

**DELOVANJE CIMIAZOL HIDROHLORIDA NA RAZMENU
SESTRINSKIH HROMATIDA, MITOTSKI I PROLIFERATIVNI
INDEKS U KULTURAMA HUMANIH LIMFOCITA***
*EFFECTS OF CYMIAZOLE HYDROCHLORIDE ON SISTER-CHROMATID
EXCHANGES, MITOTIC AND PROLIFERATION INDICES IN
CULTURED HUMAN LYMPHOCYTES*

Z. Stanimirović, Svetlana Fišter, D. Ćirković**

Cimiazol hidrohlorid je aktivna komponenta akaricida Apitol®-a i Apihem®-a koji se koriste kao varoacidi u pčelarstvu. Imajući u vidu da su rezidue cimiazol hidrohlorida ustanovljene u svim pčelinjim proizvodima koji su u upotrebi u ljudskoj ishrani, kao i u humanoj i veterinarskoj medicini – kao alternativni medikamenti, cilj ovog proučavanja je bio da se proceni sposobnost ove supstancije da izazove genotoksične efekte u kulturama limfocita periferne krvi čoveka i njen mogući uticaj na mitotsku aktivnost i kinetiku ćelijskog ciklusa. Genotoksični efekti su proučavani primenom SCE-testa in vitro. Rezultati su pokazali statistički vrlo značajno povećanje SCE-a ($p < 0,001$) u poređenju sa negativnom kontrolom; tj. cimiazol hidrohlorid je ispoljio genotoksična svojstva. Sve eksperimentalne koncentracije cimiazol hidrohlorida su statistički značajno ($p < 0,001$) povisile vrednosti mitotskog indeksa (MI) i indeksa proliferacije (PI), takođe. Tako, dobijeni rezultati ukazuju na značajne citomodulirajuće efekte i genotoksična svojstva.

Ključne reči: cimiazol hidrohlorid, akaricidi, pčelarstvo, genotoksičnost, SCE-test, mitotski indeks, indeks proliferacije

Uvod / Introduction

Cimiazol hidrohlorid se nalazi kao aktivna komponenta u mnogim sredstvima koja se koriste kao akaricidi, tj. varoacidi u pčelarstvu. Supstancija je

* Rad primljen za štampu 2. 6. 2003. godine

** Dr Zoran Stanimirović, vanredni profesor, dr Svetlana Fišter, viši naučni saradnik, Katedra za biologiju, Fakultet veterinarske medicine, Beograd; mr Dragan Ćirković, Ministarstvo za poljoprivredu i vodoprivredu Srbije, Novi Pazar.

rastvorljiva u vodi, što znači da može da se rastvori i u medu. Rezidue cimiazol hidrohlorida su tako nađene ne samo u medu, već i u vosku i drugim pčelinjim proizvodima [7, 5, 14, 8, 2, 1, 20, 21, 11,12]. Pčelinji proizvodi imaju vrlo široku i raznovrsnu primenu, kako u ishrani, tako i kao alternativni lekovi. Razumljivo je da je potrebno da se zna da li ova materija, čiji se ostaci detektuju, može da ima štetnih, toksičnih i genotoksičnih osobina. Postoje neki raniji nalazi da su određene koncentracije cimiazol hidrohlorida uzrokovale povišenje učestalosti prekida i ahromatskih lezija, kao i pojave poliploidnih ćelija u nekim test sistemima [15, 16, 19]. Kako se smatra da je test na genotoksičnost u kome se primenjuje pojava razmene sestrinskih hromatida (SCE), izuzetno osetljiv u detekciji hemijskih genotoksičnih agenasa [22, 18, 19], cilj ovoga rada je bio da se korišćenjem ovog testa ispitaju eventualna genotoksična svojstva ove supstancije, kao i njen mogući uticaj na mitotski indeks i indeks proliferacije.

Materijal i metode rada / Materials and methods

Korišćen je cimiazol hidrohlorid (Apitol® JKL: 03 6,6/005-011/005; Evrotom, Ruma) u koncentracijama od 0,01 mg/ml, 0,1 mg/ml i 1 mg/ml. Za pozitivnu kontrolu je korišćen ciklofosamid (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) u koncentraciji od 40 µg/ml; kao negativna kontrola korišćen je 0,9% NaCl.

Kulture humanih limfocita postavljane su na klasičan način [6], a diferencijalno bojenje SCE-a obavljeno je prema proceduri Perryja i Wolffa [17].

Mitotski indeks je određivan na 1000 ili više ćelija, dok je kinetika ćelijskog ciklusa procenjavana na osnovu indeksa proliferacije.

Statističke analize obavljene su primenom Student t-testa.

Rezultati i diskusija / Results and discussion

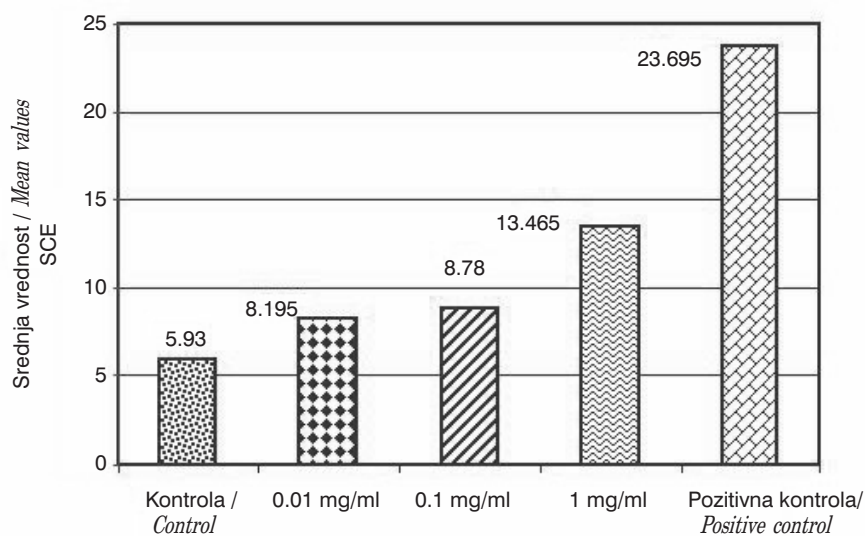
Rezultati istraživanja su prikazani na tabelama 1, 2 i 3 i slikama 1, 2 i 3.

Kao što se uočava na tabeli 1 i slici 1, srednje vrednosti SCE-a, u negativnoj kontroli, bile su $5,93 \pm 0,13$, dok su u svim ostalim slučajevima bile više (tabela 1, slika 1); odnosno tretman cimiazol hidrohloridom, kod svih primenjenih doza ove supstancije, izazvao je statistički značajno ($p < 0,001$) povećanje SCEa, što je, kako se i očekivalo, očigledno i u pozitivnoj kontroli.

Tabela 1. Uticaj cimiazol hidrohlorida na učestalost SCEa u kulturama limfocita periferne krvi čoveka

Table 1. Influence of cymiazole hydrochloride on SCE frequency in cultures of human peripheral blood lymphocytes

Koncentracija cimiazol hidrohlorida / <i>Cymiazole hydrochloride concentrations</i>	Opseg / <i>Range SCE</i>	Srednja vrednost / <i>Mean value SCE</i>	Standardna devijacija / <i>Standard deviation SD</i>	Standardna greška / <i>Standard error SE</i>	Procenat srednje vrednosti SCEa u odnosu na kontrolu / <i>Percent of mean value of SCE in respect to control X_k</i>
Kontrola / <i>Control</i>	3 – 9	5.930	1.9008	0.1344	100.00
0,01 mg/ml	3 – 10	8.195	1.8120	0.1281	138.20
0,10 mg/ml	5 – 12	8.780	1.8022	0.1274	148.06
1,00 mg/ml	7 – 16	13.465	1.8832	0.1332	227.06
Pozitivna kontrola / <i>Positive control</i>	9 – 29	23.695	4.4599	0.3154	399.58



Slika 1. Uticaj cimiazol hidrohlorida na učestalost SCEa u kulturama limfocita periferne krvi čoveka

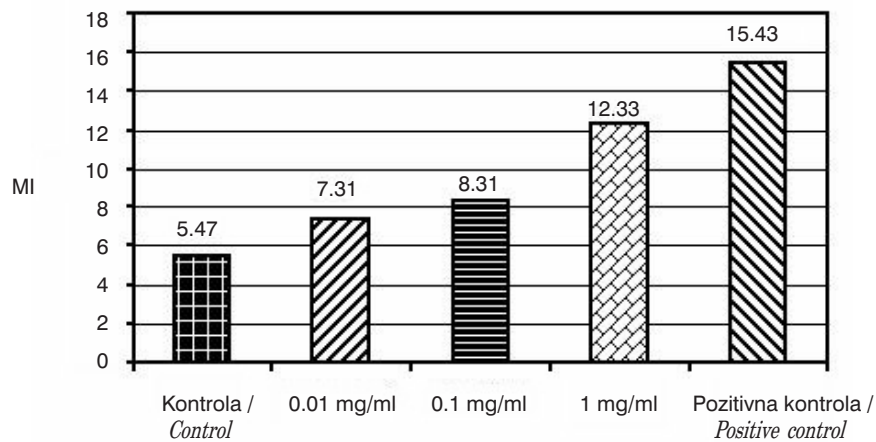
Figure 1. Influence of cymiazole hydrochloride on SCE frequency in cultures of human peripheral blood lymphocytes

Cimiazol hidrohlorid, pri svim eksperimentalnim koncentracijama omogućio je statistički značajno povećanje vrednosti mitotskog indeksa (MI) i indeksa proliferacije (PI).

Tabela 2. Uticaj cimiazol hidrohlorida na vrednosti mitotskog indeksa (MI) u kulturama limfocita periferne krvi čoveka

Table 2. Influence of cymiazole hydrochloride on mitotic index (MI) in cultures of human peripheral blood lymphocytes

Koncentracija cimiazol hidrohlorida / <i>Cymiazole hydrochloride concentrations</i>	Srednja vrednost / <i>Mean value</i> MI	Minimum	Maximum	Standardna devijacija / <i>Standard deviation</i> SD	Standardna greška / <i>Standard error</i> SE
Kontrola / <i>Control</i>	5.47	5.13	6.05	0.3494	0.0902
0,01 mg/ml	7.35	7.11	7.81	0.1850	0.0478
0,10 mg/ml	8.31	8.02	8.81	0.1989	0.0514
1,00 mg/ml	12.33	11.99	12.97	0.2517	0.0650
Pozitivna kontrola / <i>Positive control</i>	14.57	14.02	15.43	0.4429	0.1144



Slika 2. Uticaj cimiazol hidrohlorida na mitotski indeks (MI) u kulturama limfocita periferne krvi čoveka /

Figure 2. Influence of cymiazole hydrochloride on mitotic indices (MI) in cultures of human peripheral blood lymphocytes

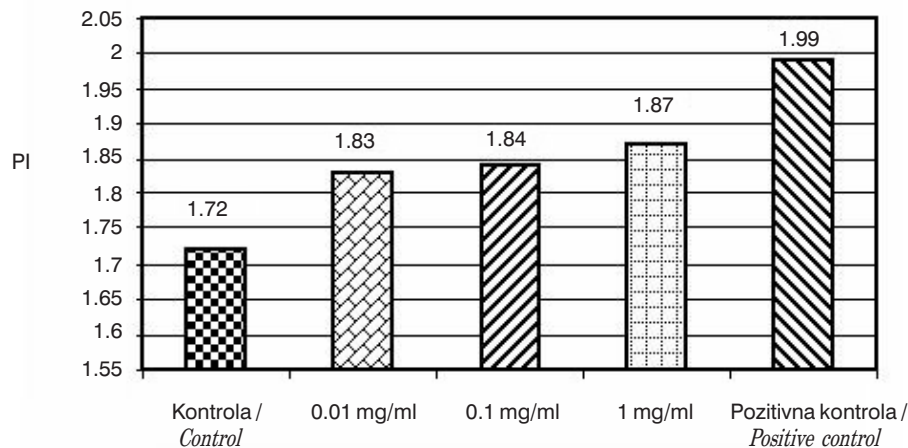
Rezultati dobijeni za vrednosti mitotskog indeksa prikazani su na tabeli 1 i slici 1. Vrlo značajne statističke razlike ($p < 0,001$) javljaju se između vrednosti negativne kontrole i svih koncentracija cimiazola u tretiranim kulturama.

Slični rezultati su dobijeni i za vrednosti indeksa proliferacije (tabela 3 i slika 3).

Tabela 3. Uticaj cimiazol hidrohlorida na vrednosti indeksa proliferacije (PI) u kulturama limfocita periferne krvi čoveka

Table 3. Influence of cymiazole hydrochloride on proliferation index (PI) in cultures of human peripheral blood lymphocytes

Koncentracija cimiazol hidrohlorida / <i>Cymiazole hydrochloride concentrations</i>	Srednja vrednost / <i>Mean value PI</i>	Minimum	Maximum	Standardna devijacija / <i>Standard deviation SD</i>	Standardna greška / <i>Standard error SE</i>
Kontrola / <i>Control</i>	1.72	1.695	1.790	0.028452	0.007346
0,01 mg/ml	1.83	1.820	1.860	0.012659	0.003268
0,10 mg/ml	1.84	1.830	1.875	0.011310	0.002920
1,00 mg/ml	1.87	1.830	1.905	0.017948	0.004634
Pozitivna kontrola / <i>Positive control</i>	1.99	1.965	2.025	0.022615	0.005839



Slika 3. Uticaj cimiazol hidrohlorida na indeks proliferacije (PI) u kulturama limfocita periferne krvi čoveka

Figure 3. Influence of cymiazole hydrochloride on proliferation indices (PI) in cultures of human peripheral blood lymphocytes

Na osnovu ovih rezultata moglo bi da se zaključi da cimiazol hidrohlorid omogućava značajno citomodulirajuće dejstvo kao i to da ova supstancija iskazuje genotoksična svojstva.

Mnogi istraživači su zapazili da cimiazol hidrohlorid iskazuje nepoželjna dejstva na same pčele. Tako Omar i Shoriete [13] ukazuju na zaostajanje u razviću hipofaringealnih žlezda i povećanje kiselosti rektalnog sadržaja, dok Stanimirović i sar [19] navode postojanje efekata na nivou spermatogeneze i oogeneze. Kezić i sar [10] navode povećanje aktivnosti nekih enzima kao što je benzo-(a)-pyrene monooksidaza, do 300 posto.

Prema podacima Evropske agencije za procenu medicinskih proizvoda [4] (The European Agency for Evaluation of Medicinal Products), posle primene metoda nakapavanja preporučenih doza ovoga leka, rezidue cimiazol hidrohlorida bile su: u medu u opsegu od 0,01 do 1,1 mg/kg, od 0,2 do 9,3 mg/kg u pčelinjem saću i od 0,37 do 1,25 mg/kg u vosku. Posle metode hranjenja, koncentracije cimiazol hidrohlorida su bile niže: od 0,01 do 0,34 mg/kg u medu, od 0,33 do 2,4 mg/kg u pčelinjem saću i od 0,3 do 1,02 mg/kg u vosku.

U nekim zemljama utvrđene su najveće moguće dozvoljene doze (MRL), za rezidue cimiazola i one se razlikuju u raznim državama. Tako, maksimalna dozvoljena doza (MRL) cimiazola u medu iznosi 0,01 ppm u Italiji i Nemačkoj, 1 ppm važi za EU, dok u SAD-u, maksimalno dozvoljena doza uopšte nije propisana.

Pčele su u stanju da razgrađuju ovu supstanciju [2, 3] u izvesnoj meri. Nažalost, veliki broj podataka iz literature o njenom štetnom delovanju, a posebno rezultati ovog, prikazanog istraživanja, koji upućuju na njena genotoksična svojstva, ukazuju na to da je izuzetno važno poštovanje pravila pri njenoj upotrebi i da je potrebna velika opreznost u odnosu na prisustvo mogućih rezidua, da ne bi umesto zdrave hrane i bezbednih medikamenata imali proizvode dalekosežno štetne po žive organizme.

Zaključak / Conclusion

Rezultati testiranja cimiazol hidrohlorida su pokazali statistički vrlo značajno povećanje SCE-a ($p < 0,001$) u poređenju sa negativnom kontrolom; tj. cimiazol hidrohlorid je u kulturi humanih limfocita, u primenjenim koncentracijama, ispoljio genotoksična svojstva. Sve eksperimentalne koncentracije cimiazol hidrohlorida su statistički značajno ($p < 0,001$) povisile vrednosti mitotskog indeksa (MI) i indeksa proliferacije (PI), takođe. Tako, dobijeni rezultati ukazuju na značajne citomodulirajuće efekte i genotoksična svojstva ove supstancije.

Rad je izrađen u okviru zadatka projekta br. 1870 koji je finansiralo Ministarstvo za nauku Srbije.

Literatura / References

1. Bogdanov S., Kolchenmann V., Imdorf A.: *J Apic Res*, 37, 57-67, 1998. – 2. Cabras P., Melis M., Spanedda L.: *J AOAC* 76, 92-93, 1993. – 3. Cabras P., Martini M. G., Floris I., Spanedda L.: *J Apic Res*, 33, 83-86, 1994. – 4. Committee for Veterinary Medicinal Products, Summary Report, Cymiazole. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Veterinary Medicines Evaluation Unit. EMEA/MRL/067/96-FINAL March 1996. <http://www.Fedesa.Be/Events/Medaviability/013000en.pdf>, 1996. – 5. Eischen F. A., Cardoso-Tamez D., Dietz A., Ware G. O.: *Apidologie*, 19, 4, 367-376, 1988. – 6. Evans H. J., O' Riordan M.: *Mutat Res*, 31, 135-148, 1975. – 7. Eyrich U., Ritter W.: *Apidologie*, 17, 4, 379-381, 1986. – 8. Eyrich U., Ritter W.: *Zeitschrift für Angewante Entomologie*, 109, 15-20, 1990. – 9. Iannuzzi L., Di Meo G. P., Perucatti A., Ferrara L., Gustavsson I.: *Hereditas*, 114, 201-205, 1991. – 10. Kezić N., Lucić D., Sulimanović Đ.: *Apidologie*, 23, 217-223, 1992. – 11. Korta E., Bakkali A., Berrueta L. A., Gallo B., Vicente F., Kilchenmann V., Bogdanov S.: *J Agric Food Chem*, 49, 5835-5842, 2001. – 12. Korta E., Bakkali A., Berrueta L. A., Gallo B., Vicente F.: *J Food Prot* 65, 161-166, 2002. – 13. Omar M. O. M., Shoriete M. N.: *Assiut Journal of Agricultural Sciences*, 23, 4, 203-215, 1992. – 14. Patetta A., Manino A.: *Apicoltura Moderna*, 79, 3, 109-114, 1988. – 15. Pejović D., Stanimirović Z., Jovanović N.: Abstracts from EEMS-99 (29th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society) Vol 85, Suppl I, July 4-9, pp 45. Copenhagen, Denmark, 1999. – 16. Pejović D., Stanimirović Z., Đelić N., Raičević Nevena.: In: Trailović D, Lazarević M, editors, Proceedings of the 2nd Symposium in Animal Clinical Pathology and Therapy *Clinica Veterinaria*, June 12-16, pp 231-234, Budva, YU, 2000. – 17. Perry P., Wolff S.: *Nature*, 251, 156-158, 1974. – 18. Ronne M.: *Gen Sel Evol* 23 suppl. 1, 49-55, 1991. – 19. Stanimirović Z., Stevanović Jevrosima, Mladenović M.: editors Book of abstracts. The 2nd international exhibition "INTERMIOD-2001", Sep 14, pp 202-203. Moscow, Russia, 2001. – 20. Volante M., Galarini R., Miano V., Cattaneo M., Pecorelli I., Bianchi M., Cossignati L., Damiani P.: *Chromatographia*, 54, 3-4, 241-246, 2001. – 21. Wallner K.: *Apidologie*, 30, 2-3, 235-248, 1999. – 22. Zimonjić D., Savković N., Anđelković M.: *Genotoksični agensi [Genotoxic agents]* Naučna knjiga, Beograd, 1990.

ENGLISH

EFFECTS OF CYMIAZOLE HYDROCHLORIDE ON SISTER-CHROMATID EXCHANGES, MITOTIC AND PROLIFERATION INDICES IN CULTURED HUMAN LYMPHOCYTES

Z. Stanimirović, Svetlana Fišter, D. Ćirković

Cymiazole hydrochloride is the active component of the acaricides Apitol® and Apichem® which are used as varroacide in beekeeping. Since residues of cymiazole hydrochloride were detected in all bee products being used for human nutrition and as alternative medications in human and veterinary medicine, the aim of this study was to evaluate the capability of this substance to produce genotoxic effects in peripheral human blood lymphocytes and its possible influence on mitotic activity and cell cycle kinetics. The genotoxic effects were studied by in vitro SCE-test. The results that were obtained for all doses applied in cultures (0.01 mg/ml, 0.1 mg/ml and 1 mg/ml) showed the very significant in-

creases in frequencies of SCEs ($p < 0.001$) in comparison to negative controls; i.e. the cymiazole hydrochloride exhibited genotoxic properties. All experimental concentrations of cymiazole hydrochloride caused statistically highly significant ($p < 0.001$) increased mitotic index values (MI) and proliferation index (PI), too. Thus, the obtained data indicate significant cytomodulating effects and genotoxic properties.

Key words: cymiazole hydrochloride, acaricides, beekeeping, genotoxicity, SCE-test, mitotic index, proliferation index

РУССКИЙ

ДЕЙСТВОВАНИЕ ГИДРОХЛОРИД ЦИМИАЗОЛА НА ОБМЕН СЕСТРИНСКИХ ХРОМАТИДОВ, МИТОТОЧЕСКИЙ И ПРОЛИФЕРАТИВНЫЙ ИНДЕКС В КУЛЬТУРАХ ГУМАННЫХ ЛИМФОЦИТОВ

З. Станимирович, Светлана Фиштер, Д. Чиркович

Гидрохлорид цимиазола активный компонент акарицидов Apitol-a и Aриhem-a, используемые в качестве варроацидов в пчеловодстве. Имея в виду, что остатки гидрохлорид цимиазола, установленные во всех пчелиных продуктах, используемые в человеческом питании, словно и в гуманной ветеринарной медицине как альтернативные медикаменты, цель этого изучения была оценить способность этой субстанции, вызвать генотоксические эффекты в культурах лимфоцитов периферической крови человека и её возможное влияние на митотическую активность и кинетику клеточного цикла. Генотоксические эффекты изучены применением SCE-теста *in vitro*. Результаты показали статистически очень значительное увеличение SCE-а ($p < 0,001$) в сравнении с отрицательным контролем; т.е. гидрохлорид цимиазола проявил генотоксические свойства. Все экспериментальные концентрации гидрохлорид цимиазола статистически значительно ($p < 0,001$) повысили стоимости митотического индекса (МИ) и индекса пролиферации (ПИ), также. Так, полученные результаты указывают на значительные цитомодулирующие эффекты и генотоксические свойства.

Ключевые слова: гидрохлорид цимиазола, акарициды, пчеловодство, генотоксичность, SCE-тест, митотический индекс, индекс пролиферации