

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU  
Diplomski sveučilišni studij  
Biotehnologija u medicini

Margita Šrajbek

**Biokemijski markeri subkronične toksičnosti  
klorpirifosa u štakora**

Diplomski rad

Rijeka, 2016.

## **Zahvala**

*Zahvaljujem svojoj dragoj mentorici dr. sc. Suzani Žunec na iskazanom povjerenju, vodstvu te stručnim savjetima tijekom izrade diplomskog rada. Hvala svima na institutu na pomoći i kolegijalnosti kao i prof. dr. sc. Ani Lucić Vrdoljak što mi je omogućila iskustvo rada na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada.*

*Veliko hvala mojim roditeljima, Bubici i obitelji koji su uvijek bili tu uz mene, na podršci i razumijevanju ne samo na fakultetu nego kroz cijelo moje obrazovanje. Na kraju, najveće hvala mojim prijateljima na potpori kao i svim zajedničkim uspomenama, zbog kojih mi je vrijeme provedeno na studiju prošlo i prebrzo ali ostaje u najljepšem sjećanju.*

Ovaj diplomski rad izrađen je u okviru projekta br. 8366 „Organska zagađivala u okolišu – markeri i biomarkeri toksičnosti“ (OPENTOX) koji financira Hrvatska zaklada za Znanost.

Mentor rada: dr. sc. Suzana Žunec

Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb

Komentor rada: prof. dr. sc. Ana Lucić Vrdoljak

Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb

Diplomski rad obranjen je dana 4. listopada 2016.

pred povjerenstvom:

1. dr. sc. Miranda Mladinić Pejatović, izv. prof. (predsjednik)

2. dr. sc. Anđelka Radojčić Badovinac, red. prof.

3. dr. sc. Ana Lucić Vrdoljak, red. prof.

Rad ima 44 stranice, 11 slika i 50 literaturnih navoda

## Sažetak

Pesticidi su toksični spojevi koji imaju štetne učinke na ljudsko zdravlje i okoliš. U današnje vrijeme, organofosfatni spojevi spadaju u najkorišteniju vrstu pesticida. Veliki udio u njihovoj ukupnoj primjeni ima klorpirifos (CPF), organofosfatni pesticid širokog spektra. Glavni mehanizam toksičnosti organofosfatnih spojeva je ireverzibilna inhibicija acetilkolinesteraze (AChE), ključnog enzima za prijenos neurotransmitera acetilkolina. Uz štetan učinak na AChE, postoje dokazi o porastu oksidacijskog stresa u organizmu nakon izlaganja klorpirifosu. U ovom radu istražen je učinak niskih koncentracija klorpirifosa na biomarkere subkronične toksičnosti kod štakora. Svrha ovog i sličnih istraživanja je pridonijeti saznanjima o utjecaju pesticida na ljudsko zdravlje i okoliš. Ispitali smo štetne učinke niskih koncentracija koje su u realnim uvjetima prisutne u izloženog stanovništva, zaposlenih u proizvodnji i primjeni štetnih tvari, kao i one koje se odnose na prihvatljivi dnevni unos i referentne doze pesticida. Životinje su podijeljene u sedam skupina po pet jedinki. Četiri skupine štakora tijekom 28 dana primale su klorpirifos *per os* u različitim dozama: 0,000374 mg/kg tjelesne težine po danu (odgovara koncentraciji eng. „*residential exposure level*“, REL), 0,01 mg/kg tjelesne težine po danu (odgovara koncentraciji prihvatljivog dnevnog unosa eng. „*acceptable daily intake*“, ADI), 0,01572 mg/kg tjelesne težine po danu (odgovara koncentraciji eng. „*occupational exposure limit*“, OEL) i 0,1572 mg/kg tjelesne težine po danu (odgovara koncentraciji 10xOEL)). Preostale tri skupine životinja bile su kontrolne (negativna, pozitivna i kontrola s otapalom). Istraživani parametri uključivali su mjerenje aktivnosti ukupnih kolinesteraza (ChE), acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze (BChE). Također, mjereni su parametri oksidacijskog stresa, razine reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) i lipidne peroksidacije (LPO) te aktivnost antioksidacijskog enzima katalaze (CAT). Na osnovi izmjerenih vrijednosti istraživanih parametara zaključeno je da svakodnevna oralna primjena CPF-a tijekom 28 dana rezultira inhibicijom ChE, AChE i BChE, porastom razina ROS-ova i LPO te porastom aktivnosti CAT.

**Ključne riječi:** klorpirifos, acetilkolinesteraza, butirilkolinesteraza, oksidacijski stres

## Abstract

Organophosphate compounds are currently the most used type of pesticides. A large share of its administration involves chlorpyrifos (CPF), a wide range organophosphate pesticide. It is well-known that pesticides are toxic compounds with harmful effects on human health and the environment. The main toxicity mechanism of organophosphate compounds is irreversible acetylcholinesterase (AChE) inhibition, i.e. the inhibition of the primary channel for the distribution of the neurotransmitter acetylcholine. Apart from toxic effects on AChE, there is also evidence of an increase of oxidative stress in the organism, after chlorpyrifos exposure. This study investigated the effect of chlorpyrifos on biochemical markers of subchronic toxicity in rats. To investigate the influence of the pesticide on human health and the environment, we tested low concentrations that matched real exposure and were estimated on the basis of residential exposure levels, acceptable daily intake and occupational exposure limit. Animals were divided into seven groups of five animals. In four of the groups, the animals were orally administered chlorpyrifos at different dosages (0.000374 mg/kg b.w./day (REL), 0,01 mg/kg b.w./day (ADI), 0.01572 mg/kg b.w./day (OEL) and 0.1572 mg/kg b.w./day (10xOEL)). The remaining three groups were control groups. The parameters we investigated were overall cholinesterase (ChE), acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE). We also measured parameters of oxidative stress, reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation (LPO) and catalase (CAT), the antioxidative defence mechanism. The investigated parameters showed certain harmful effects that exposure to CPF has on an organism. Oral administration of chlorpyrifos throughout 28 days resulted in ChE, AChE and BChE inhibition, increase of ROS levels and LPO, as well as with increased CAT activity.

**Key words:** chlorpyrifos, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, oxidative stress

## **Kazalo**

<b>1. Uvod</b> .....	<b>7</b>
1.1 Klorpirifos.....	7
1.2 Mehanizmi toksičnog djelovanja klorpirifosa.....	9
1.2.1. Inhibicija kolinesteraza.....	9
1.2.2. Mehanizmi toksičnosti neovisni o inhibiciji kolinesteraza.....	11
1.2.2.1 Reaktivne kisikove vrste.....	11
1.2.2.2 Lipidna peroksidacija.....	12
1.2.2.3 Katalaza.....	13
1.3 Toksikokinetika i toksikodinamika klorpirifosa.....	14
<b>2. Cilj rada</b> .....	<b>16</b>
<b>3. Materijali i metode</b> .....	<b>17</b>
3.1. Priprema radnih otopina klorpirifosa.....	17
3.2. Izvor enzima i mjerni instrumenti.....	17
3.3. Dizajn eksperimenta.....	18
3.4. Metode mjerenja aktivnosti kolinestaraza.....	19
3.5. Određivanje koncentracije produkata lipidne peroksidacije.....	20
3.6. Određivanje koncentracije ukupnih reaktivnih kisikovih spojeva.....	21
3.6. Određivanje aktivnosti katalaze.....	22
3.8. Određivanje količine hemoglobina u eritrocitima.....	23
3.9. Određivanje koncentracije ukupnih proteina metodom po Bradfordu.....	23
3.10. Statistička obrada rezultata.....	24
<b>4. Rezultati</b> .....	<b>24</b>
4.1. Učinak klorpirifosa na aktivnost ukupnih kolinesteraza (ChE).....	24
4.2. Učinak klorpirifosa na aktivnost acetilkolinesteraze (AChE).....	25
4.3. Učinak klorpirifosa na aktivnost butirilkolinesteraze (BChE).....	26
4.4. Učinak klorpirifosa na razinu lipidne peroksidacije (LPO).....	28
4.5. Učinak klorpirifosa na količinu reaktivnih kisikovih spojeva (ROS).....	29
4.6. Učinak klorpirifosa na aktivnost katalaze (CAT).....	30
<b>5. Rasprava</b> .....	<b>32</b>
<b>6. Zaključak</b> .....	<b>36</b>
<b>7. Literatura</b> .....	<b>37</b>
<b>Životopis</b> .....	<b>41</b>

# 1. Uvod

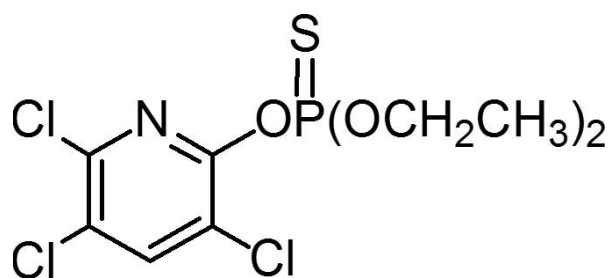
## 1.1 Klorpirifos

Iako se pesticidi stoljećima upotrebljavaju u poljoprivredi za proizvodnju hrane, uklanjanje štetnika i kontrolu širenja bolesti, njihova uporaba uzrokuje ozbiljne posljedice na zdravlje organizama (1). Masovne i nekontrolirane upotrebe pesticida uzrokovale su onečišćenje okoliša i povećanu opasnost za zdravlje, uključujući akutna i kronična otrovanja, osobito u zemljama u razvoju (2). Svake godine upotreba pesticida uzrokuje preko tri milijuna slučajeva teškog otrovanja, te više od 220.000 smrtnih ishoda (3). Veliki problem današnjice je povećana upotreba pesticida, dok njihov štetni utjecaj na okoliš i ljudsko zdravlje i dalje nije dovoljno istražen. Pesticidi su biocidne tvari koje su namijenjene za kontrolu i suzbijanje štetnika, a mogu biti prirodnog ili kemijskog podrijetla (4). Zbog visoke insekticidne aktivnosti i umjerene toksičnosti organofosfatni spojevi spadaju u najkorišteniju vrstu insekticida (1). Značajan udio u ukupnoj primjeni insekticida ima organofosfatni pesticid klorpirifos (CPF) (5).

Klorpirifos, kao insekticid širokog spektra, jedan je od najkorištenijih organofosforinih pesticida u domaćinstvu i industriji, koji je u tržišnoj primjeni od 1965. (6). Svjetska zdravstvena organizacija klasificirala je CPF među insekticide II. klase, tj. skupinu spojeva koji su umjereno štetni za zdravlje organizama i okoliš (1). CPF se primarno metabolizira u jetri kroz nekoliko stupnjeva reakcije posredovane specifičnim citokrom P450 enzimima. Poput ostalih organofosfata, klorpirifos inhibira aktivnost acetilkolinesteraze (AChE) u ciljnim tkivima kao što su jetra, pluća, mozak te također pokazuje inhibitorni učinak na AChE eritrocita. Osim inhibicije AChE, poznato je da izloženost CPF-u povećava stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta, čime pridonosi porastu razine oksidacijskog stresa u organizmu (7).

Na Slici 1. prikazana je kemijska struktura klorpirifosa. Prema nomenklaturi IUPAC-a, klorpirifos je *O,O*-dietil *O*-3,5,6-trikloropiridin-2-il fosforotioat. Dobiva se složenom sintezom iz 3-metilpiridina, gdje naposljetku dolazi do reakcije 3,5,6-trikloro-2-piridinola sa dietiltiofosforil kloridom (8).





**Slika 1. Kemijska struktura klorpirifosa;** preuzeto iz „*Biodegradation of Chlorpyrifos by Microbial Strains Isolated from Agricultural Wastewater*“, (2).

Klorpirifos je umjereno toksičan za ljude, a neke od posljedica trovanja su znojenje, mučnine i glavobolje kod blažih trovanja, mišićne kontrakcije, slabost, povraćanje i smetnje vida kod umjerenih trovanja, dok prilikom težih otrovanja može doći do nesvjestice, paralize i gušenja uzrokovanog kolapsom pluća (9). Akutno trovanje visokim dozama klorpirifosa ili dugotrajna izloženost niskim dozama može dovesti do raznih poremećaja u funkcioniranju ljudskog organizma. Rezultati ranijih istraživanja upućuju da su djeca podložnija utjecaju klorpirifosa od odraslih iz razloga što im je sposobnost detoksikacije i metaboliziranja spoja i njegovih metabolita znatno manja nego u odraslih ljudi (10). Rezultati istraživanja također povezuju izloženost klorpirifosu tijekom gestacijskog perioda ili djetinjstva s nižom porođajnom težinom djece, sporijim motoričkim razvojem i poremećajem pozornosti te raznim kognitivnim i bihevioralnim promjenama (11). U odraslih osoba koje su akutno izložene klorpirifosu primijećeno je otežano disanje uzrokovano opstrukcijom plućnih puteva, a također je zabilježena i veća pojavnost karcinoma pluća nego u općoj populaciji (12,13).

## **1.2. Mehanizmi toksičnog djelovanja klorpirifosa**

### **1.2.1. Inhibicija kolinesteraza**

Glavni mehanizam toksičnog djelovanja organofosfatnih pesticida zasniva se na remećenju prijenosa neurotransmitera acetilkolina (ACh), što je njihov primarni mehanizam djelovanja (14). Pri ulasku u tijelo klorpirifos prelazi u klorpirifos-okson (CPF – okson), toksični oblik spoja, koji se ireverzibilno veže na enzim acetilkolinesterazu (AChE) koja kontrolira prijenos među živčanim stanicama. Prvi korak tijekom inhibicije je fosforiliranje enzima, što je analogno hidrolizi supstrata ACh. Jedina razlika u odnosu na reakciju AChE sa supstratom je u brzini reakcije s vodom, gdje je deacetilacija enzima znatno brža od defosforilacije.

AChE (Acetilhidrolaza, Acetilkinesteraza, EC 3.1.1.7) je enzim koji spada u skupinu serinskih esteraza (15). Fiziološka uloga AChE je hidroliza neurotransmitera ACh. ACh se iz sinaptičke pukotine uklanja razgradnjom, a ne difuzijom, pa njegovom hidrolizom AChE kontrolira prijenos živčanih impulsa u kolinergičkoj sinapsi središnjeg i perifernog živčanog sustava (16). Prema brzini hidrolize, AChE jedan je od najučinkovitijih enzima te je time hidroliza ACh određena samo brzinom njegove difuzije u aktivno mjesto enzima. AChE se sintetizira u koštanoj srži, mišićima i mozgu, te se nalazi u krvi gdje je vezana na membrane eritrocita. Ovaj enzim u prirodi dolazi u nekoliko različitih molekularnih formi.

Neki organofosforini spojevi se ne defosforiliraju, dok je za druge karakteristična spora, odnosno spontana reaktivacija. Spojevi nastali hidrolizom organofosfatnih spojeva više nisu inhibitori AChE. Kod fosforilacije AChE, uz spontanu reaktivaciju, može doći do dealkiliranja jedne alkoksi skupine na fosforu, čime enzim postaje negativno nabijen te je onemogućen nukleofilni napad vode. Ta se pojava naziva „starenje enzima“. Razlikujemo dvije vrste inhibicije AChE (17). Prva uključuje kovalentno vezanje spojeva, koji se koriste kao pesticidi, na serin katalitičke trijade AChE te se naziva ireverzibilna inhibicija. Organofosfati djeluju putem ireverzibilne inhibicije uslijed čega su visoko toksični te uzrokuju dugotrajnije posljedice (18). Druga je vrsta inhibicije reverzibilna inhibicija, gdje se spojevi nekovalentnim interakcijama vežu na aktivni centar AChE. Primjer

spojeva koji se reverzibilno vežu na AChE su karbamati. Oni su manje toksični od organofosfornih spojeva zbog kraćeg trajanja negativnih posljedica na organizam uzrokovanih njihovom primjenom (17,18).

Inhibicija enzima AChE dovodi do akumulacije ACh, jače i dugotrajne signalizacije među neuronima te naposljetku iscrpljivanja neurona i grčenja mišića. Do pojave simptoma akutnog trovanja dolazi nakon što se inhibira 70% aktivnosti AChE, a povrat funkcije postiže se isključivo novom sintezom molekule (19). Što je veća razina inhibicije AChE, veća je vjerojatnost pojave simptoma trovanja. Simptomi variraju od blažih koji uključuju slabost, mučnine i vrtoglavicu, do ozbiljnijih kao što su nekontrolirane kontrakcije mišića, hipotenzija, spore kontrakcije srčanog mišića, te ukoliko se ne provede pravovremena i odgovarajuća terapija, nastupa smrt. Također, težina otrovanja ovisi i o trajanju izloženosti CPF-u, putu unosa u tijelo (oralno, dermalno) te količini CPF-a unesenog u organizam.

Općenito je poznato da inhibicija AChE kao posljedica akutnog trovanja organofosfatnim spojem ima po život opasne posljedice, no organofosfati inhibiraju i drugi enzim tzv. nespecifičnu kolinesterazu, butirilkolinesterazu ili BChE. Razlike između AChE i BChE očituju se u fizikalno-kemijskim značajkama, mjestu nalaženja u organizmu te fiziološkoj funkciji. Za razliku od AChE, specifične za hidrolizu acetatnih estera, BChE (E.C 3.1.1.8) hidrolizira butiratne estere, pa je stoga nazvana pseudo ili nespecifičnom kolinesterazom (16). Premda je dokazano da i BChE može hidrolizirati ACh u sinapsi, njezin specifični supstrat još uvijek nije pronađen. Iako njegova fiziološka uloga nije u potpunosti razjašnjena, poznato je da BChE sudjeluje u metabolizmu lipida te diferencijaciji i rastu živčanog tkiva (20). BChE se u višoj koncentraciji nalazi u središnjem i perifernom živčanom sustavu, cerebrospinalnoj tekućini te u crijevima, plućima, gušterači i jetri, gdje se i sintetizira.

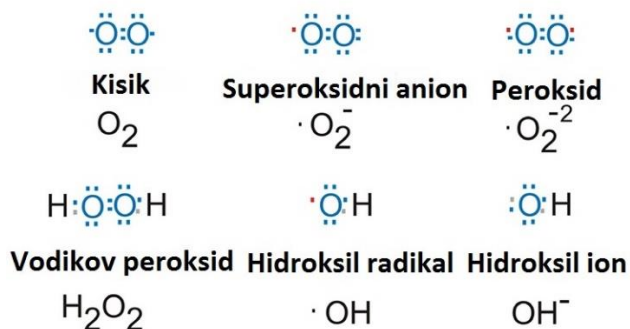
### **1.2.2. Mehanizmi toksičnosti neovisni o inhibiciji kolinesteraza**

CPF može utjecati i na druge neurotransmitere, enzime i puteve stanične signalizacije čiji opseg i mehanizmi djelovanja još uvijek nisu dovoljno proučeni, te postoji mogućnost njegova štetnog učinka i u nižim dozama od onih potrebnih za inhibiciju acetilkolinesteraze. Istraživanja na staničnim kulturama i glodavcima pokazala su da niske doze CPF-a uzrokuju promjene u serotoninskoj signalizaciji, što dovodi do pojave simptoma depresije (21). Prilikom trovanja, također dolazi do ireverzibilne inhibicije enzima koji su zaslužni za razgradnju endokanabinoida što dovodi do porasta razine endokanabinoida u mozgu i kanaboidno-specifičnog ponašanja (22).

Poznato je da CPF uzrokuje povećanje stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS), te time uzrokuje oksidacijski stres u organizmu (7). Oksidacijska oštećenja primarno nastaju zbog produkcije ROS-ova koji narušavaju integritet stanične membrane, te uzrokuju lipidnu peroksidaciju (LPO) (23). Organizam ima nekoliko različitih mehanizama obrane od oštećenja nastalih oksidacijskim stresom. Najpoznatiji su antioksidacijski enzimi superoksid dismutaza (SOD), glutation peroksidaza (GPx) i katalaza (CAT), čija se aktivnost mijenja u prisutnosti pesticida, uključujući i CPF.

#### **1.2.2.1 Reaktivne kisikove vrste**

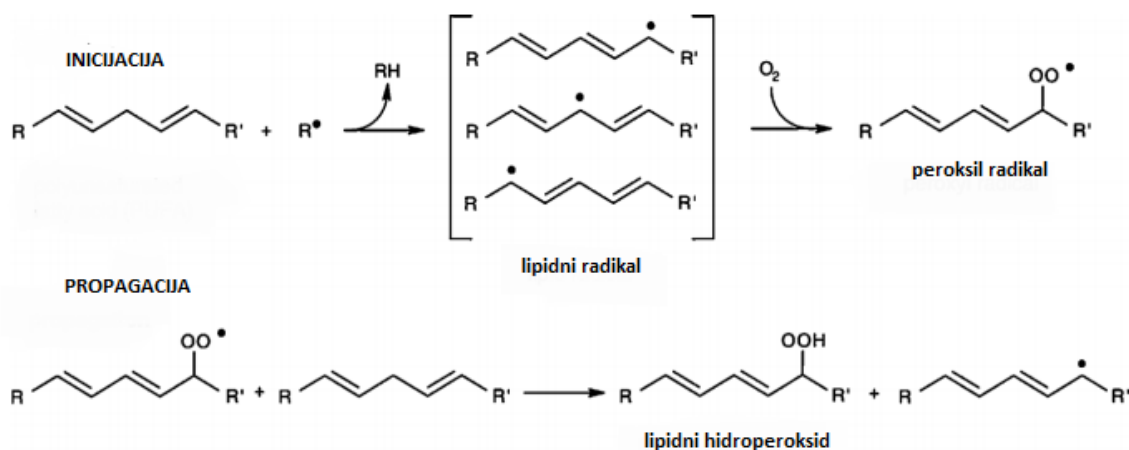
Oksidacijski stres je štetan proces u organizmu koji nastaje zbog stvaranja prekomjerne količine ROS-ova u odnosu na sposobnost njihovog uklanjanja putem antioksidansa (24). ROS su spojevi kisika koji u svojoj strukturi sadrže nespareni elektron. Neke od vrsta ROS-a su superoksidni anion, singlet kisika, hidroksil radikal te vodikov peroksid, a u tijelu nastaju tijekom mitohondrijskog oksidacijskog metabolizma kao i zbog odgovora organizma na ksenobiotike, citokine te prisutnost bakterija. Oksidacijski stres rezultira oštećenjem makromolekula te je povezan s različitim bolestima i stanjima, primjerice neurodegeneracijom, starenjem i nastankom tumora (25).



**Slika 2. Elektronska struktura reaktivnih kisikovih spojeva;** po uzoru na „Held P. *An introduction to reactive oxygen species. BioTek White Pap. 2010;1–14.*“, (26)

### 1.2.2.2 Lipidna peroksidacija

Lipidna peroksidacija je metabolički proces u kojem reaktivne kisikove vrste uzrokuju oksidacijsko oštećenje lipida (27). Iako je LPO proces koji se u malim količinama prirodno odvija u tijelu, ona također ima važnu ulogu u razvoju bolesti u odraslih i djece. Tijekom procesa LPO reaktivne kisikove vrste stupaju u reakcije s višestruko nezasićenim masnim kiselinama u membranama što uzrokuje lančanu reakciju njihovog samouništenja (10).



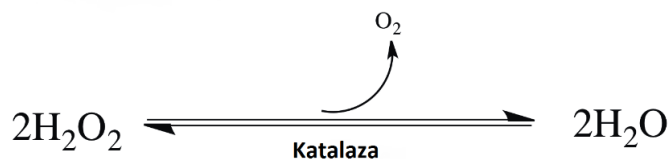
**Slika 3. Proces lipidne peroksidacije;** po uzoru na „Boots AW, van Berkel JJBN, Dallinga JW, Smolinska A, Wouters EF, van Schooten FJ. *The versatile use*

*of exhaled volatile organic compounds in human health and disease. J Breath Res. 2012", (28)*

Uništenje lipidnih membrana te krajnji produkti takve reakcije osobito su opasni za preživljenje samih stanica te narušavaju funkcije organa. Enzimi kao što su katalaza i superoksid dismutaza te ne-enzimatski prirodni antioksidansi kao što su vitamini A i E štite organizam od štetnog učinka LPO. Međutim, ukoliko su nadvladani, nastupa proces LPO. Kako je LPO samoreproducirajuća lančana reakcija, oksidacija tek nekoliko lipidnih molekula može dovesti do značajnog oštećenja tkiva.

### 1.2.2.3 Katalaza (CAT)

Enzim CAT odgovoran je za razgradnju vodikovog peroksida na vodu i kisik (29).



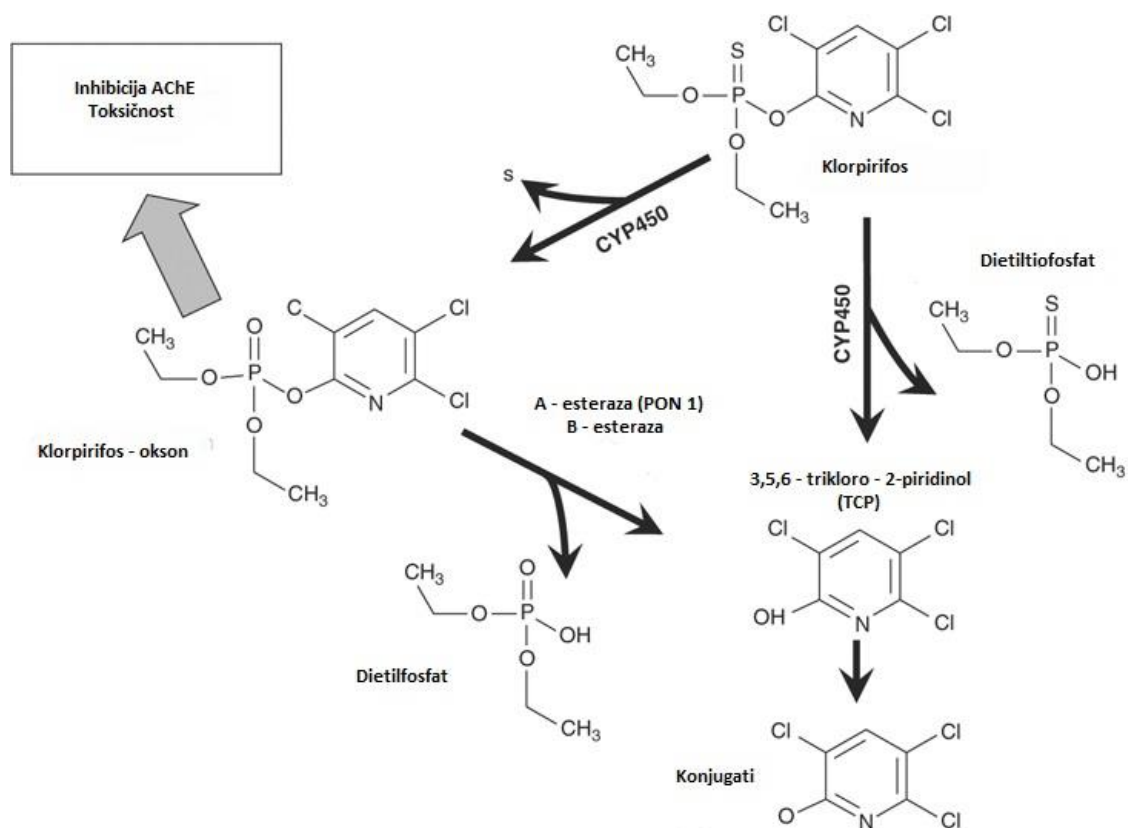
**Slika 4. enzimski reakcija katalaze;** razlaganje vodikovog peroksida na kisik i vodu; po uzoru na „P. Z, A. R, W. J, Cho J, Henderson M, T. T. *Current Therapeutic Modalities, Enzyme Kinetics, and Redox Proteomics in Traumatic Brain Injury. In: Sadaka F, editor. Traumatic Brain Injury. InTech; 2014", (30,31).*

CAT ima zaštitnu ulogu u gotovo svim bakterijskim, biljnim i životinjskim stanicama, te je dio antioksidativnog zaštitnog mehanizma. Njezina je uloga u organizmu obrana stanica i tkiva od oksidacijskog stresa uzrokovanog ROS-ovima. Kod sisavaca se najveći dio enzima katalaze nalazi u jetri.

### **1.3 Toksikokinetika i toksikodinamika klorpirifosa**

Prilikom ulaska u organizam klorpirifos prolazi kroz metaboličku aktivaciju u jetri (32). Metabolička aktivacija posredovana je enzimima iz skupine citokroma P 450 uz koje CPF prelazi u CPF – okson, (33). CPF – okson , aktivni metabolit, najzaslužniji je za inhibiciju ne samo AChE, već i ostalih B – esteraza kao što su BChE i karboksilesteraza. Paraoksonaza 1 (PON 1) katalizira hidrolizu CPF-oksona i time ga prevodi u netoksične metabolite dietilfosfat (DEP) i 3,5,6 trikloropiridinol (TCPy) (34). Također, inhibicija B – esteraza CPF – oksonom može rezultirati stvaranjem netoksičnih metabolita DEP i TCPy (35).

Učinak CPF-a na inhibiciju AChE razlikuje se ovisno o načinu njegova unosa u organizam (36). Rezultati dosadašnjih istraživanja pokazuju veću razinu inhibicije AChE nakon subkutane primjene CPF-a u odnosu na oralnu primjenu (37). Smatra se da je razlog tome sporo i kontinuirano otpuštanje CPF-a u tijelo, spora sekvestracija CPF-a te lokalizirano metaboliziranje CPF-a u CPF – okson u mozgu (37,38). Za razliku od subkutane, kod oralne primjene CPF-a moguće je da CPF prolazeći kroz stijenke crijeva, a potom prolazeći kroz jetru brže podliježe detoksifikaciji (39). Suprotno, u slučajevima oralne primjene favorizirana je aktivacija CPF.



**Slika 5. Shema metabolizma klorpirifosa i njegovih metabolita;** klorpirifos – oksona, triklorpiridinola, dietilfosfata i dietiltiofosfata; po uzoru na "Timchalk C, Poet TS, Kousba AA. Age-dependent pharmacokinetic and pharmacodynamic response in preweanling rats following oral exposure to the organophosphorus insecticide chlorpyrifos. *Toxicology*. 2006;220(1):13–25.", (40).



## 2. Cilj rada

Klorpirifos (CPF), organofosfatni insekticid širokog spektra, danas je jedan od najkorištenijih pesticida. Glavni mehanizam djelovanja CPF-a, kao i ostalih organofosfata, je inhibicija aktivnosti AChE u ciljnim tkivima kao što su jetra, pluća, mozak i eritrociti. Osim inhibicije AChE, poznato je da uporaba pesticida povećava produkciju ROS-ova, te time pridonosi oksidacijskom stresu u organizmu. Također zbog posljedica oksidacijskog stresa izazvanih izlaganjem CPF-u, dolazi i do porasta aktivnosti antioksidacijskih sustava u organizmu. Ovo je istraživanje provedeno na modelu Wistar štakora koji su tijekom 28 dana u laboratorijskim uvjetima izlagani niskim koncentracijama klorpirifosa. Specifični ciljevi istraživanja bili su:

1. Ispitati utjecaj klorpirifosa na aktivnost ukupnih kolinesteraza u plazmi, mozgu i jetri
2. Ispitati utjecaj klorpirifosa na aktivnost acetilkolinesteraza u plazmi, mozgu, jetri i eritrocitima.
3. Ispitati utjecaj klorpirifosa na aktivnost butirilkolinesteraze u plazmi, mozgu i jetri.
4. Ispitati utjecaj klorpirifosa na razinu lipidne peroksidacije u plazmi, mozgu i jetri.
5. Ispitati utjecaj klorpirifosa na količinu reaktivnih kisikovih spojeva u plazmi, mozgu i jetri.
6. Ispitati utjecaj klorpirifosa na aktivnost katalaze u plazmi, mozgu i jetri.

## 3. Materijali i metode

### 3.1. Priprema radnih otopina klorpirifosa

Spoj klorpirifos (O,O-dietil O-3,5,6-trikloropiridin-2-il fosforotioat) (Chlorpyrifos PESTANAL, *Sigma Aldrich*) je organofosfatni insekticid, molekularne formule  $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$ .

Ishodna otopina klorpirifos-etila (5 mg/mL) pripremljena je u 100% - tnom etanolu (EtOH), a potom razrijeđena destiliranom vodom u omjeru 1:1 kako bi se dobila otopina koncentracije 2,5 mg/mL iz koje su na tjednoj bazi pripremane svježere radne otopine koncentracije 0,0001122 mg/ml (odgovara koncentraciji kojoj je izloženo stanovništvo, tj. REL - „residential exposure level“), 0,003 mg/mL (odgovara koncentraciji prihvatljivog dnevnog unosa, tj. ADI - „acceptable daily intake“) i 0,004716 mg/mL (odgovara koncentraciji prisutnoj u profesionalnoj izloženosti, tj. OEL - „occupational exposure limit“). U svrhu pripreme radne otopine koncentracije 0,04716 mg/mL (10xOEL) otopljeno je 5 mg CPF u 1 mL 5% EtOH te je potom razrjeđenjem dobivena ishodna otopina koncentracije 0,1 mg/mL.

### 3.2. Izvor enzima i mjerni instrumenti

Kao izvor enzima korišteni su nativni štakorski eritrociti dva puta isprani fiziološkom otopinom i potom nadopunjeni fiziološkom otopinom na početni volumen krvi. Tijekom mjerenja enzimske aktivnosti eritrociti su bili razrijeđeni 10 puta u natrij-fosfatnom puferu.

Za mjerenje je korišten UV-VIS spektrofotometar Cecil 9000 (*Cecil Instruments Ltd.*, Velika Britanija).

### 3.3. Dizajn eksperimenta

Određivanje subkronične toksičnosti klorpirifosa provedeno je na mužjacima štakora (soj Wistar) starosti 3 mjeseca. Tijekom svih eksperimenata životinje su boravile u makrolonskim kavezima pod kontroliranim uvjetima (periodična izmjena svjetla svakih 12 sati, temperatura 24 °C) sa slobodnim pristupom hrani (4RF21, *Mucedola*, Italija) i vodi. Eksperimenti su provedeni u skladu s etičkim načelima i

odobreni od povjerenstva Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb, Hrvatska.

Kako bi se istražio učinak klorpirifosa na oksidacijski stres, aktivnost ChE i aktivnost AChE u trovanih štakora, životinje su nasumice podijeljene u skupine po pet jedinki te su pojedine skupine tretirane na sljedeći način:

*Skupina 1:* REL *per os* primjena CPF-a u dozi od  
0,000374 mg/kg t.m. dnevno

*Skupina 2:* ADI *per os* primjena CPF-a u dozi od 0,01  
mg/kg t.m. dnevno

*Skupina 3:* OEL *per os* primjena CPF-a u dozi od  
0,01572 mg/kg t.m. dnevno

*Skupina 4:* 10xOEL *per os* primjena CPF-a u dozi od 0,1572 mg/kg  
t.m. dnevno

*Skupina 5 (negativna kontrola):* Životinje su imale stalan pristup vodi za piće, ali zbog podvrgavanja istom tretmanu („stresu“) dnevno su dobivale i 1 mL vode putem sonde.

*Skupina 6 (pozitivna kontrola):* Tretman životinja etil metansulfonatom (EMS) u dozi od 300 mg/kg t.m. dnevno proveden je posljednja tri dana pokusa

*Skupina 7 (kontrola otapalo):* *Per os* primjena otopine etanola koncentracije 0,03% (v/v) u fiziološkoj otopini.

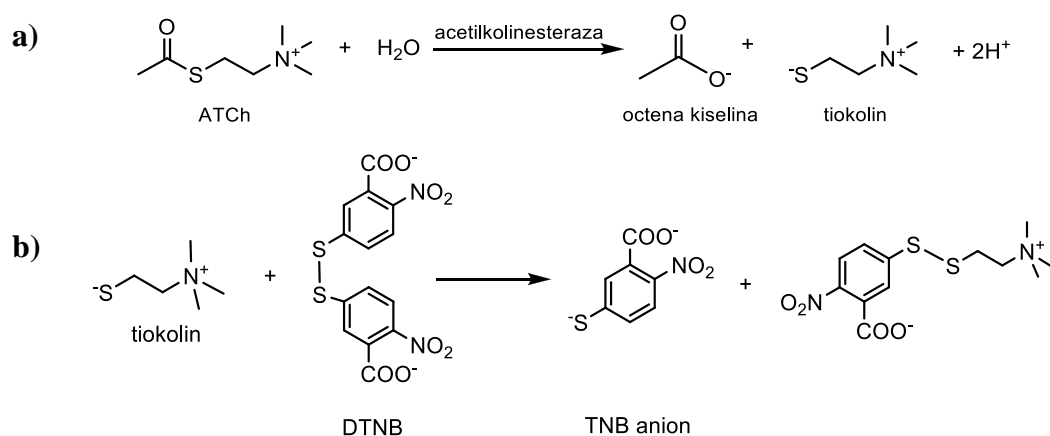
Životinje su žrtvovane nakon 28 dana tretiranja. Anestezirane su intraperitonealnim (i.p.) ubrizgavanjem otopina Narketan, 80 mg/kg t.m. i Xylapan, 12 mg/kg t.m. Nakon otvaranja trbušne šupljine i prsnog koša iz desne pretkljetke srca uzeto je cca 5-7 mL krvi u hepariniziranu epruvetu. Plazma je izdvojena nakon centrifugiranja uzoraka krvi (3000 okretaja min<sup>-1</sup>, 10 min). Eritrociti su četiri puta isprani fiziološkom otopinom i potom nadopunjeni fiziološkom otopinom na početni volumen krvi. Životinjama su nakon iskrvarenja odstranjeni mozak i jetra i potom isprani u hladnom PBS puferu. Svi uzorci pohranjeni su na -20 °C do analize.

Uzorci tkiva mozga i jetre homogenizirani su neposredno prije analize u 50 mM K-fosfatnom puferu (pH=7,4) uz dodatak 1 mM EDTA.

U homogenatima mozga ( $40 \text{ mg mL}^{-1}$ ) i jetre ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$  i  $200 \text{ mg mL}^{-1}$ ) određivane su aktivnosti ChE, AChE i BChE, koncentracija produkata LPO, koncentracija ROS-ova i koncentracija ukupnih proteina. Homogenati mozga i jetre ( $100 \text{ mg/mL}$ ) centrifugirani su 30 min na  $14000 \text{ rpm}$  na  $4^\circ\text{C}$  da bi se dobio supernatant koji je korišten za određivanje aktivnosti katalaze.

### 3.4. Metode mjerenja aktivnosti kolinestaraza

Sva mjerenja aktivnosti ChE provedena su u  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  fosfatnom puferu ( $\text{pH} = 7,4$ ) spektrofotometrijskom metodom po Ellmanu (41) u prisutnosti  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  ATCh kao supstrata, u vremenskom rasponu 1-3 minute. Hidrolizom ATCh nastaju tiokolin i octena kiselina (**Slika 3.1.a**) (41). Mjerenje brzine reakcije zasniva se na reakciji tiokolina s tiolnim reagensom DTNB-om (**Slika 3.1.b**). U reakciji nastaje žuto obojeni anion 5-tio-2-nitrobenzojeve kiseline koji maksimalno apsorbira na  $412 \text{ nm}$ . Brzina njegovog nastajanja prati se porastom apsorbancije ( $\Delta A$ ) na toj valnoj duljini.



**Slika 3.1. Ellmanova metoda:** a) enzimskom hidrolizom acetiltiokolina oslobađa se tiokolin, b) tiokolin potom reagira s DTNB-om pri čemu se oslobađa žuti anion 5-tio-2-nitrobenzojeve kiseline ( $\text{TNB}^-$ ).

Mjerenje aktivnosti AChE provedeno je istom metodom, gdje je prije dodatka acetiltiokolina u reakcijsku smjesu dodan etopropazin koji selektivno inhibira BChE. Aktivnost BChE dobivena je razlikom aktivnosti ukupnih ChE i AChE.

Aktivnost enzima ChE i AChE u svakom uzorku mjerena je tri puta te je kao rezultat uzeta srednja vrijednost tih mjerenja. Aktivnost ChE i AChE izražena kao

$\mu\text{mol}$  supstrata hidroliziranoga u minuti po mililitru plazme odnosno supernatanta izračunata je pomoću jednadžbe:

$$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL} = \text{IU mL}^{-1} = \frac{dA}{dt} \times \frac{V \times 10^3}{E \times B \times D}$$

gdje je:

$\frac{dA}{dt}$  = promjena ekstinkcije u vremenu

V = volumen uzorka (3,0 mL)

E = koeficijent ekstinkcije za 5-tio-2-nitrobenzoat ( $1,36 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

B = volumen uzorka

D = duljina puta svjetlosti (1,0 cm)

Dobivene vrijednosti za aktivnost ChE u plazmi odnosno AChE u homogenatima, eritrocitima i plazmi štakora izražene kao  $\text{IU mL}^{-1}$  preračunate su na  $\text{IU g}_{\text{proteina}}^{-1}$ .

### 3.5. Određivanje koncentracije produkata lipidne peroksidacije

Malondialdehid (MDA), sekundarni produkt lipidne peroksidacije, određen je u uzorcima plazme te homogenatima mozga i jetre štakora spektrofotometrijskom metodom po Drury-u pomoću tiobarbiturne kiseline (TBA) (42). Budući da TBA reagira i s drugim aldehydima, osim MDA, rezultati mjerenja koncentracije produkata lipidne peroksidacije izraženi su kao tiobarbiturni reaktivni spojevi (engl. *thiobarbituric acid reactive substances*, TBARS).

Kao standard pri izradi baždarnog dijagrama korišten je 1,1,3,3-tetrametoksiopropan (TMP) (*Sigma Aldrich*, Njemačka) u koncentraciji od 1,5175 do 30,35  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Reakcijska smjesa za određivanje koncentracije TBARS sadržavala je 50  $\mu\text{L}$  uzorka (standarda ili uzorka plazme odnosno homogenata tkiva), 5  $\mu\text{L}$  0,2 %-tnog butiliranog hidroksitoluena (BHT; *Sigma Aldrich*, Njemačka), 750  $\mu\text{L}$  1 %-tne fosfatne kiseline ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ; *Kemika*, Hrvatska), 250  $\mu\text{L}$  0,6 %-tne otopine TBA (*Sigma Aldrich*, Njemačka) i 445  $\mu\text{L}$  redestilirane vode. Nakon kratkotrajnog miješanja na vorteksu uzorci su inkubirani u vodenoj kupelji na temperaturi od 90 °C tijekom 30 min. Po završetku inkubacije, epruvete sa uzorcima ohlađene su pod mlazom hladne vode i spektrometrijski je izmjerena apsorbanacija pri 532 nm. Koncentracija TBARS u uzorcima plazmi i tkiva očitana je iz baždarnog dijagrama i izražena kao  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

### **3.6. Određivanje koncentracije ukupnih reaktivnih kisikovih spojeva**

Količina ROS-ova u plazmi i homogenatima tkiva mjerena je pomoću 2,7,-dikloroflorescin diacetata (DCFDA) koji se konvertira u fluorescentni DCF pod utjecajem staničnih peroksidaza (uključujući vodikov peroksid) i dihidroetidija (DHE), koji se konvertira u fluorescentni spoj pomoću superoksid radikala. Reakcija je provedena metodom po Socci-ju (43). 1%-tni homogenat tkiva pripremljen je razrijeđenjem homogenata koncentracije 100 mg/mL u hladnom 50 mM PBS puferu (pH 7,4). Uzorci od 0,07 mL pufera i 0,03 mL 1%-og homogenata pipetirani su u jažice mikrotitarske pločice s 96 jažica na koje je potom pipetirano 20  $\mu$ L 0,12 mM DCFDA ili 0,12 mM DHE boje u PBS-u. Konačno razrijeđenje homogenata tkiva u jažicama bilo je 0,25%, dok je konačna koncentracija fluorescentne boje bila 20  $\mu$ M. Kontrole za uzorke homogenata pripremljene su bez dodavanja DCFH-DA ili DHE, a kontrola za autofluorescenciju boje pripremljena je bez dodavanja boje. Uzorci su inkubirani 30 min na 37°C. Fluorescencija je mjerena ekscitacijom na valnim duljinama od 488 nm i 525 nm koristeći čitač mikrotitarskih pločica Victor (*Perkin-Elmer*, Velika Britanija).

Količina ROS-ova u plazmi mjerena je primjenom 2,7,-dikloroflorescin diacetata (DCF-DA). DCF-DA hidroliziraju stanične esteraza pri čemu nastaje 2,7-diklorodihidrofluorescin, kojim potom oksidira do 2,7-diklorofluorescina (DCF) u prisutnosti hidroksilnih radikala (43). 10%-tni uzorci plazme pripremljeni su razrijeđenjem 1 dijela plazme sa 9 dijelova hladnog PBS-a (pH 7,4). Uzorci od 0,1 mL 10%-tne razrijeđene plazme pipetirani su u jažice mikrotitarske pločice te im je dodano 20  $\mu$ L 0,12 mM DCFDA boje u PBS-u. Konačno razrijeđenje krvne plazme u jažicama iznosilo je 8,3%. Kontrola za fluorescenciju boje pripremljena je bez dodavanja boje u jažice. Uzorci su inkubirani 30 min na 37°C i analizirani pomoću čitača *Victor<sup>TM</sup> multiplate reader* na ekscitacijskoj valnoj duljini od 485 nm i emisijskoj valnoj duljini od 535 nm. Podaci su izraženi kao fluorescencijske arbitrarne jedinice (AU).

### 3.7. Određivanje aktivnosti katalaze

Katalitička aktivnost CAT-e može se odrediti spektrofotometrijski mjerenjem razgradnje vodikovog peroksida ( $H_2O_2$ ) zbog čega dolazi do pada apsorbanije na 240 nm (UV područje). Razlika apsorbanije u jedinici vremena jest mjera katalitičke aktivnosti CAT-e. Što se više CAT-e nalazi u uzorku, veća je razgradnja  $H_2O_2$  te će razlika u apsorbaniji unutar određenog vremenskog intervala biti veća.

Katalitička aktivnost CAT-e određena je prema metodi koju je opisao Aebi (44). Uzorak homogenata jetre ili mozga razrjeđuje se fosfatnim puferom (50 mM, pH 7,0) 500 puta, odnosno 5 puta. Nakon toga 2,0 ml razrijeđenog uzorka pomiješa se sa 1,0 mL  $H_2O_2$  (830 mM). ApSORBANCija svakog uzorka mjeri se prema svojoj slijepoj probi koja se sastoji od 2,0 ml razrijeđenog uzorka i 1,0 mL fosfatnog pufera (50 mM, pH 7,0), te se uzorci tijekom pripreme konstantno drže na ledu. Pad apsorbanije prati se tijekom 30 sec na 25°C pri valnoj duljini od 240 nm. Aktivnost CAT-e izračuna se pomoću molarog ekstincijskog koeficijenta  $40 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

Aktivnost enzima u svakom uzorku mjerena je tri puta te je kao rezultat uzeta srednja vrijednost tih mjerenja. Aktivnost CAT-e izražena kao  $\mu\text{mol}$  supstrata hidroliziranoga u minuti po mililitru plazme odnosno supernatanta tkiva izračunata je pomoću jednadžbe:

$$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL} = \text{IU ml}^{-1} = \frac{\frac{\Delta A}{\text{min}} \times \text{razr.} \times 1000 \times V_{\text{uk}}}{E \times d \times V_{\text{uzorka}}}$$

gdje je:

$$\Delta A = A_0 - A_{30}$$

$V_{\text{uk}}$  = volumen reakcijske smjese

$E$  = koeficijent ekstinkcije ( $40 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , 240nm, 25°C)

$d = 1 \text{ cm}$

Dobivene vrijednosti za aktivnost CAT-e u plazmi odnosno u supernatantima tkiva izražene kao  $\text{IU mL}^{-1}$  preračunate su na  $\text{IU g}_{\text{proteina}}^{-1}$ .

### **3.8. Određivanje količine hemoglobina u eritrocitima**

Količina hemoglobina u eritrocitima mjerena je na 540 nm (*Cary 50 UV-Vis, Varian Inc. CA, USA*) pomoću standardne cijanmethemoglobin metode koristeći standard hemiglobincijanid (45). Da bi se verificirao postupak, mjerenje hemoglobina ponovljeno je tri puta.

### **3.9. Određivanje koncentracije ukupnih proteina metodom po Bradfordu**

Ukupni proteini u uzorcima plazme i tkiva štakora određeni su metodom po Bradfordu koja se temelji na vezanju boje *Coomassie Brilliant Blue* na aminokiselinske ostatke proteina u kiselom mediju (46).

Kao standard pri izradi baždarnog dijagrama korišten je albumin goveđeg seruma (*Sigma Chemical Co., SAD*) u koncentraciji od 0,2 do 1,0 mg mL<sup>-1</sup>. Otopina boje (*Serva-Blue G; Serva, Njemačka*) pripremljena je otapanjem 22 mg *Serva-Blue G* u 20 mL 96 %-tnog etanola (*Kemika, Hrvatska*), 40 ml 85 %-tne orto-fosfatne kiseline (*Kemika, Hrvatska*) i 340 ml redestilirane vode. Profiltrirana otopina čuva se 3-4 tjedna na sobnoj temperaturi. Reakcijska smjesa sadržana od 20 µL uzorka (standarda ili uzorka plazme odnosno homogenata ili supernatanta tkiva), 20 µL mravlje kiseline (*Kemika, Hrvatska*) i 960 µL boje inkubirana je 10 min pri sobnoj temperaturi te je potom izmjerena apsorbancija pri 595 nm prema slijepoj probi koja je umjesto uzorka sadržavala isti volumen redestilirane vode. Koncentracija proteina u uzorku ekstrapolirana je iz baždarnog dijagrama pri čemu je uzet u obzir faktor razrjeđenja uzorka.

### **3.10. Statistička obrada rezultata**

Podaci su analizirani u programu *Excel i Statistica 12* te su obrađeni Kruskal Wallis testom pri čemu su *P* vrijednosti manje od 0,05 smatrane statistički značajnima. Rezultati mjerenja pojedinih biomarkera prvotno su obrađeni primjenom deskriptivne statistike. Podaci su prikazani u obliku srednje vrijednosti s pripadajućim standardnim devijacijama.

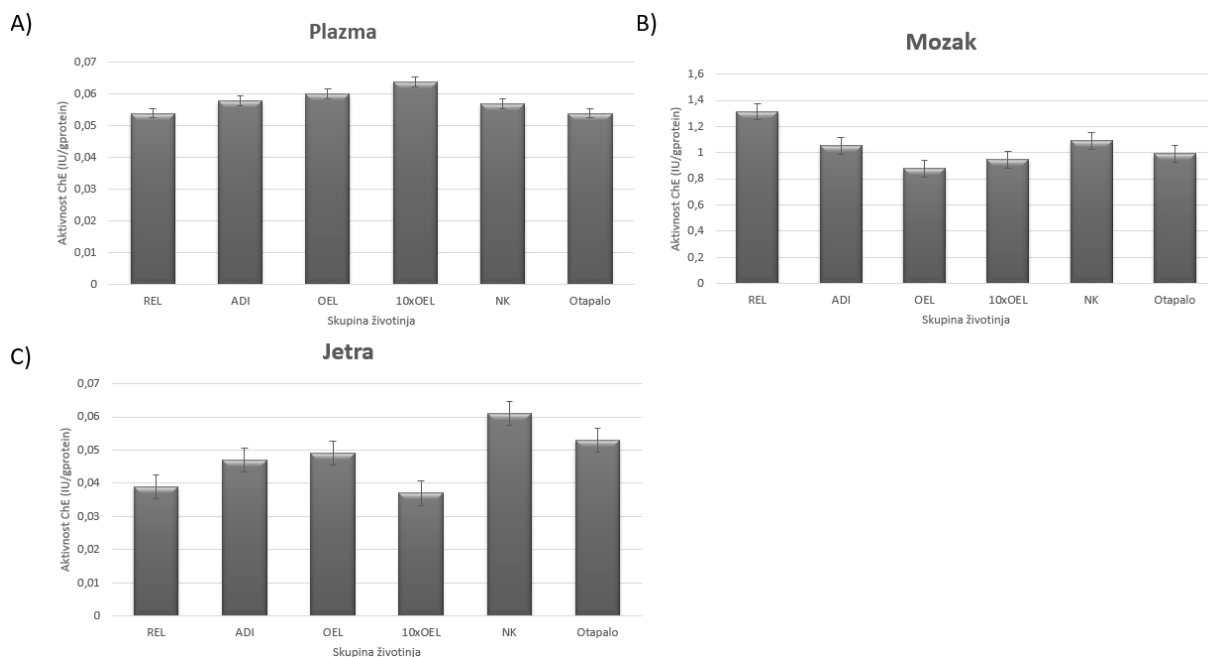


## 4. Rezultati

Kako bi se istražio učinak insekticida CPF-a, Wistar štakori su tijekom 28 dana *per os* dobivali CPF u četiri različite doze. Pokusne životinje tretirane CPF-om nisu pokazale kliničke znakove i simptome toksičnosti. Međutim, kako bi se ispitao mogući štetni učinak dugotrajne izloženosti životinja niskim dozama CPF-a na biokemijske markere toksičnosti u tkivima/organima tretiranih životinja, određeni su aktivnost ukupnih ChE, aktivnost AChE, aktivnost BChE, razina LPO, razina ukupnih ROS-ova te aktivnost CAT-e. Izmjereni su odabrani parametri te su potom pojedine skupine uspoređene sa negativnom i pozitivnom kontrolom, skupinom koja je dobivala otapalo te međusobno.

### 4.1. Učinak klorpirifosa na aktivnost ukupnih kolinesteraza (ChE)

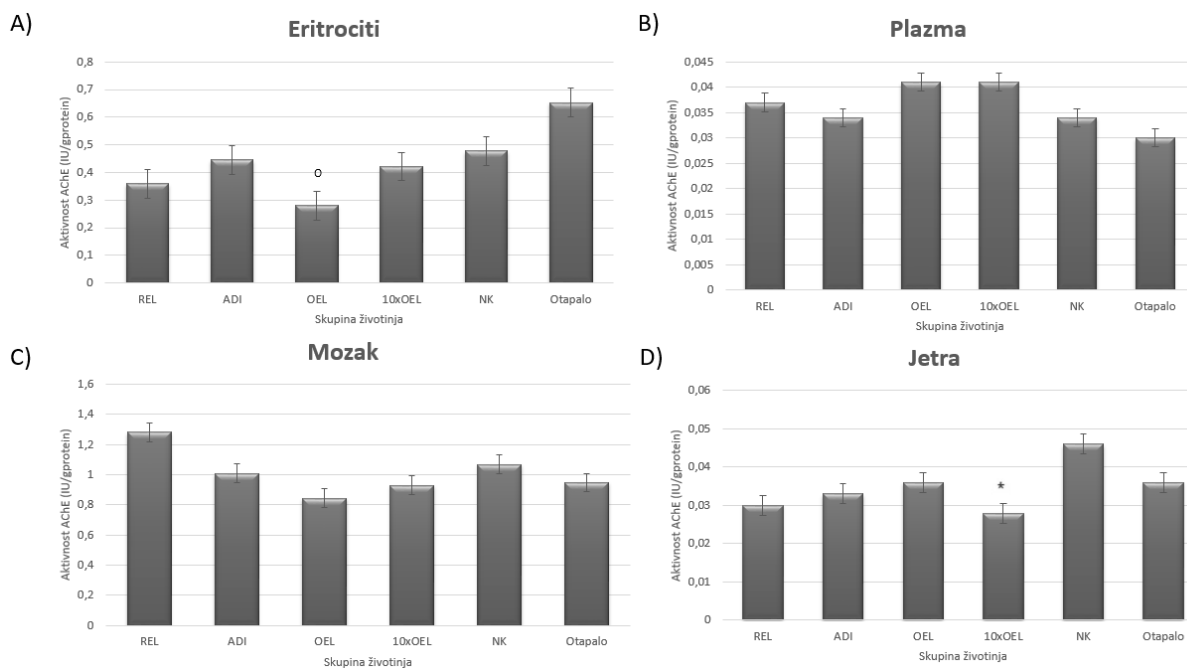
Istražen je učinak oralne primjene CPF-a tijekom 28 dana na aktivnost ukupnih ChE u plazmi te mozgu i jetri štakora (**Slika 6.**). Izloženost CPF-u nije značajno utjecala na aktivnost ukupnih ChE u plazmi i mozgu u odnosu na kontrolnu skupinu. Međutim, u jetri štakora izlaganih CPF-u uočen je veći stupanj inhibicije kolinesteraza u usporedbi s negativnom kontrolom. Inhibicija je u odnosu na negativnu kontrolu uočena u svim tretiranim skupinama, dok je najveći stupanj inhibicije ChE uočen u skupini životinja tretiranih s najvećom dozom CPF-a od 0,1572 mg/kg tjelesne težine po danu.



**Slika 6. Učinak tretmana klorpirifosom na aktivnost ukupnih kolinesteraza u plazmi (A), mozgu (B) i jetri (C) štakora.** Životinje su bile izložene dozama od 0,000374 mg/kg tjelesne težine po danu (REL), 0,01 mg/kg tjelesne težine po danu (ADI), 0,01572 mg/kg tjelesne težine po danu (OEL) i 0,1572 mg/kg tjelesne težine po danu (10xOEL). Životinje u skupini negativne kontrole tretirane su svakodnevno sa 1 ml destilirane vode, pozitivna kontrola je posljednja tri dana pokusa tretirana sa 300 mg/kg tjelesne težine po danu etilmetansulfonata (EMS), skupina otapalo tretirana je sa 1 ml 0,03%-tnog (v/v) etanola u fiziološkoj otopini. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija. Razlika između tretiranih skupina i odgovarajućih kontrola te tretiranih skupina međusobno testirana je uporabom Kruskal – Wallis testa ( $P < 0,05$ ).

#### 4.2. Učinak klorpirifosa na aktivnost acetilkolinesteraze (AChE)

Izlaganje štakora CPF-u nije dovelo do inhibitornog učinka na aktivnost AChE u plazmi (**Slika 7.**). Nasuprot tome, tretman CPF-om rezultirao je inhibicijom AChE u eritrocitima, mozgu i jetri. U eritrocitima je najveća razina inhibicije AChE uočena u skupini životinja tretiranih dozom 0,01572 mg/kg tjelesne težine po danu (OEL). U mozgu je uočena inhibicija u skupinama životinja tretiranih dozama OEL i 10xOEL. Najveća razina inhibicije vidljiva je u jetri. CPF primjenjen u svim dozama pokazao je inhibitorni učinak na aktivnost AChE u jetri, pri čemu je izloženost dozi od 10xOEL CPF-a rezultirala statistički značajnom razinom inhibicije usporedbi s negativnom kontrolom.

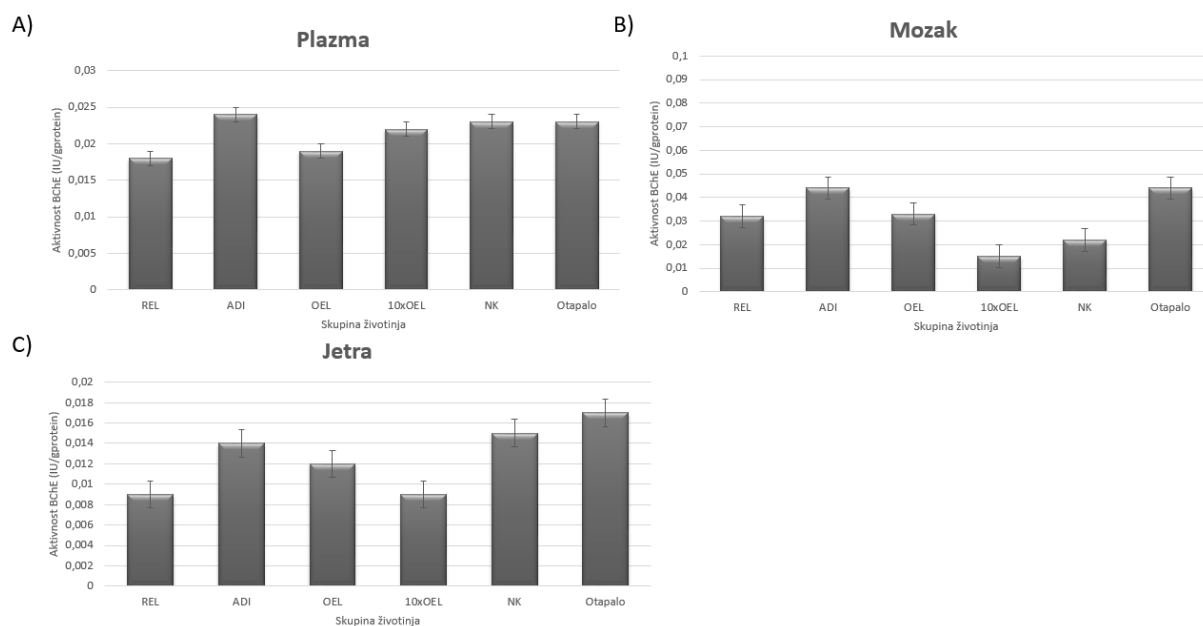


**Slika 7. Učinak tretmana klorpirifosom na aktivnost acetilkolinesteraze u plazmi (A), mozgu (B) i jetri (C) štakora.** Životinje su bile izložene dozama od 0,000374 mg/kg tjelesne težine po danu (REL), 0,01 mg/kg tjelesne težine po danu (ADI), 0,01572 mg/kg tjelesne težine po danu (OEL) i 0,1572 mg/kg tjelesne težine po danu (10xOEL) klorpirifosa *per os* tijekom 28 dana. Životinje u skupini negativne kontrole tretirane su svakodnevno sa 1 ml destilirane vode, pozitivna kontrola je posljednja tri dana pokusa tretirana sa 300 mg/kg tjelesne težine po danu etilmetansulfonata (EMS), skupina otapalo tretirana je sa 1 ml 0,03%-tnog (v/v) etanola u fiziološkoj otopini. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija. Razlika između tretiranih skupina i odgovarajućih kontrola te tretiranih skupina međusobno testirana je uporabom Kruskal – Wallis testa. Statistički značajne razlike ( $P < 0,05$ ) su: \*u usporedbi s NK; <sup>o</sup>u usporedbi sa štakorima tretiranim otapalom.

### 4.3. Učinak klorpirifosa na aktivnost butirilkolinesteraze (BChE)

CPF je pokazao inhibitorni učinak i na aktivnost BChE. U plazmi tretiranih životinja uočen je najniži stupanj inhibicije u usporedbi s mozgom i jetrom, dok je najveća inhibicija u plazmi uočena kod OEL doze od 0,01572 mg/kg tjelesne težine po danu (**Slika 8.**). Za razliku od niske razine inhibicije koju CPF ima na AChE u mozgu, nije uočen inhibitorni učinak na aktivnost BChE. Kao i u slučaju inhibicije

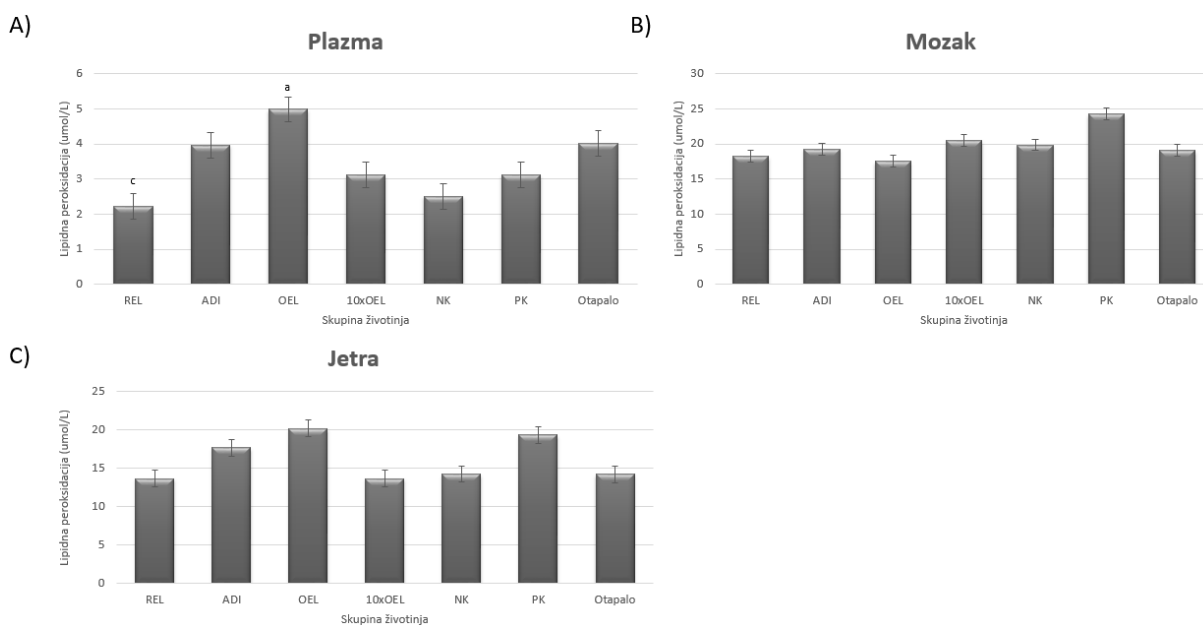
aktivnosti AchE, najveća razina inhibicije aktivnosti BChE uočena je u jetri i to u skupini životinja tretiranih s dozama od 0,000374 mg/kg tjelesne težine po danu (REL) i 0,1572 mg/kg tjelesne težine po danu (10xOEL). Međutim, te vrijednosti nisu statistički značajno odstupale u odnosu na negativnu kontrolu.



**Slika 8. Učinak tretmana klorpirifosom na aktivnost butirilkinesteraze u plazmi (A), mozgu (B) i jetri (C) štakora.** Životinje su bile izložene dozama od 0,000374 mg/kg tjelesne težine po danu (REL), 0,01 mg/kg tjelesne težine po danu (ADI), 0,01572 mg/kg tjelesne težine po danu (OEL) i 0,1572 mg/kg tjelesne težine po danu (10xOEL). Životinje u skupini negativne kontrole tretirane su svakodnevno sa 1 ml destilirane vode, pozitivna kontrola je posljednja tri dana pokusa tretirana sa 300 mg/kg tjelesne težine po danu etilmetansulfonata (EMS), skupina otapalo tretirana je sa 1 ml 0,03%-tnog (v/v) etanola u fiziološkoj otopini. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija. Razlika između tretiranih skupina i odgovarajućih kontrola te tretiranih skupina međusobno testirana je uporabom Kruskal – Wallis testa ( $P < 0,05$ ).

#### 4.4. Učinak klorpirifosa na razinu lipidne peroksidacije (LPO)

Uz učinak koji CPF ima na aktivnost ChE, ispitan je učinak na druge biomarkere njegove toksičnosti kao što je LPO (**Slika 9.**). Razine LPO izmjerene u mozgu kod svih pokusnih skupina zanemarive su u odnosu na pozitivnu kontrolu. LPO je bila povišena u plazmi i jetri. Najveća razina LPO u plazmi izmjerena je u skupini životinja tretiranih sa dozom OEL od 0,01572 mg/kg tjelesne težine po danu, ali i u skupinama koje su primale doze REL, ADI i 10xOEL u odnosu na negativnu i pozitivnu kontrolu. Također, slično kao i u plazmi, najveća razina LPO u jetri ponovo je uočena kod skupine životinja tretiranih sa dozom od 0,01572 mg/kg tjelesne težine po danu (OEL), te je određeni porast vidljiv u skupini koja je primala dozu ADI u odnosu na kontrole. Kod skupina koje su primale doze REL i 10xOEL nije zamijećen porast razine LPO.

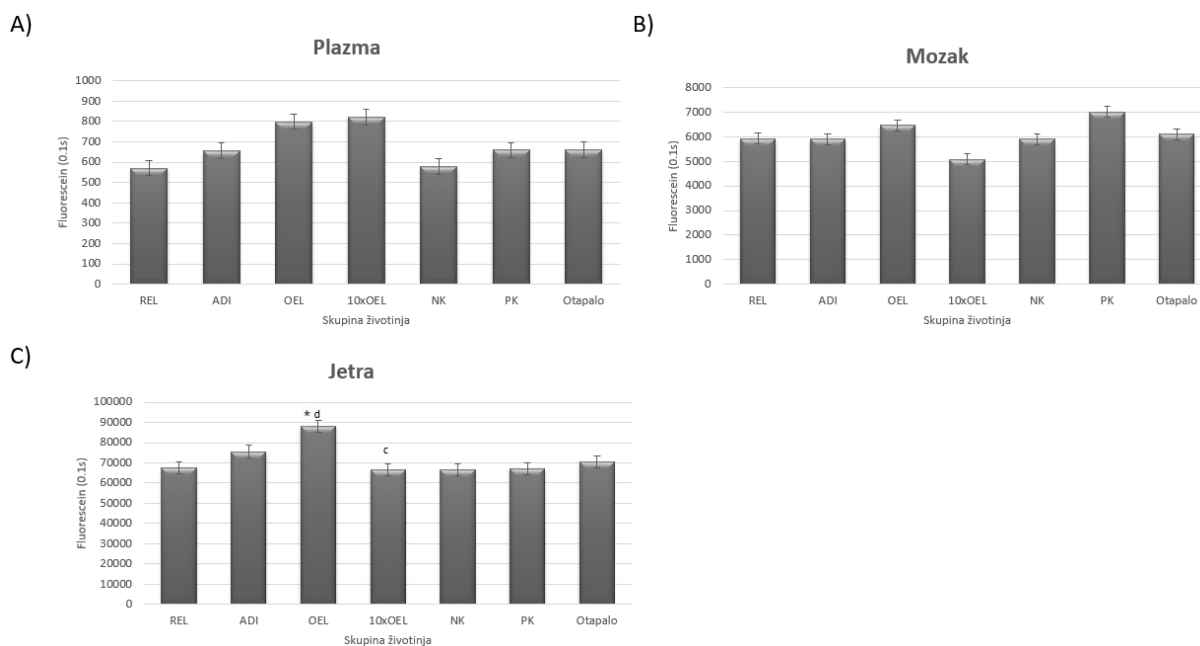


**Slika 9. Utjecaj tretmana klorpirifosom na razinu lipidne peroksidacije** u plazmi (A), mozgu (B) i jetri (C) štakora. Životinje su bile izložene dozama od 0,000374 mg/kg tjelesne težine po danu (REL), 0,01 mg/kg tjelesne težine po danu (ADI), 0,01572 mg/kg tjelesne težine po danu (OEL) i 0,1572 mg/kg tjelesne težine po danu (10xOEL) klorpirifosa per os tijekom 28 dana. Svaka skupina sadržavala je pet jedinki. Životinje u skupini negativne kontrole tretirane su svakodnevno sa 1 ml destilirane vode, pozitivna kontrola je posljednja tri dana pokusa tretirana sa 300 mg/kg tjelesne težine po danu

etilmetansulfonata (EMS ), skupina otapalo tretirana je sa 1 ml 0,03%-tnog (v/v) etanola u fiziološkoj otopini. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija. Razlika između tretiranih skupina i odgovarajućih kontrola te tretiranih skupina međusobno testirana je uporabom Kruskal – Wallis testa. Statistički značajne razlike ( $P < 0,05$ ) su: *a* u usporedbi sa skupinom životinja REL, *c* u usporedbi sa skupinom životinja OEL.

#### **4.5. Učinak klorpirifosa na količinu reaktivnih kisikovih spojeva (ROS)**

Rezultati provedenih mjerenja upućuju na porast razine ROS-ova u jetri, mozgu te u plazmi (**Slika 10.**). U plazmi je primjetno povećanje razine ROS-a u svim skupinama, osim skupine koja je primala najnižu dozu CPF-a (REL), koja iznosi 0,000374 mg/kg tjelesne težine po danu. Određeno povećanje primjetno je u skupinama koje su primale doze ADI i OEL, dok je najveće povećanje razine ROS-a vidljivo u skupini koja je primala dozu 10xOEL u odnosu na negativnu odnosno pozitivnu kontrolu. Razina ROS-ova u mozgu tretiranih životinja nije se statistički značajno razlikovala u odnosu na kontrolne skupine životinja. Iznimku čini skupina životinja tretiranih sa dozom OEL od 0,01572 mg/kg tjelesne težine po danu. Također, u jetri, kao i u mozgu najveći porast razine ROS-a primjećen je u skupini koja je primala dozu OEL u odnosu na negativnu kontrolu sa statističkom značajnošću  $P < 0,05$ . U skupini koja je primala dozu ADI također je primjetno malo, ali ipak zanemarivo povećanje razine ROS-a. Ostale skupine nisu pokazivale nikakvu promjenu u količinama reaktivnih kisikovih vrsta nakon tretmana CPF-om u odnosu na kontrole.

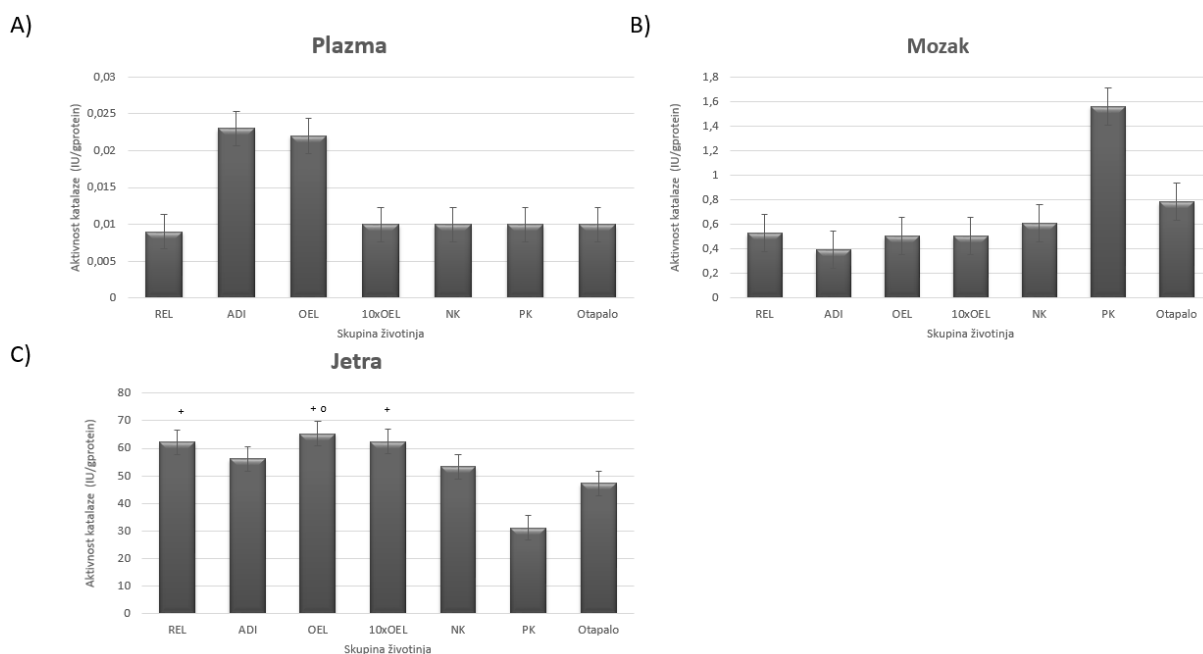


**Slika 10. Učinak tretmana klorpirifosom na ukupnu količinu reaktivnih kisikovih spojeva** u plazmi (A), mozgu (B) i jetri (C) štakora. Životinje su bile izložene dozama od 0,000374 mg/kg tjelesne težine po danu (REL), 0,01 mg/kg tjelesne težine po danu (ADI), 0,01572 mg/kg tjelesne težine po danu (OEL) i 0,1572 mg/kg tjelesne težine po danu (10xOEL). Životinje u skupini negativne kontrole (NK) tretirane su svakodnevno sa 1 ml destilirane vode, pozitivna kontrola (PK) je posljednja tri dana pokusa tretirana sa 300 mg/kg tjelesne težine po danu etilmetansulfonata (EMS), skupina otapalo tretirana je sa 1 ml 0,03%-tnog (v/v) etanola u fiziološkoj otopini. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija. Razlika između tretiranih skupina i odgovarajućih kontrola te tretiranih skupina međusobno testirana je uporabom Kruskal – Wallis testa. Statistički značajne razlike ( $P < 0,05$ ) su: \*u usporedbi s NK, c u usporedbi sa skupinom životinja OEL, d u usporedbi sa skupinom životinja 10xOEL)

#### 4.6. Učinak klorpirifosa na aktivnost katalaze (CAT)

Nakon izlaganja CPF-u, aktivnost CAT-e porasla je u plazmi i jetri dok u mozgu nije vidljiva promjena njene aktivnosti u odnosu na negativnu kontrolu (**Slika 11.**). Porast aktivnosti CAT-e u plazmi najviše je vidljiva u skupinama životinja tretiranih sa dozom od 0,01 mg/kg tjelesne težine po danu (ADI) i sa dozom od 0,01572 mg/kg tjelesne težine po danu (OEL) u odnosu na negativnu odnosno pozitivnu kontrolu. Kod skupina REL i 10xOEL nije uočena promjena u aktivnosti CAT-e u odnosu na kontrolne skupine. Aktivnost CAT-e u jetri vidljivo je

porasla u svim skupinama životinja tretiranih CPF-om, u odnosu na pozitivnu kontrolu. Statistički značajan porast aktivnosti katalaze u odnosu na negativnu i kontrolu s otapalom izmjeren je samo u jetri životinja izloženih dozama REL, OEL i 10xOEL.



**Slika 11. Učinak tretmana klorpirifosom na aktivnost katalaze u plazmi (A), mozgu (B) i jetri (C) štakora.** Životinje su bile izložene dozama od 0,000374 mg/kg tjelesne težine po danu (REL), 0,01 mg/kg tjelesne težine po danu (ADI), 0,01572 mg/kg tjelesne težine po danu (OEL) i 0,1572 mg/kg tjelesne težine po danu (10xOEL). Životinje u skupini negativne kontrole (NK) tretirane su svakodnevno sa 1 ml destilirane vode, pozitivna kontrola (PK) je posljednja tri dana pokusa tretirana sa 300 mg/kg tjelesne težine po danu etilmetansulfonata (EMS), skupina otapalo tretirana je sa 1 ml 0,03%-tnog (v/v) etanola u fiziološkoj otopini. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija. Razlika između tretiranih skupina i odgovarajućih kontrola te tretiranih skupina međusobno testirana je uporabom Kruskal – Wallis testa. Statistički značajne razlike ( $P < 0,05$ ) su: <sup>+</sup>u usporedbi s PK; <sup>o</sup>u skupini životinja tretiranih otapalom, <sup>+</sup>u usporedbi s NK.



## 5. Rasprava

Zbog rasprostranjene uporabe organofosfatnih pesticida, potreba za istraživanjem njihovog štetnog utjecaja na organizam raste. Izloženost CPF-u, kao najučestalijem pesticidu takve vrste ima niz negativnih posljedica na okoliš i ljudsko zdravlje (8). Poznat je inhibitorni učinak CPF-a na aktivnost kolinesteraza (33). Novija istraživanja ukazala su i na štetan učinak CPF-a u vidu porasta oksidacijskog stresa u organizmu (7).

Rezultati dosadašnjih istraživanja u uvjetima *in vitro* i *in vivo* potvrđuju da je glavni mehanizam toksičnosti organofosfata, tako i CPF-a, vezan za akumulaciju ACh unutar kolinergičkih sinapsi što rezultira inhibicijom AChE aktivnim CPF – oksonom. Istraživanja također pokazuju povezanost između inhibicije AChE i LPO nakon subkroničnog i kroničnog izlaganja organofosfatima. Poznato je da organofosfatni insekticidi uzrokuju oksidativni stres povećavajući stvaranje ROS-ova, koji između ostalog sudjeluju u nastanku sekundarnog oštećenja mozga. Iako je u istraživanjima većinom primjetan isti učinak na organizam, razlike u rezultatima postoje s obzirom na put unosa CPF-a u organizam (38). Pokazano je da pri subkutanoj primjeni tek jedna doza CPF-a ima učinak na muskarinske receptore u mozgu. Subkutana primjena vjerojatno uzrokuje akumulaciju CPF-a koji tada za posljedicu ima dugotrajniju inhibiciju kolinesteraza pa se ti rezultati ne mogu uspoređivati s onima gdje je CPF bio primijenjen oralnim putem (37). Modelne simulacije predviđaju da bi prilikom unosa bilo koje doze, bilo kojim putem unosa i duljinom izlaganja, koncentracija CPF-a bila najviša u krvi, potom u mozgu, te u jetri (36). Takva se predviđanja mogu objasniti razlikom metaboliziranja CPF-a u pojedinom organu, kao i kemijskom raspodjelom po tkivima. Jetra pokazuje visoki metabolički afinitet prema CPF-u, omogućujući brzu konverziju CPF-a u njegove metabolite. Nasuprot jetri, mozak ima puno niži metabolički afinitet prema CPF-u, pa stoga ni njegova koncentracija u mozgu nije visoka. Kod oralne primjene, kao u našem slučaju, može doći do zasićenja metabolizma, zbog toga što velika koncentracija CPF-a dopijeva u tkivo u relativno kratkom vremenskom periodu. U skladu s prijašnjim istraživanjima, primjena CPF-a uzrokovala je promjene u neurokemiji mozga, uz izostanak znakova sistemske toksičnosti (47).

Rezultati ovog istraživanja koji prikazuju inhibicijski učinak CPF-a na ukupne ChE u plazmi i mozgu ne upućuju na značajne promjene s obzirom na negativnu kontrolu što može biti posljedica oralne primjene CPF-a te metabolizma CPF u pojedinom organu (**Slika 6.**). U jetri je inhibicija primjetna u svim skupinama životinja, te rezultati mjerenja pokazuju porast inhibicije u ovisnosti o dozi tj. najveći stupanj inhibicije ChE uočen je u skupini životinja tretiranih s najvišom dozom CPF-a od 0,1572 mg/kg tjelesne težine po danu (10xOEL), što je u skladu sa prijašnjim istraživanjima (48).

Nasuprot rezultatima inhibicije ChE, inhibicija AChE primjetna je u eritrocitima, mozgu i jetri (**Slika 7.**). U eritrocitima, najveća inhibicija uočena je kod doze od 0,01572 mg/kg tjelesne težine po danu (OEL). Unatoč tome, najveća razina inhibicije nije utvrđena u skupini životinja tretiranih s deset puta većom dozom CPF-a, što je također moguće zbog cirkulacije spoja kroz organizam. Jetra ponovno ima najveći stupanj inhibicije, također dozno vezan, gdje je izloženost najvišoj dozi CPF-a od 10xOEL rezultirala najvećom razinom inhibicije u usporedbi s kontrolnim skupinama.

Inhibicijski učinak CPF-a na aktivnost BChE u plazmi i jetri sličan je inhibitornom učinku spoja na AChE (**Slika 8.**). U plazmi je najveća inhibicija ponovno vidljiva kod doze OEL od 0,01572 mg/kg tjelesne težine po danu, što također može biti zbog učinka cirkulacije na djelotvornost spoja. Također, najveća razina inhibicije primjetna je u jetri, gdje je najveća razina inhibicije uočena u životinja kojima su aplicirane najniža i najviša doza klorpirifosa. Razlog tome ponovno može biti cirkulacija, kao i način primjene klorpirifosa.

U dosadašnjim je istraživanjima također pokazano kako izlaganje organofosfatima doprinosi povećanju LPO u organizmu te remeti aktivnost antioksidativnih enzima (23). Istraživanja pokazuju povezanost izlaganja organofosfatnim pesticidima, kao što je CPF, s povećanim stvaranjem ROS-ova. ROS-ovi doprinose oksidacijskom stresu inicirajući LPO na membranama stanica (49). Obzirom na lipofilnost spoja, izlaganje CPF-u može rezultirati peroksidacijom višestruko nezasićenih masnih kiselina, što vodi do degradacije fosfolipida te naposljetku uništenja staničnih membrana. Stanice imaju nekoliko različitih načina za uklanjanje štete uzrokovane oksidacijskim stresom, izravno popravljajući štetu

nastalu pod utjecajem ROS-ova i LPO ili spriječavanjem oksidacijskog oštećenja neenzimatskim i enzimatskim antioksidacijskim mehanizmima (23). Enzimatski antioksidacijski mehanizmi, ukoliko ispravno funkcioniraju, imaju sposobnost neutraliziranja oksidacijskog stresa. Među njima je i CAT koja razlaže vodikov peroksid na kisik i vodu. Pokazano je da izlaganje CPF-u doprinosi povećanju ROS-ova i LPO u organizmu, dok je utjecaj na CAT-u različit od porasta CAT aktivnosti do njenog smanjenja (23,49,50). Razlog takvom utjecaju na CAT-u može biti inhibicija aktivnosti CAT od strane superoksidnih radikala koji nastaju oksidacijskim stresom (23).

Rezultati mjerenja razina ROS-ova nakon tretmana CPF-om pokazuju porast njihove koncentracije u plazmi, jetri i mozgu, što je u skladu s rezultatima prijašnjih istraživanja (50). U plazmi je primjetno najveće povećanje ROS-ova koje je raslo linearno sa dozom primijenjenog CPF-a (**Slika 9.**). U organima nije uočeno povećanje ROS-ova nakon primjene svih doza CPF-a. Kod skupine životinja tretiranih sa dozom OEL od 0,01572 mg/kg tjelesne težine po danu u mozgu, kao i u jetri, vidljivo je najveće povećanje razine ROS-ova, dok je u jetri povećanje razine ROS-ova statistički značajno uz  $P < 0,05$ . Izostanak povećanja razine ROS-ova može se pripisati djelovanju antioksidacijskih mehanizama u organizmu.

Rezultati mjerenja razine LPO upućuju na određeno povećanje u plazmi i jetri, dok kod mozga nije primjetno povećanje LPO u odnosu na pozitivnu odnosno negativnu kontrolu (**Slika 10.**). U plazmi i jetri najveće povećanje LPO primjetno je u skupini životinja tretiranih sa dozom OEL CPF-a od 0,01572 mg/kg tjelesne težine po danu. Ostale skupine životinja također su imale određen porast razine LPO u plazmi, dok u jetri najniža i najviša doza CPF-a nisu imale učinka na razine LPO, čemu razlog, kao i kod razina ROS-ova, može biti djelovanje antioksidacijskih mehanizama.

Rezultati mjerenja aktivnosti CAT-e nakon primjene CPF-a pokazuju porast aktivnosti CAT u plazmi i jetri, dok u mozgu nije primjetna promjena njene aktivnosti u odnosu na negativnu odnosno pozitivnu kontrolu (**Slika 11.**). U plazmi je porast uočljiv u dvije skupine životinja koje su primale doze ADI i OEL, dok u skupinama životinja tretiranih sa najmanjom dozom REL odnosno najvećom dozom 10xOEL CPF-a nije uočen učinak na aktivnost CAT-e. Ta se pojava može pripisati

cirkulaciji spoja kroz tijelo, ali i mogućnosti inhibicije CAT-e od strane superoksidnih radikala koji nastaju uslijed oksidacijskog stresa, što je i otprije poznato (50). Jedino je u jetri uočen porast aktivnosti CAT-e u svih skupina tretiranih životinja, te je u skupinama životinja tretiranih dozama koje odgovaraju REL, OEL i 10xOEL porast aktivnosti CAT bio statistički značajan uz  $P < 0,05$ . Razlika u utjecaju CPF-a na aktivnost CAT-e između organa može biti uzrokovana i samom razlikom metaboliziranja CPF-a u određenom organu kao i razinom ROS-ova odnosno LPO u datom trenutku u određenom organu.

## 6. Zaključak

U ovom radu istražen je učinak subkronične izloženosti štakora niskim dozama CPF-a na biokemijske markere toksičnosti. Potvrđeno je da CPF ima inhibicijski učinak kako na aktivnost AChE tako i na aktivnost BChE. Također, potvrđen je učinak CPF-a na razinu oksidacijskog stresa u organizmu kroz povećanje razina ROS-ova i LPO, te porasta aktivnosti antioksidacijskog enzima CAT-e. Iako rezultati prikazuju štetan učinak subkroničnog izlaganja CPF-u na organizam, potreban je nastavak istraživanja u vidu kroničnog izlaganja, kako bi se nedvojbeno potvrdili navedeni zaključci. Također potrebno je bolje istražiti metabolizam CPF-a u krvi te svakom pojedinom organu, kako bi se objasnila odstupanja u rezultatima kod određenih, pogotovo visokih i niskih, doza klorpirifosa.

## 7. Literatura

1. Heikal TM, H. Mossa A-T. Cyromazine and Chlorpyrifos Induced Renal Toxicity in Rats: The Ameliorated Effects of Green Tea Extract. *J Environ Anal Toxicol.* 2012;02(05).
2. Eissa FI, Mahmoud HA, Massoud ON, Ghanem KM, Gomaa IM. Biodegradation of chlorpyrifos by microbial strains isolated from agricultural wastewater. *J Am Sci.* 2014;10(3):98–108.
3. Noaishi MA, Allah AAA, Afify MM. Oral and dermal exposure of chlorpyrifos and cypermethrin mixture induced cytogenetic, histopathological damage and oxidative stress in rats. *J Am Sci.* 2013;9(3).
4. Team of university extension educators, state lead agency personnel, US Environmental Protection Agency personnel, and private industry. *National Pesticide Applicator Certification Core Manual, 2nd Edition, 2014.*
5. *Journal of Basic Microbiology, Review; Biodegradation of chlorpyrifos by bacterial genus Pseudomonas.*
6. Heikal TM, El-Sherbiny M, Hassan SA, Arafa A, Ghanem HZ. Antioxidant effect of selenium on hepatotoxicity induced by chlorpyrifos in male rats. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2012;4(4):603–9.
7. Singh S, Kaur S, Budhiraja RD. Chlorpyrifos-induced oxidative stress in rat's brain and protective effect of grape seed extract. 2013.
8. Robert Ryan, Claude Terry. *Toxicology Desk Reference: The Toxic Exposure & Medical Monitoring Index.*
9. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. *The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard, 2009.*
10. John Flaskos. The developmental neurotoxicity of organophosphorus insecticides: A direct role for the oxon metabolites. *Toxicol Lett.*
11. Olga A. Timofeeva, Edwaed D. Levin. *Hayes' Handbook of pesticide Toxicology, Lasting Behavioral Consequences of Organophosphate Pesticide Exposure During Development.*
12. Won Jin Lee, Aaron Blair, Jane A. Hoppin, Jay H. Lubin, Jennifer A. Rusiecki, Dale P. Sandler, Mustafa Dosemeci and Michael C. R. Alavanja. *Cancer Incidence Among Pesticide Applicators Exposed to Chlorpyrifos in the Agricultural Health Study.*
13. Jane A. Hoppin, David M. Umbach, Stephanie J. London, Michael C. R. Alavanja, and Dale P. Sandler. *Chemical Predictors of Wheeze among Farmer Pesticide Applicators in the Agricultural Health Study.*

14. T. Roy Fukuto. Environmental Health Perspectives; Mechanism of Action of Organophosphorus and Carbamate Insecticides.
15. Colovic MB, Krstic DZ, Lazarevic-Pasti TD, Bondzic AM, Vasic VM. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Curr Neuropharmacol*. 2013;11(3):315–35.
16. Massoulié J, Pezzementi L, Bon S, Krejci E, Vallette F-M. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog Neurobiol*. 1993;41(1):31–91.
17. Pakaski M, Rakonczay Z, Kasa P. Reversible and irreversible acetylcholinesterase inhibitors cause changes in neuronal amyloid precursor protein processing and protein kinase C level in vitro. *Neurochem Int*. 2001;38(3):219–26.
18. Michal Rotenberg, Menachem Shefi, Sanda Dany, Ilana Dore, Moshe Tirosh, Shlomo Almog. Differentiation between organophosphate and carbamate poisoning. *Clin Chim Acta* 234, 1995;11-21.
19. Susan L. Connors, MD, Pat Levitt, PhD, Stephen G. Matthews, PhD, Theodore A. Slotkin, PhD, Michael V. Johnston, MD, Hannah C. Kinney, MD, William G. Johnson, MD, Rosa M. Dailey, BAΦ, Andrew W. Zimmerman, MD. *Pediatric Neurology, Fetal Mechanisms in Neurodevelopmental Disorders*.
20. Çokuğraş AN. Butyrylcholinesterase: structure and physiological importance. *Turk J Biochem*. 2003;28(2):54–61.
21. Lucio G. Costa. *Clinical Chimica Acta; Current issues in organophosphate toxicology*.
22. John E. Casida, Daniel K. Nomura, Sarah C. Vose, Kazutoshi Fujioka. *Chemico-Biological Interactions; Organophosphate-sensitive lipases modulate brain lysophospholipids, ether lipids and endocannabinoids*.
23. Altuntas I, Delibas N, Sutcu R. The effects of organophosphate insecticide methidathion on lipid peroxidation and anti-oxidant enzymes in rat erythrocytes: role of vitamins E and C. *Hum Exp Toxicol*. 2002;21(12):681–5.
24. Ray PD, Huang B-W, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal*. 2012;24(5):981–90.
25. Apel K, Hirt H. REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu Rev Plant Biol*. 2004;55(1):373–99.
26. Held P. An introduction to reactive oxygen species. *BioTek White Pap*. 2010;1–14.
27. Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;338(1):668–76.

28. Boots AW, van Berkel JJBN, Dallinga JW, Smolinska A, Wouters EF, van Schooten FJ. The versatile use of exhaled volatile organic compounds in human health and disease. *J Breath Res.* 2012;6(2):027108.
29. Chelikani P, Fita I, Loewen PC. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 2004;61(2):192–208.
30. P. Z, A. R, W. J, Cho J, Henderson M, T. T. Current Therapeutic Modalities, Enzyme Kinetics, and Redox Proteomics in Traumatic Brain Injury. In: Sadaka F, editor. *Traumatic Brain Injury.* InTech; 2014.
31. P. Z, A. R, W. J, Cho J, Henderson M, T. T. Current Therapeutic Modalities, Enzyme Kinetics, and Redox Proteomics in Traumatic Brain Injury. In: Sadaka F, editor. *Traumatic Brain Injury.* InTech; 2014.
32. Sultatos LG. Mammalian toxicology of organophosphorus pesticides. *J Toxicol Environ Health.* 1994;43(3):271–89.
33. James W. Albers, Philip Cole, Raymo. Analysis of chlorpyrifos exposure and human health: expert panel report. *J Toxicol Environ Health Part B.* 1999;2(4):301–24.
34. Carey N. Pope. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews, Volume 2, Issue 2, 1999; Organophosphorus pesticides: do they all have the same mechanism of toxicity?*
35. Singleton ST, Lein PJ, Dadson OA, McGarrigle BP, Farahat FM, Farahat T, et al. Longitudinal assessment of occupational exposures to the organophosphorous insecticides chlorpyrifos and profenofos in Egyptian cotton field workers. *Int J Hyg Environ Health.* 2015;218(2):203–11.
36. Ellison CA, Smith JN, Lein PJ, Olson JR. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of chlorpyrifos in adult male Long-Evans rats following repeated subcutaneous exposure to chlorpyrifos. *Toxicology.* 2011;287(1-3):137–44.
37. Moser VC, Padilla S, Hunter DL, Marshall RS, McDaniel KL, Phillips PM. Age- and gender-related differences in the time course of behavioral and biochemical effects produced by oral chlorpyrifos in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1998;149(1):107–19.
38. Nostrandt AC, Padilla S, Moser VC. The relationship of oral chlorpyrifos effects on behavior, cholinesterase inhibition, and muscarinic receptor density in rat. *Pharmacol Biochem Behav.* 1997;58(1):15–23.
39. Carr RL, Nail CA. Effect of Different Administration Paradigms on Cholinesterase Inhibition following Repeated Chlorpyrifos Exposure in Late Prewanling Rats. *Toxicol Sci.* 2008;106(1):186–92.
40. Timchalk C, Poet TS, Kousba AA. Age-dependent pharmacokinetic and pharmacodynamic response in preweanling rats following oral exposure to the organophosphorus insecticide chlorpyrifos. *Toxicology.* 2006;220(1):13–25.



41. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 1961;7(2):88–95.
42. Josephine A. Drury, Julie A. Nycyk, Richard W.I. Cooke. Comparison of urinary and plasma malondialdehyde in preterm infants. *Clin Chim Acta*, 263,1997;177-185.
43. D. J. Socci, K. B. Bjugdstad, H. C. Jones, J. V. Pattisapu, G. W. Arendash. Evidence That Oxidative Stress Is Associated with the Pathophysiology of Inherited Hydrocephalus in the H-Tx Rat Model. *Exp Neurol*,155,1999;109-117.
44. Aebi Hugo. [13] Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105,1984;121-126.
45. Drabkin DL. Spectrophotometric studies XIV. The crystallographic and optical properties of the hemoglobin of man in comparison with those of other species. *J Biol Chem.* 1946;164(2):703–23.
46. Marion M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Analytical Biochemistry Volume 72, Issues 1–2, 7,1976, Pages 248-254.*
47. Betancourt AM. The Effect of Chlorpyrifos and Chlorpyrifos-Oxon on Brain Cholinesterase, Muscarinic Receptor Binding, and Neurotrophin Levels in Rats Following Early Postnatal Exposure. *Toxicol Sci.* 2003;77(1):63–71.
48. Chanda SM, Mortensen SR, Moser VC, Padilla S. Tissue-specific effects of chlorpyrifos on carboxylesterase and cholinesterase activity in adult rats: an in vitro and in vivo comparison. *Toxicol Sci.* 1997;38(2):148–57.
49. Tuzmen N, Candan N, Kaya E, Demiryas N. Biochemical effects of chlorpyrifos and deltamethrin on altered antioxidative defense mechanisms and lipid peroxidation in rat liver. *Cell Biochem Funct.* 2008;26(1):119–24.
50. Mansour SA, Mossa A-TH. Lipid peroxidation and oxidative stress in rat erythrocytes induced by chlorpyrifos and the protective effect of zinc. *Pestic Biochem Physiol.* 2009;93(1):34–9.

# Životopis

## OSOBNNE INFORMACIJE

Šrajbek Margita

📍 Šetalište 150 brigade 10., 10000 Zagreb (Hrvatska)

☎ (+385) 91 16 12 743

✉ margita.srajbek@gmail.com

## OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

ožujka 16–lipnja 16

izrada diplomskog rada

Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Odjel za toksikologiju, Zagreb (Hrvatska)

Tema: "Biokemijski markeri subkronične toksičnosti klorpirifosa u štakora"

Mentor: dr. sc. Suzana Žunec

Komentor: prof. dr. sc. Ana Lucić Vrdoljak

1 listopada 14–danas

diplomski studij "Biotehnologija u medicini"

Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci, Rijeka (Hrvatska)

Predmeti: Stanična terapija, Tkivno inženjerstvo, Personalizirana medicina, Metode u DNA tehnologijama, Razvoj i registracija lijeka

10 srpnja 14

prvostupnik Biotehnologije i istraživanja lijekova

Odjel za Biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci, Rijeka (Hrvatska)

univ. bacc. biotech. et pharm. inv.

1 listopada 11–10 srpnja  
14

preddiplomski studij Biotehnologije i istraživanja lijekova

Odjel za Biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci, Rijeka (Hrvatska)

Predmeti: Stanična i molekularna biologija, Biokemija, Organska kemija, Imunologija, Mikrobiologija, Farmakognozija, Analitička kemija, Bioeseji u istraživanju lijekova, Farmakologija...

## RADNO ISKUSTVO

23 lipnja 14–7 srpnja 14

Studentska stručna praksa

Jadran - Galenski laboratorij, Rijeka (Hrvatska)

mentor: Voditeljica odjela za kontrolu kvalitete Jasmina Uljan

## OSOBNNE VJEŠTINE

Materinski jezik

hrvatski

Ostali jezici	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
Engleski	C2	C1	C2	C1	C1

Stupnjevi: A1 i A2: Početnik - B1 i B2: Samostalni korisnik - C1 i C2: Iskusni korisnik

Zajednički europski referentni okvir za jezike

Komunikacijske vještine Komunikacijske i organizacijske vještine stečene kroz rad i volontiranje na različitim projektima. Prezentacijske vještine stečene kroz studij.

Organizacijske / rukovoditeljske vještine

Vođenje grupa studenata na znanstvenom natjecanju Tetragon 2013.,2014. i 2015. godine

Sudjelovanje na festivalu znanosti u sklopu dana otvorenih vrata Odjela za biotehnologiju

Organizacija brucešijade Odjela za biotehnologiju i Sveučilišnih odjela

Organizacija i koordinacija volontera na Student day festivalu

Voditeljica karnevalske grupe Kampus

Voditeljica organizacije zabavnih sadržaja Udruge studenata biotehnologije

Sudjelovanje u case study natjecanju Jadran-Galenskog laboratorija

Sudjelovanje na Event management contest CocaCola kompanije

Sudjelovanje na projektu 100% pRirodno i časopisa Biotech - znanost u društvu

Zamjenica predstavnika studentskog zbora Odjela za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci

Sudjelovanje u projektu Putujući znanstvanici

Poslovne vještine

Upoznata s načelom rada odjela za Kontrolu kvalitete tijekom trajanja prakse u Jadran Galenskom Laboratoriju

Digitalna kompetencija

SAMOPROCJENA				
Obrada informacija	Komunikacija	Stvaranje sadržaja	Sigurnost	Rješavanje problema
Iskusni korisnik	Iskusni korisnik	Samostalni korisnik	Iskusni korisnik	Samostalni korisnik

Informacijsko-komunikacijske tehnologije - tablica za samoprocjenu

Dobro poznavanje rada na računalu; Vladanje alatima Microsoft Office-a (Word, Excel, PowerPoint, Access); Poznavanje rada u programu Statistica; Osnovno znanje programiranja u programu c++; Poznavanje rada programa: Chimera, Avogadro, SciDAVis, Marvin, PyMOL

Poznavanje statističke obrade podataka, programi Statistica i MedCalc

Vozačka dozvola B

#### DODATNE INFORMACIJE

- Članstva članica Udruge studenata biotehnologije Sveučilišta u Rijeci od 26. travnja 2014. do danas  
članica Studentskog Zbora Sveučilišta u Rijeci od 11. srpnja. 2014. - danas  
članica Studentskog zbora Odjela za biotehnologiju 20. svibnja 2014. - danas
- Konferencije Budućnost i perspektiva studija, 3. prosinac 2015
- Priznanja i nagrade Titula Naj-osiguravateljii, zahvalnica za sudjelovanje na Case study competition-u Jadran Galenskog Laboratorija, 07.01.2015  
Pohvalnica pročelnika Odjela za biotehnologiju za sudjelovanje u aktivnostima 13. Festivala znanosti (projekt Tetragon), travanj 2015.  
Pohvalnica pročelnika Odjela za biotehnologiju za sudjelovanje u aktivnostima 12. Festivala znanosti (projekt Tetragon), travanj 2014.  
Pohvalnica pročelnika Odjela za biotehnologiju za sudjelovanje u aktivnostima 11. Festivala znanosti (projekt Tetragon), travanj 2013.
- Projekti Organizacija i sudjelovanje u projektima Odjela za biotehnologiju, Udruge studenata biotehnologije i Studentskog zbora sveučilišta u Rijeci; Festival znanosti, natjecanje Tetragon, 100% pRirodno - proizvodnja prirodne kozmetike, "Biotech - znanost i društvo" -časopis studenata Odjela za biotehnologiju, Karnevalska grupa Kampus, Student day festival, Putujući znanstvenici - projekt popularizacije prirodnih znanosti u osnovnim školama

## Kratice:

%	postotak
°C	stupanj Celsius
μl	mikrolitar ( $10^{-6}$ L)
μM	mikromolarni ( $10^{-6}$ M)
AChE	acetilkolinesteraza
ADI	acceptable daily intake
AU	arbitrarne jedinice
BChE	kolinestreraza
BHT	butilirani hidroksitoluen
BSA	goveđi serumski albumin
CAT	katalaza
ChE	butirilkolinestreraza
CPF	klorpirifos
CPF - okson	klorpirifos - okson
DCF - DA	2,7,-dikloroflorescin diacetat
DEP	dietilfosfat
DHE	dihidroetidij
DTNB	5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzojeva kiselina)
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
EMS	etilmetanosulfonat
EtOH	etanol
g	gram
GPx	glutation peroksidaza
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	vodikov peroksid
kg	kilogram
LPO	lipidna peroksidacija
MDA	malondialdehid
mg	miligram
mL	mililitar ( $10^{-3}$ L)
mM	milimolarni ( $10^{-3}$ L)
OEL	occupational exposure limit
PBS	fosfatni pufer

PON 1	paraoksonaza 1
REL	residential exposure level
ROS	reaktivni kisikovi spojevi
SOD	superoksid dismutaza
t.t/dan	tjelesna težina po danu
TBA	tiobarbituratna kiselina
TBARS	tiobarbituratni reaktivni spojevi
TCP - y	3,5,6 trikloropiridinol
TMP	1,1,3,3-tetrametoksipropan
v/v	volumen/volumen
w/v	težina/volumen