутагена активност на препаратот во отсуство на метаболна активација. Високи концентрации на препаратот: 7 мг/Петри садови предизвикуваат 915 His<sup>+</sup> ревертанти во видот TA100, што покажува дека на подготовка е агростемин мутагени „missense“ типот. Индукција на 80 Ris<sup>+</sup> ревертанти со 35 мг/Петри садови во вирусот TA98 укажува на тоа дека на подготовка е многу слабо мутагени и од „frameshift“ типот. Во присуство на ензими на микрозомалниот дел од црниот дроб на стаорец, т.е. метаболна активација, мутагениот ефект на препаратите за агростемин се губи и бројот на ревертанти се намалува на нивото на спонтаните ревертанти или е малку зголемен.

Во студијата со тестот „spot“, пронајден е позитивен мутаген одговор во присуство и отсуство на S9, „mix“ за релативно ниски концентрации на препаратот. Во тестот „plate“, мутагениот одговор беше пронајден за високи концентрации, во отсуство на метаболна активација и во соеви што носат плазмиди.

Подготовката е идентификувана во многу високи концентрации кои се движат од 0,7 до 35 мг/садови Петри, во отсуство на метаболичко активирање, со тестот Ames како мутаген агент.

Важно е да се потенцира губењето на мутагената активност на препаратот во присуство на метаболна активација, што укажува на многу ефикасна детоксикација во клетките на цицачите.

**Табела 1:** Тест на тестот „plate“ за ефектот на препаратот врз *S. typhimurium* TA100

Концентрација мг/Петри садови	Метаболичка активација (S9"mix")	His <sup>+</sup> ревертанти/Петри садови
0,07	–	20
	+	5
0,70	–	74
	+	16
7,00	–	915
	+	66
35,00	–	2.736
	+	27

Број His<sup>+</sup> ревертантите беа намалени за бројот на спонтани ревантери.

**Табела 2:** Тест на тестот „plate“ за ефектот на препаратот врз *S. typhimurium* TA98

Концентрација мг/Петри садови	Метаболичка активација (S9"mix")	His <sup>+</sup> ревертанти/Петри садови
0,07	–	16
	+	13
0,70	–	27
	+	0
7,00	–	13
	+	7
35,00	–	80
	+	5

Број His<sup>+</sup> ревертантите беа намалени за бројот на спонтани ревантери.

### ИСПИТУВАЊЕ НА ТЕРАТОГЕН ЕФЕКТ НА ПРЕПАРАТОТ ВРЗ ЕМБРИОНОТ НА СТАОРЕЦ

**Третман.** Тестовите биле извршени на бремени женки. Препаратот, растворен во 0,9% NaCl, беше даден интраперитонеално на 9–тиот ден од бременоста во дози од 10, 100 и 1.000 гама и 10, 100 и 500 мг/кг телесна тежина. Контролната група на бремени жени доби 0,9% NaCl.

Експерименталните и контролните жени биле жртвувани на 21–от ден од бременоста, односно ден пред очекуваното сопирање. Одредени се телесната тежина, тежината на недопрената матка, бројот на жолти тела (Cl) и имплантација на фетус (жив или мртов). Фетусите се определени според полот, телесната тежина и биле внимателно испитани за видливи надворешни и внатрешни малформации. Предиплантацијата и поиплантацијата на феталната загуба беа пресметани.

**Резултати.** Тестираните дози на препаратот не покажале влијание врз преживувањето на бремените жени, освен дозата од 500 мг/кг телесна тежина што доведе до смрт на близу 50% од бремените жени во рок од 24 часа по администрацијата на препаратот.

Врз основа на податоците од **Табела 3** и **Табела 4** може се заклучити да препарат не покажује негативан ефекат на репродукцију и same fetuse u dozama manjim od 500 мг/кг, па чак и kod 2 gravidne preživele ženke tretirane ovom visokom dozom. Izvesna variranje koja su nađena unutar tretiranih grupa ili u odnosu na kontrole (mrtvi fetusi, kasne resorpcije) rezultat su slučajnosti a ne efekta datog preparata.

Доза/кг телесна тежина	Број на стаорци	Средна вредност/бремени стаорци							% смртност	
		тежина		CL	имплантација	ресорпција	фетуси		имплантациа	
		телесна	утерус				умри	живи	пред	по
10 gama	6	332	58,5	11,7	10,0	1,2	0,3	8,5	14,28	11,67
100 gama	6	301	68,3	10,7	9,5	0,7	0,0	8,8	10,93	7,01
1000 gama	7	289	59,5	10,7	10,0	0,1	0,0	9,9	6,67	1,43
10 mg	7	303	59,6	11,7	10,1	0,7	0,0	9,4	13,41	7,04
100 mg	8	297	63,8	12,1	11,0	0,4	0,0	10,6	9,27	3,41
500 mg	2	362	71,7	13,5	11,5	0,5	0,0	11,0	14,82	4,54
NaCl 0,9%	7	340	62,3	11,4	9,5	0,1	0,0	9,4	16,25	1,49

**Табела 3:** Резултати од репродукција на женски стаорци третирани со препарат 9–тиот и жртвувани на 21–от ден од бременоста



Доза/кг телесна тежина	Број на стаорци	Број на фетуси				Тежина на фетусот, гр ± SD	
		по стаорец		вкупно		машки	женски
		машки	женски	машки	женски		
10 gama	6	4,0	4,8	24	29	5,3±0,36	4,9±0,30
100 gama	6	4,7	4,2	28	25	4,9±0,85	4,6±0,62
1000 gama	7	5,3	4,6	37	32	4,7±0,64	4,5±0,34
10 mg	7	5,0	4,4	35	31	5,2±0,42	5,0±0,42
100 mg	8	4,7	5,9	38	47	4,7±0,51	4,5±0,48
500 mg	7	5,0	6,0	10	12	5,1±0,49	4,8±0,36

**Табела 4:** Испитување на ефектот на препаратот, даден интраперитонеално кај жени на 9. ден бременост, до фетусот

### ЧЕТИРИДНЕВНИ СТАТИЧКИ ИСПИТУВАЊЕ НА ТОКСИЧНОСТ АГРОСТЕМИН НА РИБА (Крап – *Carp*)

Подготовката агростемин е тестирана за токсичност на крап (*Cyprinus carpio*), телесна тежина  $104 \pm 12$  грама.

**Третман.** Здравите риби биле чувани во експериментални услови 3 дена пред почетокот на експериментот.

Во еднакви пластични кади, додадени се 12,5 литри нехлорирана вода. Во водата се додаваше воздух, така што концентрацијата на растворен кислород беше околу 5 mg/литар (5 ppm). Температурата на водата се движеше од 19 до 20 ° C. PH на чистата вода беше 7,0, а водата во кадите во која беше додаден агростемин се движеше од 7,4 до 7,6.

Во водата е додадена суспензија на малку растворлив агростемин во следните концентрации: 10, 100, 250 и 500 ppm.

Секоја група се состоеше од 10 риби.

Тестовите за редовно дишење, пливање на страна, удирање вода, голтање на воздух, реакција на иритација и смртност се извршени во 1–6, 24, 48, 72 и 96 часа. На крајот од експериментот, беа извршени патоанатомски прегледи на рибите.

**Резултати.** За време на целиот преглед, рибите што биле во вода со агростемин се однесувале како контрола. Дозите на препаратот од 10 до 500 ppm не доведоа до смрт или видливи патоанатомски промени.

## ИСПИТУВАЊЕ НА ДЕЈСТВОТО НА АГРОСТЕМИН НА ПОЧВАТА

Земени се примероци на почва од третираната и нетретирана почва под културата од неколку точки, така што тие беа комбинирани од иста длабочина во еден репрезентативен примерок.

Почвата беше исушена на воздух, смачкана, добро измешана и земени се 250 грама за мелење. Честичките на земјата почва беа помалку од 0,2 mm.

Определувањето на вкупниот азот беше извршено со методот на полумикро Кјелдал според J. M. Bremner (1965). Вкупниот азот се изразува како процент.

Одредување на минералната форма на азот: амонијак, нитрат и нитрит, беше извршена во претходно подготвена почва со методот Bremner (1965).

Определување на лесно достапен фосфор и калиум во почвите беше извршено со методот AL според EGNER–RIENH. Извлекувањето на достапен фосфор и калиум беше извршено со соодветно со раствор на AL–амониум лактат. Од добиениот екстракт, фосфорот се определил на спектрофотометар, а калиумот на атомски абсорбер.

Определување на pH на почвата се изврши во вода и 1N KCl, 10 g суво воздух се истури со 25 ml вода или 25 ml 1N KCl (1: 2,5), потоа се меша околу 30 минути, а pH се чита на pH–метар 27 Copenhagen радиометар со стакло и каломелна електрода).

**Резултати.** Резултатите од утврдувањето на хемискиот состав на почвата **Табела 5** покажуваат дека тестираниот препарат во доза од 1 грам на хектар почва не довел до значителни промени во содржината на тестираните параметри во почвата, која претходно била третирана со агростемин околу 2,5 месеци. во однос на нетретираниот.

Назив на узорци		Длабочина	Вкупно N %	NH <sub>4</sub> -N mg/kg	(NO <sub>3</sub> +NO <sub>2</sub> ) -N mg/kg	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> mg/100g	K <sub>2</sub> O mg/100g	H <sub>2</sub> O pH	(1:2,5) KCl
Пипер	третиран	20	0,19	4,2	6,3	18,0	38,5	8,32	7,39
	контрола	20	0,18	4,3	2,8	14,6	31,3	8,32	7,30
	третиран	40	0,16	3,5	2,8	11,9	33,3	8,40	7,40
	контрола	40	0,17	5,7	4,9	9,7	29,0	8,30	7,35
Луцерка	третиран	20	0,23	6,4	9,2	22,1	36,6	8,15	7,25
	контрола	20	0,20	4,9	8,4	24,3	32,8	8,28	7,22
	третиран	40	0,20	5,3	7,8	18,2	32,8	8,20	7,30
	контрола	40	0,20	5,4	5,4	17,0	27,9	8,25	7,38
Пченка	третиран	20	0,22	4,2	8,4	14,6	30,3	8,18	7,38
	контрола	20	0,21	5,3	3,5	13,0	31,3	8,20	7,30
	третиран	40	0,20	4,3	8,1	7,4	26,0	8,25	7,45
	контрола	40	0,20	4,3	6,4	10,0	27,9	8,30	7,42

**Табела 5:** Испитување на хемискиот состав на третирана со агростемин и нетретирана почва

## ПРЕГЛЕД НА РЕЗУЛТАТИТЕ И ЛИТЕРАТУРНИТЕ ПОДАТОЦИ

Агростемин се базира на алелопатскиот ефект, пред сè на плевата, почнувајќи од претходните студии на Harper-a i Gajić (1961.), кои покажаа дека под одредени услови виталноста на плевата е значително поголема кога расте во асоцијација со пченица и шеќерна репка. Овие и други тестови се засноваат на долго познатите резултати и теории на De Candolle (1831), Schreiner-a (1909), Molisch-a (1937), Knapp-a (1954), Grummer-a (1955) i Rademacher-a (1960), кои наведуваат дека метаболитите од одредени делови на растенијата можат да имаат физиолошки ефекти врз развојот и растот во растителната заедница.

**Метаболизам на активен принцип.** Механизмот на хемиска алелопатична интеракција во релацијата биотски систем – околина и обратно се изразува во успешна биогенеза кај голем број хемиски супстанции: алантоин – слободен триптофан–индол оцетна киселина (Wightman, 1962). Таквиот ланец доведува до поголема акумулација на алантоин, триптофан и  $P_2O_5$  во околината, како фитогени егзометаболити (Gajić i Vrbaški, 1972; Gajić, 1977). Ова воспоставува поголема стабилност на ценотичните односи ((Margalef, 1962 – цитиран според Odum, 1971).

**Деградација во животната средина.** Бидејќи растенијата многу брзо го асимилираат агростеминот со неговата основна супстанца, не беше откриено дека неговите остатоци се наоѓаат на средина. Според резултатите на Gajić i sar. (1977), можно е да се заклучи дека алантоин и триптофан се појавуваат како резултат на биогенеза во животната средина.

**Перзистенција во животната средина.** Бидејќи агростеминот многу брзо се вметнува во биотскиот систем (на пример, за околу 23 минути во пченица) (Gajić, 1978), не е можно да се утврди за релативно кратко време по апликацијата.

**Токсичност на деградиран производ.** Хемиските тестови за присуство на алантоин во луцерката, сојата и сончогледот, кои биле третирани со агростемин по раната ртење, како и нивната токсичност за стаорци кои биле хранети со оброк што содржел 30% од овие хранливи материи, биле негативни и не покажале токсични ефекти врз испитаните животни.

**Токсиколошки својства на препаратот.** Во своите испитувања, Živković i sar. (1976) i Soldatović i sar. (1976), на HeLa и клетки од ембрионално човечко ткиво, покажаа дека дозите на агростемин од 1, 10 и 100  $\mu\text{g/ml}$  не се токсични.

За долгогодишно тестирање во експерименталните полиња на разни сорти пченица, третираны со агростемин во првата година од експериментот, не беа пронајдени промени во морфолошките и сортителните карактеристики. Овие тестови биле извршени во рамките на Биолошкиот институт во Белград (Gajić i saradnici).

Сортните својства беа уште подобро изразени, не беа забележани мутагени–тератогени промени никаде.

<b>Име на сортата:</b>	<b>Време траење на тест t</b>
Банкут 1205	од 1956 до 1977 година
Сава	од 1971 до 1976 година
Безостаја	од 1971 до 1976 година
Либелула	од 1958 до 1960 година
Сан Пасторе	од 1958 до 1960 година

**Специфични противотрови и мерки за прва помош.** Бидејќи препаратот во испитуваните дози не покажа токсични својства, освен депресивниот ефект врз централниот нервен систем на стаорци третираны интраперитонеално со високи дози и мутаген ефект врз салмонела тифимуриум без метаболичко активирање, покрај строгата примена на хигиенски и технички мерки не препорачувајте специфични мерки за терапија.

## ПРЕГЛЕД НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОД ТЕСТОВИТЕ НА ПРЕПАРАТИТЕ НА АГРОСТЕМИН НА ТОКСИЧНОСТ

1. **Акутен орален LD<sub>50</sub> кај стаорци.** Подготовката не делуваше смртоносно дури и во највисоката тестирана доза од 14.080 mg/kg телесна тежина.
2. **Акутен орален LD<sub>50</sub> на глувци.** Препаратот не беше смртоносна дури и во највисоката тестирана доза од 49.152 мг/кг телесна тежина
3. **Акутен LD<sub>50</sub> над кожата на зајакот.** Препаратот не ја иритираше кожата и беше смртоносна кај зајаци дури и при највисока тестирана доза од 1.384 мг/кг телесна тежина.
4. **Акутен LD<sub>50</sub> кога се вдишува кај стаорци.** Единствено вдишување на аеросолот на препаратот за 1 час и со максимална доза од 580 мг/м<sup>3</sup> воздух, немаше токсичен ефект.
5. **Единствено вдишување на аеросол.** Нанесувањето на воден раствор на препаратот 15 дена во доза од 1 и 10 mg на ден, не го иритираше окото ниту доведе до патолошки промени во текот на 6 месеци од студијата.
6. **Иритација на кожата на зајакот.** Примена на воден раствор на препаратот 8 пати во рок од 16 дена и при највисока тестирана доза од 1.376 мг/кг телесна тежина, не доведе до патолошки промени на кожата на зајациите.
7. **Токсични ефекти со вдишување кај стаорци.** Вдишување на препаратот 8 пати во рок од 16 дена за 1 час и со највисока тестирана доза од 580 мг/м<sup>3</sup> воздух, не доведе до патолошки промени кај стаорци.
8. **Токсичен ефект на препаратот даден перорално на кокошки.** Препаратот беше даден орално 8 пати во рок од 16 дена, и при највисока тестирана доза од 6,152 mg/kg телесна тежина, немаше токсичен ефект врз кокошките.
9. **Истражување на акумулацијата на агростемин во системот на синџир на исхрана.** Хемиската анализа на луцерка, соја и сончогледи третирани со агростемин во доза од 1.000 мг на хектар земја не открила зголемена содржина на алантоин во споредба со нетретирани растенија.  
Исхраната на стаорци со оброк од 30% луцерка, соја и сончогледи третирани со агростемин, не доведе до патолошки промени во 6 месеци од студијата.
10. **Тестирање на препаратот за мутагеност/канцерогеност.** Препаратот беше идентификуван како мутаген агент во многу високи концентрации од

0,7 до 35,0 mg/Petri јадења на *Salmonella typhimurium*, без метаболичко активирање. Во присуство на микрозомални ензими на црниот дроб на стаорци или метаболичко активирање, мутагената активност на препаратот се губи.

11. **Тератоген ефект врз ембрион кај стаорци.** Препаратот даден на стаорци интраперитонеално на 9–тиот ден од бременоста, и при највисока тестирана доза од 500 мг/кг телесна тежина, не покажа тератогени ефекти врз ембрионот на стаорец.
12. **Токсичност на агростемин за риби,** четиридневни статички студии за крап покажаа дека дозите на агростемин од 10, 100, 250 и 500 ppm не биле смртоносни.
13. **Ефект на агростемин врз почвата.** Испитувањето на хемискиот состав на почвата (вкупна и минерална форма на азот, фосфор и калиум) покажа дека агростемин не доведе до значителни промени во содржината на тестираните параметри во почвата, која претходно беше третирана со агростемин во количина од 1.000 mg на хектар на нетретирани.



### ЗАКЛУЧОК И МИСЛЕЊЕ

Врз основа на резултатите од тестот, податоците од документацијата на производителот и прегледаната стручна литература, може да се заклучи дека тестираниот препарат добиен со екстракција од агростемин и лиофилизација, како и природниот агростемин, нема смртоносни ефекти врз испитаните животни и штетни за животната средина.

Ние сметраме дека агростемин, со строго почитување на хигиенските и техничките мерки за заштита при работа и производство, не претставува опасност за здравјето на луѓето и животните..

Ние сме на мислење дека препаратот може да се користи за неговата намена, во доза одредена од производителот, што изнесува 1,0 грам по хектар земја без носач.

Белград,  
25 декември 1978 година

УПРАВИТЕЛ НА ТЕСТИРАЊЕТО,

  
Dr Čedomir Rusov, viši naučni saradnik

## ЛИТЕРАТУРА

- Ames, B.N., Ch. Yanofski:** *In Chemical Mutagens, ed. A. Hollander, I, 267, 1971.*
- Ames, B.N., W.E. Durston, E. Yamasaki, F.D. Lee:** *Proc. Natl. Acad. Sci., 70, 2281, 1973.*
- Ames, B.N., J. McCann, E. Yamasaki:** *Mut. Res 33, 27, 1975.*
- Fink, K., Clino, R.E., Fink, M.R.:** *Anal. Chem. 35, 389. 1963.*
- Gajić, D.:** *Jour. for Scientific Agricultural Research 19, 66, 63:96, 1966.*
- Gajić D., Vrbaški, M., Vrbaški, S.:** *Fragmenta herbologica jugoslavica II, 5–16, 1977.*
- Gajić, D.:** *Usmeno saopštenje, 1977. i 1978.*
- Garžičić, B., Živković, S.:** *Izveštaj o dejstvu zoostemina na HeLa ćelije in vitro. Institut za biološka istraživanja, Univerzitet u Beogradu, 1976.*
- Grommer, G.:** *Die gegenseitige Beeinflussung hoherer Pflanzen–Allelopatie–Jena: Fischer, 1955.*
- Hartman, F.E. X. Levine, Z. Hartman, H. Berger:** *Science 172, 1058, 1971.*
- Hansen, E.O. Meyer:** *Toxicology 10, 195, 1978.*
- Harper, J.L., Gajić, D.:** *Weed Research 1,2, 91–104, 1961.*
- Knapp, R.:** *Experimentelle Sociologie der höheren Pflanzen, Stuttgart, 1954.*
- Molisch, H.:** *Der Einfluss einer Pflanze auf die andere: Allelopatie, Jena, 1937.*
- Odum, P.E.:** *Fundamentals of Ecology, 3th ed, New York, 1971.*
- Rademacher, B.:** *Fragen der Unkrautkonkurrenz, Tagungsberichte. Deutsche Akademie Landwirtschaftswissenschaften su Berlin, 33, 1960.*
- Schreiner, S., Reed, H.S.:** *Z toxic action of certain organic plant constituents, Botanical Gazette, Chicago, 45, 73–102, 1908.*
- Schreiner, S., Shoory, E.C.:** *Z isolation of harmful organic substances from soils, Botanic gazette, Chicago, 53, 1909.*
- Soldatović, B.:** *Izveštaj o ispitivanju efekta agrostemina na sisarske ćelijske populacije in vitro. Institut za biološka istraživanja, Univerzitet u Beogradu, 1976.*
- Vrbaški, M.:** *Hemijsko–biološka identifikacija bioregulatora u semenu Agrostemma githago, magistarska teza, Prirodnomatemički fakultet, Univerzitet u Beogradu, 1974.*
- Wightman, F.:** *Can. J. Botany, 40, 689–718, 1962.*
- Wilsca, J. G., H. C. Jordan, R.L. Brent:** *An. J. Anat., 92, 153, 1953.*
- Wilson:** *In Teratology, Principles and Techniques, Ed. Univ. Chicago Press, 251, 1965.*  
*SIENTEC–Fundacao de ciencia e tecnologia, izveštaj br. 15496, Porte Alegre, Brazil, 1976.*  
*Savezni zavod za patente SFR Jugoslavija, broj 32749, 1974.*