

Prehľad

FUNGICÍD TOLYLFLUANID AKO ZDROJ EXPOZÍCIE FLUORID

Review article

Fungicide Tolyfluanid as a source of fluoride exposure

N. KOVALKOVIČOVÁ¹, I. ŠUTIAKOVÁ², J. PISTL¹

¹Univerzita veterinárskeho lekárstva, Košice; University of Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic;

²Prešovská univerzita, University of Prešov, Prešov, Slovak Republic

ABSTRACT

Now-a-days more attention is paid to sources of fluoride exposure. Pesticides containing fluoride in their molecules also contribute to the environmental contamination by fluorides. One of them is tolyfluanid. Tolyfluanid belongs to the class of phenylsulfamide fungicides. It is used to control a wide range of fungicidal diseases in several fruits, vegetables and hops. Its main effects in experimental animals during short-term exposure are functional disturbance of the thyroid gland, increased liver weight, decreased liver enzyme levels and slight histopathological changes in the kidneys. Long-term exposure leads to accumulation of increased level of fluoride in the organism.

Key words: flouride, pesticide, tolyfluanid

Účinky fluoridov na organizmus človeka a zvierat

Aktuálnou otázkou v súčasnosti je sledovanie vplyvu fluoridov na zdravotný stav človeka a zvierat. Fluoridy sú prirodzenými stavebnými prvkami tela podieľajúcimi sa na tvorbe kostí a raste, na strane druhej expozícia vysokým dávkam môže viesť ku mnohým nežiaducim účinkom. Pri akútnej otrave fluoridmi sa objavujú gastrointestinálne príznaky, a to nausea, vomitus a abdominálne bolesti.

Dlhodobejší nadmerný príjem fluoridov u mladých jedincov môže viesť ku poškodeniu skloviny zubov známemu ako dentálna fluoróza. Zuby poškodené fluorózou majú viditeľnú stratu farby, objavujú sa na nich biele, hnedé až čierne škvrny. Expozícia vysokým dávkam fluoridu u starších jedincov zapríčiňuje fluorózu kostí. Známe sú aj alergické reakcie na fluorid. Klinické štúdie

ukázali, že u citlivých jedincov sa objavujú zmeny na koži, gastrointestinálne ťažkosti, bolesti hlavy, výrazne sa u nich zvyšuje aj výskyt ochorení obličiek. Obličky zabraňujú kumulácii fluoridu v organizme. U dospelých jedincov sú schopné vylúčiť až 50 % prijatého fluoridu, kým pri ich poškodení je to iba 10 až 20 %, čo následne vedie ku kumulácii fluoridov nie len v samotných obličkách, ale aj v kostiach a iných orgánoch (Whitford, 1996). Po expozícii fluoridu bolo u ľudí a zvierat zaznamenané priame poškodenie obličkového tkaniva skôr ako poškodenie iných orgánov (Hongso a kol., 1980; Karaoz a kol., 2004; Xu a kol., 2006; Birkner a kol., 2006).

V súčasnosti je výskum zameraný predovšetkým na sledovanie narušenia normálnej hormonálnej funkcie organizmu, hlavne porúch funkcie štítnej žľazy (National Research Council, 2006), poškodenia mozgového tkaniva Bhatnagar a kol., 2002), prípadného mutagénneho a

Correspondence: E-mail: kovalkovicova@uvm.sk

karcinogénneho účinku po expozícii fluoridu a fluorid obsahujúcemu pesticídu (Wang a kol., 2004; Velazquez-Guadarrama a kol., 2005).

Zdroje expozície fluoridom

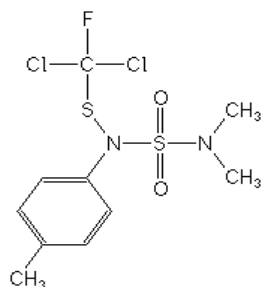
Flouridy sa vyskytujú v životnom prostredí buď prirodzene alebo ako dôsledok ľudskej činnosti. Prirodzene sú do životného prostredia uvoľňované zo sopiek, morskej vody a počas zvetrávania hornín. V niektorých lokalitách sú prítomné aj v pitnej vode ako dôsledok špecifických geologických podmienok prostredia, z ktorého sa voda získava, v iných sú zámerne pridávané do vody a dentálnych produktov ako prevencia proti zubnému kazu. Všetky potraviny, krmivá a pitná voda obsahujú určité malé množstvá flouridov. U niektorých ale (napríklad v dojčeneckej výžive, džúsoch, sóde, čaji, víne, pive) môže byť ich obsah vyšší, ak voda použitá na ich prípravu obsahovala zvýšené koncentrácie flouridov. Vyšší obsah flouridov sa zisťuje aj v spracovaných cereáliách, mechanicky vykostených kurčatách, rybách, fluoridovanej soli, niektorých anestetikách a cigaretách (www.fluorideactionnetwork.com).

Flouridy sa používajú v rôznych druhoch priemyslu, hlavne v hlinikárňach, tehelniciach, pri výrobe fosforečných hnojív, ocele, skla, keramiky, gleja a lepidiel, uvoľňujú sa tiež pri spaľovaní uhlia. Významnú funkciu majú pri výrobe plastických látok, napr. teflónu. Zlúčeninou fluóru je aj freón difluór-dichlórmetán, ktorý sa používa ako náplň do chladiacich zariadení a pri uvoľnení do atmosféry poškodzuje ozónovú vrstvu.

Ku kontaminácii životného prostredia fluoridmi v súčasnosti výraznou mierou prispieva aj použitie mnohých pesticídov obsahujúcich vo svojej molekule flouridy. Jedným z nich je fungicíd tolylfluánid.

Fyzikálno-chemické vlastnosti, použitie a osud tolylfluánidu v životnom prostredí

Tolylfluánid (Euparen Multi 50 WG, Euparen M 50 WP) je fenylsulfamidový fungicíd s protektívnym účinkom. Chemicky ide o 1,1-dichloro-*N*-[(dimetylamino)sulfonyl]-1-fluoro-*N*-(4-metylfenyl)metansulfenamid ($C_{10}H_{13}Cl_2FN_2O_2S_2$) s molekulovou hmotnosťou 347,3 a štruktúrnym vzorcom (The Pesticide Manual, 2000):



Je to bezfarebná kryštalická látka bez charakteristického zápachu alebo s miernym aromatickým zápachom. V Tab. 1 je uvedená rozpustnosť tolylfluánidu v jednotlivých rozpúšťadlách pri 20 °C (EPA, 2002a).

Tab. 1: Rozpustnosť tolylfluánidu v jednotlivých rozpúšťadlách pri 20 °C (EPA, 2002a)

rozpúšťadlo	koncentrácia (mg.l ⁻¹)	rozpustnosť (g.l ⁻¹)
voda	(mg.l ⁻¹)	0,90
heptán	(g.l ⁻¹)	54
dichlórmetán	(g.l ⁻¹)	> 250
izopropanol	(g.l ⁻¹)	22
xylén	(g.l ⁻¹)	190

Tolylfluánid sa používa na ničenie plesní pri pestovaní a uskladnení ovocia, chmeľu, zeleniny, ako aj v boji proti sneti, hrdzi a škvrnitosti listov okrasných rastlín. Po viacnásobnej aplikácii má aj akaricídne účinky. Veľmi účinný je predovšetkým v boji proti *Botrytis cinerea*, *Plasmopara viticola*, *Venturia inaequalis* u jabĺk, malín, čiernych ríbezlí, hrozna, chmeľu, jahôd a paradajok (Brugmans, 1999; Bryk, 2002). Účinne pôsobí aj proti *Helminthosporium solani* u zemiakov, *Gossypium hirsutum* L. a *Rhizoctonia solani* u bavlny (Goulart, 2002). Solarska (1999) zistila, že pri pestovaní chmeľu je formulácia prípravku na báze tolylfluánidu - Euparen M 50 WG oveľa účinnejšia ako Euparen M 50 WP. U paradajok pretrváva protektívny fungicídny účinok tolylfluánidu 11 dní po aplikácii (Szpyrka a Sadlo, 2002).

Tolylfluánid podlieha v pôde rýchlej hydrolyze za vzniku dimetylaminsulfotoluididu (DMST). Pri alkalickom pH 9 je jeho polčas rozpadu < 10 min, pri pH 7 predstavuje 29,1 h, pri pH 4 je 11,7 dňa. Degradácia tolylfluánidu bola sledovaná v 4 rôznych druhoch pôd za aeróbných podmienok. Pôvodná zlúčenina bola rýchlo degradovaná na DMST, polčas rozpadu bol menej ako 1 deň. Extrakty pôdy obsahovali aj ďalšie metabolity – metylamino-sulfotoluidid (< 2,7 %), 4-dimetylaminosulfonylamino-benzoovú kyselinu (< 4,1 %), 4-metylaminosulfonyl amino-benzoovú kyselinu (< 1,7 %) a CO₂. V aeróbnej ílovito-pieskovej pôde predstavoval polčas rozpadu 1,4–9 dní, pričom po 12–24 dňoch od aplikácie bolo do hĺbky 27 cm pôdy extrahovaných iba 6,6, resp. 4,9 % pôvodnej zlúčeniny, 0,2 % DMST, po 65 dňoch 0,24 % pôvodne aplikovaného množstva fungicídu a po 540 dňoch bolo prítomných len 9,8 % vo forme DMST, zatiaľ čo 75,1 % bolo viazaných na 9 cm povrch pôdy. Polčas rozpadu v 10 cm povrchu ílovito-piesčitej pôdy bol 4,5 dňa a ílovitej pôdy 14 dní. Tolylfluánid je v pôde slabobobilný, preto pôvodná zlúčenina, ako aj DMST zostávajú v povrchových vrstvách, ich transport do hlbších vrstiev pôdy je veľmi málo pravdepodobný. V životnom prostredí hydrolyza prebieha oveľa rýchlejšie ako fotolýza, nakoľko

tolyfluanid vo vodnom roztoku neabsorbujú svetlo pri vlnovej dĺžke > 290 nm (The Pesticide Manual, 2000).

Vo vode podlieha hydrolyze, nedochádza ku jeho kumulácii ani po viacerých aplikáciách, avšak po 25-týždňovej aplikácii môže zvýšená koncentrácia metabolitu DMST predĺžiť polčas rozpadu na 76,4 dňa.

V rastlinách je rýchlo hydrolyzovaný na DMST, ktorý je ďalej hydroxylovaný a konjugovaný (The Pesticide Manual, 2000), pričom v jahodách 80 % celkových rezíduí tvorí pôvodná zlúčenina a DMST, v jablkách je to hlavne pôvodná zlúčenina (89 %). Tolyfluanid a DMST sú veľmi stabilné i pri nízkych teplotách, napríklad v jablkách pri -18 °C 168 dní a v jahodách pri -20 °C 811 dní (Fussell a kol., 2002). U jablka je možné rezíduá fungicídu úplne odstrániť ich obvarením a odstránením kože a stoniek (Štěpán a kol., 2005; Tichá a kol., 2007).

Tolyfluanid patrí medzi najčastejšie detegované fungicídy v ovocí a zelenine (Nowacka, 2002). Jeho rezíduá sa stanovujú plynovou chromatografiou a hmotnostnou spektrometriou (Langowska, 2002; Lehotay a kol., 2007). Maximálne limity rezíduí pre jednotlivé plodiny sú uvedené v Tab. 2 (EPA, 1997).

Tab. 2: Maximálne limity rezíduí v mg.kg⁻¹ pre jednotlivé plodiny (EPA, 1997)

Plodina	Maximálny limit rezíduí (mg.kg ⁻¹)
černice	10
hlávkový šalát	1
hrozno	5
chmeľ	30
jablká	5
jahody	3
maliny	10
paradajky	1
uhorky	2

Účinky tolyfluanidu na organizmus človeka a zvierat

Až do roku 2007 sa tolyfluanid používal v mnohých krajinách. Rozhodnutím Komisie Európskych spoločenstiev zo 4. mája 2007 členské štáty pozastavili vonkajšie používanie prípravkov na jeho báze. Na Slovensku ide o prípravky Euparen Multi, Euparen Multi WG, Hattrick a Hattrick WG. Ochranné opatrenia vyplynuli z nedávneho zistenia, že jeden z metabolitov tolyfluanidu – dimetylsulfamid, ktorý sa môže vyskytovať v pôde a podzemnej a povrchovej vode, sa pri štandardnom procese úpravy pitnej vody (ozonizovaním) premieňa na nitrosamín (NDMA), ktorý je škodlivý pre zdravie, patrí medzi látky s genotoxickým a karcinogénnym účinkom (Úradný vestník Európskej únie, 2007). V USA je jeho

použitie zakázané kvôli možnému poškodeniu renálnych tubulov obličiek účinkom fluóru a zvýšenému výskytu nádorov – adenómov štítnej žľazy, ktoré boli sledované u experimentálnych zvierat. Ku expozícii však môže dochádzať i v týchto krajinách, nakoľko rezíduá fungicídu môžu byť prítomné v dovážaných potravinách, ako sú produkty z paradajok, hrozňová šťava a jablkový džús.

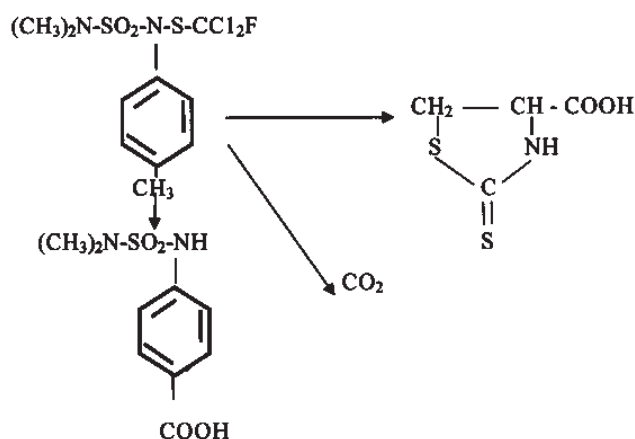
V krajinách, kde sa tolyfluanid ešte stále používa, prichádza u ľudí do úvahy aj dermálna a inhalačná expozícia, napríklad pri postreku ovocia (Tielemans a kol., 1999). U detí je hlavným zdrojom expozície jablková šťava obsahujúca rezíduá fungicídu (PFPC Newsletter Special Issue, 1999).

Po p.o. prijíme u potkanov je tolyfluanid rýchlo absorbovaný, metabolizovaný na DMST, neskôr na hlavný metabolit 4-(dimetylamino)sulfonylamino) benzoovú kyselinu, ktorá môže podliehať ďalšej demetylácii (The Pesticide Manual, 2000). V organizme nekumuluje, viac ako 90 % dávky je vylúčených do 48 h močom, malé množstvo žlčou a následne výkalmi.

Po jednorázovom podaní rádioaktívne značeného fungicídu potkanom v dávke 0,1–20 mg.kg⁻¹ bolo v priebehu 48 h vylúčených 50–60 % v moči a 20–30 % vo výkaloch. Po intraduodenálnom podaní dávky 0,5 mg.kg⁻¹ sa približne 6 % fungicídu vylúčilo žlčou. Po p.o. podaní 5 mg.kg⁻¹ ž. hm. bolo 16 % zlúčeniny prítomných vo vydychovanom vzduchu. V plazme sa najvyššia koncentrácia zistovala 2 h po aplikácii, v štítnej žľaze bolo prítomných 5 ppm na 1. a 1 ppm na 10. deň od podania (Weber a kol., 1977). Abbink a Weber (1988) podávali p.o. potkanom kmeňa Wistar rádioaktívne značený tolyfluanid v dávke 2 a 20 mg.kg⁻¹ ž. hm. Fungicíd bol rýchlo a temer úplne absorbovaný (> 95 %), najvyššia koncentrácia v plazme bola zaznamenaná po 1,5 h, v priebehu 48 h sa 75–80 % vylúčilo močom, 14–25 % výkalmi a 0,06 % vydychovaným vzduchom. Najvyššie koncentrácie fungicídu boli v pečeni a obličkách, nižšie v perirenálnom tuku, mozgu, gonádach a štítnej žľaze. Po 48 h predstavovalo množstvo tolyfluanidu v organizme menej ako 0,05 % prijatej dávky po podaní 2 mg.kg⁻¹ ž. hm. a menej ako 0,2 % po prijíme 20 mg.kg⁻¹ ž. hm.

Po jednorázovom i.v. a p.o. podaní rádioaktívne značeného tolyfluanidu v dávke 5 a 10 mg.kg⁻¹ ž. hm. potkanom bola hlavným metabolitom v moči tiazolidin-2-tion-4-uhličitá kyselina (TTC) a 8 h po i.v. podaní predstavovala 74 % a po p.o. podaní 50–63 %. Pôvodná zlúčenina nebola v moči detegovaná (APVMA, 2000). Pri dávke 20 mg.kg⁻¹ ž. hm. tvoril metabolit – 4-dimetylamino-sulfonyl-amino-benzoová kyselina v moči 90 % a vo výkaloch 70 % (Obr. 1; Ecker a Brauner, 1987).

V inej štúdii biotransformácie bol potkanom podaný tolyfluanid v jednorázovej dávke 2 a 100 mg.kg⁻¹ ž. hm. Približne 86–100 % dávky bolo vylúčených do 48 h, a to 56–80 % v moči, 12–36 % vo výkaloch a 0,48 % bolo prítomných v kadáveri. Hlavným metabolitom u oboch pohlaví bol DMST, ktorý bol neskôr metabolizovaný na



Obr. 1: Biotransformácia tolylfluanidu u potkanov (Ecker a Brauner, 1987)

dimethylaminosulfonylamino-benzoovú kyselinu (RNH 0166; 46–78 %), tá bola ďalej demetylovaná na 4-methylamino-benzoovú kyselinu (RNH 0416; 3–6 %). Vo výkaloch bol stanovený tolylfluanid (1–19 %), DMST (5–8 %), RNH 0166 (3–12 %) a RNH 0416 (< 1 %; EPA, 2002a).

Po podaní dávky 10 mg.kg⁻¹ ž. hm. tolylfluanidu laktujúcim kozám bolo exkretovaných 59,7 % prijatej dávky, z toho 49,4 % močom. V orgánoch, tkanivách, mlieku a v moči bolo detegovaných iba 2,8 % dávky a hlavným metabolitom bol N-[4-(dimethylaminosulfonylamido)-benzoyl]-glycín. Koncentrácie metabolitov boli vyššie v obličkách a v pečeni ako v telesnom tuku (EPA, 1997).

Sliepkam bola jednorázovo p.o. alebo počas troch dní podávaná dávka 5 mg tolylfluanidu.kg⁻¹ ž. hm., z ktorej sa vylúčilo 83,9 %, vo vajciach bolo prítomných iba 0,01 %, v tkanivách a v orgánoch

Tab. 3: Hodnoty LD₅₀/LC₅₀/EC₅₀ pre jednotlivé druhy zvierat (mg.kg⁻¹ ž. hm./mg.l⁻¹/M)

Druh	Pohlavie	Cesta vstupu	LD ₅₀	LC ₅₀	EC ₅₀	Autori
Myš	M	p.o.	> 1000	-	-	Kimmerle, 1968; The Pesticide Manual, 2000
Potkan	M	p.o.	> 2500	-	-	Kimmerle a Lorke, 1967
Potkan	M	Inhalačne (4 h)	-	0,26	-	Kimmerle a Lorke, 1967
Potkan	M	i.p.	20,2	-	-	Kimmerle, 1968
Potkan	F	i.p.	25,6	-	-	Kimmerle, 1968
Potkan	M, F	p.o.	> 5000	-	-	Heimann a Pauluhn, 1983; The Pesticide Manual, 2000
Potkan	M	i.p.	14,7	-	-	Heimann a Pauluhn, 1983
Potkan		i.p.	15,9	-	-	Heimann a Pauluhn, 1983
Potkan	M, F	i.d.	> 5000	-	-	Heimann a Pauluhn, 1983; The Pesticide Manual, 2000
Morča	F	p.o.	250–500	-	-	Kimmerle, 1968; The Pesticide Manual, 2000
Králík	M	p.o.	250–500	-	-	Kimmerle, 1968
Mačka	M, F	p.o.	> 500	-	-	Kimmerle, 1968
Ovca	M, F	p.o.	625–1250	-	-	Hoffmann, 1983
Prepelica japonská		p.o.	> 5000	-	-	The Pesticide Manual, 2000
Prepelica viržínska			> 2000	-	-	The Pesticide Manual, 2000
Pstruh dúhový			-	0,05 (96 h)	-	The Pesticide Manual, 2000; NRA, 2002
Jalec			-	0,06 (96 h)	-	The Pesticide Manual, 2000; NRA, 2002
Dafnia			-	0,71 (48 h)	-	The Pesticide Manual, 2000
Morské bezstavovce			-	-	213-2839x10 ⁻⁹ M	Bellas, 2006

0,18 %. Pôvodná zlúčenina nebola nájdená v žiadnej zo vzoriek. Hlavným metabolitom vo vajciach, svalovine a v pečeni bola 4-(dimetylamino-sulfonylamido)-benzoová kyselina a v tuku DMST (EPA, 1997).

Hodnoty akútnej perorálnej, dermálnej a inhalačnej toxicity LD_{50}/LC_{50} u jednotlivých druhov zvierat a hodnoty EC_{50} u morských bezstavovcov sú uvedené v Tab. 3. Tolyfluanid predstavuje ekotoxikologické riziko pre cicavce, ryby a užitočný hmyz (Schmuck a Berge, 1998; The Pesticide Manual, 2000; Merabet a kol., 2002; Klungen a Westrum, 2007).

Mechanizmus účinku tolyfluanidu nie je známy, no predpokladá sa, že ovplyvňuje aktivitu mnohých enzýmov reakciou s SH-skupinami a inhibuje predovšetkým respiráciu (The Pesticide Manual, 2000).

Klinické príznaky akútnej, subchronickej a chronickej otravy fungicídmi boli popísané u ľudí a rôznych druhov zvierat. Prvými príznakmi expozície u ľudí sú zvyčajne zmeny v správaní a schopnosti učenia sa, ktoré sa objavujú skôr ako dysfunkcie štítnej žľazy (PFPC Newsletter Special Issue, 1999).

Po akútnej p.o. expozícii tolyfluanidu u potkanov boli sledované zmeny správania, ataxia a dyspnoe. U myší, morčiat a mačiek došlo ku zhoršeniu celkového stavu, u oviec ku anorexii, hnačke a výraznej slabosti končatín (Heimann a Pauluhn, 1983; APVMA, 2000). I.p. expozícia mala za následok zmeny správania sa, ataxiu, potácanie, závraty, spastické kŕče a zväčšenie dutiny brušnej. Aplikácia tolyfluanidu na kožu králikov v dávke do $500 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{deň}^{-1}$ počas 14 dní nevyvolala systemický účinok, no viedla ku slabému podráždeniu povrchu kože (erytém, šupinatienie a zhrubnutie), ktoré vymizli do 2 týždňov od ukončenia expozície. Dermálna expozícia dávkam do $225 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{deň}^{-1}$ počas 3 mesiacov vyvolala u potkanov iba zníženie hmotnostných prírastkov (PFPC Newsletter Special Issue, 1999). Po aplikácii do konjunktiválneho vaku fungicíd vyvolal silné sčervenanie a opuch spojiviek, ktoré vymizli do 14 dní (Pauluhn, 1984).

Po 3-mesačnej subchronickej p.o. aplikácii tolyfluanidu potkanom v dávke 225 mg.kg^{-1} ž. hm. bolo zistené iba zníženie hmotnostných prírastkov (APVMA, 2000). V inej 3-mesačnej štúdiu u potkanov exponovaných p.o. dávkam 0; 150; 500; 1500 a 4500 ppm neboli zaznamenané zmeny v správaní, hmotnosti, mortalite, biochemických ukazovateľoch a morfológické poškodenia orgánov (Bomhard a Schilde, 1976). Dávka do 9000 mg.kg^{-1} tolyfluanidu v krmive (t.j. približne 450 mg.kg^{-1} ž. hm.) podávaná počas 13 týždňov vyvolala u potkanov ľahké funkčné zmeny štítnej žľazy, mierne ovplyvnenie aktivity pečeneých enzýmov, pokles hmotnostných prírastkov a u samcov zvýšenie hmotnosti pečene. Všetky zmeny vymizli do 4 týždňov od ukončenia expozície (PFPC Newsletter Special Issue, 1999; APVMA, 2000). Psom plemena Beagle boli p.o.

podávané dávky 0; 330; 1000 a 3000 ppm tolyfluanidu počas 3 mesiacov. V skupine, ktorej bola podávaná najvyššia dávka, bolo sledované zhoršenie celkového stavu so zníženou fyzickou aktivitou, zníženie príjmu krmiva, hmotnostných prírastkov, zvýšenie aktivity alkalického fosfatázy v sére a hmotnosti pečene (Hoffmann a Mírea, 1974). V inej štúdiu boli psy exponované p.o. tolyfluanidu prítomnému v želatínových kapsulách v dávke 0; 2,5; 12,5 a $62,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ počas 33 týždňov a 125 mg.kg^{-1} na 34.–52. týždeň. U zvierat neboli zaznamenané klinické príznaky otravy ani zmeny v správaní. U samíc vyvolala najvyššia dávka zníženie hmotnostných prírastkov, vracanie, glukozúriu a proteínúriu, zvýšenie aktivity alaninaminotransferázy a glutamátdehydrogenázy v sére a koncentrácie močoviny, kreatinínu, ako aj mierne zníženie koncentrácie draslíka. Prítomné boli aj histologické zmeny v kortikálnych tubuloch obličiek (von Keutz a Nash, 1986; PFPC Newsletter Spec. Issue, 1999).

Chronická štúdia bola vykonaná na myšiach, potkanoch a psoch. Zvieratá prijímali dávky 750; 400 a $62,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ ž. hm. na deň. U myší a potkanov bola pri najvyššej dávke fungicídu pozorovaná anorexia a zníženie telesnej hmotnosti. U všetkých druhov zvierat bol zaznamenaný hepatotoxický a nefrotoxický účinok fungicídu manifestovaný zvýšenou aktivitou alkalického fosfatázy (myši, psy), alaninaminotransferázy (psy), zvýšením hmotnosti pečene a obličiek (potkany), zvýšením hladiny močoviny a kreatinínu v krvi a glukózy v moči (psy). U potkanov došlo ku zmenám v cytoplazme hepatocytov, vakuolizácii a tukovej degenerácii, u myší ku hepatocelulárnej hypertrofii. U psov sa zisťovali mikroskopické zmeny v obličkách (dilatácia, sploštenie, deskvamácia epitelu; EPA, 1997).

V inej chronickej štúdiu boli potkany kmeňa Wistar počas 2 rokov exponované 0; 300; 1500 a 7500 ppm tolyfluanidu v krmive. Najvyššia dávka u nich vyvolala zníženie príjmu krmiva, hmotnosti, zmeny v správaní, celkovom stave a biochemických parametroch. Pri dávkach 1500 a 7500 ppm došlo u oboch pohlaví ku zhrubnutiu lebečných kostí a u samcov ku predĺženiu rezákov (Krötlinger a Löser, 1982; APVMA, 2000).

Účinky tolyfluanidu na reprodukciu a teratogenitu študoval Löser (1980) v dvojgeneračnom teste u potkanov exponovaných dávkam 0; 300; 1500 a 7500 ppm v krmive. Dávky do 1500 ppm neovplyvnili reprodukciu a u mláďat neboli sledované malformácie. Na strane druhej v inej štúdiu boli u potkanov pri dávkach nad 600 ppm sledované toxické účinky u rodičov a pri dávkach do $1000 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{deň}^{-1}$ došlo ku zníženiu hmotnosti placenty a plodu, početnosti vrhu, zmene hmotnosti orgánov a hyperostóze lebky (EPA, 1997). Po p.o. expozícii gravidných králičíc dávkam do $70 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{deň}^{-1}$ došlo ku zvýšeniu mortality plodov (EPA, 1997). U myší exponovaných dávkam 0; 100; 300; 1000 mg.kg^{-1} ž. hm. na 6.–15. deň gestácie tolyfluanid nevykazoval účinky

na reprodukciu a teratogenitu (Machemer, 1976). Na strane druhej, Domaracký a kol. (2007) zaznamenali signifikantné zmeny vo vývoji preimplantačných embryí u exponovaných samíc myši.

Cytotoxický účinok tolylfluuanidu bol zaznamenaný v baktériovom teste génových mutácií, a to u všetkých kmeňov pri $> 8 \mu\text{g}/\text{platňu}$ za prítomnosti mikrozómovej frakcie pečene S9, fungicíd precipitoval z roztokov pri koncentrácii $5000 \mu\text{g}/\text{platňu} \pm \text{S9}$. Slabo klastogénny bol v bunkách V 79 čínskeho škrečka v prítomnosti S9 frakcie. V bunkových kultúrach cicavcov bol sledovaný cytotoxický účinok tolylfluuanidu v koncentrácii $1\text{--}10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (-S9) a $5\text{--}10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (+S9; EPA, 2002b). Holovská a kol. (2007) sledovali po expozícii fungicídu zmeny proliferácie aktivity buniek rôznych kultúr. Signifikantné zmeny boli zaznamenané hlavne u RK13 buniek, a to pri koncentráciách $10^{-1}\text{--}10^{-4}$ M ($p < 0,001$) s $\text{IC}_{50} = 10^{-4.33}$ M.

Výsledky štúdií mutagénnych účinkov tolylfluuanidu pre jednotlivé testovacie systémy sú uvedené v Tab. 4. Genotoxickosť tolylfluuanidu bola hodnotená za *in vitro* a *in vivo* podmienok. V niekoľkých *in vitro* testoch (štúdiu chromozómových aberácií v humánných lymfocytoch, teste mutácií v bunkách myšacieho lymfómu) bol výsledok pozitívny (Tian a kol., 2003), čo poukázalo na možný klastogénny účinok fungicídu. V iných *in vitro* testoch (vrátane štúdií reverzných mutácií u kmeňov *Salmonella typhimurium* a *Saccharomyces cerevisiae*, v ovariálnych bunkách čínskeho škrečka a indukcie DNA opravných procesov v primárnych bunkových kultúrach potkaních hepatocytov) sa nezistila jeho genotoxická aktivita. Väčšina *in vivo* testov so somatickými bunkami bola negatívna, napríklad *in vivo* cytogenetická štúdia v kostnej dreni myši (Herbold, 2004). Na strane druhej, zvýšenie frekvencie chromozómových aberácií a mikrojadier bolo zaznamenané u subchronicky exponovaných oviec (Šutiaková a kol., 2006). V testoch chromozómových aberácií v kostnej dreni a pohlavných bunkách čínskeho škrečka sa nepreukázala jeho genotoxickosť (Cristaldi a kol., 2004). Keďže u prokaryotov a eukaryotov vykazoval mutagénny účinok iba v *in vitro* testoch, nie však *in vivo*, EPA (1997) ho uvádza ako negenotoxický. Metabolity tolylfluuanidu neprejavovali genotoxický účinok v Amesovom teste.

EPA (2002b) klasifikuje tolylfluuanid ako možný karcinogén skupiny C, pričom vychádza z výskytu benígnych nádorov štítnej žľazy v chronickej štúdiu u potkanov. Ďalšími cieľovými orgánmi jeho pôsobenia u zvierat sú kostrový systém (kosti, zuby) a pečeň. Pri štúdiu karcinogenity boli myši a potkany exponované 0; 200; 1000 a 5000 ppm tolylfluuanidu počas 104 týždňov. U myši nebol sledovaný výskyt nádorov (Mohr, 1982). U potkanov fungicíd ovplyvnil hladiny hormónov štítnej žľazy a zvýšil výskyt hyperplastických a neoplastických lézií štítnej žľazy, hlavne adenómov.

Tolylfluuanid nevykazoval u zvierat priamu onkogénnu aktivitu a autori uvádzajú, že tyroidné nádory vznikajú sekundárne ako dôsledok zmeny v metabolizme jódu a rovnováhe tyroidného hormónu. Tolylfluuanid sa svojou štruktúrou nepodobá inými tyroidálnym karcinogénom a jeho endokrinný účinok sa viaže iba na štítnu žľazu (Mohr, 1982; EPA, 1997; PFPC Newsletter Special Issue, 1999). Metabolit TTCA (tiazolidin tiouhličitá kyselina) bol testovaný na interakciu s hormónmi štítnej žľazy a vykazoval podobný účinok ako niektoré antityroidné liečivá (EPA, 2002a).

Vplyv subchronickej expozície tolylfluuanidu na humorálnu a bunkami sprostredkovanú imunitnú odpoveď u oviec študovali Kovalkovičová a kol. (2005). Zvieratá boli denne exponované dávkou $1/20 \text{LD}_{50}$ fungicídu počas 90 dní a na 45. deň imunizované 2 ml inaktivovanej vakcíny Bodibion inj. a.u.v. proti Q-horúčke obsahujúcej inaktivované baktérie *Coxiella burnetti*. Zaznamenané bolo signifikantné zníženie indexu metabolickej aktivity fagocytov periférnej krvi a proliferácie lymfocytov aktivovaných fytohemaglutinínom.

Ako podklad pre výpočet ADI (Acceptable daily intake) u ľudí slúžili výsledky dvojgeneračnej štúdie u potkanov, kde hodnota NOAEL (No Observable Adverse Effect Level) predstavovala $12 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ž. hm. na deň (Young a Fickbohm, 2004), tá sa predelila bezpečnostným faktorom 100, teda ADI tolylfluuanidu pre človeka je $0,1 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ž. hm. na deň.

ZÁVER

Intenzifikácia rastlinnej a živočíšnej výroby sa ani v najbližších rokoch nezaobíde bez použitia chemických protektívnych látok – pesticídov. Ich rozsiahle používanie je spojené s rizikom akútnych, ale hlavne chronických intoxikácií zvierat a cez potravinový reťazec aj s negatívnym ovplyvnením zdravia človeka. Je preto urgentnou požiadavkou poznať charakteristiku každého v súčasnosti používaného, ako aj do poľnohospodárskej praxe novodoporučovaného pesticídu. Pesticídy obsahujúce vo svojej molekule fluór predstavujú riziko ovplyvnenia hormonálnej funkcie organizmu, hlavne činnosti štítnej žľazy. Jedným z nich je fungicíd tolylfluuanid. Na základe dostupných literárnych údajov je možné konštatovať, že má nasledovné účinky:

1. počas krátkodobej perorálnej expozície vyvoláva narušenie funkcie štítnej žľazy, zvýšenie hmotnosti pečene, zníženie hladiny pečenej enzýmov u potkanov a psov a mierne histopatologické zmeny v obličkách;
2. po dlhodobejšej expozícii sa zisťuje zvýšená hladina fluoridov v organizme;
3. nemá genotoxický, teratogénny ani karcinogénny účinok;
4. nevykazuje účinky na reprodukciu;

Tab. 4: Výsledky štúdií mutagénnych účinkov tolylfuamidu pre jednotlivé testovacie systémy

Test	Testovací systém	Koncentrácia tolylfuamidu	Čistota	Výsledok	Autori
Amesov test (s aktiváciou a bez)	<i>S. typhimurium</i> TA-98, 100, 1537	3,15–1000 µg/plaňa, rozpustený v DMSO	100 %	Slabo pozitívny	Oesch, 1977
Amesov test (s aktiváciou a bez)	<i>S. typhimurium</i> TA-98, 100, 1537	4–2500 µg/plaňa, rozpustený v DMSO	100 %	Slabo pozitívny	Herbold, 1979
Test reverzných mutácií <i>in vitro</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Neaktivované: 1–200 µg.ml ⁻¹ Aktivované: 1–100 µg.ml ⁻¹	99,1 %	Negatívny	Hoorn, 1984
Test génových mutácií (HGPR- test) <i>in vitro</i>	Somatické bunky cicavcov (V79)	Neaktivované: 4–40 ng.ml ⁻¹ Aktivované: 300–3000 ng.ml ⁻¹	98,5 %	Negatívny	Heidemann a Miltenburger, 1987
Test génových mutácií (HGPR- test) <i>in vitro</i>	Bunky ovárií čínskeho škrečka	Neaktivované: 0,5–6 µg.ml ⁻¹ Aktivované: 3–30 µg.ml ⁻¹	98,5 %	Negatívny	den Boer, 1987
Test mutácií <i>in vitro</i>	Bunky myšieho lymfómu	Neaktivované: 25–300 ng.ml ⁻¹ Aktivované: 500–7500 ng.ml ⁻¹	99,1 %	Pozitívny	Hoorn, 1985
Cytogenetický test <i>in vitro</i>	Humánne lymfocyty	0,1–10 µg.ml ⁻¹ (aktivované a neaktivované)	99,2 %	Pozitívny	Herbold, 1984b
Mikrojadrový test	Myši (kmeň NMRI)	2x250 a 2x500 mg.kg ⁻¹ (p.o. 24 h)	93,4 %	Negatívny	Herbold, 1980
Test dominantných letálnych mutácií	Myši (kmeň NMRI)	4000 mg.kg ⁻¹ p.o. (mortalita: 5/50); 8000 mg.kg ⁻¹ p.o. (mortalita: 12/50)	98,8 %	Negatívny	Herbold, 1986
Cytogenetický test <i>in vivo</i>	Kostná dreň čínskeho škrečka	4000 mg.kg ⁻¹ p.o.	99,7 %	Negatívny	Herbold, 1983
Cytogenetický test <i>in vivo</i>	Spermatogonia čínskeho škrečka	2x250 a 2x500 mg.kg ⁻¹ (p.o. 24 h)	93,1 %	Nepreukazný	Herbold, 1984a
Cytogenetický test <i>in vivo</i>	Zárodčné bunky myši (kmeň NMRI)	500–5000 mg.kg ⁻¹ ž. hm. p.o.	97,9 %	Negatívny	Völkner, 1988a
Test sesterských chromatidových výmen	Kostná dreň myši (kmeň NMRI)	500–5000 mg.kg ⁻¹ p.o.	97,9 %	Negatívny	Völkner, 1988b
Spot test u cicavcov	Myši	1750–7000 mg.kg ⁻¹ p.o.	98,4 %	Negatívny	Herbold, 1988

5. predstavuje ekotoxikologické riziko pre cicavce, ryby a užitočný hmyz;
6. v pôde, podzemnej a povrchovej vode sa môže vyskytovať metabolit dimetylsulfamid, ktorý sa pri procese úpravy pitnej vody (ozonizovaním) premieňa na zdraviu škodlivý nitrosamín.

Práca je podporovaná Vedeckou grantovou agentúrou Ministerstva školstva SR a Slovenskej akadémie vied (Grant Vega 1/4375/07 a 1/0545/08) a Národným referenčným laboratóriom pre pesticídy Univerzity veterinárskeho lekárstva v Košiciach.

LITERATÚRA

- ABBINK, J. – WEBER, H. 1988. Phenyl-UL-14C-tolyfluanid: investigation of the biokinetic behaviour in the rat. Unpublished report No. PF2989, 21 April 1988, amended 10 November 2000, from Bayer AG, Institute of Toxicology, Wuppertal, Germany, Submitted to WHO by Bayer AG, Bayerwerk, Germany. Available on internet: <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2002pr13.htm>.
- APVMA 2000. Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. Public Release Summary on evaluation of the new active tolyfluanid in the product Euparen Multi 50 WG Fungicide, 2000, 24 p.
- BELLAS, J. 2006. Comparative toxicity of alternative antifouling biocides on embryos and larvae of marine invertebrates. In: *Sci. Total Environ.*, vol. 367, 2006, no. 2-3, p. 573-585.
- BHATNAGAR, M. – RAO, P. – SUSHMA, J. – BHATNAGAR, R. 2002. Neurotoxicity of fluoride: neurodegeneration in hippocampus of female mice. In: *Ind. J. Experim. Biol.*, vol. 40, 2002, no. 5, p. 546-554.
- BIRKNER, E. – GRUCKA-MAMCZAR, E. – ZALEJSKA-FIOLKA, J. – CHLUBEK, D. – KASPERCZYK, S. – STAWIARSKA-PIETA, B. – BLASZCZYK, U. 2006. Influence of sodium fluoride and caffeine on the kidney function and free-radical processes in that organ in adult rats. In: *Biol. T. Elem. Res.*, vol. 109, 2006, no. 1., p. 35-48.
- den BOER, W.C. (1987): Mutagenicity test on KUE 13183b in the CHO/HGPRT forward mutation assay. Unpublished report No. R4204, 24 August 1987 from Hazleton Biotechnologies, The Netherlands. Submitted to WHO by Bayer AG, Bayerwerk. Available on internet: <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2002pr13.htm>.
- BOMHARD, E. – SCHILDE, B. 1976. KUE 13183b - Subchronic toxicological study in rats (feeding experiment over 3 months). Unpublished report No. 5929, 20 February 1976 from Bayer AG, Toxicology Institute, Wuppertal, Germany, Submitted to WHO by Bayer AG, Bayerwerk, Germany. Available on internet: <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2002pr13.htm>.
- BRUGMANS, W. 1999. New possibilities to control fruit rot (*Botrytis cinerea*) in woody small fruits. In: *Fruittelt-nieuws*, vol. 12, 1999, no. 3, p. 18-20.
- BRYK, H. 2002. Usefulness of Euparen M 50 WP and Mythos 300SC for the control of bull's eye rot of apples (*Pezizula* spp.). In: *Progress-in-Plant-Protection*, vol. 42, 2002, no. 2, p. 886-888.
- CRISTALDI, M. – IERADI, A. L. – UDROIU, I. – ZILLI, R. 2004. Comparative evaluation of background micronucleus frequencies in domestic mammals. In: *Mutat. Res.*, vol. 559, 2004, no. 1-2, p. 1-9.
- DOMARACKÝ, M. – REHÁK, P. – LEGÁTH, J. – KOPPEL, J. 2007. Effects of fungicide Euparen Multi (tolylfluanid) on development of preimplantation embryos in mouse. In: *Acta Vet.*, Brno, roč. 76, 2007, p. 209-214.
- ECKER, W. – BRAUNER, A. 1987. Biotransformation of (ring-U-14C) tolyfluanid by the rat following oral administration. Unpublished report No. PF2826, 14 July 1987 from Bayer Ag Toxicology, Wuppertal, Germany. Submitted to WHO by Bayer AG, Bayerwerk, Germany. Available on internet: <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2002pr13.htm>.
- EPA: FEDERAL REGISTER 1997. Notice of filing of pesticide petitions, vol. 62, 1997, no. 154, p. 42980-42986.
- EPA. PESTICIDE FACT SHEET 2002a. Tolyfluanid., 2002, p. 1-18.
- EPA: FEDERAL REGISTER 2002b. Tolyfluanid; Pesticide Tolerance, vol. 67, 2002, no. 186, p. 60130-60142.
- FUSSELL, R. J. – ADDIE, K. J. – REYNOLDS, S. L. – WILSON, M. F. 2002. Assessment of the stability of pesticides during cryogenic sample processing. 1. Apples. In: *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50, 2002, no. 3, p. 441-448.
- GOULART, A.C.P. (2002): Effect of cotton seed dressing with fungicides for the control of seedling damping-off caused by *Rhizoctonia solani*. In: *Fitopatol. bras.*, vol. 27, 2002, no. 4, p. 399-402.
- HEIDEMANN, A. – MILTENBURGER, H. G. 1987. KUE 13183b, detection of gene mutations in somatic mammalian cells in culture: HGPRT-test with V79 cells. Unpublished report No. R4103, 8 May 1987 from Laboratory for Mutagenicity Testing. Technical University, Darmstadt, Germany. Submitted to WHO by Bayer AG, Bayerwerk, Germany. Available on internet: <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2002pr13.htm>
- HEIMANN, K.G. – PAULUHN, J. 1983. KUE 13183B (tolylfluanid, Euparen M active ingredient). Study for acute toxicity. Unpublished report No. 11383, 5 January 1983 from Institute of Toxicology, Bayer AG. Submitted to WHO by Bayer AG, Bayerwerk, Germany. Available on internet: <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2002pr13.htm>
- HERBOLD, B. 1979. KUE 13183b – Salmonella/microsome test for point mutagenic effects. Unpublished report No. 8265, 30 March 1979 from Institute for Toxicology, Bayer AG. Submitted to WHO by Bayer AG, Bayerwerk, Germany. Available on internet: <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2002pr13.htm>
- HERBOLD, B. 1980. KUE 13183b (tolylfluanid) - Micronucleus test on the mouse to evaluate for mutagenic effect. Unpublished report No. 9149, 13 May 1980 from Institute of Toxicology, Bayer AG. Submitted to WHO by Bayer AG, Bayerwerk, Germany. Available on internet: <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2002pr13.htm>
- HERBOLD, B. 1983. KUE 13183b (c.n. tolyfluanid/Euparen M/Preventol VP oc 3017) - Cytogenetic study of the Chinese hamster's bone marrow *in vivo* to evaluate for mutagenic effect. Unpublished report No. 11792, 10 May 1983 from Institute of Toxicology, Bayer AG. Submitted to WHO by

- Bayer AG, Bayerwerk, Germany. Available on internet: <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2002pr13.htm>
- HERBOLD, B. 1984a. KUE 13183b (c.n. tolylfluanid) - Cytogenetic study of the spermatogonia of the Chinese hamster *in vivo* to evaluate for mutagenic effect. Unpublished report No. 12739, 8 June 1984 from Institute of Toxicology, Bayer AG. Submitted to WHO by Bayer AG, Bayerwerk, Germany. Available on internet: <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2002pr13.htm>.
- HERBOLD, B. 1984b. KUE 13183b (c.n. tolylfluanid) - Cytogenetic study with human lymphocyte cultures *in vitro* to evaluate for harmful effect on chromosomes. Unpublished report No. 12836, 6 August 1984 from Institute of Toxicology, Bayer AG. Submitted to WHO by Bayer AG, Bayerwerk, Germany. Available on internet: <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2002pr13.htm>.
- HERBOLD, B. 1986. KUE 13183b (c.n. tolylfluanid) - Dominant lethal test on the male mouse to evaluate for mutagenic effect. Unpublished report No. 15017, 26 August 1986 from Institute of Toxicology, Bayer AG. Submitted to WHO by Bayer AG, Bayerwerk, Germany. Available on internet: <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2002pr13.htm>
- HERBOLD, B. 1988. KUE 13183b (c.n. tolylfluanid) - Spot test on cross-bred C5781/6JxT stock mouse fetuses to evaluate for induced somatic changes in the genes of the coat pigment cells. Unpublished report No. 16752, 31 May 1988 from Institute of Toxicology, Bayer AG. Submitted to WHO by Bayer AG, Bayerwerk, Germany. Available on internet: <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2002pr13.htm>
- HERBOLD, B. 2004. KUE 13183B - *In vivo* bone marrow cytogenetic study using male mice. Bayer Health Care AG. Unpublished report No. AT01134, 8 April 2004, Submitted to WHO by Bayer AG, Bayerwerk, Germany. In: Final addendum to the Draft Assessment Report (DAR) - public version - Initial risk assessment provided by the rapporteur Member State Finland for the existing active substance. Tolyfluanid of the second stage of the review programme referred to in Article 8(2) of Council Directive 91/414/EEC. February 2005.
- HOFFMANN, K. - MIREA, D. 1974. KUE 13183b (tolylfluanid/Euparen M) - Subchronic toxicity study on dogs (13-week feeding experiment). Unpublished report No. 4957, 12 September 1974 from Institute of Toxicology, Bayer AG. Submitted to WHO by Bayer AG, Bayerwerk, Germany. Available on internet: <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2002pr13.htm>.
- HOFFMANN, K. 1983. KUE 13183b - Acute toxicity to the sheep after oral administration. Unpublished report No. 11975, 2 August 1983 from Institute of Toxicology, Bayer AG. Submitted to WHO by Bayer AG, Bayerwerk, Germany. Available on internet: <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2002pr13.htm>
- HOLOVSKÁ, V. - PISTL, J. - KOVALKOVIČOVÁ, N. 2007. *In vitro* effect of pesticides (dichlofluanid, endosulfan, simazine, tolylfluanid and triallate) on proliferative activity of animal derived cell cultures. In: *Acta Biol. Hungarica*, vol. 58, 2007, no. 1, p. 61-74.
- HONGSLO, C. F. - HONGSLO, J. K. - HOLLAND, R. I. 1980. Fluoride sensitivity of cells from different organs. In: *Acta Pharmacol. Toxicol.*, vol. 46, 1980, no. 1, p. 73-77.
- HOORN, A.J.W. 1984. Mutagenicity evaluation of KUE 13183b (c.n. tolylfluanid) in the reverse mutation induction assay with *Saccharomyces cerevisiae* strains S138 and S211 α . Unpublished report No. R3060, 29 August 1984 from Litton Bionetics, the Netherlands. Submitted to WHO by Bayer AG, Bayerwerk, Germany. Available on internet: <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2002pr13.htm>
- HOORN, A.J.W. 1985. Mutagenicity evaluation of KUE 13183b (c.n. tolylfluanid) in the mouse lymphoma forward mutation assay. Unpublished report No. R3192, 2 February 1985 from Litton Bionetics, the Netherlands. Submitted to WHO by Bayer AG, Bayerwerk, Germany. Available on internet: <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2002pr13.htm>.
- KARAOZ, E. - ONCU, M. - GULLE, K. - KANTER, M. - GULTEKIN, F. - KARAOZ, S. - MUMCU, E. 2004. Effect of chronic fluorosis on lipid peroxidation and histology of kidney tissues in first- and second-generation rats. In: *Biol. T. Elem. Res.*, vol. 102, 2004, no. 1-3, p. 199-208.
- von KEUTZ, E. - NASH, G. 1986. KUE 13183b/Chronic toxicity study to dogs after oral administration (12-month capsule study). Unpublished report No. 12999. Submitted to WHO by Bayer AG, Bayerwerk, Germany. <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v88pr10.htm>
- KIMMERLE, G. - LORKE, D. 1967. Toxicological studies on the active ingredient BAY 49854. Unpublished report No. 323, 17 May 1967 from Institute of Toxicology, Bayer AG. Submitted to WHO by Bayer AG, Bayerwerk, Germany. Available on internet: <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2002pr13.htm>
- KIMMERLE, G. 1968. BAY 49854 - Toxicological studies. Unpublished report No. 832, 10 June 1968 from Bayer AG. Submitted to WHO by Bayer AG, Bayerwerk, Germany. <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2002pr13.htm>
- KLINGEN, I. - WESTRUM, K. 2007. The effect of pesticides used in strawberries on the phytophagous mite *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and its fungal natural enemy *Neozygites floridana* (Zygomycetes: Entomophthorales). In: *Biological Control*, vol. 43, 2007, no. 2, p. 222-230.
- KOVALKOVIČOVÁ, N. - PISTL, J. - ELIAŠ, D. - JACKOVÁ, A. - NOVOTNÝ, J. - HLINČÍKOVÁ, S. - LEGÁTH, J. - RÉVAJOVÁ, V. - KOVÁČ, G. 2005. Influence of subchronic exposure to fungicide tolylfluanid on humoral and cell-mediated immune parameters in sheep immunized with *Coxiella* vaccine. In: *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, vol. 49, 2005, no. 3, p. 287-292.
- KRÖTLINGER, F. - LÖSER, E. 1982. KUE 13183b (tolylfluanid/Euparen M-active ingredient) - Chronic toxicological study in rats (feeding for two years). Unpublished report No. 10978, 30 June 1982 from Institute of Toxicology, Bayer AG. Submitted to WHO by Bayer AG, Bayerwerk, Germany. Available on internet: <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2002pr13.htm>
- LANGOWSKA, B. 2002. Application of column extraction technique and gas chromatography method for determination the residue of fungicides in strawberry. In: *Progress-in-Plant-Protection*, vol. 42, 2002, no. 2, p. 761-764.
- LÖSER, E. 1980. KUE 13183B (Euparen M-active ingredient) - Generation study with rats. Unpublished report No. 9419, 29 August 1980 from Institute of Toxicology, Bayer AG. Submitted to WHO by Bayer AG, Bayerwerk, Germany. <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2002pr13.htm>.

- LEHOTAY, S. J. – O'NEIL, M. – TULLY, J. – GARCIA, A. V. – CONTRERAS, M. – MOL, H. – HEINKE, V. – et al. 2007. Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: Collaborative study. In: *J. AOAC Int.*, vol. 90, 2007, no. 2, p. 485-520.
- MACHEMER, L. 1976. KUE 13183B - Studies on embryotoxic and teratogenic effects on rats after oral administration. Unpublished report No. 5888, 10 February 1976 from Institute of Toxicology, Bayer AG. Submitted to WHO by Bayer AG, Bayerwerk, Germany. Available on internet: <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2002pr13.htm>
- MERABET, H. – DUTZMANN, S. – HAEUSER-HAHN, I. – BYLEMANS, D. – CREEMERS, P. – KNIEHASE, U. – OHS, P. – STUEBLER, D. – STUMPF, N. 2002. Euparen® Multi (tolylfluanid), a broad spectrum fungicide for Rubus and Ribes fruit crops. In: *Acta Hort.* (ISHS), vol. 585, 2002, no. 1, p. 381-386.
- MOHR, U. 1982. KUE 13183b - Study for cancerogenic effect on NMRI-mice (feeding study for 104 weeks). Appendix: histopathological individual findings. Unpublished report No. R. 2225, 22 July 1982 from department of Experimental Pathology, Medizinische Hochschule, Hannover, Germany. Submitted to WHO by Bayer AG, Bayerwerk, Germany. Available on internet: <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2002pr13.htm>
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL 2006. Fluoride in Drinking Water. A Scientific Review of EPA's Standards. Washington D.C. : National Academies Press, 2006, 530 p. ISBN 0-309-10129-8.
- NOWACKA, A. 2002. Residues of the most frequently applied fungicide in vegetables and fruit (1997–2001). In: *Progress-in-Plant-Protection*, vol. 42, 2002, no. 1, p. 118-130.
- NRA 2002. National Registration Authority for Agricultural and Veterinary Chemicals, Tolyfluanid. Public Release Summary. Canberra. 1 June 2002.
- OESCH, F. 1977. KUE 13183b/Ames Test for Euparen M. Institute of Biochemical pharmacology, University of Mainz. Unpublished report from November 10. Submitted to WHO by Bayer AG, Bayerwerk, FRG. 1977. Wuppertal, Germany, Submitted to WHO by Bayer AG, Bayerwerk, Germany. Available on internet: <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v88pr10.htm>
- PAULUHN, J. 1984. KUE 13183bB (Euparen M active ingredient). Study for irritant/corrosive effect on skin and eye (rabbit). Unpublished report No. 1236, 6 January 1984 from Institute of Toxicology, Bayer AG. Submitted to WHO by Bayer AG, Bayerwerk, Germany. Available on internet: <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2002pr13.htm>.
- PFPC NEWSLETTER SPECIAL ISSUE 1999. Hidden Sources of Fluoride – Pesticides, 1999, p. 1-8.
- PFPC NEWSLETTER 7 (2000): Flouride and Thyroid Cancer, 2000, p. 1-10.
- SCHMUCK, R. – BERGE, J. 1998. Effects of Euparen M on honey bees and selected beneficial arthropods – information about the use of the pesticide during blossom and in IPM cultures. In: *Pflanzenschutz-Nachrichten-Bayer*, vol. 50, 1998, no. 3, p. 237-252.
- SOLARSKA, E. 1999. Efficacy of fungicide Euparen M 50WP and M50WG in hop production against *Pseudoperonospora humuli*. In: *Progress-in-Plant-Protection*, vol. 39, 1999, no. 2, p. 889–891.
- SZPYRKA, E. – SADLO, S. 2002. Comparison of disappearance of dichlofluanid and tolylfluanid residues in green house tomato. In: *Progress-in-Plant-Protection*, vol. 42, 2002, no. 2, p. 742-744.
- ŠTEPÁN, R. – TICHÁ, J. – HAJŠLOVÁ, J. – KOVALCZUK, T. – KOCOUREK, V. 2005. Baby food production chain: pesticide residues in fresh apples and products. In: *Food Addit. Contam.*, vol. 22, 2005, no. 12, p. 1231-1242.
- ŠUTIÁKOVÁ, I. – KOVALKOVIČOVÁ, N. – PISTL, J. – NOVOTNÝ, J. – LEGÁTH, J. – KOVÁČ, G. – HLINČÍKOVÁ, S. – ŠUTIÁK, V. 2006. Chromosomal aberrations and frequency of micronuclei in sheep subchronically exposed to the fungicide Euparen Multi (tolylfluanid). In: *Ecotoxicol. Environ. Safety*, vol. 64, 2006, no. 3, p. 312-320.
- THE PESTICIDE MANUAL 2000. C.D.S. Tomlin; BCPC Publications, Berkshire, UK, 2000, 1276 p. ISBN 1-901396-12-6.
- TIAN, Y. – ISHIKAWA, H. – PIAO, F. Y. – YAMAMOTO, H. – YAMAUCHI, T. – DUAN, Z. W. – ZHANG, Y. M. – MA, M. Y. – CUI, J. S. 2003. Micronucleus assay of human lymphocytes: a comparison of cytokinesis-block and human capillary blood lymphocytes methods. In: *J. Occup. Health*, vol. 45, 2003, no. 6, p. 408-409.
- TICHÁ, J. – HAJŠLOVÁ, J. – KOVALCZUK, T. – JECH, M. – HONZICEK, J. – KOCOUREK, V. – LANSKÝ, M. – KLOUTVOROVÁ, J. – FALTA, V. 2007. Safe apples for baby-food production: Survey of pesticide treatment regimes leaving minimum residues. In: *Food Addit. Contam.*, vol. 24, no. 6, p. 605-620.
- TIELEMANS, E. – LOUWERSE, E. – DE COCK, J. – BROWER, D. – ZIELHUIS, G. – HEEDERIK, D. 1999. Exposure to fungicides in fruit growing: re-entry time as a predictor for dermal exposure. In: *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, vol. 60, 1999, no. 6, p. 789-793.
- ÚRADNÝ VESTNÍK EURÓPSKEJ ÚNIE 2007. Rozhodnutie Komisie zo 4. mája 2007, ktorým sa ustanovujú ochranné opatrenia v súvislosti s použitiami prípravkov na ochranu rastlín obsahujúcich tolylfluanid, ktoré vedú ku kontaminácii pitnej vody [oznámené pod číslom K(2007) 1865] (text s významom pre EHP) (2007/322/ES). L 119/49, 9.5.2007.
- VELAZQUEZ-GUADARRAMA, N. – MADRIGAL-BUJADAR, E. – MOLINA, D. – CHAMORRO, G. 2005. Genotoxic evaluation of sodium fluoride and sodium perborate in mouse bone marrow cells. In: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 74, 2005, no. 3, p. 566-572.
- VÖLKNER, W. 1988a. Mouse germ-cell cytogenetic assay with KUE 13183b. Unpublished report No. 4485, 1 July 1988 from Cytotest Cell Research GmbH & Co. KG, Germany. Submitted to WHO by Bayer AG, Bayerwerk, Germany. <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2002pr13>
- VÖLKNER, W. 1988b. Sister chromatid exchange assay in bone marrow cells of the mouse with KUE 13183b. Unpublished report No. 4422, 2 May 1988 from Cytotest Cell research GmbH & Co. KG, Germany. Submitted to WHO by Bayer AG, Bayerwerk, Germany. <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2002pr13.htm>.

- WANG, A. S. – XIA, T. – CHU, O. L. – ZHANG, M. – LIU, F. – CHEN, X. M. – YANG, K. D. 2004. Effects of fluoride on lipid peroxidation, DNA damage and apoptosis in human embryo hepatocytes. In: *Biomed. Environ. Sci.*, vol. 17, 2004, no. 2, p. 217-222.
- WEBER, H. – PATZSCHKE, K. – WEGNER, L.A. 1977. TOLYLFLUANID-¹⁴C (Euparen M active substance) - Biokinetic investigations of rats. Unpublished report No. PF1165, 29 September 1977 from Isotope Laboratory, Institute of Pharmacokinetics, Bayer AG. Submitted to WHO by Bayer AG, Bayerwerk, Germany. 1977. <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/.htm>.
- WHITFORD, G.M. 1996. The Metabolism and Toxicity of Fluoride. Monograph in Oral Sciences. 2nd Revised Edition. Karger: Basel, Switzerland : Myers, H.M., vol. 16, 1996, p. 1-156.
- www.fluorideactionnetwork.com
- XU, H. – JIN, . O. – JING, L. – LI, G. S. 2006. Effect of sodium fluoride on the expression of bcl-2 family and osteopontin in rat renal tubular cells. In: *Biol. T. Elem. Res.*, vol. 109, 2006, no. 1, p. 55-60
- YOUNG, A. D – FICKBOHM, B. L. 2004. KUE 13183B - Two-generation reproductive toxicity study in rat. Unpublished report No. 200770, 30 January 2004, Bayer CropScience AG, 2004. Submitted to WHO by Bayer AG, Bayerwerk, Germany. In: Final addendum to the Draft Assessment Report (DAR) - public version - Initial risk assessment provided by the rapporteur Member State Finland for the existing active substance. TOLYLFLUANID of the second stage of the review programme referred to in Article 8(2) of Council Directive 91/414/EEC. February 2005.

Adresy autorov: MVDr. Natália Kovalkovičová, PhD., Prof. MVDr. Juraj Pistl, PhD., Univerzita veterinárskeho lekárstva, Komenského 73, 041 81 Košice, tel: +421915984688; e-mail: kovalkovicova@uvm.sk; e-mail: sutiakova@pobox.sk; e-mail: pistl@uvm.sk; Doc. RNDr. Irena Šutiaková, CSc., Prešovská univerzita, Ul. 17. novembra 1, 081 16 Prešov, e-mail: sutiakova@pobox.sk
