

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković u Zagrebu

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti

LIDIJA BARUŠIĆ

PROCJENA ZDRAVSTVENE ISPRAVNOSTI ODABRANIH DODATAKA

PREHRANI I NJIHOV TOKSIKOLOŠKI UČINAK *IN VIVO*

DOKTORSKA DISERTACIJA

Osijek, 2018.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković u Zagrebu

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti

LIDIJA BARUŠIĆ

PROCJENA ZDRAVSTVENE ISPRAVNOSTI ODABRANIH DODATAKA

PREHRANI I NJIHOV TOKSIKOLOŠKI UČINAK *IN VIVO*

DOKTORSKA DISERTACIJA

Doktorska disertacija predložena je Sveučilišnom Vijeću za poslijediplomske doktorske studije u svrhu stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti na Sveučilišnom poslijediplomskom interdisciplinarnom doktorskom studiju Molekularne bioznanosti – Interdisciplinarno područje/polje biologija i temeljne medicinske znanosti

Osijek, 2018.

Doktorska disertacija izrađena je u Laboratoriju za zdravstvenu ispravnost i kvalitetu hrane i predmeta opće upotrebe Nastavnoga zavoda za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“ pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Jasne Bošnjir, i u Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog Odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Domagoja Đikića.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni
studij Molekularne bioznanosti

Doktorska disertacija

Znanstveno područje: Interdisciplinarno područje znanosti
Znanstvena polja: Biologija i Temeljne medicinske znanosti

PROCJENA ZDRAVSTVENE ISPRAVNOSTI ODABRANIH DODATAKA PREHRANI I NJIHOV TOKSIKOLOŠKI UČINAK *IN VIVO*

Lidija Barušić

Disertacija je izrađena u: Laboratoriju za zdravstvenu ispravnost i kvalitetu hrane i predmeta opće upotrebe Nastavnog zavoda za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“ i Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog Odsjeka Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Mentor/i: Izv.prof.dr.sc. Jasna Bošnjir i Izv.prof.dr.sc. Domagoj Đikić

Kratki sažetak doktorske disertacije:

Zbog nedostatka podataka vezanih uz provjeru toksikološke javno zdravstvene sigurnosti upotrebe pojedinih biljnih vrsta sadržanih unutar dodataka prehrani sa vazodilatacijskim učinkom provedeno je znanstveno istraživanje sa ciljem utvrđivanja prisutnosti rezidualnih pesticida, teških metala i nedozvoljenih farmakološki aktivnih tvari. Cilj dizertacije bio je utvrditi združeno toksikološko djelovanje biljnih vrsta prisutnih u istraživanim proizvodima na *in vivo* modelu Swiss miša. Utvrđeno je da postoje interakcije određenih biljnih vrsta koje se manifestiraju štetnim učincima na hematološkim parametrima, redoks i antioksidativnoj ravnoteži u tkivima eksperimentalnih životinja. Disertacija ima važan doprinos u području javnog zdravstva i toksikologije ali i temeljni znanstveni doprinos zbog inovativnog pristupa u analizi dobivenih rezultata Klaster metodom kojom je dodatno određena kvantitativna korelacija i grupiranje pojedinih biljnih vrsta i kontaminanata kako bi se donio zaključak i preporuke koje biljne formulacije predstavljaju najveći potencijalni toksikološki rizik za pojedini fiziološki sustav.

Broj stranica: 250

Broj slika: 76

Broj tablica: 56

Broj literaturnih navoda: 302

Jezik izvornika: Hrvatski

Ključne riječi: dodaci prehrani, metali, pesticidi, sildenafil, oksidacijski stres,

Datum obrane: 27. 03. 2018.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Prof.dr.sc. Dinko Puntarić
2. Prof.dr.sc. Irena Landeka Jurčević
3. Prof.dr.sc. Vera Cesar
4. Prof.dr.sc. Nada Oršolić (zamjena)

Disertacija je pohranjena u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
University of Dubrovnik
Ruđer Bošković Institute
University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of
Molecular biosciences

PhD thesis

Scientific Area: Interdisciplinary Area of Science

Scientific Fields: Biology and Basic Medical Sciences

THE HEALTH SAFETY ASSESSMENT OF SELECTED FOOD SUPPLEMENTS AND THEIR TOXICOLOGICAL EFFECT *IN VIVO*

Lidija Barušić

Thesis performed at: Laboratory for Objects of Common Use Teaching Institute of Public Health „Dr. Andrija Štampar“ and Division Animal Physiology Department of Biology Faculty of Science University of Zagreb

Supervisor/s: Jasna Bošnjir, PhD, Associate Professor and Domagoj Đikić, PhD, Associate Professor

Short abstract:

Due to the lack of data related to the toxicological public health safety check, the use of certain plant species contained within nutritional supplements with vasodilating effect was carried out by scientific research to determine the presence of residual pesticides, heavy metals and unauthorized pharmacologically active substances. The aim of this dissertation was to establish the combined toxicological effects of plant species present in the investigated products on the *in vivo* Swiss mouse model. It has been found that there are interactions of certain plant species that manifest themselves with adverse effects on haematological parameters, redox and antioxidative equilibrium in experimental animal tissues. The dissertation has an important contribution in the field of public health and toxicology, but also has the fundamental scientific contribution due to the innovative approach in the analysis of the obtained results by the Cluster method which further determined the quantitative correlation and grouping of certain plant species and contaminants in order to reach the conclusion and recommendations that plant formulations represent the greatest potential toxicological risk for a particular physiological system.

Number of pages: 250

Number of figures: 76

Number of tables: 56

Number of references: 302

Original in: Croatian

Key words: food supplements, metals, pesticides, sildenafil, oxidative stress

Date of the thesis defence: 27. 03. 2018.

Reviewers:

1. Dinko Puntarić, PhD, Full Professor
2. Irena Landeka Jurčević, PhD, Full Professor
3. Vera Cesar, PhD, Full Professor
4. Nada Oršolić, PhD, Full Professor (substitute)

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

ZAHVALA

„Tko ima jaku volju uvijek će pronaći sredstva da postigne svoj cilj.“ ... Don Bosco

Veliko hvala mojim dragim mentorima izu.prof.dr.sc. Jasni Bošnjir i izu.prof.dr.sc. Domagoju Đikiću na velikoj podršci, iznimnom trudu i pomoći koju su mi pružili tijekom izrade ovog doktorskog rada. Hvala vam što ste svoju stručnost i znanje nesebično djelili sa mnom.

Veliko hvala Povjerenstvu za ocjenu disertacije prof Veri Cesar, prof Ireni Landeki Jurčević i prof Dinku Puntarić na izdvojenom vremenu za čitanje rada, susretljivosti i pomoći te korisnim savjetima.

Posebnu zahvalnost upućujem dragim kolegama doktorima znanosti, inženjerima i tehničarima iz Službe za okoliš i zdravlje NZZJZ „Dr. Andrija Štampar“ koji su svojom stručnom pomoći i radom pridonjeli u ostvarivanju ciljeva ove disertacije. Hvala Lidija, Josipa, Jasenka, Goga, Maja, Antonija, Martina, Ivana i Tomislave. Također se zahvaljujem i svima ostalim dragim kolegama sa Odjela prehrane na podršci, savjetima i ohrabrenju.

Hvala doc.dr.sc. Milanu Miliševiću, dr. med sa Škole NZ „Andrija Štampar“ i dr.sc. Krunoslavu Peteru, dipl.ing. iz Službe za znanost NZZJZ „Dr. Andrija Štampar“ na informatičkoj podršci u obradi rezultata.

Želim se zahvaliti i kolegama sa Zavoda za animalnu fiziologiju Biološkog Odsjeka Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu koji su svojom stručnom pomoći doprinjeli realizaciji ovoga rada.

Veliko hvala mojoj dragoj prijateljici i kolegici Silvuni Mlačić, voditeljici Laboratorija za razvoj u Plivi, na krizi i vremenu koje je nesebično utrošila pomažući u realizaciji jedne ideje. Hvala ti Silve, nezamjenjiva si.

Hvala svim mojim dragim prijateljima, „mojim curama“, kumovima, rodbini i svim meni dragim ljudima koji su sve ove godine bili moralna podrška ovog malog projekta.

Posebno hvala mojim dragim roditeljima Mariji i Vladi, sestrama Jeleni i Vesni, bratu Vladislavu, svekrvi Mariji na bezuvjetnoj podršci, ljubavi, vjeri i nadi s kojom su me na ovom putu pratili i zadužili.

Na kraju veliko i neizmerno hvala mojoj obitelji, mom dragom suprugu Josipu na iskrenoj ljubavi, razumjevanju i velikoj podršci svih ovih godina. Veliko hvala uz suzu radosti za moje najdraže anđele Josipu, Ivana, Luciju i Lanu Mariju. Vi ste bili moja najveća snaga i inspiracija, svjetlo na kraju tunela koje me tjeralo naprijed. Neizmerno sam Bogu zahvalna na vama. Sve vas puno volim.

Ovaj rad posvećujem svojoj obitelji.

SADRŽAJ

1. Uvod	4
1.1. Uvod	5
1.2. Literaturni pregled	7
1.2.1. Dodaci prehrani	7
1.3. Eretilna disfunkcija	9
1.4. Inhibitori fosfodiesteraze 5 (PDE-5)	10
1.6. Biljni dodaci prehrani namjenjeni za pomoć pri erektilnoj disfunkciji.....	17
1.6.1. Biljke koje se smatraju vazodilatacijskim stimulansima obuhvaćene u ovom istraživanju	20
1.7. Oksidacijski stres.....	40
1.7.1. Slobodni radikali	41
1.7.2. Lipidna peroksidacija	44
1.7.3. Antioksidansi.....	46
1.7.4. Glutacion peroksidaza	48
1.8. Kontaminanti iz okoliša	50
1.8.1. Teški metali.....	50
1.8.2. Pesticidi	56
1.9. Cilj i hipoteza rada	62
2. Materijali i metode	63
2.1. Komercijalni proizvodi korišteni u istraživanju	64
2.1.1. Popis pojedinačnih biljnih vrsta u istraživanim proizvodima	64
2.2. Kemijske analize organskih i anorganskih tvari u istraživanim proizvodima	66
2.2.1. Određivanje prisutnosti nedeklariranih farmakoloških tvari	66
2.2.2. Određivanje ostataka pesticida	67

2.2.3. Određivanje prisutnosti teških metala	69
2.2.4. Metoda analize industrijskih otapala	71
2.3. Toksikološke <i>in vivo</i> analize	71
2.3.1. Pokusne životinje	71
2.3.2. Analiza parametara u perifernoj krvi tretiranih životinja	73
2.3.3. Biomarkeri oksidativnog stresa	75
2.3.4. Određivanje spolnih hormona	78
2.3.5. Histopatološke analize	80
2.4. Statistička obrada podataka	80
3. Rezultati	82
3.1. Rezultati kemijskih analiza organskih i anorganskih tvari u istraživanim proizvodima	83
3.1.1. Rezultati analize farmakološki aktivne tvari (sildenafil)	83
3.1.2. Rezultati analize ostataka pesticida	84
3.1.3. Rezultati analize teških metala	85
3.1.4. Rezultati analize organskih otapala	86
3.2. Rezultati toksikološke analize <i>in vivo</i>	86
3.2.1. Prirast životinja nakon pokusnog razdoblja	86
3.2.2. Organosomatski indeks pojedinih organa životinja nakon pokusnog razdoblja	89
3.2.3. Koncentracije spolnih hormona u serumu životinja nakon pokusnog razdoblja	96
3.2.4. Hematotoksični i imunotoksični potencijal istraživanih proizvoda	99
3.2.5. Oksidacijski stres i promjene antioksidacijskog sustava u tkivima organa pokusnih životinja	118
3.2.6. Rezultati histološke analize testisa	137
3.3. Spearmanova korelacijska analiza (Rho)	140

3.3.1. Spearmanov koeficijent korelacije fizioloških parametara životinje i koncentracije pojedinih biljaka zastupljenih u proizvodima	140
3.3.2. Spearmanov koeficijent korelacije hematoloških parametara životinje i koncentracije biljaka zastupljenih u proizvodima.....	143
3.3.3. Spearmanov koeficijent korelacije oksidacijskog stresa u životinja i koncentracije biljaka zastupljenih u proizvodima	148
3.3.4. Spearmanov koeficijent korelacije saplemenata, teških metala i pesticida i koncentracije biljaka zastupljenih u proizvodima	151
3.4. Analiza rezultata metodom hijerarhijske aglomerativne klaster analize..	155
4. Rasprava	173
5. Zaključci.....	193
6. Literatura.....	197
7. Sažetak.....	229
8. Summary	232
9. Popis kratica	235
10. Prilozi	239
11. Životopis	244

1. UVOD

1.1. Uvod

Sinergija života sa prirodom najbolje se očituje u povezanosti biljaka i čovjeka. Stoljećima je jedini oblik liječenja i ublažavanja boli bila fitoterapija. Tradicionalna fitoterapija sinonim je za herbalizam i ne temelji se na znanstvenim spoznajama, a suvremena fitoterapija uz tradicionalnu uporabu ljekovitog bilja zahtjeva i znanstvenu potvrdu. Tradicionalna medicina ima dugu povijest, a definira se kao skup znanja, vještina i prakse temeljenih na uvjerenjima i iskustvima različitih kultura s ciljem prevencije bolesti i liječenja fizičkih i psihičkih zdravstvenih poteškoća [1].

Tradicionalni sustavi medicine postali su tema od globalnog značaja u proteklom desetljeću. Smatra se da se i danas oko dvije trećine čovječanstva liječi ljekovitim biljem kao primarnim lijekovima. Poznato je da većina zemalja ima slabo regulirane biljne lijekove često bez registracije i kontrole pa je osiguranje sigurnosti, kvalitete i učinkovitosti ljekovitog bilja pitanje od velike važnosti [2].

Na svjetskoj razini u uporabi je oko 20.000 ljekovitih biljaka od čega je njih 250 osnova sastojaka suvremenih lijekova sa biljnim aktivnim tvarima [3]. Svjetska zdravstvena organizacija (WHO, engl. *World Health Organization*) je od 1999. godine objavila četiri izdanja, odnosno 116 monografija odabranog ljekovitog bilja koje predstavljaju značajan izvor istraživačkih podataka u korištenju biljnih lijekova. WHO je također omogućila Novim nezavisnim državama (NIS, engl. *Newly Independent States*) kao i zemljama srednje i istočne Europe (CCEE, engl. *Countries of Central and Eastern Europe*) da razviju svoje vlastite subregionalne monografije za najčešće korištene ljekovite bilje. Svrha monografije je pružiti znanstvene informacije o sigurnosti, učinkovitosti i kontroli kvalitete ljekovitog bilja te lakša razmjena informacija među zemljama članicama. Monografija svake biljke uključuje dva dijela:

- farmakopejski zahtjevi za osiguranjem kvalitete (botaničke značajke, distribucija, zahtjevi čistoće, kemijske analize te aktivni kemijski sastojci)

- dio kliničke primjene (farmakologija, kontraindikacije, upozorenja, nuspojave i doziranje) [4].

Osim što su od velikog značaja za farmaceutsku industriju prirodni biljni proizvodi nalaze svoju primjenu i u proizvodnji dodataka prehrani, koji pored zadovoljavajućih nutritivnih svojstva pokazuju i određene farmakološke i fiziološke efekte na zdravlje i prevenciju bolesti. U današnje vrijeme suočeni sa sve većim posljedicama štetnih učinaka izazvanih alopatskim lijekovima, često se pribjegava korištenju alternativne medicine pri rješavanju nekog zdravstvenog problema. Ljudi su uvijek vjerovali u ljekovita svojstva biljaka, ali je konvencionalna medicina često iskazivala sumnju u ljekovitu moć koja im se pripisivala. Razlog leži u njihovoj sigurnosti i zdravstvenim tvrdnjama koje se vežu uz njih, a koje nisu znanstveno potkrijepljene [5]. Stoga je izazov današnjice osigurati da se tradicionalna medicina koristi ispravno kroz ustaljene postupke istraživanja i vrednovanja [6]. Najveći problem pri uporabi biljnih proizvoda mogu predstavljati mogući štetni učinci koji nastaju zbog interakcije između sastojaka, odnosno biljnih vrsta koje se nalaze u sastavu proizvoda, ali i sa farmakološkim tvarima iz lijekova koje potrošač usporedno koristi. Štetni učinci biljnih proizvoda mogu biti posljedica prirodne toksičnosti biljke, biološkog ili kemijskog onečišćenja sirovine ili namjernog patvorenja jeftinim sirovinama i sintetskih farmakološki aktivnih tvari [7].

Sigurnost dodataka prehrani na bazi bilja postala je problem globalnih razmjera. Zemlje članice traže od Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) da se kroz nacionalne farmakovigilancijske centre provodi kontrola biljnih proizvoda i pratećih štetnih učinaka te da adekvatni stručni timovi istražuju uzroke štetnih učinaka koji mogu biti posljedica upotrebe određenih biljnih vrsta [8].

Cilj disertacije je istraživanje modela toksikološkog djelovanja biljnih vrsta: *Epimedium sagittatum*, *Panax quinquefolius*, *Lepidium meyenii*, *Tribulus terrestris*, *Turnera diffusa*, *Sarsaparilla officinalis*, *Humulus lupulus*, *Melissa officinalis*, *Origanum vulgare*, *Ginkgo biloba*, *Ilex paraguariensis*, *Smilax aspera*, *Schisandra chinensis* i aminokiseline L-arginin. Navedene biljne vrste se već dugi niz godina koriste kao pomoć kod smanjenog libida i erektilne disfunkcije (ED, engl. *Erectile Dysfunction*).

Rezultati disertacije ukazuju na ozbiljnost problema i potrebe reevaluacije terapijske strategije i javnozdravstvenog pristupa kada su u pitanju dodaci prehrani na bazi bilja.

1.2. Literaturni pregled

1.2.1. Dodaci prehrani

Dodaci prehrani (engl. *Food supplements*) su pripravci proizvedeni iz koncentriranih izvora hranjivih tvari sa svrhom povoljnog djelovanja na zdravlje ljudi. Hranjivim tvarima u ovoj vrsti proizvoda smatraju se vitamini i minerali, bjelančevine, aminokiseline, masne kiseline, celuloza, pivski kvasac, inulin, lecitin, bilje i ljekovito bilje te njihovi ekstrakti ili koncentracije, zaštitne tvari biljnog podrijetla i dr. Na tržište se stavljaju isključivo pakirani u doziranim oblicima (kapsule, pastile, tablete, sirupi i slično). Za proizvodnju biljnih pripravaka mogu se upotrebljavati svježi ili sušeni, cijeli ili segmentirani (korijen, list, plod, cvijet) biljni dijelovi ili čiste tvari biljnog podrijetla i sekundarni proizvodi onih biljnih vrsta koje se nalaze na Listi dozvoljenih ljekovitih biljnih vrsta navedenih u Pravilniku o hrani za posebne prehrambene potrebe Republike Hrvatske (RH) [9, 10].

Veći dio populacije, zdrave i bolesne, smatra sigurnim korištenje biljnih proizvoda registriranih kao dodaci prehrani te je njihova potrošnja u porastu. U RH dodaci prehrani regulirani su Pravilnikom o dodacima prehrani [11] koji je podzakonski akt Zakona o hrani [12] i usklađen je s odredbama Direktive o dodacima prehrani Europske unije (EU, engl. *European Union*) [8]. Prema navedenim propisima kod označivanja, prezentacije i oglašavanja dodataka prehrani ne smiju se isticati niti upućivati na svojstva prevencije, liječenja ili izlječenja bolesti ljudi. Na tržište EU i RH zabranjeno je stavljati proizvode koji imaju istaknute tvrdnje koje dovode potrošače u zabludu.

Sve više je prisutna potreba za uspostavom općih načela koja bi bila primjenjiva za sve tvrdnje koje se navode na dodacima prehrani te da se pri tome osigura visoka razina zaštite potrošača. Tvrdnje bi se trebale temeljiti na općeprihvaćenim

znanstvenim dokazima bitnima za očuvanje i unapređenje zdravlja ljudi [13]. Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA, engl. *The European Food Safety Authority*) provodi postupak ocjenjivanja znanstvenih dokaza vezano za traženu tvrdnju, a Europska komisija (EC, engl. *European Commission*) provodi njihova odobrenja.

Za postupak registracije dodataka prehrani na bazi bilja sa istaknutom tvrdnjom u RH potrebno je Ministarstvu zdravstva (MIZ) putem javnog portala dostaviti obavijest o stavljanju proizvoda na tržište i ishoditi odobrenje od Povjerenstva za dodatke prehrani MIZ-a. Uz obavijest se prilaže prateća dokumentacija (deklaracija, proizvođačka specifikacija s podacima o kvalitativnom i kvantitativnom sastavu proizvoda, kemijski sastav, podatke o količini aktivnih tvari, navode o interakcijama, navode i/ili dokaze o netoksičnosti i sigurnosti primjene kod ljudi te certifikat o zdravstvenoj ispravnosti ili sukladnosti proizvoda). Zakonski propisi nalažu da biljne vrste koje se koriste u dodacima prehrani moraju biti u upotrebi više od deset godina bez vidljivih štetnih učinaka na zdravlje pojedinaca koji ih koriste [14]. Toksikološka sigurnost mnogih takvih proizvoda nije dovoljno istražena. Danas se teži standardizaciji biljnih ekstrakata sa točno definiranom količinom aktivne ili ljekovite tvari u jedinici mjere proizvoda (1 g ili 1 ml).

Kontrola zdravstvene ispravnosti dodataka prehrani obuhvaća provjeru prisutnosti određenih granično dozvoljenih ili zabranjenih kontaminanata kao što su teški metali i pesticidi te provjeru aditiva, vitamina, alergena kao i provjeru prisustva nedozvoljenih farmakoloških komponenti [15].

U Americi dodaci prehrani spadaju u nadležnost Agencije za hranu i lijekove (FDA, engl. *Food and Drug Administration*). Za razliku od lijekova FDA odobrava njihovo legalno stavljanje na tržište bez prethodne procjene sigurnosti i učinkovitosti. Kontrola se obavlja najčešće po prijavi potrošača ili kao dio rutinskih inspeksijskih kontrola na tržištu. Prema zakonu proizvođač je dužan osigurati proizvodnju prema zahtjevima dobre laboratorijske prakse (GMP, engl. *Good Manufacturing Practice*) radi osiguranja kvalitete proizvoda koja između ostaloga uključuje osposobljenost djelatnika, čistoću sirovine, kontrolu prostora i opreme, kontrolu kontaminanata, prisustvo sastojaka u ograničenim količinama [16]. Prema mišljenju određenih medicinskih institucija u Americi navedeni zahtjevi daju određene standarde

kvalitete i mogućnost FDA-u da može intervenirati i povlačiti opasne proizvode s tržišta ali na žalost ne jamče sigurnu uporabu proizvoda za sve skupine potrošača obzirom da neki proizvodi mogu sadržavati aktivne sastojke koji imaju jak učinak na organizam te mogu uzrokovati neočekivane opasnosti po život u osjetljivim populacijskim skupinama. Zbog neodgovornosti proizvođača i nedostatne kontrole nadležnih institucija u posljednje vrijeme sve su češći alarmantni natpisi na stranicama FDA i javnih glasila o pronalasku nedozvoljenih aktivnih tvari u biljnim proizvodima koje ugrožavaju ljudski život [17].

1.3. Eretilna disfunkcija

Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji [18] seksualno zdravlje se definira kao stanje fizičkog, emocionalnog, mentalnog i društvenog blagostanja u odnosu na seksualnost. Seksualnost može biti podložna interakcijama bioloških, psiholoških, društvenih, kulturnih i vjerskih čimbenika [18]. Spolna želja ili libido (*lat.* želja, požuda) je psihoanalitički izraz za spolnu energiju koja pripada instinktu, i prolazi svoj proces tijekom psihoseksualnoga razvoja. Libido je ovisan o fizičkom i psihičkom zdravlju pojedinca kao i godinama starosti koje doprinose njegovu smanjenu. Osim starosti kao važan čimbenik koji utječe na smanjenje libida smatra se i stres koji može imati utjecaja i na samu razinu hormona testosterona. Koliko razina testosterona utječe na libido je pitanje koje u znanstvenoj literaturi nailazi na oprečne stavove. Problem smanjenog libida nastao kao posljedica psihološkog stanja može se riješiti djelovanjem na uzrok nastanka [19-21]. Smanjeni libido karakterizira i stanje ED. Američki institut za zdravstvo ED definira kao nemogućnost postizanja i održavanja erekcije dostatne za zadovoljavajući odnošaj (klasifikacija bolesti DSM-5) [22]. ED spada u kategoriju najstarijih bolesti, a prema Globalnoj studiji seksualnih stavova i ponašanja (GSSAB, engl. *Global Study of Sexual Attitudes and Behaviours*) svako drugi muškarac u dobi od 40 do 70 godina pati od ED [23]. Procjenjuje se da bi do 2025. godine broj ljudi s problemima ED mogao prijeći brojku od 320 milijuna, s najvećim povećanjem u zemljama u razvoju. Rezultati dobiveni epidemiološkom studijom na svjetskoj razini ukazuju na stopu prevalencije za ED od 33 do 47% ovisno o području ispitivanja i kulturološkim

razlikama. Učestalost je veća u bolesnika s neplodnošću, hipertenzijom, dijabetesom, hormonalnim poremećajem, depresijom i niskim libidom [24].

Lijek za pomoć kod ED naziva se Viagra® (Sildenafil), a na tržištu se mogu pronaći i njegovi manje poznati konkurenti Cialis® (tadalafil), Levitra® (vardenafil) i Stendra® (avanafil) [25]. Viagra je 1998. godine prvi put lansirana na tržište kao „mala plava tableta“ koja je postala najprodavaniji lijek u povijesti farmaceutske tvrtke Pfizer. Viagra je na tržištu prvenstveno predstavljena kao sredstvo za pomoć kod ED u starijoj populaciji. S vremenom promocija Viagre mijenja ciljanu grupu potrošača i prikazuje se u reklamama s mladim ljudima i luksuznim stilom života. Danas se Viagra kao i biljni proizvodi za pomoć kod ED koriste puno više kod mlađe i srednje dobi za jačanje libida. Ta činjenica ne čudi ako uzmemo u obzir moderan način urbanog života uzrokovan stresom, poslovnim obvezama, različitim ambicijama te obiteljskim i zdravstvenim problemima. Najčešće se te nedostatke kompenzira brzo djelujućim mjerama koje povećavaju zadovoljstvo kao što su nezdrava, brza i obilna hrana, alkohol, pušenje te premalo tjelesne aktivnosti. Pretilost, povišeni krvni tlak, povišena razina šećera i masnoća u krvi doprinose razvoju ED. Debljina prethodi mnogim bolestima, a smatra se da oko 30% muškaraca s prekomjernom tjelesnom masom ima ED (oko 80% muškaraca s ED su oni s prekomjernom tjelesnom masom). Promjene uzrokovane psihološkim, neurološkim, vaskularnim ili kavernoznim faktorom uzrokuju neki od stupnjeva ED u oko 50% muškaraca u dobi od 40-70 godina [26-28].

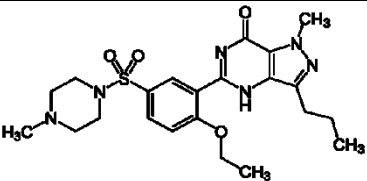
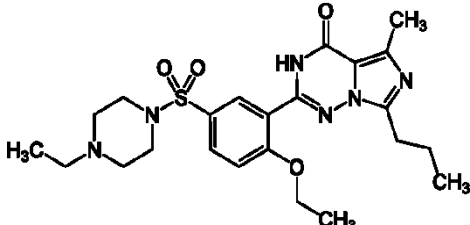
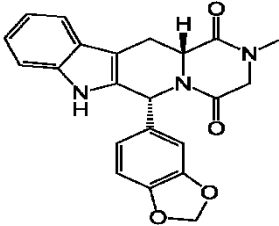
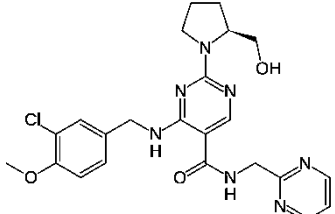
1.4. Inhibitori fosfodiesteraze 5 (PDE-5)

Aktivna tvar u Viagri je sildenafil acetat koji djeluje kao inhibitor fosfodiesteraze tipa 5 (PDE-5). Prema preporukama Američkog udruženja urologa (EAU, engl. *American Urological Association*) terapija prvog izbora za liječenje ED-a su inhibitori PDE-5. Sildenafil je prvi PDE-5 inhibitor s najviše provedenih kliničkih studija, a sadrži sildenafil u obliku sildenafil citrata u preporučenim dozama od 25, 50 i 100 mg. Učinkovitost mu je najizraženija u periodu od 30-60 minuta nakon uzimanja za vremenski period od 12 sati. Apsorciju usporava istovremena konzumacija masne hrane [26, 29].

Od 2003. godine na tržištu postoji još jedno sredstvo za pomoć kod ED pod nazivom Tadalafil (Cialis®) koja ima prolongirani učinak i do 36 sati nakon uzimanja. Preporučene doze su od 10 i 20 mg, a apsorpcija nije uvjetovana vrstom hrane. Treći oralni pripravak za pomoć kod ED je Vardenafil (Levitra®) koji je registriran iste godine kao i Tadalafil. Učinkovit je 30 minuta nakon primjene, a djelotvornost mu je izražena i do 10 sati. Preporučuje se u dozama od 5, 10 i 20 mg, a masni obrok smanjuje njegovu apsorpciju [30]. Avanafil (Stendra®) je PDE-5 inhibitor novije generacije kojeg je FDA odobrio 27. travnja 2012. a 21. lipnja 2013. Europska agencija za lijekove (EMA, engl. *European Medicines Agency*) . Dolazi u obliku tableta u dozama od 50, 100 i 200 mg. Istraživanja ukazuju na povoljnu farmakodinamiku i farmakokinetiku lijeka odnosno, dobre učinkovitosti i niže incidencije štetnog djelovanja u usporedbi sa PDE-5 inhibitorima prve generacije. Također u usporedbi sa ostalim lijekovima ima karakteristiku najbržeg (15 min od uzimanja) i najkraćeg (do 6 sati) djelovanja [31,32]. Tijekom proteklih pola stoljeća, sredstva za pomoć pri ED brzo se razvijaju, a pored već spomenutih postoje i Udenafil i Mirodenafil koji se trenutno nalaze u kliničkoj upotrebi u nekoliko država [33]. Ove aktivne tvari, osim što imaju izrazit učinak na ED imaju i niz značajnih štetnih učinaka. Stoga je zabrinjavajući podatak da sve više mladih ljudi koji i ne pate od ED koriste ove vrste lijekova kako bi produljili seksualni užitak, nabavljajući ih ilegalno putem interneta. Najopasniji štetni učinci su kardiovaskularni među koje se ubrajaju srčane aritmije (nepravilan rad srca), srčani i moždani udar, nagle promjene tlaka pa i smrt. Kao medicinski značajni najčešći prijavljeni štetni učinci su: glavobolja, omaglica, oštećenja vida koje se obično javlja naglo i najčešće je trajno, smanjenje ili iznenadan gubitak sluha, vrtoglavica, crvenilo, začepjenost nosa, priapizam (erekcije koje traju 4 sata ili dulje), dispepsija, učinak na krvarenje, oštećenje jetre i bubrega, infarkt miokarda, bol u prsima i ubrzani otkucaji srca [34]. Kontraindicirana je istodobna primjena s potentnim inhibitorima CYP3A4 (engl. *Cytochrome P450 family 3 subfamily A member 4*) kao što su ketokonazol ili ritonavir (mikostatik i lijek za HIV) [35].

Dokazano je da svi PDE-5 inhibitori kod bolesnika s težim kardio-vaskularnim poremećajem potenciraju vazodilatatorni i hipotenzivni učinak te je njihova istodobna primjena sa nitratima apsolutno kontraindicirana [36].

Tablica 1. Kemijske strukture inhibitora PDE-5 sildenafil, Vardenafila, Tadalafila i Avanafila¹²

Naziv tvari	CAS, formula	Struktura
SILDENAFIL	Registry Number (CAS): 139755-83-2 Formula: C ₂₂ H ₃₀ N ₆ O ₄ S	
VARDENAFIL	Registry Number (CAS): 224785-90-4 Formula: C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₄ S	
TADALAFIL	Registry Number (CAS): 171596-29-5 Formula: C ₂₂ H ₁₉ N ₃ O ₄	
AVANAFIL	Registry Number (CAS): 330784-47-4 Formula: C ₂₃ H ₂₆ ClN ₇ O ₃	

¹ Prilagođeno prema <http://www.acdlabs.com/resources/freeware/chemsketch/> [22.10.2016.]² Prilagođeno prema <http://www.acdlabs.com/resources/freeware/chemsketch/> [22.10.2016.]

1.4.1. Mehanizam djelovanja inhibitora fosfodiesteraze 5 (PDE-5)

Fosfodiesteraze (PDE, engl. *Phosphodiesterase*) spadaju u porodicu enzima koji su na temelju svojstava podijeljeni u 11 obitelji (PDE1 - PDE11) a kontroliraju unutarstanične razine cikličkih nukleotida [37]. Enzim PDE-5 (Slika 1.) je dimer čiji se monomeri sastoje od regulacijskog i reakcijskog dijela.

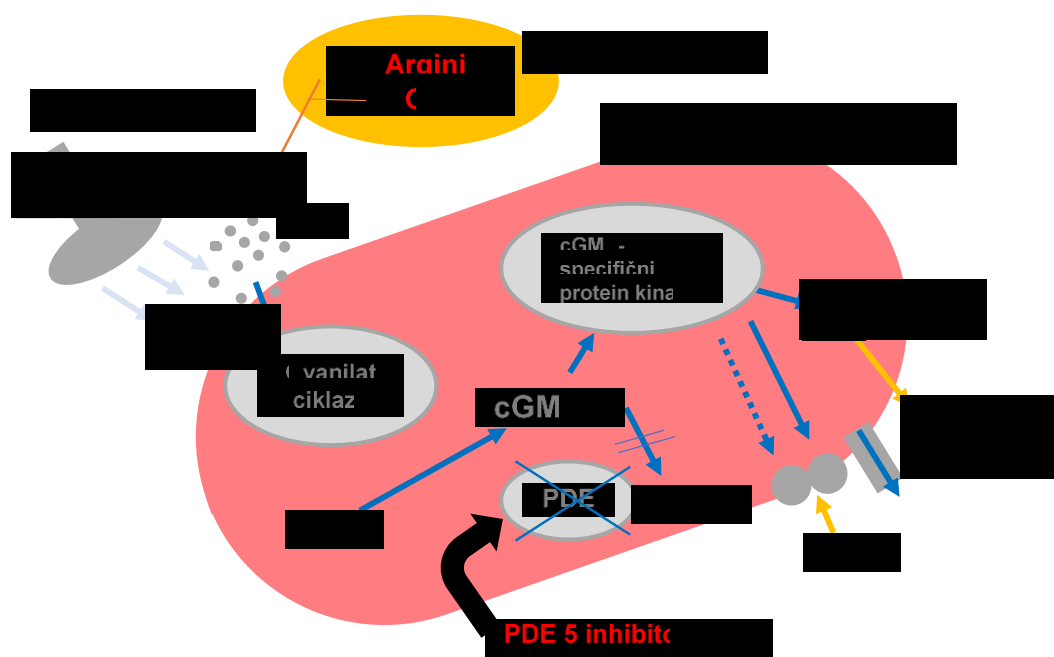


Slika 1. Struktura enzima fosfodiesteraze 5 (PDE-5). Inhibicija ovog enzima je mehanizam djelovanja aktivnih tvari koje se koriste za liječenje ED³

Regulacijski dio, koji se nalazi na amino-terminalnoj strani monomera, sadrži fosforilacijsko mjesto, dva alosterička cGMP-vezna mjesta i dimerizacijski dio (mjesto spoja s drugim monomerom). Reakcijski dio se nalazi na karboksi-terminalnoj strani monomera, a sadrži katalitičku domenu s dva Zn²⁺ vezna mjesta i cGMP-vezno mjesto [38]. Sve PDE sadrže stabilnu katalitičku domenu ~270 aminokiselina na karboksi-kraju, dok se dijelovi koji jako variraju nalaze u blizini amino-kraja [28]. PDE-5 su izvorno izolirani iz trombocita ali popularnost su stekli otkrićem njihove uloge regulatora glatkih mišićnih kontrakcija što je pridonijelo rješavanju problema ED i plućne hipertenzije [39]. Kataliziraju razgradnju cikličkog adenin monofosfata (cAMP, engl. *cyclic Adenine Monophosphate*) i cikličkog gvanozin monofosfata (cGMP, engl. *cyclic Guanosine Monophosphate*), što

³ https://es.123rf.com/photo_36765966_la-fosfodiesterasa-5-pde5.html [preuzeto 8.11.2017].

posljedično utječe na razinu unutarstaničnog kalcija, odnosno sniženje njegove koncentracije u stanicama glatkih mišića koji se potom relaksiraju [40]. Funkcija PDE-5 je regulirana koncentracijom supstrata unutar stanice. Inhibitori PDE-5 stupaju u interakciju samo s reakcijskim dijelom enzima. ED je obično uzorkovana niskom koncentracijom cikličkog gvanozin-monofosfata (cGMP) što rezultira povećanom aktivnosti PDE-5 (Slika 2).



Slika 2. Način djelovanja PDE-5 inhibitora u svrhu poboljšanja fiziološkog odgovora na spolni nadražaj⁴

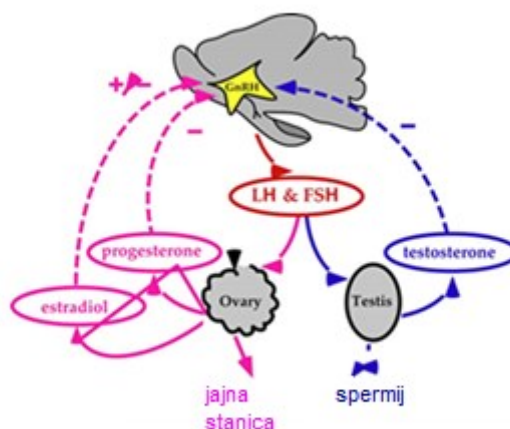
Spolno uzbuđenje preko parasimpatičkih živčanih završetaka kavernoznog tijela dovodi do povećanog stvaranja dušikovog monoksida (NO). Jedan dio NO sintetizira se iz L-arginina iz endotelnih stanica. NO difundira u stanice glatkih mišića stijenki krvnih žila i aktivira enzim gvanilat-ciklazu (GC) koja proizvodi ciklički gvanozin-monofosfat (cGMP). Povećana sinteza cGMP dovodi do opuštanja glatkog mišićja što rezultira širenjem arterija i povećanim dotokom krvi u kavernožno tijelo, odnosno do erekcije (Slika 2.) Sprječavanjem razgradnje cGMP-a inhibitori PDE-5 poboljšavaju erektilnu funkciju [41].

⁴ Gerald Brock, Current drug therapies of ED, www.medscape [preuzeto 06.11.2016.].

1.5. Spolni hormoni

Spolni hormoni imaju ulogu u razvoju spolnih organa, u spolnoj diferencijaciji spolnih organa te i u nizu drugih tjelesnih funkcija. Neravnoteža spolnih hormona utječe na razvoj ED. Po kemijskoj strukturi spadaju u steroide među kojima razlikujemo estrogene (estradiol, estron) i progesteron u žena te androgene (testosteron, androsteron) u muškaraca [42]. Gonadotropin-oslobađajući hormon (GnRH, engl. *Gonadotropin-releasing hormon*) također poznat kao LHRH (engl. *Luteinizing-hormone-releasing hormone*) izlučuje se pod nadzorom hipotalamusa iz prednjeg režnja hipofize (adenohipofiza). To je hormon koji stimulira oslobađanje luteinizacijskog hormona (LH, engl. *Luteinizing hormone*) i folikul stimulirajućeg hormona (FSH, engl. *Follicle-stimulating hormone*) koji nadziru proizvodnju spolnih hormona (Slika 3.). Hormoni LH i FSH u žena stimuliraju razvoj folikula i ovulaciju te proizvodnju estrogena, a u muškaraca FSH povećava proizvodnju androgen vezajućeg proteina u Sertolijevim stanicama testisa i neophodan je za spermatogenezu dok LH potiče produkciju testosterona u Leydigovim stanicama. Manje količine androgenih hormona luči i kora nadbubrežnih žlijezda [43,44].

Testosteron, kao primarni muški spolni hormon koji ima utjecaja na dlakavost, raspoloženje, promjenu glasa i nekoliko drugih tjelesnih funkcija [45] mjeri se u najvišoj koncentracijskoj razini u funkcionalnoj životnoj dobi od 18-35 godina sa dnevnom proizvodnjom od oko 7 mg u zdravih muških osoba. Razina testosterona postepeno se smanjuje sa starošću [39]. Testosteron je odgovoran za proizvodnju dušikovog oksida (NO, engl. *Nitric Oxide*) čija se sinteza odvija na razini neuralne izoforme dušik - oksid - sintetaze (nNOS) [46]. NO djeluje vazodilatatorski i na taj način održava tonus krvnih žila i regulira krvni tlak [47] te utječe i na relaksaciju korpus kavernosuma, a time i na samu erekciju [48].



Slika 3. Hipotalamusno – hipofizna gonadalna os (HPG, engl The Hypothalamic-Pituitary-Gonadal) sastoji se od hipotalamusa i njegovih živčanih veza s ostatkom mozga, hipofize i testisa ili jajnika⁵

Ukoliko spolne žlijezde proizvode malu količinu hormona ili ih uopće ne proizvode razvija se hipogonadizam. Hipogonadizam se u odraslih muškaraca može manifestirati kroz smanjeni libido, ED, neplodnost, gubitak mišićne mase i dr. [43]. Snižena koncentracija testosterona prisutna je u zakašnjelom pubertetu dječaka, a ukazuje i na nisku razinu gonadotropina. Kod impotencije je to prvi znak poremećaja u osi hipotalamus-hipofiza i poremećene kontrole izlučivanja androgena. Nadomjesna terapija testosteronom može se primiti oralno, lokalno ili injekcijama što dovodi do određenih prednosti i nedostataka. Pojedina retrospektivna istraživanja ukazuju na povećani rizik od kardiovaskularnih komplikacija pri uporabi zamjenskog testosterona zbog čega se upućuje na potreban oprez u primjeni [45]. Efektivnost nadomjesne terapije testosterona prikazana je u studiji Morgunov i sur. [49] provedenoj u ljudi sa smanjenom količinom testosterona i dijagnosticiranom ED gdje se nakon 12 mjeseci terapije potvrđuje normalizirana razina testosterona i povećan indeks ED [49].

Prema znanstvenim spoznajama spolni nagon kod žena također je pod kontrolom androgena. Kliničke studije ukazuju na uspješnost u terapiji testosteronom u

⁵ <http://pblcr.salk.edu/research.php> [preuzeto 26. 8. 2016].

odnosu na estradiol kod povećanja seksualne motivacije žena s odstranjenim jajnicima [42]. Poremećaj smanjene spolne želje (HSDD, engl. *Hypoactive sexual desire disorder*) javlja se u jedne na deset odraslih žena. Istina, primjenom zamjenske testosteron terapije dolazi do poboljšanja seksualne želje kod HSDD u menopauzi, ali studijski podaci za stanje predmenopauze su ograničeni a dugoročna terapijska sigurnost je upitna [50].

Androgeni su danas i najpoznatija dopingirajuća sredstva zbog svog utjecaja na snagu, energiju, izdržljivost, agresivnost i izgled tijela (engl. *body building*). Lako se detektiraju masenom spektroskopijom iz urina [51] ali zabrinjavaju štetni učinci do kojih može doći nakon njihove primjene. Prema Švedskoj studiji Eklöf i sur. [52] pod nazivom „Antidoping Hot-Line“ najviše prijavljenih nuspojava vezano je za anaboličke androgene steroide. Najčešće se spominju agresivnost, depresija, akne, ginekomastija, anksioznost, problemi potencije, atrofija testisa, zadržavanje tekućine i poremećaji raspoloženja. Nuspojave kod žena uključuju menstruacijske poremećaje, dlakavost lica i niži glas. Sve navedeno predstavlja novi zdravstveni problem koji zahtjeva određene mjere prevencije i stručnu medicinsku pomoć [52].

1.6. Biljni dodaci prehrani namjenjeni za pomoć pri erektilnoj disfunkciji

Široka dostupnost, diskretnost i anonimnost te prihvatljive cijene neki su od ključnih čimbenika koji su pridonjeli porastu upotrebe prirodnih proizvoda za potenciju. Među dodatke prehrani na bazi bilja i biljnih ekstrakata ubrajamo i proizvode namjenjene za pomoć kod smanjenog libida i erektilne disfunkcije (ED) [11].

Jednostavna primjena i dostupnost biljnih dodataka prehrani namijenjenih za ublažavanje simptoma kod ED, potiču potrošača da po vlastitom nahođenju pribjegava samoliječenju i nekontroliranom korištenju opisanih proizvoda vjerujući u njihovu sigurnost. Pozitivan stav potrošača prema biljnim proizvodima populizira njihovu široku primjenu i oni sve više postaju interesantni osobama koje imaju problema sa potencijom zbog nezdravog načina života i psihičkog stresa (mlađa i

srednja dob). Sveprisutnija je i zloupotreba kao oblik razonode kod mlađih generacija [53].

Alternativna medicina se pri rješavanju problema ED koristi kombinacijom biljaka koje su stoljećima poznate po svojim afrodizijačkim svojstvima, a čijom se sinergijom postiže maksimalan učinak. Međutim, malo je literaturnih podataka koji preporučuju korištenje prirodnih afrodizijaka za ublažavanje, odnosno liječenje problema kod ED. Razlog tome je nedostatak znanstvenih studija sa dovoljnim brojem ispitanika temeljem kojih bi se donijeli čvrsti zaključci o djelovanju ispitivanih tvari [54]. Problem predstavlja i ilegalno dodavanje farmakoloških aktivnih tvari (najčešće sildenafil), što proizvođači koriste kako bi povećali fiziološki učinak za koji se sredstvo deklarira. FDA upozorava na oprez pri upotrebi biljnih proizvoda za pomoć kod ED pogotovo u kombinaciji sa opijatima zbog nastalih štetnih učinaka koji mogu biti pogubni za ljudski život [17]. Slabi sustavi kontrole kvalitete, neodgovarajuće zakonske mjere kao i nekontrolirani distribucijski kanali (internet) pridonose ponudi proizvoda loše kvalitete koji svojim štetnim učincima mogu ugroziti zdravlje i sigurnost potrošača. Stoga WHO potiče jačanje nacionalnih regulatornih mjera koje će osigurati kontrolu i kvalitetu biljnih proizvoda te posvetiti veću pozornost edukaciji potrošača [55]. Biološki aktivne tvari koje su zastupljene u dodacima prehrani za pomoć pri ED ubrajaju se u inhibitore enzima fosfodiesteraze 5 (inhibitori PDE5). Štetni učinci u sklopu deklaracije tih proizvoda kao informacija za potrošače nisu navedeni, jer zakonski nisu ni propisani. Kao najčešći štetni učinci navode se pojava crvenila lica, zamagljen vid, pojačano lupanje srca i glavobolja što upućuju na slične simptome kao kod farmaceutika i predstavlja faktor rizika za nastanak kardiovaskularnih oboljenja. Upravo zbog tih štetnih učinaka farmakološki lijekovi za liječenje ED idu isključivo na lječnički recept kako bi se provjerilo i pratilo zdravstveno stanje pacijenta, odredila odgovarajuća doza primjene i procjenio omjer koristi i rizika za zdravlje pacijenta [56]. Činjenica da su inhibitori PDE-5 kontraindicirani s popratnim nitratima pa iz tog razloga nisu prikladni za određene zdravstvene skupine potakli su znanstvenike na drugačija istraživanja. Fokus je na najnovijim eksperimentalnim i kliničkim istraživanjima gdje se ED pokušava liječiti matičnim stanicama (SC, engl. *Stem cells*) [57]. Predkliničke studije su pokazale da te stanice mogu djelovati na patofiziološke promjene koje uzrokuju ED [58].

Danas je u uporabi preko 61 biljna vrsta za liječenje muških spolnih poremećaja, a pozitivni učinci uglavnom se temelje na empirijskim dokazima [59, 60]. WHO definira ljekovito bilje kao one biljne vrste čiji jedan ili više dijelova sadrže biološki aktivnu tvar koja se može iskoristiti u terapijske svrhe ili za kemijsko farmaceutske sinteze. [61]. Aktivna tvar kod biljaka sa afrodizijačkim potencijalom, istraženo na albino miševima, očituje se u povećanju koncentracije testosterona u serumu [62]. Negativan utjecaj biljaka na zdravlje ljudi može biti posljedica biljnih toksina poznatih kao pirolizidinski i tropanski alkaloidi. Pirolizidinski alkaloidi ubrajaju se među najčešće prirodne toksine koji uzrokuju bolesti kod životinja i ljudi. Postoje mnogi dokumentirani slučajevi trovanja pirolizidinskim alkaloidima uzrokovanih konzumacijom proizvoda na bazi žitarica i biljnih pripravaka budući da su biljke koje su izvor pirolizidinskih alkaloida jako rasprostranjene i brojne [63]. Jedna od njih je i *per os* zabranjena biljka gavez (*Symphytum officinale*) koja je u tradicionalnoj medicini u uporabi preko 200 godina kao sastavni dio biljnih lijekova i dodataka prehrani. Pirolizidinski alkaloidi su hepatotoksični sa hemoragijskom nekrozom u akutnoj fazi, a dugotrajno izlaganje može dovesti i do same ciroze jetre [64].

Tropanski alkaloidi su grupa spojeva koja se pojavljuje kao sekundarni metaboliti nekoliko porodica biljaka: pomoćnice (*Solanaceae*), slakovke (*Convolvulaceae*), koke (*Erythroxylaceae*) i druge. Poznato je više od 200 različitih tropanskih alkaloida ali najviše istraženi su atropin, skopolamin i kokain. Suvremena farmaceutska industrija proizvodi više od 20 aktivnih farmaceutskih supstanci koje sadrže tropansku jedinicu u svojem sastavu. U biljkama najviše tropanskih alkaloida sadrži korijen (1,3%), zatim lišće (1,2%), a stabljika i cvijet imaju slične količine (0,6%) [65]. Atropin je jedan od starijih biljnih lijekova koji se dobiva iz biljke Velebilje (*Atropa Belladonna*). U većim koncentracijama atropin i skopolamin mogu dovesti do trovanja koje se simptomatski očituje kao tahikardija, zamućen vid, suhoća usta, halucinacije i pomahnitalost, a ekstremno visoke koncentracije mogu dovesti i do respiratorne paralize koja može uzrokovati smrt. Atropin može prijeći i kroz placentarnu barijeru i ući u krvotok fetusa, a poznat je i kao antidot za organofosforne pesticide. U istraživanju Pestalozzi i Caduff [66] opisano je trovanje većeg broja mladih ljudi atropinom prilikom konzumacije (meditacije) biljnog čaja gdje su izmjerene koncentracije atropina bile i do 3 mg/kg. Prosječna koncentracija atropina u suhim čajevima iznosi oko 0,5 mg/kg a koncentracija od 1,6 mg/kg može

izazvati toksične efekte. Do kontaminacije ljekovitog bilja biljem koje ima veliki udio tropskih alkaloida najčešće dolazi prilikom strojne berbe [66].

Flavonoidi su velika i raznolika skupina biljnih sekundarnih metabolita koji su uglavnom prisutni kao glikozidi. Oni se često akumuliraju u odgovoru na abiotičke činitelje, kao što su UV zračenje, suša, hladnoća i smrzavanja. Najviše istraživana funkcija flavonoida je njihova antioksidativna aktivnost, iako je njihov značaj kao antioksidanasa u biljkama upitan [67].

1.6.1. Biljke koje se smatraju vazodilatacijskim stimulansima obuhvaćene u ovom istraživanju

Epimedium Sagittatum



Slika 4. Biljka *Epimedium sagittatum* ili Epimedium⁶

Epimedium sagittatum ili Epimedium (Slika 4.) pripada rodu biljaka cvijetača iz porodice *Berberidaceae* koja broji 60-tak vrsta bilja istog roda i sličnog sastava. Epimedium se koristi tisućama godina u kineskoj medicini pod nazivom „Yin Yang Huo“ u liječenju kardiovaskularnih bolesti, demencije, amnezije, za jačanje libida i poboljšanje erekcije [68]. Za ljekovite pripravke uglavnom se koristi nadzemni dio

⁶ [https://en.wikipedia.org/wiki/Epimedium#/media/File:Elfenblume_\(Epimedium_x_versicolor\).jpg](https://en.wikipedia.org/wiki/Epimedium#/media/File:Elfenblume_(Epimedium_x_versicolor).jpg)
B. Garten TU Dresden, 2009. by Maja Dumat [preuzeto 14. 11. 2017.].

biljke (list). Njegov ekstrakt danas je jedan od najčešće korištenih pripravaka u rješavanju problema cirkulacije, umora i kod podizanja energije [69].

Dokazano je da sadrži lignane, flavonoide i to hiperin, kvercitrin, epimedin A, B, C i ikarin koji posjeduje farmakološku aktivnost [70]. Biološka aktivnost Epimediuma u liječenju problema seksualnog poremećaja bazira se na djelovanju ikarina kao aktivne tvari koji inhibira PDE-5 i povećava ekspresiju NO-sintetaze, bez utjecaja na razinu testosterona [71-73].

Metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti dokazano je da ekstrakt Epimediuma u interakciji sa sildenafilom kod štakora utječe na smanjenu farmakokinetiku sildenafilu. Iz tog razloga se ne preporučuje koristiti ekstrakt Epimediuma i sildenafil u kliničkoj praksi zbog moguće interakcije. O toksičnim učincima Epimediuma ne postoji puno literaturnih podataka ali dostupni podaci upozoravaju da konzumacija kroz duži period i pri povećanim dozama može izazvati štetne učinke kao što su povraćanje, pojačana žeđ i vrtoglavica do ozbiljnijih simptoma povezanih s krvarenjima (često krvarenje nosa i krvave stolice), problemi sa vidom ili govorom, slabosti ili ukočenosti u ekstremitetima i teške glavobolje. Zabilježeni su i slučajevi tahikardije, alergijskih reakcija (osip), oticanje jezika i usana kao i problemi sa disanjem. Kontraidicirana je primjena Epimediuma sa lijekovima za sniženje krvnog tlaka i antikoagulansima [74, 75].

Panax ginseng i *Panax quinquefolius*



Slika 5. Biljka *Panax quinquefolius*, ili amerčki ginseng⁷

⁷ <https://alchetron.com/American-ginseng> [preuzeto 18. 11. 2017.]

Pojam „Ginseng“ odnosi se na višegodišnje korjenaste biljke koje pripadaju rodu *Panax* i porodici *Araliaceae*. Na tržištu najčešće nalazimo *Panax ginseng* (azijski ginseng) koji raste u istočnoj Aziji i *Panax quinquefolius* (američki ginseng) koji potječe iz područja Sjeverne Amerike (Slika. 5.). Ginseng zauzima istaknuto mjesto na popisu najprodavanijih ljekovitih biljaka na svijetu. U tradicionalnoj medicini koristi se tisućama godina za prevenciju i liječenje različitih bolesti, za jačanje općeg imuniteta te u impotenciji [76]. Koriste se svi dijelovi biljke (korijen, lišće, stabljika, cvjetni pupoljci, bobice i sjemenke) mada se najveći značaj pripisuje korjenu, a posebno malim korjenovima („vitkim repovima“) zbog većeg sadržaja aktivnih tvari. Korijen ginsenga koristi se i kao osnova nekih lijekova u farmaceutskoj industriji. Korijen se uzima od biljke stare 4 do 6 godina, najčešće kao cijeli ili narezani, prirodno osušeni (bijeli ginseng) ili prerađeni djelovanjem parom pa sušeni (crveni ginseng). U praksi je načešća upotreba ginsenga u obliku ekstrakta [77].

Kao glavne sastavnice ginsenga pronađeni su brojni saponini, eterična ulja, steroli, škrob, polisaharidi, pektini, vitamini i minerali. Empirijske studije su djelotvorne učinke ginsenga pripisale saponinima zvanim ginsenzozidi koji spadaju u grupu triterpenoida. Njihova vrsta i omjer pridonosi bioaktivnosti ginsenga i čine osnovnu razliku između azijskog i američkog ginsenga. Ukupni sadržaj ginsenzozida veći je kod američkog ginsenga [78]. Ginsengu se pripisuju mnogi farmakološki učinci na reproduktivni, kardiovaskularni, endokrini i imunološki sustav [76]. Do sada je od svih vrsta ginsenga izolirano preko 200 različitih ginsenzozida koji su obzirom na kemijsku strukturu podjeljeni u nekoliko grupa. Dvije najznačajnije grupe su protopanaxadioli (PPD) i protopanaxatrioli (PPT). Na osnovi TLC-Rf (TLC, engl. *Thin Layer Chromatography*) vrijednosti ginsenzozida određena je njihova nomenklatura (Ra, Rb, Rc, itd.) s time da se polaritet smanjuje od Ra do Rf, što je proporcionalno stupnju glikozilacije [73]. Ginsenzozidi su većinom lipofilni što doprinosi njihovom prolasku kroz stanične membrane i regulaciji stanične funkcije vezanjem na ciljane proteine u jezgri i stanicima. Primjena ginsenga pri ED povezuje se sa utjecajem određenih ginsenzozida na razinu spolnih hormona. [79]. Osim široke primjene kao antioksidansa ginseng se predlaže kao dobra alternativa za steroidne hormone u menopauzi [80-82]. Širok spektar aktivnosti koju ginsenzozidi

pokazuju kroz inhibiciju oksidacijskog stresa i proizvodnju NO, poboljšanje cirkulacije i vazodilatacijske učinke kontraindicirana je primjena ginsenga kod problema sa srcem, cirkulacijom i visokim tlakom. Ginseng se ne preporučuje koristiti u trudnoći i za vrijeme laktacije [83].

Postoje studije o pozitivnom učinku azijskog ginsenga na efikasnost inhibicije i proliferacije karcinomskih stanica te se razmatra mogućnost korištenja ginsenga u liječenju karcinoma [84]. Iako mu nije dokazana genotoksičnost, ginseng se ipak ne preporučuje kao lijek za karcinome zbog nedostatnosti podataka koji bi isključili potencijalnu toksičnost u kombinacijama s kemoterapijskim lijekovima [85].

Američkom ginsengu se pripisuje svojstvo antioksidativne zaštite [86] kao i mogućnost utjecaja na sprječavanje inzulinske rezistencije kod dijabetesa [87].

Ginseng se smatra najčešće primjenivanim biljnim lijekom, složene farmakološke aktivnosti povezan s akutnim i značajnim psihijatrijskim poremećajima u određenim psihički rizičnih skupina. Kao štetan učinak ističe se manija kod bolesnika koji su ginseng koristili kod liječenja ED. Rizik je izražajniiji kod dugogodišnje primjene većih doza a prestankom primjene dolazi do brzog oporavka [88]. Kada se koristi u obliku ekstrakta njegova sigurnost može biti narušena i rezidualnim ostacima pesticida (organofosfornih) koji se kod ove biljne vrste mogu naći iznad maksimalno dozvoljene granice (MRL, engl. *Maximum residue limits*), a od metala često se može naći olovo, kadmij i aluminij ali u granicama koje su prihvatljive [89].

Lepidium meyenii



Slika 6. Biljka *Lepidium meyenii* ili Maka (žuta, crvena i crna)⁸

⁸ <https://herbolab.com/macaeverythingneedknow/> by Peter Cordone, [preuzeto 19. 11. 2017.]

Lepidium meyenii ili Maka (Slika 6.) poznatija kao „prirodna vijagra“ je jednogodišnja, korjenasta biljka slična rotkvi, iz porodice *Brassicaceae* i roda *Lepidium*. Uspjeva isključivo u središnjim Andama na visinama i većim od 4 000 m. Karakterizira je gomoljasti korjen (hipokotil) koji može biti žute, crvene, ili crne boje, a konzumira se svjež ili posušen. Na tržištu se najčešće nalazi u obliku brašna ili praha od osušenog korjena, a koristi se kao dodatak prehrani zbog potencijalnih ljekovitih svojstava [90]. Pripisuju joj se adaptogena svojstva i sposobnost hormonalnog regulatora. Također se naziva i „peruanski ginseng“ jer kao i ginseng povećava snagu, energiju, izdržljivost, libido i seksualnu funkciju. Obiluje fitosterolima i fitoestrogenima, alkaloidima i lukozinolatima koji su posebno odgovorni za plodnost i libido. Studije provedene na životinjama pokazuju da Maka može povećati plodnost te pokretljivost i broj spermija. U istraživanjima provedenima na miševima utječe na povećanje razine testosterona [91, 92]. U znanstvenoj literaturi Maka se prikazuje kao biljka niske akutne oralne toksičnosti u životinja i niske stanične toksičnosti *in vitro*. Ipak preporuka je da se konzumira kuhana, jer svježija Maka može negativno utjecati na zdravlje [93]. Osušeni hipokotil bogat je esencijalnim aminokiselinama, a svježi sadrži velike količine željeza i kalcija. Maka sadrži i sekundarne metabolite kao što su macaridini, macaeni (nezasićene masne kiseline), macamidi te sterole i druge glukozinolate [90]. Varijacije u koncentracijama različitih bioaktivnih metabolita povezuju se s različitim bojama Make, a ujedno su i pokazatelji njenih bioloških svojstava [94]. Iako sadrži alkaloidne njihova biološka učinkovitost nije znanstveno potvrđena [95]. Maka je istraživana i kao biljka sa protektivnim učinkom na toksične konatminante iz okoliša [96]. Istraživanja koja su proučavala pomoć Make pri ED pružaju ograničene dokaze [97, 98].

Tribulus terrestris

Slika 7. Biljka *Tribulus terrestris* ili babin/bablji zub⁹

Tribulus terrestris ili babin/bablji zub (Slika 7.) je jednogodišnja mediteranska biljka iz porodice dvoliskovaca (*Zygophyllaceae*) koja stoljećima ima važnu ulogu u ayurvedskoj, kineskoj i europskoj medicini sa naglašenim afrodizijačkim svojstvima. Sposobnost oponašanja funkcije spolnih hormona pridonijela je popularizaciji ove biljke [99]. Lišće, plod i korijen *Tribulus terrestris* koriste se u proizvodnji lijekova povezanih s urinarnim i reproduktivnim problemima, a u posljednje vrijeme sve više i za pomoć kod spolne funkcije [100].

Tribulus terrestris sadrži prirodne steroide, a najčešće prisutni su furostanol i spirostanol saponini koji su odgovorni za različite farmakološke aktivnosti biljke a posebno za liječenje neplodnosti i poremećaje libida [101,102]. Prema istraživanjima najaktivniji furostanol saponin je protodioscin koji potiče otpuštanje luteinizirajućeg hormona (LH) iz hipofize. LH djeluje na Leydigove stanice u testisima, koje proizvode testosteron. Protodioscin je također odgovoran i za stvaranje dehidroepiandrosterona (DHEA) kojeg tijelo pretvara u estrogen i testosteron. Druga važnost protodioscina je otpuštanje dušičnog oksida iz živčanih završetaka u *corpus cavernosum* [103, 104].

⁹ https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3AStarr_030612-0063_Tribulus_terrestris.jpg
by Starr F. jpg.030612-0063, [preuzeto 25. 11. 2017.]

Tribulus terrestris je poznat kao biljka koja povećava razinu testosterona te je zbog toga često promovirana među sportašima kao dobra prirodna alternativa za steroide. Od posebnog je interesa sportašima koji rade na povećanju mišićne mase (engl. *Bodybuilder*) i izdržljivosti [105]. Postoje brojne studije koje su analizirale učinak *Tribulus terrestris* u liječenju ED. Uglavnom su temeljene na pretpostavci da zbog sposobnosti povećanja androgena posjeduje afrodizijsko djelovanje [106]. Istraživanja koja su proučavala štetne učinke koji mogu nastati upotrebom *Tribulus terrestris* dokazala su da inducira hepatotoksičnost, nefrotoksičnost i neurotoksičnost. Studija Talasaz i sur. [107] navodi da je kod mlade muške osobe koja je pila vodeni ekstrakt *Tribulus terrestris* kao prevenciju nastanka bubrežnih kamenaca došlo do napadaja praćenog visokim vrijednostima aminotransferaze i kreatinina u serumu. Nestanak simptoma i normalizacija jetrenih enzima nastupili su nakon prestanka konzumiranja vodenog ekstrakta [107].

Turnera diffusa



Slika 8. *Turnera diffusa* ili Damiana¹⁰

Turnera diffusa ili Damiana (Slika 8.) je grmolika biljka sa žutim aromatičnim cvjetovima iz porodice *Passifloraceae*, porijeklom iz Srednje i Južne Amerike. Damiana sadrži niz različitih kemijskih sastojaka, kao što su beta-sitosteroli, flavonoidi, tanini, glikozidi (arbutin, tetrafilin i dr.) i aromatična ulja (pinen, cineol i cimen, timol i dr) [108]. Dugo je u uporabi u tradicionalnoj biljnoj medicini jer se smatra da ima afrodizijačku i antidepresivnu djelotvornost te je primjenjivana u slučajevima kao što je depresija, anksioznost, seksualna disfunkcija, kod mokrenja

¹⁰ <http://eol.org/pages/584511/overview>, Enciclopedia of Life, by © 2008 Alex V. Popovkin [preuzeto 25. 11. 2017.]

u krevet, menstrualnih nepravilnosti, želučanog ulkusa, astme, dijabetesa, dizenterije, dispepsije, sifilisa i sličnih problema [109].

Uloga Damiane u rješavanju problema impotencije pripisuje se njenom sinergističkom učinku u kombinaciji s određenim biljnim vrstama [110]. Damiana u svojem sastavu sadrži tvari koje joj omogućuju estrogensku aktivnost [111]. Dokazan je i njen potencijal u antikancerogenoj terapiji posredstvom aktivnosti arbutina i apigenina koji su pokazali izražajan citotoksični učinak [112]. Uz djelotvornost Damiane vežu se i neki štetni učinci koji proizlaze iz toksičnog efekta cijanogenih glikozida (tetrafilina i arbutina). Zbog potencijalne toksičnosti ne preporuča se primjena Damiane u većim količinama. Damiana se ne smije koristiti za vrijeme trudnoće i tijekom laktacije [113].

Smilax officinalis i *Smilax Aspera*



Slika 9. Biljka *Smilax aspera* ili Tetivka¹¹

Sarsaparilla je naziv za *Smilax* vrste koje su vrlo slične po izgledu, upotrebi i kemijskoj strukturi. Vrste *Smilax officinalis*, (Slika 9.) *Smilax japicanga* i *Smilax febrifuga* karakteristične su za područje Južne Amerike, a vrste *Smilax regelii*, *Smilax aristolochiaefolia* i *Smilax ornata* za područje Mexika i Latinske Amerike dok je vrsta *Smilax aspera* (Tetivka) najrasprostranjenija na području Europe. *Smilax* vrste pripadaju porodici *Smilacaceae* koja broji više od 350 različitih biljnih vrsta [114]. Ime Sarsaparilla ili Zarzaparilla dolazi od španjolske riječi Zarza (glog ili grm), Parra (loza) te Illa (mala), što označava karakteristike višegodišnje biljke

¹¹<https://www.biolib.cz/en/formsearch/pos100,50/?action=execute&string=smilax&searchrecords=1&searchsynonyms=1&searchtype=4>, by © 2003 Leif and Anita Stridvall [preuzeto 04. 12. 2017.]

slične vinovoj lozi sa crnim, plavim i crvenim plodovima u obliku bobica. *Smilax* gomoljasti korijeni imaju farmakološki značaj u obliku vodenog ekstrakta koji su u prošlosti široko primenjivani u pročišćavanju krvi. Najveću popularnost je stekla kao lijek protiv sifilisa po čemu je i uvrštena u Farmakopeju SAD-a 1850. godine. Primjenu Tetivke nalazimo i kod problema smanjenog libida, reumatizma, artritisa, kašlja, hipertenzije, probavnih poremećaja, psorijaze i dr kožnih problema. Ljekovita svojstva potječu od biljnih steroida i strukturno različitih steroidnih saponina (sarsasaponin, smilasaponin, sarsaparilloside i sitosterol glikozid) od kojih je sitosterol glikozid odgovoran za farmakološka svojstva [115, 116].

Mehanizam kojim biljka potiče libido u potpunosti nije razjašnjen ali se smatra da fitosteroli koji se nalaze u njenom sastavu imaju stimulativni učinak na spolne hormone u tijelu, kao i na povećanje mišićne mase. Provedene studije ne idu u prilog tome. U istraživanju Grunewald i sur. [117] koje je uključilo preko 600 dodataka prehrani za povećanje mišićne mase (*bodybuilding supplements*) među kojima su bili uključeni i *Smilax* spojevi nisu potvrđeni deklarirani navodi tih proizvoda o njihovom djelovanju na aktivaciju hormona i anaboličkom učinku [117]. Postoje studije provedene na miševima koje podržavaju njeno djelovanje protiv hiperglikemijskog učinka kao i ljekovito djelovanje kod gastrointestinalnih problema [118, 119]. Oprečna su mišljenja i kod antioksidativnog učinka koji joj se pripisuje, pa se tako u jednoj studiji Park i sur. [120] naglašava njeno djelovanje kao inhibitora oksidacijskih oštećenja, dok u drugoj studiji Amira i sur. [121] njen antioksidacijski učinak nije potvrđen. U visokim dozama, saponini prisutni u biljci mogu biti štetni. Toksikološki učinak nije dovoljno istražen pa se biljka ne preporučuje trudnicama i dojiljama [121].

Humulus lupulus

Slika 10. Biljka *Humulus Lupulus* ili Hmelj¹²

Humulus Lupulus ili Hmelj (Slika 10.) je biljka cvjetnica iz obitelji *Cannabaceae*, porijeklom iz Europe, zapadne Azije i Sjeverne Amerike. Više od 1000 godina hmelj se koristi u pivu zbog gorčine i kao konzervans. Pripisuju mu se hipnotička, sedativna i antibakterijska svojstva. Opisano je da hmelj sadrži 200-300 µg/g estradiola [122]. Hmelj obiluje flavanoidima i halkanima. Prenilflavonoidi su jedinstvena klasa fitokemikalija koje nalazimo u cvatnji Hmelja. Ovi flavonoidi su pokazali širok spektar bioloških aktivnosti koje su uvjetovane njihovom stereokemijskom konfiguracijom. Osim toga, nedavna istraživanja ukazuju da prenilflavonoidi podliježu biotransformacijama koje bi mogle promijeniti ili obogatiti njihovu stereokemiju [123]. Najzastupljeniji su 8-prenilnaringenin (8-PN, flavanon), 6-prenilnaringenin i isoksantohumol. Zbog prisutnosti fitoestrogena u svojem sastavu preporučuje se kao nadomjesna hormonska terapija u menopauzi [124]. Pojedine studije ipak upućuju na potreban oprez u primjeni fitoestrogena koji bez obzira na svoje prirodno podrijetlo mogu pridonjeti nastanku malignih oboljenja [121, 125]

¹² <https://www.biolib.cz/en/taxonimage/id20071/?taxonid=3469> Copyright © 1999-2017 BioLib, by Lukáš Konečný, [preuzeto 27. 11. 2017.]

Za Hmelj kao i neke druge biljne vrste (*Gingko biloba*, *Tribulus terrestris*) koje pokazuju svoj potencijal kod seksualnih poremećaja smatra se da se na osnovi dosadašnjih provedenih studija mogu predložiti samo za pomoć pri poremećaju seksualnih želja dok se za probleme rješavanja seksualne disfunkcije preporuča provedba nedostatnih kliničkim studija koji bi dale procjenu učinkovitosti i sigurnosti [126].

Melissa officinalis



Slika 11. Biljka *Melissa officinalis* ili Matičnjak [128]

Melissa officinalis ili Matičnjak (Slika 11.) poznata je i pod sinonimom Lemon balm (limunski balzam) spada među biljke iz porodice *Lamiaceae* ili Usnače. *Melissa* što na grčkom znači pčela je manji rod koji broji 4 vrste, a najvažnija je ljekoviti i medonosni matičnjak ili pčelinja metvica (pčele je vole zbog nektra i peludi) koji uspijeva u mediteranskom dijelu Europe i zapadnoj Aziji [127]. Duge je tradicionalne primjene, različitih farmakoloških djelovanja primjerice neuroprotektivnih učinaka, antispazmatičnih, sedativnih, hipnotičkih, nutritivnih i perspirantnih svojstava, a koristi se kao sredstvo protiv nadutosti. Poznata je i kao biljka s jakim antioksidacijskim kapacitetom zbog sadržaja polifenolnih tvari (kvercetin, galna kiselina, flavanoidi te aldehidni i taninski spojevi) za koje je u znanstvenim studijama dokazan izražajan i protektivan učinak na lipidnu peroksidaciju te se preporučuje kao djelotvorno sredstvo u prevenciji neuroloških bolesti vezanih za oksidacijski stres. Njena protektivna uloga istraživana je i kod Alzheimerove bolesti, a rezultati govore u prilog zaštitnog učinka na inducirani oksidacijski stres i apoptozu [128-129]. U studiji Zarei i sur. [130] ispitivana je njena aktivnost na jetrene enzime u usporedbi sa Atorvastatinom (lijek za regulaciju

kolesterola u krvi). Dokazano je da posjeduje hipolipidemijski učinak na jetru štakora sličan Atorvastatinu, za što su zaslužni fenolni alkaloidi koji mogu inhibirati sintezu kolesterola [130]. Promovira se i kao biljka koja pomaže kod nesanice žena u menopauzi [131]. Unatoč svim navedenim pozitivnim učincima Matičnjaka postoje i studije kao ona koju su proveli Namjoo i sur. [132] koje ga opisuju kao biljku sa mogućim toksičnim učinkom na jetru što može biti posljedica konzumacije u većoj količini. Potvrđeno je da polifenolne tvari (kao što su kvercetin i galna kiselina kod *Melisse officinalis*) pokazuju anitoksidativnu aktivnost pri niskim koncentracijama (do 50 μmol) dok pri visokim koncentracijama (50 -250 μmol) povećavaju proizvodnju reaktivnih kisikovih spojeva autooksidacijom. Biokemijska analiza u navedenoj studiji pokazala je oštećenja jetrenog tkiva pri konzumaciji od 1.350 mg/kg ekstrakta *Melisse officinalis* u kraćem vremenskom periodu. Preporuka je izbjegavati konzumaciju u visokim dozama [132].

Origanum vulgare



Slika 12. Biljka *Origanum vulgare* ili Origano¹³

Origanum vulgare ili Origano (Slika 12.) poznat još pod nazivom Mravinac koji se ubraja u kategoriju začinskih i ljekovitih biljaka. Ima maslinasto-zelene listove i

¹³ http://www.fnec.gr/nature/images/herbs/Oregano_2.jpg [preuzeto 27. 11. 2017.]

ljubičastie cvijetove i pripada porodici *Lamiaceae*. Origano je biljka mediteranskog podrijetla ali uspješno raste na većini kontinenta i pod različitim uvjetima. Grčka, Izrael i Turska najpoznatije su po proizvodnji visokokvalitetnog eterična ulja Origana [133]. Eterično ulje origana je varijabilnog sastava bogato monoterpenima i seskviterpenima od kojih su najznačajniji karvakrol i timol o čijoj količini ovisi i kvaliteta ulja [134]. Postoje *in vitro* studije provedene na sojevima *Salmonella typhimurium* u kojima je dokazana antimutagenost, odnosno farmakološka važnost karvakrola u prevenciji raka [135]. Origano ulje se koristi kao pomoć kod kožnih bolesti poput rosacee, psorijaze, akni i bradavica kao i kod uboda kukaca i ugriza pauka, a potvrđeno je i njegovo antimikrobno djelovanje. U koncentraciji većoj od 1% može djelovati iritativno na kožu. U hrani i piću, origano se koristi kao kulinarski začin i konzervans [136].

Uloga Origana kao afrodizijaka slabo je istražena [137]. Istraživanja koja su proučavala utjecaj eteričnog ulja Origana na spolne organe miševa upućuju na potencijalno toksično djelovanje i oštećenje tkiva [138]. Origano nije preporučljivo koristiti u kombinaciji sa biljkama koje mogu imati utjecaja na zgrušavanje krvi (Anđelika, Ginko, azijski ginseng, divlji kesten, crvena djetelina, češnjak, đumbir, i kurkuma) jer može doći do povećanog rizika od krvarenja [139].

Ginkgo biloba



Slika 13. Biljka *Ginkgo biloba* ili Ginko¹⁴

¹⁴ http://www.biopix.com/ginkgo-tree-ginkgo-biloba_photo-113601.aspx, Enciclopedia of Life © Biopix: S Drozd Lund, [preuzeto 27. 11. 2017.]

Ginkgo Biloba ili Ginko (Slika 13.) jedna je od najpopularnijih ljekovitih biljaka alternativne medicine i jedina živa vrsta iz porodice *Ginkgoaceae*. Smatra se „živim fosilom“ zbog neprekinutog postojanja vrste oko 270 milijuna godina. Potječe s područja Kine i Japana, a danas je rasprostranjen po cijelome svijetu. Zbog svoje izuzetne otpornosti biljka je prilagodljiva različitim klimatskim promjenama i okolišnim zagađenjima što je i doprinjelo njenoj dugovječnosti. Ginko je listopadno drvo koje može živjeti i preko 1000 godina i narasti više od 40 m. Primjena Ginka u ljekovite svrhe zabilježena je još u kineskoj farmakopeji, a u tako davnoj prošlosti koristio se za liječenje astme, bronhitisa i poremećaja bubrega i mjehura [140]. Najviše je u primjeni ekstrakt zelenog lišća Ginka koji sadrži veliki broj reprezentativnih sastojaka (do sada izolirano oko 50–tak spojeva) ali se njegova biološka aktivnost pripisuje dvijema važnim skupinama koju čine flavonoidi i terpeni trilaktoni. Primarnu ulogu imaju flavonoidni spojevi među kojima prevladavaju flavonolni mono-, di- i tri-glikozidi. Oni pokazuju jaku antioksidativnu aktivnost i zahvaljujući njima, Ginko ima kapacitet vezivanja slobodnih kisikovih radikala utječući tako na povećanje tolerancije tkiva prema pomanjkanju kisika. Aglikonski dijelovi molekula karakterističnih ginkoflavonoglikozida su: kvercetin, kemferol i izoramnetin. Skupinu terpenih trilaktona čine diterpeni laktoni – ginkolidi A, B, C, J i M i seskviterpeni laktoni bilobalidi [141,142]. Na tržištu se nalaze brojni pripravci sa ekstraktom Ginka ali najkvalitetniji su oni koji su standardizirani na sadržaj flavonoida i ginkolida. Suhi standardizirani ekstrakt Ginka (GBE, engl. *Ginkgo Biloba Extract*) oznake EGb 761 dobiva se ekstrakcijom lista Ginka pomoću acetona i vode. Ekstrakt ne smije sadržavati otapalo kao ni ginkolnu kiselinu koji su toksični. Upotreba Ginka u obliku sirovog ekstrakta (koji nije standardiziran) smatra se nesigurnom zbog mogućnosti pojave alergija i toksičnih učinaka izazvanih prisutnošću alkilfenola (ginkolna kiselina, ginkgol, bilobol). Prema zahtjevu WHO i Savezne komisije za monografije droga SR Njemačke postavljen je zahtjev o maksimalnoj koncentraciji ginkolne kiseline u standardiziranom ekstraktu ginka (≤ 5 ppm). Neurotoksične posljedice zbog prisutnosti ginkolne kiseline mogu nastati konzumacijom čaja Ginka kao i pri ostalim oblicima upotrebe biljke u ne standardiziranom obliku. Udio i omjer triju glavnih flavanoida (kvercetina, kemferola i izoramnetina) ključni su za ocjenu potvrde prirodnog ekstrakta Ginka. Obzirom na svoju veliku popularnost proizvodi Ginka često se krivotvore na način da se flavanoidi Ginka zamjenjuju sa

flavanoidima drugih manje kvalitetnih biljaka. Budući da se na taj način zadovolji količina flavanoglikozida, krivotvorinu je teško utvrditi neadekvatnim analitičkim metodama. Stoga je posebno važno analitički provjeravati omjer kvercetina i kemferola (Q/K) koji ukoliko je veći od 2 ukazuje na sumnjivo podrijetlo proizvoda [143, 144].

Osim lišća koriste se i sjemenke Ginka, koje se ne smiju koristiti sirove jer sadrže potencijalno otrovne cijanogene glikozide. Ginkgo se često koristi kao antioksidans, vazodilatator za povećanje cerebralne i periferne perfuzije te za poboljšanje memorije. Primjena ekstrakta Ginka se u principu dobro tolerira, no ponekad može biti praćena slabijim simptomima (glavobolja, mučnina, probavne smetnje, alergije osip na koži) [145]. Ginkgo se koristi i u liječenju perifernih vaskularnih bolesti jer se smatra da utječe na povećanje protoka krvi, aktivaciju trombocita te štiti membrane od oštećenja uzrokovanih slobodnim radikalima. Ipak, Ginko nije potpuno bez rizika, obično da djeluje na cirkulaciju. Dokazano je da kod duže primjene povećava rizik krvarenja te se ne preporučuje osobama koje koriste antikoagulanse. Istraživana je i uloga Ginka kod makularne degeneracije oka jer se vaskularni čimbenici i oksidacijsko oštećenje smatraju glavnim faktorima rizika u patologiji te bolesti. Pitanje da li se Ginko treba uzimati u sprečavanju progresije makularne degeneracije ostalo je bez odgovora, odnosno rezultati studije nisu bili uvjerljivi za pouzdane i čvrste zaključke koji bi išli u prilog Ginku [146].

Ginko ima široku primjenu i pri rješavanju problema impotencije. Međutim postoje istraživanja koja ukazuju na toksične učinke nastale na spolnim organima nakon primjene Ginka posebno pri većim koncentracijama [147]. Upotreba Ginkgo bilobe kontraindicirana je kod istodobne primjene lijekova za srce, epilepsije, tjeskobe i depresije jer mijenja njihovo djelovanje. Ne preporučuje se tijekom trudnoće i dojenja [148].

Ilex paraguariensis

Slika 14. Biljka *Ilex Paraguariensis* ili Mate¹⁵

Ilex paraguariensis ili Mate (Slika 14.) kod nas poznata i kao paragvajski čaj (španjolski Yerba mate ili portugalski Erva mate) pripada porodici *Aquifoliaceae* ili božikovina. Mate je Južno-Američka grmoljasta biljka sa zimzelenim lišćem koja se najviše uzgaja u Paragvaju, Brazili, Urugvaju i Argentini. Bogata je mineralima, fenolnim kiselinama, taninom te posebno kofeinom [149]. Zbog bogatog sadržaja kofeina istraživan je potencijalni negativni učinak konzumacije biljke na mineralnu gustoću kostiju u kombinaciji sa niskim sadržajem kalcija. Rezultati studije bili su negativni [150].

U istraživanju Berté i sur. [151] proučavano je i potvrđeno antioksidacijsko svojstvo Mate zbog visokog udjela polifenola (neoklorogenske kiseline 91,40 mg/g, kofeina 1,54 mg/g i rutina 5,38 mg/g) [151]. Konzumacija ekstrakta biljke Mate u širokoj je društvenoj primjeni u krajevima gdje najbolje uspijeva jer se vjeruje da biljka doprinosi općem zdravstvenom stanju, dugovječnosti i uklanjanju umora. Mate ili Paragvajski čaj je vrući napitak s određenim tradicijskim ritualom pripremanja i konzumiranja (drvena posuda s metalnom slamčicom ili bombillom koja sadrži pore za filtriranje). Zbog široke i učestale primjene bilo je potrebno saznati (zbog

¹⁵https://en.wikipedia.org/wiki/Yerba_mate#/media/File:Ilex_paraguariensis_-_K%C3%B6hler%E2%80%93s_Medizinal-Pflanzen-074.jpg Wikipedia, by F. E. Köhler, [preuzeto 27. 11. 2017.]

javnozdravstvenog interesa) da li postoji mogući toksični učinak na zdravlje ljudi kao i potvrditi njena antioksidacijska svojstva. U istraživanju Lima i sur. [152] korišten je nematod *Caenorhabditis elegans* koji je testiran na mogućnost produljenja životnog vijeka primjenom ekstrakta Mate. Dobiveni rezultati su potvrdili hipotezu o produljenom životnom vijeku nematoda što se povezuje sa antioksidacijskim kapacitetom Mate i sposobnosti redukcije ROS [152].

Testiranje sušenog ekstrakta Mate na Wistar štakorima u količini od 2 mg/kg/ 90 dana nije produciralo nikakve biokemijske i toksične efekte. Ne postoje službeni podaci o ograničenoj dnevnoj primjeni ali se smatra da se iz sigurnosnih razloga ne treba koristiti u velikim količinama (2-3 šalice čaja ili do 500 mg u sklopu dodataka prehrani). Ako se konzumira u velikim količinama mogu nastupiti štetne promjene kao povišeni krvni tlak, povraćanje, nesаница, nemir, zujanje u ušima, nervoza, tahikardija.

Prevelika konzumacija Mate povezuje se s razvojem određenih vrsta karcinoma [153]. U studiji De Stefani i sur. [154] koja je provedena na 996 osoba kroz 6 godina pronađena je poveznica između Mate i karcinoma usne šupljine, jednjaka i pluća. Smatra se da je utjecaj na razvoj karcinoma posljedica karcinogenih policikličkih aromatskih ugljikovodika (PAH, engl. *Polycyclic aromatic hydrocarbons*) koji se razvijaju kod toplinske obrade Mate kao štetni produkti [154]. Studija McGee i sur. [155] opisuje slučaj mlade Britanke kojoj je biopsijom jetre dokazana veno-okluzivna bolest (začepljenje malih vena u jetri) kao posljedica pirolizidnih alkaloida usljed dugotrajne i učestale konzumacije Mate čaja [155].

Schisandra chinensis

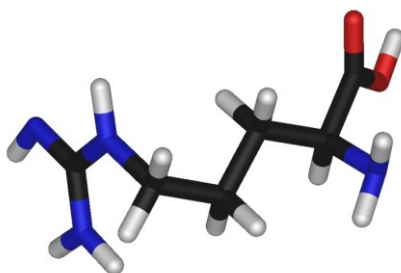
Slika 15. Biljka *Schisandra chinensis* ili Šisandra¹⁶

Schisandra chinensis ili Schisandra (Slika 15.) kod nas poznata i kao Šisandra, spada u biljke penjačica iz porodice *Schisandraceae*. Ubraja se i među najpoznatije biljke tradicionalne kineske medicine. Porijeklom je iz sjeverne i sjeveroistočne Kine rasprostranjena i u susjednim regijama Rusije i Koreje [156]. Poznata je pod nazivom Wu-wei-zi ili plod s pet okusa gdje se vjerovalo da su slani i kiseli okusi utjecali na jetru i testise, a gorki i trpki na srce i pluća. Temeljem rezultata dugogodišnjih farmakoloških i kliničkih studija Šisandra je uvrštena i u popis lijekova Nacionalne farmakopeje SSSR-a prvenstveno zbog svog adaptogenog učinka koji se ispoljava kroz djelovanje na živčani, endokrini i imunološki sustav. Klinička istraživanja potvrđuju joj učinkovitost kod psihijatrijskih poremećaja, liječenja alergijskog dermatitisa i kod zacjeljivanja rana [157]. Šisandra je bogati izvor različitih aktivnih tvari kao što su organske kiseline, tanini, antocijani i lignani. Kao glavni bioaktivni lignani navode se Schisandrin A, Schisandrin B, Schisandrin C, Schisandrol A, Schisandrol B i Schisantherin A koji pokazuju značajni hepatoprotektivni potencijal [158].

¹⁶ https://calphotos.berkeley.edu/cgi/img_query?seq_num=160441&one=T, Enciclopedia of Life, Copyright © 2005. N. Kurzenko, [preuzeto 27. 11. 2017.].

Šisandra se primjenjuje i kao fitoestrogen u žena u menopauzi [159]. Poznata je i njena primjena pri ED zbog utjecaja na aktivaciju NO-cGMP signalnih puteva. Djelotvoran učinak pokazuje i u kombinaciji sa sildenafilom [160, 161]. Obzirom na široku primjenu proučavan je i njen učinak kod moguće interakcije biljka-lijek gdje u vodenom i alkoholnom ekstraktu Šisandra pokazuje inhibitorsku aktivnost na jetrene enzime štakora (CYP450). Zbog potencijalne mogućnosti metaboliziranja lijekova zahtjeva se pozornosti kod njene primjene u interakcijama s određenim vrstama lijekova. Šisandra se ne preporučuje osobama koje imaju gastroezofagealnu refleksnu bolest (GERB), epilepsiju, visoki tlak te trudnicama i doiljama [162]. Minimalna toksična doza koju su miševi primali oralnim putem je 3,6 g/kg [163].

L-arginin



Slika 16. L-arginine-3D-hztl.png¹⁷

L-arginin je esencijalna aminokiselina značajnih metaboličkih aktivnosti. Unosi se putem hrane, a tijelu je potrebna za izgradnju proteina. Crveno meso, perad, ribe i mliječni proizvodi smatraju se njenim glavnim izvorom. Prekursor je za sintezu NO u stanicama endotela krvnih žila te poboljšava protok krvi i štiti od ateroskleroze [164]. Kroz eksperimentalne i kliničke studije dokazana je učinkovitost L-arginina kao nutritivno esencijalne aminokiseline (AA) kod spermatogeneze, fetalnog i neonatalnog rasta te pri održavanju tonusa krvnih žila i hemodinamike. Neophodna

¹⁷ <https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3AL-arginine-3D-hztl.png>, Wikimedia Commons [preuzeto 3.12.2017.]

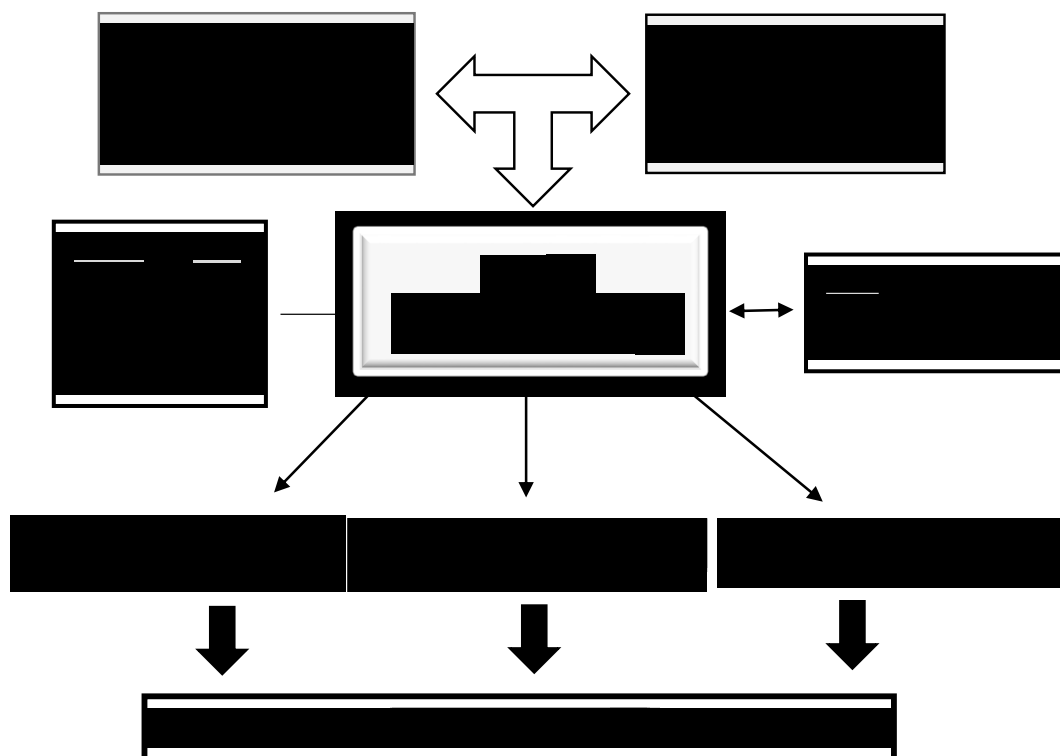
je za sintezu uree, poliamina i agmatina [165]. Agmatin je produkt L-arginina koji ima određena antidepresivna svojstva [166], a dokazan je njegov pozitivan utjecaj na antioksidacijski kapacitet u tkivu jetre nakon primjene antipsihotika (Klorpromazina) [167].

L-arginin sudjeluje i u biosintezi kreatina, koji ima važnu ulogu u energetske metabolizmu stanice, odnosno, povećava energetske metabolizam tijela bržim izgaranjem masti i proteina. Postoje istraživanja i o djelotvornosti L-arginina na ED. Učinak može biti ograničen ukoliko je L-arginin zastupljen u maloj količini zbog čega se često kombinira sa proizvodima bogatim flavonoidima i proantocijanidima [168, 169]. Smatra se da je primjena L-arginina vjerojatno sigurna za većinu ljudi ukoliko se uzima kratkoročno na usta ili se aplicira na kožu. Najčešći štetni učinci su abdominalna bol, nadutost, proljev, krvni poremećaji, alergije, upale dišnih putova, pogoršanja astme, i nizak krvni tlak [170,171].

Visoke doze posebno se ne preporučuju kod djece jer u težim slučajevima mogu uzrokovati i smrt. Također se ne preporučuje kombinacija L-arginina i sildenafilila jer i jedan i drugi utječu na snižavanje krvnog tlaka a hipotenzija može uzrokovati vrtoglavicu, nesvjest, zamućenje vida, umor i dr štetne učinke. L-arginin se ne smije kombinirati sa biljkama koje mogu usporiti zgrušavanje krvi (npr. ginko i azijski ginseng) jer se time povećava rizik od krvarenja [172].

1.7. Oksidacijski stres

Svaki organizam teži stanju homeostaze, odnosno ravnoteži bioloških i biokemijskih procesa u tijelu koji mogu biti narušeni različitim fiziološkim i psihološkim čimbenicima manifestirajući se kao stres na organizam. Znanost danas u velikoj mjeri proučava pojam oksidacijskog stresa koji je baziran na integraciji kemije, biologije i medicine kao koncept između oksidansa i antioksidansa. Helmut Sies poznat i kao „redoks pionir“ koji je uvelike pridonio nutritivnoj strategiji protiv raznih vrsta karcinoma i kardiovaskularnih bolesti, oksidacijski stres je definirao kao stanje promjenjene ravnoteže između oksidansa i antioksidansa u korist oksidansa koje može dovesti do oštećenja tkiva i organa [173,174]. Oksidansi se stvaraju kao normalan proizvod aerobnog metabolizma i njihova razina je pod neprekinutim nadzorom antioksidacijskog zaštitnog mehanizma. Povećano stvaranje oksidansa (slobodni radikali) ili smanjenje antioksidacijske zaštite (antioksidacijski enzimi i vitamini) dovesti će do nastanka oksidacijskog stresa [175]. Slobodni radikali mogu nastati kao posljedica izlaganja endogenim i egzogenim izvorima. Stanična redoksna neravnoteža koja karakterizira oksidacijski stres povezuje se s onkogenom stimulacijom i potvrđena je u različitim stanicama raka dok je normalne stanice ne sadrže. U stanju oksidacijskog stresa može doći do inaktivacije proteina, oštećenja DNA i lipidne stanične membrane što rezultira promjenama u funkciji i strukturi stanice, tkiva i organa [176].



Slika 17. Kisikovi reaktivni spojevi (ROS) i njihova uloga u postupnom procesu karcinogeneze, prema [177].

1.7.1. Slobodni radikali

Kisik, koji je neophodan za život aerobnih bića danas se smatra jednim od najtoksičnijih prirodnih polutanata. Razvojem superoksidne teorije o toksičnosti kisika (engl. *The superoxide theory of oxygen toxicity*) superoksidni radikal ($^{\bullet}\text{O}_2^-$) se predstavlja kao glavni uzrok oksidacijskog oštećenja, a superoksid dizmutaza (SOD) najvažniji enzim u antioksidacijskoj obrani. Procesom oksidacije kisik nam osigurava energiju neophodnu za život ali i oštećuje naše stanice zbog nastanka slobodnih radikala [178,179]. Slobodni radikali (SR) su vrlo nestabilni atomi, ioni ili molekule nastali homolitičkim cjepanjem kovalentnih veza. U vanjskoj ljusci imaju jedan ili više nesparenih elektrona, što je osnova njihove visoke i neselektivne reaktivnosti. Nastojeći što prije postići ravnotežno stanje reagiraju s elektronom najbliže molekule [180]. Reaktivni kisikovi spojevi (ROS, engl. *Reactive Oxygen Species*) su metaboliti kisika reaktivniji od molekularnog kisika (O_2). Povećavaju

svoju energiju dovođenjem elektrona ili prijenosom energije, a dijele se na slobodne radikale i na ne radikalne vrste. ROS igraju važnu ulogu u unutarstaničnoj signalizaciji, proliferaciji, angiogenezi, apoptozi i starenju. Ako je ROS prisutan u suvišku može doći i do smrti stanice. Važnu ulogu u tome imaju antioksidansi koji kroz kompenzaciju količine ROS nastoje vratiti redoks homeostazu. Pored ROS-a veliku ulogu u oksidacijskom stresu imaju i reaktivni dušikovi spojevi (RNS, engl. *Reactive Nitrogen Species*) u koje ubrajamo dušikove radikale i neradikalne spojeve (Tablica 2.) [181,182].

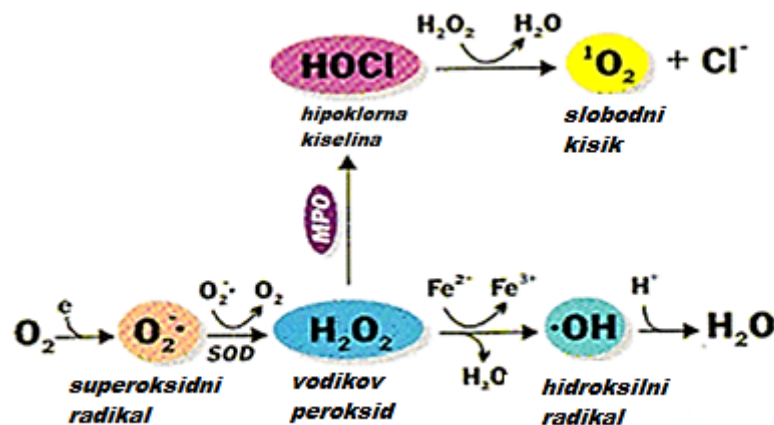
Tablica 2. Reaktivni kisikovi i dušikovi spojevi [181].

Reaktivni kisikovi spojevi - ROS			
Slobodni radikali		Ne radikali	
Superoksidni radikal (anion)	O_2^-	Vodik peroksid	H_2O_2
Hidroksilni radikal	OH^\bullet	Hipoklorna kiselina	$HOCl$
Peroksilni	ROO^\bullet	Ozon	O_3
Akoksilni	RO^\bullet	Singletni kisik	$O_2(1\Delta g)$
Hidroperoksilni	HO_2^\bullet	Peroksinitrit	$ONOO^-$
Reaktivni dušikovi spojevi - RNS			
Slobodni radikali		Ne radikali	
Dušikov oksid	NO^\bullet	Nitrozilni kation	NO^+
Dušikov dioksid	NO_2^\bullet	Nitrozilni anion	NO^-
Dušikov radikal	NO_3^\bullet	Dušična kiselina	HNO_2

Slobodni radikali mogu sudjelovati u reakcijama davanja elektrona (s reducirajućeg radikala), primanja elektrona (na oksidirajući radikal), oduzimanju vodika, reakcijama adicije, poništavanja i disproporcionalnosti. Izvori ROS mogu se podjeliti na endogene i egzogene. Endogeni izvori ROS mogu biti mitohondrije, metabolizam citokroma P450 i peroksizome a u egzogene spadaju ultraljubičasto

i ionizirajuće zračenje, ozon, stres, neke vrste lijekova (kemoterapeutici), opijati, kemijska onečišćenja i hrana [182].

Superoksidni radikal ($^{\bullet}\text{O}_2^-$) endogeno nastaje u mitohondrijima redukcijom jednog elektrona molekule kisika. Smatra se blagim oksidansom koji neizravno stvara oksidacijska oštećenja. Ima ograničenu topivost u mastima zbog čega ne može prodrijeti duboko u stanicu pa mu je djelovanje ograničeno na mjesto nastanka. Transformira se uz pomoć enzima superoksid dismutaze (SOD) i iona vode u manje aktivni vodikov peroksid (Slika 18.) Neutralizaciju nastalog vodikovog peroksida obavljaju katalaza ili glutation-peroksidaza. Superoksidni radikal ($^{\bullet}\text{O}_2^-$) se može transformirati i u druge oblike ROS [178].



Slika 18. Generiranje reaktivnih kisikovih spojeva. Superoksid se dismutira na vodikov peroksid i kisik. Vodikov peroksid uz prisutnost metalnih iona stvara najreaktivniji kisikov radikal ($^{\bullet}\text{OH}$)¹⁸.

Vodikov peroksid (H_2O_2) je oksidans koji uz prisustvo dvovalentnog iona željeza (Fe^{2+}) i jednovalentnog iona bakra (Cu^+) stvara hidroksilni radikal ($^{\bullet}\text{OH}$). Vodikov peroksid je topiv u mastima pa može djelovati dublje od mjesta nastanka.

Hidroksilni radikal ($^{\bullet}\text{OH}$) je najreaktivniji kisikov radikal sa najizraženijim citotoksičnim efektom, a nastaje Haber-Weissov-om i Fentonovom reakcijom. U Haber-Weissovoj reakciji superoksid reagira sa vodikovim peroksidom dajući hidroksidni radikal i hidroksidni ion. Kod Fentonove reakcije dvovalentni ion željeza

¹⁸ <https://www.rndsystems.com/resources/technical/free-radicals-and-oxidative-stress> [preuzeto 01. 10. 2017.]

(Fe²⁺) reagira sa vodikovim peroksidom pri čemu prelazi u trovalentni ion željeza (Fe³⁺) uz izdvajanje hidroksilnog radikala i hidroksilnog iona [183].



Slika 19. Fentonova i Haber-Weissova reakcija. Smanjeni oblik prijelaznih metala (Mn) reagira kroz Fentonovu reakciju s vodikovim peroksidom (H₂O₂) i stvara hidroksilni radikal (*OH). Superoksidni radikal (O₂ •-) također može reagirati s oksidiranim oblikom prijelaznih metala (M (n + 1)) u Haber-Weissovoj reakciji koja stvara Mn i ponovno potiče ciklus [184].

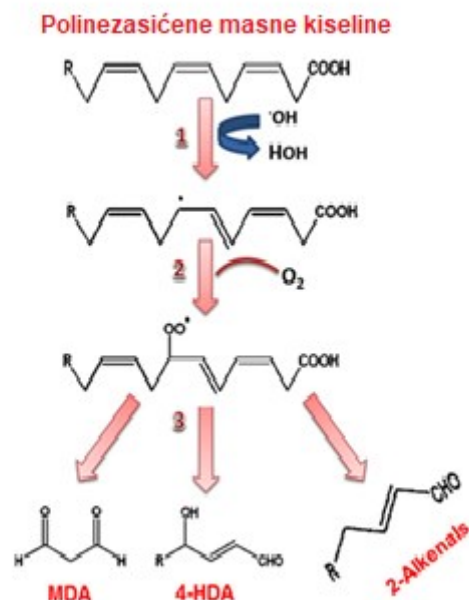
1.7.2. Lipidna peroksidacija

Lipidna peroksidacija (LPO) je lančana reakcija razgradnje višestruko nezasićenih masnih kiselina (PUFA, engl. *Polyunsaturated Fatty Acid*) uzrokovana oksidacijskim stresom. Zasićene masne kiseline kao i masne kiseline koje sadrže jednu dvostruku vezu više su otpornije na djelovanje slobodnih radikala od PUFA-e. Hidroksilni radikal (*OH) je najčešći pokretač LPO, ali to mogu napraviti i pojedini drugi radikali. U biološkim membranama lipidna peroksidacija dovodi do gubitka fluidnosti, opadanja membranskoga potencijala, povećanja permeabilnosti prema H⁺ i drugim ionima te do rupture same stanice [185].

Lipidi u biološkim sustavima sadrže PUFA-e u obliku fosfolipida, estera, triacilglicerola, kolesterola slobodnih masnih kiselina što omogućuje nesmetano odvijanje lipidne peroksidacije uz prisutnost slobodnih radikala [186]. Proces lipidne peroksidacije pokrenut slobodnim radikalima odvija se u tri faze: inicijacija, propagacija i terminacija (Slika 20.). U fazi inicijacije hidroksilni radikal (*OH)

izdvaja atom vodika iz metilenske (-CH₂) grupe PUFA pri čemu nastaje slobodni lipidni radikal (•L). U radikale koji mogu oksidirati PUFA spadaju osim •OH radikala i HO₂•, RO• i RO₂•. Superoksidni radikal nedovoljno je reaktivan da eliminiira vodik a i zbog negativnog naboja nema sposobnost ulaska unutar stanične membrane što ga čini neaktivnim u procesu lipidne peroksidacije. U fazi propagacije slobodni lipidni radikal reagira sa O₂ pri čemu nastaje lipidni hidroperoksid (LOOH) i novi lipidni radikal. Nastali radikali mogu reagirati sa susjednim lipidima, proteinima i nukleinskim kiselinama izazivajući seriju oštećenja i reaktivnih produkata. Lančana reakcija se može prekinuti u slučaju da slobodni radikali međusobno reagiraju ili djelovanjem antioksidansa što predstavlja proces završetka lipidne peroksidacije ili fazu terminacije [187].

Kao razgradni produkti lipidne peroksidacije nastaju različiti reaktivni aldehidi među kojima se posebno izdvajaju malondialdehid (MDA), propanal, heksanal i 4-hidroksi-2nonenal (4-HNE). Smatraju se „drugim toksičnim glasnicima“ primarnih slobodnih radikala [188]. Reaktivni aldehidi su stabilniji od ROS, imaju sposobnost difundiranja dalje od mjesta nastanka što omogućuje širenje oksidativnog oštećenja do samih molekula. MDA ima veoma izražena mutagena svojstva dok je 4-HNE najtoksičniji sekundarni produkt lipidne peroksidacije [189].



Slika 20. Faze i produkti lipidne peroksidacije. Hidroksilni radikal reagira s lipidnim membranama i generira reaktivne aldehide kao što su malondialdehid (MDA) i 4-hidroksi-2-nonenal (HNE) u tri faze LPO [190].

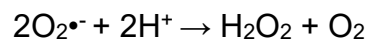
MDA se najčešće koristi kao marker lipidne peroksidacije u tkivima i plazmi. Odgovoran je i za nastanak lipofuscina (žutosmeđi pigment koji se nakuplja starenjem). U fiziološkim uvjetima se nalazi u obliku enolatnog iona koji interreagira s proteinima i ima afinitet prema lizinskom aminokiselinskom ostatku. Ciljno mjesto napada mu je i gvanin u DNA sa mutagenim posljedicama. U organizmu se metabolizira do malonske kiseline koja je kompetitivni inhibitor sukcinat dehidrogenaze u mitohondriju [191]. 4-HNE predstavlja biomarker za oksidacijski stres, a njegovi biološki učinci su posljedica kovalentne modifikacije važnih biomolekula, uključujući proteine, DNA i fosfolipide koji sadrže amino skupinu [192]. 4-HNE ima ulogu u proliferaciji i diferencijaciji stanica kao i u patogenezi raka [193]. Mjerljiv je u fiziološkim uvjetima, ima sposobnosti vezanja sa proteinima pri čemu daje stabilne i biološki aktivne GSH-konjugate koji prelaze u merkapturane kiseline i izlučuju se mokraćom. Prisutnost MDA i HNE zapažena je u patološkim stanjima kao što su ateroskleroza, dijabetes, razne neurodegenerativne i autoimune bolesti i kod starenja [194].

1.7.3. Antioksidansi

U borbi za opstank aerobni organizmi su razvili antioksidacijski sustav kao zaštitu od toksičnog djelovanja kisika. Antioksidansi se mogu definirati kao molekule koje su sposobne stabilizirati ili deaktivirati slobodne radikale prije nego napadnu stanice. Mehanizmi njihova djelovanja usmjereni su na poništavanje djelovanja slobodnih radikala ili popravljavanje nastalih oštećenja te reguliranje stvaranja ROS. Ljudski organizam ima razvijene složene antioksidativne sustave (enzimske i neenzimske) koji djeluju sinergistički i štite stanice i organske sustave od slobodnih radikala [195]. Antioksidansi imaju sposobnost doniranja elektrona oksidansu što im omogućuje kontrolu njihove reaktivnosti i sprječavanje staničnih oštećenja, pri čemu i sami postaju radikali, ali stabilniji i bez mogućnosti izazivanja staničnih oštećenja. Za svoju obnovu do aktivnog reduktivnog stanja koriste NADPH energiju (engl. *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) što je osnova njihove antioksidacijske moći koja bi se u protivnom brzo potrošila [196]. Među

najznačajnije enzimske antioksidanse koji mogu spriječiti štetne učinke ROS i ostalih reaktivnih tvari spadaju superoksid dismutaze (SOD), katalaza (CAT) i peroksidaze, dok su vitamin C i E kao i glutation (GSH) neenzimski antioksidansi niže molekulske mase [197].

Superoksid dismutaze (SOD, EC 1.15.1.1) su metaloproteini koji čine najefikasniju antioksidativnu obranu od reaktivnih kisikovih vrsta (ROS-a) [198]. SOD uklanjaju visoko reaktivni superoksidni radikal ($O_2^{\bullet-}$) katalizirajući njegovu dismutaciju pri čemu jedna molekula $O_2^{\bullet-}$ oksidira u O_2 , a druga reducira u manje reaktivni vodikov peroksid (H_2O_2) [199].



Prema vrsti metala prisutnom u katalitičkom centru razikujemo tri oblika SOD: Bakar-cink ovisna SOD (Cu,Zn-SOD); mangan ili željezo ovisna SOD (Mn ili Fe-SOD) i Ekstracelularnu SOD (EcsSOD). Drevni organizmi su najviše koristili Fe-ovisne SOD-e dok suvremeni organizmi za svoju aktivnost sve više koriste prisustvo Mn SOD što je u skladu s oksidacijom okoliša i smanjenom dostupnošću Fe u atmosferi kao i povećanjem njegove toksičnosti [200]. Navedeni izoenzimi razlikuju se po svojoj proteinskoj strukturi, vrsti metalnog iona, svojstvima, lokaciji unutar stanice i distribuciji u tkivima. Zajednička im je uloga uklanjanje superoksidnog aniona [201]. ROS imaju važnu ulogu u poticanju i promicanju različitih upalnih procesa u organizmu. Prirodni enzim mangan superoksid dismutaza (MnSOD) smatra se idealnim antioksidacijskim terapijskim agentom za nastala upalna stanja. MnSOD enzim smješten je u mitohondrijima i ima važnu ulogu u diferencijaciji stanica i antitumorskoj aktivnosti te se ubraja među najefikasnije enzime. Prekomjerna ekspresija MnSOD-a u stanicama raka može promijeniti fenotip u kulturi, odnosno pridonjeti gubitku sposobnosti formiranja kolonija kod malignih stanica. Njegove razine su smanjene u mnogim bolestima poput karcinoma, neurodegenerativnih bolesti i psorijaze [202].

Dostupnost SOD-e ključna je za održavanje redoks ravnoteže u tijelu. U istraživanju koje su proveli Li Y. i sur. [203] kod homozigotnih mutiranih miševa

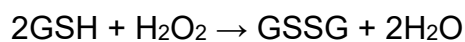
(nedostatak mangan superoksid dizmutaze) dolazi do stvarnja jakog oksidativnog stresa što je rezultiralo razvojem srčane dilatacije i neonatalne smrti miša unutar 10 dana od rođenja [203].

Na miševima koji nisu imali sposobnost proizvodnje Cu,Zn-SOD dokazano je da pozitivna proliferacija stanica u prisutnosti trajnog oksidativnog oštećenja može doprinjeti razvoju hepatokarcinogeneze kasnije u životu [204]. Nedostatak cinka, bakra i mangana može narušiti proizvodnju superoksid dizmutaze i dovesti do oksidativnog stresa i staničnog oštećenja. Danas se za dugovječnost jako zagovara nadomjestak SOD prirodnim putem preko određenih biljaka ili u obliku dodataka prehrani. Naime, postoje biljke za koje je dokazano da proizvode SOD radi vlastite zaštite (npr. Klice pšenice, soja, kukuruz, špinat i dinja). Na žalost istraživanja ukazuju na činjenicu da je bioraspoloživost SOD unesena ingestijom jako mala i da ne uspije doprijeti do krvotoka jer se razgradi u želucu [205].

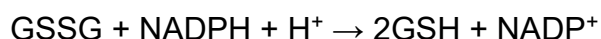
1.7.4. Glutation peroksidaza

Glutation peroksidaza (GSH-Px, EC 1.11.1.9.) opći je naziv za peroksidaze čija je primarna biološka uloga zaštititi organizam od oksidativnog oštećenja. Za razliku od SOD-a glutacion peroksidaza je neenzimski antioksidans u koje ubrajamo i vitamin C (askorbinska kiselina), vitamin E (α -tokoferol), flavanoidi i dr. [206]. Glutation peroksidaza je tripeptid kojeg čine glutaminska kiselina, cistein i glicin. Važan je stanični antioksidans prisutan u svim organima i tkivima. Tkiva s najvećom količinom glutacion peroksidaze su jetra i bubrezi, a u umjerenoj količini prisutna je u srcu, plućima i mozgu dok je vrlo malo ima u mišićima [207].

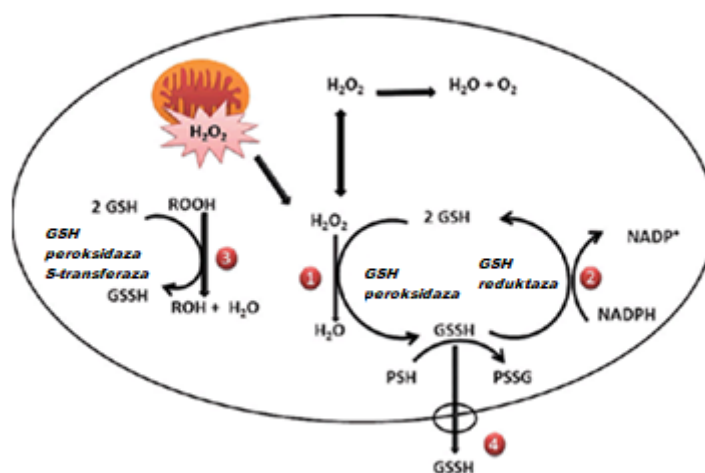
Biokemijska funkcija glutacion peroksidaze bazira se na katalizi redukcije vodikovog peroksida ili organskih hidroperoksida (ROOH) nastalih tijekom aerobnog procesa u prisutnosti reduciranog glutaciona (GSH) do oksidiranog glutaciona ili glutacion disulfida (GSSG, engl. *Glutathione disulfide*). GSSG se sastoji od dvije molekule GSH povezanih s disulfidnom vezom.



Nastali glutation disulfid (GSSG) se potom reducira u GSH djelovanjem enzima glutation reduktaze (EC 1.8.1.7) pomoću NADPH, čime se formira ciklus redukcije oksida [208]



U uvjetima teškog oksidacijskog stresa, nesposobnost stanice da smanji GSSG na GSH može dovesti do unutarstanične redox neravnoteže zbog čega se GSSG aktivno transportira izvan stanice ili reagira sa sulfhidrilom proteina stvarajući miješane disulfide.



Slika 21. Antioksidacijska uloga GSH. 1) H_2O_2 nastao aerobnim procesom metabolizira GSH radi stvaranja GSSH, 2) Redukcija nastalog GSSG pomoću enzima GSH uz kofaktor, 3) Nastali organski peroksidi mogu se reducirati uz pomoć GSH reduktaze do GSSG, 4) GSSG koji je nastao tijekom oksidacijskog stresa i ne može se reducirati u GSH izbacuje je se iz stanice radi održavanja redukcijско-oksidacijske ravnoteže [207].

Omjer GSSG/GSH baziran na visokoj razini reduciranog glutationa i niskoj razini oksidiranog glutation dioksida temelj je za održavanje oksidacijske ravnoteže.

Optimalna razina glutationa rezultira vrlo korisnim učincima u antioksidacijskoj obrani, raspadanju hranjivih tvari i regulaciji mnogih bioloških procesa. Glutation peroksidaza ima važnu ulogu u detoksikaciji ksenobiotika i njihovih metabolita, koji se nakon konjugacije izlučuju urinom ili fekalijama u obliku derivata merkapturane kiseline [209].

Mjerenje navedenih biomarkera antioksidativne obrane u tkivima predstavlja najosjetljivije primarne mehanizme toksičnih učinaka u stanici prije nastanka patofizioloških promjena. Stoga smo u ovoj disertaciji odlučili analizirati navedene markere kao pokazatelje promjene homeostatke redoks ravnoteže.

1.8. Kontaminanti iz okoliša

1.8.1. Teški metali

Kako je navedeno u prethodnom poglavlju neki metali su važni u redoks reakcijama i oksidacijskom stresu. Nadalje, neki metali primjerice teški metali imaju izravne toksične učinke u organizmu zasebno ili u interakciji sa drugim ksenobioticima. Metali prolaze biokemijski ciklus s različitim vremenom zadržavanja u pojedinim dijelovima ekološkog sustava. Tako ih u atmosferi možemo naći u periodu od nekoliko dana do nekoliko tjedana, u svježoj vodi mjesecima i godinama, u Zemljinoj kori stotinama godina, a u ocenaima i na tisuće godina. Vrsta metala kao i kemijsko svojstvo definira njihovu pokretljivost u okolišu, bioakumulaciju u biljkama i životinjama te toksične učinke. Najveće toksikološke razlike postižu se stvaranjem metal-ugljik veze, odnosno stvaranjem organo-metalnih spojeva [210].

Prema značaju za živa bića dijele se na biogene (esencijalne) ili one koji u manjoj mjeri sudjeluju u građi i metabolizmu živih bića i na ne-biogene (ne-esencijalne). Teški metali su prirodni elementi sa gustoćom većom od 5 g/cm^3 . U okoliš dospjevaju zbog svoje višestruke industrijske, poljoprivredne, medicinske i tehnološke primjene proizvoda bilo u toku proizvodnje ili pri odlaganju u okoliš.

Imaju svojstvo lake apsorpcije u živim organizmima (topivi u vodi) te su izrazito toksični. Toksičnost im se određuje kroz čimbenike kao što su doza, put izloženosti i kemijske vrste te dob, spol, genetika i nutritivni status izloženih pojedinaca. Olovo, kadmij, arsen, živa i krom imaju izrazito visok stupanj toksičnosti i smatraju se prioritetima od javno zdravstvenog značaja. Njihova toksičnost je sistemska sa mogućnošću oštećenja organa i pri nižim razinama. Američka agencije za zaštitu okoliša (US EPA, engl. *Environmental Protection Agency*) i Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC, engl. *International Agency for Research on Cancer*) klasificirani su ih kao potencijalne ljudske kancerogene [211].

U istraživanju koje su proveli Ziarati i Asgarpanah [212] dokazano je da su ljekovite biljke (*Panax ginseng*) kontaminirane toksičnim metalima kao što su olovo, kadmij i krom koji su pronađeni u ovom istraživanju i to u koncentracijama koje su bile i do tri puta veće od maksimalno dozvoljenih. Pronađeni toksikanti mogu izazvati neurološke poremećaje, oštećenja bubrega i kostiju te utjecati na smanjenje broja spermija što u kombinaciji sa štetnim učincima koji mogu proizići od toksičnih tvari u sastavu same biljke može producirati kumulativne toksične efekte. Obzirom na sve veću popularnost proizvoda na bazi bilja kao i na dugoročnu primjenu te mogućnost korištenja od strane rizičnih skupina (kardiovaskularni problemi i problemi s bubrezima) dovodi se u pitanje sigurnost potrošača primjenom ovih vrsta proizvoda [212].

Toksičnost metala u biljkama ovisiti će o njihovoj bioraspoloživosti tj o putu preuzimanja kroz stanične membrane te o daljnoj distribuciji i vezanju na stanične molekule. Toksičnost metala na biljke može varirati ovisno o genotipu i raspoloživim uvjetima, međutim postoje osnovni putevi njihova djelovanja, a to je propusnost membrane, vezanje preko sulfitnih skupina s kationima, ADP ili ATP reakcije, zamjena esencijalnih iona i oksidacijskim stresom [213].

Olovo

Olovo (Pb) je prirodni otrovni metal koji se nalazi u Zemljinoj kori a njegova široka upotreba rezultirala je onečišćenjem okoliša i značajnim javno zdravstvenim

problemom u mnogim dijelovima svijeta [214]. Dokazano je da olovo može izazvati neurološke poremećaje, anemije, oštećenja bubrega te hepatotoksičnost. Ima i značajan negativni učinak na reproduktivno zdravlje. Toksično djelovanje olova može izazvati pobačaj te ujecati na smanjenje broja spermija i razine hormona (LH, FSH i estradiola), a također može pridonjeti smanjenju aktivnosti estrogenskih receptora što ima za posljedicu smanjene reproduktivne sposobnosti, odnosno neplodnost [215].

Bez obzira na podrijetlo i kemijsku strukturu olovo je uvijek toksično. Njegova koncentracija, naročito u gradovima industrijski razvijenih zemalja, prelazi granice biološke podnošljivosti, a toksičnim djelovanjem izloženo je cjelokupno stanovništvo [210]. Kada olovo dospije u krvotok čovjeka pohranjuje se u meka tkiva i organe (jetra, bubrezi, pluća, mozak, slezena, mišići i srce). Nakon nekog vremena većina olova prelazi u kosti i zube (94% ukupne količine olova u tijelo) a nepohranjeni dio se izlučuju urinom [215]. Dokazano je da koncentracije olova u krvi, čak i one ispod 5 µg / dL (50 ppb), djeluju negativno na ljudsko zdravlje jer nema identificiranog praga ili sigurne razine olova u krvi [216].

Otrovanja olovom povezana su s tradicionalnim latinoameričkim biljnim lijekovima [217]. Olovo koje je u vodotocima i jezerima, najvećim se dijelom taloži u mulju. Kako se muljem često gnoje oranice, u tlo se unosi olovo akumulirano iz vode u mulju. Uz prisutno olovo, u mulju često ima i ostalih teških metala, kadmija i žive . Sadržaj olova u tlu određen je stupnjem urbanizacije i industrijskog onečišćenja. U blizini prometnica bilježi se u gornjih 5 cm tla i do 4. 000 mg/kg olova, a tlo u blizini industrijskih postrojenja sadržavalo je i do 10.000 mg/kg olova. Najviše olova nađeno je u biljkama i tlu udaljenim do 10 m od ceste. Na sadržaj olova u tlu utječe pH i sam sastav tla pa tako kisela tla imaju manje olova nego alkalna [218]. Biljke najčešće apsorbiraju olovo kroz korijen. Olovo nakupljeno u biljkama može utjecati na poremećaj različitih morfoloških, fizioloških i biokemijskih funkcija biljke te izazvati štetne učinke. Inhibicija produkcije ATP, LPO i oštećenja DNA preko proizvodnje ROS su posljedice toksičnog djelovanja olova u biljkama [219]. Neke biljke kao što je Ginko pokazuju antioksidacijski učinak na olovo [220].

Kadmij

Kadmij (Cd) je visokotoksični metal koji predstavlja značajan rizik za zdravlje ljudi. Prema IRAC-u klasificiran je kao kancerogen za ljudsku populaciju, a EPI ga kategorizira kao reproduktivno toksičnu tvar (1B kategorija) [221]. Kada dospije u organizam (inhalacijom ili ingestijom) remeti sintezu nukleinskih kiselina, oksidativnu fosforilaciju i inhibira enzime sa sulfhidrilnim skupinama. Kadmij prisutan u okolišu može potjecati iz prirodnih izvora ili antropogenim djelovanjem. Sedimentne stijene i morski fosfati te aktivnost vulkana i šumski požari glavni su prirodni izvori kadmija. Prosječna količina kadmija u zemljinoj kori kreće se oko 0,1 mg/kg. Čovjekovim djelovanjem najviše kadmija u okoliš dospije odlaganjem otpada, spaljivanjem ugljena, proizvodnjom željeza i čelika, iz fosfornih gnojiva i cinka. [210]. Količina kadmija u biljkama ovisi o vrsti biljke, odnosno o njenim sposobnostima apsorpcije, akumulacije i tolerancije kadmija. Važan čimbenik je pH tla jer što je pH tla niži (kiseliji) dostupnost kadmija u tlo je veća i biljka ga lakše apsorbira [222].

Opća populacija je najviše izložena kadmiju iz hrane kao posljedica bio koncentracije. Povećanju izloženosti svakako pridonosi i konzumacija cigareta. Kronična izloženost kadmiju povezana je s kroničnom bolešću bubrega, osteoporozom, kardiovaskularnim bolestima i rakom [223]. Privremeni podnošljivi mjesečni unos kadmija (PTMI, engl. *Provisional Tolerable Monthly Intake*) od 2010. godine iznosi 25 µg/kg bw (JECFA, engl. *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*) i on je zamjenjen dotadašnjim tjednim unosom od 7 µg/kg bw zbog dugog poluživota kadmija u ljudskim bubrezima [224].

Apsorbiran u organizam kadmij se nakuplja u tkivima i izaziva oštećenja u obliku povećanog krvnog tlaka, oštećenja endotela i oksidacijski stres. U studiji koju su proveli Almenara i sur. [225] miševi su putem pitke vode trovani kadmij-kloridom (CdCl₂), a u krvi je pronađena koncentracija kadmija koja se mogla usporediti sa koncentracijom kod profesionalnih izloženosti što je pridonjelo razvoju oksidativnog stresa i oštećenju endotela te pojavi upale i vaskularne ozljede kao i razvoju ateroskleroze. Na žalost mehanizmi kojima kadmij izaziva oštećenja endotela još uvijek ostaju nepoznanica [225]. Dokazano je da akutna primjena kadmija (10

mg/kg) uzrokuju značajan oksidacijski stres povećanjem lipidne peroksidacije u slini miševa. Ako je izloženost kadmiju praćena mehanizmima sustavne upale i indukcije oksidacijskog stresa tada se rizik od bolesti povećava. Istraživanjima je potvrđeno da je izlaganje kadmiju pozitivno koreliralo sa koncentracijom gama - glutamil transferaze (GGT) markerom OS, kao i sa markerima upale alkalne fosfataze (ALP) i C-reaktivnim proteinom (CRP) [226, 227].

Mehanizmi zaštite u rješavanju oksidacijskog stresa induciranog kadmijem trebaju imati za cilj sprječavanje oštećenja stanice. Kao terapijski pristup u rješavanju tog problema predloženi su antioksidansi i kelacija kadmija, odnosno zaštita od kadmija i detoksikacija kadmija koji se smatraju najoptimalnijim mjerama [228]. Prisutnost kadmija u biljkama inhibira njihov rast i razvoj izazivajući štetne efekte kao što su oksidacijski stres, genotoksičnost, inhibiciju fotosintetskih aparata i inhibiciju metabolizma korijena biljke [229]. Na biakumulaciju kadmija u biljci može utjecati količina minerala i hranjivih tvari s kojima biljka raspolaže. Odnosno veća količina tih tvari može pomoći biljci da ojača svoj antioksidacijski sustav i ublaži toksične učinke kadmija [230].

Živa

Živa ima simbol Hg koji potječe od latinskog naziva *Hydrargyrum* što znači „vodeno srebro“. Spada u prijelazne elemente bez fiziološke funkcije, izrazito toksične sa neuropatološkim oštećenjima [231]. U prirodi je nalazimo u tri oblika: elementarnom, anorganskom i organskom. Isparavanjem se u elementarnom stanju prenosi u atmosferu, zatim u hidrosferu i biosferu tvoreći prirodni geokemijski ciklus pri kojem završava u organizmu čovjeka [210]. Prema WHO živa se smatra jednim od deset najvažnijih javno zdravstvenih problema. Oblik žive određuje i njenu toksičnost i učinke na živčane, probavne i imunološke sustave. Toksikološki najznačajniji su organski spojevi žive (metil-živa) koji se akumuliraju kod riba i školjkaša i ulaze u probavni sustav čovjeka. Resorpcija iz probavnog trakta vrlo je visoka (više od 50%). Živa se kuhanjem ne uništava, a može izazvati akutna i kronična trovanja [232]. Kada hrana koja je kontaminirana metil-živom uđe u probavni sustav, metil živa se odvaja od želučane kiseline i sa aminokiselinom

cisteinom u dvanaesniku se gotovo u potpunosti apsorbira, a u kombinaciji sa hemoglobinom kroz portalnu venu akumulira se u živčanom sustavu gdje uzrokuje oštećenje neurona. Metil-živa lako prelazi krvno moždanu barijeru i placentu te se nakuplja u mozgu fetusa u većoj količini nego kod majke. Pri raspadanju metil-živa oslobađa slobodni kisikov radikal koji aktivira LPO stanične membrane [233]. Dokazano je da živa uzrokuje promjene u središnjem živčanom sustavu, što može dovesti do razdražljivosti, umora, promjena u ponašanju, drhtavice, glavobolja, halucinacije i smrti [234]. Zbog izravne interakcije žive s DNA u subtoksičnim dozama može doći do kromosomskih oštećenja kod ljudi [213]. Koncentracija metil-žive u krvi proporcionalna je koncentraciji metil-žive u organizmu i u kosi [235]. Kod akutnog i kroničnog trovanja živom liječenje obuhvaća uklanjanje žive iz organizma [210]. Štetni učinci žive na biljke ovise o koncentraciji i vremenu izloženosti. Vrlo malo se zna o njenoj induciranoj fitotoksičnosti kao i o mehanizmu djelovanja u biljci [213].

Arsen

Arsen (As) je ksenobiotik koji se može naći u zemljinoj kori i široko je rasprostranjen u cijelom okolišu zraku, vodi i zemlji. Prema IARC klasifikaciji arsen i njegovi spojevi spadaju u kancerogene za ljude [236]. Javlja se u četiri oksidacijska stanja kao As(0) (arsen), As(-III) (arsin), As(+III)(arsenit), As(V) (arsenat) [237]. Pri izgradnji kemijskih veza s kisikom, klorom i sumporom arsen stvara vrlo toksične anorganske spojeve (arsenate i arsenite). Taj oblik arsena pronalazimo u industriji i vodi za piće te kod biljaka kao posljedica navodnjavanja takvom vodom. Zbog visoke toksičnosti i sporijeg izlučivanja iz organizma od velikog je zdravstvenog značaja. Dugotrajno izlaganje anorganskom arsenu zbog kumulativnog efekta može dovesti do kroničnog trovanja [238]. Smatra se da trovalentni oblici arsena reagiraju sa -SH skupinama u vitalnim staničnim enzimima pri čemu dolazi do kočenja reakcija u Krebsovom ciklusu i sprječavanja razgradnje ugljikohidrata, masti i bjelančevina. To ima utjecaja na oksidaciju stanica i paralitičko djelovanje arsena na glatku muskulaturu krvnih žila po čemu se arsen svrstava u vaskularne otrove. Paraliza glatkog mišićja krvnih žila uzrokuje vazodilataciju koja za

posljedicu ima oštećenje srca i krvnih žila [210]. U većini slatkovodnih voda, jezera i rijeka koncentracije arsena uglavnom se kreću ispod 10 µg/L dok se u blizini antropogenih izvora nalazi i u koncentraciji od 5 mg/L koliko ga se u prosjeku nalazi i u tlu [239]. Od ukupne količine unesenog arsena oko 4/5 se apsorbira, pohranjuje i naširoko distribuira u tkiva uključujući jetru, kosti, kožu, nokte i kosu, gdje se može naći i još nekoliko mjeseci nakon prestanka izlučivanja iz organizma. Ti dijelovi tijela se koriste kao biomarkeri za dokaz akutne ili kronične izloženosti arsenu [236]. Neke studije pokazuju da arsen djeluje antagonistički u interakciji sa selenom koji se unosi u organizam obogaćenom hranom te može doći i do povećanja štetnog djelovanja arsena [240].

Za biljke arsen je ne-esencijalni obično toksični element. Riža je poznata kao namirnica s većim količinama anorganskog arsena i smatra se uz vodu za piće i morske plodove glavnim kontaminatom arsena za čovjeka. Arsen prisutan u tlu ima sposobnost ulaska u biljku putem korijenja kao i mogućnost transformacije iz manje toksičnog oblika arsenata (AsV) u toksičniji arsenit (AsIII) utječući na promjenu metabolizma biljke što se može odraziti na sam rast biljke (usporavanje) i akumulaciju biomase kao i na reproduktivni sustav biljke stvarajući gubitke u prinosu. Toksičnost arsena na biljke još je uvijek velika enigma u pogledu poznavanja najosjetljivijih dijelova biljke pogodnih za distribuciju otrova te zašto i koji molekularni putevi su najkritičniji. Odgovori na ova pitanja zasigurno će pomoći zaštititi bilja od toksičnog djelovanja arsena [241].

1.8.2. Pesticidi

Postoje različite definicije pesticida, a sve one imaju zajedničku osnovu koja proizlazi od latinske riječi *pestis* - kuga, *occides* – ubiti. WHO pesticide definira „kao kemijske spojeve koji se koriste za ubijanje štetnika, uključujući insekte, glodavce, gljive i neželjene biljke (korov)“. U javnom zdravstvu. pesticidi se koriste za spriječavanje vektora bolesti, a u poljoprivredi za očuvanje usjeva [242]. Pesticidi spadaju u potencijalno toksične spojeve zbog čega je neophodno postaviti

regulatorne okvire u pogledu njihove proizvodnje, uvoza, transporta, skladištenja, prodaje, upotrebe i zbrinjavanja [243]. Tijekom života čovjek je podvrgnut djelovanju pesticida konzumacijom hrane i vode te putem kože i udisanjem. Zbog široke primjene i velike godišnje potrošnje (oko 5 miliona tona) pesticidi su veliki zagađivači okoliša, a spora razgradnja dovodi do nakupljanja i bioakumulacije. Prema procjenama WHO broj trovanja pesticidima na godišnjoj razini u svijetu je oko 3 milijuna ljudi od kojih oko 7% završava smrću, a oko 25% s kroničnim posljedicama [210].

Pesticid za uporabu je pripravak koji se sastoji od djelatne ili aktivne tvari i inertnog nosača (otapalo). Pesticidni pripravak može biti u obliku praha, granula, tableta, kristala i emulzija. Postoje i fumiganti, odnosno pesticidi koji djeluju u plinovitom obliku, a kao pripravci su tekućine ili krutine [210].

Primjena pesticida vezana je za raznolika područja ljudske djelatnosti, a najviše se koriste kao „sredstva za zaštitu bilja“ pa je to ujedno i najbrojnija skupina pesticida. Primjenom pesticida jedan dio zaostaje u tretiranoj kulturi i naziva se ostatkom sredstva za zaštitu bilja. Zaostatke pesticida možemo naći i u okolišu zbog stabilnosti i perzistentnosti pojedinih aktivnih tvari i nakon prestanka njihove uporabe (npr. DDT) [244]. Zaostaci aktivnih tvari pesticida najčešće se mjere u mg/kg, a popis aktivnih tvari koje su dopuštene za uporabu unutar EU sa maksimalnim razinama ostataka (MRO) pesticida (MRLs, engl. *Maximum Residue Levels*) u hrani redovito se ažurira i dostupan je na stranicama EC [245].

Pesticide možemo podijeliti:

- po namjeni, odnosno ciljanim organizmima (insekticide, fungicite, herbicide, limacide, karicide, nemacide, rodenticide i dr)
- po kemijskom sastavu (klorirani ugljikovodici, organofosforni, karbamati, sintetski piretroidi, neonikotinoidi, bakrena i sumporna sredstva, triazini, imidazolinoni i dr)
- po otrovnosti na čovjeka [244].

Podjela pesticida po otrovnosti provodi se po WHO klasifikaciji koja se odvija prvenstveno na osnovi akutne oralne otrovnosti za štakora (Tablica 3.) [246].

Tablica 3. Klasifikacija pesticida Svjetske zdravstvene organizacije temeljena na njihovoj akutnoj otrovnosti [246].

WHO Klasifikacija	LD ₅₀ za štakora (mg/kg tjelesne težine)		
		Probavnim putem	Preko kože
Ia	Ekstremno opasni	<5	<50
Ib	Visoko opasni	5-50	50-200
II	Umjerenno opasni	50-2000	200-2000
III	Neznatno opasni	Iznad 2000	Iznad 2000
U	Bez rizika za akutnu opasnost	5000 ili više	

Kumulativno nakupljanje pesticida i njihovih metabolita u organizmu povezuje se sa nastankom mnogih kroničnih bolesti kao što je leukemija i različiti oblici karcinoma (bubrega, pluća, jajnika, gušterače, prostate i želuca). Kombinirana izlaganja pesticida i nekih drugih kemikalija (ostaci lijekova) mogu i u niskim dozama tvari koje pojedinačno ne predstavljaju rizik u mješavinama inducirati toksične učinke. Na žalost malo je istraživanja koja se bave kombiniranim efektom jer se većina toksikoloških studija odnosi na evaluaciju izlaganja jednoj kemikaliji. Štetni učinci su veći kad je čovjek izložen kombinacijama aktivnih tvari a najveće posljedice imaju djeca i trudnice [247].

U ovom istraživanju detektirano je nekoliko pesticida iznad maksimalno dozvoljene razine ostataka pesticida (MRO), a to su: cipermetrin, bioaletrin, ciflutrin i miklobutanil.

Cipermetrin, bioaletrin i ciflutrin spadaju u sintetske piretroide koji se koriste kao insekticidi. Dugotrajnog su djelovanja, a djeluju i pri vrlo niskim koncentracijama. Sintetski piretroidi su analozi i derivati piretrina (prirodne insekticidne tvari iz cvjetova biljke buhač ili krizanteme). Piretroidi su perzistentniji od piretrina pa u zaštiti bilja uspješno zamjenjuju klorirane insekticide, organofosfate i karbamate. Spadaju u nervne otrove. Osim navedenih pesticida u piretroide ubrajamo i deltametin, fenpropatrin, permetrin, tetrametin i dr. Kao štetan učinak nakon višesatnog izlaganja piretroidima može se javiti parestezija, kao posljedica

djelovanja na senzorne živce opisana kao peckanje kože koje se pretvara u trnce i utrnulost. Ovisno o stupnju izloženosti simptomi trovanja piretroidima mogu biti glavobolja, umor, prolazne promjene električnih aktivnosti mozga (EEG), znakovi poremećaja svijesti, konvulzije i koma. Neurotoksično djelovanje posljedica je djelovanja na prijenos natrija u stanicama [244].

U ovoj studiji najzastupljeniji pesticid je piretroid cipermetrin. Cipermetrin je registriran za poljoprivrednu uporabu (zaštita hrane, stočne hrane i pamuka), može se primjenjivati i u zaštiti stoke od ušiju, za kontrolu mrava, žohara buba i drugih insekata u zatvorenim prostorima. Na tržištu je dostupan u obliku emulzije, tekućine i paraha. Obzirom da pokazuje kompatibilnost sa većim brojem insekticida i fungicida najčešće dolazi u formulaciji s dva ili više aktivnih sastojaka. Američka agencija za zaštitu okoliša (EPA, engl. *Environmental Protection Agency*) cipermetrin je klasificirala kao potencijalni ljudski kancerogen čija je toksičnost najveća kad se uzima probavnim putem (Tablica 4.) što je u skladu s klasifikacijom pesticida prema WHO [246, 248].

Tablica 4. Akutni toksični profil Cipermetrina prema EPI [249].

Rezultat	Kategorija toksičnosti	Kategorija toksičnosti
Probavnim putem – miševi	LD ₅₀ (M): 247 mg/kg LD ₅₀ (Ž): 309 mg/kg	II
Preko kože – akutno – miševi, zečevi	LD ₅₀ > 4920 mg/kg/day	III
Očni iritans	konjuktivitis, hemoza i očni iscjedak. Traje do 7 dana.	III
Kožni iritans	Blagi eritemi	IV

Prema CLP Uredbi (EZ) br. 1272/2008 o razvrstavanju, označivanju i pakiranju tvari i smjesa obzirom na akutnu toksičnost (ATE) ukupni cipermetrin je razvrstan u IV kategoriju, a alfa izomer u III kategoriju toksičnosti dok beta i zeta izomeri nisu kategorizirani po navedenoj Uredbi. Preporučeni dnevni unos (ADI, engl. *Acceptable daily intake*) za ukupni cipermetrin je 0,05 mg/kg/dan, za alfa izomer 0,015 mg/kg/dan, za zeta izomer 0,04 mg/kg/dan, a beta izomer nema propisan ADI [245, 249].

Prema dostupnim podacima cipermetrin ne spada u kronične toksične tvari, nije teratogen ni mutagen. U količini od 37,5 mg/kg/dan primjenjenoj na miševima pokazao je štetne reproduktivne promjene. Negativno utječe na promjene središnjeg živčanog sustava dovodeći do motorne neusklađenosti u pokusnih životinja pri koncentraciji od 37,5 mg/kg, a veća koncentracija (85 mg/kg) je uzrokovala smrtnost oko 30% pokusnih životinja u periodu od 4 do 17 dana testiranja. Dugoročne studije na miševima su pokazale povećanje težine jetre i bubrega i patološke promjene jetre, a kod zečeva su se patološke promjene uočile na jetri, plućima nadbubrežnoj žlijezdi i koži [250]. Cipermetrin spada i u blage iritante kože i oka, a ima i alergena svojstva. Brzo se metabolizira u životinjskom organizmu te ga se oko 99% izluči urinom za nekoliko sati, a ostatak se pohranjuje u masno tkiva i biva kroz period od nekoliko dana (trans izomeri puno prije od cis izomera) eliminiran iz organizma [248, 251]. Cipermetrin je prvi piretroid za kojeg se veže smrtni slučaj koji se dogodio u Grčkoj gdje je čovjek pojeo obrok u koji je greškom dodano 10% cipermetrina te je u vremenu od tri sata umro. Simptomi su bili mučnina, produljena povraćanja s bolovima, proljev, konvulzije, nesvjestica i koma. Ostaci cipermetrina u tkivu bili su ispod granice detekcije ali je u želucu ostalo 0,7 g. cipermetrina [252]. Prema Uredbi (EZ) br. 396/2005 o maksimalnim razinama ostataka (MRO) pesticida u hrani [253] cipermetrin nije reguliran u dodacima prehrani, odnosno za njega nije propisana MRO u toj grupi proizvoda, ali je reguliran u korijenju i lišću biljka (ginseng, valerijane, mate čaj i dr bilje korjenasto i lisnato) i gdje mu je MRO 0,1 mg/kg iskazan kao ukupan zbroj svih izomera.

Ciflutin je po CLP Uredbi (EZ) br. 1272/2008 o razvrstavanju, označivanju i pakiranju tvari i smjesa obzirom na akutnu toksičnost (ATE) razvrstan u II kategoriju za unos probavnim putem i u III kategoriju inhalacijski. Po Uredbi (EZ) br. 396/2005 o maksimalnim razinama ostataka pesticida ciflutrin nije reguliran u dodacima prehrani ali je reguliran u biljkama (ginseng, valerijane i dr bilje korjenasto i lisnato) gdje mu je MRO 0,1 mg/kg, a u osušenom hmelju 0,07 mg/kg. ADI za cyflutrin iznosi 0,003 mg/kg/dan [245].

Bioaletrin nije reguliran navedenim Uredbama [245, 253].

Miklobutanil spada u fungicide koji se koriste za spriječavanje gljivičnih nametnika. To su pesticidi koji se najčešće pronalaze u hrani, a prema djelovanju se mogu podjeliti na protektivne (djeluju na spore) i kurativne (djeluju na gljivice nakon infekcije). U biljku mogu ući preko korijena i sistemski se šire po cijeloj biljci ili djeluju kontaktno [253]. Miklobutanil je aktivni sastojak nekoliko vrsta pesticida, ima širok raspon primjene na jestivom povrću i bilju. Smatra se da kod ispravne primjene ima nisku toksičnost kod ljudi. Djeluje tako da blokira ključni enzim u sintezi stanice gljivične membrane. Spada u sustavne fungicide, apsorbira se na mjestu primjene (list) i ne uklanja se ispiranjem obrađenih usjeva. Pri ekstrakcijama bilja koriste se određena otapala koja se nakon toga moraju ukloniti. Postupak uklanjanja otapala i povećavanja koncentracije aktivne tvari iz sastava biljke vjerojatno može utjecati i na povećanje aktivne tvari pesticida, kao što je slučaj miklobutanila i kanabinoida [254].

Miklobutanil je obzirom na akutnu toksičnost po CLP Uredbi (EZ) br. 1272/2008 razvrstan u IV kategoriju toksičnosti u kontaktu s kožom i u II kategoriju toksičnosti kao iritant oka. Po Uredbi (EZ) br. 396/2005 nije reguliran u dodacima prehrani ali je reguliran u biljkama (ginseng, valerijane i dr bilje korjenasto i lisnato) gdje mu je MRO 0,05 mg/kg, a ADI je 0,025 mg/kg/dan [245].

1.9. Cilj i hipoteza rada

Prvi cilj ovog istraživanja je utvrditi da li odabrani dodaci prehrani na biljnoj bazi sa tržišta Republike Hrvatske udovoljavaju uvjetima zdravstvene ispravnosti obzirom na prisutnost određenih organskih i anorganskih tvari, odnosno utvrditi količinu rezidualnih pesticida i teških metala.

Drugi cilj istraživanja je utvrditi prisutnost nedozvoljenih i nedeklariranih farmakološki aktivnih tvari namjenjenih poboljšanju deklariranog učinka.

Treći cilj istraživanja je provjera toksikološke javno zdravstvene sigurnosti upotrebe navedenih biljnih vrsta u međusobnim kombinacijama (ali i sinergističkog učinka rezidualnih pesticida, metala ili nedopuštenih farmakološki aktivnih tvari) na *in vivo* modelu. Standardno toksikološko testiranje provedeno je na miševima Swiss, prema OECD protokolu 407, sa RDA dozama prijavljenim na deklaraciji proizvoda. Željelo se utvrditi da li u tkivima životinja nastaju toksične promjene poput oksidacijskog stresa, apoptoze ili nekroze, hematoloških promjena, promjena u koncentracijama hormona i patoloških promjena na organima.

Četvrti cilj predstavlja inovativni pristup u analizi dobivenih rezultata istraživanja koji je metodom hijerarhijske klaster analize pokušao dovesti u kvantitativnu vezu pojedinu biljnu vrstu ili kontaminant i njihove kombinacije kako bi se donio zaključak i preporuke koje biljne vrste ili kontaminanti te njihove kombinacije predstavljaju najveći potencijalni sigurnosni rizik za pojedini fiziološki sustav.

Rezultati bi trebali doprinjeti novom kvantitativnom pristupu u toksikološkoj ili javnozdravstvenoj procijeni sigurnosti pri korištenju različitih biljnih komponenti unutar formulacija istraživanih dodataka prehrani na biljnoj bazi.

Praktična primjena rezultata istraživanja trebala bi pridonjeti uspostavi odgovarajućih upozorenja i razvrstavanja temeljem štetnih učinaka unutar pojedinih biljnih formulacija kako bi mjerodavne institucije uputile na nužnu potrebu za re-evaluacijom terapijske strategije u cilju zaštite zdravlja ljudi kod nekontrolirane primjene dodataka prehrani na biljnoj bazi.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Komercijalni proizvodi korišteni u istraživanju

Kao materijali u ovom istraživanju korišteni su komercijalni proizvodi deklarirani kao dodaci prehrani s namjenom za poticanje potencije i libida te sprječavanje erektilne disfunkcije (ED). Svi testirani proizvodi bili su registrirani od Ministarstva zdravstva, dostupni u slobodnoj prodaji na tržištu RH, odabrani slučajnim odabirom s naglaskom da u sastavu sadrže biljne vrste za koje literaturni podaci govore da se koriste u svrhu pojačanja i/ili poboljšanja potencije, odnosno koje imaju dugotrajnu primjenu u tradicionalnoj medicini. Istraživanje je provedeno u dvije faze. U prvoj fazi istraživanja analizirala se zdravstvena ispravnost proizvoda, odnosno kemijska analiza organskih i anorganskih spojeva. Analize su provedene u Zavodu za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“ u Službi za zaštitu okoliša i zdravstvenu ekologiju.

Druga faza ispitivanja odnosila se na toksikološko testiranje istih proizvoda koja su provedena na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu u Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka. Sva toksikološka testiranja provedena su na miševima Swiss prema OECD protokolu 407 sa RDA specifikacijama prijavljenim na deklaraciji proizvoda.

2.1.1. Popis pojedinačnih biljnih vrsta u istraživanim proizvodima

U Tablici 5. prikazan je sastav komercijalnih proizvoda namjenjenih muškarcima (proizvod 1, 2, 3 i 4) i namjenjenih ženama (proizvod 7, 8 i 9). Proizvodi su deklarirani kao biljni dodaci prehrani za pomoć kod ED. Komercijalni nazivi istraživanih proizvoda nisu u radu navedeni zbog marketinških razloga. Prema sastojcima navedenim na deklaraciji svaki od analiziranih proizvoda ima svoju specifičnu kombinaciju obzirom na sastav biljnih vrsta i njihov udio u ukupnoj masi ekstrakta. Ekstrakt biljnih vrsta *Epimedium sagittatum* i *Lepidium meyenii* zastupljeni su u najvećem broju proizvoda. Posebna kombinacija biljaka koju čine *Humulus lupulus*, *Melisa officinalis*, *Origanum vulgare* i *Ginkgo biloba* karakteristična je za proizvod 2 i proizvod 9, odnosno za uzorak sa univerzalnom namjenom za muškarce i žene.

Tablica 5. Popis pojedinačnih biljnih vrsta i njihovih količina zastupljenih u istraživanim proizvodima za muškarce i žene u mg (podaci s deklaracije proizvoda)

Biljne vrste zastupljene u istraživanim proizvodima prema RDA specifikacijama	Proizvodi za muškarce				Proizvodi za žene		
	Proizvod 1	Proizvod 2	Proizvod 3	Proizvod 4	Proizvod 7	Proizvod 8	Proizvod 9
<i>Epimedium sagittatum</i> (Epimedium)	225	-	200	240	606	250	-
<i>Panax quinquefolius</i> (Američki ginseng)	135	-	100	140	-	-	-
<i>Lepidium meyenii</i> (Maka)	67,5	-	100	100	-	100	-
<i>Tribulus terrestris</i> (Tribulus)	-	-	-	100	-	100	-
<i>Turnera diffusa</i> (Damiana)	-	-	-	-	201	100	-
<i>Humulus lupulus</i> (Hmelj)	-	450	-	-	-	-	450
<i>Melisa officinalis</i> (Matičnjak)	-	450	-	-	-	-	450
<i>Origanum vulgare</i> (Origano)	-	360	-	-	-	-	360
<i>Ginkgo biloba</i> (Ginko)	-	150	-	-	-	-	150
<i>Ilex paraguariensis</i> (Mate)	-	-	-	-	201	-	-
<i>Sarsaparilla officinalis</i> (Sarsaparila)	-	-	-	-	-	50	-
<i>Smilax aspera</i> (Tetivka)	-	-	-	-	18	-	-
<i>Schisandra chinensis</i> (Shizandra)	22,5	-	-	-	-	-	-
L-arginin	-	-	-	100	-	100	-
UKUPNA KOLIČINA BILJAKA PO RDA*	450	1.410	400	680	1.026	700	1.410

*RDA -preporučena dnevna količina (engl. Recommended Dietary Allowances)

2.2. Kemijske analize organskih i anorganskih tvari u istraživanim proizvodima

2.2.1. Određivanje prisutnosti nedeklariranih farmakoloških tvari

Svi komercijalni proizvodi su analizirani na prisutnost farmakoloških aktivnih tvari koje se koriste za liječenje ED i koje su zabranjene za upotrebu u dodacima prehrani. Identifikacija i kvantifikacija farmakoloških tvari provedena je metodom tekućinske kromatografije – tandemne spektrometrije masa (LC-MS-MS, engl. *Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*). To je vezani sustav kojeg čine tekućinski kromatograf i spektrometar masa s tri kvadrupola. Ova instrumentalna kombinacija omogućuje stvaranje dodatnih fragmentacija što doprinosi kvaliteti određivanja strukture analiziranog iona. Karakterizira je visoka osjetljivost, selektivnost i robusnost. Kao ionski izvor korišteno je elektroraspršivanje (ESI, engl. *Electrospray Ionization*) koje omogućuje prevođenje termolabilnih i nehlapljivih molekula u plinsku fazu što je osnova za daljnju analizu spektrometrom masa [255]. Ionizacija se provela iznad 100 °C u struji dušika. U spektrometru masa kao analizator korišten je trostruki kvadrupol koji ima ulogu filtera masa. Kvadrupol čine četiri metalne, valjkaste i paralelne elektrode od kojih je jedan par spojen na određeni konstantan napon i promjenjivu radiofrekvenciju, a drugi na napon i radiofrekvenciju suprotne polarnosti. Kroz središte kvadrupola prolaze ioni određenog omjera mase i naboja, koji će sekvencijski biti propušteni do detektora a kao rezultat svega će se dobiti spektar [256, 257].

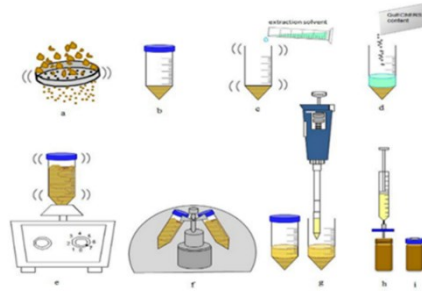
Uzorak se usitni i homogenizira od čega se u postupak uzima oko 0,5 g i ekstahira smjesom otapala metanol:voda (50:50 mL), a zatim se uvodi u tekućinski kromatograf oznake Thermo Finnigan Surveyor (Thermo Electron Corporation, San Jose, SAD) koji je opremljen kvaternom pumpom i autosamplerom oznake Finnigan Surveyor (Thermo Electron Corporation, San Jose, SAD). Za MS-MS analizu korišten je trostruki kvadrupol oznake Thermo Finnigan TSQ Quantum Ultra EMR opremljen grijanim elektrosprejom (ESI). Po analitu su praćena dva

prijelaza, kao ion prekursor odabran je protonirani molekulski ion ($[M+H]^+$) i sildenafil D8 (Clearsynth, India) kao interni standard. Ciljani analit je razdvojen tekućinskom kromatografijom reverznih faza na kromatografskoj koloni Zorbax SB C18 (150 mm \times 2.1 mm, 3.5 μ m) sa izokratnim eluiranjem, gdje je mobilna faza A bila 0,1% mravlja kiselina u deioniziranoj vodi dok je mobilna faza B bila 0,1% mravlja kiselina u acetonitrilu. Brzina protoka iznosila je 0,2 mL/min. Identifikacija analita određena je na temelju vremena zadržavanja sastojaka na kromatografskoj koloni koje se treba poklapati s vremenom zadržavanja standardnih otopina (odstupanje do $\pm 5\%$) i odgovarajućih podataka MS-MS analize.

2.2.2. Određivanje ostataka pesticida

Određivanje ostataka pesticida u biljnim pripravcima provedeno je prema normiranoj metodi HRN EN 15662:2008 - Hrana biljnog podrijetla tehnikom vezanog sustava plinske kromatografije i spektrometrije masa (GC-MS) korištenjem Quechers metode za pripremu uzoraka. Quechers metoda je multiresidualna metoda čiji naziv proizlazi iz kombinacije riječi *Qu/Quick* = brzo, *E/Easy* = jednostavno, *Ch/Cheap* = jeftino, *E/Effective* = učinkovito, *R/Rugged* = robusno, *S/Safe* = sigurno te podrazumjeva jednostavne, brze i učinkovite analitičke postupke gdje se u kraćem vremenskom razdoblju može obraditi veći broj uzoraka te istovremeno indentificirati više stotina pesticida s dobrom analitičkom osjetljivošću [258]. U postupku obrade (Slika 22.) uzorak je potrebno homogenizirati, zatim se od homogenizirane mase uzima $10 \pm 0,1$ g uzorka u polipropilensku (PP) tubu od 50 ml. Uzorku se dodaje organsko otapalao (Acetonitril, HPLC kvalitete), a zatim smjesa bezvodnog magnezijevog sulfata, natrijevog klorida, natrij citrata i disodij citrat seskvihidrata. Sve se snažno ekstrahira na vortexu tijekom 1 minute nakon čega se centrifugira (5 min/3000 okretaja/min). Nakon toga se 6 ml supernatanta (gornji organski sloj) dalje ekstrahira i čisti pomoću disperzivne SPE tehnike koja sadrži magnezijev sulfat za razdvajanje vode iz otapala, PSA (*Pressure swing adsorption*) apsorbens za uklanjanje šećera i kiselina i grafitizirani ugljik (GCB) za uklanjanje pigmenta. Ekstrakt se zatim

centrifugira (5 min/3000 okretaja/min) kako bi bio čist i spreman za snimanje (Slika 22.).



Slika 22. Postupak obrade uzorka Quechers metodom [258].

Snimanje se provodi na plinskom kromatografu sa spektrometrijom masa, Shimadzu GC-MS-QP 210 Plus. Kod plinske kromatografije koja se sastoji od plina nosioca, injektora, kromatografske kolone, detektora i jedinice za procesiranje podataka (PC) mobilna faza je plin a stacionarna faza kruta ili tekuća tvar. Uzorci su snimljeni u SIM (engl. *Selective Ion Monitoring*) modu a identifikacija i kvantifikacija uzoraka izvršena je prema jednom glavnom i dva referentna iona. Koncentracija se izračuna uz pomoć GCMS-solution programa temeljem površine pikova i površine pikova standarda. Kalibracijska krivulja se postavlja dnevno korištenjem „matrix match“ kalibracije. Za potrebe snimanja koristila se kapilarna kolona RTX-OPPesticides (30 m x 0,25 mm i.d.) i 0,25 debljine filma, a plin nosilac bio je helij (He 6.0) sa protokom od 1.99 ml/min. Početna temperatura pećnice bila je 50 °C tijekom 3 minute, a zatim se dizala po 20 °C do 280 °C kroz period od 10 minuta. Korišten je PTV injektor sa visokim pritiskom od 250 kPa / 1 minutu i liner 1,5 mm x 3,5 x 95 mm ispunjen karbofritz punilom.



Slika 23. Aparat za analizu pesticida Shimadzu GC-MS-QP 210 Plus (NZZJZ „Dr. Andrija Štampar“)

2.2.3. Određivanje prisutnosti teških metala

U ovom istraživanju su identificirana i kvantificirana četiri teška metala: olovo (Pb), arsen (As), kadmij (Cd) i živa (Hg). Analiza je provedena metodom induktivno spregnute plazme s masenom detekcijom (ICP-MS, engl. *Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry*) na instrumentu oznake Perkin Elmer Sciex ELAN DRC-e Axial Field Technology. Ovu vrstu masene spektroskopije karakterizira mogućnost stvaranja iona (ICP) te visoka osjetljivost i specifičnost njihove detekcije i identifikacije u niskim koncentracijama i u širokom linearnom području (MS). Instrument ELAN DRC-e koristi Dynamic Reaction Cell™ (DRC™) tehnologiju za uklanjanje poliatomskih smetnji i inovativnu tehnologiju aksijalnog polja, Axial Field™ Technology (AFT) koja omogućuje povećanu brzinu i stabilnost analita [259].

Obrada čvrstih uzorka prije injektiranja u aparat zahtjeva usitnjavanje i homogenizaciju te razgradnju mikrovalnom digestijom pomoću nitratne kiseline (HNO₃) i vodikova peroksida (H₂O₂). Nakon razgradnje bistra otopina se profiltrira u odmjernu tikvicu od 25 ml, nadopuni do oznake i injektira u instrument. Mjerenje uzorka provodi se uz paralelno mjerenje slijepe probe (HNO₃) i radnih standarda (Ultra Scientific koncentracije 1000 mg/L) u linearnom području određivanja.

Kao potvrđeni referentni materijal (CRM, engl. *Certified Reference Material*) koristilo se mlijeko u prahu oznake ERM BD-150 milk powder, a raspon rezultata bio je 92-105% . Metoda je validirana čime je potvrđeno da je prihvatljiva i pouzdana za tu namjenu. Tako pripremljena otopina uzorka se pomoću peristaltičke pumpe uvodi u raspršivač gdje se raspršuje pomoću struje argona, koji služi kao plin nosilac. Formira se aerosol, koji prolazi kroz tkz. *spray chamber* u kojem se kolizijom uklanjaju veće kapljice uzorka. Aerosol dalje ulazi direktno u cijev horizontalno postavljenog ICP *torcha*. U središtu plazme kinetička temperatura varira od 4500 – 6500 K. Aerosol uzorka postaje desolvatiziran i ioniziran. Plazma je izvor pojedinačnih pozitivno nabijenih iona, koji omogućuju većini elemenata da budu ionizirani s efikasnošću većom od 90%. MS sustav koristi kvadropolirani način razdvajanja. Nastali ioni iz plazme prelaze u kvadropol (analizator masa) gdje se pomoću četiri metalna štapića koji služe kao filter masa,

u središte kvadropola propuštaju isključivo ioni specifičnog omjera mase i naboja (m/z). Nakon prolaza kroz kvadropol, signali iona mjere se pomoću detektora. [260].

Kvantifikacija rezultata se provodi prema jednadžbi:

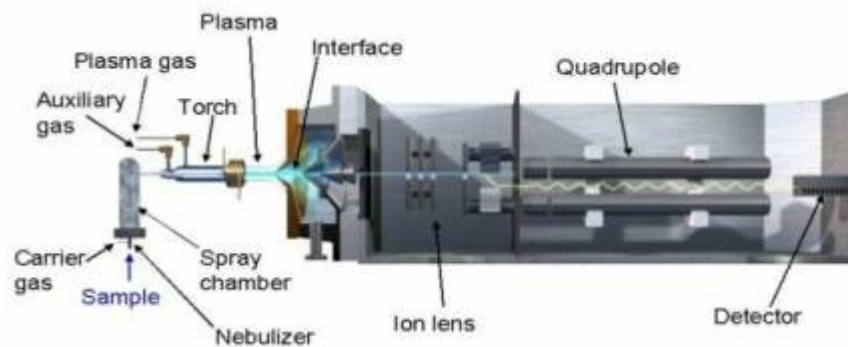
$$\gamma_M = \frac{\gamma_{metal} \times V_{ot}}{m}$$

γ_M koncentracija metala u uzorku (mg/kg)

γ_{metal} koncentracija određivanog metala u pripremljenoj otopini uzorka ($\mu\text{g/L}$)

V_{ot} volumen pripremljene otopine uzorka (L)

m masa uzorka (g)



Slika 24. Presjek instrumenta induktivno spregnute plazme s masenim detektorom (ICP-MS), <http://icpms.ucdavis.edu/facilities-procedures> [22.09.2017.].

2.2.4. Metoda analize industrijskih otapala

Identifikacija industrijskih otapala provedena je na plinskom kromatografu sa spektrometrijom masa oznake GC-MS-QP2010 Plus Shimadzu. Uz odgovarajuće uvjete plinske kromatografije i masene spektrometrije identifikacija spojeva provodi se prema indeksima sličnosti (SI) nepoznatih s poznatim spektrima iz baze podataka (Državni zavod za normizaciju i tehnologiju (NIST, engl. *National Institute for Standards and Technology*) u skladu sa $SI \geq 80$. Analizirani uzorak se otopi u pogodnom otapalu (n-heksan, diklormetan odnosno metanol) i injektira u aparat. Plinskokromatografski uvjeti su kapilarna kolona 60 m x 0,25mm ID x 0,32 um film, stacionarna faza IC5 (5% fenila na polisiloksanu), temperaturni program: 40°C 5'/10°C/280°C 21' ; protok = 1,5 mL He/min, ionizacija se provodi snopom elektrona 70eV (standard) i snimaju se potpuni spektri masa. Popis identificiranih sastojaka (relativno zastupljeni sastojci) uspoređuje se prema indeksima sličnosti (SI) nepoznatih s poznatim spektrima iz baza ($SI \geq 80$).

2.3. Toksikološke *in vivo* analize

2.3.1. Pokusne životinje

U toksikološkom istraživanju svaki pojedini istraživani proizvod apliciran je miševima soja Swiss outbreed albino prema protokolu OECD 407 (28 day subchronic toxicity) gastričkom kanilom, oralno kao svakodnevni tretman preporučene dnevne količine (RDA, engl. Recommended Dietary Allowances) u mg/kg. Za svaki proizvod formirana je skupina od 6 miševa. Proizvodi 1, 2, 3 i 4 namjenjeni za mušku populaciju aplicirani su muškim miševima, a proizvodi 7,8 i 9 namjenjeni za žensku populaciju ženskim miševima. Svi proizvodi prije aplikacije pripremljeni su u obliku otopine sukladno preporuci proizvođača, odnosno prema

RDA preračunato na masu miša. Osim skupina koje su primale otopine istraživanih komercijalnih proizvoda, bile su oformljene i kontrolne skupine. Kontrolna skupina (K) sastojala se od 6 muških i 6 ženskih miševa koje su tijekom pokusa primale samo fiziološku otopinu. Pozitivna kontrolna skupina (PKGon) koja je predstavljala pozitivnu kontrolu kod usporedbe razine spolnih hormona sastojala se od 6 muških i 6 ženskih miševa kojima se aplicirao komercijalni gonadotropni hormon (4 puta tijekom 28 dana – jednom tjedno), u obliku proizvoda Gonavet™ (Gonadorelin (6-D-Phe)) apliciran prema uputama primjene lijeka prilagođeno na težinu miša.

Obzirom da je u dva analizirana proizvoda namjenjena muškoj populaciji dokazana prisutnost zabranjene farmakološke komponente sildenafilu oformljena je još jedna pozitivna kontrolna skupina (PKSil) od 6 muških miševa kojima se aplicirao farmakološki pripravak Viagra (100 mg sildenafilu) prema RDA specifikacijama proizvođača svakodnevno tijekom 28 dana na način opisan kao i u ostalih skupina.

Nakon provedbe pokusa u trajanju od 28 dana za sve životinje obiju skupina utvrđen je ukupni prirast tjelesne mase koji se dobio iz razlike u masi vaganjem životinja 1. i 28. dana pokusa. Nakon 28 dana, sve su životinje anestezirane mješavinom Xylapana i Narketana (i.p. 25 mg/kg).

Tablica 6. Vrste skupina, broj i vremensko razdoblje tretiranja životinja

Vrste skupina (s) tretiranih životinja (ž)	Muška skupina životinja (6 ž / s)	Ženska skupina životinja (6 ž / s)	Ukupan broj tretiranih životinja	Vremenski period tretiranja životinja prema RDA specifikacijama
Komercijalni proizvodi za muškarce: 1, 2, 3, 4 za žene: 7, 8, 9	4 skupine za 4 različita proizvoda (6 ž x 4 = 24 ž)	3 skupine za 3 različita proizvoda (6 ž x 3 s = 18 ž)	42	Svakodnevno tijekom 28 dana prema dozama iskazanim u Tablici 7.
Fiziološka otopina (K)	Jedna skupina (6 ž)	Jedna skupina (6 ž)	12	Svakodnevno tijekom 28 dana
Pozitivna kontrola gonadotropinom (PKGon)	Jedna skupina (6 ž)	Jedna skupina (6 ž)	12	4 puta tijekom 28 dana (jednom tjedno)
Pozitivna kontrola sildenafilom (PKSil)	Jedna skupina (6 ž)	-	6	Svakodnevno tijekom 28 dana
	Ukupno tretirano 42 mužjaka	Ukupno tretirano 30 ženki	72 životinje	

Tablica 7. Prikaz preporučenih dnevnih doza biljnih proizvoda po preporuci proizvođača za čovjeka i vrijednosti preračunatih na masu miša

Proizvodi	RDA dnevna doza za čovjeka	RDA dnevna doza preračunata za miša
Proizvod 1	450 mg / dan	0,16 mg / dan
Proizvod 2	1.410 mg / dan	0,50 mg / dan
Proizvod 3	400 mg / dan	0,14 mg / dan
Proizvod 4	680 mg / dan	0,24 mg / dan
Proizvod 7	1.026 mg / dan	0,37 mg / dan
Proizvod 8	700 mg / dan	0,25 mg / dan
Proizvod 9	1.410 mg / dan	0,50 mg / dan

2.3.2. Analiza parametara u perifernoj krvi tretiranih životinja

Krv se prikupila kardijalnom punkcijom životinje te su iz pune krvi određeni hematološki i biokemijski parametri automatiziranim hematološkim analizatorom (Coulter). Od hematoloških parametara izmjereni su: broj eritrocita, hematokrit, hemoglobin, prosječnu težinu hemoglobina u eritrocitima, prosječnu koncentraciju hemoglobina u volumenu eritrocita, prosječni volumen eritrocita, raspodjela eritrocita po volumenu, broj leukocita, broj trombocita i prosječni volumen trombocita. Neautomatiziranom metodom diferencijalnog bojenja po Pappenheimu određena je i diferencijalna krvna slika (DKS).

Određivanje krvne slike

Krvne uzorke uzeli smo iz srca anesteziranih pokusnih životinja prije žrtvovanja te stavili u heparinizirane plastične vacutainere s dodatkom EDTA (Becton Dickinson,

Plymouth, UK) i čuvali na temperaturi od 4 °C kroz 2-4 sata do određivanja hematoloških parametara.

Za procjenu hematoloških parametara uzimali smo 1 ml krvi u epruvetu s podtlakom s dodatkom antikoagulansa K3EDTA. Za procjenu hormona uzeti su uzorci krvi u epruvete bez antikoagulansa; nakon koagulacije krvi uporabljen je serum za analizu hormona. Krvni uzorci za dobivanje seruma odmah su stavljeni u epruvete bez antikoagulansa te nakon koagulacije krvi su centrifugirani na 10 min /3000 okretaja/ minuti. Nakon centrifugiranja, serumi su stavljeni u 1,5 ml polipropilenske tubice (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) te pohranjeni na -20 °C do određivanja biokemijskih parametara. Od hematoloških parametara odredili smo broj i distribuciju eritrocita (E), prosječni stanični volumen eritrocita (MCV), koncentraciju hemoglobina (Hgb), hematokrit (Hct), prosječnu težinu hemoglobina u eritocitu (MCH), prosječnu staničnu koncentraciju hemoglobina (MCHC), ukupni broj leukocita (L), ukupan broj trombocita (Trc), postotak pojedinih leukocitnih stanica u perifernoj krvi; neutrofila, limfocita i bazofila. Krv smo analizirali standardnim laboratorijskim metodama. Hematološke parametre analizirali smo brojačem krvnih stanica Cell-Dyn® 3200 (Abbott, USA).

Mjerenje hemoglobina (Hgb) u eritrocitima

Koncentracija hemoglobina (Hgb) u eritrocitima (Er) određivana je pomoću metode s cijanidnim reagensom. Reakcija se temelji na litičkom djelovanju cijanidnog reagensa koji oslobađa hemoglobin iz eritrocita, nakon čega dolazi do oksidacije hemoglobina s cijanidom te se stvara stabilan obojeni kompleks cijanomethemoglobin. Koncentracija ukupnog hemoglobina u eritrocitima mjeri se na spektrofotometru na valnoj duljini od 560 nm. U epruvetu se dodaje 20 µL uzoraka eritrocita i 5 mL radne otopine cijanidnog reagensa. Nakon dodavanja cijanidnog reagensa uzorak se inkubira 5 minuta na sobnoj temperaturi nakon čega isti centrifugiramo na 10 min/2700 okretaja/min. U drugu epruvetu se ulije 5 mL standarda s poznatom koncentracijom hemoglobina od 150 g/L. Nakon

centrifugiranja mjere se vrijednosti apsorbancije uzorka i standarda. Koncentraciju hemoglobina u uzorku izražavamo kao g/L a izračunavamo prema formuli:

$$y(\text{hemoglobina u uzorku}) = \frac{A(\text{uzorka})}{A(\text{standarda})} \times y(\text{hemoglobina u standardu})$$

2.3.3. Biomarkeri oksidativnog stresa

Određivanje proteina metodom po Lowery-u

Količina proteina u plazmi krvi i tkivima organa određena je metodom po Lowry *i sur* [261]. Ova metoda kombinira biuretsku reakciju te oksidaciju aromatskih bočnih ogranaka. Biuretska reakcija temelji se na redukciji bakra u reakciji s peptidnom vezom u lužnatim uvjetima. Mehanizam reakcije u kojoj dolazi do oksidacije aromatskih bočnih ogranaka je nepoznat, ali pri tome se reducira fenolni reagens. Kao standard upotrijebljen je albumin goveđeg seruma (engl. Bovine serum albumin, BSA) u koncentracijama od 6 mg/mL prema manjim koncentracijama (6; 3; 1,5; 1; 0,6; 0,3; 0,15; 0,1 i 0 mg/mL). Iz standardne krivulje ovisnosti apsorbancije i koncentracije BSA određen je nagib pravca. Preko nagiba pravca izračunata je koncentracija proteina u uzorcima prema sljedećoj formuli:

$$C = \frac{A(\text{uzorka}) - b(\text{st.krivulje})}{\text{nagib pravca st.krivulje}} \times \text{razrijeđenje}$$

Koncentracija proteina izražena je kao mg/mL.

Proteini su određeni jer je aktivnost enzima ili koncentracija mjerenih spojeva izražena po mg proteina u krvi, tkivu jetre, bubrega, slezene ili mozga.

Mjerenje količine lipidne peroksidacije / malondialdehida (MDA)

Količina lipidne peroksidacije u homogenatu tkiva jetre, bubrega, slezene i testisa te eritrocitima određivana je modificiranom metodom koju su opisali Ohkawa *i sur* [262]. Metodom se mjeri koncentracija malondialdehida (MDA), jednog od glavnih produkata lipidne peroksidacije. Temelji se na reakciji MDA s tiobarbiturnom kiselinom i pri čemu se stvara kromogen koji je moguće mjeriti spektrofotometrijski.

U eppendorf-epruvetu je dodano 100 μL 8,1%-tni SDS, 750 μL 20%-tne octene kiseline (pH=3,5), 750 μL 0,8%-tne TBA i 100 μL homogenog uzorka. Otopina je zatim stavljena u vodenu kupelj na 100 °C na 60 minuta. Nakon toga je naglo ohlađena na ledu i zatim centrifugirana 15 min/5000 okretaja/min pri temperaturi 4–6 °C. Supernatant je odvojen i izmjerena je apsorbancija pri 532 nm. Putem Beer-Lambertovog zakona izračunata je ukupna koncentracija MDA, izražena kao nmol MDA po mg proteina.

Mjerenje enzimatske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)

Aktivnost SOD određena je prema metodi po Flohé i Ötting [263]. Metoda je posredna i temelji se na inhibiciji redukcije citokroma c u sustavu ksantin/ksantin oksidaza.

U ovoj metodi korištene su dvije slijepa probe. Prva slijepa proba sastojala se samo od reakcijske otopine radnog reagensa te je apsorbancija u spektrofotometru mjerena na 550 nm tijekom 3 min. Druga slijepa proba služila je za namještanje aktivnosti ksantin oksidaze. U eppendorf epruvetu je stavljeno 1,45 mL otopine radnog reagensa, mješavine citokroma C i Xantina. U ovaj radni reagens dodano je 15-30 μL otopine enzima ksantin oksidaze (XOD) (Stock 0,8 U/mL, 40 μL Stock XOD + 960 μL dH₂O) sa 25 μL dH₂O pri mjerenju druge slijepa probe ili sa dodatkom 25 μL uzorka homogenata tkiva. Odmah nakon dodavanja enzima i brzog miješanja reakcijska smjesa prelivena je u kivetu i mjerena je promjena apsorbancije, odnosno aktivnost enzima ksantin oksidaze tijekom 3 min na 550 nm. Aktivnost ksantin oksidaze mora biti oko 0,025 U/min. Nakon što se postigla

optimalna aktivnost SOD u slijepoj probi ($\Delta A = 0.025$), analizirani su uzorci tkiva. U svaku reakcijsku smjesu umjesto dH_2O dodano je $25 \mu\text{L}$ uzorka te odgovarajući volumen ksantin oksidaze i odmah nakon toga mjerena je apsorbancija u spektrofotometru na isti način. Enzimaska aktivnost mjerena je kao postotak inhibicije aktivnosti ksantin oksidaze koja se računa prema formuli:

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

Enzimaska aktivnost superoksid dismutaze (SOD) računa se prema formuli:

$$Aktivnost\ SOD = 10 \exp^{((\%inhibicijeXOD+12,757)/30,932)}.$$

Aktivnost SOD izražena je kao U/mg proteina jetre, bubrega i testisa.

Mjerenje koncentracije ukupnog glutationa (GSH)

Koncentracija ukupnog glutationa u jetri, bubregu, slezeni i testisu miševa određena je prema modificiranoj metodi koju je opisao Tietze [264]. Metoda se temelji na reakciji tiolnog reagensa 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoične kiseline (DTNB, Ellmanov reagens) s GSH pri čemu se stvara kromofor 5-tionitrobenzoična kiselina (TNB) koja se fotometrijski očitava na 412 nm. Osim TNB, stvara se i GS-TNB koji se reducira pomoću GSH reduktaze i NADPH pri čemu se otpušta druga molekula TNB i reciklira GSH. Brzina nastanka TNB proporcionalna je recirkulirajućoj reakciji koja je proporcionalna koncentraciji glutationa u uzorku. Pri ovoj metodi sav oksidirani GSH (disulfid GSSG) prisutan u reakcijskoj smjesi ili nastao iz miješanog disulfida GSH s GS-TNB brzo se reducira do GSH. Konačan rezultat koji se dobije odgovara ukupnoj koncentraciji reduciranog i oksidiranog GSH u uzorku.

Koncentracija ukupnog GSH mjeri se u mikrotitarskoj pločici. U jednu jažicu dodano je 20 μL uzorka, 40 μL 0,035 M HCl i 40 μL 10 mM DTNB te izmjerena apsorbancija na valnoj duljini od 415 nm. Zatim je dodano 100 μL otopine glutation reduktaze i NADPH te izmjerena apsorbancija tijekom 5 min. Kao slijepa proba korišten je PBS u reakcijskoj smjesi. Za standard korištene su koncentracije reduciranog GSH (5-100 μM). Nacrtani su pravci za sve standarde kao promjena apsorbancije u vremenu. Očitani su nagibi pravaca, nacrtan je pravac kao ovisnost nagiba pravca o koncentraciji GSH. Konačno, taj dobiveni pravac korišten je za dobivanje koncentracije ukupnog GSH u uzorku prema formuli proizvođača. Koncentracija ukupnog GSH prikazana je kao $\mu\text{mol/mg}$ proteina tkiva za organe.

2.3.4. Određivanje spolnih hormona

Spolni hormoni, Testosteron i Estradiol (E2) mjereni su u serumu pokusnih životinja metodom imunoenzimatskog ili ELISA testa (engl. *Enzyme – Linked Immuno Sorbent Assay*). ELISA se može definirati kao test velike osjetljivosti i selektivnosti koji se koristi za otkrivanje i kvantificiranje peptida, proteina, protutjela i hormona. Standardno se provodi na mikrotitarskim pločama s oko 96 (12x8) jažica. Temelji se na reakciji vezanja antigena i antitjela, pri čemu je kao marker za detekciju dodan enzim koji katalizira supstrat u obojeni produkt koji se mjeri spektrofotometrijski [265].

Kod određivanja hormona, Testosterona i E2 korišteni su komercijalno dostupni ELISA testovi oznake Calbiotech Mouse/Rat Testosterone (Cat#TE187S-100) i Calbiotech Mouse/Rat Estradiol (E2) ELISA Kit (cat. No.ES180S-100). Testovi su namjenjeni za kvantitativno određivanje hormona u serumu i plazmi miša bazirani na načelu kompetativnog vezanja između hormona i konjugata.

Kod određivanja Testosterona kao konjugat se koristio Testosterone-HRP (HRP, engl. *Enzyme Horseradish Peroxidase*). Tijekom inkubacije koja se odvijala na sobnoj temperaturi u vremenu od 60 minuta u svaku jažicu koja je premazana sa specifičnim Testosteron antitjelima dodano je 25 μl standarda Testosterona, kontrola, uzorak, 100 μl Testosteron-HRP konjugiranog reagensa i 50 μl zečjeg

anti-testosteron reagensa. Tijekom inkubacije, fiksna količina HRP-obilježenog Testosterona natječe se s endogenim Testosteronom u serumu standardnog uzorka ili seruma kontrole za fiksni broj veznih mjesta specifičnog Testosteron antitijela. Nakon inkubacije jažice se ispiru 3 puta sa puferom nakon čega se dodala otopina TMB Reagensa i inkubiralo se na sobnoj temperaturi 15 minuta. Reakcija se zaustavila dodavanjem 50 μ L *Stop Solution* otopine u svaku jažicu. Nakon blagog mješanja od 30 sekundi važno je osigurati da se sva plava boja potpuno promijeni u žutu. Apsorbancija se mjeri spektrofotometrijski na 450 nm i kod uzorka i kod kontrole uzima se srednja vrijednost apsorbance (A_{450}), a koncentracija testosterona očitava se iz standardne krivulje konstruirane iz srednjih apsorbanci za svaku koncentraciju referentnih standarda [266].

Određivanje koncentracije Estradiola (E2) odvija se na principu kompetitivnog vezanja između E2 u testnim peptidima i konjugata E2 enzima za fiksnu količinu anti-estradiol poliklonskog protutijela. U inkubaciji se protutijela E2 kojima su fiksirane jažice inhibiraju sa standardima E2, kontrolom, uzorkom i E25 enzim konjugatom na sobnoj temperaturi 120 minuta. Tijekom inkubacije fiksna količina HRP-obilježenog E2 natječe se s endogenim E2 u standardnom uzorku ili serumu kontrole za fiksne vezne stranice specifičnog E2 protutijela. E2 peroksidazni konjugat imunološki povezan s jažicama progresivno se smanjuje kako se koncentracija E2 u uzorku povećava. Zatim se nepovezani E2 peroksidazni konjugat ukloni ispiranjem jažice. Nakon toga se doda otopina TMB reagensa i inkubira se na sobnoj temperaturi 15 minuta pri čemu se razvija plava boja otopine. Razvijanje boje zaustavlja se dodatkom *Stop Solution* otopine. Apsorbancija se mjeri i izračunava po istom principu kao i kod Testosterona.



Slika 25. Elisa testovi za analizu hormona



Slika 26. Elisa Microplates, MRC SI

2.3.5. Histopatološke analize

Nakon izolacije jetre, bubrega, slezene i testisa uslijedila je patohistološka obrada materijala. Obrada uključuje fiksaciju resekcijskog materijala u 10% formalinu 24 sata, inkubaciju u nizu alkohola, uklapanje tkiva u parafin, rezanje tkiva u rezove debljine 6-12 μm i bojenje hemalaun-eozinom. Preparati su pregledani svjetlosnim mikroskopom Olympus BX5.

2.4. Statistička obrada podataka

Podaci su prikazani tablično i grafički. Opisna statistika je prikazana kroz odgovarajuće udjele i apsolutne frekvencije za kategorijske varijable, dok su se kontinuirane vrijednosti prikazale kroz pripadajuće medijane i interkvartilne rasponne. Korelacije pojedinih varijabli prikazane su Spearmanovim koeficijentima korelacije. Pri analizi korelacijskih koeficijenata za jake korelacije uzeta je apsolutna vrijednost koeficijenta $> 0,600$, za srednje jake $0,300 - 0,600$, a za slabe $< 0,300$. Razlike pojedinih skupina u odnosu na kontrolnu skupinu analizirane su Mann-Whitney U testom.

Kako bi se odredilo grupiranje određenih varijabli u klastere (nakupine) primjenile su se metode hijerarhijske aglomerativne klaster analize po principu da se svaki objekt, koji je prethodno binariziran ($0=Ne$ i $1=Da$) tretira na prvom koraku kao zaseban klaster, a zatim se udružuju dva najbliža objekta u prvi klaster. U trećem koraku ili se tom klasteru dodaje neki pojedini objekt ili se dva pojedina objekta povezuju u drugi klaster. Pri svakom sljedećem koraku ili se pojedini objekti kombiniraju u nove klastere ili se već postojeći klasteri međusobno povezuju. Jednom formirani klaster se više ne dijeli, već se samo može povezivati s drugim klasterima. Kao mjera udaljenosti korištena je kvadrirana euklidska udaljenost (*squared euclidean distance*) u kojoj se udaljenost dva objekta određuje kao suma kvadriranih razlika vrijednosti za svaku varijablu.

Kao mjera povezanosti između pojedinih objekata u klaster analizi korištena je metoda najdaljeg susjeda, odnosno potpunog povezivanja (*complete linkage* - "*furthest neighbour*"). Kod ove metode udaljenost između dva klastera računa se na osnovu udaljenosti između dva najudaljenija člana.

U analizi je korištena programska podrška IBM SPSS Statistics verzija 21.0 (www.spss.com), a sve p-vrijednosti manje od 0,05 su smatrane značajnima.

3. REZULTATI

3.1. Rezultati kemijskih analiza organskih i anorganskih tvari u istraživanim proizvodima

3.1.1. Rezultati analize farmakološki aktivne tvari (sildenafil)

U Tablici 8. prikazani su rezultati analize na prisutnost sildenafil u dodacima prehrani kojima su tretirane životinje u ovom istraživanju. Od 7 analiziranih proizvoda sildenafil je utvrđen (mg/kg) u proizvodu 1 (Pr.1) i proizvodu 3 (Pr.3), zbog čega se ti proizvodi smatraju zdravstveno neispravnim ili nesukladnim jer je sildenafil farmakološka tvar koja je zbranjena za proizvode koji nisu kategorizirani kao lijek. Kao pozitivna kontrola korištena je Viagra® čija jedna tableta sadrži 100 mg sildenafil u obliku sildenafilcitrata.

U ostalim proizvodima sildenafil nije pronađen.

Tablica 8. Koncentracija sildenafil utvrđena u proizvodima kojima su tretirane životinje

Red.br.	Farmakološka tvar mg/kg	Dodaci prehrani za muškarce				Dodaci prehrani za žene		
		Pr. 1	Pr. 2	Pr. 3	Pr. 4	Pr. 7	Pr. 8	Pr. 9
1.	Sildenafil	669,4	n.d.	4628,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. – nije detektirano

PKSil (Viagra, 100 mg/tableti sildenafil ili $6,2 \times 10^{-5}$ mg/kg)

3.1.2. Rezultati analize ostataka pesticida

Tablica 9. prikazuje koncentraciju utvrđenih ostataka pesticida (mg/kg), u dodacima prehrani kojima su tretirane pokusne životinje.

Utvrđeno je 5 pesticida ili 6.4% od ukupno 78 analiziranih pesticida. U proizvodu 2 (Pr.2) i proizvodu 9 (Pr.9) utvrđeni su bioaletrin, ciflutrin-beta izomer 3, i miklobutanil. U proizvodu 3 (Pr.3) utvrđeni su cipermetrin izomer 2 i 3. Utvrđene koncentracije za cipermetrin, ciflutrin i miklobutanil i nakon korekcije za mjernu nesigurnost metode (MN*) znatno su veće u odnosu na maksimalno dozvoljene razine ostataka pesticida (MRO*) za biljke propisane Uredbom o MRO pesticida [245].

Popis svih analiziranih pesticida priložen je u Prilogu 1.

Tablica 9. Koncentracije utvrđenih pesticida u istraživanim proizvodima kojima su tretirane životinje

Red. br.	Pesticidi mg/kg	MRO mg/kg	Dodaci prehrani za muškarce				Dodaci prehrani za žene			Viagra	Hormon
			Pr. 1	Pr. 2	Pr. 3	Pr. 4	Pr. 7	Pr. 8	Pr. 9	Pr. 1	Pr. 2
1.	Bioaletrin	-	n.d.	0,02	n.d.	n.d.	1.	Bioaletrin	-	n.d.	0,02
2.	Ciflutrin-beta izomer 3	0,1	n.d.	0,67	n.d.	n.d.	2.	Ciflutrin-beta izomer 3	0,1	n.d.	0,67
3.	Cipermetrin izomer 2	0,1	n.d.	n.d.	10,43	n.d.	3.	Cipermetrin izomer 2	0,1	n.d.	n.d.
4.	Cipermetrin izomer 3		n.d.	n.d.	5,8	n.d.	4.	Cipermetrin izomer 3	n.d.	n.d.	n.d.
5.	Miklobutanil	0,05	n.d.	0,06	n.d.	n.d.	5.	Miklobutanil	0,05	n.d.	0,06

n.d. – nije detektirano

Ganice kvantifikacije (LOQ, engl. *Limit of quantification*), LOQ = 0,01 mg/kg

MRO-maksimalno dozvoljena razina ostataka pesticida

*MN za: Bioalletrin ($\pm 0,003$ mg/kg), Ciflutrin-beta 3 ($\pm 0,31$ mg/kg), Cipermetrin 2 ($\pm 3,5$ mg/kg), Cipermetrin 3 ($\pm 2,4$ mg/kg), Miklobutanil ($\pm 0,003$ mg/kg)

3.1.3. Rezultati analize teških metala

Tablica 10 . prikazuje koncentracije metala (olovo, kadmij, arsen i živa) u mg/kg u proizvodima kojima su tretirane životinje.

U svim testiranim proizvodima osim u hormonu gonadotropinu (PKGon) pronađeno je olovo u rasponu koncentracije od 0,55 – 2,33 mg/kg što je niže od najveće dopuštene količine (NDK) olova u toj vrsti proizvoda [15].

U proizvodima 4 i 8 pronađen je kadmij u rasponu koncentracije od 0,05 – 0,06 mg/kg. Koncentracije kadmija također su bile niže od NDK. U proizvodu 3 pronađen je arsen u koncentraciji od 0,24 mg/kg, ali on nije reguliran Uredbom o kontaminantima [15], a obzirom da spada u metale koji se često pronalaze u hrani analiziran je kao informativni pokazatelj. Živa nije pronađena ni u jednom testiranom proizvodu.

Tablica 10. Koncentracije utvrđenih metala u istraživanim proizvodima kojima su tretirane životinje

Red. br.	Teški metali mg/kg	NDK mg/kg	Dodaci prehrani za muškarce				Dodaci prehrani za žene			Viagra	Hormon
			Pr. 1	Pr. 2	Pr. 3	Pr. 4	Pr. 7	Pr. 8	Pr. 9	PKSil	PKGon
1.	Olovo (Pb)	3	0,55	0,55	0,86	2,33	1,14	0,8	0,55	1,58	n.d.
2.	Kadmij (Cd)	1	n.d.	n.d.	n.d.	0,05	n.d.	0,06	n.d.	n.d.	n.d.
3.	Arsen (As)	-	n.d.	n.d.	0,24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4.	Živa (Hg)	0,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. – nije detektirano

Ganice kvantifikacije (LOQ, engl. *Limit of quantification*); LOQ (mg/kg): Pb = 0,01; Cd = 0,05; As = 0,2; Hg = 0,05.

NDK- najveća dopuštena količina tvari

3.1.4. Rezultati analize organskih otapala

Biljni dodaci prehrani koji su istraživani u ovoj studiji analizirani su preglednom analizom plinske kromatografije i masene spektroskopije gdje se prema spektru masa radila usporedba identificiranih sastojaka nepoznatih s poznatim spektrima iz baze podataka ($SI \geq 80$). Cilj ove analize bio je provjeriti da li postoje zaostale organske tvari koje su posljedica korištenja organskih otapala kod ekstrakcije biljaka. Obzirom da su organska otapala poput metanola, n-hexana i acetona toksična njihova primjena je zabranjena ali je jako korisna za proizvođače zbog dobre efikasnosti ekstrakcije aktivnih tvari. Ove vrste otapala najčešće se primjenjuju kod ekstrakata koji služe kao međuproizvod za suhi ekstrakt (kapsulirani oblici). Dobiveni rezultati (Prilog, Slika 76.) ukazuju da u istraživanim proizvodima nisu pronađene komponente koje bi se mogle povezati s organskim otapalima. Uglavnom su bile prisutne komponente koje su dio biljne strukture: polifenolne tvari, mirisi, kumarani, kafeini, furfurali i razne alkaloidne tvari.

3.2. Rezultati toksikološke analize *in vivo*

3.2.1. Prirast životinja nakon pokusnog razdoblja

Tablice 11. i 13. prikazuju ukupni prirast (g) tjelesne mase mužjaka i ženki kontrolne skupine (K) i skupina životinja izloženih proizvodima 1-4 za mužjake (1-4M) i proizvodima 7-9 za ženke (7-9Ž) i PKSil i PKGon tijekom 28 dana.

Tablice 12. i 14. prikazuju statističke p vrijednosti i razlike u prirastu životinja između pokusnih skupina (kontrolnih skupina i skupina izloženih testiranim proizvodima). Negativne vrijednosti znače da je tijekom pokusa dolazilo do opadanja mase životinja.

Grafički prikaz odnosa prirasta kod muških i ženskih pokusnih skupina u odnosu na njihove kontrolne skupine prikazani su na Slikama 27. i 28.

Rezultati statističkog testiranja u mužjaka (Tablica 12.), ukazuju da na kraju pokusnog razdoblja nije došlo do statistički značajnog odstupanja u težini pokusnih životinja.

Rezultati statističkog testiranja u ženki (Tablica 14.), ukazuju da na kraju pokusnog razdoblja nije došlo do statistički značajnog odstupanja u težini pokusnih životinja, osim u skupini tretiranoj proizvodom 9 u kojoj su životinje na kraju pokusa bile teže ($p \leq 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu.

Tablica 11. Prirast muških jedinki (g) nakon pokusnog razdoblja izloženih proizvodima 1-4 i pripadajućim kontrolama.

MUŽJACI	N	Aritmetička sredina	SD	Medijan	25. centila	75. centila
Kontrola	5	0,07	1,32	0,30	-0,99	0,97
Prirast (g)						
Proizvod 1	6	-0,14	1,03	-0,23	-0,81	0,65
Proizvod 2	6	-0,70	1,24	-0,54	-2,03	0,41
Proizvod 3	6	-0,38	0,54	-0,47	-0,72	0,09
Proizvod 4	6	-0,17	0,57	-0,44	-0,55	0,21
Sildenafil	6	0,64	3,10	0,51	-0,04	2,74
Gonadotropin	6	-1,08	1,02	-0,93	-1,64	-0,48

Tablica 12. Statističko testiranje razlika prirasta (g) muških jedinki izloženih proizvodima 1-4 i pripadajućim kontrolama.

Prirast (g)						
Proizvod 1	Kontrola	Pr. 2	Pr. 3	Pr. 4	Sildenafil	Gonadotropin
p vrijednost	0,855	0,631	0,873	0,749	0,423	0,150
Proizvod 2	Kontrola	Pr. 1	Pr. 3	Pr. 4	Sildenafil	Gonadotropin
p vrijednost	0,361	0,631	0,873	0,522	0,200	0,423
Proizvod 3	Kontrola	Pr. 1	Pr. 2	Pr. 4	Sildenafil	Gonadotropin
p vrijednost	0,584	0,873	0,873	0,522	0,109	0,200
Proizvod 4	Kontrola	Pr. 1	Pr. 2	Pr. 3	Sildenafil	Gonadotropin
p vrijednost	0,715	0,749	0,522	0,522	0,200	0,109
Sildenafil	Kontrola	Pr. 1	Pr. 2	Pr. 3	Pr. 4	Gonadotropin
p vrijednost	0,584	0,423	0,200	0,109	0,200	0,078
Gonadotropin	Kontrola	Pr. 1	Pr. 2	Pr. 3	Pr. 4	Sildenafil
p vrijednost	0,144	0,150	0,423	0,200	0,109	0,078

Prikazane p vrijednosti dobivene su usporedbom pojedinih proizvoda Mann-Whitney U testom, a sve $p < 0,05$ smatrane su značajnima.

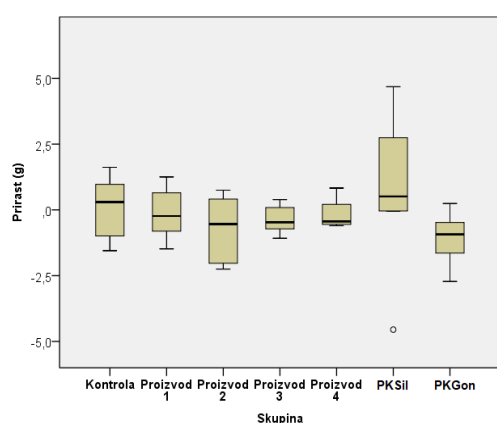
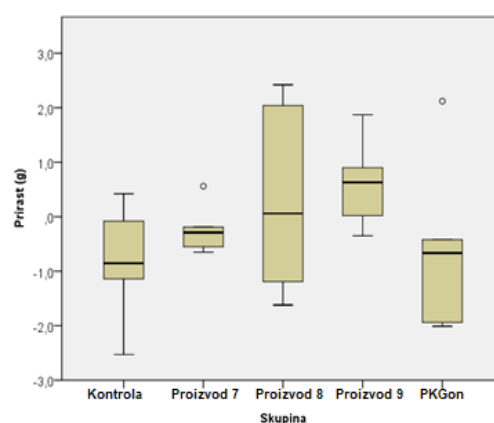
Tablica 13. Prirast ženskih jedinki (g) nakon pokusnog razdoblja izloženih proizvodima 7-9 i pripadajućim kontrolama.

ŽENKE	N	Aritmetička sredina	SD	Medijan	25. centila	75. centila	
Prirast (g)	Kontrola	6	-0,84	1,01	-0,86	-1,14	-0,08
	Proizvod 7	6	-0,24	0,43	-0,29	-0,55	-0,19
	Proizvod 8	6	0,30	1,65	0,06	-1,19	2,04
	Proizvod 9	5	0,61	0,86	0,63	0,02	0,90
	Gonadotropin	6	-0,60	1,50	-0,66	-1,94	-0,42

Tablica 14. Statističko testiranje razlika prirasta (g) ženskih jedinki izloženih proizvodima 7-9 i pripadajućim kontrolama.

Prirast (g)				
Proizvod 7	Kontrola	Pr. 8	Pr. 9	Gonadotropin
p vrijednost	0,361	0,078	0,855	0,749
Proizvod 8	Kontrola	Pr. 7	Pr. 9	Gonadotropin
p vrijednost	0,423	0,078	0,715	0,262
Proizvod 9	Kontrola	Pr. 7	Pr. 8	Gonadotropin
p vrijednost	0,028	0,855	0,715	0,068
Gonadotropin	Kontrola	Pr. 7	Pr. 8	Pr. 9
p vrijednost	0,749	0,749	0,262	0,068

Prikazane p vrijednosti dobivene su usporedbom pojedinih proizvoda Mann-Whitney U testom, a sve $p < 0,05$ smatrane su značajnima.

**Slika 27.** Prikaz prirasta (g) muških jedinki obzirom na vrstu korištenih proizvoda**Slika 28.** Prikaz prirasta (g) ženskih jedinki obzirom na vrstu korištenih proizvoda

3.2.2. Organosomatski indeks pojedinih organa životinja nakon pokusnog razdoblja

Tablice 15. i 17. prikazuju vrijednosti u težini pojedinih organa, izraženih u obliku organosomatskog indeksa (OSI, engl. *Organo-somatic index*) u mužjaka i ženki K i skupina životinja izloženih proizvodima 1-4M i 7-9Ž te PKSil i PKGon, tijekom 28 dana.

Tablice 16. i 18. prikazuju statističke p vrijednosti i razlike između OSI životinja pojedinih pokusnih skupina (kontrolnih skupina i skupina izloženih testiranim proizvodima).

Grafički prikaz raspona OSI unutar muških i ženskih pokusnih skupina prikazani su na Slikama 29, 30, 31, 32, 33,34,35 i 36.

Rezultati statističkog testiranja u mužjaka (Tablica 16.), ukazuju da je na kraju pokusnog razdoblja došlo do statistički značajnog ($p < 0,05$) povećanja organosomatskog indeksa jetre (HSI, engl. *Hepato Somatic Index*) kod skupine tretirane proizvodom 1 u odnosu na K, skupine tretirane proizvodima 3 i 4 i PKSil.

Do statistički značajnog ($p < 0,05$) smanjenja organosomatskog indeksa bubrega (KSI, engl. *Kidney Somatic Index*) u mužjaka došlo je između skupine tretirane proizvodom 3 u odnosu na PKGon.

Do statistički značajnog odstupanja kod organosomatskog indeksa slezene (SSI, engl. *Spleen somatic index*) nije došlo ni kod jedne tretirane muške skupine.

Statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje organosomatskog indeksa testisa (TSI, engl. *Testicular Somatic Index*) u mužjaka nastalo je kod skupine tretirane proizvodom 3 u odnosu na K i skupine tretirane proizvodima 2 i 4. Statistički značajno smanjenje ($p < 0,05$) kod TSI nastalo je između skupine tretirane proizvodom 2 u odnosu na skupinu tretiranu proizvodom 3 i PKGon.

Kod ostalih proizvoda unutar tretiranih muških skupina nije došlo do statistički značajnog odstupanja organosomatskog indeksa.

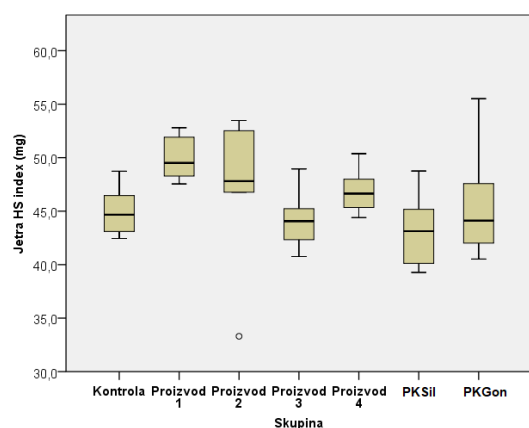
Tablica 15. Organosomatski indeks u muških jedinki nakon pokusnog razdoblja izloženih proizvodima 1-4 i pripadajućim kontrolama.

MUŽJACI		N	Aritmetička sredina	SD	Medijan	25. centila	75. centila
Organosomatski indeks jetre (mg)	Kontrola	5	45,08	2,56	44,67	43,10	46,46
	Proizvod 1	6	49,93	2,06	49,51	48,28	51,92
	Proizvod 2	6	46,95	7,23	47,81	46,77	52,52
	Proizvod 3	6	44,23	2,88	44,07	42,34	45,23
	Proizvod 4	6	46,90	2,13	46,64	45,35	47,99
	Sildenafil	6	43,26	3,60	43,13	40,12	45,17
	Gonadotropin	6	45,64	5,40	44,12	42,01	47,58
Organosomatski indeks bubrega (mg)	Kontrola	5	6,96	0,28	6,88	6,75	7,00
	Proizvod 1	6	7,12	0,40	7,08	6,84	7,56
	Proizvod 2	6	7,12	0,26	7,16	6,89	7,34
	Proizvod 3	6	6,73	0,48	6,84	6,20	7,08
	Proizvod 4	6	7,39	0,48	7,43	6,90	7,66
	Sildenafil	6	7,00	0,33	6,99	6,94	7,05
	Gonadotropin	6	7,45	0,60	7,55	7,15	7,82
Organosomatski indeks slezene (mg)	Kontrola	5	5,22	0,56	5,32	4,77	5,51
	Proizvod 1	6	4,75	0,50	4,61	4,50	5,09
	Proizvod 2	6	5,91	1,20	6,02	5,16	7,04
	Proizvod 3	6	4,64	0,85	4,77	4,07	5,39
	Proizvod 4	6	5,08	0,31	5,03	4,94	5,38
	Sildenafil	6	5,28	1,17	4,81	4,67	5,11
	Gonadotropin	6	4,81	0,59	4,63	4,56	5,23
Organosomatski indeks testisa (mg)	Kontrola	5	2,88	0,18	2,82	2,74	3,07
	Proizvod 1	6	3,54	1,48	2,96	2,86	3,61
	Proizvod 2	6	2,60	0,45	2,66	2,57	2,92
	Proizvod 3	6	3,30	0,32	3,31	3,19	3,51
	Proizvod 4	6	2,86	0,27	2,91	2,68	3,09
	Sildenafil	6	2,98	0,26	2,86	2,82	3,27
	Gonadotropin	6	3,27	0,44	3,36	2,83	3,46

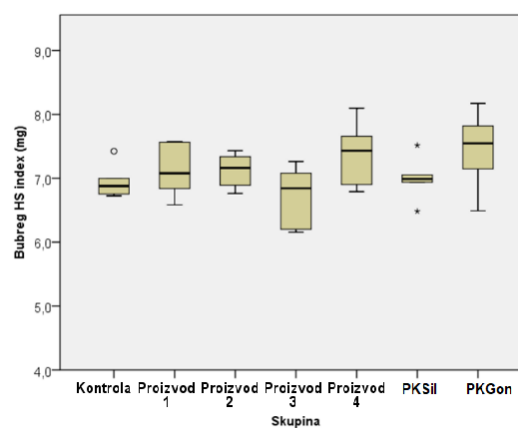
Tablica 16. Statističko testiranje razlika organosomatskog indeksa u muških jedinki izloženih proizvodima 1-4 i pripadajućim kontrolama.

Organosomatski indeks						
Proizvod 1	Kontrola	Pr. 2	Pr. 3	Pr. 4	Sildenafil	Gonadotropin
Jetra - p vrijednost	0,018	0,423	0,010	0,037	0,010	0,078
Bubreg - p vrijednost	0,465	1,000	0,262	0,423	0,631	0,262
Slezena - p vrijednost	0,144	0,078	0,749	0,262	0,337	0,631
Testis - p vrijednost	0,465	0,150	0,522	0,522	0,423	0,873
Proizvod 2	Kontrola	Pr. 1	Pr. 3	Pr. 4	Sildenafil	Gonadotropin
Jetra - p vrijednost	0,201	0,423	0,150	0,423	0,150	0,337
Bubreg - p vrijednost	0,201	1,000	0,109	0,200	0,522	0,262
Slezena - p vrijednost	0,273	0,078	0,109	0,109	0,262	0,150
Testis - p vrijednost	0,100	0,150	0,010	0,200	0,109	0,025
Proizvod 3	Kontrola	Pr. 1	Pr. 2	Pr. 4	Sildenafil	Gonadotropin
Jetra - p vrijednost	0,584	0,010	0,150	0,078	0,337	1,000
Bubreg - p vrijednost	0,584	0,262	0,109	0,055	0,749	0,037
Slezena - p vrijednost	0,201	0,749	0,109	0,522	0,631	0,873
Testis - p vrijednost	0,028	0,522	0,010	0,025	0,150	1,000
Proizvod 4	Kontrola	Pr. 1	Pr. 2	Pr. 3	Sildenafil	Gonadotropin
Jetra - p vrijednost	0,273	0,037	0,423	0,078	0,078	0,262
Bubreg - p vrijednost	0,068	0,423	0,200	0,055	0,337	0,749
Slezena - p vrijednost	0,715	0,262	0,109	0,522	0,631	0,262
Testis - p vrijednost	0,855	0,522	0,200	0,025	0,631	0,109
Sildenafil	Kontrola	Pr. 1	Pr. 2	Pr. 3	Pr. 4	Gonadotropin
Jetra - p vrijednost	0,465	0,010	0,150	0,337	0,078	0,522
Bubreg - p vrijednost	0,465	0,631	0,522	0,749	0,337	0,078
Slezena - p vrijednost	0,584	0,337	0,262	0,631	0,631	0,423
Testis - p vrijednost	0,361	0,423	0,109	0,150	0,631	0,262
Gonadotropin	Kontrola	Pr. 1	Pr. 2	Pr. 3	Pr. 4	Sildenafil
Jetra - p vrijednost	0,715	0,078	0,337	1,000	0,262	0,522
Bubreg - p vrijednost	0,144	0,262	0,262	0,037	0,749	0,078
Slezena - p vrijednost	0,201	0,631	0,150	0,873	0,262	0,423
Testis - p vrijednost	0,144	0,873	0,025	1,000	0,109	0,262

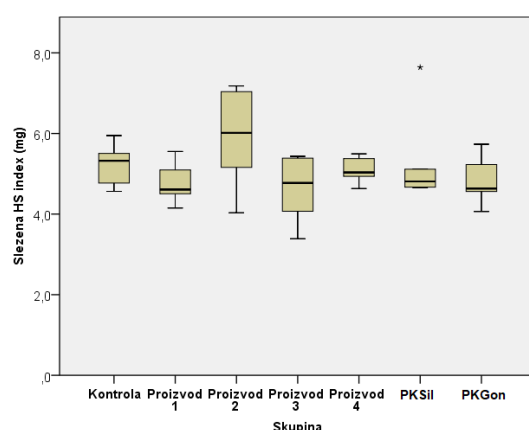
Prikazane p vrijednosti dobivene su usporedbom pojedinih proizvoda Mann-Whitney U testom, a sve $p < 0,05$ smatrane su značajnima.



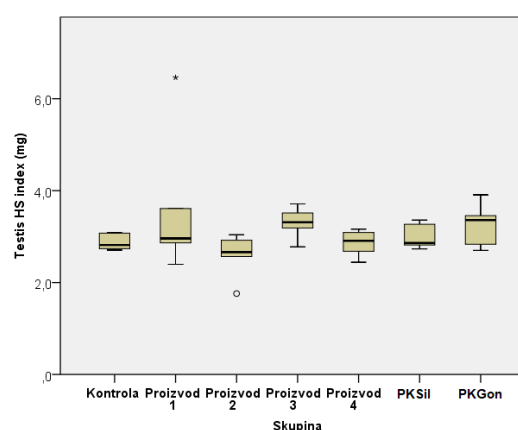
Slika 29. Prikaz HSI (mg) muških jedinki s obzirom na vrstu korištenih proizvoda



Slika 30. Prikaz KSI (mg) muških jedinki s obzirom na vrstu korištenih proizvoda



Slika 31. Prikaz SSI (mg) muških jedinki s obzirom na vrstu korištenih proizvoda



Slika 32. Prikaz TSI (mg) muških jedinki s obzirom na vrstu korištenih proizvoda

Rezultati statističkog testiranja u ženki (Tablica 18.) ukazuju da je na kraju pokusnog razdoblja došlo do statistički značajnog ($p < 0,05$) povećanja kod SSI kod skupine tretirane proizvodom 7 u odnosu na skupinu tretiranu proizvodom 9.

Kod ostalih proizvoda unutar tretiranih ženskih skupina nije došlo do statistički značajnog odstupanja organosomatskog indeksa.

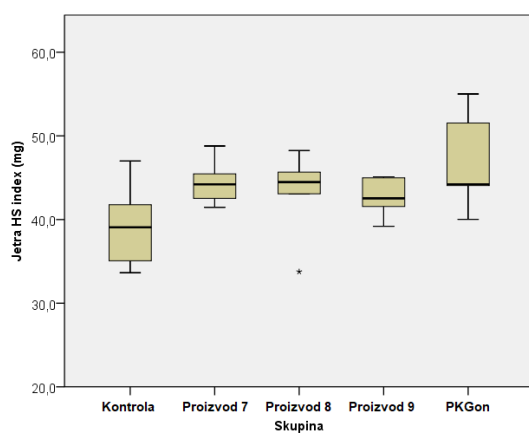
Tablica 17. Organosomatski indeks ženskih jedinki nakon pokusnog razdoblja izloženih proizvodima 7-9 i pripadajućim kontrolama.

ŽENKE		N	Aritmetička sredina	SD	Medijan	25. centila	75. centila
Organosomatski indeks jetre (mg)	Kontrola	6	39,32	5,37	39,07	35,08	41,77
	Proizvod 7	6	44,45	2,61	44,21	42,53	45,47
	Proizvod 8	6	43,28	5,00	44,47	43,08	45,66
	Proizvod 9	5	42,68	2,48	42,53	41,56	44,99
	Gonadotropin	6	46,52	5,59	44,23	44,07	51,54
Organosomatski indeks bubrega (mg)	Kontrola	6	5,95	0,88	5,83	5,36	6,71
	Proizvod 7	6	6,65	0,56	6,79	6,61	6,98
	Proizvod 8	6	6,50	0,70	6,57	5,91	7,17
	Proizvod 9	5	6,48	0,47	6,59	6,25	6,64
	Gonadotropin	6	6,62	0,68	6,63	6,09	7,04
Organosomatski indeks slezene (mg)	Kontrola	6	5,85	1,08	5,89	5,30	6,61
	Proizvod 7	6	7,05	1,19	6,82	6,35	7,79
	Proizvod 8	6	6,83	1,15	6,91	6,22	7,70
	Proizvod 9	5	6,05	0,40	6,24	5,91	6,34
	Gonadotropin	6	7,11	1,60	7,12	5,67	8,30
Organosomatski indeks Ovariji+Uterus (mg)	Kontrola	6	8,03	3,20	9,56	7,10	9,74
	Proizvod 7	6	9,55	2,42	10,15	7,32	11,05
	Proizvod 8	6	7,28	2,48	6,82	5,06	9,26
	Proizvod 9	5	9,95	3,83	9,10	7,32	13,69
	Gonadotropin	6	9,87	1,65	10,03	8,23	11,54

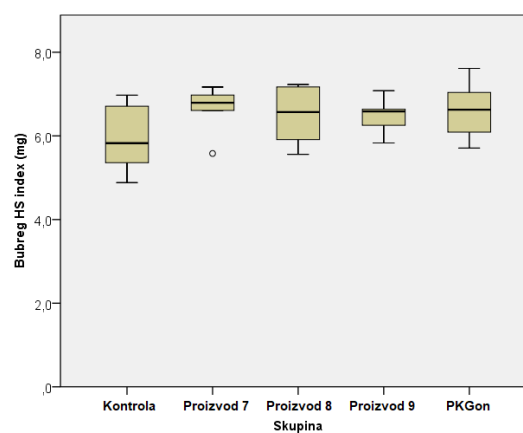
Tablica 18. Statističko testiranje razlika organosomatskog indeksa ženskih jedinki izloženih proizvodima 7-9 i pripadajućim kontrolama.

Organosomatski indeks (mg)				
Proizvod 7	Kontrola	Pr. 8	Pr. 9	Gonadotropin
Jetra - p vrijednost	0,100	0,873	0,273	0,631
Bubreg - p vrijednost	0,144	1,000	0,361	0,749
Slezena - p vrijednost	0,144	0,631	0,045	1,000
Ovariji+Uterus - p vrijednost	0,361	0,078	0,855	0,749
Proizvod 8	Kontrola	Pr. 7	Pr. 9	Gonadotropin
Jetra - p vrijednost	0,201	0,873	0,273	0,522
Bubreg - p vrijednost	0,201	1,000	0,855	0,873
Slezena - p vrijednost	0,201	0,631	0,361	0,631
Ovariji+Uterus - p vrijednost	0,584	0,078	0,273	0,078
Proizvod 9	Kontrola	Pr. 7	Pr. 8	Gonadotropin
Jetra - p vrijednost	0,251	0,273	0,273	0,361
Bubreg - p vrijednost	0,347	0,361	0,855	0,855
Slezena - p vrijednost	0,754	0,045	0,361	0,584
Ovariji+Uterus - p vrijednost	0,602	0,855	0,273	0,855
Gonadotropin	Kontrola	Pr. 7	Pr. 8	Pr. 9
Jetra - p vrijednost	0,068	0,631	0,522	0,361
Bubreg - p vrijednost	0,201	0,749	0,873	0,855
Slezena - p vrijednost	0,273	1,000	0,631	0,584
Ovariji+Uterus - p vrijednost	0,273	0,749	0,078	0,855

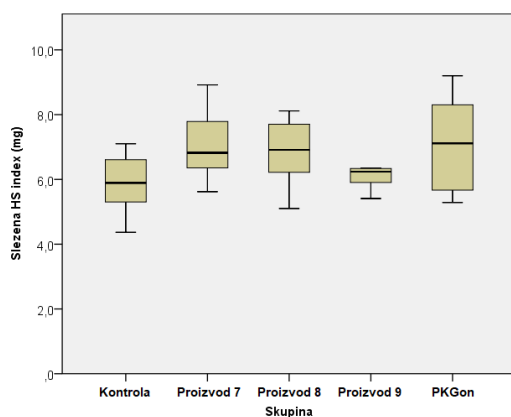
Prikazane p vrijednosti dobivene su usporedbom pojedinih proizvoda Mann-Whitney U testom, a sve $p < 0,05$ smatrane su značajnima.



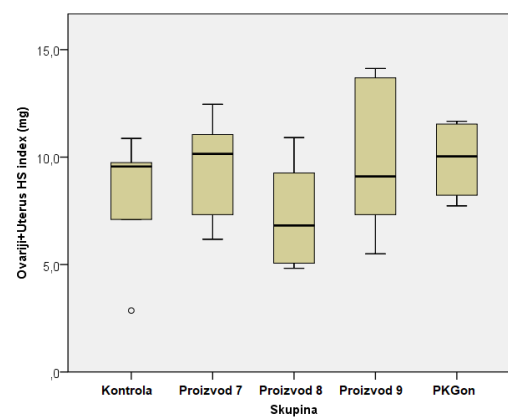
Slika 33. Prikaz HSI (mg) ženskih jedinki s obzirom na vrstu korištenih proizvoda



Slika 34. Prikaz KSI (mg) ženskih s obzirom na vrstu korištenih proizvoda



Slika 35. Prikaz SSI (mg) ženskih jedinki s obzirom na vrstu korištenih proizvoda



Slika 36. Prikaz OSI ovarij+uterus (mg) ženskih s obzirom na vrstu korištenih proizvoda

3.2.3. Koncentracije spolnih hormona u serumu životinja nakon pokusnog razdoblja

Tablice 19. i 21. prikazuju serumske koncentracije spolnih hormona u mužjaka i ženki K i skupina životinja izloženih proizvodima 1-4M i 7-9Ž te PKSil i PKGon, nakon 28 dana.

Tablice 20. i 22. prikazuju statističke p vrijednosti i razlike između serumskih koncentracija hormona životinja pojedinih pokusnih skupina (kontrolnih skupina i skupina izloženih testiranim proizvodima).

Rezultati statističkog testiranja u mužjaka (Tablica 20.), ukazuju da je na kraju pokusnog razdoblja došlo do povećanja testosterona i to najviše kod PKGon zatim kod skupina tretiranih proizvodom 1 i 2. Navedene skupine pokazuju statistički značajno ($p < 0,05$) odstupanje (povećanje) u odnosu na kontrolu. Statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenje testosterona primjećuje se i između skupina tretiranih proizvodima 3 i 4 u odnosu na skupine tretirane proizvodima 1 i 2 i PKGon.

Do statistički značajnog ($p < 0,05$) povećanja estradiola u mužjaka došlo je kod skupine tretirane proizvodom 2 u odnosu na skupinu tretiranu proizvodom 3.

Rezultati statističkog testiranja u ženki (Tablica 22.) ukazuju da na kraju pokusnog razdoblja nije došlo do statistički značajnog odstupanja kod serumskih koncentracija testosterona i estradiola.

Tablica 19. Koncentracija serumskih hormona muških jedinki nakon pokusnog razdoblja izloženih proizvodima 1-4 i pripadajućim kontrolama

MUŽJACI		N	Aritmetička sredina	SD	Medijan	25. centila	75. centila
ESTRADIOL (pg/ml)	Kontrola	5	3,61	4,95	0,91	0,63	4,63
	Proizvod 1	6	3,66	3,38	2,06	1,26	6,68
	Proizvod 2	6	10,75	6,80	8,37	5,20	18,00
	Proizvod 3	6	3,48	3,59	1,83	1,36	4,33
	Proizvod 4	6	4,66	6,15	1,47	0,95	6,76
	Sildenafil	6	4,59	7,50	1,36	1,28	1,38
	Gonadotropin	6	5,14	6,67	2,04	0,99	6,81
TESTOSTERON (pg/ml)	Kontrola	5	9,34	1,76	8,83	8,44	9,77
	Proizvod 1	6	13,27	2,14	13,29	12,51	14,39
	Proizvod 2	6	13,55	2,23	13,91	12,11	15,00
	Proizvod 3	6	10,42	1,59	9,99	9,28	11,36
	Proizvod 4	6	9,09	3,04	9,36	6,29	11,52
	Sildenafil	6	15,25	11,83	11,96	8,62	12,59
	Gonadotropin	6	16,68	8,63	13,98	10,94	17,95

Tablica 20. Statističko testiranje razlika koncentracija serumskih hormona u muških jedinki izloženih proizvodima 1-4 i pripadajućim kontrolama.

Hormonski status (pg/ml)						
Proizvod 1	Kontrola	Pr. 2	Pr. 3	Pr. 4	Sildenafil	Gonadotropin
Estradiol - p vrijednost	0,410	0,067	0,749	0,873	1,000	0,873
Testosteron – p vrijednost	0,011	0,670	0,025	0,016	0,273	0,423
Proizvod 2	Kontrola	Pr. 1	Pr. 3	Pr. 4	Sildenafil	Gonadotropin
Estradiol - p vrijednost	0,075	0,067	0,044	0,067	1,072	0,097
Testosteron – p vrijednost	0,027	0,670	0,042	0,055	0,327	0,831
Proizvod 3	Kontrola	Pr. 1	Pr. 2	Pr. 4	Sildenafil	Gonadotropin
Estradiol - p vrijednost	0,465	0,749	0,044	0,522	0,410	1,000
Testosteron – p vrijednost	0,273	0,025	0,042	0,631	0,855	0,037
Proizvod 4	Kontrola	Pr. 1	Pr. 2	Pr. 3	Sildenafil	Gonadotropin
Estradiol - p vrijednost	0,273	0,873	0,067	0,522	0,927	0,423
Testosteron – p vrijednost	0,715	0,016	0,055	0,631	0,201	0,055
Sildenafil	Kontrola	Pr. 1	Pr. 2	Pr. 3	Pr. 4	Gonadotropin
Estradiol - p vrijednost	0,347	1,000	0,072	0,410	0,927	0,522
Testosteron – p vrijednost	0,465	0,273	0,327	0,855	0,201	0,361
Gonadotropin	Kontrola	Pr. 1	Pr. 2	Pr. 3	Pr. 4	Sildenafil
Estradiol - p vrijednost	0,273	0,873	0,097	1,000	0,423	0,522
Testosteron – p vrijednost	0,018	0,423	0,831	0,037	0,055	0,361

Prikazane p vrijednosti dobivene su usporedbom pojedinih proizvoda Mann-Whitney U testom, a sve $p < 0,05$ smatrane su značajnima.

Tablica 21. Koncentracija serumskih hormona u ženskih jedinki nakon pokusnog razdoblja izloženih proizvodima 7-9 i pripadajućim kontrolama.

ŽENKE		N	Aritmetička sredina	SD	Medijan	25. centila	75. centila
TESTOSTERON (pg/ml)	Kontrola	6	0,97	0,26	1,00	0,87	1,08
	Proizvod 7	6	0,97	0,19	1,00	0,81	1,16
	Proizvod 8	6	0,90	0,28	0,99	0,56	1,07
	Proizvod 9	5	0,82	0,19	0,86	0,78	0,97
	Gonadotropin	6	0,96	0,15	0,95	0,84	1,10
ESTRADIOL (pg/ml)	Kontrola	6	10,67	2,38	9,86	9,46	12,30
	Proizvod 7	6	10,81	0,90	10,90	9,92	11,15
	Proizvod 8	6	10,98	1,75	10,66	9,69	11,70
	Proizvod 9	5	9,88	3,26	11,10	10,37	11,12
	Gonadotropin	6	12,02	2,86	11,96	10,63	14,94

Tablica 22. Statističko testiranje razlika koncentracija serumskih hormona u ženskih jedinki izloženihi proizvodima 7-9 i pripadajućim kontrolama.

Hormonski status (pg/ml)				
Proizvod 7	Kontrola	Pr. 8	Pr. 9	Gonadotropin
Testosteron (pg/ml) - p vrijednost	1,000	0,688	0,273	0,810
Estradiol (pg/ml) - p vrijednost	0,715	0,749	0,855	0,337
Proizvod 8	Kontrola	Pr. 7	Pr. 9	Gonadotropin
Testosteron (pg/ml) - p vrijednost	0,584	0,688	0,361	0,749
Estradiol (pg/ml) - p vrijednost	0,715	0,749	0,927	0,262
Proizvod 9	Kontrola	Pr. 7	Pr. 8	Gonadotropin
Testosteron – p vrijednost	0,175	0,273	0,361	0,234
Estradiol (pg/ml) - p vrijednost	0,917	0,855	0,927	0,273
Gonadotropin	Kontrola	Pr. 7	Pr. 8	Pr. 9
Testosteron (pg/ml) - p vrijednost	0,927	0,810	0,749	0,234
Estradiol (pg/ml) - p vrijednost	0,465	0,337	0,262	0,273

Prikazane p vrijednosti dobivene su usporedbom pojedinih proizvoda Mann-Whitney U testom, a sve $p < 0,05$ smatrane su značajnima.

3.2.4. Hematotoksični i imunotoksični potencijal istraživanih proizvoda

Broj eritrocita i hemoglobinski parametri u perifernoj krvi tretiranih životinja

Tablice 23. i 25. prikazuju vrijednosti hematoloških parametara u mužjaka i ženki K i skupina životinja izloženih proizvodima 1-4M i 7-9Ž te PKSil i PKGon, nakon 28 dana. Tablice 24. i 26. prikazuju statističke p vrijednosti i razlike između hematoloških parametara životinja pojedinih pokusnih skupina (kontrolne skupine i skupina ispitivanih proizvoda).

Rezultati statističkog testiranja u mužjaka (Tablica 24.), ukazuju da je na kraju pokusnog razdoblja uočljivo statistički značajno ($p < 0,05$) odstupanje kod svih tretiranih skupina u odnosu na K, izuzev skupine sa proizvodom 3. Broj eritrocita, koncentracija HGB i vrijednost hematokrita u tretiranih skupina značajno ($p < 0,05$) su povećani u odnosu na K. Skupina tretirana proizvodom 2 pokazuje značajno ($p < 0,05$) povećanje eritrocita, HGB i hematokrita u odnosu na skupinu tretiranu proizvodom 4 te značajno ($p < 0,05$) povećanje HGB i hematokrita u odnosu na skupinu tretiranu proizvodom 3.

Rezultati statističkog testiranja kod ženki (Tablica 26.) ukazuju na to da je na kraju pokusnog razdoblja došlo do statistički značajnog ($p < 0,05$) odstupanja, odnosno do smanjene koncentracije HGB u skupini tretiranoj proizvodom 8 u odnosu na K i skupine tretirane proizvodima 7 i 9. Skupina tretirana proizvodom 8 pokazuje značajno smanjenje ($p < 0,05$) broja eritrocita u odnosu na skupine tretirane proizvodima 7 i 9, a značajno smanjenje ($p < 0,05$) vrijednosti hematokrita u odnosu na skupinu tretiranu proizvodom 9.

Kod ostalih proizvoda unutar tretiranih muških i ženskih skupina nije došlo do statistički značajnog hematološkog statusa.

Tablica 23. Hematološki parametri u muških jedinki nakon pokusnog razdoblja izloženih proizvodima 1-4 i pripadajućim kontrolama.

MUŽJACI		N	Aritmetička sredina	SD	Medijan	25. centila	75. centila
Eritrociti (10E12/L)	Kontrola	5	7,85	3,56	8,53	8,50	9,97
	Proizvod 1	6	13,01	0,98	12,59	12,40	13,00
	Proizvod 2	6	14,16	0,73	14,16	14,16	14,78
	Proizvod 3	6	11,21	3,32	12,13	11,20	12,97
	Proizvod 4	6	11,91	2,05	12,53	11,43	13,13
	Sildenafil	6	13,22	2,34	12,93	11,30	14,37
	Gonadotropin	6	12,25	2,54	12,33	10,00	14,43
Hgb (g/L)	Kontrola	5	114,00	52,14	126,67	123,33	143,33
	Proizvod 1	6	193,78	12,44	190,00	188,89	196,67
	Proizvod 2	6	208,33	8,23	208,33	208,33	215,00
	Proizvod 3	6	162,00	46,70	170,00	166,67	183,33
	Proizvod 4	6	177,78	29,71	186,67	176,67	193,33
	Sildenafil	6	195,00	32,57	191,67	163,33	213,33
	Gonadotropin	6	179,44	35,55	180,00	150,00	206,67
Hematokrit	Kontrola	5	41,60	18,54	47,00	45,00	50,33
	Proizvod 1	6	70,24	5,27	68,33	68,22	72,00
	Proizvod 2	6	73,72	3,16	73,72	73,72	76,00
	Proizvod 3	6	58,47	15,46	63,33	61,00	65,00
	Proizvod 4	6	64,22	10,29	67,00	65,33	69,00
	Sildenafil	6	70,61	12,38	68,50	60,67	76,33
	Gonadotropin	6	63,78	15,13	62,50	51,33	74,67

Tablica 24. Statističko testiranje razlika hematoloških parametara u muških jedinki izloženosti proizvodima 1-4 i pripadajućim kontrolama.

Hematološki parametri						
Proizvod 1	Kontrola	Pr. 2	Pr. 3	Pr. 4	Sildenafil	Gonadotropin
Eritrociti (10E12/L) – p vrijednost	0,009	0,065	0,251	0,522	0,715	0,715
Hgb (g/L) – p vrijednost	0,009	0,065	0,117	0,410	0,854	0,584
Hematokrit – p vrijednost	0,009	0,269	0,076	0,522	0,715	0,361
Proizvod 2	Kontrola	Pr. 1	Pr. 3	Pr. 4	Sildenafil	Gonadotropin
Eritrociti (10E12/L) – p vrijednost	0,006	0,065	0,065	0,016	0,259	0,259
Hgb (g/L) – p vrijednost	0,006	0,065	0,010	0,008	0,258	0,090
Hematokrit – p vrijednost	0,006	0,269	0,010	0,016	0,374	0,197
Proizvod 3	Kontrola	Pr. 1	Pr. 2	Pr. 4	Sildenafil	Gonadotropin
Eritrociti (10E12/L) – p vrijednost	0,076	0,251	0,065	0,715	0,465	0,584
Hgb (g/L) – p vrijednost	0,076	0,117	0,010	0,410	0,464	0,714
Hematokrit – p vrijednost	0,076	0,076	0,010	0,201	0,361	0,715
Proizvod 4	Kontrola	Pr. 1	Pr. 2	Pr. 3	Sildenafil	Gonadotropin
Eritrociti (10E12/L) – p vrijednost	0,045	0,522	0,016	0,715	0,522	0,688
Hgb (g/L) – p vrijednost	0,045	0,410	0,008	0,410	0,574	0,810
Hematokrit – p vrijednost	0,045	0,522	0,016	0,201	0,575	1,000
Sildenafil	Kontrola	Pr. 1	Pr. 2	Pr. 3	Pr. 4	Gonadotropin
Eritrociti (10E12/L) – p vrijednost	0,006	0,715	0,259	0,465	0,522	0,631
Hgb (g/L) – p vrijednost	0,006	0,854	0,258	0,464	0,574	0,521
Hematokrit – p vrijednost	0,006	0,715	0,374	0,361	0,575	0,297
Gonadotropin	Kontrola	Pr. 1	Pr. 2	Pr. 3	Pr. 4	Sildenafil
Eritrociti (10E12/L) – p vrijednost	0,028	0,715	0,259	0,584	0,688	0,631
Hgb (g/L) – p vrijednost	0,028	0,584	0,090	0,714	0,810	0,521
Hematokrit – p vrijednost	0,045	0,361	0,197	0,715	0,297	1,000

Prikazane p vrijednosti dobivene su usporedbom pojedinih proizvoda Mann-Whitney U testom, a sve $p < 0,05$ smatrane su značajnima.

Tablica 25. Hematološki parametri u ženskih jedinki nakon pokusnog razdoblja izloženosti proizvodima 7-9 i pripadajućim kontrolama.

ŽENKE		N	Aritmetička sredina	SD	Medijan	25. centila	75. centila
Eritrociti (10E12/L)	Kontrola	6	9,46	1,39	9,93	7,80	9,97
	Proizvod 7	6	8,72	0,95	8,50	7,97	9,07
	Proizvod 8	6	7,43	1,12	7,67	6,90	7,90
	Proizvod 9	5	11,17	2,45	10,50	10,07	12,77
	Gonadotropin	6	8,46	1,53	8,55	7,37	9,55
Hgb (g/L)	Kontrola	6	135,00	15,17	140,00	116,67	143,33
	Proizvod 7	6	126,11	14,52	123,33	113,33	133,33
	Proizvod 8	6	108,89	13,28	111,67	103,33	113,33
	Proizvod 9	5	161,33	33,13	153,33	146,67	180,00
	Gonadotropin	6	121,67	23,49	121,67	105,00	138,33
Hematokrit	Kontrola	6	47,06	5,84	49,00	40,00	50,00
	Proizvod 7	6	45,44	4,40	45,17	41,67	49,00
	Proizvod 8	6	40,11	4,68	40,83	38,33	43,00
	Proizvod 9	5	57,67	11,75	55,33	52,67	61,33
	Gonadotropin	6	42,92	9,54	42,83	35,83	50,00

Tablica 26. Statističko testiranje razlika hematoloških parametara u ženskih jedinki izloženih proizvodima 7-9 i pripadajućim kontrolama.

Hematološki parametri				
Proizvod 7	Kontrola	Pr. 8	Pr. 9	Gonadotropin
Eritrociti (10E12/L) – p vrijednost	0,630	0,037	0,068	0,915
Hgb (g/L) – p vrijednost	0,195	0,034	0,044	0,830
Hematokrit – p vrijednost	0,809	0,078	0,028	0,522
Proizvod 8	Kontrola	Pr. 7	Pr. 9	Gonadotropin
Eritrociti (10E12/L) – p vrijednost	0,054	0,037	0,011	0,240
Hgb (g/L) – p vrijednost	0,010	0,034	0,010	0,238
Hematokrit – p vrijednost	0,108	0,078	0,011	0,748
Proizvod 9	Kontrola	Pr. 7	Pr. 8	Gonadotropin
Eritrociti (10E12/L) – p vrijednost	0,099	0,068	0,011	0,142
Hgb (g/L) – p vrijednost	0,081	0,044	0,010	0,086
Hematokrit – p vrijednost	0,067	0,028	0,011	0,086
Gonadotropin	Kontrola	Pr. 7	Pr. 8	Pr. 9
Eritrociti (10E12/L) – p vrijednost	0,520	0,915	0,240	0,142
Hgb (g/L) – p vrijednost	0,386	0,830	0,238	0,086
Hematokrit – p vrijednost	0,447	0,522	0,748	0,086

Prikazane p vrijednosti dobivene su usporedbom pojedinih proizvoda Mann-Whitney U testom, a sve $p < 0,05$ smatrane su značajnima.

Hematološki parametri u tretiranih životinja

Tablice 27. i 29. prikazuju vrijednosti eritrocitnih hematoloških parametara u mužjaka i ženki K i skupina životinja izloženih proizvodima 1-4M i 7-9Ž te PKSil i PKGon, nakon 28 dana.

Tablice 28. i 30. prikazuju statističke p vrijednosti i razlike između eritrocitnih hematoloških parametara životinja pojedinih pokusnih skupina (Kontrolne skupine i skupina izloženih ispitivanim proizvodima).

Statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje eritrocitnih hematoloških parametara vidljivo je kod skupina tretiranih proizvodima 1 i 2 između distribucije eritrocita i kontrole te kod skupine tretirane proizvodom 4 između MCH i kontrole. Značajno povećanje ($p < 0,05$) MCV-a vidljivo je u muške skupine tretirane proizvodom 1 u odnosu na PKGon.

Kod MCHC statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje vidljivo je kod muške skupine tretirane proizvodom 2 u odnosu na skupinu tretiranu proizvodom 1. Do statistički značajnog ($p < 0,05$) odstupanja kod distribucije eritrocita došlo je i kod skupine tretirane proizvodom 1 u odnosu na skupine tretirane proizvodom 3 i 4 kao i kod skupine tretirane proizvodom 2 u odnosu na skupine tretirane proizvodima 3, 4, PKSil i PKGon.

Tablica 27. Eritrocitni hematološki parametri u muških jedinki nakon pokusnog razdoblja izloženosti proizvodima 1-4 i pripadajućim kontrolama.

MUŽJACI		N	Aritmetička sredina	SD	Medijan	25. centila	75. centila
MCH(pg)	Kontrola	5	14,40	0,44	14,50	14,40	14,50
	Proizvod 1	6	14,93	0,58	14,60	14,60	15,03
	Proizvod 2	6	14,75	0,19	14,75	14,60	14,75
	Proizvod 3	6	14,50	0,43	14,60	14,10	14,90
	Proizvod 4	6	14,95	0,34	14,85	14,70	15,20
	Sildenafil	6	14,77	0,29	14,70	14,50	15,00
	Gonadotropin	6	14,68	0,25	14,65	14,60	14,90
MCHC (g/L)	Kontrola	5	270,20	12,70	272,00	270,00	274,00
	Proizvod 1	6	276,00	3,39	277,00	273,00	278,00
	Proizvod 2	6	282,50	2,21	282,50	282,50	284,00
	Proizvod 3	6	275,40	12,01	279,00	263,00	282,00
	Proizvod 4	6	276,67	12,31	271,50	268,00	289,00
	Sildenafil	6	276,50	11,41	274,00	268,00	283,00
	Gonadotropin	6	283,50	11,04	288,00	277,00	292,00
MCV (fL)	Kontrola	5	53,34	1,92	53,30	52,70	54,90
	Proizvod 1	6	54,05	2,41	53,30	52,60	54,23
	Proizvod 2	6	52,10	0,60	52,10	52,10	52,20
	Proizvod 3	6	52,76	3,42	50,40	50,30	56,50
	Proizvod 4	6	54,08	3,03	55,05	50,50	56,60
	Sildenafil	6	53,48	2,85	53,60	51,00	56,30
	Gonadotropin	6	51,82	1,95	51,10	50,90	51,70
Distr. Eritroc (%)	Kontrola	5	15,22	0,72	14,90	14,80	15,40
	Proizvod 1	6	17,23	1,12	16,93	16,40	18,40
	Proizvod 2	6	17,30	0,35	17,30	17,30	17,30
	Proizvod 3	6	15,65	0,48	15,70	15,30	15,70
	Proizvod 4	6	15,95	0,44	15,90	15,90	16,40
	Sildenafil	6	15,98	0,69	15,75	15,50	16,30
	Gonadotropin	6	16,00	0,92	16,05	15,30	16,60

Tablica 28. Statističko testiranje razlika eritrocitnih hematoloških parametara u muških jedinki izloženih proizvodima 1-4 i pripadajućim kontrolama.

Eritrocitni hematološki parametri						
Proizvod 1	Kontrola	Pr. 2	Pr. 3	Pr. 4	Sildenafil	Gonadotropin
MCV (fL) – p vrijednost	1,000	0,097	0,346	0,855	0,715	0,044
MCH(pg) – p vrijednost	0,071	0,852	0,340	0,461	0,710	0,709
MCHC (g/L) – p vrijednost	0,295	0,010	0,753	0,522	0,855	0,169
Distr. Eritrocita (%) – p vrijednost	0,021	0,712	0,020	0,025	0,054	0,119
Proizvod 2	Kontrola	Pr. 1	Pr. 3	Pr. 4	Sildenafil	Gonadotropin
MCV (fL) – p vrijednost	0,140	0,097	0,580	0,333	0,333	0,106
MCH(pg) – p vrijednost	0,065	0,852	0,517	0,226	0,936	0,626
MCHC (g/L) – p vrijednost	0,079	0,010	0,196	0,333	0,259	0,332
Distr. Eritrocita (%) – p vrijednost	0,006	0,712	0,006	0,003	0,006	0,008
Proizvod 3	Kontrola	Pr. 1	Pr. 2	Pr. 4	Sildenafil	Gonadotropin
MCV (fL) – p vrijednost	0,600	0,346	0,580	0,360	0,714	0,646
MCH(pg) – p vrijednost	0,596	0,340	0,517	0,166	0,408	0,457
MCHC (g/L) – p vrijednost	0,600	0,753	0,196	0,714	0,647	0,199
Distr. Eritrocita (%) – p vrijednost	0,207	0,020	0,006	0,192	0,463	0,409
Proizvod 4	Kontrola	Pr. 1	Pr. 2	Pr. 3	Sildenafil	Gonadotropin
MCV (fL) – p vrijednost	0,522	0,855	0,333	0,360	0,631	0,423
MCH(pg) – p vrijednost	0,035	0,461	0,226	0,166	0,295	0,195
MCHC (g/L) – p vrijednost	0,784	0,522	0,333	0,714	0,936	0,470
Distr. Eritrocita (%) – p vrijednost	0,094	0,025	0,003	0,192	0,871	0,628
Sildenafil	Kontrola	Pr. 1	Pr. 2	Pr. 3	Pr. 4	Gonadotropin
MCV (fL) – p vrijednost	0,855	0,715	0,333	0,714	0,631	0,261
MCH(pg) – p vrijednost	0,093	0,710	0,936	0,408	0,295	0,808
MCHC (g/L) – p vrijednost	0,855	0,855	0,259	0,647	0,936	0,423
Distr. Eritrocita (%) – p vrijednost	0,081	0,054	0,006	0,463	0,871	0,936
Gonadotropin	Kontrola	Pr. 1	Pr. 2	Pr. 3	Pr. 4	Sildenafil
MCV (fL) – p vrijednost	0,272	0,044	0,106	0,646	0,423	0,261
MCH(pg) – p vrijednost	0,168	0,709	0,626	0,457	0,195	0,808
MCHC (g/L) – p vrijednost	0,067	0,169	0,332	0,199	0,470	0,423
Distr. Eritrocita (%) – p vrijednost	0,201	0,119	0,008	0,409	0,628	0,936

Prikazane p vrijednosti dobivene su usporedbom pojedinih proizvoda Mann-Whitney U testom, a sve $p < 0,05$ smatrane su značajnima.

Tablica 29. Eritrocitni hematološki parametri u ženskih jedinki nakon pokusnog razdoblja izloženosti proizvodima 7-9 i pripadajućim kontrolama.

ŽENKE	N	Aritmetička sredina	SD	Medijan	25. centila	75. centila	
MCH(pg)	Kontrola	6	14,37	0,59	14,40	13,80	15,00
	Proizvod 7	6	14,45	0,45	14,40	14,30	14,60
	Proizvod 8	6	14,70	0,63	14,65	14,20	15,10
	Proizvod 9	5	14,48	0,30	14,60	14,40	14,60
	Gonadotropin	6	14,35	0,24	14,25	14,20	14,50
MCHC (g/L)	Kontrola	6	287,50	3,94	287,00	285,00	292,00
	Proizvod 7	6	277,33	9,63	277,00	272,00	279,00
	Proizvod 8	6	271,50	8,60	272,50	270,00	277,00
	Proizvod 9	5	279,40	7,77	277,00	275,00	278,00
	Gonadotropin	6	285,00	9,90	284,50	276,50	293,50
MCV (fL)	Kontrola	6	49,93	1,36	50,20	48,50	51,30
	Proizvod 7	6	52,20	2,32	53,05	49,60	54,00
	Proizvod 8	6	54,23	2,26	54,35	52,30	55,60
	Proizvod 9	5	51,78	2,37	52,30	52,30	52,70
	Gonadotropin	6	50,48	2,26	50,05	48,65	52,30
Distr. Eritroc (%)	Kontrola	6	15,62	0,68	15,40	15,10	15,80
	Proizvod 7	6	15,53	0,53	15,70	15,00	15,80
	Proizvod 8	6	15,37	0,59	15,15	14,90	16,00
	Proizvod 9	5	15,80	0,74	15,60	15,50	15,90
	Gonadotropin	6	14,73	0,33	14,60	14,50	14,95

Rezultati statističkog testiranja u ženki (Tablica 30.) ukazuju da je na kraju pokusnog razdoblja došlo do statistički značajnog ($p < 0,05$) povećanja MCV-a kod skupine tretirane proizvodom 8 u odnosu na K i PKGon. Vrijednost MCHC je statistički značajno ($p < 0,05$) smanjena kod skupine tretirane proizvodom 8 u odnosu na K. Kod distribucije eritrocita značajno ($p < 0,05$) smanjenje uočava se kod PKGon u odnosu na K i skupine tretirane proizvodima 7 i 9.

Kod ostalih proizvoda unutar tretiranih skupina (muških i ženskih) nije došlo do statistički značajnog odstupanja u hematološkom statusu.

Tablica 30. Statističko testiranje razlika eritrocitnih hematoloških parametara u ženskih jedinki izloženih proizvodima 7-9 i pripadajućim kontrolama.

Eritrocitni hematološki parametri				
Proizvod 7	Kontrola	Pr. 8	Pr. 9	Gonadotropin
MCV (fL) – p vrijednost	0,108	0,200	0,360	0,201
MCH(pg) – p vrijednost	0,806	0,810	0,577	0,451
MCHC (g/L) – p vrijednost	0,054	0,337	0,927	0,336
Distr. Eritroc (%) – p vrijednost	0,936	0,747	0,783	0,032
Proizvod 8	Kontrola	Pr. 7	Pr. 9	Gonadotropin
MCV (fL) – p vrijednost	0,006	0,200	0,197	0,042
MCH(pg) – p vrijednost	0,419	0,810	0,647	0,449
MCHC (g/L) – p vrijednost	0,004	0,337	0,142	0,069
Distr. Eritroc (%) – p vrijednost	0,419	0,747	0,361	0,068
Proizvod 9	Kontrola	Pr. 7	Pr. 8	Gonadotropin
MCV (fL) – p vrijednost	0,098	0,360	0,197	0,461
MCH(pg) – p vrijednost	0,711	0,577	0,647	0,459
MCHC (g/L) – p vrijednost	0,099	0,927	0,142	0,389
Distr. Eritroc (%) – p vrijednost	0,463	0,783	0,361	0,027
Gonadotropin	Kontrola	Pr. 7	Pr. 8	Pr. 9
MCV (fL) – p vrijednost	0,587	0,201	0,042	0,461
MCH(pg) – p vrijednost	0,667	0,451	0,449	0,459
MCHC (g/L) – p vrijednost	0,829	0,336	0,069	0,389
Distr. Eritroc (%) – p vrijednost	0,031	0,032	0,068	0,027

Prikazane p vrijednosti dobivene su usporedbom pojedinih proizvoda Mann-Whitney U testom, a sve $p < 0,05$ smatrane su značajnima.

Broj leukocita i diferencijalna krvna slika tretiranih životinja

Tablice 31. i 33. prikazuju broj leukocita i diferencijalnu krvnu sliku (DKS) u mužjaka i ženki K i skupina životinja izloženih proizvodima 1-4M i 7-9Ž te PKSil i PKGon, nakon 28 dana.

Tablice 32. i 34. prikazuju statističke p vrijednosti i razlike između broja leukocita i DKS životinja pojedinih pokusnih skupina (kontrolne skupine i skupina izloženih ispitivanim proizvodima).

Rezultati statističkog testiranja u mužjaka (Tablica 32.), ukazuju da je na kraju pokusnog razdoblja došlo do statistički značajnog ($p < 0,05$) odstupanja u broju leukocita kod PKSil koji je povećan u odnosu na K i PKGon.

Statistički značajno ($p < 0,05$) odstupanje u obliku povećanja udjela neutrofila uočljivo je kod skupine tretirane proizvodom 1 u odnosu na K. Do statistički značajnog ($p < 0,05$) povećanja broja neutrofila došlo je kod skupine tretirane proizvodom 2 u odnosu na sve pokusne skupine kod mužjaka. Statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje udjela limfocita uočljivo je kod K u odnosu na PKSil i skupine tretirane proizvodima 2 i 4. Značajno povećanje limfocita također je uočljivo kod skupine tretirane proizvodom 1 u odnosu na skupinu tretiranu proizvodom 2.

Rezultati statističkog testiranja u ženki (Tablica 34.) ukazuju da je na kraju pokusnog razdoblja došlo do statistički značajnog ($p < 0,05$) smanjenja neutrofila kod skupine tretirane proizvodom 8 u odnosu na K. Do statistički značajnog ($p < 0,05$) smanjenja eozinofila u ženki došlo je kod skupine tretirane proizvodom 9 u odnosu na K i skupinu tretiranu proizvodom 7. Statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenje eozinofila vidljivo je i kod PKGon u odnosu na K.

Kod ostalih proizvoda unutar tretiranih skupina (muških i ženskih) nije došlo do statistički značajne promjene broja leukocita i vrijednosti DKS.

Tablica 31. Ukupni broj leukocita i postotnih udjela pojedinih tipova leukocita (DKS) u muških jedinki nakon pokusnog razdoblja izloženih proizvodima 1-4 i pripadajućim kontrolama.

MUŽJACI		N	Aritmetička sredina	SD	Medijan	25. centila	75. centila
Leukociti (10E9/L)	Kontrola	5	5,80	2,77	6,33	6,33	7,33
	Proizvod 1	6	11,18	4,04	12,33	10,22	13,67
	Proizvod 2	6	11,46	5,62	13,75	13,33	13,75
	Proizvod 3	6	7,27	4,02	6,33	6,00	7,67
	Proizvod 4	6	7,89	3,17	8,00	5,33	9,67
	Sildenafil	6	9,78	2,03	10,17	8,33	11,67
	Gonadotropin	6	7,00	1,46	6,33	6,33	7,67
Neutrofili (%)	Kontrola	5	8,85	8,03	8,00	3,45	14,25
	Proizvod 1	6	19,43	0,54	19,52	19,07	19,80
	Proizvod 2	6	35,00	0,00	35,00	35,00	35,00
	Proizvod 3	6	13,37	9,57	15,70	6,08	20,65
	Proizvod 4	6	19,43	11,34	16,95	15,90	30,20
	Sildenafil	6	16,05	5,88	16,60	10,10	18,20
	Gonadotropin	6	14,20	3,63	14,65	12,00	16,90
Limfociti (%)	Kontrola	5	89,36	8,08	89,80	88,90	90,80
	Proizvod 1	6	79,00	1,44	79,35	78,00	80,00
	Proizvod 2	6	63,30	0,00	63,30	63,30	63,30
	Proizvod 3	6	55,32	37,64	65,50	27,35	83,30
	Proizvod 4	6	75,52	9,37	80,60	66,00	81,70
	Sildenafil	6	69,80	25,01	79,55	72,70	83,60
	Gonadotropin	6	78,83	10,73	81,60	79,30	82,90
Monociti (%)	Kontrola	5	1,78	1,22	2,20	1,20	2,30
	Proizvod 1	6	1,55	1,18	1,33	1,00	2,40
	Proizvod 2	6	3,10	1,76	3,10	1,80	3,10
	Proizvod 3	6	5,86	12,21	0,50	0,12	1,00
	Proizvod 4	6	4,80	5,05	3,25	2,40	4,30
	Sildenafil	6	3,85	4,62	1,85	0,90	5,60
	Gonadotropin	6	6,75	11,56	1,60	1,00	6,40
Eozinofili (%)	Kontrola	5	0,48	0,56	0,40	0,00	0,95
	Proizvod 1	6	0,19	0,30	0,00	0,00	0,23
	Proizvod 2	6	0,17	0,04	0,17	0,17	0,20
	Proizvod 3	6	0,20	0,45	0,00	0,00	0,01
	Proizvod 4	6	0,25	0,48	0,00	0,00	0,30
	Sildenafil	6	0,25	0,21	0,30	0,00	0,40
	Gonadotropin	6	0,22	0,25	0,15	0,00	0,50

Tablica 32. Statističko testiranje razlike ukupnog broja leukocita i postotnih udjela pojedinih tipova leukocita (DKS) u muških jedinki izloženih proizvodima 1-4 i pripadajućim kontrolama

Leukocitni hematološki parametri						
Proizvod 1	Kontrola	Pr. 2	Pr. 3	Pr. 4	Sildenafil	Gonadotropin
Leukociti (10E9/L) - p vrijednost	0,075	0,461	0,209	0,119	0,272	0,097
Neutrofili (%) - p vrijednost	0,043	0,007	0,773	0,394	0,088	0,011
Limfociti (%) - p vrijednost	0,086	0,007	0,773	0,593	0,831	0,201
Mononociti (%) - p vrijednost	0,834	0,065	0,462	0,120	0,584	0,581
Eozinofili (%) – p vrijednost	0,421	0,576	1,000	1,000	0,443	0,765
Proizvod 2	Kontrola	Pr. 1	Pr. 3	Pr. 4	Sildenafil	Gonadotropin
Leukociti (10E9/L) - p vrijednost	0,065	0,461	0,097	0,053	0,053	0,051
Neutrofili (%) - p vrijednost	0,007	0,007	0,007	0,004	0,004	0,004
Limfociti (%) - p vrijednost	0,005	0,007	1,000	0,056	0,056	0,056
Mononociti (%) - p vrijednost	0,310	0,065	0,097	0,747	0,519	0,518
Eozinofili (%) – p vrijednost	1,000	0,576	0,093	0,324	0,331	1,000
Proizvod 3	Kontrola	Pr. 1	Pr. 2	Pr. 4	Sildenafil	Gonadotropin
Leukociti (10E9/L) - p vrijednost	0,916	0,209	0,097	0,783	0,143	0,851
Neutrofili (%) - p vrijednost	0,248	0,773	0,007	0,522	1,000	0,831
Limfociti (%) - p vrijednost	0,050	0,773	1,000	0,522	0,670	0,286
Mononociti (%) - p vrijednost	0,402	0,462	0,097	0,144	0,273	0,270
Eozinofili (%) – p vrijednost	0,592	1,000	0,093	1,000	0,443	0,765
Proizvod 4	Kontrola	Pr. 1	Pr. 2	Pr. 3	Sildenafil	Gonadotropin
Leukociti (10E9/L) - p vrijednost	0,460	0,119	0,053	0,783	0,335	0,805
Neutrofili (%) - p vrijednost	0,201	0,394	0,004	0,522	0,631	0,262
Limfociti (%) - p vrijednost	0,045	0,593	0,056	0,522	0,749	0,575
Mononociti (%) - p vrijednost	0,100	0,120	0,747	0,144	0,423	0,521
Eozinofili (%) – p vrijednost	0,631	1,000	0,324	1,000	0,389	0,654
Sildenafil	Kontrola	Pr. 1	Pr. 2	Pr. 3	Pr. 4	Gonadotropin
Leukociti (10E9/L) - p vrijednost	0,017	0,272	0,053	0,143	0,335	0,024
Neutrofili (%) - p vrijednost	0,136	0,088	0,004	1,000	0,631	0,522
Limfociti (%) - p vrijednost	0,045	0,831	0,056	0,670	0,749	0,631
Mononociti (%) - p vrijednost	0,647	0,584	0,519	0,273	0,423	0,873
Eozinofili (%) – p vrijednost	0,659	0,443	0,331	0,443	0,389	0,866
Gonadotropin	Kontrola	Pr. 1	Pr. 2	Pr. 3	Pr.4	Sildenafil
Leukociti (10E9/L) - p vrijednost	0,848	0,097	0,051	0,851	0,805	0,024
Neutrofili (%) - p vrijednost	0,286	0,011	0,004	0,831	0,262	0,522
Limfociti (%) - p vrijednost	0,100	0,201	0,056	0,286	0,575	0,631
Mononociti (%) - p vrijednost	0,927	0,581	0,518	0,270	0,521	0,873
Eozinofili (%) – p vrijednost	0,494	0,765	1,000	0,765	0,654	0,866

Prikazane p vrijednosti dobivene su usporedbom pojedinih proizvoda Mann-Whitney U testom, a sve $p < 0,05$ smatrane su značajnima.

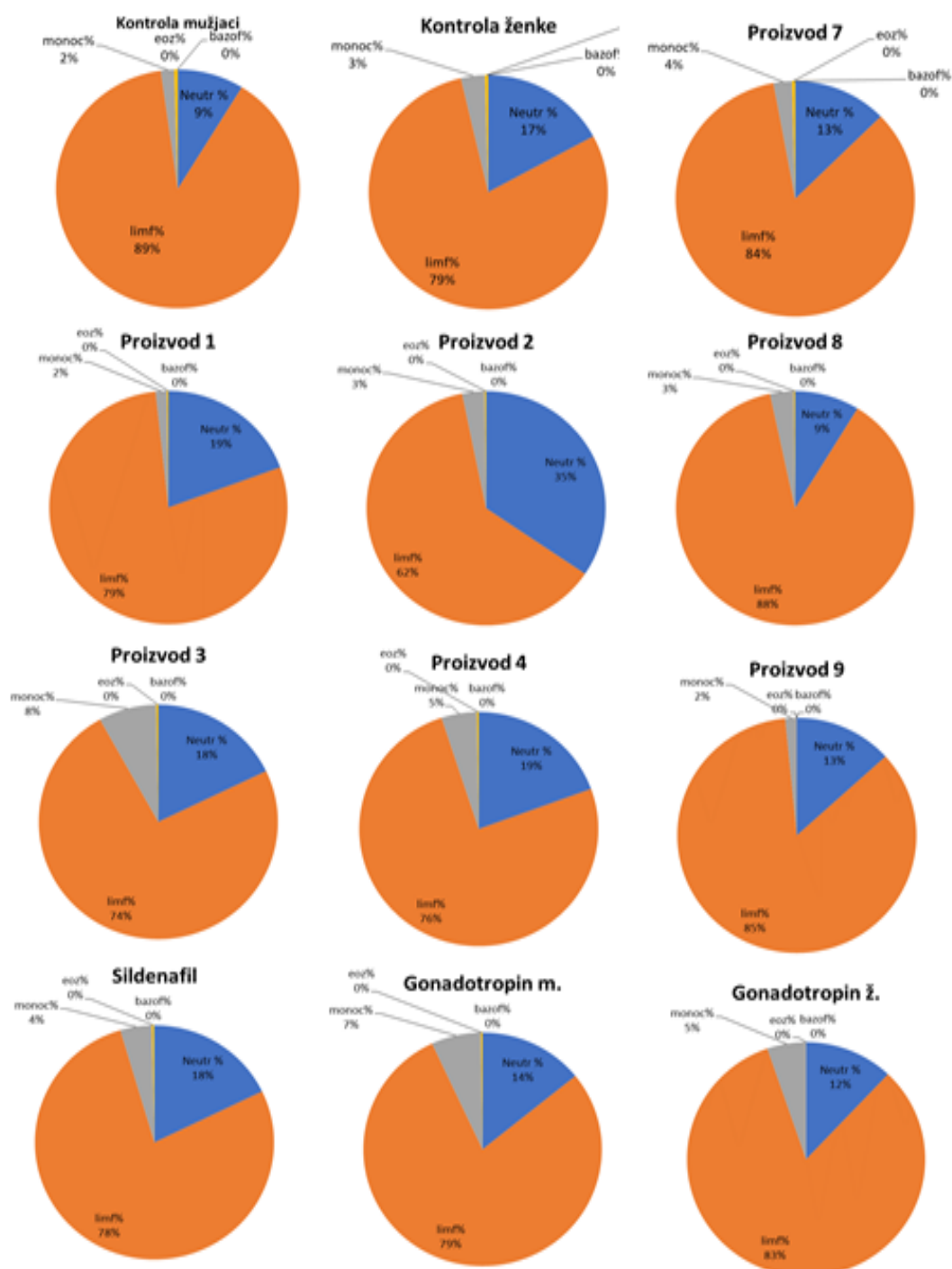
Tablica 33. Ukupni broj leukocita i postotnih udjela pojedinih tipova leukocita (DKS) u ženskih jedinki nakon pokusnog razdoblja izloženih proizvodima 7-9 i pripadajućim kontrolama.

ŽENKE		N	Aritmetička sredina	SD	Medijan	25. centila	75. centila
Leukociti(10E9/L)	Kontrola	6	5,61	1,18	5,33	5,00	7,00
	Proizvod 7	6	5,00	1,85	4,50	3,67	7,00
	Proizvod 8	6	4,11	1,54	4,00	3,33	4,67
	Proizvod 9	5	5,40	1,74	6,00	4,00	6,00
	Gonadotropin	6	4,58	3,18	4,33	2,00	7,17
Neutrofili (%)	Kontrola	6	14,97	4,73	13,50	12,20	13,90
	Proizvod 7	6	12,70	5,18	10,70	9,20	17,30
	Proizvod 8	6	8,80	4,34	9,40	4,60	12,10
	Proizvod 9	5	13,30	5,80	9,80	9,50	16,00
	Gonadotropin	6	12,08	14,11	5,70	4,70	19,45
Limfociti (%)	Kontrola	6	69,41	33,52	82,00	81,40	85,00
	Proizvod 7	6	84,38	4,65	85,15	81,80	87,00
	Proizvod 8	6	87,82	4,72	87,50	83,90	90,60
	Proizvod 9	5	85,14	6,49	88,80	80,00	90,20
	Gonadotropin	6	82,65	22,17	92,35	70,00	95,30
Monociti (%)	Kontrola	6	2,86	2,55	2,25	1,00	5,80
	Proizvod 7	6	2,50	1,77	2,05	1,80	4,50
	Proizvod 8	6	3,23	2,24	2,75	1,70	5,40
	Proizvod 9	5	1,56	1,50	1,30	0,80	1,70
	Gonadotropin	6	5,28	8,16	1,95	0,00	10,55
Eozinofili (%)	Kontrola	6	0,37	0,28	0,50	0,02	0,60
	Proizvod 7	6	0,42	0,35	0,50	0,00	0,60
	Proizvod 8	6	0,15	0,37	0,00	0,00	0,00
	Proizvod 9	5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Gonadotropin	6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tablica 34. Statističko testiranje razlike ukupnog broja leukocita i postotnih udjela pojedinih tipova leukocita (DKS) u ženskih jedinki izloženih proizvodima 7-9 i pripadajućim kontrolama.

Leukocitni hematološki parametri				
Proizvod 7	Kontrola	Pr. 8	Pr. 9	Gonadotropin
Leukociti (10E9/L) – p vrijednost	0,515	0,520	0,582	0,669
Neutrofili (%) – p vrijednost	0,199	0,337	1,000	0,199
Limfociti (%) – p vrijednost	0,199	0,337	0,784	0,201
Mononociti (%) – p vrijednost	0,872	0,575	0,170	0,829
Eozinofili (%) – p vrijednost	1,000	0,179	0,034	0,054
Proizvod 8	Kontrola	Pr. 7	Pr. 9	Gonadotropin
Leukociti (10E9/L) – p vrijednost	0,052	0,520	0,309	1,000
Neutrofili (%) – p vrijednost	0,037	0,337	0,273	0,831
Limfociti (%) – p vrijednost	0,037	0,337	0,465	0,522
Mononociti (%) – p vrijednost	0,748	0,575	0,170	0,669
Eozinofili (%) – p vrijednost	0,103	0,179	0,361	0,414
Proizvod 9	Kontrola	Pr. 7	Pr. 8	Gonadotropin
Leukociti (10E9/L) – p vrijednost	0,927	0,582	0,309	0,618
Neutrofili (%) – p vrijednost	0,359	1,000	0,273	0,219
Limfociti (%) – p vrijednost	0,359	0,784	0,465	0,221
Mononociti (%) – p vrijednost	0,463	0,170	0,170	1,000
Eozinofili (%) – p vrijednost	0,012	0,034	0,361	1,000
Gonadotropin	Kontrola	Pr. 7	Pr. 8	Pr. 9
Leukociti (10E9/L) – p vrijednost	0,668	0,669	1,000	0,618
Neutrofili (%) – p vrijednost	0,197	0,199	0,831	0,219
Limfociti (%) – p vrijednost	0,133	0,201	0,522	0,221
Mononociti (%) – p vrijednost	0,667	0,829	0,669	1,000
Eozinofili (%) – p vrijednost	0,022	0,054	0,414	1,000

Prikazane p vrijednosti dobivene su usporedbom pojedinih proizvoda Mann-Whitney U testom, a sve $p < 0,05$ smatrane su značajnima.



Slika 37. Postotni udjeli pojedinih tipova bijelih krvnih stanica (WBC, engl. *White Blood Cell*). Statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje neutrofila uočava se kod proizvoda 1 i 2 u muških skupina u odnosu na kontrolu, a također se uočava značajno povećanje ($p < 0,05$) neutrofila kod proizvoda 2 u odnosu na druge tretirane muške skupine. Kod ženskih skupina prisutno je značajno smanjenje ($p < 0,05$) neutrofila kod skupine tretirane proizvodom 8. Kod proizvoda 2, 3, 4 i PKSil u muških skupina prisutno je i značajno smanjenje ($p < 0,05$) limfocita u odnosu na kontrolnu skupinu.

Antikoagulacijski potencijal biljnih pripravaka

Tablice 35. i 37. prikazuju antikoagulacijski potencijal (vrijeme zgrušavanja, broj trombocita i MPV) u mužjaka i ženki K i skupina životinja izloženih proizvodima 1-4M i 7-9Ž te PKSil i PKGon, nakon 28 dana.

Tablice 36. i 38. prikazuju statističke p vrijednosti i razlike između antikoagulacijskog potencijala životinja pojedinih pokusnih skupina (kontrolne skupine i skupina izloženih ispitivanim proizvodima).

Rezultati statističkog testiranja u mužjaka (Tablica 36.), ukazuju da je na kraju pokusnog razdoblja došlo do statistički značajnog ($p < 0,05$) odstupanja u vremenu zgrušavanja krvi koje je bilo povećano u skupinama tretiranim proizvodima 1 i 2 u odnosu na PKSil i skupinu tretiranu proizvodom 3. Kod skupine tretirane proizvodom 3 uočava se statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenje vremena zgrušavanja u odnosu na K. Statistički značajno povećanje količine trombocita uočava se kod PKSil u odnosu na K i PKGon. Kod skupine tretirane proizvodom 4 i PKSil uočava se statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje količine trombocita u odnosu na K. Statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenje količine MPV-a uočava se u skupini tretiranoj proizvodom 4 u odnosu na K te u skupini tretiranoj proizvodom 1 u odnosu na PKSil, PKGon i skupinu tretiranu proizvodom 4.

Rezultati statističkog testiranja u ženki (Tablica 38.) ukazuju da je na kraju pokusnog razdoblja došlo do statistički značajnog ($p < 0,05$) odstupanja u vremenu zgrušavanja krvi koje je bilo povećano u skupini tretiranoj proizvodom 9 u odnosu na skupinu tretiranu proizvodom 7. Statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje vrijednosti MPV-a uočljivo je kod svih pokusnih skupina u odnosu na K. Također, značajno ($p < 0,05$) veću količinu MPV-a uočavamo kod skupine tretirane proizvodom 8 u odnosu na skupinu tretiranu proizvodom 9 i PKG-om.

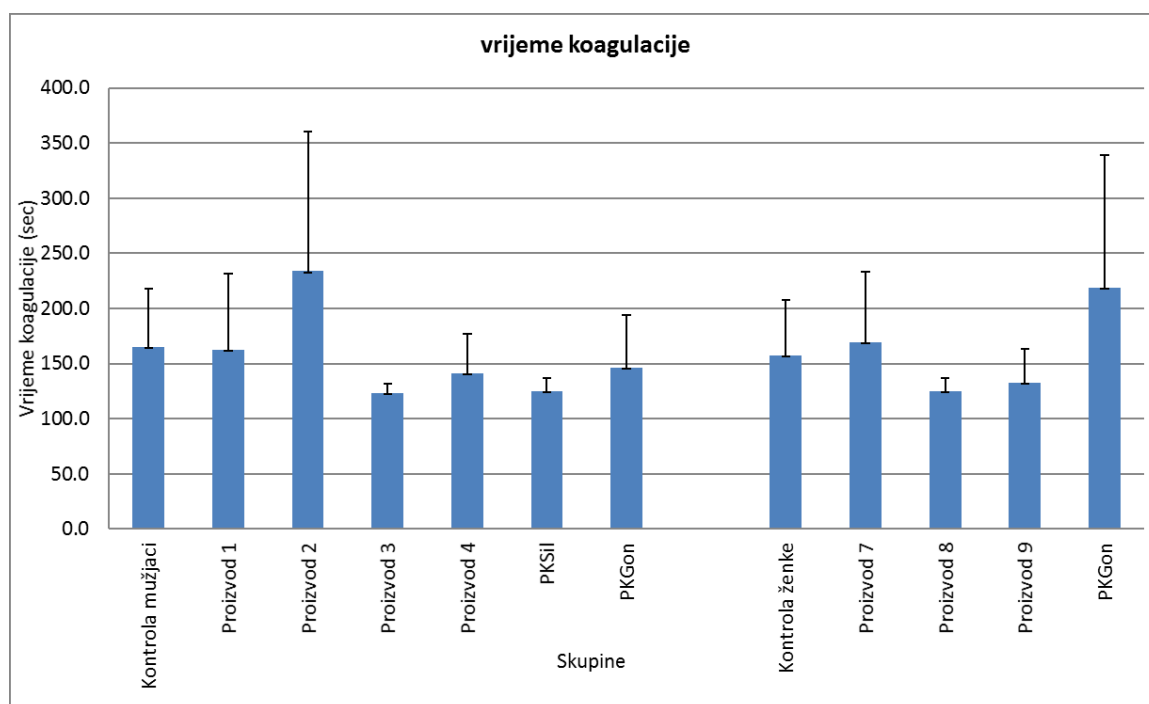
Tablica 35. Koagulacijski parametri u muških jedinki nakon pokusnog razdoblja izloženih proizvodima 1-4 i pripadajućim kontrolama.

MUŽJACI		N	Aritmetička sredina	SD	Medijan	25. centila	75. centila
Vrijeme zgrušavanja (sek)	Kontrola	5	168	58,48	150	150	150
	Proizvod 1	6	162,5	68,82	134,5	126	160
	Proizvod 2	6	253,83	159,57	187,5	128	400
	Proizvod 3	6	123,33	8,16	120	120	120
	Proizvod 4	6	141,5	35,52	124,5	120	150
	Sildenafil	6	125	12,25	120	120	120
	Gonadotropin	6	146,67	47,19	125	120	150
Trombociti (10E9/L)	Kontrola	5	298,6	149,07	353	304	358
	Proizvod 1	6	480,67	122,26	439,33	425	559
	Proizvod 2	6	438,67	236,99	438,67	438,67	652
	Proizvod 3	6	400,56	307,02	438	181	638
	Proizvod 4	6	481,33	123,89	484	454	548
	Sildenafil	6	525,67	105,83	532	433	638
	Gonadotropin	6	375,17	124,98	355	323	494
MPV(fL)	Kontrola	5	5,80	0,07	5,80	5,80	5,80
	Proizvod 1	6	5,72	0,04	5,70	5,70	5,70
	Proizvod 2	6	5,83	0,13	5,83	5,83	5,90
	Proizvod 3	6	5,58	0,59	5,80	5,50	5,90
	Proizvod 4	6	5,95	0,12	5,90	5,90	6,10
	Sildenafil	6	5,93	0,16	5,95	5,80	6,10
	Gonadotropin	6	6,03	0,38	5,90	5,80	6,00

Tablica 36. Statističko testiranje razlika koagulacijskih parametara u muških jedinki izloženih proizvodima 1-4 i pripadajućim kontrolama.

Koagulacijski parametri						
Proizvod 1	Kontrola	Pr. 2	Pr. 3	Pr. 4	Sildenafil	Gonadotropin
Vrijeme zgrušavanja (sek) – p vrijednost	0,644	0,378	0,040	0,414	0,049	0,463
Trombociti(10E9/L) – p vrijednost	0,076	0,854	0,754	0,855	0,715	0,201
MPV (fL) - p vrijednost	0,065	0,059	0,665	0,006	0,027	0,008
Proizvod 2	Kontrola	Pr. 1	Pr. 3	Pr. 4	Sildenafil	Gonadotropin
Vrijeme zgrušavanja (sek) – p vrijednost	0,574	0,378	0,021	0,142	0,026	0,191
Trombociti(10E9/L) - p vrijednost	0,065	0,854	0,580	0,629	1,000	0,333
MPV (fL) - p vrijednost	0,226	0,059	0,518	0,162	0,331	0,463
Proizvod 3	Kontrola	Pr. 1	Pr. 2	Pr. 4	Sildenafil	Gonadotropin
Vrijeme zgrušavanja (sek) - p vrijednost	0,021	0,040	0,021	0,216	0,902	0,216
Trombociti(10E9/L) - p vrijednost	0,465	0,754	0,580	0,584	0,647	0,855
MPV (fL) - p vrijednost	0,914	0,665	0,518	0,186	0,267	0,264
Proizvod 4	Kontrola	Pr. 1	Pr. 2	Pr. 3	Sildenafil	Gonadotropin
Vrijeme zgrušavanja (sek) – p vrijednost	0,251	0,414	0,142	0,216	0,252	0,864
Trombociti(10E9/L) - p vrijednost	0,045	0,855	0,629	0,584	0,749	0,200
MPV (fL) - p vrijednost	0,035	0,006	0,162	0,186	0,868	0,737
Sildenafil	Kontrola	Pr. 1	Pr. 2	Pr. 3	Pr. 4	Gonadotropin
Vrijeme zgrušavanja (sek) – p vrijednost	0,041	0,049	0,026	0,902	0,252	0,252
Trombociti(10E9/L) - p vrijednost	0,013	0,715	1,000	0,647	0,749	0,037
MPV (fL) - p vrijednost	0,158	0,027	0,331	0,267	0,868	0,935
Gonadotropin	Kontrola	Pr. 1	Pr. 2	Pr. 3	Pr. 4	Sildenafil
Vrijeme zgrušavanja (sek) – p vrijednost	0,251	0,463	0,191	0,216	0,864	0,252
Trombociti(10E9/L) - p vrijednost	0,465	0,201	0,333	0,855	0,200	0,037
MPV (fL) - p vrijednost	0,082	0,008	0,463	0,264	0,737	0,935

Prikazane p vrijednosti dobivene su usporedbom pojedinih proizvoda Mann-Whitney U testom, a sve $p < 0,05$ smatrane su značajnima.



Slika 38. Vrijeme zgrušavanja krvi u muških skupina tretiranih proizvodima 1-4 i u ženskih skupina tretiranih proizvodima 7-9 u odnosu na kontrolnu skupinu i PKSii i PKGon

Tablica 37. Koagulacijski parametri u ženskih jedinki nakon pokusnog razdoblja izloženih proizvodima 7-9 i pripadajućim kontrolama.

ŽENKE		N	Aritmetička sredina	SD	Medijan	25. centila	75. centila
Vrijeme zgrušavanja (sek)	Kontrola	6	169,17	64,06	142,5	120	210
	Proizvod 7	6	125	12,25	120	120	120
	Proizvod 8	6	132,5	30,62	120	120	120
	Proizvod 9	5	179	77,41	155	150	155
	Gonadotropin	6	157,5	49,97	135	120	195
Trombociti(10E9/L)	Kontrola	6	322,33	56,71	307	283	331
	Proizvod 7	6	364,67	98,76	345,5	309	374
	Proizvod 8	6	354,33	139,49	319	286	387
	Proizvod 9	5	378,2	118,67	364	328	458
	Gonadotropin	6	274,5	57,99	285,5	231,5	317,5
MPV(fL)	Kontrola	6	5,58	0,10	5,55	5,50	5,70
	Proizvod 7	6	5,90	0,21	5,85	5,70	6,10
	Proizvod 8	6	6,05	0,22	6,00	5,90	6,20
	Proizvod 9	5	5,76	0,17	5,80	5,70	5,90
	Gonadotropin	6	5,80	0,08	5,80	5,75	5,85

Tablica 38. Statističko testiranje razlika koagulacijskih parametara u ženskih jedinki izloženih proizvodima 7-9 i pripadajućim kontrolama.

Proizvod 7	Kontrola	Pr. 8	Pr. 9	Gonadotropin
Vrijeme zgrušavanja (sek) – p vrijednost	0,074	0,902	0,028	0,181
Trombociti(10E9/L) – p vrijednost	0,335	0,749	0,855	0,088
MPV (fL) – p vrijednost	0,009	0,226	0,402	0,584
Proizvod 8	Kontrola	Pr. 7	Pr. 9	Gonadotropin
Vrijeme zgrušavanja (sek) – p vrijednost	0,108	0,902	0,090	0,252
Trombociti(10E9/L) – p vrijednost	0,520	0,749	0,584	0,286
MPV (fL) – p vrijednost	0,004	0,226	0,033	0,039
Proizvod 9	Kontrola	Pr. 7	Pr. 8	Gonadotropin
Vrijeme zgrušavanja (sek) – p vrijednost	0,710	0,028	0,090	0,453
Trombociti(10E9/L) – p vrijednost	0,359	0,855	0,584	0,142
MPV (fL) – p vrijednost	0,072	0,402	0,033	0,899
Gonadotropin	Kontrola	Pr. 7	Pr. 8	Pr. 9
Vrijeme zgrušavanja (sek) – p vrijednost	0,618	0,181	0,252	0,453
Trombociti(10E9/L) – p vrijednost	0,198	0,088	0,286	0,142
MPV (fL) – p vrijednost	0,016	0,584	0,039	0,899

Prikazane p vrijednosti dobivene su usporedbom pojedinih proizvoda Mann-Whitney U testom, a sve $p < 0,05$ smatrane su značajnima.

3.2.5. Oksidacijski stres i promjene antioksidacijskog sustava u tkivima organa pokusnih životinja

Lipidna peroksidacija u organima pokusnih životinja

Tablice 39. i 41. prikazuju vrijednosti Malondialdehida (MDA) u slezeni, bubregu, jetri i testisu mužjaka te slezeni, bubregu i jetri ženki K i skupina životinja izloženih proizvodima 1-4M i 7-9Ž te PKSil i PKGon, nakon 28 dana.

Tablice 40. i 42. prikazuju statističke p vrijednosti i razlike između vrijednosti MDA navedenih organa životinja pojedinih pokusnih skupina (kontrolne skupine i skupina izloženih ispitivanim proizvodima).

Rezultati statističkog testiranja u mužjaka (Tablica 40.), ukazuju da je na kraju pokusnog razdoblja došlo do statistički značajnog ($p < 0,05$) odstupanja u vrijednostima MDA. Značajno ($p < 0,05$) povećanje vrijednosti MDA u slezeni uočava se kod skupina tretiranih proizvodima 1 i 2 u odnosu na K i skupine tretirane

proizvodom 3. Statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenje količine MDA u slezeni uočava se kod skupine tretirane proizvodom 3 u odnosu na sve tretirane skupine za mušjake, osim K.

Statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje vrijednosti MDA u bubregu uočava se kod skupina tretiranih proizvodima 1 i 4 u odnosu na sve pokusne skupine za mušjake. Statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje vrijednosti MDA u jetri uočava se kod skupina tretiranih proizvodima 1, 2 i 3 u odnosu na K, PKSil, PKGon i skupinu tretiranu proizvodom 4. Skupina tretirana proizvodom 4 pokazuje statistički značajno ($p < 0,05$) smanjene vrijednosti MDA u jetri u odnosu na sve tretirane skupine za mušjake, osim skupine tretirane PKGon.

Statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje vrijednosti MDA u testisima uočava se kod skupina tretiranih proizvodima 2 i 3 u odnosu na kontrolu i ostale tretirane muške skupine. Najveće povećanje MDA u testisima prisutno je u skupini tretiranoj proizvodom 2, a statistički značajno odstupanje između skupine tretirane proizvodom 1 i 2 nije prisutno.

Rezultati statističkog testiranja ženki (Tablica 42.), ukazuju da je na kraju pokusnog razdoblja došlo do statistički značajnog ($p < 0,05$) odstupanja u vrijednosti MDA. Značajno ($p < 0,05$) povećanje vrijednosti MDA u slezeni uočava se kod skupina tretiranih proizvodima 7, 8, i 9 u odnosu na K te skupina tretiranih proizvodom 7 u odnosu na PKGon. Najveća vrijednost MDA u bubrezima uočava se kod ženske skupine tretirane proizvodom 9, a najmanja kod skupine tretirane proizvodom 8. Statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenje vrijednosti MDA u bubregu prisutno je kod skupine tretirane proizvodom 8 u odnosu na skupine tretiranu proizvodom 7 i 9. Statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje vrijednosti MDA u jetri uočava se kod PKGon u odnosu na K i skupinu tretiranu proizvodom 8.

Kod ostalih proizvoda unutar tretiranih skupina (muških i ženskih) nije došlo do statistički značajnog odstupanja u vrijednosti MDA.

Tablica 39. MDA parametri u muških jedinki nakon pokusnog razdoblja izloženih proizvodima 1-4 i pripadajućim kontrolama.

MUŽJACI		N	Aritmetička sredina	SD	Medijan	25. centila	75. centila
MDA Slezena (nmol/mg)	Kontrola	5	12,91	1,88	12,33	11,76	14,06
	Proizvod 1	6	22,04	1,27	22,44	20,94	22,94
	Proizvod 2	6	18,69	3,69	20,72	14,81	21,17
	Proizvod 3	6	9,22	2,63	9,02	7,3	9,18
	Proizvod 4	6	15,97	3,98	14,11	14,02	15,44
	Sildenafil	6	19,03	7,04	15,8	14,99	18,1
	Gonadotropin	6	16,91	4	15,9	15,24	16,16
MDA Bubrezi (nmol/mg)	Kontrola	5	5,13	0,48	5,27	4,77	5,5
	Proizvod 1	6	13,69	1,09	13,45	13,07	14,44
	Proizvod 2	6	5,7	1,05	5,99	4,64	6,31
	Proizvod 3	6	6,34	0,63	6,51	6,34	6,64
	Proizvod 4	6	9,09	1,11	9,28	8,54	9,78
	Sildenafil	6	6,09	1,21	6,45	6,23	6,58
	Gonadotropin	6	6,23	0,58	6,28	5,95	6,69
MDA Jetra (nmol/mg)	Kontrola	5	6,67	0,26	6,73	6,5	6,84
	Proizvod 1	6	14,97	2,34	14,8	14,18	14,81
	Proizvod 2	6	15,97	1,73	15,61	14,6	16,97
	Proizvod 3	6	15,03	2,14	14,8	14,08	15,58
	Proizvod 4	6	6,03	0,47	6,14	6,1	6,27
	Sildenafil	6	7,35	1,05	7,2	6,54	7,53
	Gonadotropin	6	6,52	0,88	6,76	6,14	7,17
MDA Testisi (nmol/mg)	Kontrola	5	0,87	0,17	0,86	0,75	1
	Proizvod 1	6	1,38	0,78	1,51	1,43	1,61
	Proizvod 2	6	5,52	1,85	6,01	5,34	6,15
	Proizvod 3	6	4,08	0,51	4,05	3,84	4,34
	Proizvod 4	6	0,84	0,07	0,84	0,82	0,89
	Sildenafil	6	1,19	0,25	1,31	0,99	1,37
	Gonadotropin	6	0,81	0,14	0,76	0,74	0,77

Tablica 40. Statističko testiranje razlika MDA parametara u muških jedinki izloženih proizvodima 1-4 i pripadajućim kontrolama.

MDA parametri (nmol/mg)						
Proizvod 1	Kontrola	Pr. 2	Pr. 3	Pr. 4	Sildenafil	Gonadotropin
MDA Slezena – p vrijednost	0,014	0,117	0,009	0,076	0,117	0,117
MDA Bubrezi – p vrijednost	0,014	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009
MDA Jetra – p vrijednost	0,014	0,465	0,917	0,009	0,009	0,009
MDA Testisi – p vrijednost	0,142	0,009	0,009	0,117	0,117	0,117
Proizvod 2	Kontrola	Pr. 1	Pr. 3	Pr. 4	Sildenafil	Gonadotropin
MDA Slezena – p vrijednost	0,050	0,117	0,009	0,251	0,917	0,754
MDA Bubrezi – p vrijednost	0,327	0,009	0,251	0,009	0,465	0,602
MDA Jetra – p vrijednost	0,014	0,465	0,347	0,009	0,009	0,009
MDA Testisi – p vrijednost	0,014	0,009	0,117	0,009	0,009	0,009
Proizvod 3	Kontrola	Pr. 1	Pr. 2	Pr. 4	Sildenafil	Gonadotropin
MDA Slezena – p vrijednost	0,086	0,009	0,009	0,016	0,009	0,016
MDA Bubrezi – p vrijednost	0,050	0,009	0,251	0,009	0,754	0,754
MDA Jetra – p vrijednost	0,014	0,917	0,347	0,009	0,009	0,009
MDA Testisi – p vrijednost	0,014	0,009	0,117	0,009	0,009	0,009
Proizvod 4	Kontrola	Pr. 1	Pr. 2	Pr. 3	Sildenafil	Gonadotropin
MDA Slezena – p vrijednost	0,142	0,076	0,251	0,016	0,175	0,347
MDA Bubrezi – p vrijednost	0,014	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009
MDA Jetra – p vrijednost	0,027	0,009	0,009	0,009	0,009	0,347
MDA Testisi – p vrijednost	0,806	0,117	0,009	0,009	0,028	0,347
Sildenafil	Kontrola	Pr. 1	Pr. 2	Pr. 3	Pr. 4	Gonadotropin
MDA Slezena – p vrijednost	0,050	0,117	0,917	0,009	0,175	0,917
MDA Bubrezi – p vrijednost	0,142	0,009	0,465	0,754	0,009	0,917
MDA Jetra – p vrijednost	0,327	0,009	0,009	0,009	0,009	0,251
MDA Testisi – p vrijednost	0,086	0,117	0,009	0,009	0,028	0,028
Gonadotropin	Kontrola	Pr. 1	Pr. 2	Pr. 3	Pr. 4	Sildenafil
MDA Slezena – p vrijednost	0,050	0,117	0,754	0,016	0,347	0,917
MDA Bubrezi – p vrijednost	0,050	0,009	0,602	0,754	0,009	0,917
MDA Jetra – p vrijednost	0,806	0,009	0,009	0,009	0,347	0,251
MDA Testisi – p vrijednost	0,462	0,117	0,009	0,009	0,347	0,028

Prikazane p vrijednosti dobivene su usporedbom pojedinih proizvoda Mann-Whitney U testom, a sve $p < 0,05$ smatrane su značajnima.

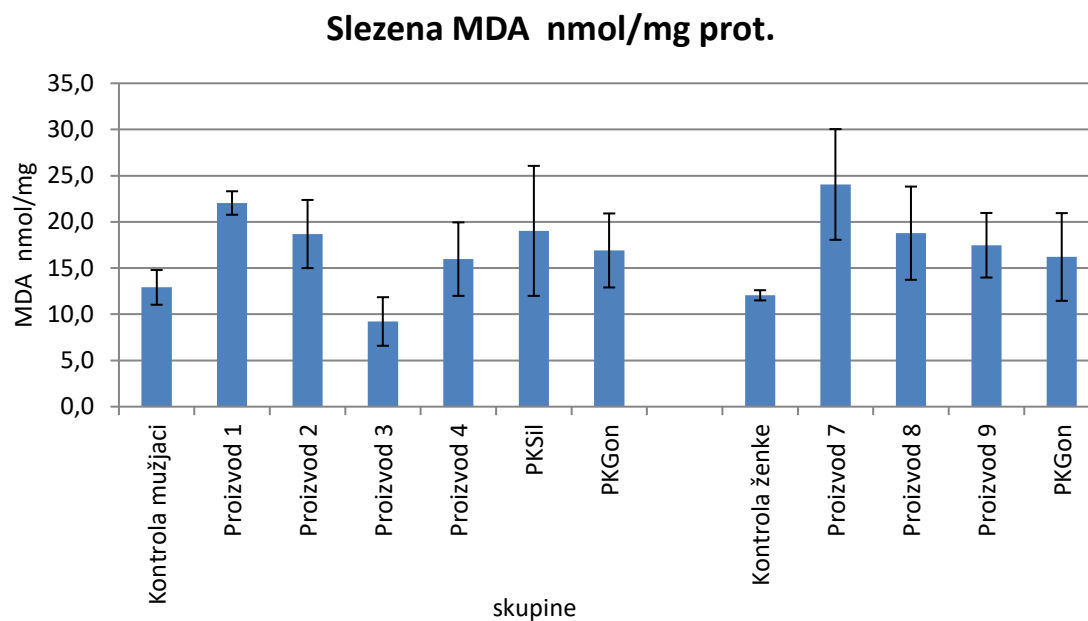
Tablica 41. MDA parametri u ženskih jedinki nakon pokusnog razdoblja izloženih proizvodima 7-9 i pripadajućim kontrolama.

ŽENKE		N	Aritmetička sredina	SD	Medijan	25. centila	75. centila
MDA Slezena (nmol/mg)	Kontrola	6	12,06	0,55	12,09	11,66	12,45
	Proizvod 7	6	24,05	5,99	21,67	19,77	26,89
	Proizvod 8	6	18,78	5,04	15,49	15,46	23,23
	Proizvod 9	5	17,47	3,5	17,85	15,21	19,73
	Gonadotropin	6	16,2	4,75	14,97	14,79	16,12
MDA Bubrezi (nmol/mg)	Kontrola	6	11,34	1,11	11,61	10,58	12,1
	Proizvod 7	6	11,35	0,96	11,66	10,44	11,73
	Proizvod 8	6	9,09	2,09	9,64	8,45	10,23
	Proizvod 9	5	13,13	1,87	12,62	11,8	14,46
	Gonadotropin	6	10,59	1,58	10,33	9,55	11,95
MDA Jetra (nmol/mg)	Kontrola	6	9,12	3,79	8,94	5,87	12,36
	Proizvod 7	6	12,58	4,33	12,48	9,69	14,55
	Proizvod 8	6	9,38	3,54	11,23	6,52	11,68
	Proizvod 9	5	10,97	5,26	9,47	6,95	14,98
	Gonadotropin	6	17,21	3,69	17,14	14,57	19,5

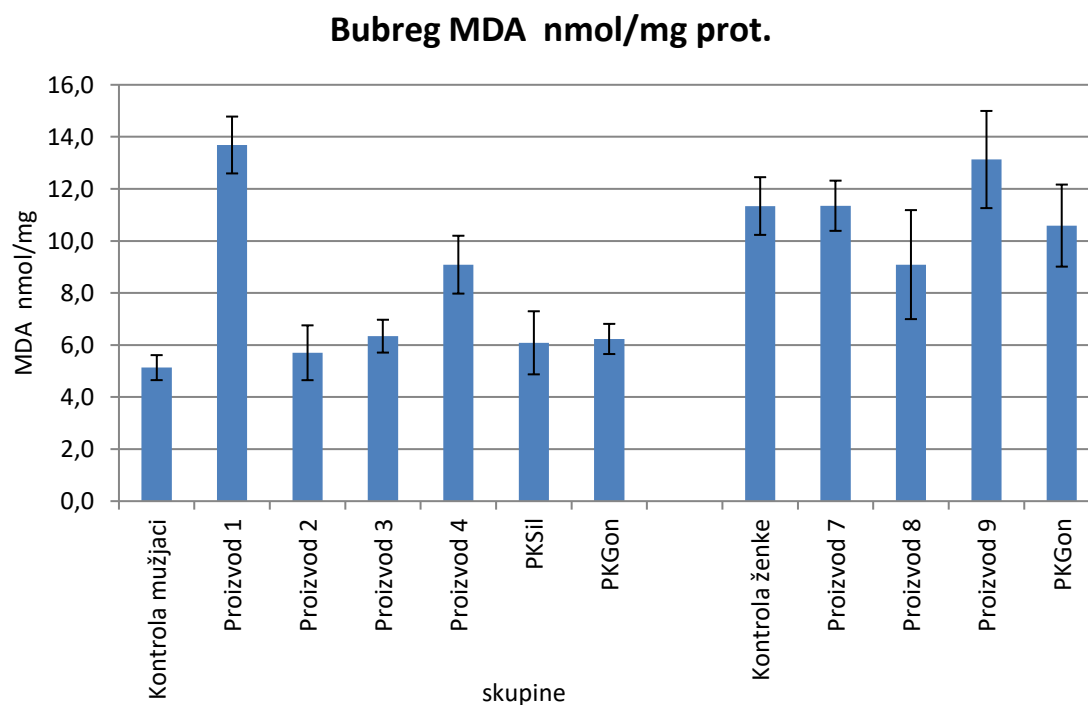
Tablica 42. Statističko testiranje razlika MDA parametara u ženskih jedinki izloženih proizvodima 7-9 i pripadajućim kontrolama.

MDA parametri				
Proizvod 7	Kontrola	Pr. 8	Pr. 9	Gonadotropin
MDA Slezena nmol/mg – p vrijednost	0,014	0,175	0,050	0,047
MDA Bubrezi nmol/mg – p vrijednost	1,000	0,028	0,142	0,465
MDA Jetra nmol/mg – p vrijednost	0,221	0,251	0,327	0,076
Proizvod 8	Kontrola	Pr. 7	Pr. 9	Gonadotropin
MDA Slezena nmol/mg – p vrijednost	0,014	0,175	0,806	0,465
MDA Bubrezi nmol/mg – p vrijednost	0,050	0,028	0,014	0,251
MDA Jetra nmol/mg – p vrijednost	0,806	0,251	0,462	0,009
Proizvod 9	Kontrola	Pr. 7	Pr. 8	Gonadotropin
MDA Slezena nmol/mg – p vrijednost	0,021	0,050	0,806	0,462
MDA Bubrezi nmol/mg – p vrijednost	0,149	0,142	0,014	0,086
MDA Jetra nmol/mg – p vrijednost	0,386	0,327	0,462	0,086
Gonadotropin	Kontrola	Pr. 7	Pr. 8	Pr. 9
MDA Slezena nmol/mg – p vrijednost	0,142	0,047	0,465	0,462
MDA Bubrezi nmol/mg – p vrijednost	0,624	0,465	0,251	0,086
MDA Jetra nmol/mg – p vrijednost	0,027	0,076	0,009	0,086

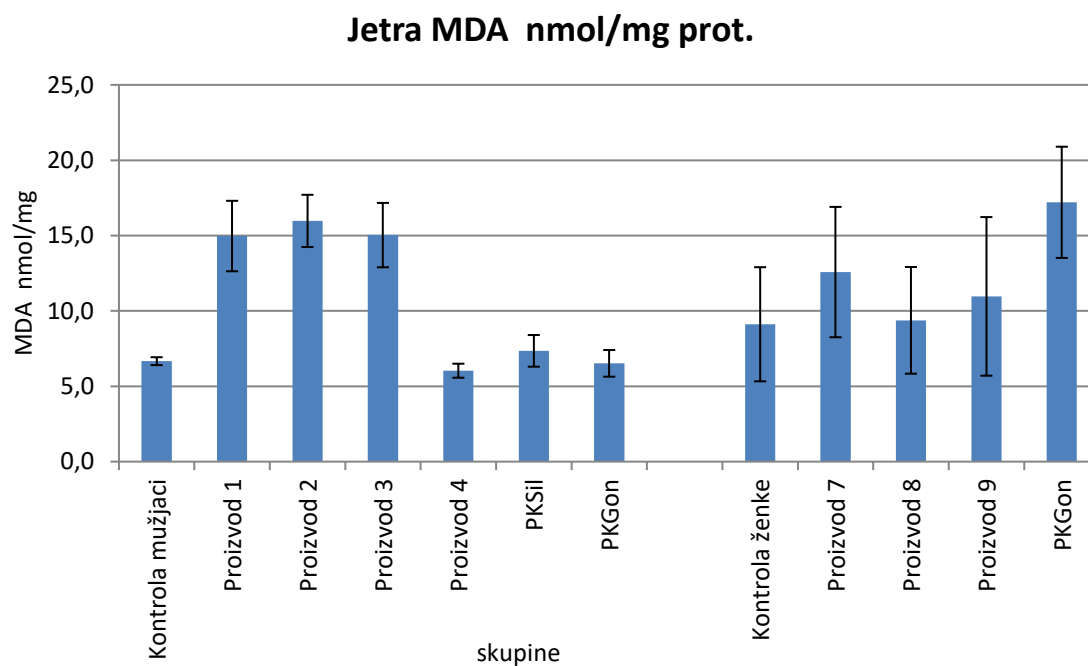
Prikazane p vrijednosti dobivene su usporedbom pojedinih proizvoda Mann-Whitney U testom, a sve $p < 0,05$ smatrane su značajnima.



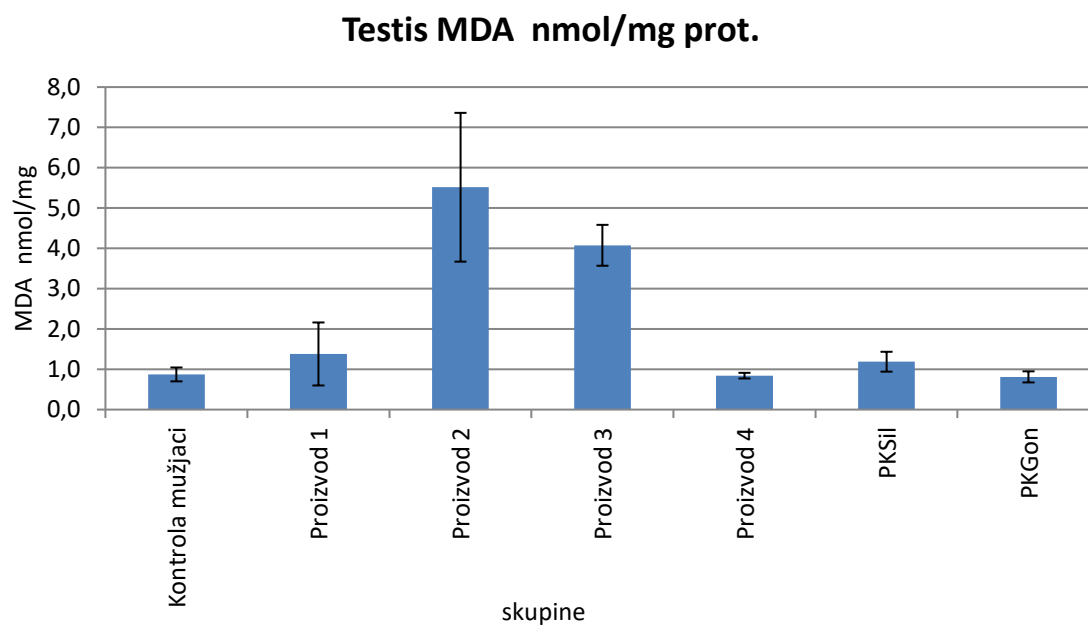
Slika 39. Koncentracija MDA (nmol/mg prot.) u slezeni u muških skupina tretiranih proizvodima 1-4 i u ženskih skupina tretiranih proizvodima 7-9 u odnosu na kontrolnu skupinu i PKSil i PKGon



Slika 40. Koncentracija MDA (nmol/mg prot.) u bubregu u muških skupina tretiranih proizvodima 1-4 i u ženskih skupina tretiranih proizvodima 7-9 u odnosu na kontrolnu skupinu i PKSil i PKGon



Slika 41. Koncentracija MDA (nmol/mg prot.) u jetri u muških skupina tretiranih proizvodima 1-4 i u ženskih skupina tretiranih proizvodima 7-9 u odnosu na kontrolnu skupinu i PKSil i PKGon



Slika 42. Koncentracija MDA (nmol/mg prot.) u testisima u muških skupina tretiranih proizvodima 1-4 u odnosu na kontrolnu skupinu i PKSil i PKGon.

Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u organima pokusnih životinja

Tablice 43. i 45. prikazuju aktivnost superoksid dismutaze (SOD-a) u jetri, bubregu i testisima mužjaka te u jetri i bubregu ženki K i skupina životinja izloženih proizvodima 1-4M i 7-9Ž te PKSIL i PKGon, nakon 28 dana.

Tablice 44. i 46. prikazuju statističke p vrijednosti i razlike aktivnosti SOD navedenih organa životinja pojedinih pokusnih skupina (kontrolne skupine i skupina izloženih ispitivanim proizvodima).

Rezultati statističkog testiranja u mužjaka (Tablica 44.) ukazuju da je na kraju pokusnog razdoblja došlo do statistički značajnog ($p < 0,05$) odstupanja u vrijednostima SOD-a. Značajno ($p < 0,05$) povećanje u aktivnosti SOD-a u bubrezima uočava se kod skupine tretirane proizvodom 1 u odnosu na sve ostale skupine. Značajno ($p < 0,05$) smanjenje aktivnosti SOD-a u bubrezima uočava se kod pozitivnih kontrola u odnosu na sve ostale skupine. Između skupina tretiranih proizvodima 2 i 4, između skupine tretirane proizvodom 3 i K te između pozitivnih kontrola (PKSIL i PKGon) nije doslo do statistički značajnog odstupanja, a kod svih ostalih skupina uočava se značajno ($p < 0,05$) odstupanje aktivnosti SOD u bubrezima.

Značajno ($p < 0,05$) povećanje aktivnosti SOD-a u jetri mužjaka u odnosu na kontrolu uočava se kod svih skupina. Najveće značajno ($p < 0,05$) povećanje prisutno je kod skupine tretirane proizvodom 1, a najmanje kod skupine tretirane proizvodom 3. Statistički značajno ($p < 0,05$) odstupanje u aktivnosti SOD u jetri prisutno je između svih tretiranih skupina osim između PKSIL i PKGon.

Značajno ($p < 0,05$) povećanje aktivnosti SOD-a u testisima uočava se kod skupine tretirane proizvodom 3 u odnosu na sve skupine. Najmanja vrijednost aktivnosti SOD u testisima uočava se kod PKGon i ona je značajno ($p < 0,05$) smanjena u odnosu na skupine tretirane proizvodom 3 i 4 i PKSIL. Između ostalih tretiranih skupina nema statističke značajnosti.

Tablica 43. Aktivnost SOD u muških jedinki nakon pokusnog razdoblja izloženih proizvodima 1-4 i pripadajućim kontrolama

MUŽJACI		N	Aritmetička sredina	SD	Medijan	25. centila	75. centila
SOD bubrezi (U/mg)	Kontrola	5	4,77	0,48	4,57	4,50	5,04
	Proizvod 1	6	9,94	1,01	10,49	9,97	10,52
	Proizvod 2	6	6,29	0,50	6,20	6,16	6,74
	Proizvod 3	6	4,59	0,41	4,61	4,34	4,67
	Proizvod 4	6	6,91	0,68	6,80	6,71	7,27
	Sildenafil	6	3,78	0,61	4,08	3,66	4,19
	Gonadotropin	6	3,94	0,15	3,91	3,86	4,01
SOD jetra (U/mg)	Kontrola	5	5,45	0,20	5,45	5,28	5,62
	Proizvod 1	6	14,79	1,43	14,58	13,63	15,44
	Proizvod 2	6	9,57	0,25	9,47	9,41	9,66
	Proizvod 3	6	6,34	0,58	6,17	6,05	6,22
	Proizvod 4	6	11,45	0,81	11,77	10,88	11,84
	Sildenafil	6	3,54	0,19	3,56	3,53	3,66
	Gonadotropin	6	4,52	0,94	5,10	3,78	5,24
SOD Testisi (U/mg)	Kontrola	5	0,42	0,08	0,42	0,37	0,48
	Proizvod 1	6	0,68	0,39	0,74	0,70	0,78
	Proizvod 2	6	0,60	0,21	0,57	0,57	0,65
	Proizvod 3	6	1,65	0,20	1,62	1,58	1,79
	Proizvod 4	6	0,49	0,04	0,50	0,47	0,52
	Sildenafil	6	0,51	0,11	0,57	0,42	0,60
	Gonadotropin	6	0,37	0,07	0,34	0,34	0,36

Tablica 44. Statističko testiranje razlike aktivnosti SOD u muških jedinki izloženih proizvodima 1-4 i pripadajućim kontrolama.

SOD parametri						
Proizvod 1	Kontrola	Pr. 2	Pr. 3	Pr. 4	Sildenafil	Gonadotropin
SOD Bubrež U/mg - p vrijednost	0,014	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009
SOD Jetra U/mg - p vrijednost	0,014	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009
SOD Testisi U/mg - p vrijednost	0,142	0,347	0,009	0,117	0,117	0,117
Proizvod 2	Kontrola	Pr. 1	Pr. 3	Pr. 4	Sildenafil	Gonadotropin
SOD Bubrež U/mg - p vrijednost	0,014	0,009	0,009	0,175	0,009	0,009
SOD Jetra U/mg - p vrijednost	0,014	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009
SOD Testisi U/mg - p vrijednost	0,142	0,347	0,009	0,117	0,602	0,117
Proizvod 3	Kontrola	Pr. 1	Pr. 2	Pr. 4	Sildenafil	Gonadotropin
SOD Bubrež U/mg - p vrijednost	0,806	0,009	0,009	0,009	0,028	0,016
SOD Jetra U/mg - p vrijednost	0,014	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009
SOD Testisi U/mg - p vrijednost	0,014	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009
Proizvod 4	Kontrola	Pr. 1	Pr. 2	Pr. 3	Sildenafil	Gonadotropin
SOD Bubrež U/mg - p vrijednost	0,014	0,009	0,175	0,009	0,009	0,009
SOD Jetra U/mg - p vrijednost	0,014	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009
SOD Testisi U/mg - p vrijednost	0,086	0,117	0,117	0,009	0,602	0,028
Sildenafil	Kontrola	Pr. 1	Pr. 2	Pr. 3	Pr. 4	Gonadotropin
SOD Bubrež U/mg - p vrijednost	0,014	0,009	0,009	0,028	0,009	0,753
SOD Jetra U/mg - p vrijednost	0,014	0,009	0,009	0,009	0,009	0,075
SOD Testisi U/mg - p vrijednost	0,221	0,117	0,602	0,009	0,602	0,028
Gonadotropin	Kontrola	Pr. 1	Pr. 2	Pr. 3	Pr. 4	Sildenafil
SOD Bubrež U/mg - p vrijednost	0,014	0,009	0,009	0,016	0,009	0,753
SOD Jetra U/mg - p vrijednost	0,049	0,009	0,009	0,009	0,009	0,075
SOD Testisi U/mg - p vrijednost	0,327	0,117	0,117	0,009	0,028	0,028

Prikazane p vrijednosti dobivene su usporedbom pojedinih proizvoda Mann-Whitney U testom a sve $p < 0,05$ smatrane su značajnima,

Rezultati statističkog testiranja kod ženki (Tablica 46.) ukazuju da je na kraju pokusnog razdoblja došlo do statistički značajnog ($p < 0,05$) povećanja aktivnosti SOD bubrega kod skupine tretirane proizvodom 9 u odnosu na sve skupine, osim skupine tretirane proizvodom 8. Statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenje aktivnosti SOD uočava se kod PKGon u odnosu na sve skupine.

Do statistički značajnog ($p < 0,05$) povećanja aktivnosti SOD-a jetre došlo je kod skupine tretirane proizvodom 9 u odnosu na sve skupine. Statistički značajno povećanje ($p < 0,05$) aktivnosti SOD-a jetra uočava se i kod PKGon u odnosu na K.

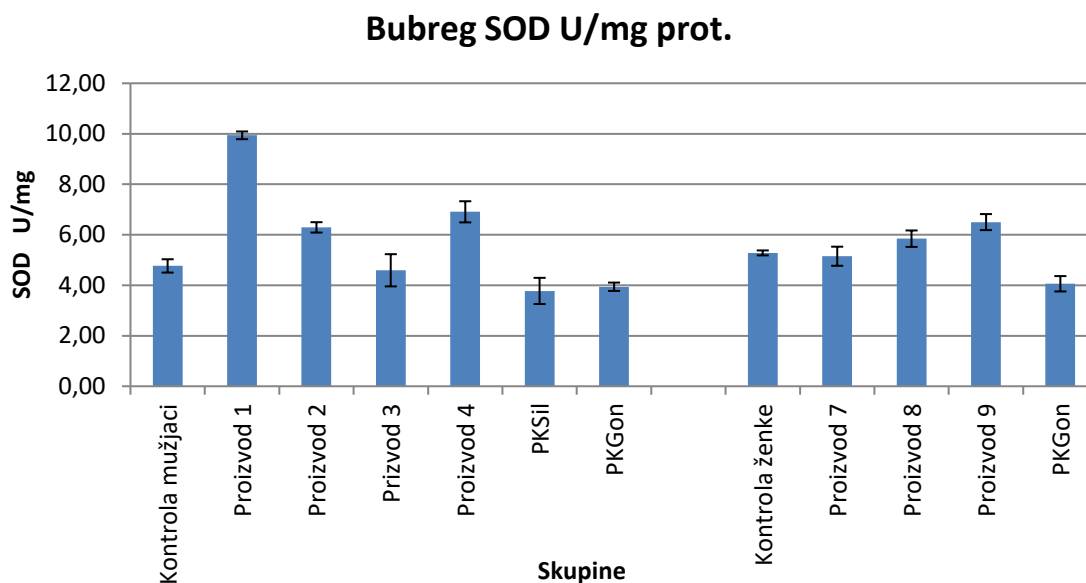
Tablica 45. Aktivnost SOD u ženskih jedinki nakon pokusnog razdoblja izloženih proizvodima 7-9 i pripadajućim kontrolama.

ŽENKE		N	Aritmetička sredina	SD	Medijan	25. centila	75. centila
SOD bubrezi (U/mg)	Kontrola	6	5,28	0,42	5,37	4,95	5,62
	Proizvod 7	6	5,15	0,49	5,37	5,19	5,41
	Proizvod 8	6	5,85	0,67	5,65	5,37	6,01
	Proizvod 9	5	6,5	1,31	5,97	5,71	7,3
	Gonadotropin	6	4,06	0,38	3,88	3,76	4,31
SOD jetra (U/mg)	Kontrola	6	5,27	0,3	5,38	5,08	5,47
	Proizvod 7	6	5,97	1,5	5,2	5,01	6,53
	Proizvod 8	6	6,66	0,42	6,57	6,57	6,6
	Proizvod 9	5	9,46	0,78	9,36	8,91	10
	Gonadotropin	6	6,78	0,85	6,43	6,29	7,04

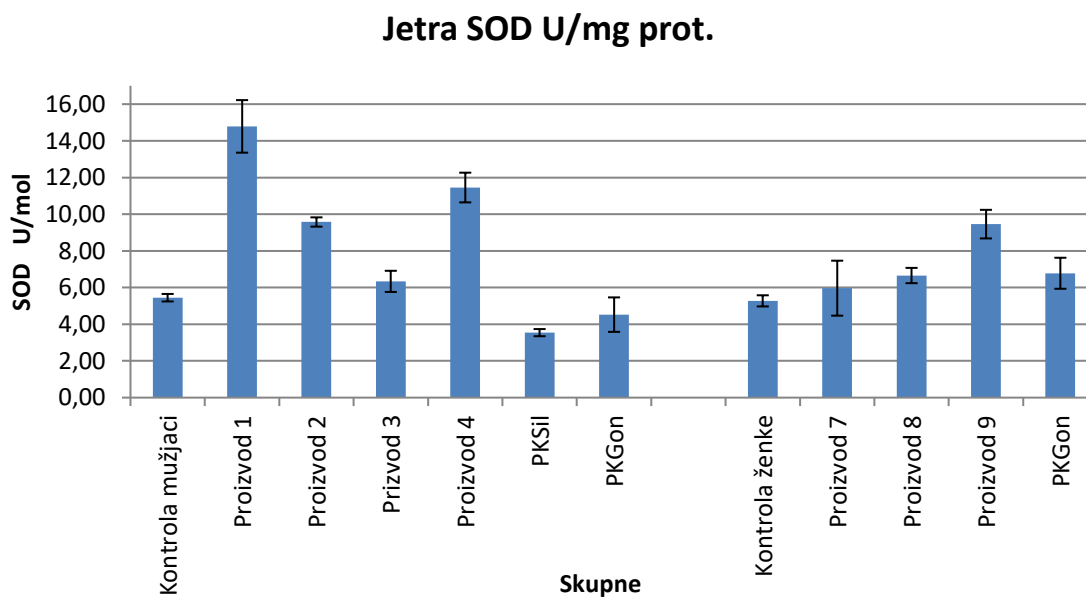
Tablica 46. Statističko testiranje razlike aktivnosti SOD u ženskih jedinki izloženih proizvodima 7-9 i pripadajućim kontrolama.

SOD parametri				
Proizvod 7	Kontrola	Pr. 8	Pr. 9	Gonadotropin
SOD Bubrež U/mg – p vrijednost	0,624	0,117	0,014	0,028
SOD Jetra U/mg – p vrijednost	1,000	0,175	0,014	0,347
Proizvod 8	Kontrola	Pr. 7	Pr. 9	Gonadotropin
SOD Bubrež U/mg – p vrijednost	0,142	0,117	0,327	0,009
SOD Jetra U/mg – p vrijednost	0,014	0,175	0,014	0,754
Proizvod 9	Kontrola	Pr. 7	Pr. 8	Gonadotropin
SOD Bubrež U/mg – p vrijednost	0,021	0,014	0,327	0,014
SOD Jetra U/mg – p vrijednost	0,021	0,014	0,014	0,014
Gonadotropin	Kontrola	Pr. 7	Pr. 8	Pr. 9
SOD Bubrež U/mg – p vrijednost	0,014	0,028	0,009	0,014
SOD Jetra U/mg – p vrijednost	0,014	0,347	0,754	0,014

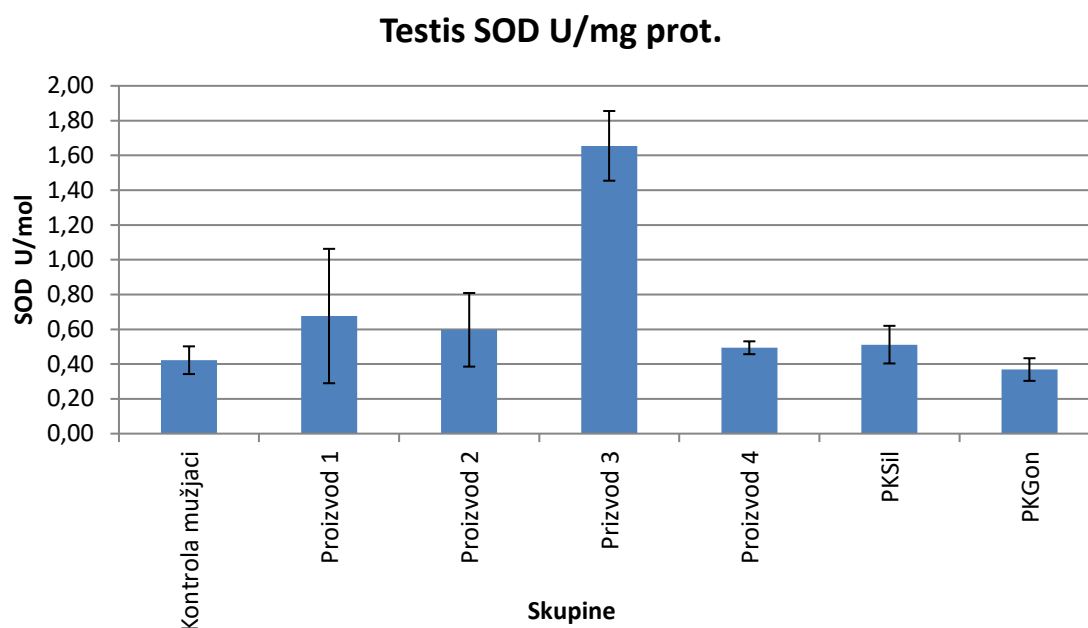
Prikazane p vrijednosti dobivene su usporedbom pojedinih proizvoda Mann-Whitney U testom, a sve $p < 0,05$ smatrane su značajnima



Slika 43. Aktivnost SOD (U/mg prot.) bubrega u muških skupina tretiranih proizvodima 1-4 i u ženskih skupina tretiranih proizvodima 7-9 u odnosu na kontrolnu skupinu i PKSil i PKGon



Slika 44. Aktivnost SOD (U/mg prot.) u jetri u muških skupina tretiranih proizvodima 1-4 i u ženskih skupina tretiranih proizvodima 7-9 u odnosu na kontrolnu skupinu i PKSil i PKGon.



Slika 45. Aktivnost SOD (U/mg prot.) u testisima u muških skupina tretiranih proizvodima 1-4 u odnosu na kontrolnu skupinu i PKSil i PKGon

Koncentracija reduciranog glutationa (GSH) u organima pokusnih životinja

Tablice 47. i 49. prikazuju koncentraciju reduciranog glutationa (GSH-a) u slezeni, bubregu, jetri i testisima mužjaka te slezeni, bubregu i jetri ženki K i skupina životinja izloženih proizvodima 1-4M i 7-9Ž te PKSil i PKGon, nakon 28 dana.

Tablice 48. i 50. prikazuju statističke p vrijednosti i razlike u koncentraciji reduciranog glutationa (GSH-a) između vrijednosti navedenih organa životinja pojedinih pokusnih skupina (kontrolne skupine i skupina ispitivanih proizvoda).

Rezultati statističkog testiranja u mužjaka (Tablica 48.) ukazuju da na kraju pokusnog razdoblja nije došlo do statistički značajnog odstupanja u koncentraciji GSH slezene ni u jednoj skupini. Statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje koncentracije GSH bubrega prisutno je samo kod skupine tretirane proizvodom 2 u odnosu na kontrolu i skupine tretirane proizvodima 1, PKSil i PKGon.

Do statistički značajnog ($p < 0,05$) povećanja u koncentraciji GSH jetre došlo je između skupina tretiranih proizvodom 1, 3 i 4 u odnosu na K. Statistički značajno povećanje GSH jetre prisutno je između skupine tretirane proizvodom 1 u odnosu na skupinu tretiranu proizvodom 4 i PKSil, između skupina tretiranih proizvodima 3 i 4 u odnosu na PKSil te između PKSil i PKGon.

Do statistički značajnog ($p < 0,05$) povećanja u koncentraciji GSH u testisima došlo je između skupina tretiranih proizvodom 1, 2, 3 i PKSil u odnosu na kontrolnu skupinu, a s najvećom vrijednosti kod skupine tretirane proizvodom 2. Kod skupine tretirane proizvodom 1 došlo je do značajnog smanjenja vrijednosti GSH u testisima u odnosu na skupinu tretiranu proizvodom 2, a do značajnog povećanja u odnosu na skupinu tretiranu proizvodom 3 i PKGon. Skupina tretirana proizvodom 2 pokazuje značajno ($p < 0,05$) povećanje vrijednosti GSH u testisima u odnosu na skupine tretirane proizvodima 1, 4, PKSil i PKGon. Statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje uočava se i kod skupine tretirane proizvodom 3 u odnosu na skupine tretirane proizvodom 4, PKSil i PKGon te PKSil u odnosu na PKGon.

Tablica 47. GSH parametri u muških jedinki nakon pokusnog razdoblja izloženosti proizvodima 1-4 i pripadajućim kontrolama.

MUŽJACI		N	Aritmetička sredina	SD	Medijan	25. centila	75. centila
GSH Slezena (μmol/mg)	Kontrola	5	0,93	0,61	0,64	0,61	1,26
	Proizvod 1	6	1,14	0,21	1,07	1,04	1,12
	Proizvod 2	6	1,26	0,4	1,11	1,02	1,29
	Proizvod 3	6	1,01	0,29	1,14	0,72	1,24
	Proizvod 4	6	1,17	0,33	1,12	0,88	1,5
	Sildenafil	6	1,12	0,48	1,03	0,87	1,09
	Gonadotropin	6	1,18	0,55	0,91	0,75	1,75
GSH Bubrezi (μmol/mg)	Kontrola	5	1,19	0,26	1,24	0,98	1,41
	Proizvod 1	6	1,56	0,15	1,63	1,45	1,64
	Proizvod 2	6	1,81	0,21	1,77	1,65	1,85
	Proizvod 3	6	1,83	0,64	1,64	1,53	1,9
	Proizvod 4	6	1,64	0,42	1,5	1,41	1,52
	Sildenafil	6	1,2	0,52	1,5	0,69	1,52
	Gonadotropin	6	1,29	0,17	1,27	1,18	1,33
GSH Jetra (μmol/mg)	Kontrola	5	1,15	0,14	1,09	1,05	1,24
	Proizvod 1	6	1,84	0,18	1,96	1,68	1,98
	Proizvod 2	6	1,87	0,97	1,67	1,42	1,68
	Proizvod 3	6	1,87	0,25	2,04	1,64	2,05
	Proizvod 4	6	1,6	0,22	1,54	1,43	1,67
	Sildenafil	6	1,2	0,23	1,14	1,05	1,32
	Gonadotropin	6	1,74	0,45	1,84	1,58	1,86
GSH Testisi (μmol/mg)	Kontrola	5	1,04	0,15	1,07	0,94	1,14
	Proizvod 1	6	1,56	0,35	1,41	1,4	1,76
	Proizvod 2	6	5,2	1,9	5,85	5,19	6,36
	Proizvod 3	6	4,61	0,95	4,38	4,15	5,1
	Proizvod 4	6	1,16	0,31	1,07	0,98	1,46
	Sildenafil	6	1,5	0,29	1,31	1,31	1,81
	Gonadotropin	6	0,98	0,12	0,93	0,88	1,06

Tablica 48. Statističko testiranje razlika GSH parametara u muških jedinki izloženih proizvodima 1-4 i pripadajućim kontrolama.

GSH parametri						
Proizvod 1	Kontrola	Pr. 2	Pr. 3	Pr. 4	Sildenafil	Gonadotropin
GSH Slezena $\mu\text{mol/mg}$ - p vrijednost	0,221	0,917	0,917	0,917	0,465	0,602
GSH Bubrež $\mu\text{mol/mg}$ - p vrijednost	0,050	0,047	0,602	0,754	0,347	0,028
GSH Jetra $\mu\text{mol/mg}$ - p vrijednost	0,014	0,251	0,465	0,047	0,009	0,465
GSH Testisi $\mu\text{mol/mg}$ - p vrijednost	0,027	0,016	0,009	0,175	0,754	0,009
Proizvod 2	Kontrola	Pr. 1	Pr. 3	Pr. 4	Sildenafil	Gonadotropin
GSH Slezena $\mu\text{mol/mg}$ - p vrijednost	0,142	0,917	0,465	0,754	0,347	0,347
GSH Bubrež $\mu\text{mol/mg}$ - p vrijednost	0,014	0,047	0,465	0,117	0,028	0,009
GSH Jetra $\mu\text{mol/mg}$ - p vrijednost	0,086	0,251	0,465	1,000	0,117	0,602
GSH Testisi $\mu\text{mol/mg}$ - p vrijednost	0,014	0,016	0,251	0,009	0,009	0,009
Proizvod 3	Kontrola	Pr. 1	Pr. 2	Pr. 4	Sildenafil	Gonadotropin
GSH Slezena $\mu\text{mol/mg}$ - p vrijednost	0,327	0,917	0,465	0,465	0,917	0,602
GSH Bubrež $\mu\text{mol/mg}$ - p vrijednost	0,050	0,602	0,465	0,347	0,117	0,076
GSH Jetra $\mu\text{mol/mg}$ - p vrijednost	0,014	0,465	0,465	0,076	0,016	0,602
GSH Testisi $\mu\text{mol/mg}$ - p vrijednost	0,014	0,009	0,251	0,009	0,009	0,009
Proizvod 4	Kontrola	Pr. 1	Pr. 2	Pr. 3	Sildenafil	Gonadotropin
GSH Slezena $\mu\text{mol/mg}$ - p vrijednost	0,221	0,917	0,754	0,465	0,602	0,917
GSH Bubrež $\mu\text{mol/mg}$ - p vrijednost	0,050	0,754	0,117	0,347	0,602	0,076
GSH Jetra $\mu\text{mol/mg}$ - p vrijednost	0,014	0,047	1,000	0,076	0,047	0,465
GSH Testisi $\mu\text{mol/mg}$ - p vrijednost	0,806	0,175	0,009	0,009	0,175	0,347
Sildenafil	Kontrola	Pr. 1	Pr. 2	Pr. 3	Pr. 4	Gonadotropin
GSH Slezena $\mu\text{mol/mg}$ - p vrijednost	0,142	0,465	0,347	0,917	0,602	0,917
GSH Bubrež $\mu\text{mol/mg}$ - p vrijednost	0,624	0,347	0,028	0,117	0,602	0,917
GSH Jetra $\mu\text{mol/mg}$ - p vrijednost	0,806	0,009	0,117	0,016	0,047	0,047
GSH Testisi $\mu\text{mol/mg}$ - p vrijednost	0,014	0,754	0,009	0,009	0,175	0,009
Gonadotropin	Kontrola	Pr. 1	Pr. 2	Pr. 3	Pr. 4	Sildenafil
GSH Slezena $\mu\text{mol/mg}$ - p vrijednost	0,221	0,602	0,347	0,602	0,917	0,917
GSH Bubrež $\mu\text{mol/mg}$ - p vrijednost	0,624	0,028	0,009	0,076	0,076	0,917
GSH Jetra $\mu\text{mol/mg}$ - p vrijednost	0,050	0,465	0,602	0,602	0,465	0,047
GSH Testisi $\mu\text{mol/mg}$ - p vrijednost	0,624	0,009	0,009	0,009	0,347	0,009

Prikazane p vrijednosti dobivene su usporedbom pojedinih proizvoda Mann-Whitney U testom, a sve $p < 0,05$ smatrane su značajnima.

Do statistički značajnog ($p < 0,05$) povećanja u koncentraciji GSH u slezeni ženki došlo je između skupine tretirane proizvodom 7 u odnosu na K i PKGon.

Kod koncentracije GSH bubrega ženki nije doslo do statistički značajnog odstupanja ni u jedno skupini.

Do statistički značajnog ($p < 0,05$) povećanja u koncentraciji GSH u jetri ženki došlo je između skupine tretirane proizvodom 7 u odnosu na skupinu tretiranu proizvodom 8.

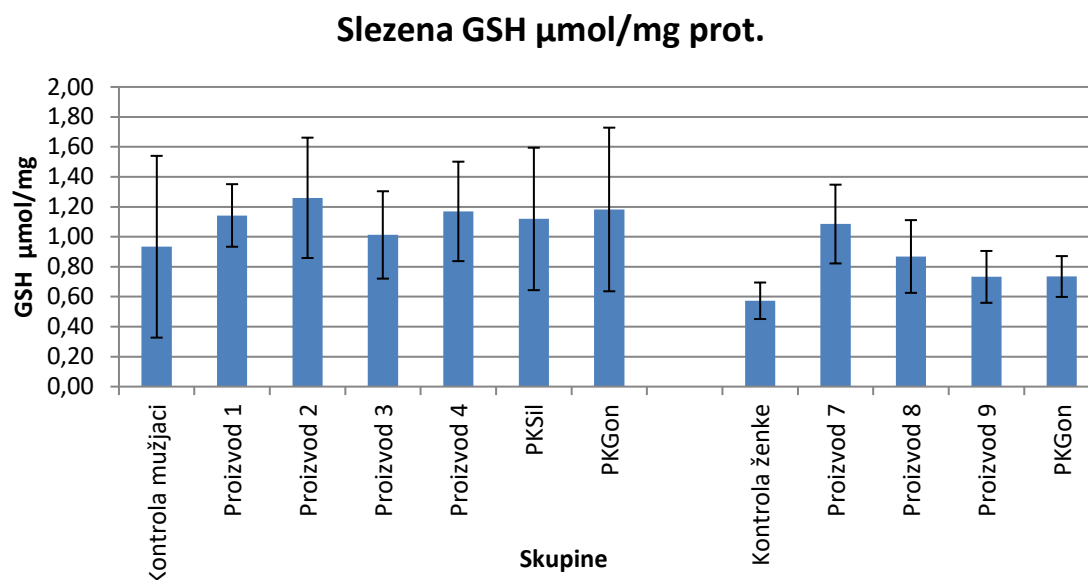
Tablica 49. GSH parametri u ženskih jedinki nakon pokusnog razdoblja izloženosti proizvodima 7-9 i pripadajućim kontrolama.

ŽENKE		N	Aritmetička sredina	SD	Medijan	25. centila	75. centila
GSH Slezena (μmol/mg)	Kontrola	6	0,57	0,12	0,56	0,48	0,67
	Proizvod 7	6	1,08	0,26	1,10	0,93	1,22
	Proizvod 8	6	0,87	0,24	0,82	0,72	0,95
	Proizvod 9	5	0,73	0,17	0,68	0,63	0,83
	Gonadotropin	6	0,73	0,14	0,78	0,61	0,79
GSH Bubrezi (μmol/mg)	Kontrola	6	1,34	0,10	1,34	1,27	1,42
	Proizvod 7	6	1,58	0,38	1,41	1,36	1,85
	Proizvod 8	6	1,41	0,33	1,44	1,15	1,52
	Proizvod 9	5	1,35	0,32	1,25	1,16	1,53
	Gonadotropin	6	1,44	0,30	1,49	1,33	1,57
GSH Jetra (μmol/mg)	Kontrola	6	1,17	0,35	1,16	0,87	1,47
	Proizvod 7	6	1,49	0,34	1,63	1,19	1,77
	Proizvod 8	6	0,99	0,15	1,02	0,87	1,07
	Proizvod 9	5	1,05	0,11	1,02	0,98	1,12
	Gonadotropin	6	1,24	0,22	1,20	1,09	1,34

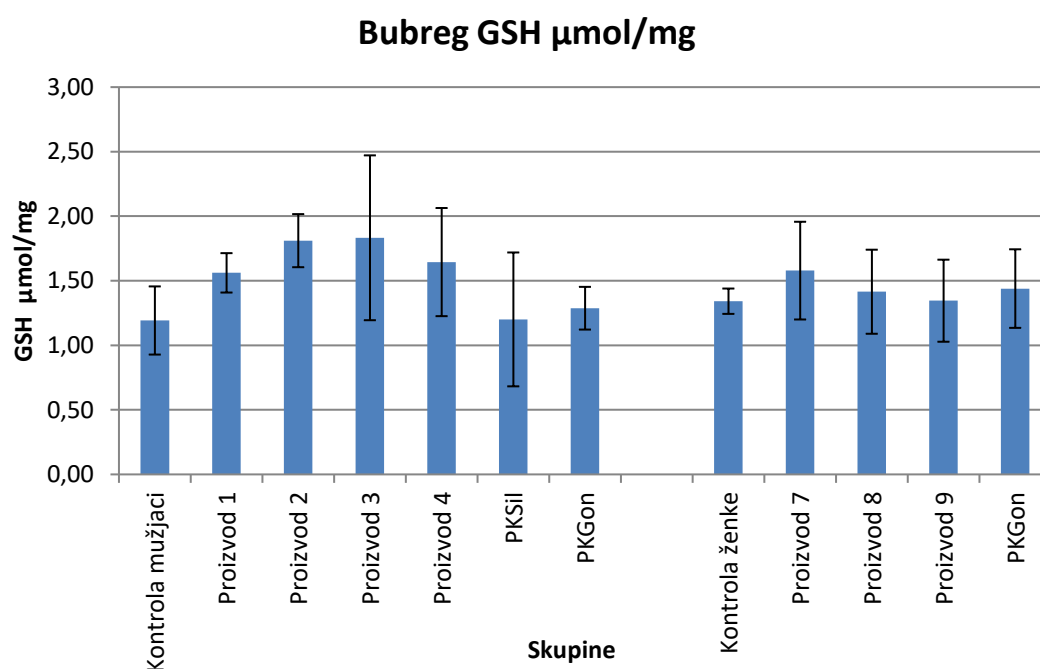
Tablica 50. Statističko testiranje razlika GSH parametara u ženskih jedinki izloženih izloženih proizvodima 7-9 i pripadajućim kontrolama.

GSH parametri				
Proizvod 7	Kontrola	Pr. 8	Pr. 9	Gonadotropin
GSH Slezena μmol/mg – p vrijednost	0,014	0,251	0,050	0,047
GSH Bubrezi μmol/mg – p vrijednost	0,462	0,602	0,221	0,602
GSH Jetra μmol/mg – p vrijednost	0,142	0,028	0,050	0,251
Proizvod 8	Kontrola	Pr. 7	Pr. 9	Gonadotropin
GSH Slezena μmol/mg – p vrijednost	0,050	0,251	0,327	0,251
GSH Bubrezi μmol/mg – p vrijednost	0,806	0,602	0,806	0,917
GSH Jetra μmol/mg – p vrijednost	0,462	0,028	0,624	0,076
Proizvod 9	Kontrola	Pr. 7	Pr. 8	Gonadotropin
GSH Slezena μmol/mg – p vrijednost	0,248	0,050	0,327	1,000
GSH Bubrezi μmol/mg – p vrijednost	0,564	0,221	0,806	0,462
GSH Jetra μmol/mg – p vrijednost	1,000	0,050	0,624	0,221
Gonadotropin	Kontrola	Pr. 7	Pr. 8	Pr. 9
GSH Slezena μmol/mg – p vrijednost	0,142	0,047	0,251	1,000
GSH Bubrezi μmol/mg – p vrijednost	0,327	0,602	0,917	0,462
GSH Jetra μmol/mg – p vrijednost	0,624	0,251	0,076	0,221

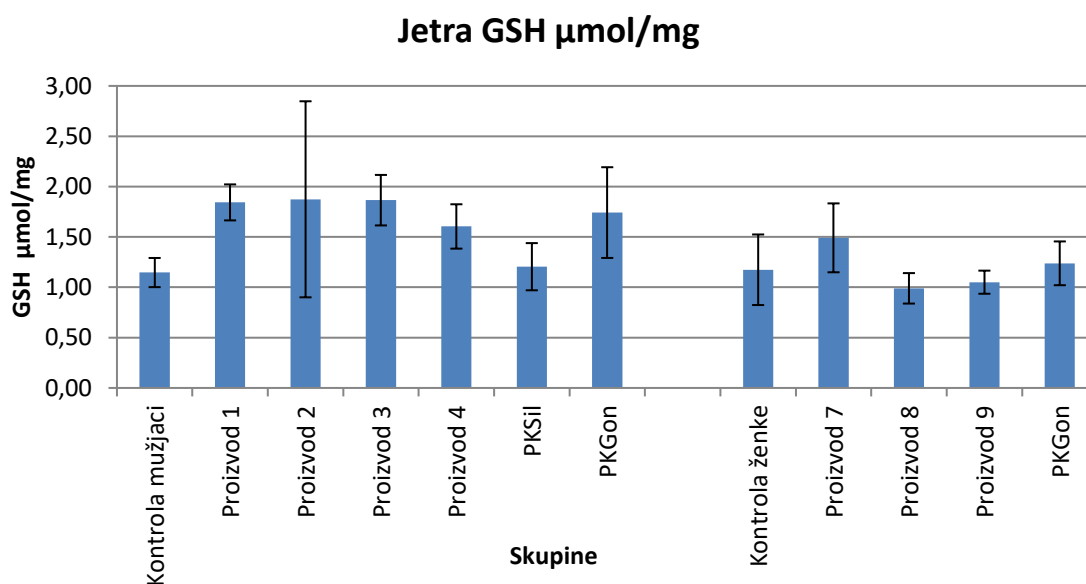
Prikazane p vrijednosti dobivene su usporedbom pojedinih proizvoda Mann-Whitney U testom, a sve $p < 0,05$ smatrane su značajnima.



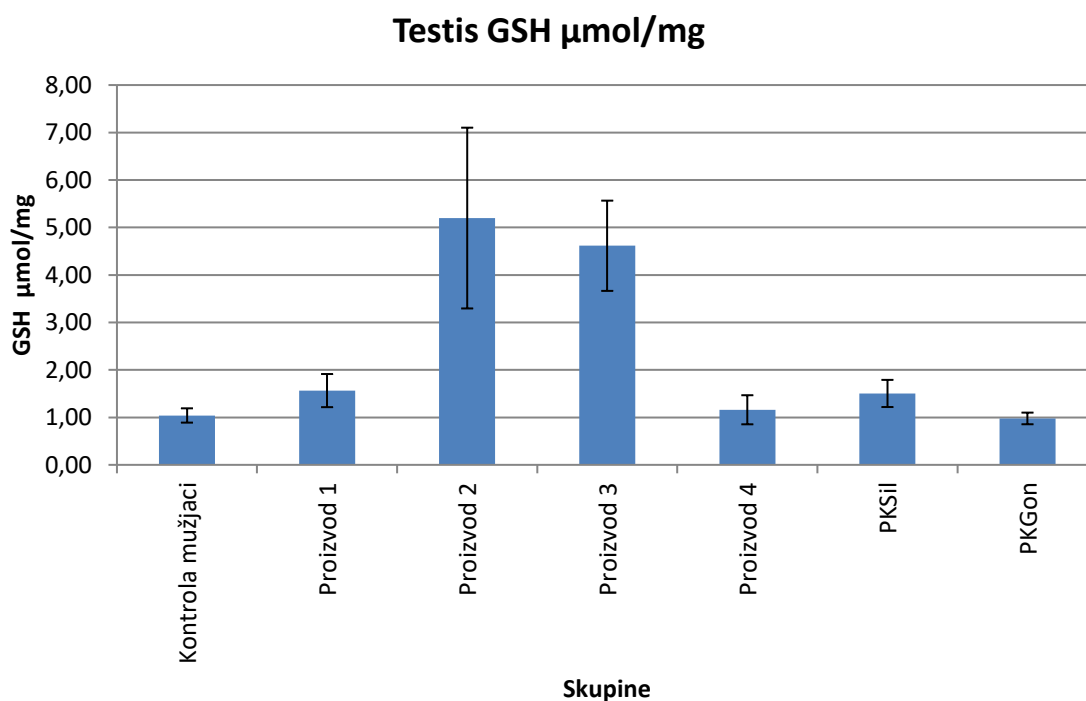
Slika 46. Koncentracija GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ prot.) slezene u muških skupina tretiranih proizvodima 1-4 i u ženskih skupina tretiranih proizvodima 7-9 u odnosu na kontrolnu skupinu i PKSil i PKGon



Slika 47. Koncentracija GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ prot.) bubrega u muških skupina tretiranih proizvodima 1-4 i u ženskih skupina tretiranih proizvodima 7-9 u odnosu na kontrolnu skupinu i PKSil i PKGon.



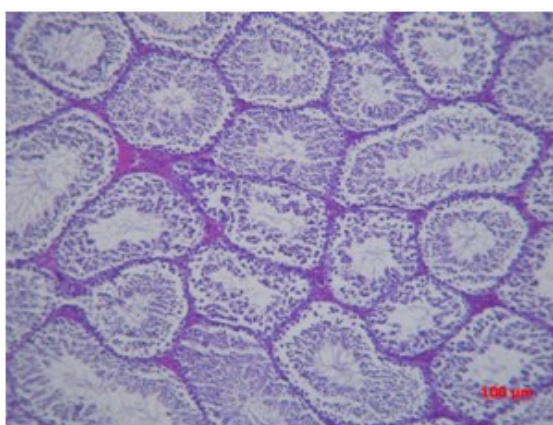
Slika 48. Koncentracija GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ prot.) u muških skupina tretiranih proizvodima 1-4 i u ženskih skupina tretiranih proizvodima 7-9 u odnosu na kontrolnu skupinu i PKSil i PKGon



Slika 49. Koncentracija GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ prot.) u muških skupina tretiranih proizvodima 1-4 i u ženskih skupina tretiranih proizvodima 7-9 u odnosu na kontrolnu skupinu i PKSil i PKGon.

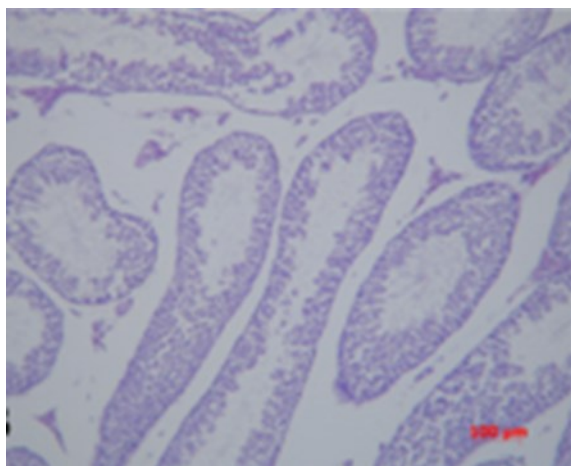
3.2.6. Rezultati histološke analize testisa

Slika 50 prikazuje histološki preparat tkiva testisa miša u kontrolnoj skupini. Sjemeni kanalići smješteni su jedan do drugog s jasno izraženom vezivnom stromom između njih te s jasno izraženim 5-6 redova stanica spermatogenetske loze. Iznad bazalne membrane sjemenih kanalića jasno je uočljiv jedan red spermatogonija (poput biserne ogrlice). U lumenima kanalića nešto spermija. U histološkoj slici testisa miša ne raspoznaju se Sertolijeve stanice između epitela kanalića spermatogeneze niti Leydigove stanice u intersticiju kanalića. Uz testis se vide vezivna ovojnica te kanalići epididimisa koji su obloženi jednorednim cilindričnim epitelom sa stereocilijama, a u lumenu sadrže zrele spermije.

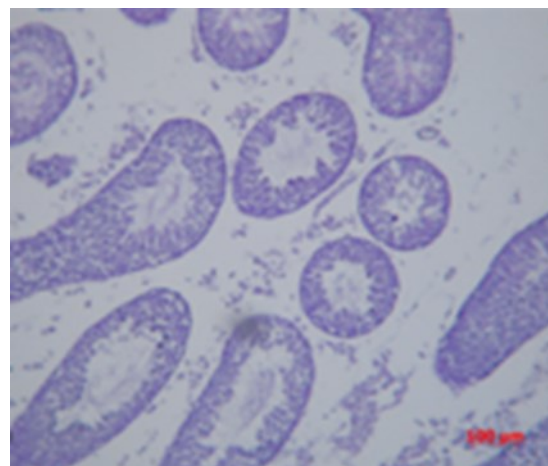


Slika 50. Histološki preparat tkiva testisa u miša kontrolne skupine. Normalni izgled testisa.

Slika 51 prikazuje histološki preparat tkiva testisa miša iz skupine tretirane pozitivnom kontrolom sildenafilom (PKSil). U centru testisa reduciran intersticij. Epitel sjemenih kanalića uredan, nema epididimisa. Na Slici 52. prikazan je histološki pregled tkiva testisa miša iz skupine tretirane gonadotropnim hormonom (PKGon), jako reduciran intersticij između kanalića. Epitel sjemenih kanalića bez nekroze ali je udaljenost tkiva testisa od čahure testisa izrazito velika. Epididimis pravilnog epitela ali bez spermija.

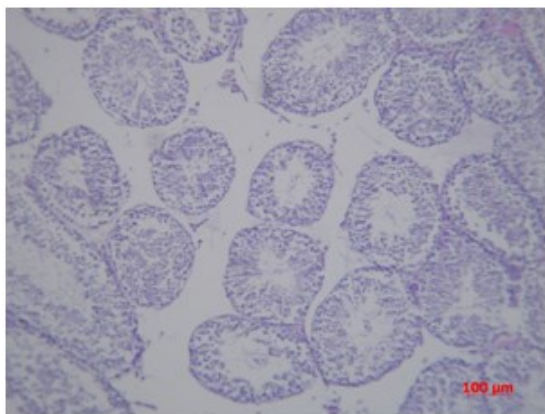


Slika 51. Histološki preparat tkiva testisa u miša tretiranih pozitivnom kontrolom sildenafil (PKSil). Vidljiva redukcija intersticija u centru, nema epididimisa.

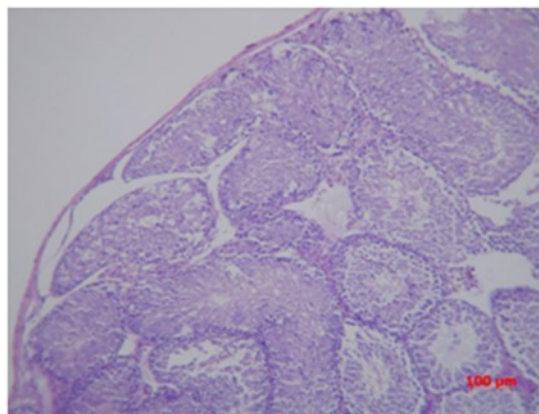


Slika 52. Histološki preparat tkiva testisa u miša tretiranih pozitivnom kontrolom gonodotropina (PKGon). Nije vidljiva nekroza epitela, uočava se velika udaljenost tkiva od čahure

Slika 53. prikazuje histološki preparat tkiva testisa miša iz skupine tretirane proizvodom 1. Vezivo intersticija u centralnom dijelu testisa nedostaje. Epitel sjemenih kanalića pokazuje ishemijsku nekrozu (vide se samo sjene stanica spermatogeneze) posebice u 2-3 reda sjemenih kanalića uz ovojnicu testisa. Epididimis prisutan, kanalići obloženi jednorednim cilindričnim epitelom sa stereocilijama, lumeni bez spermija. Na Slici 54. prikazan je histološki preparat tkiva testisa miša iz skupine tretirane proizvodom 2. Intersticij u centralnom dijelu nedostaje. Epitel kanalića uz vezivnu ovojnicu testisa pokazuje ishemijsku nekrozu (sjene stanica spermatogeneze), a očuvane su spermatogonije. U preparatu nije prisutno tkivo epididimisa.

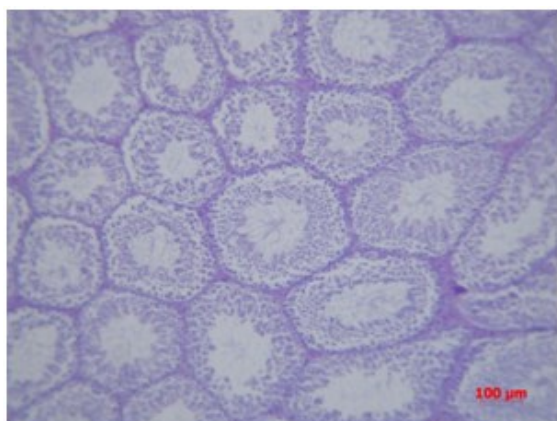


Slika 53. Histološki preparat tkiva testisa u miša tretiranih proizvodom 1. Ishemijska nekroza epitela sjemenih kanalića

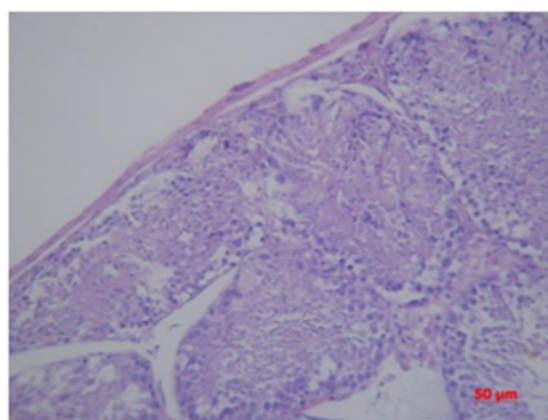


Slika 54. Histološki preparat tkiva testisa u miša tretiranih proizvodom 2. Ishemijska nekroza epitela sjemenih kanalića

Slika 55. prikazuje histološki preparat tkiva testisa miša iz skupine tretirane proizvodom 3. Intersticij u cijelosti očuvan, epitel kanalića bez nekroze, kanalići epididimisa urednog epitela ispunjen spermijem. Na Slici 56. prikazan je histološki preparat tkiva testisa miša iz skupine tretirane proizvodom 4. Centralno u testisu nedostaje intersticij, ishemijska nekroza epitela kanalića uz čahuru testisa ali djelomice i prema centru testisa. Epididimis nedostaje.



Slika 55. Histološki preparat tkiva testisa u miša tretiranih proizvodom 3. Vidljiva ishemijska nekroza epitela sjemenih kanalića.



Slika 56. Histološki preparat tkiva testisa u miša tretiranih proizvodom 4. Vidljiva ishemijska nekroza epitela uz nedostatak epididimisa.

3.3. Spearmanova korelacijska analiza (Rho)

3.3.1. Spearmanov koeficijent korelacije fizioloških parametara životinje i koncentracije pojedinih biljaka zastupljenih u proizvodima

Tablica 48. prikazuje Spearmanov korelacijski koeficijent (Rho) u muških jedinki koji ukazuje na statistički značajnu ($p < 0,05$) srednje jaku povezanost između organosomatskog indeksa slezene i testisa i biljaka *Humulus lupulus*, *Melise officinalis*, *Origanum vulgare* i *Ginko bilobe*.

Tablica 49. prikazuju Spearmanov korelacijski koeficijent (Rho) u ženskih jedinki koji ukazuje na statistički značajnu ($p < 0,05$) srednje jaku povezanost između prirasta životinja (g) i biljaka *Humulus lupulus*, *Melise officinalis*, *Origanum vulgare* i *Ginko bilobe*.

Tablica 48. Korelacijski koeficijenti i povezanost deklarirane količine pojedinih biljaka u proizvodima s ispitivanim kliničkim i histopatološkim parametrima u muških jedinki.

Parametar		<i>Epimedium sagittatum</i>	<i>Panax quinquefolius</i>	<i>Lepidium meyenii</i>	<i>Schisandra chinensis</i>	<i>Tribulus terrestris</i>	<i>Humulus lupulus</i>	<i>Melisa officinalis</i>	<i>Origanum vulgare</i>	<i>Ginkgo biloba</i>
Prirast (g)	Rho	0,046	0,046	0,008	0,030	0,058	-0,093	-0,093	-0,093	-0,093
	p	0,776	0,776	0,963	0,855	0,717	0,562	0,562	0,562	0,562
Jetra HS index (mg)	Rho	0,287	0,287	0,106	0,163	0,099	0,181	0,181	0,181	0,181
	p	0,068	0,068	0,511	0,307	0,537	0,258	0,258	0,258	0,258
Bubreg HS index (mg)	Rho	0,076	0,076	-0,080	0,019	0,227	0,035	0,035	0,035	0,035
	p	0,637	0,637	0,617	0,906	0,153	0,828	0,828	0,828	0,828
Slezena HS index (mg)	Rho	-0,160	-0,160	-0,195	-0,153	0,052	0,309	0,309	0,309	0,309
	p	0,317	0,317	0,222	0,339	0,744	0,049	0,049	0,049	0,049
Testis HS index (mg)	Rho	0,109	0,109	0,242	0,153	-0,128	-0,385	-0,385	-0,385	-0,385
	p	0,499	0,499	0,128	0,341	0,424	0,013	0,013	0,013	0,013

p-vrijednost ili razina značajnosti (vrijednost je značajna ako je $p < 0,05$).

Rho – Spearmanov korelacijski koeficijent

- Slaba povezanost ($\rho < 0,200$)
- Srednje jaka povezanost ($\rho 0,200-0,600$)
- Jaka povezanost ($\rho > 0,600$)

Tablica 49. Korelacijski koeficijenti i povezanost deklarirane količine pojedinih biljaka u proizvodima s ispitivanim kliničkim i histopatološkim parametrima u ženskih jedinki.

Parametar		<i>Epimedium sagittatum</i>	<i>Lepidium meyenii</i>	<i>Tribulus terrestris</i>	<i>Humulus lupulus</i>	<i>Melisa officinalis</i>	<i>Origanum vulgare</i>	<i>Ginkgo biloba</i>	<i>Turnera diffusa</i>	<i>Ilex paraguariensis</i>	<i>Smilax officinalis</i>	<i>Sarsaparilla officinalis</i>
Prirast (g)	Rho	0,099	0,142	0,142	0,382	0,382	0,382	0,382	0,099	0,010	0,010	0,142
	p	0,608	0,461	0,461	0,041	0,041	0,041	0,041	0,608	0,958	0,958	0,461
Jetra HS index (mg)	Rho	0,182	0,108	0,108	-0,133	-0,133	-0,133	-0,133	0,182	0,119	0,119	0,108
	p	0,353	0,585	0,585	0,501	0,501	0,501	0,501	0,353	0,548	0,548	0,585
Bubreg HS index (mg)	Rho	0,204	0,075	0,075	-0,029	-0,029	-0,029	-0,029	0,204	0,162	0,162	0,075
	p	0,298	0,703	0,703	0,884	0,884	0,884	0,884	0,298	0,411	0,411	0,703
Slezena HS index (mg)	Rho	0,270	0,065	0,065	-0,202	-0,202	-0,202	-0,202	0,270	0,237	0,237	0,065
	p	0,164	0,744	0,744	0,303	0,303	0,303	0,303	0,164	0,225	0,225	0,744
Ovariji+Uterus HS index(mg)	Rho	-0,074	-0,334	-0,334	0,098	0,098	0,098	0,098	-0,074	0,140	0,140	-0,334
	p	0,709	0,082	0,082	0,619	0,619	0,619	0,619	0,709	0,477	0,477	0,082

p-vrijednost ili razina značajnosti (vrijednost je značajna ako je $p < 0,05$).

Rho – Spearmanov korelacijski koeficijent.

- Slaba povezanost ($\rho < 0,200$)
- Srednje jaka povezanost ($\rho 0,200-0,600$)
- Jaka povezanost ($\rho > 0,600$)

3.3.2. Spearmanov koeficijent korelacije hematoloških parametara životinje i koncentracije biljaka zastupljenih u proizvodima

Tablica 50. prikazuje Spearmanov korelacijski koeficijent (Rho) u muških jedinki koji ukazuje na statistički značajnu ($p < 0,05$) srednje jaku povezanost između vremena zgrušavanja krvi, eritrocita, HGB-a, hematokrita, dist. eritrocita, leukocita, limfocita i testosterona i biljaka *Humulus lupulus*, *Melise officinalis*, *Origanum vulgare* i *Ginko bilobe*. Statistički značajna ($p < 0,05$) jaka povezanost prisutna je između neutrofila i biljaka *Humulus lupulus*, *Melise officinalis*, *Origanum vulgare* i *Ginko bilobe*.

Tablica 51. prikazuje Spearmanov korelacijski koeficijent (Rho) u ženskih jedinki koji ukazuje na statistički značajnu ($p < 0,05$) srednje jaku povezanost između vremena zgrušavanja krvi i biljaka *Epimedium sagittatum* i *Turnere diffusa*, zatim između eritrocita i hematokrita i biljaka *Lepidium meyenii*, *Tribulus terrestris*, *Humulus lupulus*, *Melise officinalis*, *Origanum vulgare*, *Ginko bilobe* i *Sarsaparille officinalis*, između HGB-a i biljaka *Epimedium sagittatum*, *Lepidium meyenii*, *Tribulus terrestris*, *Humulus lupulus*, *Melise officinalis*, *Origanum vulgare*, *Ginko bilobe*, *Turnere diffusa* i *Sarsaparille officinalis*. Srednje jaka statistički značajna ($p < 0,05$) povezanost utvrđena je i između MCV, MCHC i MPV i biljaka *Epimedium sagittatum*, *Lepidium meyenii*, *Tribulus terrestris*, *Turnere diffusa* i *Sarsaparille officinalis*.

Tablica 50. Korelacijski koeficijenti i povezanost deklarirane količine pojedinih biljaka u proizvodima s ispitivanim laboratorijskim parametrima u krvi muških jedinki.

Parametar		<i>Epimedium sagittatum</i>	<i>Panax quinquefolius</i>	<i>Lepidium meyenii</i>	<i>Schisandra chinensis</i>	<i>Tribulus terrestris</i>	<i>Humulus lupulus</i>	<i>Melisa officinalis</i>	<i>Origanum vulgare</i>	<i>Ginkgo biloba</i>
Vrijeme zgrušavanja (s)	Rho	-0,091	-0,091	-0,235	-0,183	-0,052	0,320	0,320	0,320	0,320
	P	0,572	0,572	0,140	0,252	0,745	0,041	0,041	0,041	0,041
Eritrociti (10E12/L)	Rho	-0,051	-0,051	-0,095	-0,087	-0,076	0,404	0,404	0,404	0,404
	P	0,758	0,758	0,564	0,599	0,647	0,011	0,011	0,011	0,011
Hgb (g/L)	Rho	-0,054	-0,054	-0,122	-0,102	-0,066	0,461	0,461	0,461	0,461
	P	0,746	0,746	0,460	0,539	0,688	0,003	0,003	0,003	0,003
Hematokrit	Rho	-0,001	-0,001	-0,096	-0,062	-0,025	0,401	0,401	0,401	0,401
	P	0,994	0,994	0,561	0,706	0,879	0,011	0,011	0,011	0,011
MCV (fL)	Rho	0,180	0,180	0,075	0,128	0,148	-0,101	-0,101	-0,101	-0,101
	P	0,274	0,274	0,651	0,436	0,367	0,540	0,540	0,540	0,540
MCH(pg)	Rho	0,236	0,236	0,117	0,198	0,286	0,067	0,067	0,067	0,067
	P	0,147	0,147	0,479	0,227	0,077	0,686	0,686	0,686	0,686
MCHC (g/L)	Rho	-0,161	-0,161	-0,170	-0,162	-0,063	0,237	0,237	0,237	0,237
	P	0,328	0,328	0,300	0,325	0,702	0,146	0,146	0,146	0,146
Distr. Eritroc (%)	Rho	0,018	0,018	-0,111	-0,081	-0,101	0,528	0,528	0,528	0,528
	P	0,912	0,912	0,501	0,626	0,540	0,001	0,001	0,001	0,001
Trombociti(10E9/L)	Rho	0,173	0,173	0,117	0,152	0,152	0,107	0,107	0,107	0,107
	P	0,292	0,292	0,478	0,356	0,357	0,515	0,515	0,515	0,515
MPV(fL)	Rho	-0,082	-0,082	-0,117	-0,037	0,282	0,006	0,006	0,006	0,006
	P	0,618	0,618	0,476	0,822	0,082	0,969	0,969	0,969	0,969
Leukociti(10E9/L)	Rho	-0,042	-0,042	-0,121	-0,109	-0,124	0,374	0,374	0,374	0,374
	P	0,801	0,801	0,463	0,508	0,454	0,019	0,019	0,019	0,019

Parametar		<i>Epimedium sagittatum</i>	<i>Panax quinquefolius</i>	<i>Lepidium meyenii</i>	<i>Schisandra chinensis</i>	<i>Tribulus terrestris</i>	<i>Humulus lupulus</i>	<i>Melisa officinalis</i>	<i>Origanum vulgare</i>	<i>Ginkgo biloba</i>
Neutrofili (%)	Rho	0,080	0,080	0,023	0,040	0,000	0,607	0,607	0,607	0,607
	P	0,649	0,649	0,895	0,818	1,000	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Limfociti (%)	Rho	-0,107	-0,107	-0,155	-0,123	-0,007	-0,406	-0,406	-0,406	-0,406
	P	0,536	0,536	0,367	0,476	0,967	0,014	0,014	0,014	0,014
Monociti (%)	Rho	-0,008	-0,008	-0,116	-0,024	0,231	0,193	0,193	0,193	0,193
	P	0,962	0,962	0,481	0,882	0,158	0,240	0,240	0,240	0,240
Eozinofili (%)	Rho	-0,208	-0,208	-0,219	-0,214	-0,107	0,083	0,083	0,083	0,083
	P	0,211	0,211	0,186	0,197	0,523	0,621	0,621	0,621	0,621
bazof (%)	Rho	-0,128	-0,128	-0,128	-0,128	-0,071	-0,071	-0,071	-0,071	-0,071
	P	0,444	0,444	0,444	0,444	0,671	0,671	0,671	0,671	0,671
TESTOSTERON (pg/ml)	Rho	-0,096	-0,096	-0,058	-0,078	-0,073	0,389	0,389	0,389	0,389
	P	0,562	0,562	0,724	0,635	0,660	0,014	0,014	0,014	0,014
ESTRADIOL (pg/ml)	Rho	-0,184	-0,184	-0,257	-0,285	-0,316	0,254	0,254	0,254	0,254
	P	0,268	0,268	0,119	0,083	0,053	0,124	0,124	0,124	0,124

p-vrijednost ili razina značajnosti (vrijednost je značajna ako je $p < 0,05$).

Rho – Spearmanov korelacijski koeficijent.

 Slaba povezanost ($\rho < 0,200$)

 Srednje jaka povezanost ($\rho 0,200-0,600$)

 Jaka povezanost ($\rho > 0,600$)

Tablica 51. Korelacijski koeficijenti i povezanost deklarirane količine pojedinih biljaka u proizvodima s ispitivanim laboratorijskim parametrima u krvi ženskih jedinki.

Parametar		<i>Epimedium sagittatum</i>	<i>Lepidium meyenii</i>	<i>Tribulus terrestris</i>	<i>Humulus lupulus</i>	<i>Melisa officinalis</i>	<i>Origanum vulgare</i>	<i>Ginkgo biloba</i>	<i>Turnera diffusa</i>	<i>Ilex paraguariensis</i>	<i>Smilax officinalis</i>	<i>Sarsaparilla officinali</i>
Vrijeme zgrušavanja (s)	Rho	-0,467	-0,257	-0,257	0,305	0,305	0,305	0,305	-0,467	-0,318	-0,318	-0,257
	p	0,011	0,179	0,179	0,107	0,107	0,107	0,107	0,011	0,092	0,092	0,179
Eritrociti (10E12/L)	Rho	-0,312	-0,509	-0,509	0,478	0,478	0,478	0,478	-0,312	0,006	0,006	-0,509
	p	0,113	0,007	0,007	0,012	0,012	0,012	0,012	0,113	0,977	0,977	0,007
Hgb (g/L)	Rho	-0,403	-0,557	-0,557	0,510	0,510	0,510	0,510	-0,403	-0,057	-0,057	-0,557
	p	0,037	0,003	0,003	0,007	0,007	0,007	0,007	0,037	0,776	0,776	0,003
Hematokrit	Rho	-0,255	-0,418	-0,418	0,527	0,527	0,527	0,527	-0,255	0,006	0,006	-0,418
	p	0,199	0,030	0,030	0,005	0,005	0,005	0,005	0,199	0,977	0,977	0,030
MCV (fL)	Rho	0,443	0,476	0,476	0,000	0,000	0,000	0,000	0,443	0,149	0,149	0,476
	p	0,021	0,012	0,012	1,000	1,000	1,000	1,000	0,021	0,458	0,458	0,012
MCH(pg)	Rho	0,095	0,144	0,144	0,068	0,068	0,068	0,068	0,095	0,006	0,006	0,144
	p	0,636	0,474	0,474	0,737	0,737	0,737	0,737	0,636	0,977	0,977	0,474
MCHC (g/L)	Rho	-0,413	-0,464	-0,464	-0,049	-0,049	-0,049	-0,049	-0,413	-0,126	-0,126	-0,464
	p	0,032	0,015	0,015	0,808	0,808	0,808	0,808	0,032	0,531	0,531	0,015
Distr. Eritroc (%)	Rho	0,087	-0,040	-0,040	0,239	0,239	0,239	0,239	0,087	0,115	0,115	-0,040
	p	0,665	0,843	0,843	0,230	0,230	0,230	0,230	0,665	0,569	0,569	0,843
Trombociti(10E9/L)	Rho	0,197	0,046	0,046	0,184	0,184	0,184	0,184	0,197	0,172	0,172	0,046
	p	0,325	0,821	0,821	0,359	0,359	0,359	0,359	0,325	0,392	0,392	0,821

Parametar		<i>Epimedium sagittatum</i>	<i>Lepidium meyenii</i>	<i>Tribulus terrestris</i>	<i>Humulus lupulus</i>	<i>Melisa officinalis</i>	<i>Origanum vulgare</i>	<i>Ginkgo biloba</i>	<i>Turnera diffusa</i>	<i>Ilex paraguariensis</i>	<i>Smilax officinalis</i>	<i>Sarsaparilla officinali</i>
MPV(fL)	Rho	0,512	0,539	0,539	-0,087	-0,087	-0,087	-0,087	0,512	0,180	0,180	0,539
	p	0,006	0,004	0,004	0,667	0,667	0,667	0,667	0,006	0,370	0,370	0,004
Leukociti(10E9/L)	Rho	-0,165	-0,247	-0,247	0,123	0,123	0,123	0,123	-0,165	-0,011	-0,011	-0,247
	p	0,410	0,215	0,215	0,542	0,542	0,542	0,542	0,410	0,955	0,955	0,215
Neutrofili (%)	Rho	-0,126	-0,275	-0,275	0,073	0,073	0,073	0,073	-0,126	0,046	0,046	-0,275
	p	0,530	0,166	0,166	0,716	0,716	0,716	0,716	0,530	0,821	0,821	0,166
Limfociti (%)	Rho	0,081	0,229	0,229	-0,031	-0,031	-0,031	-0,031	0,081	-0,063	-0,063	0,229
	p	0,688	0,251	0,251	0,880	0,880	0,880	0,880	0,688	0,755	0,755	0,251
Monociti (%)	Rho	0,152	0,172	0,172	-0,233	-0,233	-0,233	-0,233	0,152	0,046	0,046	0,172
	p	0,449	0,391	0,391	0,242	0,242	0,242	0,242	0,449	0,820	0,820	0,391
Eozinofili (%)	Rho	0,228	-0,165	-0,165	-0,354	-0,354	-0,354	-0,354	0,228	0,338	0,338	-0,165
	p	0,253	0,409	0,409	0,070	0,070	0,070	0,070	0,253	0,085	0,085	0,409
TESTOSTERON (pg/ml)	Rho	0,088	-0,027	-0,027	-0,277	-0,277	-0,277	-0,277	0,088	0,108	0,108	-0,027
	p	0,658	0,892	0,892	0,153	0,153	0,153	0,153	0,658	0,585	0,585	0,892
ESTRADIOL (pg/ml)	Rho	-0,082	-0,081	-0,081	-0,046	-0,046	-0,046	-0,046	-0,082	-0,032	-0,032	-0,081
	p	0,678	0,683	0,683	0,815	0,815	0,815	0,815	0,678	0,870	0,870	0,683

p-vrijednost ili razina značajnosti (vrijednost je značajna ako je $p < 0,05$).

Rho – Spearmanov korelacijski koeficijent.

- Slaba povezanost ($\rho < 0,200$)
- Srednje jaka povezanost ($\rho 0,200-0,600$)
- Jaka povezanost ($\rho > 0,600$)

3.3.3. Spearmanov koeficijent korelacije oksidacijskog stresa u životinja i koncentracije biljaka zastupljenih u proizvodima

Tablica 52. prikazuje Spearmanov korelacijski koeficijent (Rho) u muških jedinki koji ukazuje na statistički značajnu ($p < 0,05$) srednje jaku povezanost između MDA bubrega i biljaka *Lepidium meyenii*, *Schisandra chinensis* i *Tribulus terrestris*, zatim između MDA jetra i biljaka *Tribulus terrestris*, *Humulus lupulus*, *Melise officinalis*, *Origanum vulgare* i *Ginko bilobe*. Statistički značajna ($p < 0,05$) srednje jaka povezanost prisutna je i između GSH bubrega i biljaka *Humulus lupulus*, *Melise officinalis*, *Origanum vulgare* i *Ginko bilobe*, između GSH jetra i biljaka *Epimedium sagittatum*, *Panax quinquefolius*, *Lepidium meyenii* i *Schisandra chinensis*, između SOD bubrega i SOD jetre i biljki *Lepidium meyenii* i *Tribulus terrestris* te SOD bubrega i *Schisandra chinensis*. Srednje jaka statistički značajna ($p < 0,05$) povezanost prisutna je i kod MDA i GSH testisa i biljaka *Humulus lupulus*, *Melise officinalis*, *Origanum vulgare* i *Ginko bilobe* te između SOD testisa i *Lepidium meyenii* i *Schisandra chinensis*. Statistički značajna ($p < 0,05$) jaka povezanost kod muških jedinki prisutna je između MDA bubrega i SOD bubrega i biljaka *Epimedium sagittatum* i *Panax quinquefolius* te između SOD jetra i *Epimedium sagittatum*, *Panax quinquefolius* i *Schisandra chinensis*.

Tablica 53. prikazuje Spearmanov korelacijski koeficijent (Rho) kod ženskih jedinki koji ukazuje na statistički značajnu ($p < 0,05$) srednje jaku povezanost između MDA slezene i *Ilex paraguariensis* i *Smilax officinalis* te između MDA bubrega i *Lepidium meyenii*, *Tribulus terrestris*, *Humulus lupulus*, *Melisa officinalis*, *Origanum vulgare*, *Ginkgo biloba* i *Sarsaparille officinalis*, između GSH slezene i jetre i *Ilex paraguariensis* i *Smilax officinalis* te između SOD bubrega i *Humulus lupulus*, *Melise officinalis*, *Origanum vulgare* i *Ginko bilobe*. Statistički značajna ($p < 0,05$) jaka povezanost prisutna je između MDA i GSH slezene i biljaka *Epimedium sagittatum* i *Turnera diffusa* te između SOD jetra i *Humulus lupulus*, *Melise officinalis*, *Origanum vulgare* i *Ginko bilobe*

Tablica 52. Korelacijski koeficijenti i povezanost deklarirane količine pojedinih biljaka u proizvodima s ispitivanim parametrima oksidacijskog stresa u muških jedinki.

Parametar		<i>Epimedium Sagittatum</i>	<i>Panax Ginseng</i>	<i>Lepidium Meyenili</i>	<i>Schisandra Chinensis</i>	<i>Tribulus Terrestris</i>	<i>Humulus lupulus</i>	<i>Melisa officinalis</i>	<i>Origanum Vulgare</i>	<i>Ginkgo biloba</i>
MDA Slezena (nmol/mg)	Rho	-0,022	-0,022	-0,328	-0,227	-0,063	0,165	0,165	0,165	0,165
	p	0,901	0,901	0,058	0,197	0,721	0,351	0,351	0,351	0,351
MDA Bubrezi (nmol/mg)	Rho	0,736	0,736	0,504	0,599	0,402	-0,275	-0,275	-0,275	-0,275
	p	<0,001	<0,001	0,002	<0,001	0,018	0,115	0,115	0,115	0,115
MDA Jetra (nmol/mg)	Rho	-0,044	-0,044	0,132	-0,048	-0,538	0,470	0,470	0,470	0,470
	p	0,804	0,804	0,458	0,790	0,001	0,005	0,005	0,005	0,005
GSH Slezena (umol/mg)	Rho	0,116	0,116	0,062	0,089	0,089	0,174	0,174	0,174	0,174
	p	0,513	0,513	0,727	0,616	0,617	0,326	0,326	0,326	0,326
GSH Bubrezi (umol/mg)	Rho	0,224	0,224	0,287	0,250	0,047	0,453	0,453	0,453	0,453
	p	0,202	0,202	0,100	0,154	0,794	0,007	0,007	0,007	0,007
GSH Jetra (umol/mg)	Rho	0,361	0,361	0,435	0,364	-0,017	0,025	0,025	0,025	0,025
	p	0,036	0,036	0,010	0,034	0,924	0,887	0,887	0,887	0,887
SOD bubrezi (U/mg)	Rho	0,659	0,659	0,410	0,508	0,351	0,241	0,241	0,241	0,241
	p	<0,001	<0,001	0,016	0,002	0,042	0,169	0,169	0,169	0,169
SOD jetra (U/mg)	Rho	0,760	0,760	0,549	0,633	0,402	0,190	0,190	0,190	0,190
	p	<0,001	<0,001	0,001	<0,001	0,018	0,281	0,281	0,281	0,281
MDA Testisi (nmol/mg)	Rho	-0,061	-0,061	0,178	0,022	-0,334	0,571	0,571	0,571	0,571
	p	0,733	0,733	0,315	0,901	0,053	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
GSH Testis umol/mg prot	Rho	0,011	0,011	0,241	0,094	-0,275	0,546	0,546	0,546	0,546
	p	0,951	0,951	0,170	0,598	0,115	0,001	0,001	0,001	0,001
SOD Testisi (U/mg)	Rho	0,319	0,319	0,551	0,407	-0,106	0,055	0,055	0,055	0,055
	p	0,066	0,066	0,001	0,017	0,551	0,757	0,757	0,757	0,757

p-vrijednost ili razina značajnosti (vrijednost je značajna ako je $p < 0,05$).

Rho – Spearmanov korelacijski koeficijent.

- Slaba povezanost ($\rho < 0,200$)
- Srednje jaka povezanost ($\rho 0,200-0,600$)
- Jaka povezanost ($\rho > 0,600$)

Tablica 53. Korelacijski koeficijenti i povezanost deklarirane količine pojedinih biljaka u proizvodima s ispitivanim parametrima oksidacijskog stresa u ženskih jedinki.

Parametar		<i>Epimedium Sagittatum</i>	<i>Lepidium Meyenili</i>	<i>Tribulus Terrestris</i>	<i>Humulus lupulus</i>	<i>Melisa officinalis</i>	<i>Origanum Vulgare</i>	<i>Ginkgo biloba</i>	<i>Turnera diffusa</i>	<i>Ilex paraguariensis</i>	<i>Smilax Officinalis</i>	<i>Sarsaparilla officinali</i>
MDA Slezena (nmol/mg)	Rho	0,605	0,127	0,127	0,035	0,035	0,035	0,035	0,605	0,540	0,540	0,127
	P	0,002	0,563	0,563	0,876	0,876	0,876	0,876	0,002	0,008	0,008	0,563
MDA Bubrezi (nmol/mg)	Rho	-0,214	-0,540	-0,540	0,484	0,484	0,484	0,484	-0,214	0,127	0,127	-0,540
	P	0,326	0,008	0,008	0,019	0,019	0,019	0,019	0,326	0,563	0,563	0,008
MDA Jetra (nmol/mg)	Rho	-0,126	-0,350	-0,350	-0,086	-0,086	-0,086	-0,086	-0,126	0,095	0,095	-0,350
	P	0,567	0,102	0,102	0,695	0,695	0,695	0,695	0,567	0,665	0,665	0,102
GSH Slezena (umol/mg)	Rho	0,630	0,191	0,191	-0,138	-0,138	-0,138	-0,138	0,630	0,524	0,524	0,191
	P	0,001	0,383	0,383	0,529	0,529	0,529	0,529	0,001	0,010	0,010	0,383
GSH Bubrezi (umol/mg)	Rho	0,191	-0,016	-0,016	-0,190	-0,190	-0,190	-0,190	0,191	0,207	0,207	-0,016
	P	0,382	0,943	0,943	0,385	0,385	0,385	0,385	0,382	0,344	0,344	0,943
GSH Jetra (umol/mg)	Rho	0,225	-0,381	-0,381	-0,190	-0,190	-0,190	-0,190	0,225	0,477	0,477	-0,381
	P	0,301	0,073	0,073	0,385	0,385	0,385	0,385	0,301	0,021	0,021	0,073
SOD bubrezi (U/mg)	Rho	0,080	0,350	0,350	0,553	0,553	0,553	0,553	0,080	-0,143	-0,143	0,350
	P	0,718	0,102	0,102	0,006	0,006	0,006	0,006	0,718	0,515	0,515	0,102
SOD jetra (U/mg)	Rho	-0,245	0,127	0,127	0,657	0,657	0,657	0,657	-0,245	-0,334	-0,334	0,127
	P	0,259	0,563	0,563	0,001	0,001	0,001	0,001	0,259	0,120	0,120	0,563

p-vrijednost ili razina značajnosti (vrijednost je značajna ako je $p < 0,05$).

Rho – Spearmanov korelacijski koeficijent.

- Slaba povezanost ($\rho < 0,200$)
- Srednje jaka povezanost ($\rho 0,200-0,600$)
- Jaka povezanost ($\rho > 0,600$)

3.3.4. Spearmanov koeficijent korelacije saplemenata, teških metala i pesticida i koncentracije biljaka zastupljenih u proizvodima

Tablica 54. prikazuju Spearmanov korelacijski koeficijent (Rho) kod muških jedinki koji ukazuje na statistički značajnu ($p < 0,05$) srednje jaku povezanost između sildenafili i biljaka *Epimedium sagittatum* i *Panax quinquefolius*, između L-arginina i *Lepidium meyenili*, između olova i *Tribulus terrestris* te između pesticida bioallethrina, cyfluthrina-beta 3 i miklobutanila i biljaka *Epimedium sagittatum*, *Panax quinquefolius* i *Lepidium meyenii* te između biljke *Schisandra chinensis* i pesticida cypermetrina 2 i 3.

Statistički značajna ($p < 0,05$) jaka povezanost kod muških jedinki prisutna je između sildenafili i biljaka *Epimedium sagittatum* i *Schisandra chinensis*, između L-arginina i *Epimedium sagittatum*, *Panax quinquefolius* i *Schisandra chinensis* te između cypermetrina 2 i 3 i biljke *Lepidium meyenii*.

Tablica 55. prikazuju Spearmanov korelacijski koeficijent (Rho) kod ženskih jedinki koji ukazuje na statistički značajnu ($p < 0,05$) srednje jaku povezanost između L-arginina i *Epimedium sagittatum* te između bioallethrina, cyfluthrina-beta 3 i miklobutanila i biljaka *Epimedium sagittatum* i *Turnera diffusa*.

Statistički značajna ($p < 0,05$) jaka povezanost prisutna je između sildenafili i biljaka *Humulus lupulus*, *Melise officinalis*, *Origanum vulgare* i *Ginko bilobe* te između olova i biljaka *Epimedium sagittatum*, *Turnera diffusa*, *Ilex paraguariensis* i *Smilax Officinalis*.

Tablica 54. Korelacijski koeficijenti i povezanost deklarirane količine pojedinih biljaka u proizvodima s ispitivanim koncentracijama pojedinih suplemenata, teških metala i pesticida u muških jedinki.

Parametar		<i>Epimedium sagittatum</i>	<i>Panax quinquefolius</i>	<i>Lepidium meyenii</i>	<i>Schisandra chinensis</i>	<i>Tribulus terrestris</i>	<i>Humulus lupulus</i>	<i>Melisa officinalis</i>	<i>Origanum vulgare</i>	<i>Ginkgo biloba</i>
Sildenafil	Rho	0,576	0,576	0,750	0,620	-0,018	0,201	0,201	0,201	0,201
	p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,910	0,208	0,208	0,208	0,208
L-arginin	Rho	0,679	0,679	0,446	0,679	1,000	-0,171	-0,171	-0,171	-0,171
	p	<0,001	<0,001	0,003	<0,001		0,284	0,284	0,284	0,284
Olovo mg/kg	Rho	0,194	0,194	0,151	0,236	0,410	0,196	0,196	0,196	0,196
	P	0,225	0,225	0,345	0,137	0,008	0,220	0,220	0,220	0,220
Kadmij mg/kg	Rho	0,679	0,679	0,446	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	p	<0,001	<0,001	0,003	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000
Arsen mg/kg	Rho	0,213	0,213	0,679	-0,171	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	p	0,181	0,181	<0,001	0,284	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Živa mg/kg	Rho	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	p	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Bioallethrin	Rho	-0,349	-0,349	-0,349	-0,349	-0,171	0,000	0,000	0,000	0,000
	p	0,025	0,025	0,025	0,025	0,284	1,000	1,000	1,000	1,000
Cyfluthrin-beta 3	Rho	-0,349	-0,349	-0,349	-0,349	-0,171	1,000	1,000	1,000	1,000
	P	0,025	0,025	0,025	0,025	0,284				
Cypermetrin 2	Rho	0,213	0,213	0,679	0,446	-0,171	-0,171	-0,171	-0,171	-0,171
	p	0,181	0,181	<0,001	0,003	0,284	0,284	0,284	0,284	0,284
Cypermetrin 3	Rho	0,213	0,213	0,679	0,446	-0,171	-0,171	-0,171	-0,171	-0,171
	p	0,181	0,181	<0,001	0,003	0,284	0,284	0,284	0,284	0,284
Miklobutanil	Rho	-0,349	-0,349	-0,349	-0,349	-0,171	0,000	0,000	0,000	0,000
	p	0,025	0,025	0,025	0,025	0,284	1,000	1,000	1,000	1,000

p-vrijednost ili razina značajnosti (vrijednost je značajna ako je $p < 0,05$).

Rho – Spearmanov korelacijski koeficijent.

- Slaba povezanost ($\rho < 0,200$)
- Srednje jaka povezanost (ρ 0,200-0,600)
- Jaka povezanost ($\rho > 0,600$)

Tablica 55. Korelacijski koeficijenti i povezanost deklarirane količine pojedinih biljaka u proizvodima s ispitivanim koncentracijama pojedinih suplemenata, teških metala i pesticida u ženskih jedinki: Spearmanov korelacijski koeficijent

Parametar		Epimedium Sagittatum	Lepidium Meyenili	Tribulus Terrestris	Humulus lupulus	Melisa officinalis	Origanum Vulgare	Ginkgo biloba	Turnera diffusa	Ilex paraguariensis	Smilax Officinalis	Sarsaparilla officinali
Sildenafil	Rho	0,195	-0,231	-0,231	0,738	0,738	0,738	0,738	0,195	0,324	0,324	-0,231
	P	0,372	0,289	0,289	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,372	0,132	0,132	0,289
L-arginin	Rho	0,380	1,000	1,000	-0,233	-0,233	-0,233	-0,233	0,380	-0,261	-0,261	1,000
	P	0,042			0,224	0,224	0,224	0,224	0,042	0,172	0,172	
Olovo mg/kg	Rho	0,675	-0,231	-0,231	0,246	0,246	0,246	0,246	0,675	0,786	0,786	-0,231
	P	<0,001	0,289	0,289	0,258	0,258	0,258	0,258	<0,001	<0,001	<0,001	0,289
Kadmij mg/kg	Rho	0,794	-0,261	-0,261	-0,233	0,000	0,000	0,000	0,794	0,000	0,000	-0,261
	P	<0,001	0,172	0,172	0,224	1,000	1,000	1,000	<0,001	1,000	1,000	0,172
Arsen mg/kg	Rho	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	P	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Živa mg/kg	Rho	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	P	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Bioallethrin	Rho	-0,370	-0,233	-0,233	1,000	1,000	1,000	1,000	-0,370	-0,233	-0,233	-0,233

Parametar		Epimedium Sagittatum	Lepidium Meyenili	Tribulus Terrestris	Humulus lupulus	Melisa officinalis	Origanum Vulgare	Ginkgo biloba	Turnera diffusa	Ilex paraguariensis	Smilax Officinalis	Sarsaparilla officinali
	P	0,048	0,224	0,224					0,048	0,224	0,224	0,224
Cyfluthrin- beta 3	Rho	-0,370	-0,233	-0,233	1,000	1,000	1,000	1,000	-0,370	-0,233	-0,233	-0,233
	P	0,048	0,224	0,224					0,048	0,224	0,224	0,224
Miklobutanil	Rho	-0,370	-0,233	-0,233	1,000	1,000	1,000	1,000	-0,370	-0,233	-0,233	-0,233
	P	0,048	0,224	0,224					0,048	0,224	0,224	0,224

p-vrijednost ili razina značajnosti (vrijednost je značajna ako je $p < 0,05$);

Rho – Spearmanov korelacijski koeficijent.

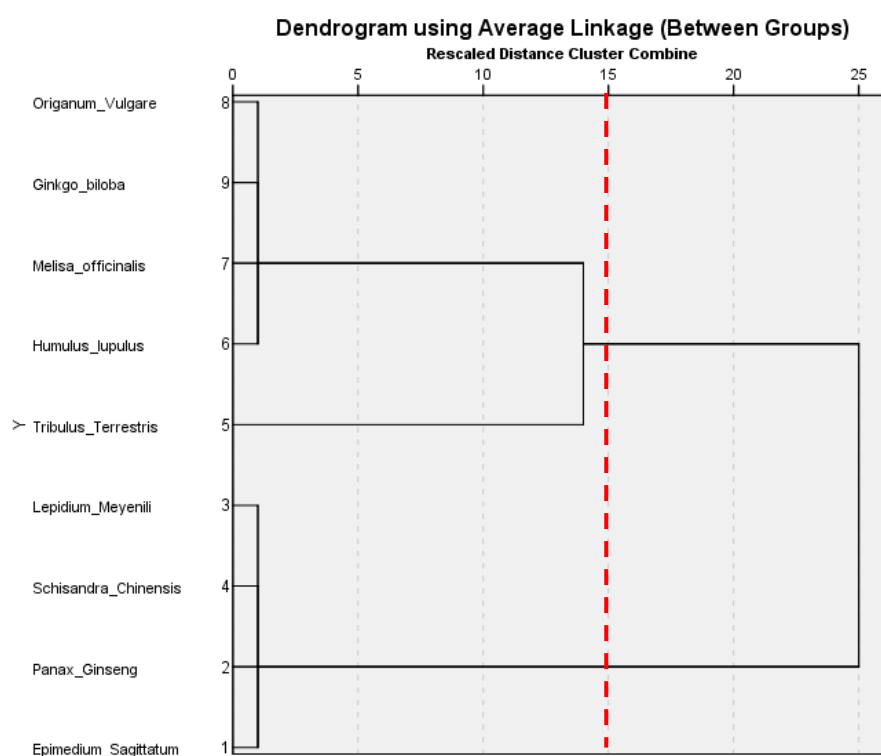
- Slaba povezanost ($\rho < 0,200$)
- Srednje jaka povezanost ($\rho 0,200-0,600$)
- Jaka povezanost ($\rho > 0,600$)

3.4. Analiza rezultata metodom hijerarhijske aglomerativne klaster analize

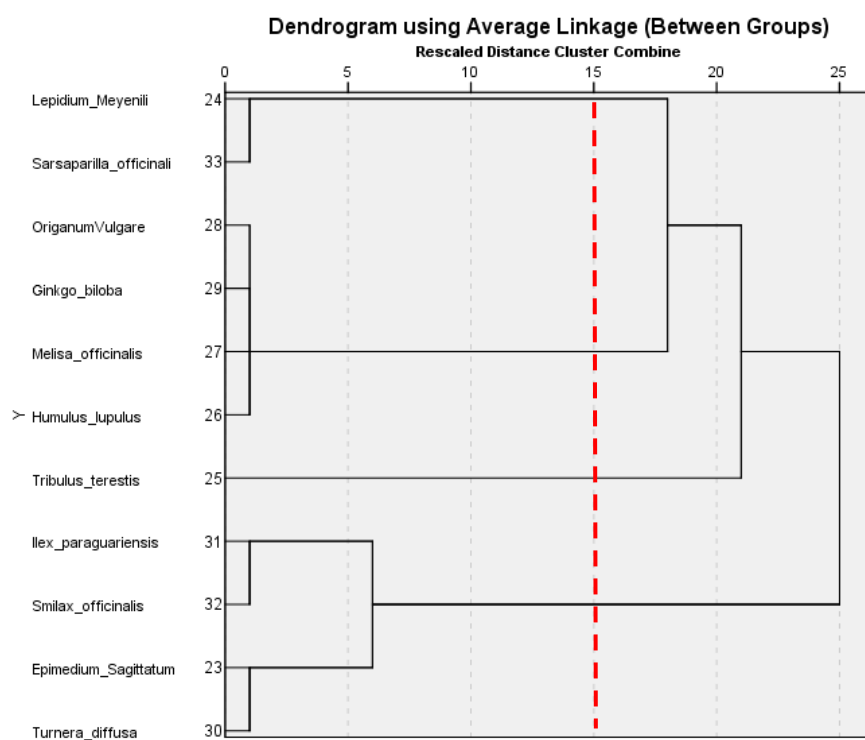
Dendogrami hijerarhijske klaster analize u skupini s pozitivnim MDA oksidacijskim stresom (kao pozitivni nalazi uzete su izmjerene MDA vrijednosti u slezeni, jetri i/ili bubregu veće od medijana vrijednosti za pojedine podskupine) u odnosu na konzumaciju pojedinih biljaka u muških i ženskih jedinki prikazani su na Slikama 57. i 58. U konačnom odabiru uključena su dva klastera u muških jedinki i četiri klastera u ženskih jedinki čija je međusobna udaljenost (kvadrirana Euklidska udaljenost) bila 15 jedinica.

Klaster analizom kod muških jedinki dobivene su kombinacije biljaka koje po svojem učinku na MDA vrijednosti oksidacijskog stresa zbirno u analiziranim viscelarnim organima (slezeni, jetri i bubregu) imaju najbližnje djelovanje. Origano, Ginko, Matičnjak i Hmelj tvore jednu od tih kombinacija, a Maka, Šizandra, Ginseng i Epimedium drugu. Tribulus nije povezan niti sa jednom od navedenih skupina i čini zasebnu skupinu. Usporedbom rezultata klaster analize sa rezultatima dobivenim korelacijskim koeficijentom (Rho) Epimedium i Ginseng pokazuju jaku povezanost u utjecaju za MDA bubrega, a srednje jaku povezanost za MDA jetre daju biljke iz kombinacije koju čine Tribulus, Origano, Ginko, Matičnjak i Hmelj.

Klaster analizom kod ženskih jedinki sa pozitivnim MDA oksidacijskim stresom stvorene su četiri skupine biljaka sa sličnim svojstvima. Jednu kombinaciju tvore biljke Epimedium i Damiana za koje rezultati korelacijskog koeficijenta (Rho) pokazuju jaku povezanost kod utjecaja na MDA slezene. Biljke Mate i Tetivka čine jednu od kombinacija sličnih svojstava, a prema rezultatima korelacijskog koeficijenta (Rho) pokazuju srednje jaku povezanost s vrijednosti MDA u slezeni. Origano, Ginko, Matičnjak i Hmelj pripadaju kombinaciji sa sličnim svojstvima i te biljke prema korelacijskom koeficijentu (Rho) pokazuju srednje jaku povezanost sa MDA bubrega.



Slika 57. Dendrogram hijerarhijske klaster analize u skupini s pozitivnim MDA oksidacijskim stresom u odnosu na konzumaciju pojedinih biljaka u muških jedinki

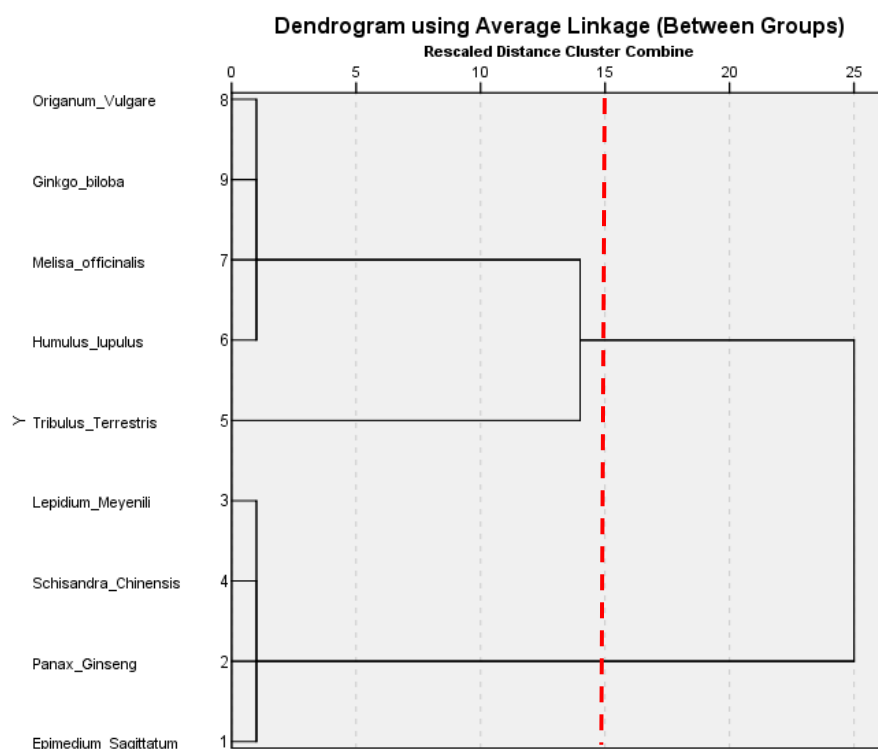


Slika 58. Dendrogram hijerarhijske klaster analize u skupini s pozitivnim MDA oksidacijskim stresom u odnosu na konzumaciju pojedinih biljaka u ženskih jedinki

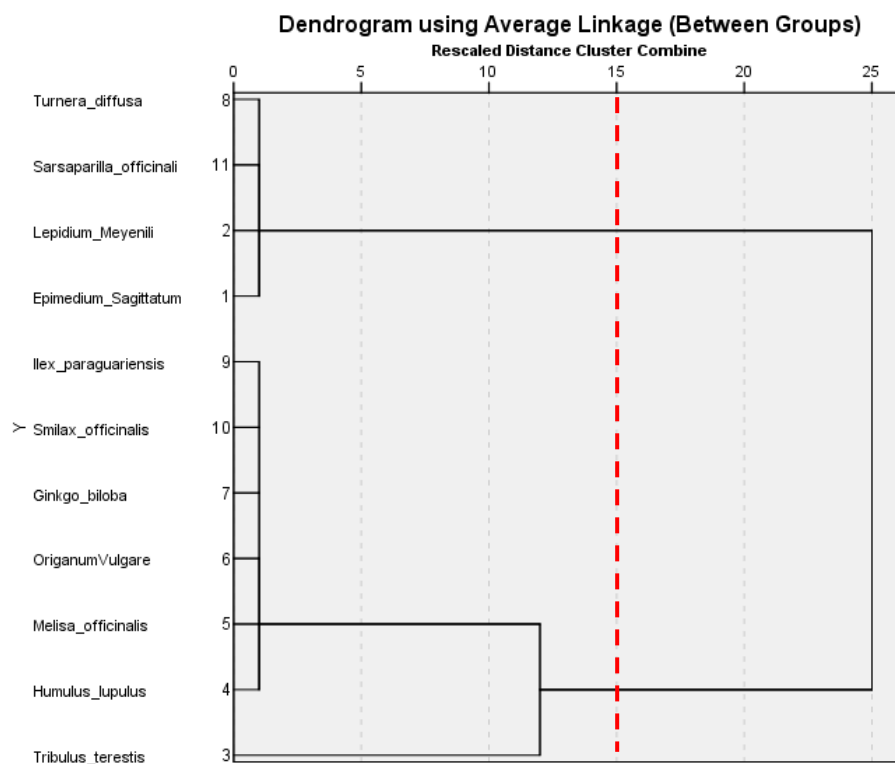
Dendrogram hijerarhijske klaster analize u skupini s pozitivnim GSH oksidacijskim stresom (kao pozitivni nalazi uzete su izmjerene GSH vrijednosti u slezeni, jetri i/ili bubregu veće od medijana vrijednosti za pojedine podskupine) u odnosu na konzumaciju pojedinih biljaka u muških i ženskih jedinki prikazani su na Slikama 59. i 60. U konačnom odabiru uključena su po dva klastera u muških i ženskih jedinki čija je međusobna udaljenost (kvadrirana Euklidska udaljenost) bila 15 jedinica

Klaster analizom kod muških jedinki s pozitivnim GSH oksidacijskim stresom dobivene su dvije kombinacije biljaka koje su najbliže povezane pa možemo smatrati da su najbliže po svojem djelovanju. Prvoj kombinaciji pripadaju biljke Origano, Ginko, Matičnjak i Hmelj koje prema rezultatima usporedbe korelacijskim koeficijentom (Rho) pokazuju srednje jaku povezanost u odnosu na GSH vrijednost bubrega. Druga kombinacija biljka sličnog djelovanja su Maka, Šizandra, Ginseng i Epimedium koje su srednje jako povezane s GSH vrijednostima u jetri. Biljka Tribulus prikazana je kao zasebna grana, odnosno *outlier* čije je djelovanje različito od navedenih kombinacija, a korelacijskim koeficijentom (Rho) nije povezana sa GSH ni u jednom od navedenih organa.

Klaster analizom kod ženskih jedinki s pozitivnim GSH oksidacijskim stresom stvorene su dvije kombinacije biljaka sa sličnim učincima. Prvu kombinaciju čine biljke Damiana, Sarsaparila, Maka i Epimedium od kojih Epimedium i Damiana prema rezultatima korelacijskog koeficijenta (Rho) daju jaku povezanost sa vrijednosti GSH u slezeni. Origano, Ginko, Matičnjak, Hmelj, Mate i Tetivka čine drugu kombinaciju biljaka sa najbliže povezanim djelovanjima od kojih Mate i Tetivka daju srednje jaku povezanost u djelovanju na GSH vrijednosti u jetri, prema izračunu korelacijskog koeficijenta (Rho).



Slika 59. Dendrogram hijerarhijske klaster analize u skupini s pozitivnim GSH oksidacijskim stresom u odnosu na konzumaciju pojedinih biljaka u muških jedinki

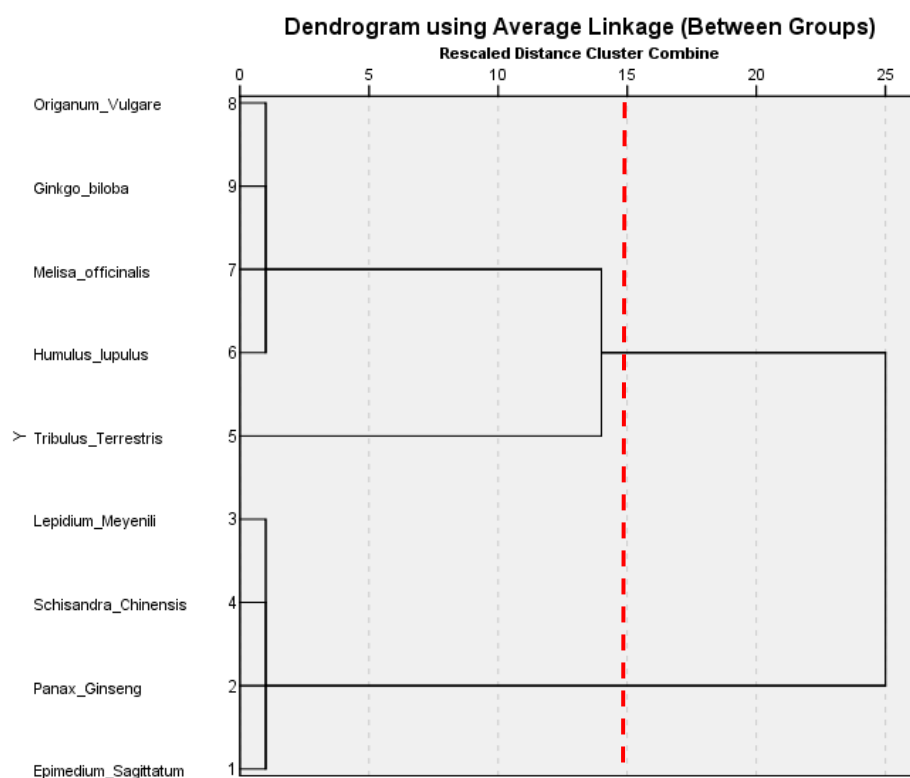


Slika 60. Dendrogram hijerarhijske klaster analize u skupini s pozitivnim GSH oksidacijskim stresom u odnosu na konzumaciju pojedinih biljaka u ženskih jedinki

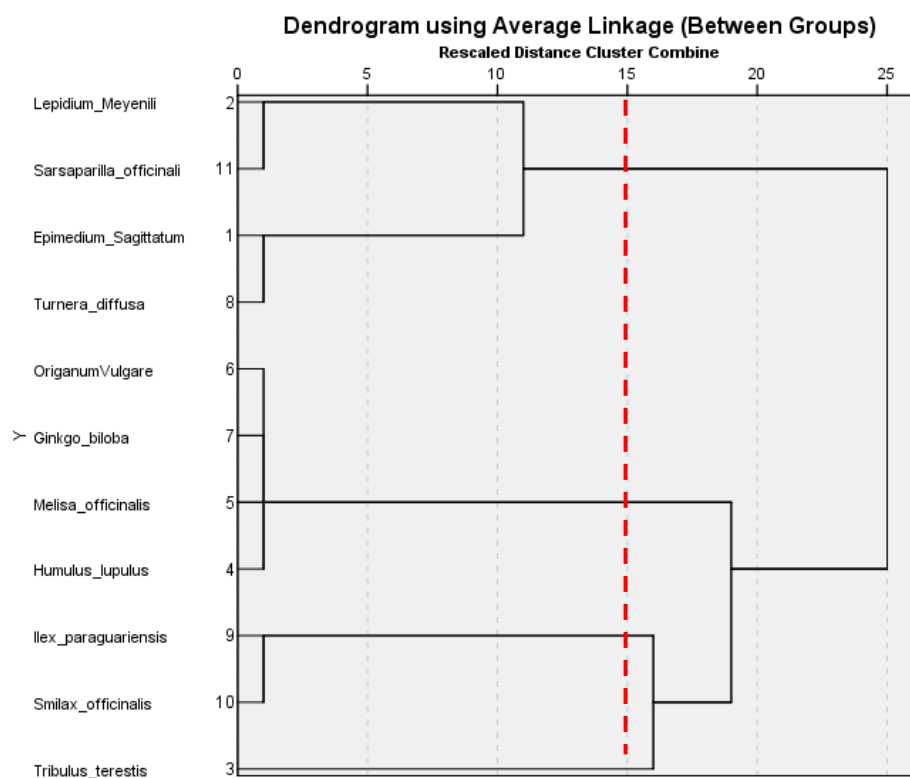
Dendrogram hijerarhijske klaster analize u skupini s pozitivnim SOD oksidacijskim stresom (kao pozitivni nalazi uzete su izmjerene SOD vrijednosti u jetri i/ili bubregu veće od medijana vrijednosti za pojedine podskupine) u odnosu konzumaciju pojedinih biljaka u muških i ženskih jedinki prikazani su na Slikama 61. i 62. U konačnom odabiru uključena su dva klastera u muških jedinki i četiri klastera u ženskih jedinki čija je međusobna udaljenost (kvadrirana Euklidska udaljenost) bila 15 jedinica.

Klaster analizom kod muških jedinki s pozitivnim SOD oksidacijskim stresom dobivene su dvije kombinacije biljaka najbližijih po svojem djelovanju. Prvoj kombinaciji pripadaju biljke Origano, Ginko, Matičnjak i Hmelj. Druga kombinacija biljaka sličnog djelovanja su Maka, Šizandra, Ginseng i Epimedium od kojih Ginseng i Epimedium pokazuju jaku povezanost sa pozitivnim učinkom na SOD u bubrezima i jetri, a Šizandra samo u jetri gledajući prema rezultatima dobivenim korelacijskim koeficijentom (Ros). Biljke Maka, Šizandra i Tribulus pokazuju srednje jaku povezanost s pozitivnim vrijednostima SOD u bubrezima dok Maka i Tribulus pokazuju srednje jaku povezanost sa pozitivnim vrijednostima SOD u jetri prema rezultatima korelacijskog koeficijenta (Rho).

Klaster analizom kod ženskih jedinki s pozitivnim SOD oksidacijskim stresom stvoreno je više kombinacija biljaka sa sličnim učincima. Najveću kombinaciju čine biljke Origano, Ginko, Matičnjak i Hmelj koje pokazuju jaku povezanost sa vrijednosti SOD u jetri i srednje jaku povezanost sa vrijednostima SOD u bubrezima izračunate preko korelacijskog koeficijenta (Rho). Tribulus je prikazan kao zasebna grana čije se djelovanje razlikuje od dobivenih biljnih kombinacija, a korelacijskim koeficijentom (Rho) nije povezan sa SOD ni u jednom od navedenih organa.



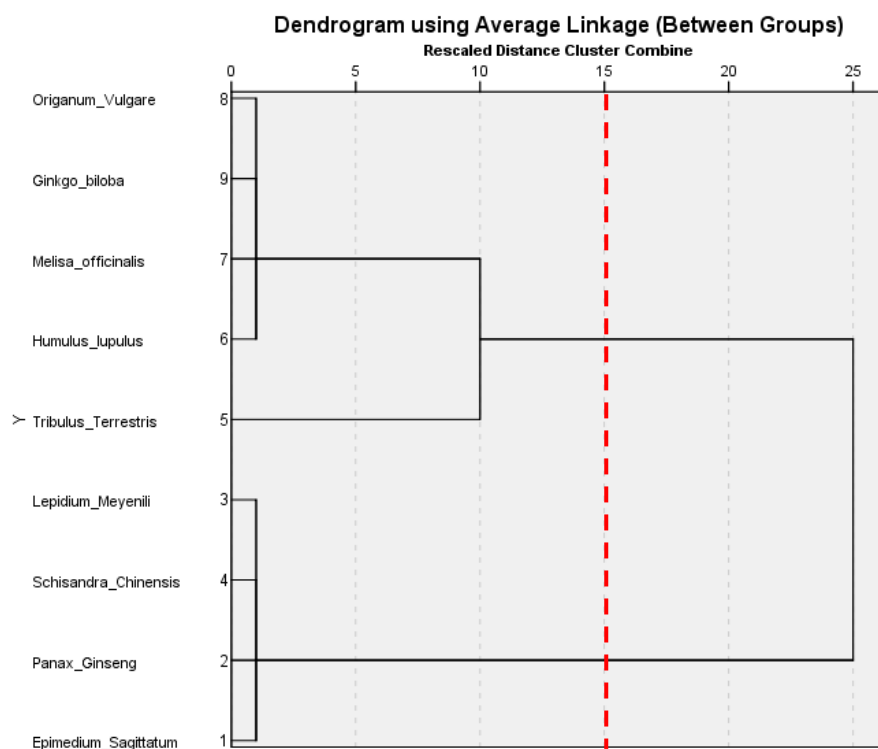
Slika 61. Dendrogram hijerarhijske klaster analize u skupini s pozitivnim SOD oksidacijskim stresom u odnosu na konzumaciju pojedinih biljaka u muških jedinki



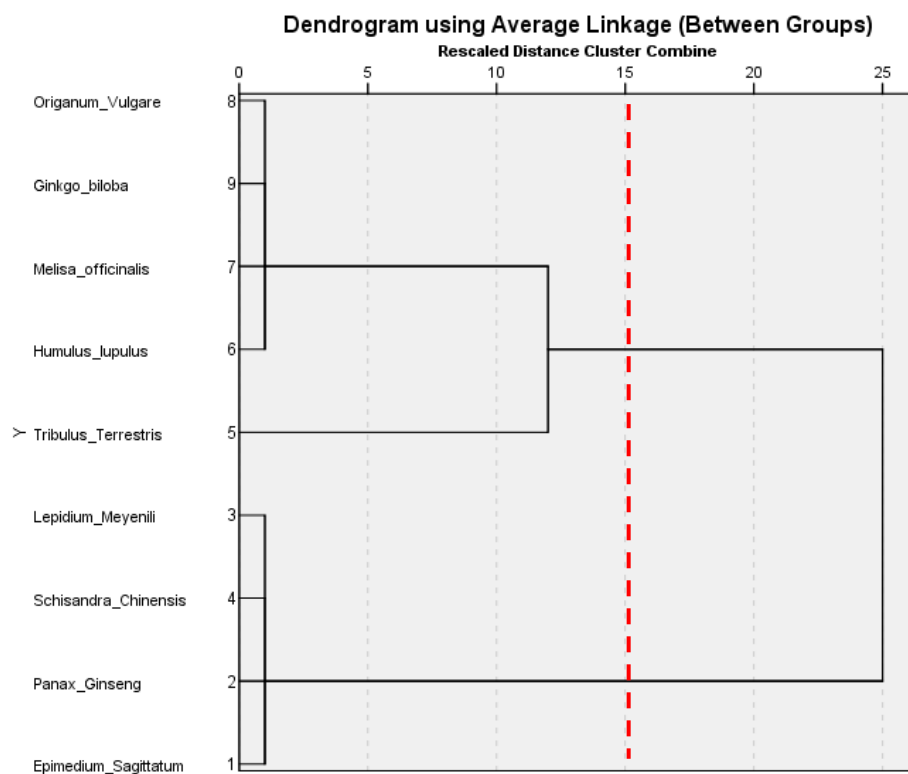
Slika 62. Dendrogram hijerarhijske klaster analize u skupini s pozitivnim SOD oksidacijskim stresom u odnosu na konzumaciju pojedinih biljaka u ženskih jedinki

Dendrogram hijerarhijske klaster analize u skupini s pozitivnim MDA, GSH i SOD oksidacijskim stresom u testisima (kao pozitivni nalazi uzete su izmjerene MDA, GSH i SOD vrijednosti u testisima veće od medijana vrijednosti za pojedine podskupine) u odnosu na konzumaciju pojedinih biljaka u muških jedinki prikazani su Slikama 63., 64. i 65. U konačnom odabiru uključena su po dva klastera za pojedini parametar čija je međusobna udaljenost (kvadrirana Euklidska udaljenost) bila 15 jedinica.

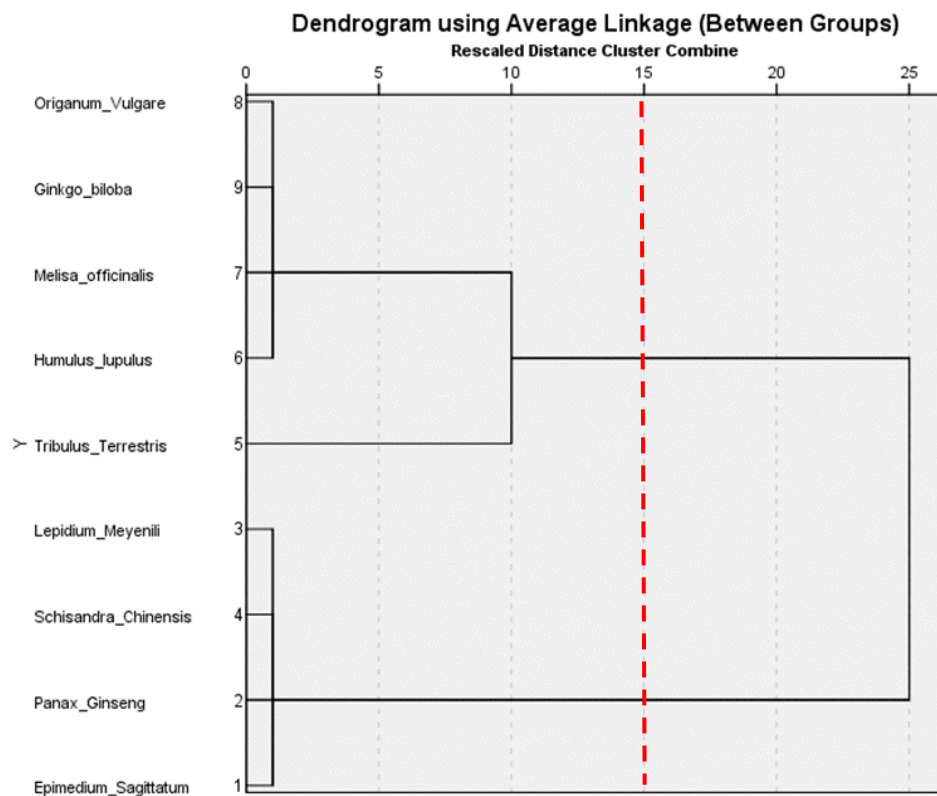
Klaster analizom kod muških jedinki s pozitivnim MDA, GSH i SOD oksidacijskim stresom u testisima dobivene su dvije kombinacije biljaka najbližijih po svojem djelovanju kod sva tri parametra istraživanja. Prvoj kombinaciji pripadaju biljke Origano, Ginko, Matičnjak i Hmelj koje pokazuju srednje jaki utjecaj na vrijednosti MDA i GSH u testisima izračunato preko korelacijskog koeficijenta (Rho). Druga kombinacija biljka sličnog djelovanja su Maka, Šizandra, Ginseng i Epimedium kod kojih Maka i Šizandra pokazuju srednje jaki utjecaj preko korelacijskog koeficijenta (Rho) na pozitivne vrijednosti SOD u testisima. Tribulus je prikazan kao zasebna grana a preko korelacijskog koeficijenta nema učinka na vrijednosti MDA, GSH i SOD u testisima.



Slika 63. Dendrogram hijerarhijske klaster analize u skupini s pozitivnim MDA oksidacijskim stresom u testisima u odnosu na konzumaciju pojedinih biljaka u muških jedinki.



Slika 64. Dendrogram hijerarhijske klaster analize u skupini s pozitivnim SOD oksidacijskim stresom u testisima u odnosu na konzumaciju pojedinih biljaka u muških jedinki

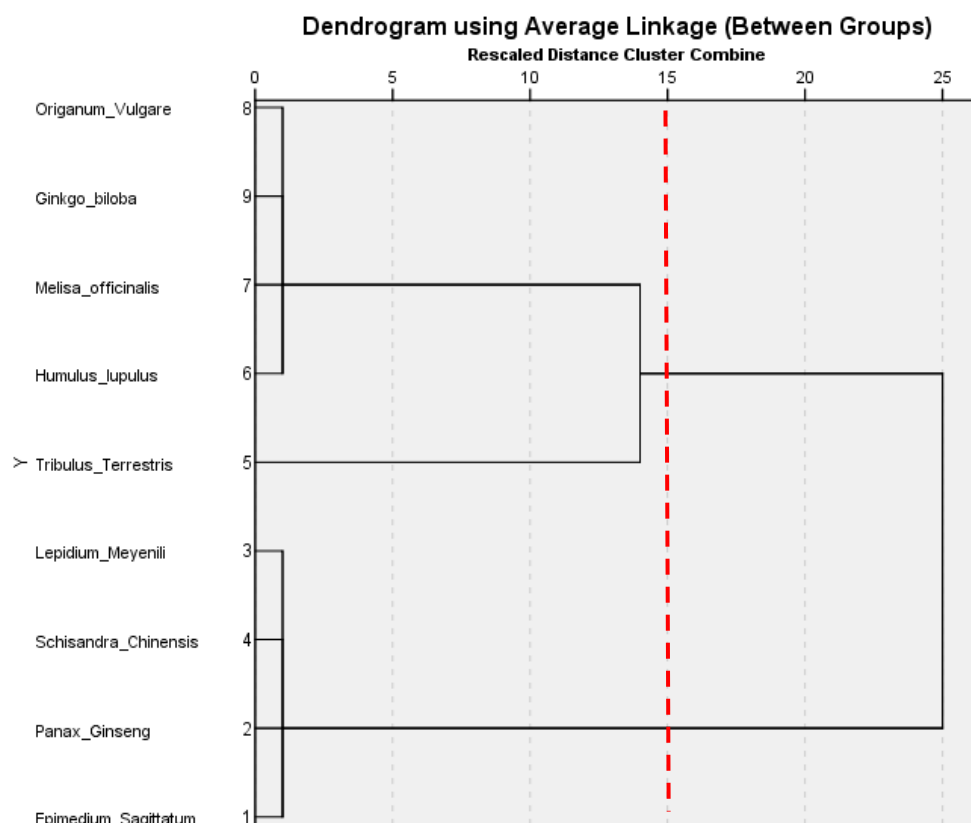


Slika 65. Dendrogram hijerarhijske klaster analize u skupini s pozitivnim GSH oksidacijskim stresom u testisima u odnosu na konzumaciju pojedinih biljaka u muških jedinki.

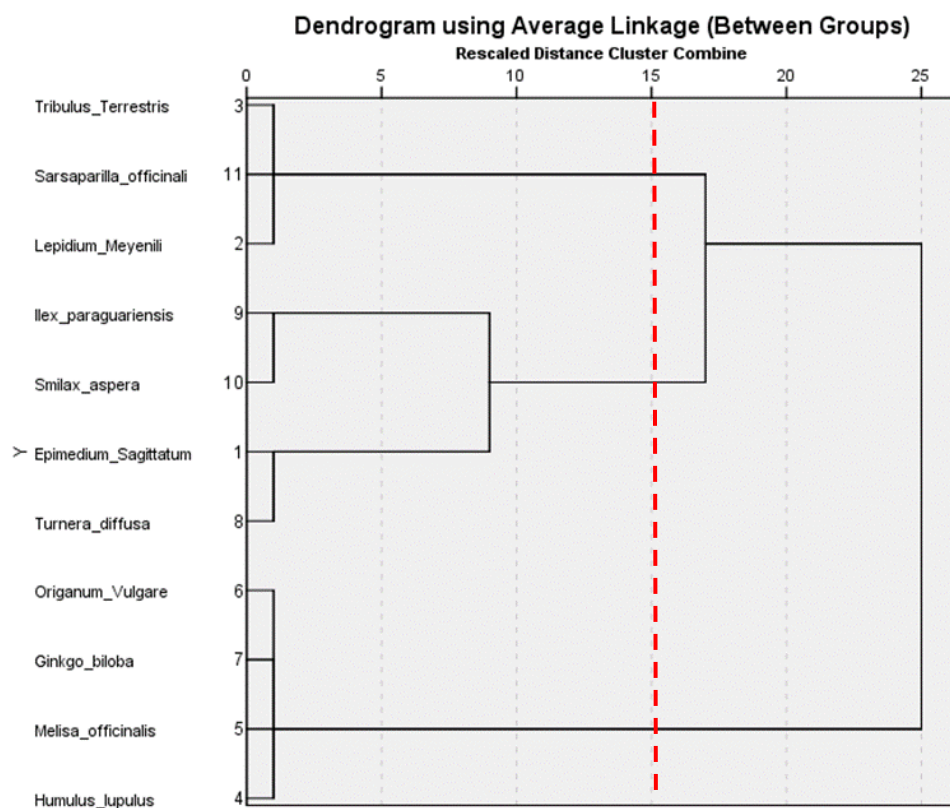
Dendrogram hijerarhijske klaster analize u skupini s povišenim estradiolom (kao pozitivni nalazi uzete su izmjerene vrijednosti veće od medijana vrijednosti za pojedine podskupine) u odnosu na konzumaciju pojedinih biljaka u muških i ženskih jedinki prikazanih na Slikama 66. i 67. U konačnom odabiru uključena su dva klastera u muških i tri klastera u ženskih jedinki čija je međusobna udaljenost (kvadrirana Euklidska udaljenost) bila 15 jedinica.

Klaster analizom kod muških jedinki s povišenim estradiolom dobivene su dvije kombinacije biljaka najbližijih po svojem djelovanju. Prvoj kombinaciji pripadaju biljke Origano, Ginko, Matičnjak i Hmelj, a drugoj kombinaciji biljke Maka, Šizandra, Ginseng i Epimedium. Niti jedna od navedenih biljaka prve i druge kombinacije ne pokazuje povezanost sa razinom estradiola prema rezultatima korelacijskog koeficijenta (Rho). Tribulus je na većoj udaljenosti od navedenih kombinacija što upućuje na njegovu različitost u djelovanju, a korelacijskim koeficijentom (Rho) ne pokazuje povezanost sa estradiolom.

Klaster analizom kod ženskih jedinki s povišenim estradiolom stvorene su tri kombinacije sa sličnim svojstvima. Jedna kombinacija uključuje biljke Tribulus, Sarsaparilu i Maku, druga Mate, Tetivku, Epimedium i Damianu i treća Origano, Ginko, Matičnjak i Hmelj. Korelacijskim koeficijentom (Rho) nije utvrđena povezanost navedenih biljaka sa koncentracijom estradiola.



Slika 66. Dendrogram hijerarhijske klaster analize u skupini s povišenim estradiolom u odnosu na konzumaciju pojedinih biljaka u muških jedinki

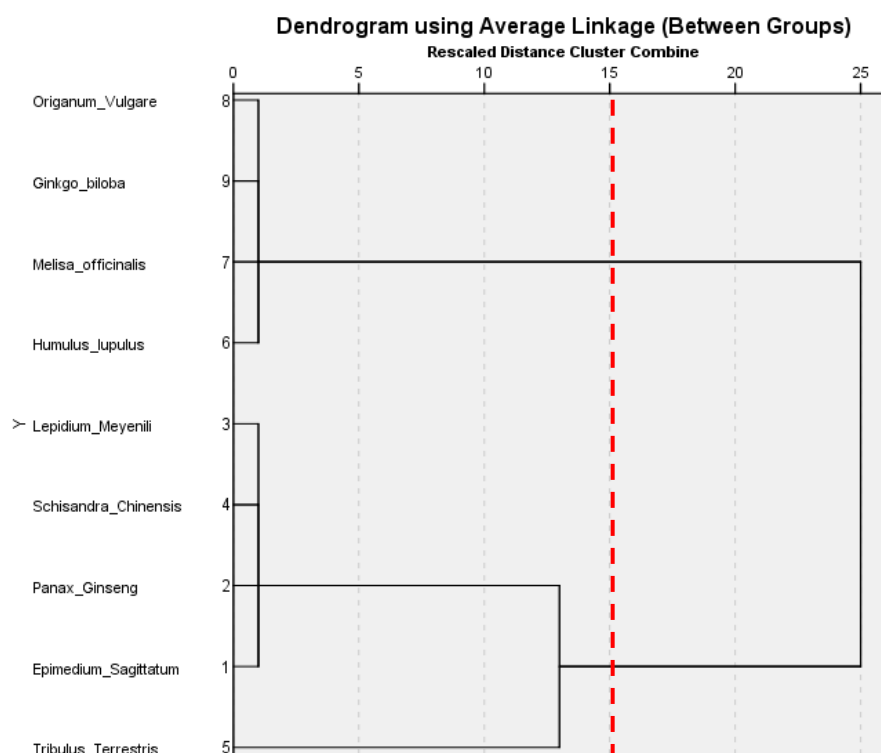


Slika 67. Dendrogram hijerarhijske klaster analize u skupini s povišenim estradiolom u odnosu na konzumaciju pojedinih biljaka u ženskih jedinki.

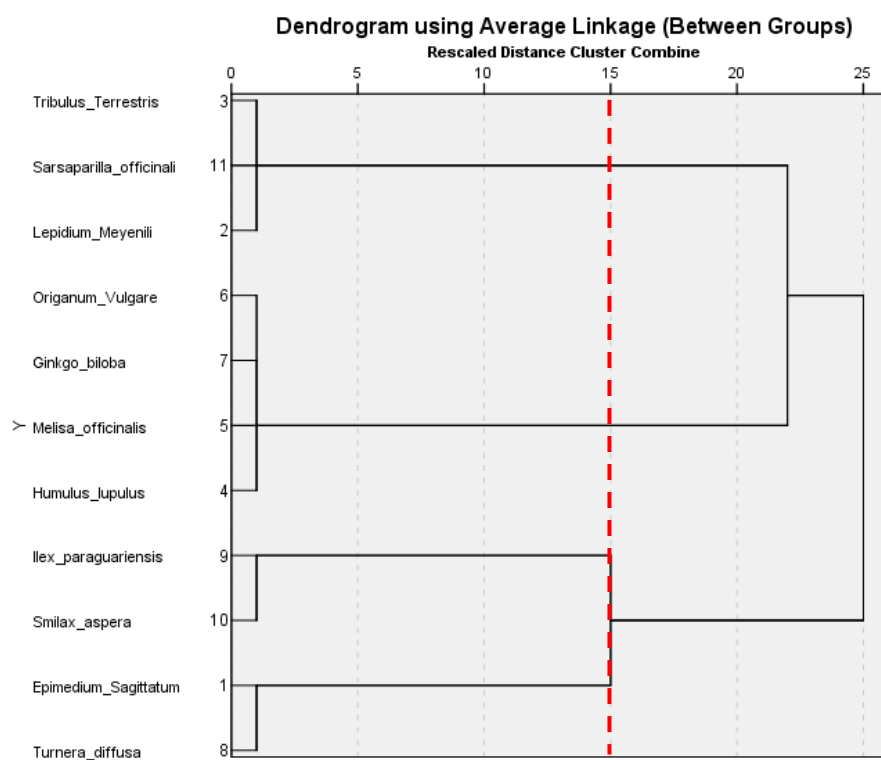
Dendogram hijerarhijske klaster analize u skupini s povišenim testosteronom (kao pozitivni nalazi uzete su izmjerene vrijednosti veće od medijana vrijednosti za pojedine podskupine) u odnosu na konzumaciju pojedinih biljaka u muških i ženskih jedinki prikazanih na Slikama 68. i 69. U konačnom odabiru kod muških jedinki uključena su tri klastera, a kod ženskih jedinki četiri klastera čija je međusobna udaljenost (kvadrirana Euklidska udaljenost) bila 15 jedinica.

Klaster analizom kod muških jedinki s povišenom koncentracijom testosterona dobivene su dvije kombinacije biljaka najsličnijih po svojem djelovanju. Prvoj kombinaciji pripadaju biljke Origano, Ginko, Matičnjak i Hmelj i sve pokazuju srednje jaku povezanost sa povećanom koncentracijom testosterona izračunato preko korelacijskog koeficijenta (Rho) Druga kombinacija biljaka sličnog djelovanja su biljke Maka, Šizandra, Ginseng i Epimedium koje ne pokazuje povezanost sa povećanom koncentracijom testosterona putem korelacijskog koeficijenta (Rho). Tribulus je prikazan zasebno i preko korelacijskog koeficijenta (Rho) ne pokazuje povezanost sa testosteronom.

Klaster analizom kod ženskih jedinki s povišenom koncentracijom testosterona stvorene su četiri kombinacije sa sličnim svojstvima. Jedna kombinacija uključuje biljke Tribulus, Sarsaparilu i Maku, druga Origano, Ginko, Matičnjak i Hmelj treća Mate i Tetivku i četvrta Epimedium i Damianu. Korelacijskim koeficijentom (Rho) nije utvrđena povezanost navedenih biljaka sa koncentracijom testosterona.



Slika 68. Dendrogram hijerarhijske klaster analize u skupini s povišenim testosteronom u odnosu na konzumaciju pojedinih biljaka u muških jedinki

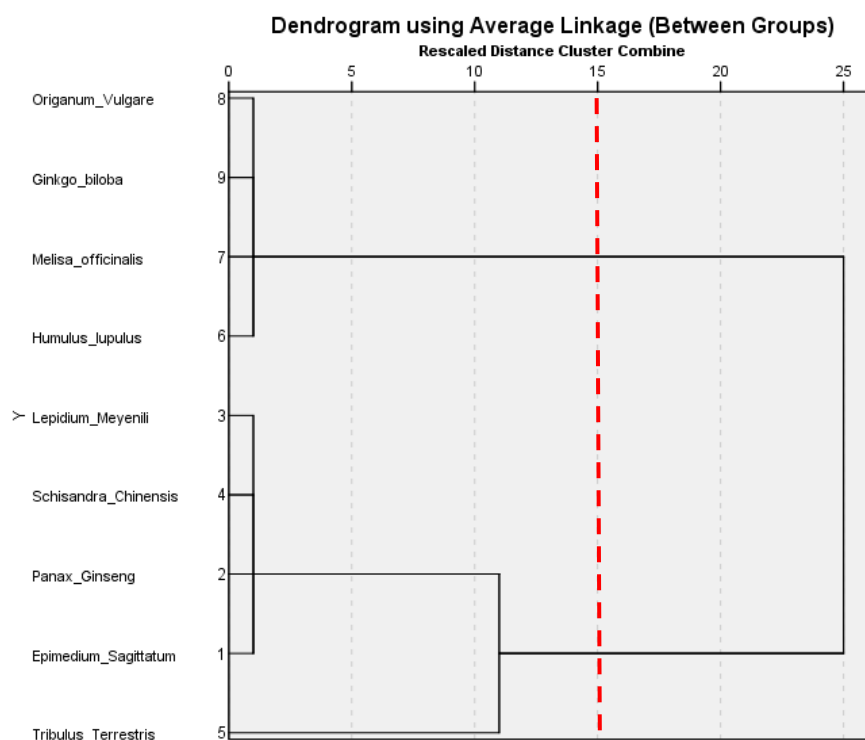


Slika 69. Dendrogram hijerarhijske klaster analize u skupini s povišenim testosteronom u odnosu na konzumaciju pojedinih biljaka u ženskih jedinki.

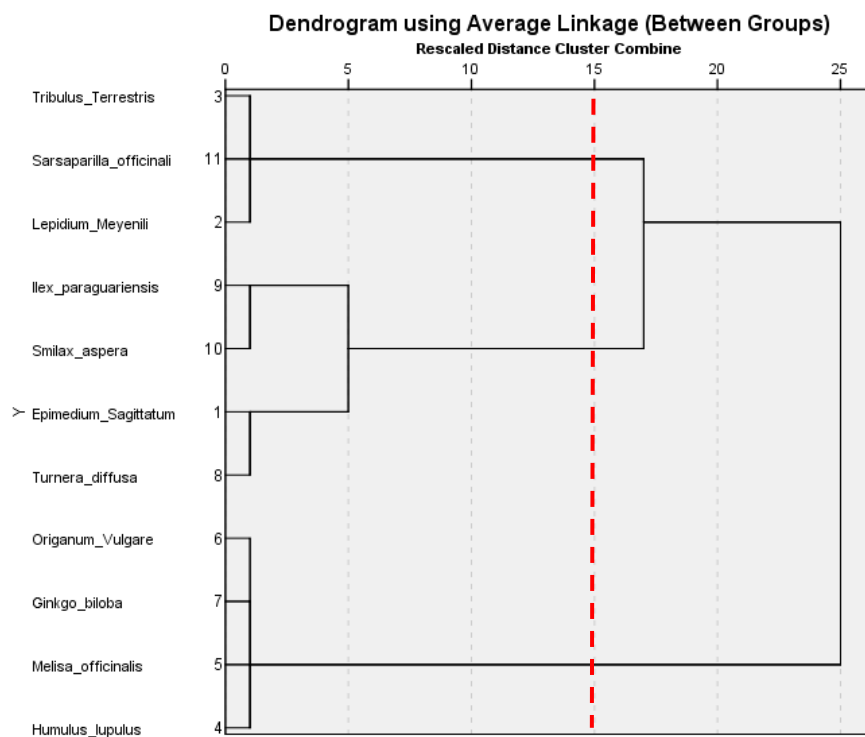
Dendrogram hijerarhijske klaster analize u skupini s povišenim brojem leukocita (kao pozitivni nalazi uzete su izmjerene vrijednosti veće od medijana vrijednosti za pojedine podskupine) u odnosu na konzumaciju pojedinih biljaka u muških i ženskih jedinki prikazani su na Slikama 70. i 71. U konačnom odabiru uključena su dva klastera u muških i tri klastera u ženskih jedinki čija je međusobna udaljenost (kvadrirana Euklidska udaljenost) bila 15 jedinica.

Klaster analizom u muških jedinki s povišenim brojem leukocita dobivene su dvije kombinacije biljaka najbližijih po svojem djelovanju. Prvoj kombinaciji pripadaju biljke Origano, Ginko, Matičnjak i Hmelj koje prema rezultatima za korelacijski koeficijent (Rho) pokazuju srednje jaku povezanost sa povišenim vrijednostima leukocita. Druga kombinacija biljaka sličnog djelovanja su Maka, Šizandra, Ginseng i Epimedium i za njih rezultati korelacijskog koeficijenta (Rho) ne pokazuju povezanost za povišene vrijednosti leukocita. Tribulus je prikazan zasebno i preko korelacijskog koeficijenta (Rho) ne pokazuje povezanost sa povišenim brojem leukocita.

Klaster analizom kod ženskih jedinki s povišenim brojem leukocita dobivene su tri kombinacije biljaka sa sličnim učincima. Jednu kombinaciju čine biljke Tribulus, Sarsaparila i Maka, drugu Mate, Tetivka, Epimedium i Damiana, a treću Origano, Ginko, Matičnjak i Hmelj. Korelacijskim koeficijentom (Rho) nije utvrđena povezanost navedenih biljaka sa povišenim brojem leukocita.



Slika 70. Dendrogram hijerarhijske klaster analize u skupini s povišenim brojem leukocita u odnosu na konzumaciju pojedinih biljaka u muških jedinki

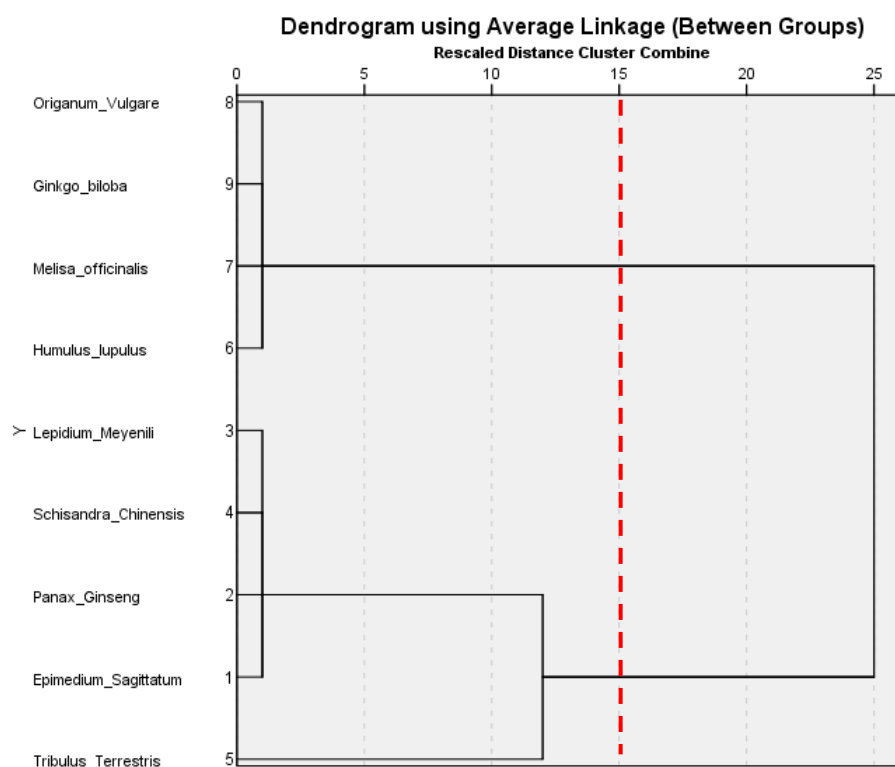


Slika 71. Dendrogram hijerarhijske klaster analize u skupini s povišenim brojem leukocita u odnosu na konzumaciju pojedinih biljaka u ženskih jedinki.

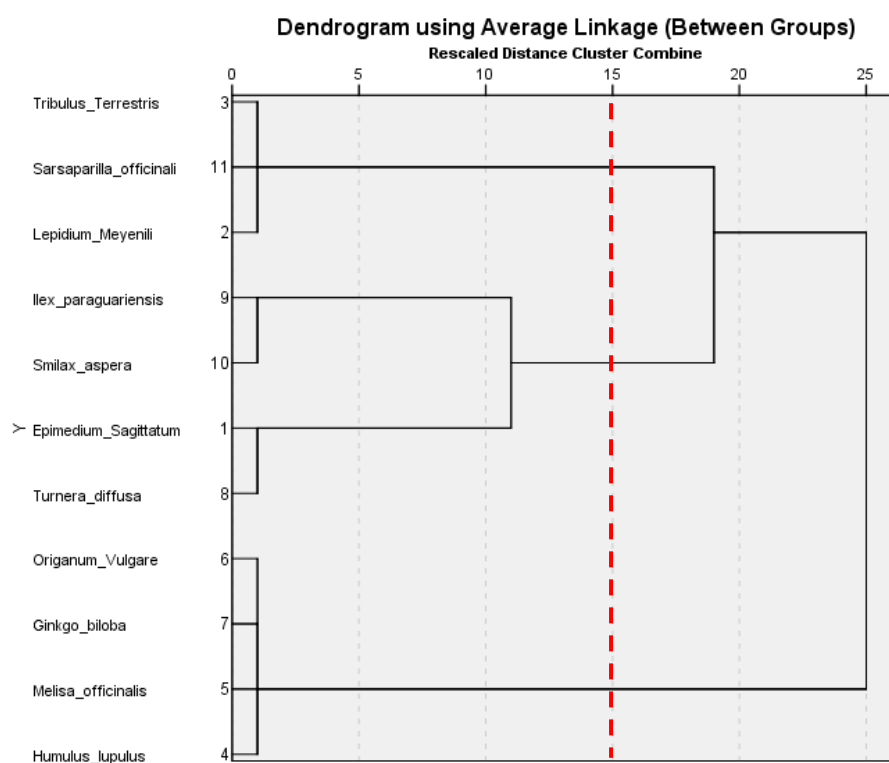
Dendrogram hijerarhijske klaster analize u skupini s povišenim brojem trombocita (kao pozitivni nalazi uzete su izmjerene vrijednosti veće od medijana vrijednosti za pojedine podskupine) u odnosu na konzumaciju pojedinih biljaka u muških i ženskih jedinki prikazani su na Slikama 72. i 73. U konačnom odabiru uključena su dva klastera u muških i tri klastera u ženskih jedinki čija je međusobna udaljenost (kvadrirana Euklidska udaljenost) bila 15 jedinica.

Klaster analizom u muških jedinki s povišenim brojem trombocita dobivene su dvije kombinacije biljaka najbližijih po svojem djelovanju. Prvoj kombinaciji pripadaju biljke Origano, Ginko, Matičnjak i Hmelj. Druga kombinacija biljaka sličnog djelovanja su Maka, Šizandra, Ginseng i Epimedium. Za navedene biljne vrste rezultati korelacijskog koeficijenta (Rho) ne pokazuju povezanost sa povišenim brojem trombocita. Tribulus je prikazan zasebno i preko korelacijskog koeficijenta (Rho) ne pokazuje povezanost sa povišenim brojem leukocita.

Klaster analizom kod ženskih jedinki s povišenim brojem trombocita dobivene su tri kombinacije biljaka sa sličnim učincima. Jednu kombinaciju čine biljke Tribulus, Sarsaparila i Maka, drugu Mate, Tetivka, Epimedium i Damiana, a treću Origano, Ginko, Matičnjak i Hmelj. Korelacijskim koeficijentom (Rho) nije utvrđena povezanost navedenih biljaka sa povišenim brojem trombocita.



Slika 72. Dendrogram hijerarhijske klaster analize u skupini s povišenim brojem trombocita u odnosu na konzumaciju pojedinih biljaka u muških jedinki

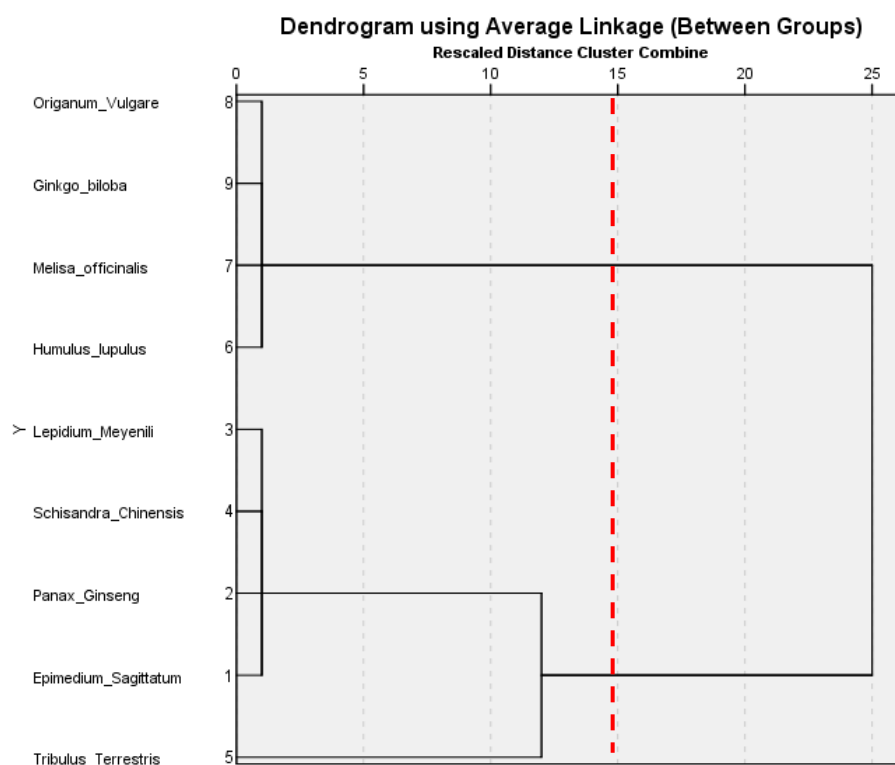


Slika 73. Dendrogram hijerarhijske klaster analize u skupini s povišenim brojem trombocita u odnosu na konzumaciju pojedinih biljaka u ženskih jedinki.

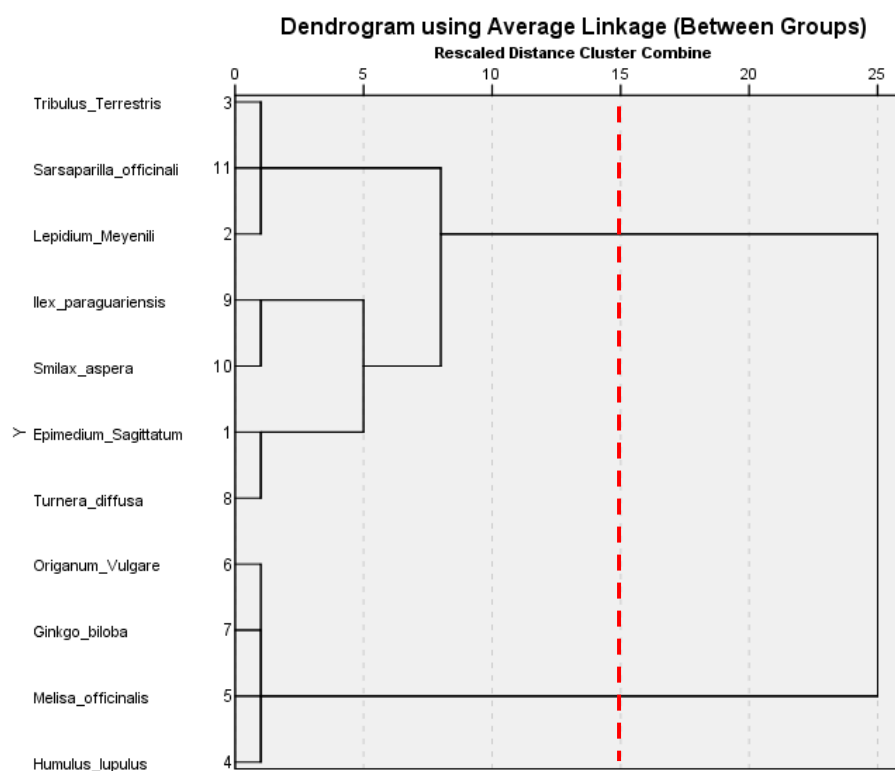
Dendogram hijerarhijske klaster analize u skupini s povećanim vremenom zgrušavanja (kao pozitivni nalazi uzete su izmjerene vrijednosti veće od medijana vrijednosti za pojedine podskupine) u odnosu na konzumaciju pojedinih biljaka u muških i ženskih jedinki prikazani su na Slikama 74. i 75. U konačnom odabiru uključena su dva klastera u muških i tri klastera u ženskih jedinki čija je međusobna udaljenost (kvadrirana Euklidska udaljenost) bila 15 jedinica.

Klaster analizom u muških jedinki s povećanim vremenom zgrušavanja dobivene su dvije kombinacije biljaka najbližijih po svojem djelovanju. Prvoj kombinaciji pripadaju biljke Origano, Ginko, Matičnjak i Hmelj koje prema rezultatima za korelacijski koeficijent (Rho) pokazuju srednje jaku povezanost s povećanim vremenom zgrušavanja. Druga kombinacija biljaka sličnog učinka su Maka, Šizandra, Ginseng i Epimedium za koje rezultati korelacijskog koeficijenta (Rho) ne pokazuju povezanost s povećanim vremenom zgrušavanja. Tribulus je prikazan zasebno i preko korelacijskog koeficijenta (Rho) ne pokazuje povezanost s povećanim vremenom zgrušavanja.

Klaster analizom kod ženskih jedinki s povećanim vremenom zgrušavanja dobivene su tri kombinacije biljaka sa sličnim učincima. Jednu kombinaciju čine biljke Tribulus, Sarsaparila i Maka, drugu Mate, Tetivka, Epimedium i Damiana, a treću Origano, Ginko, Matičnjak i Hmelj. Od navedenih biljnih vrsta ističe se djelovanje Epimediuma i Damiane za koje i rezultati korelacijskog koeficijenta (Rho) pokazuju srednje jaku povezanost s povećanim vremenom zgrušavanja.



Slika 74. Dendrogram hijerarhijske klaster analize u skupini s povećanim vremenom zgrušavanja u odnosu na konzumaciju pojedinih biljaka u muških jedinki



Slika 75. Dendrogram hijerarhijske klaster analize u skupini s povećanim vremenom zgrušavanja u odnosu na konzumaciju pojedinih biljaka u ženskih jedinki.

4. RASPRAVA

Evaluacija sigurnosti i procjena toksikološkog rizika dodataka prehrani na biljnoj bazi uglavnom se provode na životinjskim modelima, a randomizirane kontrolirane studije rizika i sigurnosti na ljudima su rijetke. Poznato je da toksične i štetne učinke u tkivima biljaka uglavnom imaju alkaloidi, glikozidi ali i bioaktivne molekule poput flavonoida, flavona i polifenola, posebice ako su prisutne u prekomjernim dozama. Slobodni radikali koji se proizvode na mjestima biotransformacije bioflavonoidima i njihovim metabolitima, stvaraju značajne nove spojeve nepoznatih svojstava od kojih neki znatno utječu na oksidoredukcijske procese u tkivima. Iz tih razloga je potrebno detaljno istraživati kemijske prirode bioflavonoida i njihovih proizvoda u biološkim sustavima ali i evaluacija biljnih mješavina koje se nalazi na tržištu u proizvodima za ljudsku uporabu [267].

Studije na laboratorijskim glodavcima i dalje ostaju prioritet u procjeni sigurnosti ovakvih pripravaka jer omogućuju monitoring subtilnih lezija i biokemijskih promjena na svim vrstama tkiva poput primjerice mjerenja markera oksidacijskog stresa i drugih fizioloških parametara koji su provedeni u ovoj studiji.

U ovoj disertaciji uspostavljen je model evaluacije odabranih dodataka prehrani na biljnoj bazi, dostupnih u RH, koji osim klasičnih analiza za potrebe javnog zdravstva (pesticidi, metali i nedeklarirane farmakološke tvari) i klasične subkronične toksikološke *in vivo* analize, ima za cilj i kompleksnu statističku modelnu klaster analizu rezultata koja je provedena kako bi mogli odgovoriti na pitanja da li pojedine biljke u proizvodima (ali i rezidue metala i pesticida) više ili manje sinergistički doprinose toksičnim efektima.

Krajnji cilj navedenog modela i glavni rezultat disertacije bile bi definirane smjernice o dopuštenom ili upitnom kombiniranju pojedinih biljnih vrsta unutar proizvoda. Iz dostupnih literaturnih podataka nije razvidno da su provedena slična istraživanja sinergističkog učinka više biljaka kao što je to provedeno u ovom izvornom znanstvenom istraživanju.

Obzirom da je u nekoliko zadnjih godina u Hrvatskoj porasla prodaja biljnih sredstava za liječenje ED te obzirom da je u više slučajeva javnozdravstvenom analizom utvrđeno postojanje brojnih nedeklariranih tvari u takvim vrstama proizvoda, u ovoj disertaciji odlučili smo postaviti eksperimentalni model

javnozdravstvene izloženosti dodacima prehrani sa različitim sastavom i formulacijama biljnih vrsta koje se već dulje vrijeme koriste u poboljšanju ili sprječavanju ED na području RH. Biljne vrste koje imaju ispitana djelovanja na ED su *Panax ginseng*, *Butea superba*, *Epimedium sagittatum*, *Tribulus terrestris*, *Securidaca longipedunculata* i *Piper guineense*. *Panax ginseng* i *B. superba* su jedine biljne vrste čija je učinkovitost provedena na ljudima, međutim studije nisu bile dovoljno robustne da bi se rezultati mogli prihvatiti kao relevantni [268].

Navedene biljne vrste su u funkcionalnim ili u toksikološkim studijama uglavnom analizirane zasebno. Pretraživanjem znanstvenih baza za sve opisane biljne komponente nije uočen značajan broj publikacija koje se bave njihovim ljekovitim (funkcionalnim) djelovanjem, nažalost rijetki su radovi koji proučavaju njihove interakcije i moguće toksične efekte na pojedinim organima.

Rezultate ovog istraživanja (*In vivo* učinke) izlaganja pojedinim proizvodima promatrali smo sistemski usporedbom prirasta, organosomatskog indeksa i hematoloških parametara, a specifične učinke usporedbom razine hormona i parametara izmjerenih na spolnim žlijezdama u pojedinim tkivima te kroz usporedbu parametara redoks ravnoteže i antioksidacijske obrane u pojedinim organima (slezena, jetra, bubreg, testis).

Također, prilikom tumačenja toksikoloških rezultata *in vivo* treba uzeti u obzir analize pesticida i metala koje pokazuju da su svi proizvodi sadržavali olovo ispod maksimalno dozvoljenih granica za tu vrstu proizvoda, a dodatno uz olovo proizvod 3 (Epimedium, Ginseng i Maka) sadržavao je tragove arsena, dok su proizvod 4 (Epimedium, Ginseng, Maka, Tribulus i Arginin) i proizvod 8 (Epimedium, Maka, Tribulus, Damiana, Sarsaparila i Arginin) uz olovo sadržavali i kadmij. Niti jedan proizvod nije sadržavao živu iznad granice kvantifikacije metode (LOQ = 0,05 mg/kg).

Proizvod 2 i proizvod 9 koji u svojem sastavu imaju Hmelj, Matičnjak, Origano i Ginko sadržavali su uz olovo i pesticide bioaletrin, ciflutrin i miklobutanil, dok je proizvod 3 (Epimedium, Ginseng i Maka) sadržavao pesticide cipermetrin izomer 2 i 3 iznad maksimalno dozvoljene razine ostataka pesticida.

Niti jedan od apliciranih proizvoda u mužjaka nije uzrokovao promjene prirasta, dok je u ženki jedino proizvod 9 (Hmelj, Matičnjak, Origano, Ginko, Pb i 3 pesticida)

uzrokovao veći prirast. To upućuje na činjenicu da biljke ali i navedene rezidue koje su se nalazile u proizvodima koji nisu djelovali na prirast nemaju veći toksični učinak na organizam u cjelini da bi mogle izazvati velike promjene gubitka tjelesne mase ili usporavanja prirasta. Za biljke u proizvodu 9 (Hmelj, Matičnjak, Origano, Ginko) kao i detektirane pesticide (bioaletrin, ciflutrin -beta izomer 3 i miklobutanil) nisu dostupni literaturni podaci koji daju direktnu povezanost sa porastom tjelesne mase. Moguća poveznica može biti aktivna tvar hmelja 8-PN flavanona (8-prenilnaringenin), koji djeluje kao jedan od najjačih fitoestrogena, a prema studiji Rimoldi i sur. [269] može se dovesti u korelaciju s povećanjem težine tretiranih ženki miševa kao i nizom drugih induciranih histoloških značajki kako je uočeno i u našoj studiji. Solak i sur. [270] izražavaju zabrinutost zbog štetnih učinaka 8-PN flavanona na zdravlje žena. Smatraju da povećane količine 8-PN koje se u organizam mogu unijeti putem česte primjene dodataka prehrani mogu imati za posljedicu pojavu subfertilnosti (smanjene plodnosti) te savjetuju ženama izbjegavanje unosa 8-PN putem dodataka prehrani. Prema studiji koju su proveli Diel i sur. [271] 8-PN može poput estradiola stimulirati i povećanje težine maternice što u našem istraživanju nije bio slučaj. Bez obzira na opisani učinak na prirast cijelog organizma u ženki nije uočena promjena u organosomatskom indeksu analiziranih organa.

Kod mužjaka, suprotno od ženki, OSI jetre povećani su korisnicima proizvoda 1 koji sadrži biljne vrste Epimedium, Ginseng, Maku i Šizandru. U proizvodu 1 je uz olovo detektirana i ilegalno dodana farmakološki aktivna tvar sildenafil. Pretraživanjem dostupnih znanstvenih baza podataka pronađena je samo jedna studija koja se bavi istraživanjem interakcije sildenafil i bilja. Istraživanje su proveli Hsueh i sur. [74] na biljnoj vrsti Epimedium te dokazali da prisutan i u niskim koncentracijama može imati neposredan utjecaj na metabolizam sildenafil posebno na jetrene enzime koji su ključni u metaboliziranju samog sildenafil. Navedeno je moguće povezati s učincima koji su zabilježeni u proizvodu 1 (Epimedium, Ginseng, Maka, Šizandra, Sil i Pb) gdje je došlo do povećanja OSI jetre. Literaturni podatci govore da biljke Epimedium, Ginseng, Maka i Šizandra imaju protektivni učinak na jetru. Prema tradicionalnoj medicini formula za liječenje kroničnih bolesti jetre bazira se na primjeni više vrsta biljnih i mineralnih sastojaka koji bi trebali dati bolji terapijski učinak na molekularnoj razini. Poznato je da

biljke mogu imati štetan utjecaj na jetru, posebno one biljne vrste koje sadrže pirolizidinske alkaloidne. Hepatotoksičnost može biti posljedica većih doza neke biljne vrste kroz kraći period ili niskih doza kroz duži vremenski period. Potencijalne interakcije između biljnih lijekova i konvencionalnih lijekova mogu također oštetiti jetru. Svaka biljka koja sadrži pirolizidinske alkaloidne potencijalno je hepatotoksična [272]. Istraživanje koje su proveli Hong i sur. [273] bazirano je na analizama više znanstvenih baza koji se bave istraživanjima vezanim za poznate biljke čije se djelovanje povezuje sa pozitivnim učinkom na liječenje bolesti jetre kao što su inhibicije oksidacijskih oštećenja, suzbijanje fibrogeneze, liječenje virusnih infekcija te prevencija i inhibicija rasta tumora. Zaključak navedenog istraživanja je da su kod većine biljnih vrsta potrebne dodatne studije radi potvrde njihove učinkovitosti, a posebno se upozorava na potrebu razvoja temeljnih istraživanja i kliničkih studija o potencijalnoj toksičnosti. Među istraživanim biljnim vrstama navode se Ginseng i Šizandra koje su zastupljene u proizvodu 1 (Epimedium, Ginseng, Maka, Šizandra, Sil, Pb) gdje dobiveni rezultati ukazuju da je OSI jetre povećan što upućuje na činjenicu da je štetan učinak sastava proizvoda izražajnije od njegove protektivne djelotvornosti. Postoji vjerojatnost da je dodatak ilegalnog sildenafil zajedno sa navedenim biljkama induktor povećanja OSI jetre (hepatosomatskog indeksa). Ovi rezultati našeg istraživanja predstavljaju smjernicu za osmišljavanje posebnog pokusa sinergističkog učinka sildenafil i navedenih vrsta na hepatotoksičnost.

Značajna razlika u OSI bubrega zabilježena je kod skupine muških životinja tretiranih proizvodom 3 (Epimedium, Ginseng, Maka, Pb, As, Sil, Cipermetrin 2 i 3) u odnosu na OSI bubrega pokusnih životinja koje su bile izložene pozitivnoj kontroli Gonadotropina. Prema Marijani i sur. [274] promjene OSI pojedinog organa u odnosu na tjelesnu masu može se izravno povezati s toksičnim učincima neke tvari na ciljni organ. Osim navedenih biljnih vrsta kao kontaminant u proizvodu 3 detektirana je farmakološka tvar sildenafil, zatim teški metali u manjim količinama (olovo i arsen) te pesticidi cipermetrin 2 i 3 u značajno većoj količini od dozvoljene. U proizvodu 4 pronađeni su teški metali (olovo i kadmij) u manjim količinama. Kako je navedeno kod proizvoda 1 (Epimedium, Ginseng, Maka, Šizandra, Sil, Pb) gdje kao i kod proizvoda 3 (Epimedium, Ginseng, Maka, Pb, As, Sil, Cipermetrin 2 i 3) u popisu sastojaka imamo kombinaciju Epimediuma i sildenafil. Na osnovi

literturnih podataka interakcije tih dviju komponenti [74] poznato je da Epimedium utječe na farmakokinetiku sildenafilu pri niskim i visokim dnevnim dozama te je njihove kombinacije potrebno izbjegavati u kliničkoj praksi s obzirom na interakcije koje mogu nastati. Slično zapažanje izneseno je u studiji Marijani i sur. [274] gdje se navodi da kod biljnih vrsta najveća opasnost prijete iz potencijalne interakcije dva agensa, odnosno reakcije biljnih tvari i lijekova koji se metaboliziraju putem P450, CYP i 3A4 izoenzima. U takve lijekove spada i sildenafil [275]. Autori također ističu da su toksični učinci na bubrege u biljnim proizvodima često posljedica prisutnosti nedozvoljenih farmakoloških tvari ili teških metala. Kao posljedica toksičnosti teških metala može nastati anemija, neuropatija, hipertenzija, disfunkcija bubrega ili jetre i različiti oblici karcinoma. Prisutnost kadmija u organizmu povezuje se s kroničnom toksičnošću bubrega. Thévenod [276] u svojoj studiji navodi da kadmij može negativno utjecati na različite stanične događaje kao što je indukcija programirane stanične smrti, a izražajnu nefrotoksičnost povezuje sa interakcijom kadmija i drugih nefropatičnih teških metala kao što su olovo i živa. Uz sve navedeno potrebno je istaknuti i prisutnost pesticida cipermetrina izomera 2 i 3 i mogućeg sinergističkog djelovanja sa navedenim toksičnim tvarima. Prema znanstvenim spoznajama štetan učinak cipermetrina veže se uz patološke promjene jetre i bubrega [250].

Znanstveni literaturni podatci o funkcionalnoj učinkovitosti pojedinih biljnih vrsta mogu se primjeniti na biljne vrste prisutne u proizvodu 3 (Epimedium, Ginseng, Maka, Pb, As, Sil, Cipermetrin 2 i 3) i proizvodu 4 (Epimedium, Ginseng, Maka, Tribulus, Arginin, Pb i Cd) sa izražajnim antioksidacijskim učincima. Za Ginseng se smatra da posjeduje antioksidacijska, anti-apoptozna i protuupalna svojstva kao rezultat prisutnosti antocijanina koji imaju ulogu antioksidansa zbog čega se Ginseng promovira kao biljka koja može značajno spriječiti nefrotoksičnost [277]. Međutim, postoje i studije koje naglašavaju njegovu dvojakulogu, naime u prisutnosti biljnih vrsta sa alkaloidnim tvarima u sastavu koje djeluju nefrotoksično (npr. aristolohična kiselina) Ginseng nije odigrao ulogu smanjenja oksidacijskog stresa već je pridonio povećanju apoptoze i smrti stanice inducirane toksičnim učinkom druge biljke [278]. Dobiveni rezultati ukazuju na potrebu *in vivo* studija koje će proučavati štetene interakcije pojedinih biljnih vrsta obzirom da se dosadašnje kombinacije biljaka baziraju na njihovim poznatim pojedinačnim

učincima. Rodríguez-Silva i sur. [279] ispitivali su učinak Make na induciranu nefrotoksičnost izazvanu u miševa i dokazali su regenerativna svojstva koja se očituju kroz utjecaj na smanjenje vrijednosti natrija, uree, kreatinina, fosfata i glukoze. Nisu pronađene studije koje ukazuju na nefrotoksičan učinak Make. Tribulus je biljka koja se često koristi kao inhibitor stvaranja bubrežnih kamenaca, a zabilježeni su slučajevi u praksi pojedinaca kojima je konzumacija vodenog ekstrakta navedene biljke doprinjela upravo suprotno tj. stvaranju bubrežnih kamenaca i napadajima praćenim visokim jetrenim enzimima (aminotransferaze) i kreatinina u serumu. Stanje se normaliziralo prestankom konzumacije ekstrakta Tribulusa [107]. Osim navedenih biljnih vrsta proizvod 4 sadrži i Arginin koji se smatra prekursorom za sintezu NO uz djelovanje enzima NO-sintaza (NOS) te niske koncentracije Arginina imaju za posljedicu nemogućnost nastanka NO što pridonosi stvaranju ROS-a i oksidacijskog stresa. Disfunkcija endotela okarakterizirana je smanjenom biološkom proizvodnjom NO i stanjem oksidacijskog stresa, što su i česta obilježja dijabetesa i dijabetičke nefropatije. You i suradnici [280] su istraživali mogućnost spriječavanja dijabetičke nefropatije povećanjem bioraspoloživosti Arginina u pokusnih životinja. Nažalost, rezultati učinkovitosti su izostali, a autori su došli do spoznaje da dodatak Arginina ne pridonosi uvijek poboljšanju posredovanja NO. Navedene spoznaje mogu se upotpuniti istraživanjem koje je proveo jedan od koautora prethodne studije, Morris [281] da se metabolizam Arginina modulira djelovanjem različitih enzima koji premještaju njegove metabolite preko plazme i mitohondrijskih membrana. Neki od tih enzima ističu se kao ključni izoenzimi (imaju različiti aminokiselinski slijed) čija se ekspresija može znatno izmijeniti i pridonijeti razvoju bolesti što stvara zabrinutost o dodatku Arginina koji u tom slučaju može djelovati štetno, a ne korisno. Povećanje OSI bubrega može biti posljedica vazodilatacije odnosno dotoka povećane količine krvi u bubrege, pada tlaka u glomerulima, smanjene stope filtracije i protoka vode u primarnu mokraću i nakupljanja tekućine u intracelularnim prostorima. Također treba napomenuti da kombinacija Arginina i sildenafili može biti opasna po zdravlje jer obje tvari utječu na hipotenziju. Takva kombinacija nije zastupljena u proizvodima ove studije ali je u proizvodu 4 Arginin prisutan u kombinaciji sa Ginsengom što nije preporučljivo jer je Ginseng kao i Ginko biljka koja djeluje na zgrušavanje krvi i ima vazodilatacijski učinak pa kombinacija s Argininom povećava rizik od pojave krvarenja [172].

Rezultati analize hematoloških parametara ukazuju da su u mužjaka svi proizvodi i tretman sildenafilom i gonadotropnim hormonom, osim proizvoda 3 (Epimedium, Ginseng, Maka, Pb, As, Sil, Cipermetrin 2 i 3) uzrokovali povećanje broja eritrocita, koncentracije hemoglobina i hematokrita. U mužjaka je znakovito da je sildenafil uzrokovao najveći porast navedenih parametara. U mužjaka se nisu značajno mijenjali parametri MCV, MCH dok se parametar MCHC značajno povećao kod skupine tretirane proizvodom 2 u odnosu na proizvod 1. Do morfoloških promjena u veličini stanica (bubrenje/smežurane) nije došlo, odnosno osmotska ravnoteža u krvi nije bila poremećena.

U ženki je samo proizvod 8 (Epimedium, Maka, Tribulus, Damiana, Sarsaparila, Arginin, Cd i Pb) značajno povećao Hgb dok su ostali parametri vezani uz fiziologiju eritrocita i hemoglobina nepromijenjeni.

Navedene promjene hematoloških parametara koji opisuju fiziologiju eritrocita ne možemo izravno povezati sa kontaminantima unutar proizvoda (pesticidi ili metali) te se stoga može govoriti da su navedene promjene izravna posljedica biljaka unutar proizvoda koje djeluju na eritrocitne hematološke parametre posebno u mužjaka.

Znanstveni literaturni podatci o funkcionalnoj učinkovitosti pojedinih biljnih vrsta zastupljenih u istraživanim sredstvima govore da neki flavonoidi u biljkama utječu na povećanje razine eritrocita i koriste se u liječenju anemija [282]. Flavonoidi su fenolne tvari poznate kao antioksidansi, a nalaze se u širokom rasponu vaskularnih biljaka. Antioksidacijska aktivnost flavonoida i njihovih metabolita eksperimentalno se dokazuje povećanjem statusa antioksidansa u plazmi te očuvanjem polinezasićenih eritrocitnih membrana masnih kiselina [283]. Iako većina istraživanja djelotvornost flavonoida pripisuje njihovu antioksidacijskom kapacitetu te modulaciji mnogobrojnih staničnih puteva ključnih u patogenezi pojedinih oboljenja, neki mehanizmi njihova djelovanja još uvijek su velika nepoznanica. Koliki je njihov koristan učinak na ljudsko zdravlje, i u kojoj količini i kojih vrsta flavonoida su pitanja koja su još uvijek predmet mnogih istraživanja [284]. Životni vijek eritrocita podložan je djelovanju oksidacijskog stresa koji uzrokuje membransku lipidnu peroksidaciju jer su eritrociti bez jezgre i mitohondrija pa imaju deformiranu staničnu membranu, nestabilnu suspenziju i osmotsku osjetljivost. An

i sur. [285] dokazali da oksidacijski stres uzrokuje hemolizu eritrocita. U studiji koju su proveli Cyboran i sur. [286] proučavan je učinak polifenola na svojstva eritrocitne membrane, a zaključak je da polifenoli imaju sposobnost ugradnje u hidrofilnu površinu membrane eritrocita, modificirajući njihova svojstva. Analogno ovom istraživanju Suwalsky i sur. [287] su proučavali antioksidacijski i toksični učinak flavonoida sa eritrocitima iz vodenog ekstrakta tamnoljubičaste bobičaste biljke *Acai Berry* poznate po visokom udjelu flavanoida u svojem sastavu po čemu se svrstava u *superfood*. Došli su do spoznaje da vodeni ekstrakt biljke u interakciji s vanjskim fosfolipidnim slojem membrane inducira morfološke promjene ljudskog eritrocita. Biljke s antikoagulacijskim efektom mogu utjecati na povećanje eritrocita [272].

Promatramo li brojnost leukocita i udjele pojedinih tipova leukocita u diferencijalnoj krvnoj slici, tijekom ovog istraživanja jedino pozitivna kontrola sildenafilom i Gonadotropinom pokazuju povećan ukupni broj leukocita u mužjaka, dok u ženki nema povećanja broja leukocita ovisno o tretmanu.

Međutim, u mužjaka proizvod 1 (Epimedium, Ginseng, Maka, Šizandra, Sil, Pb) povećava omjer broja neutrofila (iako je nepromjenjen ukupan broj leukocita) što ukazuje na aktivaciju fagocitnih stanica i aktivaciju nespecifičnih imunskih reakcija. Nadalje, proizvod 2 (Hmelj, Matičnjak, Origano, Ginko, Pb, 3 pesticida) slično povećava broj neutrofila ali uz njih aktivira i limfocite odnosno stanice koje su vezane uz specifični odgovor imunskog sustava, a proizvod 4 (Epimedium, Ginseng, Maka, Tribulus, Arginin, Pb i Cd) samo povećava broj limfocita bez aktivacije neutrofila, odnosno moglo bi se reći da potiče nespecifično imunsku reakciju. Lojek i sur. [288] u svojem istraživanju proučavaju učinke polisaharida i polifenola koji mogu modulirati metaboličku aktivnost neutrofila. Neutrofilni su prva linija obrane organizma od infekcija i nezamjenjivi su u regulaciji imunološkog sustava. U prvim minutama stimulacije neutrofilni produciraju velike količine ROS-a koji mogu dodatno potaknuti upalni proces i pridonijeti oštećenju stanice i tkiva. U mužjaka tretman sildenafilom uzrokuje povećanje ukupnog broja leukocita i povećanje broja limfocita. U istraživanju koje su proveli Szczycka i sur. [289] između ostalog proučavan je modulacijski učinak sildenafila na limfocitne podskupine i humoralni imuni odgovor miševa primjenom lijeka *in vivo*. Do

promjena je došlo u subpopulacijama splenocita i to smanjenjem B stanica i povećanjem T stanica. Nije zabilježen imunosupresivni učinak lijeka.

Jedna od novijih studija koju su proveli Kniolek i Boguska [290] i koja po riječima autora predstavlja prvi pregled trenutnih spoznaja o učincima sildenafil na imunološki sustav, navodi da sildenafil ima utjecaja na angiogenezu, aktivaciju trombocita, proliferaciju regulatornih T stanica i proizvodnju proinflammatoryh citokina i autoantitijela. Djelovanje sildenafil razlikuje se kod ljudi i životinja te kod muških i ženskih jedinki. Navedene razlike između muških i ženskih jedinki mogu se objasniti endokrinim i genetskim razlikama među spolovima. U našoj studiji proizvod 8 (Epimedium, Maka, Tribulus, Damiana, Sarsaparila, Arginin, Cd i Pb) je u ženki uzrokovao neutrofiliju, a proizvod 9 (Hmelj, Matičnjak, Origano, Ginko, Pb i 3 pesticida) eozinofiliju. Eozinofili su poznati po aktivaciji u alergijskim reakcijama (iako se najčešće povećava i broj bazofila) stoga bi se potencijalno moglo govoriti i o alergenom učinku proizvoda 9 u ženki.

Proizvod 4 (Epimedium, Ginseng, Maka, Tribulus, Arginin, Pb i Cd) sildenafil i gonadotropin izazivaju povećanje broja trombocita u mužjaka. A u ženki gonadotropni hormon izaziva produljeno vrijeme krvarenja, a povećan je i volumen trombocita u svim tretmanima.

Leite i sur. [291] u svojoj studiji ističu kako postoji 58 biljnih vrsta koje mogu promijeniti hemostazu krvi i antikoagulaciju varfarinom (oralnog antikoagulanata izvorno izvedenog iz biljke). Češnjak, Đumbir, Ginkgo, i Ginseng smatraju se biljkama koje imaju jaki antikoagulacijski potencijal. Kumarini, kvinoni, ksantoni, terpeni lignani su aktivne komponente bilja koje u interakciji sa lijekovima mogu stimulirati antikoagulaciju na više načina, a štetni učinci te interakcije mogu biti povećanje rizika od krvarenja, anemije, hipotenzija, povišenje serumskih aminotransferaza, trombocitopenija i dr. Kombinacija navedenih biljaka s antikoagulantom ili antitrombocitnim lijekovima može biti ozbiljan zdravstveni rizik.

S obzirom da su navedeni istraživani proizvodi namijenjeni ED, posebnu se mora istaknuti učinak na hormonalnu ravnotežu. Stoga se moralo ustanoviti koliko se testosterona i estrogena može proizvesti u inducirajućim uvjetima. U tu svrhu testirana je skupina životinja tretirana Gonadotropnim hormonom (PKGon), sa ciljem indukcije sinteze testosterona i estrogena (estradiola). Ravnoteža spolnih

hormona poremećena je samo u mužjaka nakon tretmana sa nekim od istraživanih proizvoda. U mužjaka, proizvod 1 (Epimedium, Ginseng, Maka, Šizandra, Sil, Pb) i proizvod 2 (Hmelj, Matičnjak, Origano, Ginko, Pb, 3 pesticida) su povećali razinu testosterona, a u testisima je došlo do povećanja težine organa (OSI) uslijed izlaganja proizvodu 3 (Epimedium, Ginseng, Maka, Pb, As, Sil, Cipermetrin 2 i 3).

Razinu oksidativnog stresa u tkivima dobili smo mjerenjem markera lipidne peroksidacije (LPO), odnosno oksidativnog oštećenja staničnih lipida. Proizvod 1 (Epimedium, Ginseng, Maka, Šizandra, Sil, Pb) izazvao je povećanje malondialdehid (MDA) u slezeni, bubregu i jetri u mužjaka dok u testisima nije došlo do povećanja. Proizvod 2 (Hmelj, Matičnjak, Origano, Ginko, Pb, 3 pesticida) također uzrokuje povećanje MDA u slezeni i jetri mužjaka dok proizvod 3 (Epimedium, Ginseng, Maka, Pb, As, Sil, Cipermetrin 2 i 3) samo u jetri. Za razliku od proizvoda 1 proizvodi 2 i 3 uzrokuju povećanje LPO i u testisu mužjaka. Proizvod 4 (Epimedium, Ginseng, Maka, Tribulus, Arginin, Pb i Cd) uzrokuju lipidna oštećenja samo u bubregu mužjaka.

Povećanje MDA u bubrezima mužjaka uzrokovano djelovanjem biljne formulacije proizvoda 4 (Epimedium, Ginseng, Maka, Tribulus, Arginin, Pb i Cd) moguće je povezati i sa opterećenjem prisutnosti kadmija koji je detektiran u tom proizvodu. Kadmij je pronađen u količini koja se smatra prihvatljivom ali mogući potencijalni sinergistički učinak u kombinaciji sa aktivnim tvarima biljaka unutar proizvoda može potencirati štetne učinke u organizmu. Literaturno je potvrđeno da kadmij u organizmu može utjecati na oštećenje endotela, na razvoj oksidacijskog stresa povećanjem LPO te na razvoj bolesti bubrega i karcinoma [223-226].

Povećanje MDA u slezeni u ženki izazvali su svi testirani proizvodi u odnosu na kontrolu. Povećanja lipidnih oštećenja zamjetna su i u jetrima i bubregu ženki kod proizvoda 7 (Epimedium, Damiana, Mate, Tetivka i Pb) i proizvoda 9 (Hmelj, Matičnjak, Origano, Ginko, Pb i 3 pesticida) ali nisu statistički značajna u odnosu na kontrolnu skupinu.

Razinu antioksidacijske obrane (AOXO) prikazali smo mjerenjem aktivnosti SOD-a i GSH. SOD je u jetrima i bubregu u mužjaka kod proizvoda 1 (Epimedium, Ginseng, Maka, Šizandra, Sil, Pb) oko dva puta povišen u odnosu na kontrolu (K) a do povećanja je došlo i kod proizvoda 2 (Hmelj, Matičnjak, Origano, Ginko, Pb,

3 pesticida) i 4 (Epimedium, Ginseng, Maka, Tribulus, Arginin, Pb i Cd) u navedenim organima mužjaka. Najveće povećanje SOD u testisima opaža se kod proizvoda 3 (Epimedium, Ginseng, Maka, Pb, As, Sil, Cipermetrin 2 i 3). Proizvod 9 (Hmelj, Matičnjak, Origano, Ginko, Pb i 3 pesticida) u ženki izaziva dva puta veću vrijednost SOD u bubrezima, a proizvod 8 (Epimedium, Maka, Tribulus, Damiana, Sarsaparila, Arginin, Cd i Pb) u jetri ženki. U skupini tretiranoj PKGon, odnosno u skupini sa povećanom razinom sponih hormona (i u mužjaka i u ženki) zabilježen je porast razine SOD u jetri i bubregu. Ovaj učinak mogao bi se objasniti ukupnim povećanjem metabolizma izlučivanja viška hormona, i povećanom mitohondrijskom aktivnošću koja generira superoksidni anion u suvišku što dovodi do povećanja SOD-a.

Slezena je jedini organ u mužjaka u kojem je GSH ostao nepromijenjen u odnosu na kontrolnu skupinu (K). Proizvodi 1 (Epimedium, Ginseng, Maka, Šizandra, Sil, Pb) i 3 (Epimedium, Ginseng, Maka, Pb, As, Sil, Cipermetrin 2 i 3) izazivaju značajne promjene i povećanje GSH u bubregu i jetri mužjaka. Proizvod 2 (Hmelj, Matičnjak, Origano, Ginko, Pb, 3 pesticida) povećava GSH u bubregu i testisu zajedno sa proizvodom 3 (Epimedium, Am. ginseng, Maka, Pb, As, Sil, Cipermetrin 2 i 3), a proizvod 4 (Epimedium, Ginseng, Maka, Tribulus, Arginin, Pb i Cd) u bubregu i jetri. PKSil podiže razinu GSH u testisu a hormoni odnosno gonadotropinski tretman, u jetri.

U slezeni ženki najveće promjene razine GSH izaziva proizvod 7 (Epimedium, Damiana, Mate, Tetivka i Pb), dok je u bubregu ženki GSH ostao nepromijenjen u odnosu na kontrolu skupinu.

Obrazloženje nastanka okidativnog stresa (povećanje MDA u slezeni, jetri i testisu, povećanje SOD u bubregu i jetri, povećanje GSH u bubrezima i testisima) na stanicama pokusnih životinja koje su bile izložene proizvodu 2 moguće je tumačiti na osnovu njegovih ključnih sastojaka Hmelja i Ginka (ostali sastojci su Matičnjak i Origano). Hmelj sadrži visoke koncentracije bioaktivnih biljnih molekula dok je Ginko jaki vazodilatator. Dobro su poznati njegovi fiziološki učinci na vazodilataciju i antikoagulaciju koji se odvijaju preko dušikovog oksida i arginaze i supresije monoamino oksidaze serotonina [292]. Hmelj sadrži mnoge specifične bioaktivne tvari. Najviše obiluje flavanoidima i halkonima, a najzastupljeniji su 8-

prenilnaringenin (8-PN), 6-prenilnaringenin i isoksantohumol. Dok se isoksantohumolu pripisuje antikancerogeno djelovanje, 8-PN je okarakteriziran kao jedan od najmoćnijih poznatih fitoestrogena s ciljanim djelovanjem na estradiol. Njegova strukturna sličnost sa molekulom 17- β -estradiolom iz skupine ženskih spolnih hormona estrogena daje mu mogućnost njihova oponašanja. Ovi flavonoidi su pokazali širok spektar bioloških aktivnosti koje su uvjetovane njihovom stereokemijskom konfiguracijom. Osim toga, nedavna istraživanja ukazuju na to da prenilflavonoidi podliježu biotransformacijama koje bi mogle promijeniti ili obogatiti njihovu stereokemiju [123,124]. Stoga smatramo da je visoka koncentracija bioaktivnih molekula iz hmelja i velika količina kisika proširenim krvnim žilama dospijela do tkiva i uzrokovala povećanje lipidne peroksidacije i smanjenje antioksidacijskih molekula (GSH i SOD). Paralelno s time viša metabolička aktivnost doprinosi i povećanoj sintezi testosterona. Kod žena u postmenopauzi s urogenitalnom atrofijom fitoestrogeni iz ekstrakta hmelja smatraju se dobrom alternativom za hormonalno nadomjesno liječenje (HRT, engl. Hormonal Replacement Therapy). Međutim znanstvenici upozoravaju na mogućnost stvaranja potencijalno toksičnih učinaka novonastalih metabolita kao i činjenice da hidroksilirani metaboliti 17- β -estradiola su više aktivni i time povećavaju rizik nastanka karcinoma [126, 127]. Ekstrakt Ginka sadrži veliki broj reprezentativnih sastojaka (do sada izolirano oko 50 –tak spojeva) ali se njegova biološka aktivnost pripisuje dvijema važnim skupinama koju čine flavonoidi i terpenski trilaktoni. Primarnu ulogu imaju flavonoidni spojevi među kojima prevladavaju flavonolni mono-, di- i tri-glikozidi. Oni pokazuju jaku antioksidativnu aktivnost i zahvaljujući njima, ginko ima kapacitet vezivanja slobodnih kisikovih radikala utječući tako na povećanje tolerancije tkiva prema pomanjkanju kisika [270]. Na žalost Ginko sadrži i manje popularne spojeve, alkilfenole (ginkolna kiselina) koji doprinose toksičnom djelovanju biljke. Postoje istraživanja koja ne idu u prilog antioksidacijskoj ulozi Ginka pa je tako u studiji Al-Yahya i sur. [147] određivan učinak Ginka: na reproduktivnu, citološku i biokemijsku toksičnost kod mužjaka Swiss albino miševa. U navedenim pokusima miševi su oralnim putem tretirani s različitim dozama (25, 50 i 100 mg / kg / dan) vodene suspenzije *Ginkgo biloba* kroz 90 dana. Dokazane su značajne toksikološke promjene u težini pasjemenika, prostati kao i kromosomske aberacije. Promjene u postotku pokretljivosti, broju spermija i morfologiji spermija nisu bile značajne. Također je

došlo do povećanja malondialdehida (MDA) što razjašnjava prisutnost slobodnih radikala u induciranim promjenama kod testisa. Qian i sur. [293] dokazali su u serumu tretiranih životinja poremećaj metabolizma lipida i smanjenje serumskih enzima pri nižim i pri visokim koncentracijama Ginka (100 i 900 mg/kg). Histopatološki rezultati ukazali su na hepatotoksičnost (steatozu jetre) i nefrotoksičnost (tubularno vakuolarne degeneracije u bubrezima). Nastala toksičnost pripisuje se toksičnim sastojcima Ginka zbog čega se preporuča njegova ograničena upotreba kao lijeka za ED mada je primjena Ginka na tom području jako raširena. Također je kontraindicirana njegova primjena sa lijekovima za bolesti srca i kod upotrebe antidepresiva jer može djelovati na farmakodinamiku lijeka što je kod primjene biljnih preparata s Ginkom za poboljšanje libida i liječenje ED u sklopu deklaracije neobavezno upozorenje za potrošača [147, 148]. Nadalje, i ostale biljke u sastavu proizvoda 2, Matičnjak i Origanu imaju značajan udio bioaktivnih komponenti, primjerice Melissa officinalis ili Matičnjak je izvor polifenolnih tvari posebice - ružmarinske kiseline sa antioksidacijskim, protuupalnim i snažnim antivirusnim djelovanjem [294]. *Origanum vulgare* ili Origanu ima visok sadržaj fenolne kiseline i flavonoida, sa antibakterijskim, fungicidnim, antiviralnim i antioksidacijskim djelovanjem [295]. Rijetke studije opisuju ulogu Origana u spolnim funkcijama mada kao pripadnik porodice Metvica sadrži fitoestrogene. Istraživanjem je potvrđeno da u kombinaciji sa sintetskim hormonima u većim dozama utječe na oogenezu i gonadotropne stanice [137]. Dostupni literaturni podatci govore da nije poželjna kombinacija Origana sa Ginkom, Anđelikom, Đumbirom, Ginsengom, divljim kestenom, crvenom djetelinom, češnjakom i kurkumom jer imaju antikoagulacijska svojstva te u interakciji s Origanom mogu povećati rizik od krvarenja kao što vrijedi i za lijekove aspirin i ibuprofen [139].

U našem istraživanju skupina životinja tretirana proizvodom 2 imala je obilna krvarenja što se može povezati sa navedenom teorijom o nepoželjnoj i za zdravlje opasnoj kombinaciji Ginka i Origana u istoj biljnoj formulaciji.

Proizvod 4 (Epimedium, Ginseng, Maka, Tribulus, Arginin, Pb i Cd) značajno je povećao vrijednost MDA i SOD u bubregu, a GSH u jetri tretiranih mužjaka. Jedna od osnovnih djelatnih tvari u proizvodu 4 je biljka Epimedium koja sadrži lignane i flavonoide, i to hiperin, kvercitrin, epimedin A, B, C i ikarin za kojeg je utvrđeno da

posjeduje farmakološka svojstva. Biološka aktivnost epimediuma u liječenju problema seksualnog poremećaja proizlazi iz činjenice da aktivna tvar ikarin djeluje kao inhibitor PDE-5, tj. ima slično djelovanje kao i sildenafil [71]. Osim što inhibira PDE-5 povećava i proteinsku ekspresiju NO-sintetaze, ali nema nikakav utjecaj na razinu testosterona [72]. U istraživanju Nan i sur. [73] provedenom na miševima dokazano je da ikarin poboljšava erektilnu funkciju u korelaciji sa povećanjem glatke strukture spužvastog tkiva. Potiče proliferaciju Sertolijevih stanica što se djelomično povezuje sa njegovom zaštitnom ulogom muške reproduktivne sposobnosti. Iako su ove spoznaje o učinku Epimediuma dostupne, o toksičnim učincima zna se jako malo [73]. Proizvod 4 osim Epimediuma u svojoj formulaciji sadrži i biljke Ginseng, Tribulus i Maku. Iz dostupnih literaturnih podataka vidljivo je da postoje podijeljena mišljenja vezana uz provedene studije o učinkovitosti Ginsenga. Neka istraživanja ukazala su na pozitivne učinke ove biljne vrste na zdravlje ljudi, dok druge govore o mogućim toksičnim učincima. Primarni aktivni sastojci Ginsenga je skupina od 30 različitih triterpen saponina, koji se nazivaju ginsenosidi, a razlikuju se po sadržaju i svojstvima ginsenga [296, 297]. Znanstveni literaturni podatci o funkcionalnoj učinkovitosti pojedinih biljnih vrsta za liječenje ED ili poboljšanje libida govore da je za poboljšanje ED iz Ginsenga zaslužan ginsenosid Rg3 kojemu se također pripisuju antioksidativna i neuroprotektivna svojstva. Potvrđeno je vezanje određenih ginsenosida na hormonskim receptorima te utjecaj na razinu estrogena i testosterona [79, 80]. Pojedine studije predstavljaju Ginseng kao dobar tretman za problem menopauze. U organizmu djeluje kao fitoestrogen. Prisutnost kseno hormona može dovesti do ozbiljnih zdravstvenih posljedica kao što je rak dojke, zbog čega je upotreba Ginsenga u menopauzi podložna kritikama i negativnim stavovima [81]. Istraživanje koje su proveli Kim i sur. [82] analizira randomizirane studije koje su uspoređivale učinke uzimanja bilo koje vrste Ginsenga s placebom u žena u menopauzi. Došlo se do zaključka da su te studije ograničene i da imaju izražajnu pristranost u rezultatima tako da se ne mogu izvući čvrsti zaključci o pozitivnoj učinkovitosti Ginsenga u menopauzi [82]. Funkcionalne studije o učincima *Lepidium meyenii* ili Make na ED i povećanje libida govore da ova biljka kao i Ginseng povećava snagu, energiju, izdržljivost, libido i seksualnu funkciju te djeluje kao adaptogen i hormonalni regulator. Funkcionalne studije provedene na životinjama pokazuju da Maka može povećati plodnost te pokretljivost i broj spermija [91] dok je značajan i njen utjecaj na povećanje razine

testosterona u miševa, a obiluje fitosterolima i fitoestrogenima, alkaloidima i glukozinolatima koji su posebno odgovorni za plodnost i libido [92]. Studije koje su proučavale djelovanje Make u rješavanja problema ED daju oprečne rezultate prema kojima jedni naglašavaju pozitivan učinak nakon primjene od 4-6 tjedana dok druge ne pronalaze djelotvorne učinke. Podaci dobiveni obradom randomiziranih kliničkih studija iz 17 različitih baza pružaju ograničene dokaze o učinkovitosti Make u poboljšanju seksualne funkcije i liječenju ED, a kao razlog tome ističe ukupan broj pokusa, ukupnu veličinu uzorka i prosječni rizik od pristranosti koji su bili zastupljeni u primarnim istraživanjima koja su zbog svega navedenog bila previše ograničena da bi se mogli izvući čvrsti dokazi. Znanstvenom studijom prikazano je ljekovito djelovanje Make kod rješavanja muške neplodnosti nastale kao posljedica izloženosti olovu. Naime, dokazano je da je učinak Make kod miševa tretiranih olovnim acetatom prevenirao štetne poremećaje spermatogeneze koji su bili inducirani tim spojem, a izostali su kod skupine miševa koja je uz olovni acetat dobivala i Maku [95 - 97].

Tribulus terrestris kao aktivnu tvar sadrži steroidalni saponin protodioscin. Funkcionalna istraživanja su ukazala na njegovu djelotvornost vezano uz povećanje razine testosterona, dihidrot testosterona i dihidroepiandrosterona što rezultira povećanim libidom [298]. Prema epidemiološkoj studiji o rasprostranjenosti ED u SAD-u odnos serumskih razina dehidroepiandrosterona i incidencije ED je inverzno koreliran. Niske razine androgenih hormona umanjuju ekspresiju gena i enzimatsku aktivnost endotelnih i neuralnih NO-sintaza te fosfodiesteraza 5, što objašnjava njihovu ulogu u mehanizmu ED [299, 300]. Tribulus je popularan i među sportašima zbog tvrdnji da povećava anaboličko i androgeno djelovanje testosterona na način da produžuje aktivaciju endogenog testosterona. U studiji Saudan i sur. [105] se navodi da su sportaši kod doping kontrola pozitivan nalaz keto-steroida opravdavali upotrebom Tribulusa zbog čega je proveden pokus na dobrovoljcima. Nakon terapije Tribulusom od 48 sati rezultat je bio negativan čime je opovrgnut njegov utjecaj na endogeni metabolizam testosterona [105]. Istraživanje koje su proveli Neychev and Mitev [106] postavilo je za cilj kritičku analizu uloge Tribulusa kao afrodizijaka i njegovu sposobnost da djeluje na povećanje androgena. Istraživanjem je obuhvaćen pregled literature šest glavnih znanstvenih baza i drugih studija koji su objavljeni u periodu od 1968.

do 2015. godine. Zaključeno je da su empirijski dokazi koji podupiru navedene pretpostavke slabi i neuvjeljivi sa dosta prividnih zapažanja. Uloga Tribulusa kao afrodisijaka i dalje ostaje nepoznanica, a istraživanja na tu tematiku treba usmjeriti na nove mehanizme učinkovitosti ovisne o endotelu i NO. Međutim, postoje i istraživanja koja ističu negativne pojave uzrokovane konuzmacijom vodenog ekstrakta Tribulusa. Nus pojave kao hepatotoksičnost, nefrotoksičnost i neurotoksičnost dokazane su vrlo visokim jetrenim enzimima u osobe koja je pila biljni vodeni ekstrakt kao prevenciju nastanka bubrežnih kamenaca [107].

Međutim u analizi sastojaka proizvoda 4 uočava se da je arginin prisutan u visokoj koncentraciji i predstavlja supstrat za reakciju dušikovog oksida koji djeluje kao vazodilatator. Studije koje analiziraju utjecaj arginina na ED pokazuju da dnevna doza od 5 g uzeta na usta utječe na poboljšanje seksualne funkcije u muškaraca sa problemom ED [168]. Manje koncentracije nisu učinkovite ukoliko se ne uzimaju u kombinaciji s Pycnogenolom (ekstraktom kore bora) koji poboljšava učinak arginina [169].

Toksikološki rezultati dobiveni istraživanjem ukazuju da oksidacijski stres izazvan proizvodom 4 (Epimedium, Ginseng, Maka, Tribulus, Arginin, Pb i Cd) nije bio jednako izražen kao u proizvodu 2 (Hmelj, Matičnjak, Origano, Ginko, Pb, 3 pesticida). Ginko je u proizvodu 2 bio zastupljen u manjoj količini nego većina prisutnih biljaka, stoga prvotno promišljanje o učincima oksidacijskog stresa koji se mogu pripisati pojedinoj biljci nije opravdano već je najvjerojatniji razlog povećanoj razini oksidacijskog stresa ukupna značajno veća doza bioaktivnih tvari (2,5 puta veća količina preporučane dnevne doze i 7 puta veća koncentracija bioaktivnih komponenti proizvoda 2 u odnosu na proizvod 4) koje imaju sinergistički učinak na izravno izazivanje oksidacijskog stresa uz dodatne neizravne učinke uzrokovane povećanom razinom testosterona. Također, evaluacijom literaturnih podataka o biološkim učincima, čini se da su biljke u sastavu proizvoda 4 jačeg biološkog učinaka, i da se pri dizajnu tablete i određivanju RDA ili -preporučenog dnevnog unosa ta činjenica uzela u obzir. Ovakav zaključak upućuje na hitnu reevaluaciju dopuštenog dnevnog unosa proizvoda 2 i 9, kao i dodatna istraživanja o graničnim dozama bioaktivnih molekula (polifenola, tanina, fenolnih kiselina i flavonoida) koje izazivaju toksični učinak u organizmu sisavaca i čovjeka.

Važno je napomenuti da se prilikom procjene štetnog utjecaja na pokusne životinje treba uzeti u obzir ukupna količina svih bioaktivnih tvari obzirom na preporučeni dnevni unos. Drugim riječima, životinje koje su primale proizvod 2 primile su 1410 mg tvari/dan, a životinje koje su primile proizvod 4 unijele su 680 mg tvari/dan tijekom 28 dana. Iz navedenog se može zaključiti da je veća količina bioaktivnih tvari bila u proizvodu 2, iako je biološki raspoloživa doza bioaktivnih spojeva koji dopijevaju u testise nepoznata. Poznato je da se tijekom bioapsorpcije iz crijeva i distribucije po tijelu ove bioaktivne komponente gomilaju u specifičnim tkivima i da su podložne opsežnim metaboličkim procesima. Slobodni radikali koji se proizvode na mjestima biotransformacije bioflavonoidima i njihovim metabolitima, stvaraju značajne nove spojeve nepoznatih svojstava od kojih neki znatno utječu na oksidoredukcijske procese u tkivima. Iz tih razloga, je potrebno detaljno istraživanje kemijske prirode bioflavonoida i njihovih proizvoda u biološkim sustavima [267]. Međutim, rezultati mjerenja testosterona ukazuju na povišene razine ovog hormona u skupini izloženosti proizvodu 2 u kojem su i uočene najveće promjene oksidoredukcijskog sustava. Možemo pretpostaviti da osim izravnih učinaka bioaktivnih komponenti, promjena oksidoredukcijskih markera posredno može biti izazvana i povećanom razinom testosterona. Dokaz tome su i literaturni podaci o međudjelovanju testosterona i polifeola i flavonoida te testosterona i markera oksidacijskog stresa [300-302]. Većina radova koji su publicirani o biljkama koje su sastavni dio istraživanih proizvoda toksične učinke opisuju samo na tumorskim stanicama i tkivima do molekularne razine, ali o djelovanju na zdravo tkivo ne postoje dostupni literaturni podaci koji bi ukazivali na toksične učinke odabranih biljnih vrsta.

Izraženo povećanje MDA u slezeni, jetri i bubregu mužjaka izazvano je i djelovanjem proizvoda 1 (povećan SOD u bubregu i jetri, povećan GSH u jetri) koji u svojoj formulaciji sadrži (Epimedium, Ginseng, Maka, Šizandra, Sil, Pb) prisutnost ilegalno dodane farmakološke tvari sildenafil. U studiji Kim i sur. [159] istražena je uloga Šisandre kao alternativne hormonske terapije žena u menopauzi. Potvrđeno je da zbog sadržaja lignana ima fitoestrogensku sposobnost te se preporučuje kao dobra alternativa sintetskoj terapiji zbog minimalnog rizika za razvoj karcinoma. Kroz znanstvene studije često se opisuje u kombinaciji sa dobro poznatim biljem u tradicionalnoj kineskoj medicini

adaptogenih svojstava kao što su Ginseng i Rodiolarosea [160]. Učinkovitost šisandrola A i B, kao aktivnih tvari njenog sastava povezuje se s problemima pri ED. U kombinaciji sa slidenafilcitratom može imati sinergističko djelovanje u bolesnika koji potpuno ne odgovaraju na terapiju sildenafilom. Šisandrol A daje obećavajući učinak u tretmanima ED i kardiovaskularnih bolesti jer se smatra da utječe na aktiviranje NO-cGMP signalnih puteva što dovodi do opuštanja glatkih mišića kavernoznog tijela [161].

Sličnog sastava kao proizvod 1 (Epimedium, Ginseng, Maka, Šizandra, Sil, Pb) je i proizvod 3 (Epimedium, Ginseng, Maka, Pb, As, Sil, Cipermetrin 2 i 3) koji utječe na povećanje količine MDA u jetri i testisu (povećanje SOD i GSH u jetri i testisu) i za razliku od proizvoda 1 ne sadrži Šizandru ali također sadrži ilegalno dodani sildenafil u znatno većoj količini od proizvoda 1. Proizvod 3 sadrži i pesticide cipermetrin 2 i 3 iznad MRO. Preporučena dnevna doza je približno ista u oba proizvoda (400 i 450 mg tvari/dan)

Klasterska analiza dovodi u vezu pojedine biljke čije zajedničke kombinacije izazivaju značajne toksikološke učinke za svaki analizirani parametar. Primjerice kod klastera koji pruža ovisnost MDA o biljnim formulacijama uočavamo dvije homologne grupe najveće sličnosti (Epimedium, Ginseng, Šizandra i Maka) i drugu (Origano, Melisa, Ginko i Hmelj). Iz prvog homologa Epimedium i Ginseng su najbliže postavljene biljne vrste što ukazuje na sličan mehanizam djelovanja, a isto tako može se primjetiti da jaku statističku ovisnost tih biljaka prema MDA bubrega, slezene i jetre preko Spermanova faktora korelacije (Rho) pokazuju upravo te dvije biljke. Navedeno može značiti da sličan mehanizam djelovanja biljnih komponenti sinergistički povećava efikasnost što se onda posredno odražava i na jače negativne učinke na pojedine organe. Ovakav oblik klastera može biti pogodan za predviđanja jednostavnih mehanizama djelovanja baziranih na strukturnim karakteristikama molekula.

Ovim još jednom možemo potvrditi ranije postavljenu hipotezu da oksidacijski stres organa tretiranih životinja nije nastao kao posljedica pojedinačnog učinka biljke zastupljene u proizvodu već kao posljedica veće količine sličnih bioaktivnih tvari iz više biljnih vrsta koje pridonose sinergističkom učinku djelotvornosti sa produljenim vremenom i ponavljanim dozama. Istraživanje ukazuje na štetne posljedice koje

mogu nastati po zdravlje ljudi ukoliko se nastavi dosadašnja praksa kombinacije biljnih formulacija na osnovi literaturno dostupnih pojedinačnih pozitivnih čimbenika bez poznavanja mogućih metaboličkih interakcija unutar biljnih komponenti.

5. ZAKLJUČCI

1. Kemijska analiza pesticida i metala pokazuje da su svi analizirani proizvodi sadržavali olovo. Proizvod 3 sadržavao je detektibilne tragove arsena, a proizvod 4 i proizvod 8 su uz olovo sadržavali i kadmij. Niti jedan proizvod nije sadržavao živu iznad granice kvantifikacije metode ($LOQ < 0,05 \text{ mg/kg}$).
2. Od 78 analiziranih pesticida, iznad maksimalno dozvoljene razine ostataka pesticida bila su 3 pesticida (3,84%). Kvantificirani pesticidi bili su bioaletrin, ciflutrin izomer 3, cipermetrin izomer 2 i 3 te miklobutanil. Proizvod 2 i 9 sadržavali su bioaletrin, ciflutrin izomer 3 i miklobutanil dok je proizvod 3 sadržavao cipermetrin izomer 2 i 3. Ostali proizvodi nisu sadržavali tragove pesticida.
3. Dva od devet (22,2%) analiziranih proizvoda sadržavali su nedeklariranu farmakološki zabranjenu tvar sildenafil. Sildenafil je pronađen u proizvodima 1 i 3.
4. Niti jedan od apliciranih proizvoda u mužjaka nije uzrokovao promjene prirasta, dok je u ženki jedino proizvod 9 sa biljnom formulacijom Hmelj, Matičnjak, Origano i Ginko i s prisutnošću olova i pesticida cipermetrina izomer 2 i 3 uzrokovao veći prirast.
5. Kod mužjaka, suprotno od ženki, OSI jetre povećan je u proizvodu 1 koji sadrži biljne vrste Epimedium, Ginseng, Maku i Šizandru uz detektirano olovo i ilegalno dodanu farmakološku aktivnu tvar sildenafil.
6. OSI bubrega u mužjaka smanjen je nakon izlaganja proizvodu 3 (Epimedium, Ginseng, Maka, olovo, arsen, sildenafil i cipermetrin 2 i 3) u odnosu na pozitivnu kontrolu Gonadotropnom.
7. U mužjaka su svi proizvodi i tretmani sildenafilom i gonadotropnim hormonom, osim proizvoda 3 (Epimedium, Ginseng, Maka, sildenafil, cipermetrin 2 i 3, olovo i arsen), uzrokovali povećanje broja eritrocita, koncentraciju hemoglobina i hematokrita. U mužjaka je znakovito da je sildenafil uzrokovao najveći porast navedenih parametara. U ženki je samo proizvod 8 (Epimedium, Maka, Tribulus, Damiana, Sarsapila, olovo i kadmij) značajno povećao koncentraciju hemoglobina dok su ostali parametri vezani uz fiziologiju eritrocita i hemoglobina nepromijenjeni.
8. U brojnosti leukocita i udjela pojedinih tipova leukocita u diferencijalnoj krvnoj slici, jedino proizvod 4 (Epimedium, Ginseng, Maka, Tribulus, Arginin, olovo i arsen) povećava ukupni broj leukocita u mužjaka, dok u ženki nema povećanja

broja leukocita ovisno o tretmanu. U mušjaka proizvod 1 (Epimedium, Ginseng, Maka, Šizandra, sildenafil i olovo) povećava omjer broja neutrofila (iako je nepromjenjen ukupan broj leukocita). Proizvod 2 (Hmelj, Matičnjak, Origano, Ginko, pesticidi bioaletrin, ciflutrin izomer 3 i miklobutanil i olovo) na sličan način povećava broj neutrofila ali uz njih aktivira i limfocite tj. specifični odgovor imunskog sustava, a proizvod 4 (Epimedium, Ginseng, Maka, Tribulus, Arginin, olovo i arsen) samo povećava broj limfocita (uz ukupno povećanje broja svih bijelih krvnih stanica) bez aktivacije neutrofila te potiče nespecifično imunsku reakciju. U ženki proizvod 8 (Epimedium, Maka, Tribulus, Damiana, Sarsapila, olovo i kadmij) uzrokuje neutrofiliju, a proizvod 9 (Hmelj, Matičnjak, Origano, Ginko, pesticidi bioaletrin, ciflutrin izomer 3 i miklobutanil i olovo) eozinofiliju odnosno, daje naznaku o alergenom učinku.

9. Proizvod 2 (Hmelj, Matičnjak, Origano, Ginko, pesticidi bioaletrin, ciflutrin izomer 3 i miklobutanil i olovo) izaziva antikoagulacijski učinak i produljeno vrijeme krvarenja, a proizvod 4 (Epimedium, Ginseng, Maka, Tribulus, Arginin, olovo i arsen), sildenafil i gonadotropni hormon izazivaju povećanje broja trombocita u mušjaka. I u ženki gonadotropni hormon izaziva produljeno vrijeme krvarenja. U ženki je također povećan i volumen trombocita u svim tretmanima.

10. U mušjaka, proizvod 1 (Epimedium, Ginseng, Maka, Šizandra, sildenafil i olovo) i proizvod 2 (Hmelj, Matičnjak, Origano, Ginko, pesticidi bioaletrin, ciflutrin izomer 3 i miklobutanil i olovo) su povećali razinu testosterona, a u testisima je došlo do povećanja težine organa (OSI) uslijed izlaganja proizvodu 3 (Epimedium, Ginseng, Maka, sildenafil, cipermetrin 2 i 3, olovo i arsen).

11. Proizvod 1 je izazvao povećanje malondialdehida (MDA) u slezeni, jetri i bubregu mušjaka, dok u testisima nije došlo do povećanja. Proizvod 2 uzrokuje povećanje MDA u slezeni, jetri i testisu mušjaka. Proizvod 3 je povećao MDA u jetri i testisu mušjaka, a proizvod 4 samo u bubregu mušjaka. Povećanje MDA u ženskih životinja utvrđeno je samo u slezeni u sva tri proizvoda (7,8 i 9).

12. Superoksid dismutaza (SOD) je kod proizvoda 1 (Epimedium, Ginseng, Maka, Šizandra, sildenafil i olovo) u jetri i bubregu u mušjaka oko 2 puta povišena u odnosu na kontrolu, a do povećanja je došlo i kod proizvoda 2 (Hmelj, Matičnjak, Origano, Ginko, pesticidi bioaletrin, ciflutrin izomer 3 i miklobutanil i olovo) i 4

(Epimedium, Ginseng, Maka, Tribulus, Arginin, olovo i arsen) u navedenim organima mužjaka. Najveće povećanje SOD-a u testisima opaža se kod proizvoda 3 (Epimedium, Ginseng, Maka, sildenafil, cipermetrin 2 i 3, olovo i arsen). Proizvod 9 (Hmelj, Matičnjak, Origano, Ginko, pesticidi bioaletrin, ciflutrin izomer 3 i miklobutanil i olovo) u ženki izaziva dva puta veću vrijednost SOD u bubrezima, a proizvod 8 (Epimedium, Maka, Tribulus, Damiana, Sarsapila, olovo i kadmij) u jetri ženki.

13. Proizvodi 1 (Epimedium, Ginseng, Maka, Šizandra, sildenafil i olovo), proizvod 3 (Epimedium, Ginseng, Maka, sildenafil, cipermetrin 2 i 3, olovo i arsen) i proizvod 4 (Epimedium, Ginseng, Maka, Tribulus, Arginin, olovo i arsen) izazivaju značajne promjene i povećanje ukupnog glutationa (GSH) u jetri mužjaka, dok proizvodi 1, proizvod 2 (Hmelj, Matičnjak, Origano, Ginko, pesticidi bioaletrin, ciflutrin izomer 3 i miklobutanil i olovo) i proizvod 3 povećavaju GSH u testisu. Pozitivna kontrolna skupina sa sildenafilom (PKSil) također podiže razinu GSH u testisu, a hormoni odnosno gonadotropinski tretman u jetri. Proizvod 2 značajno povećava razinu GSH u bregu mužjaka. U slezeni i jetri ženki najveće promjene razine GSH izaziva proizvod 7 (Epimedium, Damiana, Maka, Tetivka i olovo) dok je u bubregu ženki GSH ostao nepromjenjen u svih istraživanih proizvoda u odnosu na kontrolu skupinu.

14. Klaster analiza pokazuje da kombinacija biljnih vrsta Origano, Ginko, Matičnjak i Hmelj ili Tribulus, Sarsaparila i Maka imaju utjecaja na hematološke parametre kod životinja. Na spolne hormone muških i ženskih jedinki utječe kombinacija biljaka Origano, Ginko, Matičnjak i Hmelj. Kombinacije biljaka Hmelj, Matičnjak, Origano i Ginko ili Maka, Ginseng, Šizandra i Epimedium također pokazuju utjecaj na stvaranje oksidacijskog stresa i povećanje MDA. Navedene biljne vrste su izražajnog vazodilatatorskog učinka i njihova kombinacija pridonosi sinergističkom djelovanju štetnog efekta.

15. Navedene poveznice odgovarajućih biljnih skupina dobivenih klaster analizom potvrđuje i Spermanova korelacijska analiza (Rho) koja daje značajnu ($p < 0,05$) statističku povezanost između promjenjenih hematoloških parametara i toksikoloških promjena na pojedinim organima te štetnog utjecaja biljaka zbog nepovoljnih biljnih kombinacija unutar proizvoda.

6. LITERATURA

1. General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine. World Health Organization. Geneva. 2000. WHO/EDM/TRM/2000.
2. WHO monographs on selected medicinal plants VOLUME 1. World Health Organization. Geneva. 1999.
3. Toplak Galle K. Hrvatsko ljekovito bilje. Mozaik knjiga 2001; 1: 1-310.
4. WHO monographs on medicinal plants commonly used in the Newly Independent States (NIS). WHO Headquarters. Geneva. 2006.
5. Glisson JK, Walker LA. How physicians should evaluate dietary supplements. *Am J Med* 2010; 123(7): 577-82.
6. Ismail EA, El-Sakka AI. Innovative trends and perspectives for erectile dysfunction treatment: A systematic review. *Arab J Urol* 2016; 18(2): 84-93.
7. Cvek J, Balažin A, Tomić S. Interakcije biljnih s konvencionalnim lijekovima. *Kemija u Industriji* 2011; 60(6): 343–349.
8. World Health Organisation, WHO Guidelines on Safety Monitoring of Herbal Medicines in Pharmacovigilance System. WHO 2004; 1-18.
9. Directive 2002/46/EC of the European Parliament and of the Council of 10 June 2002 on the approximation of the laws of the Member States relating to food supplements. L 183: 51-57.
10. Pravilnik o hrani za posebne prehrambene potrebe. *Narodne novine Republike Hrvatske* 81/2004; 1-39.
11. Pravilnik o dodacima prehrani. *Narodne novine Republike Hrvatske* 46/2011, 41/2013; 1-36.
12. Zakon o hrani. *Narodne novine Republike Hrvatske* 46/2007; 1-47.
13. Corrigendum to Regulation (EC) No 1924/2006 of the European Parliament and of the Council on nutrition and health claims made on foods.

14. Pravilnik o tvarima koje se mogu dodavati hrani i koristiti u proizvodnji hrane te tvarima čije je korištenje u hrani zabranjeno ili ograničeno *Narodne novine Republike Hrvatske* 160/2013; 1-43.
15. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. L 364. 5-24.
16. FDA, Dietary Saplement, dostupno na <https://www.fda.gov/Food/DietarySupplements> [7.11.2017.].
17. FDA, All Natural' Alternatives for Erectile Dysfunction: A Risky Proposition. dostupno na: <https://www.fda.gov/ForConsumers/ConsumerUpdates/ucm465024.htm> [7.11.2017.].
18. WHO, Sexual and reproductive health. Dostupno na: http://www.who.int/reproductivehealth/topics/sexual_health/sh_definitions/en [23.11.2017.].
19. WHO, Developing sexual health programmes - A framework for action. WHO/RHR/HRP/10.22. Geneva. 2010. pp.1-54. Dostupno na: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/70501/1/WHO_RHR_HRP_10.2_2_eng.pdf [23.11.2017.].
20. Money J. History, causality, and sexology. *J Sex Res* 2003; 40(3): 237-239.
21. Van Anders SM. Testosterone and sexual desire in healthy women and men. *Arch Sex Behav* 2012; 41(6): 1471-1484.
22. National Institute of Health (NIH), Conseensus Statement 1992.
23. Laumann EO, Nicolosi A, Glasser DB, Paik A, Gingell C, Moreira E, Wang T. For the GSSAB Investigators'Group: Sexual problems among women and men aged 40–80 y: prevalence and correlates identified in the Global Study of Sexual Attitudes and Behaviors. *Int J Impot Res* 2005; 17(1): 39-57.

24. Aytac IA, McKinlay JB, Krane RJ. The likely worldwide increase in erectiledysfuction between 1995 and 2025 and some possible policy consequences. *BJU Int* 1999; 84(1): 50-56.
25. King Chien JL, Nader F, Gerald BB. Sexual dysfunction in 2013: Advances in epidemiology, diagnosis and treatment. *Arab J Urol* 2013; 11(3): 194–202.
26. Štimac G. Erektalna disfunkcija. *Medicus* 2012; 21(1): 87–93.
27. Boolell M, Allen MJ, Ballard SA, Gepi-Attee S, Muirhead GJ, Naylor AM, Osterloh IH, Gingell C. Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction. *Int. J. Impot. Res* 1996; 8(2): 47–52.
28. Jensen TK, Andersson AM, Jorgensen N, Andersen AG, Carlsen E, Petersen JH, Skakkebaek NE. Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men. *Fertil Steril* 2004; 82(4): 863–870.
29. Šincek B. Fosfodiesteraza tipa 5 i sildenafil. *Medicus* 2004; 13(2): 125 – 129.
30. Eardley I, Cartledge J. Tadalafil (Cialis) for men with erectile dysfunction. *Int J Clin Pract* 2002; 56(4): 300-304.
31. Kyle JA, Brown DA, Hill JK. Avanafil for erectile dysfunction. *Ann Pharmacother* 2013; 47(10): 1312-1320.
32. Corona G, Rastrelli G, Burri A, Jannini EA, Maggi M. The safety and efficacy of Avanafil, a new 2nd generation PDE5i: comprehensive review and meta-analysis. *Expert Opin Drug Saf* 2016; 15(2): 237-47.
33. Meyer P. Testosterone therapy in female hypoactive sexual desire disorder. *Rev Med Suisse* 2016; 12(510): 540-543.
34. Kloner RA, Mitchell M, Emmick JT. Cardiovascular effects of tadalafil. *Am J Cardiol* 2003; 92: 37-46.

35. Lim YP, Kuo SC, Lai ML, Huang JD. Inhibition of CYP3A4 expression by ketoconazole is mediated by the disruption of pregnane X receptor, steroid receptor coactivator-1, and hepatocyte nuclear factor 4alpha interaction. *Pharmacogenet Genomics* 2009; 19(1): 11-24.
36. Webb DJ, Freestone S, Allen MJ. Sildenafil citrate and blood-pressure-lowering drugs: Results of drug interaction studies with an organic nitrate and calcium antagonist. *Am J Cardiol* 1999; 83(5A): 21-28.
37. Bender AR, Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev* 2006; 58(3): 488-520.
38. Francis SH, Lincoln TM, Corbin JD. Characterization of a Novel cGMP Binding Protein from Rat Lung. *J. Biol. Chem* 1980; 255(2): 620-626.
39. Su YH, Vacquier VD. Cyclic GMP-specific Phosphodiesterase-5 Regulates Motility of Sea Urchin Spermatozoa. *Mol Biol Cell* 2006; 17(1): 114–121.
40. Fiorito J, Zhang H, Staniszewski A, Feng Y, Francis YI. Synthesis of quinoline derivatives: discovery of a potent and selective phosphodiesterase 5 inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem* 2013; 60: 285–294.
41. Chen C, Chang Y, Bau D, Huang H, Tsai F, Tsai C, Chen CY. Discovery of potent inhibitors for phosphodiesterase 5 by virtual screening and pharmacophore analysis. *Acta Pharmacologica Sinica* 2009; 30: 1186–1194.
42. Šimić N. Sex hormones and the sexual desire. *Med Jad* 2009; 39(1-2): 5-12.
43. Bhasin S, Cunningham GR, Hayes FJ, Matsumoto AM, Snyder PJ, Swerdloff RS, Montori VM. Testosterone therapy in adult men with androgen deficiency syndromes: An Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95(6): 2536-2559.

44. Morales A, Bella AJ, Chun S, Lee J, Assimakopoulos P, Bebb R, Gottesman I, Alarie P, Dugré H, Elliott S. A practical guide to diagnosis, management and treatment of testosterone deficiency for Canadian physicians. *Can Urol Assoc J* 2010; 4(4): 269-275.
45. Schlich C, Romanelli F. Issues Surrounding Testosterone Replacement Therapy. *Hosp Pharm* 2016; 51(9): 712-720.
46. Reilly CM, Zamorano P, Stopper VS, Mills TM. Androgenic regulation of NO availability in rat penile erection. *J Androl* 1997; 18(2): 110-115.
47. Štraus B. Dušikov oksid i njegove funkcije. *Biochemia Medica* 1996; 6(1): 1-21.
48. Carneiro FS, Webb RC, Tostes RC. Emerging Role for TNF- α in Erectile Dysfunction. *J Sex Med* 2010; 7(12): 3823–3834.
49. Morgunov L, Vertkin AL, Pushkar D. Safety of long-term replacement hormonal therapy in patients with erectile dysfunction and androgen deficiency. *Urologiia* 2007; (5): 49-51.
50. Meyer P. Testosterone therapy in female hypoactive sexual desire disorder. *Rev Med Suisse* 2016; 12(510): 540-543.
51. Iyer R, Handelsman DJ. Androgens. *Front Horm Res* 2016; 47: 82-100.
52. Eklöf AC, Thurelius AM, Garle M, Rane A, Sjöqvist F. The anti-doping hot-line, a means to capture the abuse of doping agents in the Swedish society and a new service function in clinical pharmacology. *Eur J Clin Pharmacol* 2003; 59(8-9): 571-577.
53. Bhagavathula AS, Elnour AA, Shehab A. Pharmacovigilance on sexual enhancing herbal supplements. *Saudi Pharm J* 2016; 24(1): 115-118.
54. Glisson JK, Walker LA. How physicians should evaluate dietary supplements. *Am J Med* 2010; 123(7): 577-582.
55. Shetti S, Kumar CD, Kumar Sriwastava N, Prakash Sharma I. Pharmacovigilance of herbal medicines: Current state and future directions. *Phcog Mag* 2011; 7(25): 69–73.

56. Ching-Shwun L, Zhong-Cheng X, Zhong W, Chunhua D, Yun-Ching H, Guiting L, Lue TF. Stem Cell Therapy for Erectile Dysfunction: A Critical Review. *Stem Cells Dev* 2012; 21(3): 343–351.
57. Choi WS, Kwon OS, Cho SY, Paick JS, Kim SW. Effect of chronic administration of PDE5 combined with glycemic control on erectile function in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Sex Med* 2015; 12(3): 600–610.
58. Albersena M, Linb CS, Lueb T. Stem-cell therapy for erectile dysfunction. *Arab J Urol* 2013; 11(3): 237–244.
59. Hsieh CH, Tsai HC, Hsu GL, Chen CC, Hsu CY. Herb formula enhances treatment of impotent patients after penile venous stripping: a randomised clinical trials. *Andrologia* 2016; 48(7): 754-60.
60. Abdillahi HS, Van Staden J. South African plants and male reproductive healthcare: Conception and contraception. *J Ethnopharmacology* 2012; 143(2): 475–480.
61. WHO, dostupno na <http://www.who.int/traditional-complementary-integrative-medicine/about/en/> [14.11.2017.].
62. Mahajan GK, Mahajan AY, Mahajan RT. Efficacy of aphrodisiac plants towards improvement in semen quality and motility in infertile males. *J Complement Integr Med* 2012; 17(9): Article 6.
63. EFSA (European Food Safety Authority). Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a Request from the European Commission related to pyrrolizidine alkaloids as undesirable substances in animal feed. *The EFSA Journal* 2007; 447: 1-51.
64. Dickstein ES, Kunkel FW. Foxglove tea poisoning. *Am J Med* 1980; 69(1): 167–169.
65. Gryniewicz G, Gadzikowska M. Tropane alkaloids as medicinally useful natural products and their synthetic derivatives as new drugs. *Pharmacol* 2008; 60(4): 439-463.

66. Pestalozzi BC, Caduff F. Group poisoning by belladonna. *Schweiz Med Wochenschr* 1986; 116(27-28): 924-926.
67. Popova AV, Hinch DK. Effects of flavonol glycosides on liposome stability during freezing and drying. *Biochim Biophys Acta* 2016; 24(12): 3050-3060.
68. Meng FH, Li YB, Xiong ZL, Jiang ZM, Li FM. Osteoblastic proliferative activity of *Epimedium brevicornum* Maxim. *Phytomedicine* 2005; 12(3): 189-193.
69. Xu RX, Wu Q, Luo Y, Gong QH, Yu LM, Huang XN, Sun AS, Shi JS. Protective effects of icariin on cognitive deficits induced by chronic cerebral hypoperfusion in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2009; 36(8): 810-815.
70. Zhang D, Cheng Y, Wang N, Zhang J, Yang M, Yao X. Effect of total flavanoids and flavonol glycosides from *Epimedium koreanum* Nakai on the proliferation and differentiation of primary osteoblasts. *Phytomedicine* 2008; 15(1-2): 55-61.
71. Lin CS, Xin ZC, Lin G, Lue TF. Phosphodiesterases as therapeutic targets. *Urology* 2003; 61: 685-691.
72. Liu WJ, Xin ZC, Xin H, Yuan YM, Tian L, Guo YL. Effects of icariin on erectile function and expression of nitric oxide synthase isoforms in castrated rats. *Asian J Androl* 2005; 7(4): 381-388.
73. Nan Y, Zhang X, Yang G, Xie J, Lu Z, Wang W, Cao X, Ma J, Wang Z. Icariin stimulates the proliferation of rat Sertoli cells in an ERK1/2-dependent manner in vitro. *Andrologia* 2014; 46(1): 9-16.
74. Hsueh TY, Wu YT, Lin LC, Chiu AW, Tsai TH. Herb-drug interaction of *Epimedium sagittatum* (Sieb. et Zucc.) maxim extract on the pharmacokinetics of sildenafil in rats. *Molecules* 2013; 18(6): 7323-7335.
75. Pieter A, Cohen PA, Ernst E. Safety of Herbal Supplements: A Guide for Cardiologists. *Cardiovasc Ther* 2010; 28(4): 246-253.

76. Scholey A, Ossoukhova A, Owen L, Ibarra A, Pipingas A, He K, Roller M, Stough C. Effects of American ginseng (*Panax quinquefolius*) on neurocognitive function: an acute, randomised, double-blind, placebo-controlled, crossover study. *Psychopharmacology (Berl)* 2010; 212(3): 345–356.
77. European medicines Agency, Committe on Herbal Medicinal Products. 7. Westferry Circus. London 2013; 1-123.
78. Lian –Wen O, Chong-Zhi W, Chun-Su Y. Ginsenosides from American ginseng: Chemical and pharmacological diverity. *Phytochemistry* 2011; 72(8): 689–699.
79. Joonwoo P, Heewon S, Si-Kwan K, Myeong SL, Dong-Kwon R, Young JL. Effects of ginseng on two main sex steroid hormone receptors: estrogen and androgen receptors. *J Ginseng* 2017; 41(2): 215–221.
80. Liu T, Peng YF, Jia C, Yang BH, Tao X, Li J, Fang X. Ginsenoside Rg3 improves erectile function in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Sex Med* 2015; 12(3): 611-20.
81. King ML, Adler SR, Murphy LL. Extraction-dependent effects of American ginseng (*Panax quinquefolium*) on human breast cancer cell proliferation and estrogen receptor activation. *Integr Cancer Ther* 2006; 5(3): 236–243.
82. Kim MS, Lim HJ, Yang HJ, Lee MS, Shin BC, Ernst E. Ginseng for managing menopause symptoms: a systematic review of randomized clinical trials. *J Ginseng Res* 2013; 37(1): 30-36.
83. Lee CH, Kim J-H. A review on the medicinal potentials of ginseng and ginsenosides on cardiovascular diseases. *J Ginseng Res* 2014; 38(3): 161-166.
84. Wang W, Zhao Y, Rayburn ER, Hill DL, Wang H, Zhang R. In vitro anti-cancer activity and structure-activity relationships of natural products isolated from fruits of *Panax ginseng*. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007; 59: 589-601.

85. Pereiral DG, AntunesII LMG, GraflIII U, Spanól MA. Protection by *Panax ginseng* C.A. Meyer against the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Genet Mol Biol* 2008; 31(4): 1678-4685.
86. Xu XY, Hu JN, Liu Z, Zhang R, He YF, Hou W, Wang ZQ, Yang G, Li W. Saponins (Ginsenosides) from the Leaves of *Panax quinquefolius* Ameliorated Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in Mice. *J Agric Food Chem* 2017; 65(18): 3684-3692.
87. Kan J, Velliquette RA, Grann K, Burns CR, Scholten J, Tian F, Zhang Q, Gui M. A novel botanical formula prevents diabetes by improving insulin resistance. *BMC Complement Altern Med* 2017; 17(1): 352.
88. Norelli LJ, Xu C. Manic psychosis associated with ginseng: a report of two cases and discussion of the literature. *J Diet Suppl* 2015; 12(2): 119-25.
89. Durgnat JM, Heuser J, Andrey D, Perrin C. Quality and safety assessment of ginseng extracts by determination of the contents of pesticides and metals. *Food Addit Contam* 2005; 22(12): 1224-30.
90. Gonzales GF. Ethnobiology and Ethnopharmacology of *Lepidium meyenii* (Maca), a Plant from the Peruvian Highlands. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012; Article ID 193496: 10.
91. Gonzales GF, Ruiz A, Gonzales C, Villegas L, Cordova A. Effect of *Lepidium meyenii* (maca) roots on spermatogenesis of male rats. *Asian J. Androl* 2001; 3(3): 231-233.
92. Oshima M, Gu Y, Tsukada S. Effects of *Lepidium meyenii* Walp and *Jatropha macrantha* on blood levels of estradiol-17 beta, progesterone, testosterone and the rate of embryo implantation in mice. *J Vet Med Sci* 2003; 65(10): 1145-1146.
93. Valerio LG, Gonzales GF. Toxicological Aspects of the South American Herbs Cat's Claw (*Uncaria tomentosa*) and Maca (*Lepidium meyenii*). *Toxicol Rev* 2005; 24(1): 11-35.

94. Clément C, Diaz Grados DA, Avula B, Khan IA, Mayer AC, Ponce Aguirre DD, Manrique I, Kreuzer M. Secondary metabolites in maca as affected by hypocotyl color, cultivation history, and site. *Agronomy Journal* 2010; 102(2): 431–439.
95. Inoue N, Farfan C, Gonzales GF. Effect of butanolic fraction of yellow and black maca (*Lepidium meyenii*) on the sperm count of adult mice. *Andrologia* 2016; 48(8): 915-921.
96. Rubio J, Riqueros MI, Gasco M, Yucra S, Miranda S, Gonzales GF. *Lepidium meyenii* (Maca) reversed the lead acetate induced - damage on reproductive function in male rats. *Food Chem Toxicol* 2006; 44(7): 1114-1122.
97. Shin BC, Lee MS, Yang EJ, Lim HS, Ernst E. Maca (*L. meyenii*) for improving sexual function: a systematic review. *BMC Complement Altern Med* 2010; 10:44.
98. Ernst E, Posadzki P, Lee MS. Complementary and alternative medicine (CAM) for sexual dysfunction and erectile dysfunction in older men and women: an overview of systematic reviews. *Maturitas* 2011; 70(1): 37-41.
99. Neycheva V, Mitev V. Pro-sexual and androgen enhancing effects of *Tribulus terrestris* L.: Fact or Fiction. *J Ethnopharmacol* 2016; 179: 345–355.
100. Gauthaman K, Adaikan PG, Prasad RNV. Aphrodisiac properties of *Tribulus terrestris* extract (protodioscin) in normal and castrated rats. *Life Sciences* 2002; 71(12): 1385-1396.
101. Kostova I, Dinchev D. Saponins in *Tribulus terrestris* – Chemistry and Bioactivity. *Phytochemistry Reviews* 2005; 4: 111-137.
102. Sellandi TM, Thakar AB, Baghel MS. Clinical study of *Tribulus terrestris* Linn. in Oligozoospermia: A double blind study. *Ayu* 2012; 33(3): 356-364.

103. Chen G, Su L, Feng SG., Lu X, Wang H, Pei YH. Furostanol saponins from the fruits of *Tribulus terrestris*. *Nat Prod Res* 2013; 27(13): 1186-1190.
104. De Combarieu E, Fuzzati N, Lovati M, Mercalli E. Furostanol saponins from *Tribulus terrestris*. *Fitoterapia* 2003; 74(6): 583-591.
105. Saudan C, Baume N, Emery C, Strahm E, Saugy M. Short term impact of *Tribulus terrestris* intake on doping control analysis of endogenous steroids. *Forensic Sci Int* 2008; 178(1): 7-10.
106. Neychev V, Mitev V. Pro-sexual and androgen enhancing effects of *Tribulus terrestris* L.: Fact or Fiction. *J Ethnopharmacol* 2016; 179: 345-355.
107. Talasaz AH, Abbasi MR, Abkhiz S, Dashti-Khavidaki S. *Tribulus terrestris*-induced severe nephrotoxicity in a young healthy male. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25(11): 3792-3793.
108. Szewczyka K, Zidorn C. Ethnobotany, phytochemistry, and bioactivity of the genus *Turnera* (Passifloraceae) with a focus on damiana—*Turnera diffusa*. *J Ethnopharmacol* 2014; 152(3): 424-443.
109. Piacente S, Camargo EE, Zampelli A, Gracioso JS, Souza Brito AR, Pizza C, Vilegas W. Flavonoids and arbutin from *Turnera diffusa*. *Z Naturforsch C* 2002; 57(11-12): 83-85.
110. Estrada-Reyes R, Ortiz-López P, Gutiérrez-Ortíz J, Martínez-Mota L. *Turnera diffusa* Wild (Turneraceae) recovers sexual behavior in sexually exhausted males. *J Ethnopharmacol* 2009; 123(3): 423-429.
111. Pinello KC, Fonseca ES, Akisue G, Silva AP, Salgado Oloris SC, Sakai M, Matsuzaki P, Nagamine MK, Palermo NJ, Dagli ML. Effects of *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) extract on macrophage activity. *Life Sci* 2006; 78(12): 1287-1292.
112. Zhao J, Dasmahapatra A., Khan SI, Khan IA. Anti-aromatase activity of the constituents from damiana (*Turnera diffusa*). *J Ethnopharmacol* 2008; 120(3): 387-393.

113. Avelino-Flores Mdel C, Cruz-López Mdel C, Jiménez-Montejo FE, Reyes-Leyva J. Cytotoxic activity of the methanolic extract of *Turnera diffusa* Willd on breast cancer cells. *J Med Food* 2015; 18(3): 299-305.
114. Braun JK, Malone MH. Legal highs. *Clin Toxicol* 1978; 12: 1-31.
115. Konopatzki Hirota BC, Cristiane da Silva P, Bednarczuk de Oliveira V, Maria da Cunha J *et al.* Phytochemical and antinociceptive, anti-inflammatory, and antioxidant studies of *Smilax larvata* (Smilacaceae). *Evid Based Complement Alternat Med* 2016; 2016: 9894610.
116. Tian LW, Zhang Z, Long HL, Zhang YJ. Steroidal Saponins from the genus *Smilax* and Their Biological Activities. *Nat Prod Bioprospect* 2017; 7(4): 283-298.
117. Grunewald KK, Bailey RS. Commercially marketed supplements for bodybuilding athletes. *Sports Med* 1993; 5(2): 90-103.
118. Fukunaga T, Miura T, Furuta K, Kato A. Hypoglycemic effect of the rhizomes of *Smilax glabra* in normal and diabetic mice. *Biol Pharm Bull* 1997; 20(1): 4-6.
119. Caceres A, Cano O, Samayoa B, Aguilar L. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 1. Screening of 84 plants against enterobacteria. *J Ethnopharmacol* 1990; 30(1): 55-73.
120. Park G, Kim TM, Kim J. Antioxidant effects of the *Sarsaparilla* via scavenging of reactive oxygen species and induction of antioxidant enzymes in human dermal fibroblasts. *Environ Toxicol Pharmacol* 2014; 38(1): 305-315.
121. Amira S, Dade M, Schinella G, Ríos JL. Anti-inflammatory, anti-oxidant, and apoptotic activities of four plant species used in folk medicine in the Mediterranean basin. *Pak J Pharm Sci* 2012; 25(1): 65-72.
122. European Medicines Agency, HMPC. Assessment report on *Humulus lupulus* L., flos. London. 2014; 1-38.

123. Casey SP, Steven JS. Resolution of diastereomeric flavonoid (1S)-(-)-camphanic acid esters via reversed-phase HPLC. *Phytochemistry* 2007; 68(8):1206-1211.
124. Jan FS, Jonathan EP. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health. *Phytochemistry* 2004; 65(10):1317-1330.
125. Oseni T, Patel R, Pyle J, Jordan VC. Selective estrogen receptor modulators and phytoestrogens. *Planta Med* 2008; 74(13): 1656-1665.
126. Morali G, Polatti F, Metelitsa EN, Mascarucci P, Magnani P, Marrè GB. Open, non-controlled clinical studies to assess the efficacy and safety of a medical device in form of gel topically and intravaginally used in postmenopausal women with genital atrophy. *Arzneimittelforschung* 2006; 56(3): 230-238.
127. Mazaro-Costa R, Andersen ML, Hachul H, Tufik S. Medicinal plants as alternative treatments for female sexual dysfunction: utopian vision or possible treatment in climacteric women? *J Sex Med* 2010; 7(11): 3695-3714.
128. Safaeian L, Sajjadi SE, Javanmard SH, Montazeri H, Samani F. Protective effect of *Melissa officinalis* extract against H₂O₂-induced oxidative stress in human vascular endothelial cells. *Res Pharm Sci* 2016; 11(5): 383-389.
129. Soodi M, Dashti A, Hajimehdipour H, Akbari S, Ataei N. *Melissa officinalis* acidic fraction protects cultured cerebellar granule neurons against beta amyloid-induced apoptosis and oxidative stress. *Cell J* 2017; 18(4): 556-564.
130. Zarei A, Changizi Ashtiyani S, Taheri S, Rasekh F. Comparison between effects of different doses of *Melissa officinalis* and atorvastatin on the activity of liver enzymes in hypercholesterolemia rats. *Avicenna J Phytomed* 2014; 4(1): 15-23.

131. Taavoni S, Nazem Ekbatani N, Haghani H. Valerian/lemon balm use for sleep disorders during menopause. *Complement Ther Clin Pract* 2013; 19(4): 193-196.
132. Namjoo A, MirVakili M, Shirzad H, Faghani M. Biochemical, liver and renal toxicities of *Melissa officinalis* hydroalcoholic extract on balb/C mice. *J HerbMed Pharmacol* 2013; 2(2): 35-40.
133. Marković S. Fitoaromaterapija – monografija esencijalnih ulja i ljekovitih biljaka temelji fitoaromaterapije. *Centar Cedrus* 2005; 1: 197-198.
134. Teixeira B, Marques A, Ramos C, Serrano C, Matos O, Neng N R, Nogueira JMF, Saraiva JA, Nunes ML. Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. *J Sci Food Agric* 2013; 93(11): 2707–2714.
135. Ipek I, Zeytinoglu H, Okay S, Tuylu BA, Kurkcouglu M, Baser KHC. Genotoxicity and antigeno-toxicity of Origanum oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. *Food Chemistry* 2005; 93(3): 551-556.
136. De Martino L, De Feo V, Formisano C, Mignola E, Senatore F. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from three chemotypes of *Origanum vulgare* L. ssp. hirtum (Link) letsvaart growing wild in Campania (Southern Italy). *Molecules* 2009; 14(8): 2735-2746.
137. Bagheri Ziari S, Naji T, Hosseinzadeh Sahafi H. Comparison of the effects of *Origanum vulgare* with LHRH-A2 and 17 β -estradiol on the ultrastructure of gonadotroph cells and ovarian oogenesis in immature *Trichogaster trichopterus*. *Anim Reprod Sci* 2015; 161: 32-39.
138. Boemler Hollenbach C, Bing RS, Stedile R, da Silva Mello FP, Schuch TL, Alves Rodrigues MR, de Mello FB, Braga de Mello RJ. Reproductive Toxicity Assessment of *Origanum vulgare* Essential Oil on Male Wistar Rats. *Acta Scientiae Veterinariae* 2015; 43: 1295.

139. Tognolini M, Barocelli E, Ballabeni V, Bruni R, Bianchi A, Chiavarini M, Impicciatore M. Comparative screening of plant essential oils: phenylpropanoid moiety as basic core for antiplatelet activity. *Life Sci* 2006; 78(13): 1419-1432.
140. Isah T. Rethinking *Ginkgo biloba* L.: Medicinal uses and conservation. *Pharmacognosy Rev* 2015; 9(18): 140-148.
141. Rossana R, Fabrizio B, Antonella DP, Pierluigi M. Analytical methods for characterizing bioactive terpene lactones in *Ginkgo Biloba* extracts and performing pharmacokinetic studies in animal and human, Biomedical Engineering, Trends. *Research and Technologies* 2011; ISBN: 978-953-307-514-3.
142. Folium Ginkgo (WHO monograph son selected medicinal plants, volume 1) World Health Organization. Geneva 1999; 154-167.
143. Duff Sloley B, Tawfik SR, Scherban KA, Tam YK. Quality control analyses for Ginkgo extracts require analysis of intact flavonol glycosides. *Journal of Food and Drug Analysis* 2003; 11(2): 102-107.
144. Baron-Ruppert G, Luepke NP. Evidence for toxic effects of alkylphenols from *Ginkgo biloba* in the hen's egg test (HET). *Phytomedicine* 2001; 8(2): 133-138.
145. Amir LH, Pirotta MV, Raval M. Breastfeeding - Evidence based guidelines for the use of medicines. *Aust Fam Physician* 2011; 40: 684-690.
146. Evans JR. *Ginkgo biloba* extract for age-related macular degeneration. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; 31(1): CD001775.
147. Al-Yahya AA, Al-Majed AA, Al-Bekairi AM, Al-Shabanah OA, Qureshi S. Studies on the reproductive, cytological and biochemical toxicity of *Ginkgo biloba* in Swiss albino mice. *J Ethnopharmacol* 2006; 107(2): 222-228.
148. Granger AS. *Ginkgo Biloba* precipitating epileptic seizures. *Age Ageing* 2001; 30(6): 523-525.

149. Rusinek-Prystupa E, Marzec Z, Sembratowicz I, Samolińska W, Kiczorowska B, Kwiecień M. Content of selected minerals and active ingredients in teas containing Yerba Mate and Rooibos. *Biol Trace Elem Res* 2016; 172(1): 266-275.
150. Brun LR, Brance ML, Lombarte M, Maher MC, Di Loreto VE, Rigalli A. Effects of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) on histomorphometry, biomechanics, and densitometry on bones in the rat. *Calcif Tissue Int* 2015; 97(5): 527-534.
151. Berté KAS, Beux MR, Spada PKWDS, Salvador M, Hoffmann-Ribani R. Chemical composition and antioxidant activity of yerba-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil., Aquifoliaceae) extract as obtained by spray drying. *J. Agric Food Chem* 2011; 59(10): 5523-5527.
152. Lima ME, Colpo AC, Salgueiro WG, Sardinha GE, Avila DS, Folmer V. *Ilex paraguariensis* extract increases lifespan and protects against the toxic effects caused by paraquat in caenorhabditis elegans. *Int J Environ Res Public Health* 2014; 11(10): 10091–10104.
153. De Andrade F, de Albuquerque CA, Maraschin M, da Silva EL. Safety assessment of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) dried extract: results of acute and 90 days subchronic toxicity studies in rats and rabbits. *Food Chem Toxicol* 2012; 50(2): 328-334.
154. De Stefani E, Fierro L, Correa P, Fonham E, Ronco A, Larrinaga M, Balbi J, Mendilaharsu M. Mate drinking and risk of lung cancer in males: a case-control study from Uruguay. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996; 5 (7): 515-519.
155. McGee J, Patrick RS, Wood CB, Blumgart LH. A case of veno-occlusive disease of the liver in Britain associated with herbal tea consumption. *J Clin Pathol* 1976; 29(9): 788–794.
156. Yu S, Shuangshuang X, Yanling G, Xiao W, Tianyou Z. Isolation and purification of lignans from *Schisandra Chinensis* by combination of silica gel column and high-speed counter-current chromatography. *CI&CEQ* 2013; 19(3): 435–440.

157. Panossian A, Wikman G. Pharmacology of *Schisandra chinensis* Bail: an overview of Russian research and uses in medicine. *J Ethnopharmacol* 2008; 118(2): 183-212.
158. Jiang Y, Fan X, Wang Y, Tan H, Chen P, Zeng H, Huang M, Bi H. Hepato-protective effects of six schisandra lignans on acetaminophen-induced liver injury are partially associated with the inhibition of CYP-mediated bioactivation. *Chem Biol Interact* 2015; 231: 83-89.
159. Kim MH, Lee HS, Hong SB, Yang WM. *Schizandra chinensis* exhibits phytoestrogenic effects by regulating the activation of estrogen receptor- α and - β . *Chin J Integr Med* 2017; PMID: 28762131.
160. Chan SW. *Panax ginseng*, *Rhodiola rosea* and *Schisandra chinensis*. *Int J Food Sci Nutr* 2012; 63(1): 75-81.
161. Kim HK, Bak YO, Choi BR, Zhao C, Lee HJ, Kim CY, Lee SW, Jeon JH, Park JK. The role of the lignan constituents in the effect of *Schisandra chinensis* fruit extract on penile erection. *Phytother Res* 2011; 25(12): 1776-1782.
162. Wang B, Yang S, Hu J, Li Y. Multifaceted interaction of the traditional Chinese medicinal herb *Schisandra chinensis* with cytochrome P450-mediated drug metabolism in rats. *J Ethnopharmacol* 2014; 155(3): 1473-1482.
163. Panossian A, Wikman G. Pharmacology of *Schisandra chinensis* Bail an overview of Russian research and uses in medicine. *J Ethnopharmacol* 2008; 118(2): 183-212.
164. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; 333(6174): 664-666.
165. Bellinghieri G, Santoro D, Mallamace A, Savica V. L-Arginine: A new opportunity in the management of clinical derangements in dialysis patients. *J Ren Nutr* 2006; 16(3): 245-247.

166. Neis VB, Bettio LE, Moretti M, Rosa PB, Ribeiro CM, Freitas AE, Gonçalves FM, Leal RB, Rodrigues AL. Acute agmatine administration, similar to ketamine, reverses depressive-like behavior induced by chronic unpredictable stress in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2016; 150(151): 108-114.
167. Bratislav D, Irena L, Milica N, Ivana S, Ana D, Sanda D, Ivana S. Effects of agmatine on chlorpromazine toxicity in the liver of Wistar rats: the possible role of oxidant/antioxidant imbalance. *Exp Anim* 2017; 66(1): 17-27.
168. Chen J, Wollman Y, Chernichovsky T, Iaina A, Sofer M, Matzkin H. Effect of administration of high-dose nitric oxide donor L-arginine in men with organic erectile dysfunction: results of a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *BJU International* 1999; 83(3): 269-273.
169. Stanislavov R, Nikolova V. Treatment of erectile dysfunction with pycnogenol and L-arginine. *J Sex Marital Ther* 2003; 29(3): 207-213.
170. Resnick DJ, Softness B, Murphy AR, Aranoff GS, Levine LS. Case report of an anaphylactoid reaction to arginine. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002; 88(1): 67-68.
171. Baligan M, Giardina A, Giovannini G, Laghi MG, Ambrosioni G. L-arginine and immunity. Study of pediatric subjects. *Minerva Pediatr* 1997; 49(11): 537-542.
172. Mantovani F, Patelli E, Colombo F, Pozzoni F, Confalonieri S, Pisani E. Erectile dysfunction after non-nerve sparing radical pelvic surgery. Therapeutical experience with sildenafil and L-arginine evaluated by Buckling test. *Minerva Med* 2001; 92(4): 285-287.
173. Jones DP, Radi R. Redox Pioneer: Professor Helmut Sies. *Antioxid Redox Signal* 2014; 21(18): 2459–2468.
174. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 1997; 82(2): 291-295.

175. Kinnula VL, Crapo JD, Raivio KO. Generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung. *Lab Invest* 1995; 73(1): 3-19.
176. Žarković N, Lončarić I, Čipak A, Jurić G, Wonisch W, Borović S, Waeg G, Vuković T, Žarković K. Patofiziološke značajke sekundarnih glasnika slobodnih radikala i oksidacijski stres. U: Oksidacijski stres i djelotvornost antioksidansa. (Bradamante V, Lacković Z, ur.), *Medicinska naklada* 2001; 13-32.
177. Klaunig JE, Kamendulis LM, Hocevar BA. Oxidative Stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicol Pathol* 2010; 38(1): 96-109.
178. Fridovic I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 1995; 64: 97-112.
179. Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic Biol Med* 2000; 28(10): 1456-1462.
180. Matés JM, Sánchez-Jiménez F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front Biosci* 1999; 4: D339-345.
181. Halliwell B. Reactive Species and Antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 2006; 141(2): 312–322.
182. Rahman K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin Interv Aging* 2007; 2(2): 219–236.
183. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006; 160(1): 1-40.
184. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid Peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med Cell Longev* 2014; Article ID 360438: 31.
185. Halliwell B, Chirco S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr* 1993; 57: 715-725.

186. Catalá A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chem Phys Lipids* 2009; 157(1): 1-11.
187. Štefan L, Tepšić T, Zavidčić T, Urukalo M, Tota D, Domitrović R. Lipidna peroksidacija – uzroci i posljedice. *Medicina* 2007; 43: 84-93.
188. Weber D, Milkovic L, Bennett SJ, Griffiths HR, Žarković N, Grune T. Measurement of HNE-protein adducts in human plasma and serum by ELISA—Comparison of two primary antibodies. *Redox Biol* 2013; 1(1): 226-233.
189. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991; 11(1): 81-128.
190. Shah D, Mahajan N, Sah S, Paudyal B. Oxidative stress and its biomarkers in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Sci* 2014; 21(1): 21-23.
191. Gawel S, Wardas M, Niedworok E, Wardas P. Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. *Wiad Lek* 2004; 57(9-10): 453-5.
192. Huiqin Z, Huiyong Y. Role of lipid peroxidation derived 4-hydroxynonenal (4-HNE) in cancer: Focusing on mitochondria. *Redox Biology* 2015; 4: 193-199.
193. Žarković N, Žarković K, Schaur RJR, Stolc S, Schlag GN, Redl H, Waeg G, Borović S, Lončarić I, Jurić G, Hlavka V. 4-Hydroxynonenal as a second messenger of free radicals and growth modifying factor. *Life Sciences* 1999; 65(18–19): 1901–1904.
194. Oberley TD, Toyokuni S, Szweda LI. Localization of hydroxynonenal protein adducts in normal human kidney and selected human kidney cancers. *Free Radic Biol Med* 1999; 27(5-6): 695-703.
195. Rahman K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin Interv Aging* 2007; 2(2): 219–236.

196. Lykkesfeldt J, Viscovich M, Poulsen HE. Ascorbic acid recycling in human erythrocytes is induced by smoking *in vivo*. *Free Radic Biol Med* 2003; 35: 1439–1447.
197. Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen N. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 2013; 13(2): 57-149.
198. Johnson F, Giulivi C. Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Mol Aspect Med* 2005; 26(4–5): 340—352.
199. Halliwell H. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 2006; 141: 312-322.
200. Miller AF. Superoxide dismutases: Ancient enzymes and new insights. *FEBS Lett* 2012; 586(5): 585-595.
201. Miller AF. Superoxide dismutases: active sites that save, but a protein that kills. *Curr Opin Chem Biol* 2004; 8: 162-168.
202. Li C, Zhou HM. The Role of Manganese Superoxide Dismutase in inflammation defense. *Enzyme Research* 2011; Article ID 387176: 6.
203. Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, Noble LJ, Yoshimura MP, Berger C, Chan PH, Wallace DC, Epstein CJ. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet* 1995; 11(4): 376-381.
204. Elchuri S, Oberley TD, Qi W, Eisenstein RS, Jackson Roberts L, Van Remmen H, Epstein CJ, Huang TT. CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. *Oncogene* 2005; 24(3): 367-380.
205. Giri SN, Misra HP. Fate of superoxide dismutase in mice following oral route of administration. *Med Biol* 1984; 62(5): 285-289.
206. Pompella A, Visvikisa A, Paolicchib A, DeTata V, Casinib AF. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol* 2003; 66(8): 1499-1503.

207. Denzoin Vulcano LA, Soraci AL, Tapia MO. Glutathione homeostasis. *Acta bioquím. clín. latinoam* 2013; 47(3): 529-539.
208. Bhabak KP, Mugesh G. Functional mimics of glutathione peroxidase: bioinspired synthetic antioxidants. *Accounts of Chemical Research* 2010; 43(11): 1408–1419.
209. Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1830(5): 3217-3266.
210. Puntarić D, Miškulin M, Bošnjir J *et al.* Zdravstvena ekologija. *Medicinska naklada* 2012; 1: 78-110.
211. Tchounwou PB, Yedjou CG, Patlolla AK, Sutton DJ. Heavy Metals toxicity and the environment. *HHS Author Manuscript* 2012; 101: 133–164.
212. Ziarati P, Asgarpanah J. Comparing heavy metal contents of *Panax Ginseng* samples from selected markets in Tehran and Beijing. *J Environ Anal Toxicol* 2013; 3(5): 183.
213. Tangahu BV, Sheikh Abdullah SR, Basri H, Idris M, Anuar N, Mukhlisin M. A review on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. *International Journal of Chemical Engineering* 2011; ID 939161: 31.
214. World Health Organization. Lead poisoning and health. Media centre. Fact sheet, Updated August 2017. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs379/en/> [25.10.2017.].
215. ATSDR. Toxicological profile for lead. Agency for Toxic Substances and Disease Registry: U.S. Department of Health and Human services, Public Health Service, Atlanta, GA, United States. 2007. <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp13.pdf> [12.12.2017.].
216. American Academy of Pediatrics. Council on Environmental Health. Prevention of childhood lead toxicity. *Pediatrics* 2016; 138(1): e20161493.

217. ATSDR. Lead toxicity: What are the physiologic effects of lead exposure? Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Case Studies in Environmental in Medicine 2017.
<https://www.atsdr.cdc.gov/csem/csem.asp?csem=7&po=10>
[25.10.2017.]
218. Springer OP, Springer D. Otrovani modrozeleni planet. Priručnik iz ekologije i zaštite prirode i okoliša. *Meridijani* 2008; 1: 208-294.
219. Pourrut B, Shahid M, Dumat C, Winterton P, Pinelli E. Lead uptake, toxicity, and detoxification in plants. *Rev Environ Contam Toxicol* 2011; 2013: 113-136.
220. Yallapragada PR, Velaga MK. Effect of Ginkgo biloba Extract on Lead-Induced Oxidative Stress in Different Regions of Rat Brain. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2015; 34(2): 161-173.
221. ATSDR, CSM. Cadmium Toxicity. *WB* 2008; 1096: 3-63.
<https://www.atsdr.cdc.gov/csem/cadmium/docs/cadmium.pdf>
[03.11.2017.].
222. Bikić F, Pašalić A. Utjecaj pH vrijednosti tla i dodatka kelatnog agensa na sadržaj kadmija u pojedinim biljkama. *Kem. Ind* 2016; 65(7-8): 375–378.
223. Chunhabundit R. Cadmium exposure and potential health risk from foods in contaminated area. Thailand. *Toxicol Res* 2016; 32(1): 65–72.
224. World Health Organization. Safety evaluation of certain food additives and contaminants/prepared by the seventythird meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA); Geneva. 2011; 305–380.
225. Almenara CCP, Broseghini-Filho GB, Vescovi MVA, Jhuli K, Angeli JK, Faria T de O, Stefanon I, Vassallo DV, Padilha AS. Chronic cadmium treatment promotes oxidative stress and endothelial damage in isolated rat aorta. *PLoS One* 2013; 8(7): e68418.

226. Abdollahi M, Bahreini-Moghadam A, Emami B, Fooladian F, Zafari K. Increasing intracellular cAMP and cGMP inhibits cadmium-induced oxidative stress in rat submandibular saliva. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2003;135C(3): 331-336.
227. Colacino JA, Arthur AE, Ferguson KK, Rozek LS. Dietary antioxidant and anti-inflammatory intake modifies the effect of cadmium exposure on markers of systemic inflammation and oxidative stress. *Environ Res* 2014; 131: 6-12.
228. Sandbichler AM, Höckner M. Cadmium protection strategies—A hidden trade-off? *Int J Mol Sci* 2016; 17(1): 139.
229. Andresen E, Küpper H. Cadmium toxicity in plants. *Met Ions Life Sci* 2013; 11: 395-413.
230. Nazar R, Iqbal N, Masood A, Iqbal Khan MR, Syeed S, Nafees A, Khan NA. Cadmium toxicity in plants and role of mineral nutrients in its alleviation. *Americ J Plant Sci* 2012; 3: 1476-1489.
231. Farina M, Avila DS Teixeira da Rocha JB, Aschner M. Metals, oxidative stress and neurodegeneration: A focus on Iron, Manganese and Mercury. *Neurochemistry International* 2013; 62(5): 575-594.
232. World Health Organization. Mercury and health. 2017. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs361/en/> [04.11.2017.].
233. Hong Y-S, Kim Y-M, Lee K-E. Methylmercury exposure and health effects. *J Prev Med Public Health* 2012; 45(6): 353–363.
234. Gochfeld M. Cases of mercury exposure, bioavailability, and absorption. *Ecotoxicol Environ Saf* 2003; 56(1): 174-179.
235. WHO Technical Report Series. Sixty-first report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives and FAO. Evaluation of certain food additives and contaminants. Geneva. 2004; 132-138. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42849/1/WHO_TRS_922.pdf [04.11.2017.].

236. IARC, International Agency for Research on Cancer: A review of human carcinogens. Part C: Arsenic, metals, fibres and dust. WHO, Lyon, 2012.
237. Mandal BK, Suzuki KT. Arsenic round the world: a review. *Talanta* 2002; 58: 201-235.
238. WHO. Background document for development of WHO Guidelines for drinking-water quality. Arsenic in drinking water. 2011; 1-24. WHO/SDE/WSH/03.04/75/Rev/1. http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/arsenic.pdf [13.12.2017.].
239. WHO. Environmental Health Criteria 224 for Arsenic and Arsenic compounds. WHO. Geneva. 2001; 2. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42366/1/WHO_EHC_224.pdf [13.12.2017.].
240. Klapac T. Selenium in selected foods grown or purchased in eastern Croatia. *Food Chemistry* 2004; 85: 445-452.
241. Patrick M, Finnegan PM, Chen W. Arsenic Toxicity: The effects on pant metabolism. *Front Physiol* 2012; 3: 182.
242. WHO. Health topics pesticides <http://www.who.int/topics/pesticides/en/> [13.12.2017.].
243. FAO, WHO. International code of conduct on pesticide management guidelines on pesticide legislation. September 2015. <http://www.fao.org/3/a-i5008e.pdf> [13.12.2017.].
244. Šarkanj B, Kipčić D, Vasić-Rački Đ *et al.* Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani. *Hrvatska agencija za hranu* 2010.
245. EU pesticides database. Plants. <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=homepage&language=EN> [14.12.2017.].
246. WHO. The WHO Recommended clasification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2009. IPCS, IOMS. ISSN 1684-1042

- http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard_2009.pdf
[13.12.2017.].
247. Bassil KL, Vakil C, Sanborn M, Cole DC, Kaur KS, Kerr KJ. Cancer health effects of pesticides. *Can Fam Physician* 2007; 53(10): 1704–1711.
248. U.S. Environmental Protection Agency. Reregistration eligibility decision for cypermethrin list B, case No. 2130. Washington 2006; EPA OPP-2005-0293: 8-30.
249. Uredba (EZ) br. 1272/2008 Europskog Parlamenta I Vijeća o razvrstavanju, označivanju i pakiranju tvari i smjesa, o izmjeni i stavljanju izvan snage Direktive 67/548/EEZ i Direktive 1999/45/EZ i o izmjeni Uredbe (EZ) br. 1907/2006. 2008. SL. EU L 353/1.
250. U.S. Environmental Protection Agency. Pesticide Fact Sheet Number 199: Cypermethrin. Office of Pesticides and Toxic Substances. Washington 1989; DC: 2-9.
251. Extoxnet. Pesticide information profile. Cypemetrin – Chronic toxicity. <http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extoxnet/carbaryl-dicrotophos/cypermet-ext.html#2> [12.12.2017.].
252. Toxnet. Cypermethrin. <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+6600> [13.12.2017.].
253. Uredba (EZ) br. 396/2005 Europskog Parlamenta I Vijeća. o maksimalnim razinama ostataka pesticida u ili na hrani i hrani za životinje biljnog i životinjskog podrijetla i o izmjeni Direktive Vijeća 91/414/EEZ. 2005. SI. EU L 70/1.
254. Specimen Label: Eagle 20EW - Specialty fungicide. Crop data management systems. Crop Data Management Systems, Inc, 21 Sept. 2011. Web. 5 May 2015. <http://www.cdms.net/LDat/ld6DG004.pdf> [14.12.2017.].
255. De Hoffmann E, Stroobant V. Mass spectrometry, Principles and Applications. 3th. Wiley 2007.

256. Cindrić M, Marković A, Horvatić A. Hyphenated techniques liquid chromatography-mass spectrometry: basic methodology and applications. *Medicina* 2009; 45(3): 218-232.
257. Krivohlavek A, Ivešić M, Žuntar I, Šikić S. Presence of sildenafil, tadalafil and avanafil in food supplements determined by validated high-pressure liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry method Dorchester. UK: *Elsevier* 2014; S185-S185.
258. Paíga P, Domingues VF, Wanderley KA, Delerue-Matos C. QuEChERS: A Sample Preparation for Extraction of Carbaryl from Rat Feces. *Toxicological and Environmental Chemistry* 2015; 97(6): 687-699.
259. ELAN DRC-e Hardware Guide. Perkin Elmer/MDS Sciex Instruments. 2005; (1- 8): 1.
260. Thomas R. Practical Guide to ICP-MS. Scientific Solutions Gaithersburg. Maryland. U. S.A. 2004; 339: ISBN: 0-8247-5319-4
261. Lowry DH, Rosebrough NJ, Farr AL. Protein measurement with the Folin– phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265–275.
262. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351–358.
263. Flohé L, Ötting F. Superoxide dismutase assays. *Methods Enzymol.* 1984; 105: 93-104.
264. Tietze F. Enzyme method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. *Anal Biochem* 1969; 27: 502–522.
265. Siegel D, Babuscio T. Mycotoxin management in European cereal trading sector. *Food. Cont* 2011; 22: 1145-1153.
266. Guide to Endocrine Testing. Diagnostic Division. ICN Biomedicals. Inc. 2:33-35; 3:4-6.

267. Jeevan KP, Chao-CW, Stephan B. Mass spectrometric methods for the determination of flavonoids in biological samples. *Free Radical Biology and Medicine* 2004; 37(9): 1324-1350.
268. Christopher CKHo, Hui MT. Rise of Herbal and Traditional Medicine in Erectile Dysfunction Management. *Current Urology Rep* 2011; 12(6): 470-478.
269. Rimoldi G, Chrstoffel J, Wuttke W. Morphologic changes induced by oral long-term treatment with 8-prenylnaringenin in the uterus, vagina, and mammary gland of castrated rats. *Menopause* 2006; 13(4): 669-677.
270. Solak KA, Santos RR, van den Berg M, Blaauboer BJ, Roelen BA van Duursen MB. Naringenin (NAR) and 8-prenylnaringenin (8-PN) reduce the developmental competence of porcine oocytes in vitro. *Reprod Toxicol* 2014; 49: 1-11.
271. Diel P, Geis RB, Caldarelli A, Schmidt S, Leschowsky UL, Voss A, Vollmer G. The differential ability of the phytoestrogen genistein and of estradiol to induce uterine weight and proliferation in the rat is associated with a substance specific modulation of uterine gene expression. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 221(1-2): 21-32.
272. Singh A, Bhat TK, Sharma OP. Clinical Biochemistry of Hepatotoxicity. Singh, *J Clinic Toxicol* 2011; S4:001: 19.
273. Hong M, Li S, Tan HY, Wang N, Tsao S-W, Feng Y. Current Status of Herbal Medicines in Chronic Liver Disease Therapy: The Biological Effects, Molecular Targets and Future Prospects. *Int. J. Molecular Sciences* 2015; 16: 28705–28745.
274. Marijani E, Nasimolo J, Kigadye E, Benoit Gnonlonfin GJ, Okoth S. Sex-Related Differences in Hematological Parameters and Organosomatic Indices of *Oreochromis niloticus* Exposed to Aflatoxin B1 Diet. *Scientifica (Cairo)* 2017; (2017): Article ID 4268926, 7.

275. Halmed, Sažetak opisa svojstva lijeka. 2011; 1-12. dostupno na <http://www.halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/UP-I-530-09-10-02-245.pdf>, [12.01.2018.].
276. Thévenod F. Nephrotoxicity and the proximal tubule. Insights from cadmium. *Nephron Physiol* 2003; 93(4): 87-93.
277. Qi ZL, Wang Z, Li W, Hou JG, Liu Y, Li XD, Li HP, Wang YP. Nephroprotective Effects of Anthocyanin from the Fruits of Panax ginseng (GFA) on Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury in Mice. *Phytother Res* 2017; 31(9): 1400-1409.
278. Bunel V, Antoine MH, Nortier J, Duez P, Stévigny C. In vitro effects of Panax ginseng in aristolochic acid-mediated renal tubulotoxicity: apoptosis versus regeneration. *Planta Med* 2015; 81(5): 363-372.
279. Rodríguez-Silva CN, Arteaga Temoche L. Efecto del *Lepidium mayenii* Walp "maca" sobre la nefrotoxicidad inducida por la ifosfamida en *Rattus rattus* var. Holtzman. *Rev méd Trujillo* 2017; 12(2): 47-57.
280. You H, Gao T, Cooper TK, Morris SM Jr, Awad AS. Diabetic nephropathy is resistant to oral L-arginine or L-citrulline supplementation. *Am J Physiol Renal Physiol* 2014; 307(11): F1292-F1301.
281. Morris SM Jr. Arginine metabolism: boundaries of our knowledge. *J Nutr* 2007; 137(6 Suppl 2): 1602S-1609S.
282. Asgary S, Naderi G, Askari N. Protective effect of flavonoids against red blood cell hemolysis by free radicals. *Exp Clin Cardiol* 2005; 10(2): 88-90.
283. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 2000; 63(7): 1035-1042.
284. Duncan AM, Phipps WR, Kurzer MS. Phyto-oestrogens. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2003; 17(2): 253-271.
285. An F, Wang S, Yuan D, Gong Y, Wang S. Attenuation of Oxidative Stress of Erythrocytes by Plant-Derived Flavonoids, Orientin and Luteolin. *Evid Based Complement Alternat Med* 2016; ID 3401269: 8.

286. Cyboran S, Oszmiański J, Kleszczyńska H. Interaction between plant polyphenols and the erythrocyte membrane. *Cell Mol Biol Lett* 2012; 17(1): 77-88.
287. Suwalsky M, Vargas P, Avello M, Villena F, Sotomayor CP. Human erythrocytes are affected in vitro by flavonoids of *Aristolelia chilensis* (Maqui) leaves. *Int J Pharm* 2008; 363(1-2): 85-90.
288. Lojek A, Denev P, Ciz M, Vasicek O, Kratchanova M. The effects of biologically active substances in medicinal plants on the metabolic activity of neutrophils. *Phytochemistry Reviews* 2014; 13(2): 499–510.
289. Szczypka M, Obmińska-Mrukowicz B. Modulating effects of nonselective and selective phosphodiesterase inhibitors on lymphocyte subsets and humoral immune response in mice. *Pharmacol Rep* 2012; 62(6): 1148-1158.
290. Kniotek M, Boguska A. Sildenafil can affect innate and adaptive immune system in both experimental animals and patients. *Journal of Immunology Research* 2017; Article ID 4541958: 8.
291. Leite PM, Martins MAP, Castilho RO. Review on mechanisms and interactions in concomitant use of herbs and warfarin therapy. *Biomed Pharmacother* 2016; 83; 14-21.
292. Aruna D, Naidu MU. Pharmacodynamic interaction studies of *Ginkgo biloba* with cilostazol and clopidogrel in healthy human subjects. *Br J Clin Pharmacol* 2007; 63(3): 333-338.
293. Qian Y, Peng Y, Shang E, Zhao M, Yan L, Zhu Z, Tao J, Su S, Guo S, Duan JA. Metabolic profiling of the hepatotoxicity and nephrotoxicity of Ginkgolic acids in rats using ultra-performance liquid chromatography-high-definition mass spectrometry. *Chem Biol Interact* 2017; 273: 11-17.
294. Cases J, Ibarra A, Feuillère N, Roller M, Sukkar SG. Pilot trial of *Melissa officinalis* L. leaf extract in the treatment of volunteers suffering from mild-to-moderate anxiety disorders and sleep disturbances. *Med J Nutrition Metab* 2011; 4(3): 211-218.

295. Ragi J, Pappert A, Rao B, Havkin-Frenkel D, Milgraum S. Oregano extract ointment for wound healing: a randomized, double-blind, petrolatum-controlled study evaluating efficacy. *J Drugs Dermatol* 2011; 10(10): 1168-1172.
296. Kitts D, Hu C. Efficacy and safety of ginseng. *Public Health Nutr* 2000; 3(4A): 473-485.
297. Gillis CN. *Panax ginseng* pharmacology: a nitric acid link?. *Biochem Pharmacol* 1997; 54: 1-8.
298. Gauthman K, Adaikan PG, Prasad RN. Aphrodisiac properties of *Tribulus terrestris* extract (Protodioscin) in normal and castrated rats. *Life Sci* 2002; 71(12): 1385-1396.
299. Gauthman K, Ganesan AP. The hormonal of *Trbulus terrestris* and its role in the management of male erectile dysfunction-an evaluation using primates, rabbit and rat. *Phytomedicine* 2008; 15(1-2): 44-45.
300. Renke D, Kenneth AJ, Richard CR, Fred KF. Differential effects of flavonoids on testosterone-metabolizing cytochrome P450s. *Life Sciences* 1997; 61(7): PL75-PL80.
301. Cotellet N. Role of Flavonoids in Oxidative Stress. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2001; 1(6): 569-590.
302. Ohlsson A, Ulleras E, Cedergreen N, Oskarsson A. Mixture effects of dietary flavonoids on steroid hormone synthesis in the human adrenocortical H295R. *Food Chem Toxicol* 2010; 48(11): 3194-3200.

7. SAŽETAK

Procjena toksikološkog rizika dodatka prehrani na biljnoj bazi i evaluacija sigurnosti od posebnog je javnozdravstvenog značaja obzirom da je posljednjih godina porasla potražnja za istraživanom vrstom proizvoda. U disertaciji su obuhvaćeni proizvodi koji u svojem sastavu sadrže biljne vrste s vazodilacijskim učinkom koji se može povećati dodatkom nedozvoljenih farmakološki aktivnih supstanci kao što je sildenafil. Malo je dostupnih znanstvenih studija koje opisuju problem interakcije biljnih vrsta sa određenim toksikološkim i farmakološkim tvarima koje mogu biti u sastavu proizvoda sa vazodilacijskim učinkom.

Studije na laboratorijskim životinjama predstavljaju najpouzdaniji model procjene sigurnosti ovakvih pripravaka jer omogućuju monitoring subtilnih lezija i biokemijskih promjena na svim vrstama tkiva poput primjerice mjerenja markera oksidacijskog stresa i drugih fizioloških parametara koji su provedeni u ovoj studiji.

U ovoj disertaciji uspostavljen je model evaluacije odabranih dodatka prehrani na biljnoj bazi dostupnih u RH, u kojima su osim klasičnih analiza u javnom zdravstvu (pesticidi, metali i nedeklarirane farmakološke tvari) provedene i klasične subkronične toksikološke *in vivo* analize. Analize su provedene korištenjem interaktivnih sinergističkih, antagonističkih i aditivnih potencirajućih učinaka združenog djelovanja na prirast, organosomatski indeks, hematologiju, spolne hormone i oksidacijski stres vitalnih tkiva i organa.

Cilj disertacije bio je i izrada kompleksne statističke modelne klaster analize rezultata koja je provedena kako bi mogli odgovoriti na pitanja da li pojedine biljke u proizvodima (ali i rezidue metala i pesticida) više ili manje sinergistički doprinose toksičnim efektima. Istraživanje je provedeno na proizvodima u čijem su sastavu bile zastupljene slijedeće biljne vrste: *Epimedium sagittatum*, *Panax quinquefolius*, *Lepidium meyenii*, *Tribulus terrestris*, *Turnera diffusa*, *Sarsaparilla officinalis*, *Humulus lupulus*, *Melissa officinalis*, *Origanum vulgare*, *Ginkgo biloba*, *Ilex paraguariensis*, *Smilax aspera*, *Schisandra chinensis* i aminokiselina L-arginin. Navedene biljne vrste se već dugi niz godina koriste kao pomoć kod smanjenog libida i erektilne disfunkcije.

Identifikacija i kvantifikacija metala provedena je vezanim sustavom induktivno spregnute plazme s masenom spektroskopijom (ICP-MS), dok je za utvrđivanje prisutnosti pesticida korištena tehnika vezanog sustava plinske kromatografije i

spektrometrije masa (GC-MS). Prisutnost nedozvoljenih farmakoloških tvari utvrđivana je vezanim sustavom tekućinske kromatografije i spektrometrije masa (LC-MS-MS). Toksikološka istraživanja za svaki proizvod provedena su na miševima soja Swiss outbreed albino prema protokolu OECD 407 (28 day subchronic toxicity) gastričkom kanilom, oralno kao svakodnevni tretman preporučene dnevne količine (RDA) u mg/kg.

Na temelju rezultata dobivenih ovim istraživanjem može se zaključiti da oksidacijski stres organa tretiranih životinja nije nastao kao posljedica pojedinačnog učinka svake biljke zastupljene u proizvodu, nego njihovom kombinacijom zbog veće količine sličnih bioaktivnih tvari što pridonosi sinergističkom djelovanju i štetnom učinku takve formulacije. Također je utvrđeno da prisutnost kontaminanata kao što su teški metali, pesticidi i sildenafil u kombinaciji sa određenim biljnim vrstama unutar pojedinog istraživanog proizvoda pojačava njihov toksični učinak.

Utvrđeni rezultati su doprinjeli novom kvantitativnom pristupu u toksikološkoj ili javnozdravstvenoj procjeni sigurnosti više vrsta komponenata unutar formulacija dodataka prehrani na biljnoj bazi. Praktičnom primjenom dobivenih rezultata istraživanja potrebno je uspostaviti sustav razvrstavanja dodataka prehrani sa vazodilacijskim učinkom te re-evaluaciju registracije proizvoda od strane mjerodavnih institucija, a sve u cilju očuvanja zdravlja ljudi prilikom primjene istraživanih proizvoda na biljnoj bazi.

8. SUMMARY

Toxicological risk assessment of plant-based dietary supplements and evaluation of safety is of particular public health importance in the field of public health considering the growing consumption of this product type in recent years. The dissertation investigates products that contain plant species with vasodilating effect which can be increased by the addition of unauthorized pharmacologically active substances such as sildenafil. Available literature data is scarce that describes the problem of interaction of plant species with certain toxicological and pharmacological agents that may be part of the product with vasodilatory effect.

Animal laboratory studies are the most reliable model for assessing the safety of such preparations because they allow monitoring of subtle lesions and biochemical changes in all type of tissues such as the measurement of oxidative stress marker and other physiological parameters that have been carried out in this study.

In this dissertation, a model of evaluation of selected plant-based dietary supplements, available in the Republic of Croatia, has been established, in which, besides classical public health analyses (pesticides, metals and undeclared pharmacological agents), classical sub-chronic toxicological *in vivo* analyses were performed. The analyses were carried out using interactive synergistic, antagonistic and additive potentiating effects of joint action on growth, organosomatic index, hematology, sex hormones and oxidative stress of vital tissues and organs.

The aim of dissertation was also to produce a complex statistical model cluster analysis of results that could be used to answer the questions whether some particular plants in final products (but also residues of metals and pesticides) more or less synergistically contribute to toxic effects. Investigated are final products that as their part have following plant species: *Epimedium sagittatum*, *Panax quinquefolius*, *Lepidium meyenii*, *Tribulus terrestris*, *Turner diffusa*, *Sarsaparilla officinalis*, *Humulus lupulus*, *Melissa officinalis*, *Origanum vulgare*, *Ginkgo biloba*, *Ilex paraguariensis*, *Smilax aspera*, *Schisandra chinensis* and L-arginine amino acids. These plant species have been used for many years to help with reduced libido and erectile dysfunction.

Identification and quantification of metals was performed by inductively coupled plasma mass-detection method (ICP-MS), while the technique of coupled gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS) was used to determine the presence of pesticides. The presence of unauthorized pharmacological agents was determined by liquid chromatography - tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). Toxicological studies for each product were performed on Swiss outbred albino mouses, according to the OECD 407 protocol (28 day subchronic toxicity) with gastric cannula, orally as a daily treatment according to Recommended Dietary Allowances (RDA) in mg/kg.

Based on the results obtained in this research it can be concluded that the oxidative stress of the treated animal organs was not due to the individual effect of each plant represented in the product, but it appeared by their combination, due to higher amounts of similar bioactive substances which contributes to synergistic activity and the adverse effect of such formulation. It has also been confirmed that the presence of contaminants such as heavy metals, pesticides and sildenafil in combination with certain plant species within a particular final product will increase its toxic effect.

The results should contribute to a new quantitative approach in toxicological or public health safety assessment of several types of components within the herbal nutrition supplement formulation. Practical application of obtained results can be used to set up a system for classification of nutritional supplements with vasodilating effect and re-evaluation of product registration by competent institutions, all with the aim of protecting of human health when applying the investigated plant basis products.

9. POPIS KRATICA

ADP	Adenozin difosfat (engl. <i>Adenosine diphosphate</i>)
As	Arsen (engl. <i>Arsenic</i>)
ATP	Adenozin trifosfat (engl. <i>Adenosine triphosphate</i>)
ATSDR	Agencija za toksične supstance i registar bolesti (engl. <i>Agency for Toxic Substances and Disease Registry</i>)
cAMP	ciklički adenin monofosfat (engl. <i>cyclic Adenine Monophosphate</i>)
Cd	Kadmij (engl. <i>Cadmium</i>)
cGMP	ciklički gvanozin monofosfat (engl. <i>cyclic Guanosine Monophosphate</i>)
DNA	Deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DKS	Diferencijalna krvna slika
ED	Eretilna disfunkcija (engl. <i>Erectile Dysfunction</i>)
EFSA	Europska agencija za sigurnost hrane (engl. <i>The European Food Safety Authority</i>)
E2	Ženski spolni hormon Estradiol
EMA	Europska agencije za lijekove (engl. <i>European Medicines Agency</i>)
ESI	Elektrosprej ionizacija (engl. <i>Electrospray Ionization</i>)
EU	Europska unija (engl. <i>European Union</i>)
FDA	Američka agencija za hranu i lijekove (engl. <i>Food and Drug Administration</i>)
GnRH	Gonadotropin-oslobađajući hormon (engl. <i>Gonadotropin-releasing hormone</i>)
GSH	Reducirani glutation
GSSG	Oksidirani glutation
Hgb	Hemoglobin
HNE	4-hidroksi-2nonenal
HRT	Hormonalno nadomjesno liječenje (engl. <i>Homonal Replacement Therapy</i>)
HR	Republika Hrvatska (engl. <i>Republic of Croatia</i>)
HRP	Enzim peroksidaza iz biljke hrena (engl. <i>Enzyme Horseradish Peroxidase</i>)
HSI	Hepatosomatski indeks (engl. <i>Hepatosomatic index</i>)
ICP-MS	Induktivno spregnuta plazma s masenom spektroskopijom (engl. <i>Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry</i>)

IARC	Međunarodna agencija za istraživanje raka (engl. <i>International Agency for Research on Cancer</i>)
K	Kontrolna skupina
Pb	Olovo (engl. <i>Lead</i>)
PKGon	Pozitivna kontrolna skupina sa hormonom Gonadotropinom
PKSiI	Pozitivna kontrolna skupina sa farmakološkom tvari sildenafilom
LC-MS-MS	Tekućinska kromatografija – tandemne spektrometrije masa (engl. <i>Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry</i>)
LC₅₀	Srednje letalna koncentracija (engl. <i>Median Lethal Concentration</i>)
LOQ	Granica kvantifikacije (engl. <i>Limit of Quantification</i>)
LPO	Lipidna peroksidacija (engl. <i>Lipid peroxidation</i>)
MCH	Prosječna težina hemoglobina u eritrocitima (engl. <i>Mean Corpuscular Hemoglobin</i>)
MCHC	Prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitu (engl. <i>Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration</i>)
MCV	Prosječni volumen eritrocita (engl. <i>Mean Corpuscular Volume</i>)
MDA	Malondialdehid
MIZ	Ministarstvo zdravstva
MPV	Prosječni obujam trombocita u krvi (engl. <i>Mean Platelet Volume</i>)
MRO	Maksimalna razina ostataka (MRLs, engl. <i>Maximum Residue Levels</i>)
MS	Masena spektrometrija (engl. <i>Mass Spectrometry</i>)
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (engl. <i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>)
NDK	Najveća dopuštena količina tvari
NO	Dušikov monoksid ili dušikov (II) oksid (engl. <i>Nitric oxide</i>)
NZZJZ	Nastavni zavod za javno zdravstvo (engl. <i>Teaching Institute of Public Health</i>)
OSI	Organo somatski indeks (engl. <i>Organo-somatic index</i>)
PDE	Fosfodiesteraze (engl. <i>Phosphodiesterase</i>)
PKGon	Pozitivna kontrola gonadotropinom
PKSiI	Pozitivna kontrola sildenafilom
Pr	Proizvod
RDA	Preporučena dnevna količina (engl. <i>Recommended Dietary Allowances</i>)
RNS	Reaktivni dušikovi spojevi (engl. <i>Reactive Nitrogen Species</i>)

ROS	Reaktivni kisikovi spojevi (engl. <i>Reactive Oxygen Species</i>)
SAD	Sjedinjene Američke Države (engl. <i>United States of America</i>)
SH	Sulfhidrilna ili tiolna grupa
SOD	Superoksid dismutaze (engl. <i>Superoxide dismutase</i>)
SSI	Organosomatski indeks slezene (engl. <i>Spleen somatic index</i>)
TBA	Tiobarbituratna kiselina (engl. <i>Thiobarbituric acid</i>)
TMB	Reagens 3,3',5,5'- tetrametilbenzidine - vizualizirajući reagens imunoenzimatskih testova
TSI	Organosomatski indeks testisa (engl. <i>Testicular Somatic Index</i>)
US EPA	Američka agencije za zaštitu okoliša (engl. <i>United States Environmental Protection Agency</i>)
Hg	Živa (engl. <i>Mercury</i>)
WBC	Bijele krvne stanice (engl. <i>White Blood Cell</i>)
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (engl. <i>World Health Organization</i>)

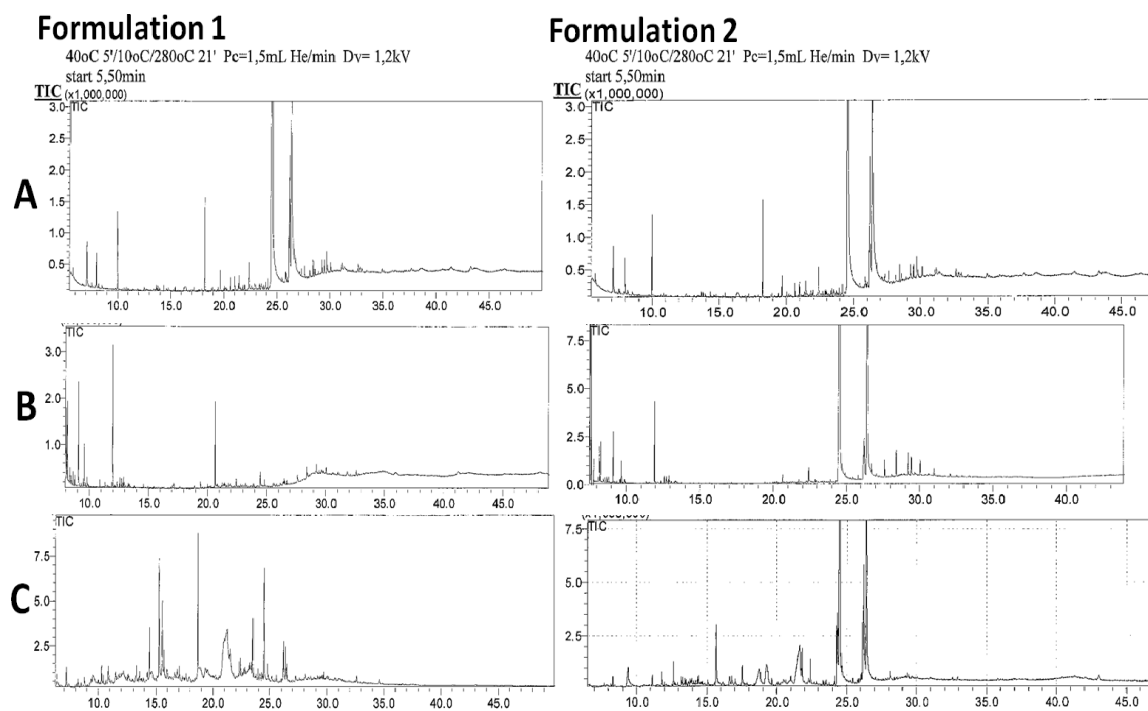
10. PRILOZI

Tablica 56. Popis analiziranih pesticida u istraživanim proizvodima kojima su tretirane životinje

Red. br.	Pesticidi mg/kg	Dodaci prehrani za muškarce				Dodaci prehrani za žene			Viagra	Hormon
		Pr. 1	Pr. 2	Pr. 3	Pr. 4	Pr. 7	Pr. 8	Pr. 9	PKSil	PKGon
1.	TPP	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2.	Diklorvos	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3.	Disulfoton-sulfoksid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4.	Mevinfos	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
5.	Metacrifos	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
6.	Forat	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
7.	Diazinone	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
8.	Dimetoat	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
9.	Etrimfos	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
10.	Metamidofos	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
11.	Disulfoton	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
12.	Fosfamidon	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
13.	Malaoxon	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
14.	Klorpirifos-metil	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
15.	Methyl parathion	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
16.	Fenklorfos	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
17.	Primiphos methyl	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
18.	Paraoxon	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
19.	Bioallethrin	n.d.	0,02	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,02	n.d.	n.d.
20.	Carbaril	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
21.	Phenitrothion	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
22.	Malation	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
23.	Chloropyrifos	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
24.	Paration etil	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
25.	Fention	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
26.	Klorfevinfos	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Red. br.	Pesticidi mg/kg	Dodaci prehrani za muškarce				Dodaci prehrani za žene			Viagra	Hormon
		Pr. 1	Pr. 2	Pr. 3	Pr. 4	Pr. 7	Pr. 8	Pr. 9	PKSil	PKGon
27.	Bromofos-etil	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
28.	Quinalfos	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
29.	Metidation	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
30.	Fenamiphos	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
31.	Disulfoton-sulfone	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
32.	Etion	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
33.	Fensulfotion	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
34.	Fenpropathrin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
35.	Tetramethrin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
36.	Azinfos - metil	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
37.	cis- permetrin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
38.	Azinfos - etil	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
39.	trans permetrin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
40.	Cyfluthrin-beta 1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
41.	Cyfluthrin-beta 2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
42.	Cyfluthrin-beta 3	n.d.	0,67	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,67	n.d.	n.d.
43.	Cypermethrin 1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
44.	Cypermethrin 2	n.d.	n.d.	10,43	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
45.	Cypermethrin 3	n.d.	n.d.	5,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
46.	alpha- HCH	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
47.	Lindan	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
48.	beta HCH	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
49.	Heptachlor	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
50.	Aldrin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
51.	Heptachlor epoxide	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
52.	Endosulfan alfa	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
53.	Endosulfan beta	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
54.	DDE	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Red. br.	Pesticidi mg/kg	Dodaci prehrani za muškarce				Dodaci prehrani za žene			Viagra	Hormon
		Pr. 1	Pr. 2	Pr. 3	Pr. 4	Pr. 7	Pr. 8	Pr. 9	PKSil	PKGon
55.	Dieldrin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
56.	Endrin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
57.	4,4-DDD	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
58.	4,4-DDT	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
59.	Endosulfan sulfat	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
60.	Imazalil	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
61.	Vinclozoline	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
62.	Klorpropam 1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
63.	Klorpropam	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
64.	Pirimicarb	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
65.	Myclobutanyl	n.d.	0,06	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,06	n.d.	n.d.
66.	Resmetrin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
67.	Fosalon	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
68.	Pirazofos	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
69.	Pirimetanil	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
70.	Tolklofos	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
71.	Prokimidon	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
72.	Trans- Klordan	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
73.	Cis- Klordan	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
74.	Trifloksistrobin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
75.	Boskalid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
76.	Tetradifon	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
77.	Fludioksonil	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
78.	Azoksistrobin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.



Slika 76. Spektri masa za proizvod 2 (Formulaciju 1) i proizvod 4 (Formulacija 2) snimljeni vezanim sustavom plinske kromatografije – masene spektroskopije (GC-MS) u tri različita otapala: A Diklormetan (CH_2Cl_2), B n-Pentan ($\text{CH}_5\text{Cl}_{12}$) i C Metanol (CH_3OH).

11. ŽIVOTOPIS

Lidija Barušić (djevojačko Rašić) rođena je 02.05.1971. godine u Imotskom. Godine 1990. nakon završenog srednjoškolskog obrazovanja upisala je Višu medicinsku školu Medicinskog Fakulteta u Zagrebu i stekla zvanje sanitarni inženjer. Školovanje nastavlja na Univerzitetu u Sarajevu (Fakultet zdravstvenih studija) gdje je diplomirala 2006. godine i stekla zvanje diplomirani sanitarni inženjer. Od lipnja 2008. student je Poslijediplomskog interdisciplinarnog sveučilišnog studija *Molekularne bioznanosti*.

U stalnom je radnom odnosu u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“ od 20. siječnja 1997. godine sa iskustvom iz područja ispitivanja mikrobiološke i kemijske sigurnosti hrane i predmeta opće upotrebe. Od 2008. godine obavlja funkciju Voditeljice Laboratorija za predmete opće uporabe.

Od 2004. godine sudjeluje u održavanju nastave Zdravstvenog veleučilišta u Zagrebu (ZVU), najprije u svojstvu vanjskog suradnika-asistenta iz područja javnog zdravstva i zdravstvene zaštite, a od 2010. godine stekla je status predavača kao naslovno zvanje iz područja biomedicine i zdravstva. Jedan je od predavača na više kolegija preddiplomskog i diplomskog specijalističkog studija te Voditelj stručne prakse za smjer sanitarnih inženjera. Iz tog stručnog područja mentor je i nekoliko diplomskih radova.

Sudjelovala je na projektu Hrvatske agencije za hranu o utvrđivanju prisutnosti toksičnih ftalata u hrani s ciljem procjene rizika za zdravlje potrošača Republike Hrvatske 2014. godine.

Aktivno je uključena u Komori zdravstvenih radnika, smjer sanitarni inženjeri kao zamjenica predsjednice Povjerenstva za priznavanje inozemnih kvalifikacija.

Stručni je predstavnik NZZJZ „Dr Andrija Štampar“ pri Ministarstvu zdravstva za pitanja predmeta široke potrošnje (sudjeluje u izradi Pravilnika i drugih aktivnih mjera vezano za područje predmeta opće uporabe) te pri Ministarstvu regionalnog razvoja i fondova Europske unije kao član Povjerenstva za dodjelu oznake „Hrvatski otočni proizvod“. Članica je Hrvatskog društva kozmetičkih kemičara (HDKK).

Udana je i majka četvero djece.

Objavljeni radovi i kongresni sažeci:

Izvorni znanstveni i pregledni radovi u u bazi Current Contents (CC)

1. **Barušić, Lidija**; Galić, Antonija, Bošnir, Jasna; Baričević, Lidija; Mandić-Andačić, Ivana; Krivohlavek, Adela; Mojsović Ćuić, Ana; Đikić, Domagoj. Phthalate in children's toys and childcare articles in Croatia. // Current science. 109 (2015), 8; 1480-1486.
2. Bošnir, Jasna; Puntarić, Dinko; Cvetković, Želimira; Pollak, Lea; **Barušić, Lidija**; Klarić, Ivana; Miškulin, Maja; Puntarić, Ida; Puntarić, Eda; Milošević, Milan. Effects of Magnesium, Chromium, Iron and Zinc from Food Supplements on Selected Aquatic Organisms. // Collegium antropologicum. 37 (2013), 3; 965-971.
3. Jamnicki, Sonja; Pèlach Serra, Maria Àngels; Lozo, Branka; Stanić, Maja; **Barušić, Lidija**. Deinking flotation of recycled linerboard for food packaging applications. // Cellulose chemistry and technology. 44 (2010), 10; 481-488.

Izvorni znanstveni i pregledni radovi objavljeni u bazi Scopus

1. Jasna Bošnir, **Lidija Barušić**, Lidija Baričević, Josipa Konjarik, Antonija Galić, Adela Krivohlavek. Praćenje prisutnosti ftalata u dječjim igračkama - procjena njihove sigurnosti. Medicinski Vjesnik. 2015;47(1):00-00 (u postupku objave)
2. Pavlinić, I., Puntarić, D., Bošnir, J., Lasić, D., **Barušić, L.**, Jergović, M., Miškulin, M., Puntarić, I. Vučić, K. Determination of ochratoxin A in barley- Contribution to the mycotoxin hypothesis on the etiology of endemic nephropathy (Istraživanje okratoksina A u ječmu – doprinos mikotoksinskoj hipotezi nastanka endemske nefropatiji (2010) Medica Jadertina, 40 (3-4), pp. 59-65.

3. Krivohlavek, A., **Barušić, L.**, Šmit, Z., Bošnjir, J., Puntarić, D. HPLC-MS Analysis of chloramphenicol residues in milk and powdered milk products. (2007) *Kemija u industriji / Journal of Chemists and Chemical Engineers*, 56 (2), pp. 53-56.

Znanstveni radovi u drugim časopisima

1. Uršulin-Trstenjak, Natalija; Levanić, Davor; Galić, Antonija; **Barušić, Lidija**; Jurica, Karlo; Vahčić, Nada. Confirming the botanical origin of the Croatian black locust honey (Istria region) using physicochemical parameters during two seasons. // *Journal of Hygienic Engineering and Design*. 8 (2014); 124-128.
2. Jamnicki, Sonja; **Barušić, Lidija**; Lajić, Branka. Suitability evaluation of various recycled paper grades for the production of health safe food packaging. // *Technics Technologies Education Management*. 8 (2013), 1; 70-77.
3. Jamnicki, Sonja; Lozo, Branka; Rutar, Vera; **Barušić, Lidija**. A study on the food contact suitability of recycled paper and board. // *Papíripar*. 54 (2012), 4; 14-20.

Kongresno priopćenje (sažeci) u CC časopisu

1. Bošnjir, Jasna; Puntarić, Dinko; Cvetković, Želimira; **Barušić, Lidija**; Pollak, Lea. Influence of Mg, Cr, Fe and Zn from food supplements on selected types of aquatic organisms. // Abstracts of the The XII International Congress of Toxicology ; u: *Toxicology Letters* 196 (2010) (S) S1-S352 ; Poster Session P108 Ecotoxicology, P108-040. Elsevir, 2010. 126-126
2. Bošnjir, Jasna; Puntarić, Dinko; **Barušić, Lidija**; Galić, Antonija. Modified analytical procedure for water pipes in "sick buildings" // *Toxicology Letters*, Volume 180, Supplement 1. 2008. 197-198.

Sažeci u zbornicima skupova

1. Baričević L, **Barušić L**, Bošnir J, Pavić T, Balog D, Šabarić J. Migration of toxic components from food contact materials. // Arhiv za higijenu rada i toksikologiju: Zbornik radova. Opatija, 2017; 68(Suppl. 1): 55. (poster, sažetak, znanstveni)
2. Bošnir, Jasna; Bevardi, Martina; Lasić, Dario; Kosić-Vukšić, Josipa; **Barušić Lidija**. Otkrivanje sastojaka patvorenosti hrane i predmeta opće uporabe // Povezivanje obrazovanja i najbolje prakse: Zbornik sažetaka. / Dr.sc. Damir Lučanin, prof.v.š. ; Dr.sc. Jadranka Pavić (ur.). Zagreb: Zdravstveno Veleučilište. Mlinarska cesta 38, 10000 Zagreb, 2017. 100-100. (predavanje, sažetak, znanstveni)
3. Šabarić, Jasenka; **Barušić, Lidija**; Marinčić, Snježana. Primjena induktivno spregnute plazme s masenom detekcijom (ICP - MS) za određivanje otpuštanja elemenata iz dječjih igračaka u svrhu ocjene njihove sigurnosti // 5. savjetovanje: Iskustva laboratorija u primjeni NORME HRN EN ISO/IEC 17025: Zbornik sažetaka. Vodice, 2014. 42-42. (poster, sažetak, stručni)
4. Jamnicki, Sonja; Lozo, Branka; Rutar, Vera; **Barušić, Lidija**. The suitability of using recycled paper as a direct food packaging // Book of abstract - 1st Conference BioMatPack / Bobu, Elena ; Obrocea, Paul (ur.). Barcelona, Španjolska : Fundación Itene, 2012. 36-38. (predavanje, sažetak, znanstveni)
5. **Barušić, Lidija**; Bevardi, Martina; Galić, Antonija; Bošnir, Jasna; Puntarić, Dinko. Određivanje parabena u kozmetičkim proizvodima metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti // 1. Hrvatski kongres zdravstvene ekologije: Zbornik radova. Zagreb, 2011. 61-61. (poster, sažetak, znanstveni)

6. **Barušić, Lidija**; Galić, Antonija; Baričević, Lidija; Dumenčić, Josipa; Mandić, Ivana; Bošnjir, Jasna. Kontrola ftalata u dječjim igračkama tijekom 2010. godine // 3. Međunarodni stručno-znanstveni simpozij „Sanitarno inženjerstvo – Sanitarengineering“: Zbornik sažetaka. Opatija, 2011. (poster, sažetak, stručni)
7. Lasić, Dario; Galić, Antonija; **Barušić, Lidija**; Krivić, Nives, Budeč, Maja; Bošnjir, Jasna; Puntarić, Dinko. Praćenje kvalitete hrvatskog meda tijekom 2010. godine // 1. Hrvatski kongres zdravstvene ekologije: Zbornik sažetaka. Zagreb, 2011. 112-112. (poster, sažetak, znanstveni)
8. Šarčević, Željka; Jusupović, F; Maestro, Danijel; Puntarić, Dinko; Bošnjir, Jasna; Galić, Antonija; **Barušić, Lidija**. Prisustvo aflatoksina u životnim namirnicama // 3. Međunarodni stručno-znanstveni simpozij "Sanitarno inženjerstvo-Sanitary Engineering": Zbornik sažetaka. Opatija, 2011. 95-95. (poster, sažetak, stručni).
9. **Barušić, Lidija**; Bevardi, Martina; Lasić, Dario; Bošnjir, Jasna. Određivanje potencijalnih faktora koji utječu na nastanak biogenih amina u vinu // Book of abstract - 13th Ružička days "Today science-tomorrow industry". Vukovar, 2010. 78-78. (poster, sažetak, znanstveni).
10. Bevardi, Martina; **Barušić, Lidija**; Jurak, Gordana; Budeč, Maja. Određivanje nitrata u povrću tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti // 2. Hrvatski kongres preventivne medicine i unaprijeđenja zdravlja; Zbornik sažetaka. Zagreb, 2010. 90-90 (poster, sažetak, znanstveni)
11. Jurak, Gordana; Jelušić, Sanja; **Barušić, Lidija**; Bevardi, Martina; Budeč, Maja; Lasić, Dario; Krivić, Nives. Primjena Quechers metode u analizi pesticida u voću i povrću // 2. Hrvatski kongres preventivne medicine i unaprijeđenja zdravlja: Zbornik sažetaka. Zagreb, 2010. 92. (poster, sažetak, znanstveni).

12. **Barušić, Lidija**; Galić, Antonija. Zdravstvena ispravnost i sigurnost igračkaka // Upravljanje zdravstvenim rizicima u predškolskim ustanovama: Zbornik sažetaka. Opatija, 2009. 61-67. (pozvano predavanje, sažetak, stručni)
13. Grgić, Matijana; Bošnir, Jasna; Puntarić, Dinko; Galić, Antonija; **Barušić Lidija**. Histamin kao kontaminant hrane // 31. stručni skup s međunarodnim sudjelovanjem Zdravstvena ekologija u praksi: Zbornik sažetaka, Šibenik, 2006. 85. (poster, sažetak, znanstveni).
14. Krivohlavek Adela; **Barušić, Lidija**; Šmit, Zdenko; Bošnir, Jasna; Puntarić, Dinko. HPLC-MS analysis of chloramphenicol residues in milk and milk products // Book of abstract -10th International Symposium on Separation Science, New Achievements in Chromatography, Opatija, 2004. 126-126. (poster, sažetak, znanstveni).