

UNIVERZITET U BEOGRADU  
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Mirjana B. Čolović

**BIOANALITIČKE METODE ZA  
DETEKCIJU I EVALUACIJU  
TOKSIČNOSTI ORGANO-TIOFOSFATNIH  
INSEKTICIDA I PROIZVODA NJIHOVE  
DEGRADACIJE**

doktorska disertacija

Beograd, 2014.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Mirjana B. Čolović

**BIOANALYTICAL METHODS FOR  
DETECTION AND TOXICITY  
EVALUATION OF ORGANO-  
THIOPHOSPHOROUS INSECTICIDES  
AND THEIR DEGRADATION PRODUCTS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014.

**Mentori:** dr Gordana Ušćumlić, redovni profesor  
Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Vesna Vasić, naučni savetnik  
Institut za nuklearne nauke „Vinča“, Univerzitet u Beogradu

**Članovi komisije:** dr Dušan Mijin, redovni profesor  
Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Saša Drmanić, vanredni profesor  
Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Danijela Krstić, vanredni profesor  
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

**Datum odbrane doktorske teze:** \_\_\_\_\_

*Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za fizičku hemiju Instituta za nuklearne nauke „Vinča“.*

*Zahvaljujem se:*

*mentoru, prof. dr Ušćumlić Gordani, na stručnim savetima, nesebičnoj podršci, strpljenju, razumevanju i posvećenom vremenu tokom izrade i pisanja teze,*

*mentoru, dr Vasić Vesni, na izboru teme, podršci, posvećenom vremenu tokom izrade i pisanja teze, kao i celokupnog naučno-istraživačkog rada,*

*prof. dr Krstić Danijeli na iskrenoj podršci, pomoći, uvođenju u problematiku i stručnim savetima tokom izrade eksperimentalnog dela teze i njenog pisanja,*

*prof. dr Mijin Dušanu i prof. dr Drmanić Saši na podršci i korisnim sugestijama tokom pisanja ove teze,*

*kolegama iz Laboratorije za fizičku hemiju Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, koji su mi pružali pomoć i podršku tokom izrade eksperimentalnog dela teze.*

## **BIOANALITIČKE METODE ZA DETEKCIJU I EVALUACIJU TOKSIČNOSTI ORGANO-TIOFOSFATNIH INSEKTICIDA I PROIZVODA NJIHOVE DEGRADACIJE**

U ovoj tezi su ispitani toksični efekti organo-tiofosfatnih insekticida i proizvoda njihove degradacije primenom različitih metoda kojima se mere parametri toksičnosti. Degradacijom organo-tiofosfatnih insekticida, do koje dolazi tokom fizičko-hemijskih procesa za uklanjanje organskih zagađivača iz voda, delovanjem faktora životne sredine, tokom dužeg skladištenja preparata insekticida ili sterilizacijom hrane, nastaju različita jedinjenja koja često poseduju jači toksični potencijal od polaznih insekticida. Proizvodi degradacije nisu ciljani analiti tokom kontrole prisustva insekticida, a i njihova detekcija primenom klasičnih analitičkih metoda je skupa, komplikovana i dugotrajna i ne može da predvidi toksične efekte na osnovu identifikovanog sastava. Znatno pogodnija je primena bioeseja koji detektuju prisustvo toksičnih proizvoda degradacije na osnovu promene odgovarajućih parametara i istovremeno daju informaciju o njihovom toksičnom potencijalu.

Za procenu neurotoksičnog potencijala ispitivanih organofosfatnih jedinjenja i njihovu detekciju modifikovan je standardni esej na bazi acetilholinesteraze, koji je unapredjen u cilju snižavanja limita detekcije organofosfata. Konstruisan je i protočni biosenzor sa imobilizovanom acetilholinesterazom koja se može koristiti više puta tokom nekoliko meseci, što ovaj sistem čini ekonomičnijim u odnosu na šaržni esej. U cilju povećanja osetljivosti standardnog eseja i biosenzora na prisustvo organo-tiofosfata, korišćeno je oksidaciono sredstvo, *N*-bromo sukcinimid koji tio oblike prevodi u okso koji dovode do pada aktivnosti enzima pri znatno nižim koncentracijama. Testirano je i simultano dejstvo organo-tiofosfata i njihovih okso i izo analoga.

U tezi su analizirani diazinon, malation, hlorpirifos, organo-tiofosfati koji se primenjuju kao preparati insekticida, i proizvodi njihove oksidacije, hidrolize i izomerizacije.

Organo-tiofosfatni insekticid diazinon je tretiran UV svetlošću, koja se koristi za uklanjanje organskih zagađivača u procesima za prečišćavanje voda. Hromatografski je praćena razgradnja polaznog jedinjenja i nastajanje proizvoda hidrolize tokom 115

minuta ozračivanja diazinona. Ispitano je neurotoksično, prooksidativno, genotoksično i citotoksično dejstvo ozračenih rastvora, kao i samog diazinona i identifikovanog proizvoda njegove fotohemijske degradacije. U tom cilju, određivana je aktivnost acetilholinesteraze, Na,K-ATPaze, sadržaj malondialdehida-indikator prooksidativnog delovanja i lipidnog oštećenja membrane, učestalost mikronukleusa-parametar ozleda genetskog materijala i indeks ćelijske proliferacije-indikator citotoksičnog dejstva u kulturama humanih limfocita, eritrocita i fibroblasta.

Sinaptozomi izolovani iz mozga pacova su korišćeni za ispitivanje toksičnog potencijala diazinona i proizvoda njegove oksidacije (diazoksona) i hidrolize (2-izopropil-6-metil-4-pirimidinola). Neurotoksični efekti su praćeni merenjem aktivnosti acetilholinesteraze, potencijal za generisanje reaktivnih vrsta kiseonika određivanjem aktivnosti antioksidantnih enzima (katalaze, glutation peroksidaze i superoksid dismutaze) i sadržaja malondialdehida, dok su citotoksični efekti diazinona i njegovih derivata procenjeni na osnovu aktivnosti laktat dehidrogenaze kao biomarkera oštećenja tkiva. Ispitan je i uticaj na aktivnost membranskog enzima Na,K-ATPaze, indikatora toksičnog delovanja.

**Ključne reči:** organo-tiofosfatni insekticidi, degradacija, acetilholinesteraza, biosenzor, oksidacija, Na,K-ATPaza, genotoksičnost, citotoksičnost, prooksidativno dejstvo.

Naučna oblast: hemija i hemijska tehnologija

UDK broj: 541.69 : 543.393

## **BIOANALYTICAL METHODS FOR DETECTION AND TOXICITY EVALUATION OF ORGANO-THIOPHOSPHOROUS INSECTICIDES AND THEIR DEGRADATION PRODUCTS**

Toxic effects of organo-thiophosphorous insecticides and their degradation products have been investigated in this dissertation using various methods for the determination of toxicity parameters. Organo-thiophosphorous insecticides can be degraded during physico-chemical processes for the removal of organic pollutants from wastewaters, insecticides storage, food sterilisation, as well as under the influence of environmental factors. The formed degradation products are not the aimed analytes during insecticides control, and their detection using analytical methods is expensive, complicated and longterm. Additionally, toxic effects of the identified compounds cannot be evaluated. Therefore, the application of bioassays, which detect the degradation products on the basis of the modification of appropriate parameters and give the information about their toxic potential, is considerably suitable.

The standard acetylcholinesterase assay has been modified for the evaluation of neurotoxic potential of the investigated organophosphorous compounds and the reduction of their limit of detection. Besides, flow injection analysis biosensor based on immobilized acetylcholinesterase has been constructed. The immobilized enzyme can be used more times during several months, making the biosensor more economical related to the batch system. In order to increase the sensitivity of the biosensor, *N*-bromosuccinimide has been used. Actually, this oxidant transforms thio forms of organophosphates to oxo analogs causing the decrease of the enzyme activity at lower concentrations. The simultaneous influence of the organo-thiophosphates and their oxo and iso analogs has been investigated as well.

In this thesis, diazinon, malathion, chlorpyrifos-organophosphates being applied as insecticides, and the products of their oxidation, hydrolysis and isomerisation have been tested.

Organo-thiophosphorous insecticide diazinon has been treated with UV light that is applied in purification processes for the removal of organic pollutants from wastewaters. The decomposition of the parent organo-thiophosphate and forming the hydrolysis product during 115 minute irradiation has been monitored using

chromatographic methods. It has been investigated neurotoxic, prooxidative, genotoxic and cytotoxic effects of the irradiated diazinon solutions, as well as various concentrations of diazinon and the identified product of diazinon photochemical degradation. For these purposes, it has been determined acetylcholinesterase and Na,K-ATPase activity, malondialdehyde content-indicator of prooxidative influence and lipid membrane damage, incidence of micronuclei-biomarker of genetic damage, and cell proliferation index-indicator of cytotoxic influence in human lymphocytes, erythrocytes and fibroblasts.

Synaptosomes isolated from rat brain have been used for the investigation of toxic potentials of diazinon and their oxidation and hydrolysis products, diazoxon and 2-isopropyl-6-methyl-4-pyrimidinol. Neurotoxic effects have been followed by the determination of acetylcholinesterase activity. Potential for the generation of reactive oxygen species has been monitored by the determination of antioxidant enzymes (catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase) activity and malondialdehyde content. Cytotoxic effects of diazinon and its derivatives have been evaluated using lactate dehydrogenase activity as the biomarker of tissue damage. Additionally, the influence of the investigated compounds on the activity of Na,K-ATPase, the membrane enzyme has been tested.

**Key words:** organo-thiophosphorous insecticides, degradation, acetylcholinesterase, biosensor, oxidation, Na,K-ATPase, genotoxicity, cytotoxicity, prooxidative effect.

Area of science: chemistry and chemical technology

UDC number: 541.69 : 543.393



## Lista skraćenica

ACh, acetilholin  
AChE, acetilholinesteraza  
ADP, adenzin-difosfat  
AOP, unapredeni procesi oksidacije (*advanced oxidation processes*)  
ASChI, acetiltioholin-jodid  
ATP, adenzin-trifosfat  
BN, binukleus  
BSA, goveđi serum albumin (*bovine serum albumin*)  
BuChE, pseudoholinesteraza; butirilholinesteraza  
CAT, katalaza  
CB, citokinezis-blok  
CBPI, citokinezis-blok proliferativni indeks, indeks ćelijske proliferacije  
CES(s), karboksilesteraza(e)  
CoA, koenzim A  
CPG, *controlled pore glass*  
DFP, diizopropilfluorofosfat  
DNK, dezoksiribonukleinska kiselina  
DTNB, 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoeva kiselina)  
EDTA, etilen-diamin-tetra sirćetna kiselina  
FIA, *flow injection analysis*  
GC-MS, gasna hromatografija-masena spektrometrija (*gass chromatography-mass spectrometry*)  
GPx, glutation peroksidaza  
GSH, glutation redukovani  
GSSG, glutation-disulfid, oksidovani glutation  
HPLC, *high performance liquid chromatography*  
IMP, 2-izopropil-6-metil-4-pirimidinol  
LDH, laktat dehidrogenaza  
LOD, granica detekcije (*limit of detection*)  
MDA, malondialdehid

MN, mikronukleusi

NADH, nikotinamid adenin dinukleotid redukovani

NAD<sup>+</sup>, nikotinamid adenin dinukleotid

NADPH, nikotinamid adenin dinukleotid fosfat redukovani

Na,K-ATPaza, natrijum kalijum adenzotrifosfataza, pumpa za natrijum i kalijum

NBS, *N*-bromo-sukcinimid

2-PAM, 2-hidroksiiminometil-1-metilpiridinijum-jodid

PTE(s), fosfotriesteraza(e)

ROS, reaktivne vrste kiseonika (*reactive oxygen species*)

SDS, natrijum-dodecil-sulfat

SOD, superoksid dismutaza

TLS, *thermal lens spectrometry*

THP, 3,5,6-trihloro-2-piridinol

UPLC, *ultra performance liquid chromatography*

UV/Vis, ultraljubičasta/vidljiva (oblast)

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. OPŠTI DEO</b> .....	3
2.1 Organofosfatna jedinjenja.....	3
2.2 Acetilholinesteraza – struktura i katalitička funkcija.....	6
2.2.1 Ireverzibilna inhibicija acetilholinesteraze organofosfatnim jedinjenjima.....	10
2.2.2 Regeneracija aktivnosti acetilholinesteraze inhibirane organofosfatima.....	12
2.2.3 Detoksikacija organofosfatnih insekticida hidrolizom katalizovanom enzimima.....	14
2.3 Nespecifični toksični efekti organofosfata.....	16
2.3.1 Lipidna peroksidacija kao parametar toksičnog dejstva.....	17
2.3.2 Antioksidacioni zaštitni sistem.....	20
2.3.3 Na, K-ATPaza.....	23
2.3.4 Testiranje genotoksičnosti određivanjem učestalosti mikronukleusa.....	26
2.4 Degradacija organofosfatnih insekticida.....	27
2.4.1 Transformacija organofosfatnih insekticida u životnoj sredini.....	27
2.4.2 Degradacija organofosfatnih insekticida u unapredjenim procesima oksidacije za prečišćavanje voda.....	28
2.5 Bioanalitičke metode za praćenje toksičnosti tokom unapredjenih procesa oksidacije za uklanjanje organofosfatnih insekticida.....	29
2.5.1 Acetilholinesterazni biosenzor za detekciju i procenu toksičnosti organofosfata i proizvoda njihove transformacije.....	32
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	36
3.1 Hemikalije.....	36
3.1.1 Enzimi i hemikalije za enzimске eseje.....	36
3.1.2 Insekticidi.....	36

3.1.3 Hemikalije za ispitivanje genotoksičnosti i citotoksičnosti.....	39
3.2 Korišćena oprema.....	39
3.2.1 Spektrofotometrijska merenja.....	39
3.2.2 Tečna hromatografija.....	39
3.2.3 Gasna hromatografija.....	39
3.2.4 Centrifugiranje.....	39
3.2.5 Mikroskopija.....	40
3.2.6 Ostala laboratorijska oprema.....	40
3.3 Izolovanje sinaptozoma iz mozga pacova.....	40
3.4 Izolovanje membrana eritrocita iz humane krvi.....	41
3.5 Kulture limfocita i eritrocita.....	41
3.6 Kulture fibroblasta.....	42
3.7 Određivanje aktivnosti enzima.....	42
3.7.1 Određivanje aktivnosti acetilholinesteraze.....	42
3.7.2 Određivanje aktivnosti Na,K-ATPaze.....	43
3.7.2.1 Određivanje aktivnosti Na,K-ATPaze preko oslobođenog ortofosfata.....	43
3.7.2.2 Određivanje aktivnosti Na,K-ATPaze preko oslobođenog ADP.....	44
3.7.3 Određivanje aktivnosti katalaze.....	44
3.7.4 Određivanje aktivnosti glutacion peroksidaze.....	45
3.7.5 Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze.....	45
3.7.6 Određivanje aktivnosti laktat dehidrogenaze.....	45
3.8 Određivanje sadržaja malondialdehida.....	46
3.9 Genotoksičnost i citotoksičnost.....	46
3.9.1 Citokinezis-blok mikronukleusni test.....	46
3.9.2 Citokinezis-blok proliferativni indeks.....	47
3.10 Određivanje koncentracije proteina.....	47
3.11 Fotodegradacija rastvora diazinona.....	48
3.11.1 Određivanje sastava ozračenih rastvora diazinona UPLC-UV/Vis sistemom.....	48

3.11.2	Određivanje sastava ozračenih rastvora diazinona GC/MS sistemom.....	48
3.12	Imobilizacija acetilholinesteraze.....	49
3.13	Statistička obrada rezultata.....	50
<b>4.</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>53</b>
4.1	Modifikacije i unapredjenje bioanalitičkih testova na bazi acetilholinesteraze za detekciju organofosfata.....	51
4.1.1	Modifikacija Elmanove metode za praćenje aktivnosti acetilholinesteraze.....	51
4.1.1.1	Uticaj vremena preinkubacije organofosfata sa enzimom na limit detekcije.....	53
4.1.1.2	Snizavanje detekcionog limita bioeseja oksidacijom organotiofosfatnih jedinjenja.....	55
4.1.2	Detekcija organofosfata u protočnom sistemu sa imobilizovanom acetilholinesterazom.....	59
4.1.2.1	Imobilizacija acetilholinesteraze.....	61
4.1.2.2	Princip rada protocnog sistema sa imobilizovanim enzimom.....	62
4.1.2.3	Snižavanje detekcionog limita FIA sistema oksidacijom organotiofosfatnih jedinjenja.....	65
4.2	Uticaj diazinona, hlörpirifosa, malationa i proizvoda njihove degradacije na aktivnost acetilholinesteraze.....	66
4.2.1	Acetilholinesteraza izolovana iz elektricne jegulje.....	66
4.2.1.1	Inhibicija aktivnosti acetilholinesteraze iz elektricne jegulje.....	67
4.2.1.2	Kinetička analiza.....	73
4.2.2	Uticaj diazinona, hlörpirifosa, malationa i proizvoda njihove degradacije na aktivnost acetilholinesteraze iz govedih eritrocita.....	75
4.2.3	Simultano delovanje diazinona, hlörpirifosa, malationa i njihovih degradacionih proizvoda na aktivnost acetilholinesteraze.....	82
4.2.3.1	Simultano delovanje diazinona i njegovih degradacionih proizvoda.....	83

4.2.3.2	Simultano delovanje hlorthirifosa i njegovih degradacionih proizvoda.....	87
4.2.3.3	Simultano delovanje malationa i njegovih degradacionih proizvoda.....	89
4.3	Primena FIA sistema za detekciju i evaluaciju toksičnosti diazinona, hlorthirifosa, malationa i proizvoda njihove transformacije.....	92
4.4.	Toksični efekti fotodegradiranog diazinona.....	98
4.4.1	Kvalitativna i kvantitativna analiza proizvoda fotohemijski ozračenih rastvora diazinona .....	99
4.4.2	Uticaj diazinona i njegovih ozračenih rastvora na aktivnost enzima.....	102
4.4.2.1	Uticaj diazinona na aktivnost Na,K-ATPaze.....	102
4.4.2.2	Uticaj diazinona na aktivnost acetilholinesteraze.....	105
4.4.2.3	Uticaj ozračenih rastvora diazinona na aktivnost Na,K-ATPaze....	108
4.4.2.4	Uticaj ozračenih rastvora diazinona na aktivnost acetilholinesteraze.....	110
4.4.3	Proksidativne osobine diazinona i proizvoda njegove fotodegradacije...	112
4.4.3.1	Uticaj diazinona i 2-izopropil-6-metil-4-pirimidinola na sadržaj malondialdehida u humanim limfocitima.....	112
4.4.3.2	Uticaj ozračenih rastvora diazinona na sadržaj malondialdehida u humanim limfocitima.....	114
4.4.4	Genotoksični i citotoksični efekti diazinona i proizvoda njegove fotodegradacije.....	115
4.4.4.1	Genotoksični i citotoksični efekti diazinona i 2-izopropil-6-metil-4-pirimidinola.....	115
4.4.4.2	Genotoksični i citotoksični efekti ozračenih rastvora diazinona.....	119
4.5	Toksični efekti diazinona i proizvoda degradacije testirani u sinaptozimima mozga pacova.....	121
4.5.1	Citotoksični efekti diaziona i proizvoda njegove degradacije.....	121
4.5.2	Proksidativna svojstva diazinona i proizvoda njegove degradacije.....	123
4.5.3	Uticaj diazinona i proizvoda njegove degradacije na lipidnu peroksidaciju.....	125

4.5.4 Uticaj diazinona i proizvoda njegove degradacije na aktivnost Na,K-ATPaze i acetilholinesteraze.....	127
<b>5. DISKUSIJA.....</b>	<b>129</b>
<b>6. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>142</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>144</b>
<b>8. PRILOZI .....</b>	<b>164</b>
<b>Biografija.....</b>	<b>172</b>

## 1. UVOD

Insekticidno dejstvo organofosfatnih jedinjenja zasniva se na inhibiciji acetilholinesteraze koja dovodi do nakupljanja neurotransmitera acetilholina, blokade prenosa nervnih impulsa, smanjenja pokretljivosti i smrti organizama. Zbog manje štetnosti po zdravlje ljudi uglavnom se proizvode i primenjuju tito oblici organofosfata koji se u metabolizmu insekata aktiviraju i prevode u toksičnije okso i izo forme, znatno jače inhibitore acetilholinesteraze u poređenju sa odgovarajućim tito jedinjenjima. Osim primarnog toksičnog delovanja koje se vezuje za prekid neurotransmisije, organotiofosfati, kao i proizvodi njihove transformacije (oksidacije, izomerizacije i hidrolize) pokazuju i nespecifično toksično dejstvo. Zapravo, tokom akutnog, a pre svega subhroničnog ili hroničnog izlaganja, produkuju se reaktivni slobodni radikali kiseonika koji napadaju lipide, proteine i DNK, dovode do oštećenja ćelijske membrane, inaktivacije enzima, genetskog oštećenja i smrti ćelije.

U životnoj sredini, organofosfati podležu prirodnoj degradaciji koju ubrzavaju rastvoreni metali, humične supstance, mikroorganizmi i druga jedinjenja prisutna u zemljištu. Procesi degradacije organotiofosfata odigravaju se i tokom fizičko-hemijskih tretmana za uklanjanje organskih materija iz zagađenih voda, kao i tokom skladištenja preparata pod uticajem svetlosti, sunca, kiseonika i vlage. Tokom degradacije dolazi do kompletne razgradnje polaznog tito jedinjenja, ali i do nastajanja produkata sa izraženijim neurotoksičnim, genotoksičnim i citotoksičnim svojstvima. Analiza polaznog jedinjenja i svakog formiranog proizvoda klasičnim analitičkim metodama bila bi skupa, dugotrajna i neefektivna. Poslednjih decenija razvijaju se bioanalitičke metode za detekciju toksičnih jedinjenja i praćenje stepena detoksikacije i efikasnosti primenjenih tretmana za prečišćavanje voda. Bioeseji povezuju toksičnost ciljanog jedinjenja i promenu aktivnosti određenog enzima ili biomarkera, koju indukuju prisutna jedinjenja. Za procenu toksičnosti organofosfatnih jedinjenja i proizvoda njihove transformacije mogu da se koriste bioeseji koji mere aktivnost holinesteraza, sadržaj malondialdehida, incidencu mikronukleusa, indeks ćelijske proliferacije, aktivnost enzima antioksidativne zaštite, membranskih enzima, esteraza u krvi, i drugih parametara koji se menjaju i, na taj način, detektuju prisustvo toksične komponente.



Cilj ovog rada je da se ispituju i uporede neurotoksični potencijali organo-tiofosfata (malationa, dizinona i hlorspirifosa) i proizvoda njihove izomerizacije, oksidacije i hidrolize određivanjem stepena inhibicije aktivnosti acetilholiesteraze, koju indukuju ova jedinjenja modifikovanim *in vitro* bioesejem slobodnog enzima i konstruisanim protočnim biosenzorom koji sadrži acetilholinesterazu imobilizovanu na čvrstom nosaču. Radi povećanja osetljivosti ovih bioanalitičkih metoda za detekciju neurotoksičnih organofosfata, organo-tiofosfati će se tretirati oksidacionim sredstvom neposredno pre testiranja na acetilholinesterazi. Kako bi se ispitaio uticaj fotolitičkog tretmana na toksične efekte organofosfatnih insekticida, testiraće se prooksidativna i genocitotoksična svojstva ozračenih rastvora diazinona na kultivisanim humanim limfocitima, eritrocitima i fibroblastima. Dodatno, prooksidativna i citotoksična svojstva izabranog organo-tiofosfata i njegovih metabolita biće *in vitro* ispitane na sinaptozomima mozga pacova. Krajnji cilj ovih istraživanja je mogućnost primene testiranih model sistema kao bioeseja za detekciju i evaluaciju toksičnosti organofosfatnih insekticida i njihovih degradacionih proizvoda.

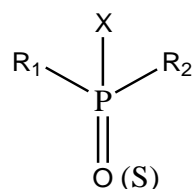
## 2. OPŠTI DEO

### 2.1 Organofosfatna jedinjenja

Pesticid je jedinjenje ili smeša jedinjenja namenjena za sprečavanje, uništavanje, odbijanje ili ublažavanje štetočina. Pesticid može biti hemijsko jedinjenje, biološki agens (virus ili bakterija), antimikrobno sredstvo, sredstvo za dezinfekciju ili uređaj koji se koristi protiv neke štetočine. U štetočine se ubrajaju insekti, biljni patogeni, korov, mekušci, ptice, sisari, ribe i mikrobi koji uništavaju imovinu, šire bolest ili su vektor za bolest ili prouzrokuju napast [1]. Pesticidi mogu da se klasifikuju prema organizmu na koji deluju (*target organism*), hemijskoj strukturi i fizičkom stanju. Najčešća podela pesticida je prema njihovoj nameni, odnosno organizmu na koji deluju na:

- insekticide - sredstva za suzbijanje štetnih insekata
- fungicide - sredstva za suzbijanje gljiva,
- baktericide - sredstva za suzbijanje bakterija,
- herbicide - sredstva za suzbijanje korova i
- regulatore rasta biljaka [2].

Organofosfatna jedinjenja su estri ili tioestri izvedeni iz fosforne kiseline (Slika 1).

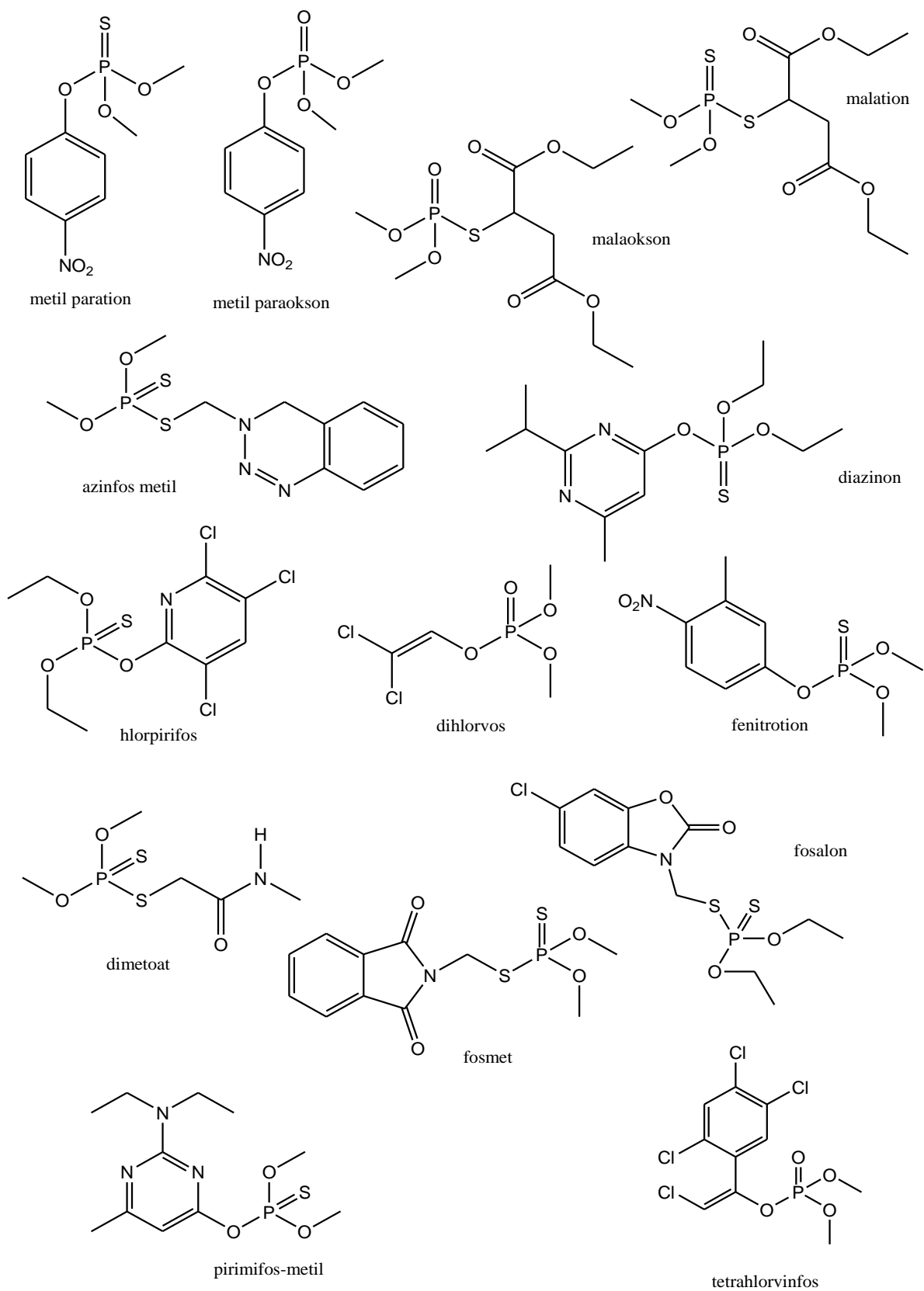


**Slika 1.** Opšta strukturna formula organofosfata.

–R<sub>1</sub> i –R<sub>2</sub> su aril ili alkil grupe koje su vezane za atom fosfora direktno (fosfinati), ili preko kiseonika ili sumpora (fosfati ili fosfotioati). U nekim slučajevima, R<sub>1</sub> je direktno vezan za atom fosfora, a R<sub>2</sub> je vezan za kiseonik ili sumpor (fosfonati ili tiofosfonati). Kod fosforamida, bar jedna od ovih grupa je –NH<sub>2</sub> (ne-, mono- ili bi-supstituisani), a atom vezan dvostrukom vezom za fosfor je kiseonik ili sumpor. –X grupa, koja je

vezana za fosfor preko kiseonika ili sumpora, može biti neki halogen, alifatična, aromatična ili heterociklična grupa. Ova "odlazeća grupa" se odvaja od atoma fosfora tokom hidrolize organofosfata fosfotriesterazama ili nakon interakcije sa proteinima. U medicini i poljoprivredi, termin "organofosfati" odnosi se na grupu insekticida i nervnih agenasa/gasova koji inhibiraju enzim acetilholinesterazu [3-5].

Organofosfati su u upotrebi kao nespecifični insekticidi preko pedeset godina radi kontrole različitih insekata u poljoprivredi i domaćinstvu. Poslednjih dvadeset godina predstavljaju najviše primenjivanu grupu insekticida. Tokom 1970-ih organohlorni insekticidi (DDT, dieldrin, aheptahlor) su zabranjeni zbog postojanosti i akumulacije u životnoj sredini i zamenjeni su razgradljivijim organofosfatima. Sinteza organofosfatnih pesticida u velikim količinama počela je posle drugog svetskog rata. Paration je bio među prvima na tržištu, a zatim malation i azinfos metil. Insekticidi koji se često koriste su etil paration, malation, metil paration, hlorspirifos, diazinon, dihlorsvos, fosmet, fenitrothion, tetrahlorsinfos, azinfos metil, pirimifos-metil, dimetoat, fosalon (Slika 2) [1, 2, 6-8]. Komercijalne formulacije organofosfatnih insekticida su uglavnom fosforotionati/fosforotioati, koje karakteriše tiono grupa (P=S) i tri -OR grupe vezane za atom fosfora. U poređenju sa oksonima (sadrže P=O grupu), organo-tiofosfati su stabilniji i bezbedniji za upotrebu [9].



**Slika 2.** Odabrani organofosfatni insekticidi.

Insekticidno dejstvo i akutni toksični efekti organofosfata su povezani sa ireverzibilnom inhibicijom acetilholinesteraze, enzima koji katalizuje hidrolizu neurotransmitera acetilholina u holinergičkim sinapsama u centralnom i perifernom nervnom sistemu [3, 5, 10-13].

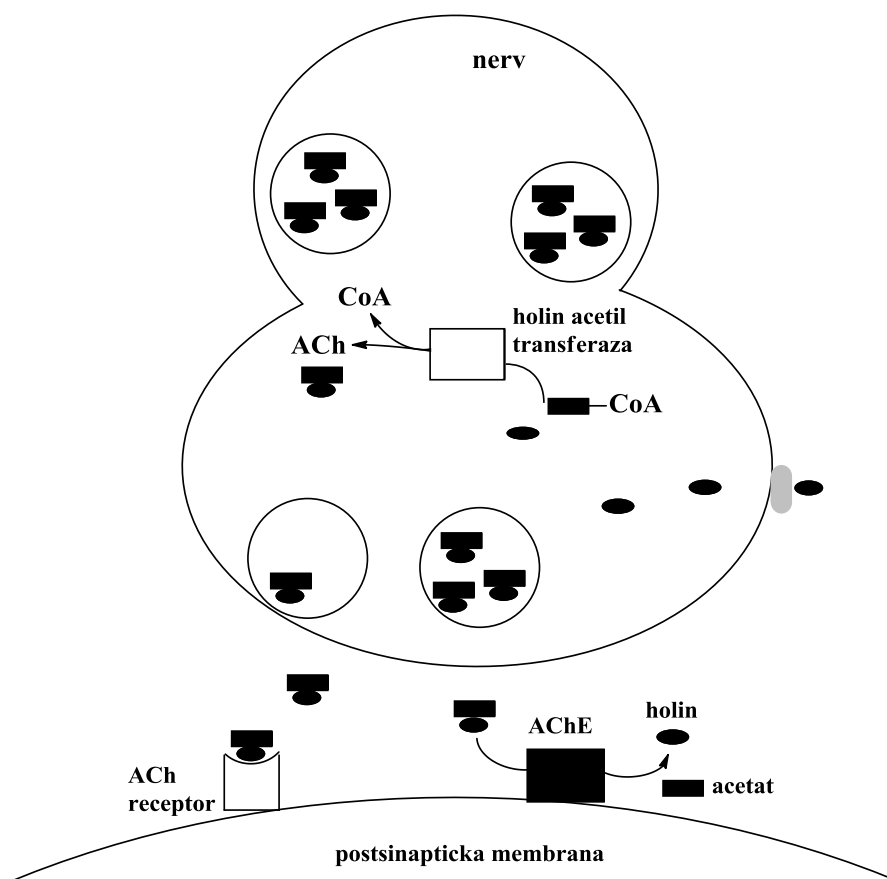
## **2.2 Acetilholinesteraza – struktura i katalitička funkcija**

Pod terminom holinesteraze podrazumeva se familija enzima koji katalizuju hidrolizu neurotransmitera acetilholina (ACh) do holina i sirćetne kiseline. Reakcija razgradnje ACh omogućava holinergičnom neuronu da se vrati u stanje relaksacije nakon aktivacije. Dva tipa enzima pripadaju holinesterazama:

1. Acetilholinesteraza (AChE, acetiholin acetilhidrolaza, E.C. 3.1.1.7) je prisutna u provodnim tkivima: nervnim i mišićnim, centralnim i perifernim tkivima, motornim i senzornim, i holinergičnim i neholinergičnim vlaknima. Aktivnost AChE je veća u motornim neuronima nego u senzornim [14-16]. AChE se nalazi i na membranama eritrocita, gde ulazi u sastav Yt antigena krvne grupe. Enzim se pojavljuje u više molekulskih formi koje poseduju slična katalitička svojstva, ali se razlikuju po konstrukciji oligomera i načinu vezivanja za površinu ćelije. U mozgu sisara se AChE pojavljuje kao tetramerna G4 forma (10) i, u mnogo manjim količinama, kao monomerna G1 (4S) forma [14].
2. Pseudoholinesteraza (BuChE, EC 3.1.1.8), poznata i kao plazma holinesteraza, butirilholinesteraza, ili acilholin acilhidrolaza, je primarno prisutna u jetri. Za razliku od AChE, BuChE hidrolizuje butirilholin brže od ACh [14].

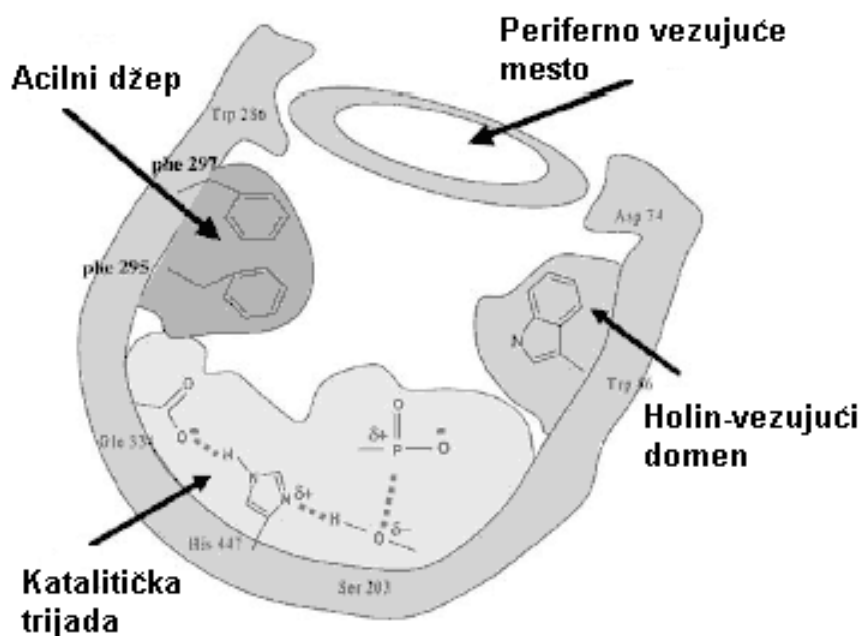
ACh je prvi otkriveni neurotransmiter u svim autonomnim ganglijama, u mnogim autonomno inervisanim organima, na nervno-mišićnim spojevima, i u mnogim sinapsama u centralnom nervnom sistemu. U autonomnom nervnom sistemu, ACh je neurotransmiter u preganglionim simpatičkim i parasimpatičkim neuronima, i služi kao neurotransmiter u svim parasimpatičkim inervisanim organima. ACh je neurotransmiter i u znojnim žlezdama i piloerektornom mišiću simpatičkog autonomnog nervnog sistema. U perifernom nervnom sistemu, ACh je neurotransmiter na nervno-mišićnim spoju između motornog nerva i skeletnog mišića. U centralnom nervnom sistemu, ACh se nalazi pre svega u interneurionima, a identifikovano je i nekoliko dugo-aksonskih

holinergičkih puteva. Značajna je holinergička projekcija od Meynert *nucleus basalis*-a (u bazalnom prednjem mozgu) do neokorteksa prednjeg mozga i asociраних limbičkih struktura. Poremećaj ovog puta je jedna od patologija Alchajmerove (*Alzheimer*-ove) bolesti [17, 18]. ACh se sintetise u elementarnoj reakciji koju katalizuje biosintetički enzim holin acetiltransferaza. Prisustvo holin acetiltransferaze je marker holinergičnog neurona. ACh u nervnim završecima je uglavnom smešten u vezikulama prečnika 100 nm, dok je mala količina slobodnog ACh prisutna u citosolu. Unos ACh u unutrašnjost vezikule odigrava se putem energetski-zavisne pumpe [18]. Tokom prenosa nervnih impulsa ACh se oslobađa iz nerva u sinaptičku pukotinu i vezuje se za receptore ACh (nikotinske i muskarinske) na post-sinaptičkoj membrani, oslobađajući signal iz nerva. AChE, takođe locirana na post-sinaptičkoj membrani, dovršava prenos signala hidrolizujući ACh. Holin, nastao razgradnjom ACh, unosi se ponovo u pre-sinaptički nerv, gde se neurotransmiter sintetizuje reakcijom holina i acetil-CoA uz pomoć holin acetiltransferaze (Slika 3) [19, 20].



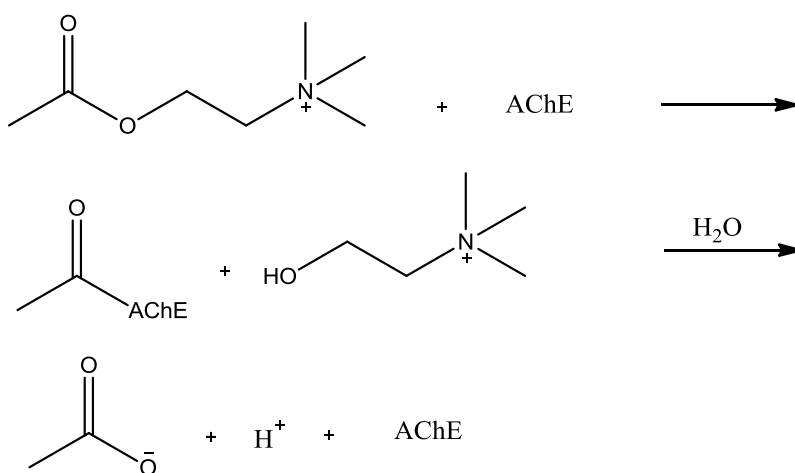
**Slika 3.** Mehanizam dejstva AChE u prenošenju nervnog impulsa.

AChE je serin hidrolaza koja se uglavnom nalazi na nervno-mišićnim spojevima i u holinergičnim sinapsama mozga. Njena glavna biološka uloga je završetak prenosa impulsa u holinergičnim sinapsama brzom hidrolizom neurotransmitera ACh do acetata i holina. AChE ima visoku specifičnu katalitičku aktivnost, naročito za jednu serin hidrolazu – svaki molekul AChE razgrađuje oko 25000 molekula ACh po sekundi, dostižući brzinu difuziono-kontrolisane reakcije [21, 22]. Molekul ima elipsoidan oblik sa dimenzijama ~ 4,5 nm/6,0 nm/6,5 nm. Monomer enzima je  $\alpha/\beta$  protein. Najznačajnija deo u strukturi enzima je duboko i usko ždrelo (~ 2,0 nm) koje prodire u enzim do polovine molekula, i dalje se širi do njegove osnove [23]. Aktivno mesto AChE je smešteno 0,4 nm od dna molekula, i čine ga dva podmesta - "anjonsko" i "estarsko", koja predstavljaju holin-vezujuće mesto i deo odgovoran za katalizu [24]. Anjonsko podmesto (*choline-binding pocket*) je nenaelektrisano i lipofilno, i vezuje kvaternerni amin holinskog dela ACh, kao i kvaternerne ligande (npr. *N*-metilakridin) koji se ponašaju kao kompetitivni inhibitori [25, 26], i kvaternerne oksime koji uspešno reaktiviraju AChE inhibiranu organofosfatima [27]. Katjonski supstrati se ne vezuju za anjonsko podmesto, već interaguju sa 14 aromatičnih ostataka (*acyl pocket*) koji su postavljeni duž ždrelo do aktivnog mesta [28-30]. Svih 14 amino kiselina u aromatičnom ždrelo su povezane preko različitih vrsta [31]. Među aromatičnim amino kiselinama triptofan 84 je ključna, i njena zamena sa alaninom dovodi do smanjenja aktivnosti enzima 3000 puta [32]. Estarsko podmesto na kome se ACh hidrolizuje do acetata i holina sadrži, slično katalitičkim podmestima drugih serin hidrolaza, katalitičku trijadu tri amino kiseline: serina, histidina i glutaminske kiseline (Slika 4).



**Slika 4.** Shematski prikaz vezujućih mesta AChE.

U prvom koraku katalitičke razgradnje ACh dolazi do nastajanja acil enzima i slobodnog holina. Zatim, acil enzim uz pomoć histidina podleže nukleofilnom napadu molekula vode, pri čemu se oslobađa sirćetna kiselina i regeneriše slobodan enzim (Reakciona shema 1) [24].



**Reakciona shema 1.** Mehanizam reakcije hidrolize ACh katalizovane sa AChE.

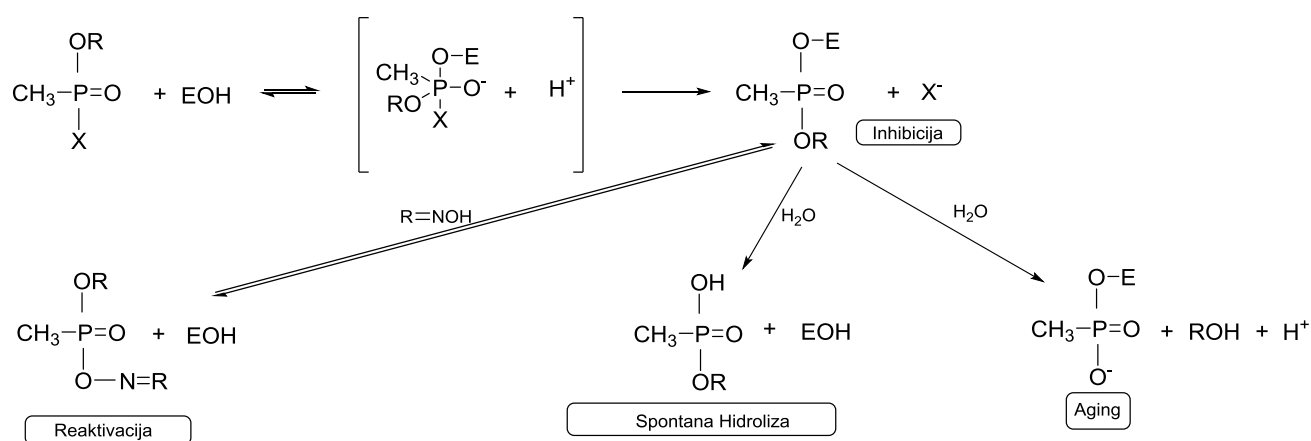


Pored dva podmesta u aktivnom centru enzima, AChE sadži jedno ili više "perifernih" anjonskih mesta koja su udaljena od anjonskog podmesta u aktivnom mestu enzima (Sika 4). Periferno anjonsko mesto služi za vezivanje kvaternernih liganada koji se ponašaju kao nekompetitivni inhibitori. Oni se vezuju za mesto na enzimu koje je udaljeno od anjonskog podmesta za koje se vezuju monokvaternerni kompetitivni inhibitori [33, 34].

Poznavanje strukture AChE je neophodno za razumevanje njenog katalitičkog dejstva, kao i za rasvetljavanje mehanizma toksikološkog i farmakološkog delovanja inhibitora enzima [35].

### 2.2.1 Ireverzibilna inhibicija acetilholinesteraze organofosfatnim jedinjenjima

Organofosfati ispoljavaju glavne toksikološke efekte putem nereverzibilne fosforilacije esteraza u centralnom nervnom sistemu. Akutni toksični efekti su povezani sa ireverzibilnom inaktivacijom AChE [36, 37]. Organofosfatna jedinjenja su supstratni analozi ACh, i kao prirodni supstrat ulaze u aktivno mesto enzima kovalentno se vezujući za -OH grupu serina. Kao i u acilovanju, molekul organofosfata se razlaže, a enzim fosforiluje (Reakciona shema 2). Dok acil enzim brzo hidrolizuje i slobodan enzim se regeneriše, defosforilacija je veoma spora (traje nekoliko dana) i fosforilovani enzim ne može da hidrolizuje neurotransmiter [38].



**Reakciona shema 2.** Mehanizam inhibicije AChE indukovane organofosfatima; reaktivacija, spontana hidroliza i 'aging' fosforilovanog enzima.

Mehanizam inhibicije AChE organofosfatnim jedinjenjima može se predstaviti reakcijom:



gde je, E–enzim, PX–molekul organofosfata, E\*PX–reverzibilni enzim-organofosfat kompleks, EP–fosforilovani enzim, X–odlazeća grupa organofosfata [39].

Ireverzibilna inhibicija odigrava se u dva koraka; prvi je brza kratkotrajna reverzibilna inaktivacija enzima, i njen uticaj je dominantan na početku inhibicije. Sledeći korak je spora ireverzibilna inhibicija pri kojoj se formira veoma stabilan enzim-inhibitor kompleks (fosforilovani enzim) – inhibitor je kovalentno vezan za enzim [40]. Ireverzibilna inhibicija je vremenski zavisna, i može se opisati jednačinom:

$$\ln \frac{E}{E_0} = - \frac{k_3 t}{1 + K_I / I} \quad (1)$$

gde je, E/E<sub>0</sub>–preostala aktivnost enzima u odnosu na početnu aktivnost (E<sub>0</sub>), K<sub>I</sub>–konstanta disocijacije za enzim-inhibitor kompleks (E\*PX), k<sub>3</sub>–konstanta prvog reda za konverziju reverzibilnog enzim-inhibitor kompleksa do fosforilovanog enzima (EP), (I)–koncentracija inhibitora (organofosfata), t–vremenski interval nakon mešanja enzima i inhibitora. Ako je (I) » (E<sub>0</sub>), recipročni izraz za nagib (1/k<sub>app</sub>) linearne zavisnosti ln(E/E<sub>0</sub>) - t može se izraziti u formi:

$$\frac{1}{k_{app}} = \frac{1}{k_3} + \frac{K_I}{k_3} \cdot \frac{1}{I} \quad (2)$$

Vrednosti inhibicionih parametara, K<sub>I</sub> i k<sub>3</sub>, izračunavaju se iz nagiba i odsečka linearne zavisnosti 1/k<sub>app</sub> - 1/(I) [41, 42].

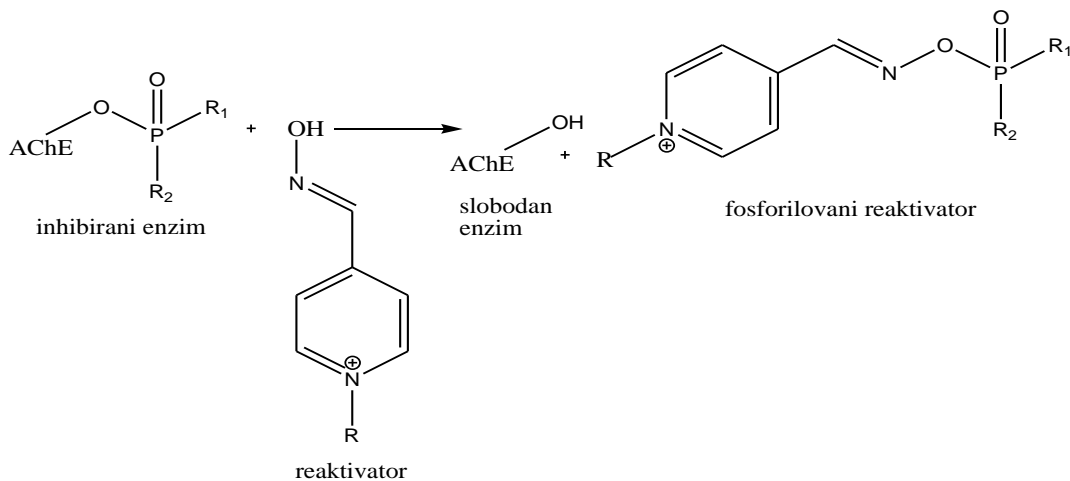
Efektivni organofosfati imaju sledeća strukturna svojstva: kiseonik vezan za fosfor dvostrukom vezom (okso forma), dve lipofilne grupe (–R<sub>1</sub>, –R<sub>2</sub>) vezane za fosfor i dobru odlazeću grupu (–X) vezanu za fosfor (Slika 1) [2].

Inhibicija enzima dovodi do akumulacije ACh u sinaptičkoj pukotini. Dolazi do prekomerne stimulacije nikotinskih i muskarinskih receptora ACh, prenos nervnih impulsa je sprečen, što uzrokuje holinergičku krizu koja se manifestuje u vidu

muskarinskih (znojenje, izlučivanje pljuvačke), nikotinskih (nervno-mišićna blokada) ili centralnih simptoma (otežano disanje) [13, 43, 44].

### 2.2.2 Regeneracija aktivnosti acetilholinestaraze inhibirane organofosfatima

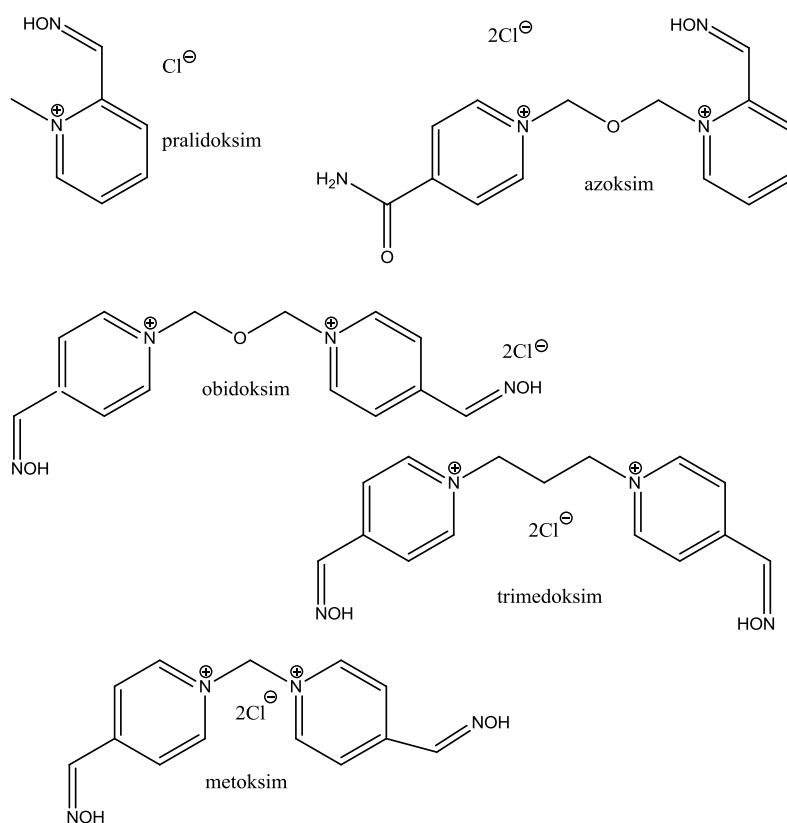
Inhibirana fosforilovana AChE, u kojoj je organofosfat kovalentno vezan za –OH grupu serina (Reakciona shema 2), može se reaktivirati primenom oksimskih reaktivatora. Oksimi regenerišu nativnu funkciju enzima raskidanjem veze organofosfata i –OH grupe serina u aktivnom mestu enzima. Mehanizam regeneracije aktivnosti AChE zasniva se na nukleofilnom napadu reaktivatora, hidroksiiminometila (oksima), na organofosfatni deo fosforilovanog enzima. Kovalentna veza između organofosfata i serina AChE se raskida, nastaje kompleks reaktivator-organofosfat (fosforilovani reaktivator), a regenerisani enzim se oslobađa (Reakciona shema 3) [45, 46].



**Reakciona shema 3.** Regeneracija AChE oksimskim reaktivatorima.

Oksimi se primenjuju kao lekovi u farmakološkom kauzalnom tretmanu intoksikacije organofosfatima, kao i u regeneraciji aktivnosti AChE inaktivirane organofosfatnim inhibitorima u *in vitro* uslovima. Neaktivni fosforilovani enzim može da se dealkiluje ('aging') (Reakciona shema 2), a takav 'aged' organofosfat-AChE kompleks nije moguće regenerisati oksimskim reaktivatorima. Iz ovog razloga, oksime bi trebalo primeniti neposredno nakon trovanja organofosfatima odnosno *in vitro* inhibicije

enzima [47]. Komercijalno dostupni oksimski reaktivatori-pralidoksim, metoksim, trimedoksim, obidoksim, azoksim (Slika 5) su razvijeni 1950-ih, i primarno su bili namenjeni da smanjuju intoksikaciju izazvanu nervnim agensima [48]. Neki od njih pokazivali su i dobre efekte u regeneraciji aktivnosti holinesteraza prethodno inhibiranih organofosfatnim insekticidima [49]. Iako je pralidoksim prvi sintetizovan i najviše korišćen kao kauzalni lek, njegova sposobnost da regeneriše nije zadovoljavajuća. S druge strane, biskvaternerni oksimi, trimedoksim i obidoksim pokazali su se veoma efikasnim u tretmanu trovanja izazvanog organofosfatnim insekticidima, dok je azoksim efektivan kod intoksikacije nervnim agensima. Obidoksim, u kombinaciji sa atropinom i diazepamom, dao je pozitivne rezultate u kliničkim ispitivanjima [50, 51]. Neka nova jedinjenja (npr. K027, BT-07-4M, TMB-4, BT-08), među 300 sintetizovanih i testiranih oksimskih reaktivatora, imaju bolju moć reaktivacije u poređenju sa komercijalno dostupnim reaktivatorima. *In vitro* i *in vivo* testovi toksičnosti na životinjama ukazuju i na značajno smanjenu toksičnost ovih regeneratorsa AChE [52-54].



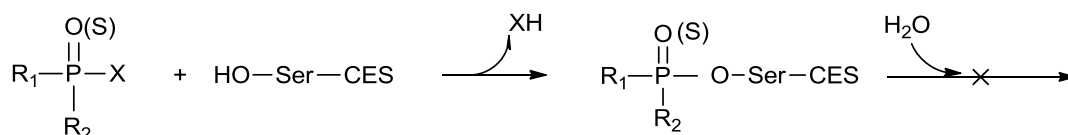
**Slika 5.** Komercijalno dostupni oksimski reaktivatori.

Osim kauzalnog farmakološkog tretmana, u slučaju trovanja organofosfatnim jedinjenjima primenjuju se nefarmakološki i farmakološki simptomatski tretmani [55]. Nefarmakološki tretman podrazumeva reanimaciju, primenu kiseonika ili dekontaminaciju u zavisnosti od načina ulaska organofosfata u telo (preko kože, očiju, organa za varenje) [56]. Parasimpatolitici (obično atropin)-smanjuju efekte akumuliranog ACh na holinergičke receptore [57], i antikonvulzivi (obično diazepam)-ublažavaju nervno-mišićne napade [58], koriste se kao lekovi u simptomatskom tretmanu trovanja.

### **2.2.3 Detoksikacija organofosfatnih insekticida hidrolizom katalizovanom enzimima**

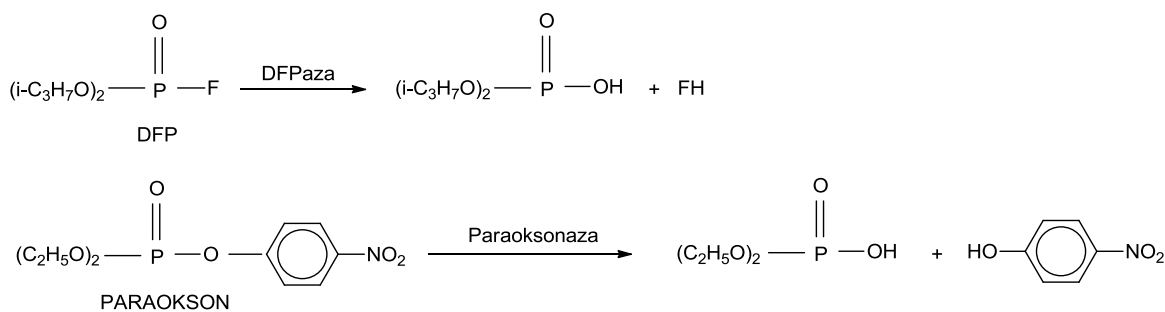
Organofosfati su nepolarna jedinjenja koja se akumuliraju u masnim tkivima. Eliminišu se iz organizma nakon prevođenja u jedinjenja rastvorna u vodi. Hidroliza do znatno rastvorljivijih metabolita, koji se mogu izlučiti urinom, je najefektivniji način da se poveća rastvorljivost ovih toksičnih jedinjenja. Iako organofosfatni insekticidi mogu da hidrolizuju spontano naročito pri visokim pH vrednostima, glavni put njihove detoksikacije je enzimska degradacija do manje toksičnih metabolita u prisustvu karboksilesteraza (CESs) i fosfotriesteraza (PTEs).

U jetri i serumu sisara nađene su CESs nepoznate fiziološke uloge (B-esteraze) koje hidrolizuju karboksilne estre, dok organofosfati inhibiraju njihovu aktivnost. Za razliku od A-esteraza koje hidrolizuju karboksilne estre, a organofosfatna jedinjenja ih ne inhibiraju, B-esteraze imaju sposobnost da detoksikuju i organofosfatna i karbamatna jedinjenja [59]. Dok organofosfatni i karbamatni insekticidi ispoljavaju glavne toksične efekte putem fosforilacije i karbamilacije AChE i drugih esteraza u nervnom sistemu, inhibicija B-esteraza ne uzrokuje toksične efekte. Mehanizam inhibicije B-esteraze organofosfatima sastoji se u kovalentnom vezivanju fosfora za kiseonik iz ostatka serina u aktivnom centru enzima. Neaktivni fosforilovani enzim ne može se reaktivirati i osloboditi slobodan enzim dejstvom molekula vode (Reakciona shema 4). U ovom sistemu detoksikacije koji uklanja insekticid, svaki molekul CES uklanja (*scavenge*) bar jedan molekul toksičnog jedinjenja pre njegovog dolaska u kontakt sa esterazama u nervnom sistemu [4, 60].



**Reakciona shema 4.** Inhibicija B-esteraza organofosfatnim jedinjenjima.

Mnogo efikasniji način detoksikacije organofosfatnih jedinjenja je hidroliza katalizovana PTEs, esterazama nepoznate fiziološke uloge. Mehanizam dejstva PTEs zasniva se na raskidanju veze između atoma fosfora i odlazeće grupe (–X) u molekulu organofosfata (Reakciona shema 5). Nastali metaboliti su manje toksični i polarniji od polaznog jedinjenja. Stoga se ne akumuliraju u masnim tkivima i eliminišu se iz organizma urinom. Dok jedan molekul CES hvata i uklanja jedan molekul insekticida, jedan molekul PTE može da razgradi veliki broj molekula organofosfata što čini ovaj put detoksikacije znatno efikasnijim [61]. Iako su PTEs prisutne u nekoliko tkiva sisara, veće koncentracije se nalaze u serumu i jetri [62, 63].



**Reakciona shema 5.** Hidroliza organofosfata katalizovana poznatim PTEs: DFPazom i paraoksonazom.

Neke studije ukazuju na korelaciju između prisustva PTEs kod nekih vrsta i njihove osetljivosti na toksično dejstvo organofosfatnih jedinjenja. Sisari, koji sadrže visoke koncentracije hidrolaze paraoksona, su rezistentniji na njegovu toksičnost u poređenju sa insektima i pticama kojima ova PTE nedostaje [63]. Zbog sposobnosti da degradiraju toksične insecticide, egzogene prečišćene PTEs mogu da se koriste kao profilaktici i antidoti u tretmanu trovanja organofosfatima [64-66]. Ovi razgradni enzimi imaju

raznoliku primenu u biotehnologiji: bioremedijaciji otpadnog materijala, biodegradaciji ostataka insekticida, razvoju biosenzora za organofosfate [67, 68] i dr.

### 2.3 Nespecifični toksični efekti organofosfata

Primarna meta delovanja organofosfatnih jedinjenja je AChE, a glavni mehanizam toksičnosti kod akutnog izlaganja odvija se preko specifične ireverzibilne inhibicije enzima u nervnom sistemu i krvi. Akutna toksičnost manifestuje se kao holinergička kriza praćena prekomernom sekrecijom žlezda, slabošću i grčevima mišića, i može dovesti do smrti [69-71]. Pored toga, mnoge studije sugerišu da bilo akutna ili hronična intoksikacija remete redoks procese. Na taj način menja se aktivnost antioksidativnih enzima i indukuje povećanje lipidne peroksidacije u mnogim organima, dok postoji mala korelacija između stepena oštećenja organa i stepena inhibicije AChE [72-74]. Zapravo, tokom akutnog, a pre svega subhroničnog ili hroničnog izlaganja organofosfatima indukcija oksidativnog stresa se smatra glavnim mehanizmom toksičnosti [75]. Oksidativni stres se definiše kao disbalans između produkcije slobodnih radikala–reaktivnih vrsta kiseonika (*ROS-reactive oxygen species*) i sistema antioksidantne odbrane koja može biti enzimska i neenzimska. ROS mogu da nastanu kao rezultat metabolizma organofosfata delovanjem citohroma P450, tj. monooksigenaza koje katalizuju oksidaciju adicijom jednog atoma kiseonika na supstrat (organofosfat) elektron transportnim putem [76]. Ovaj poremećaj manifestuje se promenom aktivnosti antioksidantnih enzima (katalaze, superoksid dismutaze, glutation peroksidaze, glutation reduktaze), povećanom koncentracijom malondialdehida i/ili izmenjenim sadržajem neenzimskih antioksidanata (redukovani glutation, vitamin C, vitamin E, beta-karoten), koji predstavljaju parametre oksidativnog stresa i markere povećanog sadržaja ROS i lipidne peroksidacije [77-79]. Postoji evidencija da organofosfati mogu izazvati poremećaje u jetri, bubrezima, mišićima, imunom i hematološkom sistemu, i dovesti do mnogih bolesti [80-82]. Takođe, neke studije pokazuju da je oksidativni stres važan patomehanizam neuroloških oboljenja kao što su Alchajmerova i Parkinsonova (*Parkinson-ova*) bolest [79, 83, 84].

ROS koje indukuju organofosfatna jedinjenja napadaju lipide, proteine i DNK, dovode do oksidacije i oštećenja ćelijske membrane, inaktivacije enzima, oštećenja

DNK i smrti ćelije [85-87]. Jako reaktivni slobodni radikali napadaju DNK rezultirajući prekidima jednog ili oba lanca, kao i oksidativnim oštećenjem šećera i ostataka baza što kasnije može uzrokovati prekide lanca [88]. S druge strane, fosforni deo u molekulu organofosfata može biti dobar supstrat za nukleofilni napad dovodeći do fosforilacije DNK koja predstavlja primer oštećenja [89]. Neke studije ukazuju na povećanje hromozomskih aberacija, incidence mikronukleusa i izmene sestrinskih hromatida kao markera citogenetskog oštećenja u kultivisanim limfocitima izolovanim iz periferne krvi osoba koje su bile izložene delovanju organofosfatnih jedinjenja. Zato, citogenetsko oštećenje u cirkulišućim limfocitima koristi se kao biomarker izlaganja pesticidima [90, 91]. Neka istraživanja pokazuju da je rizik od genotoksičnosti, koju izazivaju neki insekticidi, znatno veći od rizika koji se može predvideti na osnovu standardnih testova toksičnosti [92]. Štaviše, DNK oštećenje dovodi do genomske nestabilnosti koja može uzrokovati mutagenezu i karcinogenezu [93]. Epidemiološke studije pokazuju da postoji rizik od kancera usled izlaganja pesticidima [94-96], dok The United States Environmental Protection Agency navodi paration kao potencijalni karcinogen [97].

### **2.3.1 Lipidna peroksidacija kao parametar toksičnog dejstva**

Lipidna peroksidacija je lančana reakcija koju uzrokuju slobodni radikali i jedna je od manifestacija oksidativnog stresa *in vivo*. Međutim, delovanje radikala nije jedini način nastajanja lipidnih peroksida (LOO<sup>•</sup>). Poznato je da molekularni kiseonik i ozon, bez prisustva radikalskih vrsta, mogu neenzimskim putem da dovedu do lipidne peroksidacije. Postoje tri načina nastajanja lipidnih peroksida tokom oksidativnog katabolizma lipida:

1. katalitičkim delovanjem enzima,
2. neenzimskom oksidacijom dejstvom slobodnih radikala i
3. spontanom autooksidacijom tj. neenzimskom oksidacijom nezavisnom od slobodnih radikala.

Peroksidacija lipida uzrokovana slobodnim kiseoničnim radikalima je često krajnji ishod metabolizma ksenobiotika i parametar izazvanog oksidativnog stresa. Zato se određuje nivo malondialdehida, proizvoda razgradnje lipida, pri ispitivanju toksičnog delovanja lekova, pesticida, jonizujućeg zračenja i drugih egzogenih činilaca. Potrebno



je istaći da ROS nastaju i kao rezultat nekompletne redukcije kiseonika tokom normalnih aerobnih procesa u ćeliji [98].

Pod pojmom slobodni kiseonični radikali podrazumevaju se molekuli koji sadrže kiseonik i jedan nesparen elektron u orbitali, ili kiseonični molekuli koji se u ćeliji mogu prevesti u radikale. Ove reaktivne vrste veoma lako i brzo deluju na molekule oduzimajući im elektrone. Na taj način započinju lančanu reakciju koja dovodi do nastajanja novih slobodnih radikala. U Tabeli 1 prikazani su slobodni radikali kiseonika.

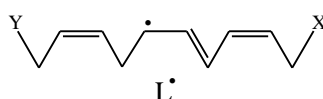
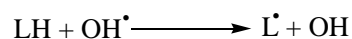
**Tabela 1.** Slobodni radikali kiseonika (ROS).

ROS	Naziv	ROS	Naziv
OH <sup>•</sup>	Hidroksilni radikal	RCOO <sup>•</sup>	Peroksil radikal
O <sup>2-</sup>	Superoksidni anjon	HOCl	Hipohlorna kiselina
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Vodonik-peroksid	O <sub>2</sub>	Molekulski kiseonik
R <sup>•</sup> RO <sup>•</sup> RS <sup>•</sup>	Organski radikali	/	/

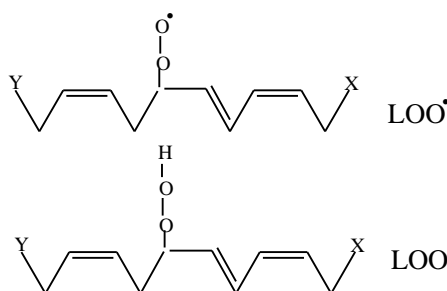
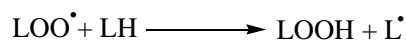
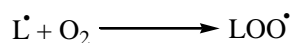
OH<sup>•</sup> je najreaktivniji od svih slobodnih radikala kiseonika koji započinje lančanu reakciju peroksidacije lipida i drugih organskih molekula, a može se i direktno adirati na dvostruke veze. O<sup>2-</sup> je veoma reaktivan i u reakciji sa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (neenzimska Haber-Vajssova (*Haber-Weiss-ova*) reakcija) dovodi do nastajanja reaktivnijeg OH<sup>•</sup>. Međutim, superoksidni anjon nije liposolubiln pa ne može da difunduje sa mesta nastajanja. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nije po hemijskoj strukturi radikal već molekul koji se ponaša kao blago oksidaciono sredstvo. Kako u Fentonovoj (*Fenton-ovoj*) reakciji u prisustvu Fe<sup>2+</sup> i Cu<sup>+</sup> daje OH<sup>•</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se svrstava u slobodne radikale. Izuzetno je lipofilan što mu omogućava difuziju kroz membranu do respiratornog lanca u mitohondrijama, gde se nalaze joni neophodni za prevođenje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u reaktivnije ROS. Organski radikali (R<sup>•</sup>, RO<sup>•</sup>, RS<sup>•</sup>) nastaju napadom OH<sup>•</sup> ili O<sup>2-</sup> na molekule iz okruženja (R-H, ROH, RSH), kada im oduzimaju elektrone (u obliku atoma vodonika). Peroksi radikali (RCOO<sup>•</sup>) nastaju kao intermedijeri u lančanim reakcijama, npr. LOO<sup>•</sup> u lipidnoj peroksidaciji [99].

Napadom ROS, pre svega  $\text{OH}^\bullet$ , na lipide u sastavu ćelijskih membrana dolazi do formiranja lipidnih peroksi radikala ( $\text{LOO}^\bullet$ ) i lipidnih radikala ( $\text{L}^\bullet$ ), a zatim i do degradacije lipida do jednostavnijih hidrosolubilnih proizvoda koji se mogu detektovati u krvi i urinu. Lančana reakcija peroksidacije lipida  $\text{OH}^\bullet$  radikalom prikazana je na Reakcionoj shemi 6. Reakcija počinje oduzimanjem elektrona iz lipida (LH), odnosno polinezasićene masne kiseline u sastavu lipida membrane, pri kojoj nastaje radikal  $\text{L}^\bullet$ . Ovaj način započinjanja lančane reakcije omogućava „labavi“ atom vodonika metilenske grupe ( $-\text{CH}_2-$ ) između dve dvostruke veze u molekulu polinezasićene masne kiseline. Faza propagacije lančane reakcije odvija se u prisustvu kiseonika. Dobijeni  $\text{LOO}^\bullet$  može da inicira peroksidaciju drugog lanca masne kiseline, pri čemu nastaje hidroperoksid ( $\text{LOOH}$ ) (Reakciona shema 6).

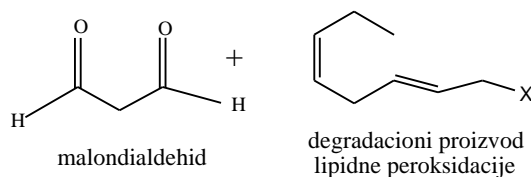
### 1. Inicijacija



### 2. Propagacija



### 3. Degradacija



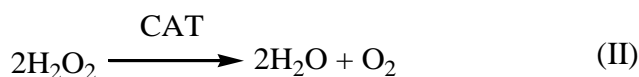
**Reakciona shema 6.** Lančana reakcija peroksidacije lipida hidroksilnim radikalom.

Malondialdehid (MDA), krajnji proizvod peroksidacije lipida, nastaje razgradnjom molekula masne kiseline, i predstavlja indikator oštećenja lipida odnosno membrana ćelije slobodnim radikalima (Reakciona shema 6) [100]. Naime, peroksidacija lipida, kao konstituenta ćelijske membrane i membrana organela, ireverzibilno oštećuje strukturu a time i normalnu funkciju membrane. Dolazi do porasta propustljivosti membrane, narušavanja jonskog transporta, oslobađanja različitih potencijalno toksičnih jedinjenja iz organela, intenzivnog ulaska vanćelijskog  $\text{Ca}^{2+}$  u ćeliju, što dalje rezultira nizom oštećenja. Takođe, dobijeni aldehidi grade Šifove baze sa amino grupama ostataka amino kiselina i oksiduju sulfidrilne grupe dovodeći do narušavanja strukture i funkcije proteina i enzima. ROS mogu da oksiduju jedarnu i mitohondrijalnu DNK i dovedu do prekida lanaca ili nekog drugog oštećenja [101, 102].

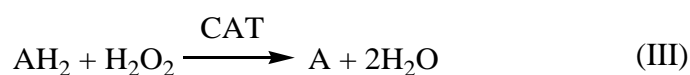
### 2.3.2. Antioksidacioni zaštitni sistem

Antioksidacioni zaštitni sistem je nastao tokom evolucije kod svih aerobnih organizama, kako bi se sprečila, ograničila ili „popravila“ oštećenja nastala delovanjem reaktivnih vrsta kiseonika ( $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{OH}^\cdot$  i  $\text{O}_2$ ). Kriterijum prema kome neko jedinjenje pripada antioksidacionom zaštitnom sistemu je „da je to svaka supstanca, koja kada je prisutna u malim koncentracijama u poređenju sa oksidacionim supstratom, značajno odlaže ili sprečava oksidaciju supstrata“. Zaštitni sistem obuhvata primarnu i sekundarnu antioksidacionu zaštitu. Primarna antioksidaciona zaštita se sastoji od enzimskih i neenzimskih komponenti. Antioksidacioni enzimski sistem čine sledeći enzimi: superoksid dismutaza (SOD) (EC 1.15.1.1), katalaza (CAT) (EC 1.11.1.6), kao i enzimi glutation redoks ciklusa u kome centralno mesto zauzima glutation peroksidaza (GPx) (EC 2.2.5.1.18) [ 77, 98, 103].

CAT katalizuje razgradnju vodonik-peroksida do vode i molekuskog kiseonika:

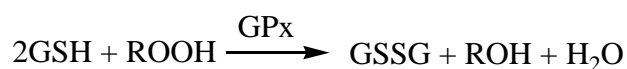


Konstanta brzine „katalazne“ reakcije iznosi  $10^7 \text{ mol}^{-1}\text{sec}^{-1}$ . CAT može da vrši i oksidacije H-donora uz utrošak jednog molekula vodonik-peroksida prema jednačini:



Konstanta brzine „peroksidazne“ reakcije je znatno manja od konstante brzine „katalazne“ reakcije, i iznosi  $10^2$ - $10^3 \text{ mol}^{-1}\text{sec}^{-1}$ . Koju aktivnost će CAT ispoljiti zavisi od brzine nastajanja vodonik-peroksida, kao i od koncentracije donora vodonika. Po strukturi, CAT je tetramerni hemoprotein koji se sastoji od 4 identične subjedinice, molarne mase 240 kDa. Enzim sadrži hematin (hem- $\text{Fe}^{3+}$  protoporfirin) grupu vezanu u aktivnom centru. Većina aerobnih organizama sadrži CAT, kao i neke anaerobne bakterije, dok je kod bakterija i algi ovaj enzim potpuno odsutan. Najviši nivo aktivnosti CAT kod sisara je nađen u jetri i eritrocitima. U životinjskim i biljnim tkivima, CAT je smeštena u respiratornim organelama, peroksisomima i čini više od 40% svih proteina u peroksisomima. Pored peroksisoma, CAT se može nalaziti i slobodna u citosolu jer se sam vodonik-peroksid može generisati i izvan peroksisoma (u mitohondrijama, endoplazmatičnom retikulumu i u samom citosolu aktivnošću ksantin oksidaze) [98, 104].

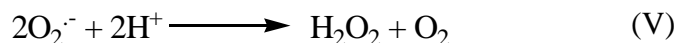
GPx katalizuje glutation zavisnu redukciju vodonik-peroksida u vodu, kao i redukciju organskih hidroperoksida u odgovarajuće alkohole, prema jednačinama:



GPx je prvi put otkrivena u goveđim eritrocitima, kao enzim koji štiti hemoglobin od oksidacionog oštećenja vodonik-peroksidom. Prisutna je u svim ćelijama kičmenjaka, dok je insekti, više biljke i bakterije ne poseduju. Postoje tri tipa GPx: selen zavisna, selen nezavisna i fosfolipid hidroperoksid GPx. Selen zavisna GPx je tetramerni enzim, selenoprotein koji u aktivnom centru ima selen u obliku selenocisteina, molarne mase 84 kDa. Primarno je prisutna u citosolu i mitohondrijama. Selen-nezavisna GPx katalizuje redukciju organskih hidroperoksida, i pretpostavlja se da pripada familiji enzima glutation S transferazne aktivnosti. Fosfolipi hidroperoksid GPx je monomer molarne mase 20 kDa, koji katalizuje redukciju fosfolipida. U aktivnom centru sadrži

selenocistein, a smešten je u citosolu. Jedina je forma GPx koja inhibira procese lipidne peroksidacije, uz obavezno prisustvo fizioloških koncentracija vitamina C [98, 105].

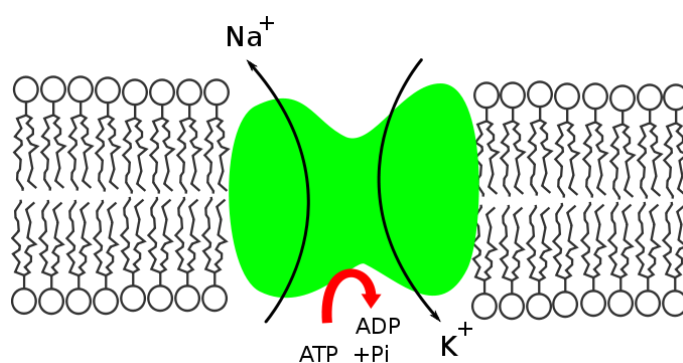
SOD je metaloprotein koji katalizuje dismutaciju superoksid anjon radikala u molekularni kiseonik i vodonik-peroksid prema jednačini:



Brzina reakcije iznosi  $2 \times 10^9 \text{ mol}^{-1}\text{sec}^{-1}$ , što je oko  $10^4$  puta veća brzina od spontane dismutacije superoksid anjon radikala pri normalnom pH. U zavisnosti od metala koji sadrže u aktivnom centru, postoje četiri tipa SOD. Fe SOD sadrži gvožđe u aktivnom centru ( $\text{Fe}^{3+}$ ), ima dve subjedinice i molekularnu masu 39 kDa. Prisutna je pre svega kod prokariotskih organizama, fotosintetskih anaeroba, fermentativnih bakterija, bakterija koje redukuju sumpor, protozoa i eukariotskih algi. Mn SOD sadrži mangan ( $\text{Mn}^{2+}$ ) u aktivnom centru. Kod prokariota je prisutna u obliku dve subjedinice, molarne mase 40 kDa, dok se kod eukariota sastoji iz četiri subjedinice molarne mase 88 kDa. Uglavnom je prisutna u citosolu i u matriksu mitohondrija. SOD koja sadrži bakar i cink, CuZn SOD se sastoji od dve identične subjedinice, od kojih svaka sadrži po jedan atom bakra i jedan atom cinka, molarne mase 32 kDa. Uglavnom se nalazi u citosolu, endoplazmatičnom retikulumu i međumembranskom prostoru mitohondrija eukariota, i osetljiva je na cijanid. Kod prokariota-bakterija i modrozelenih algi nije prisutna. Četvrti tip SOD, ekstracelularna SOD je tetramerni glukoprotein molarne mase 165 kDa. Sadrži jedan atom cinka i jedan atom bakra i ima veliki afinitet prema glikozamonoglikanima, kao što su heparin i heparan sulfat. Prisutna je u ekstracelularnoj tečnosti-plazmi, limfi i cerebrospinalnom likvoru, dok u tkivima ima malu aktivnost. Filogenetska distribucija Fe SOD, Mn SOD i CuZn SOD se pojavljuje u zavisnosti od koncentracije molekularnog kiseonika u atmosferi. Tako, anaerobne i sumporne bakterije (prokarioti) sadrže samo Fe SOD. Aerobne bakterije, prokariotske modrozeleno alge, protozoe i alge sadrže i Fe SOD i MnSOD. Kod eukariotskih organizama se pojavljuje CuZn SOD. Pojava Mn SOD se vezuje za povećanu koncentraciju molekularnog kiseonika u atmosferi ( $10^{-4} \text{ M}$ ), koja se pojavljuje u ranom prekambrijumu, dok pojava CuZn SOD odgovara kambrijumu i koncentraciji molekularnog kiseonika  $10^{-2} \text{ M}$  [98, 106].

### 2.3.3 Na, K-ATPaza

Na,K-ATPaza (pumpa za natrijum i kalijum) (EC 3.6.1.37) je integralna membranska adenzin trifosfataza, čija aktivnost zavisi od prisustva jona magnezijuma, a aktivirana je natrijumom i kalijumom. Njena glavna funkcija je u aktivnom transportu jona natrijuma i kalijuma, odnosno u uspostavljanju i održavanju visoke koncentracije jona kalijuma i niske koncentracije jona natrijuma u ćeliji. Energiju za održavanje elektrohemijskog gradijenta u ćeliji dobija iz hidrolize adenzin-trifosfata (ATP) koju enzimski katalizuje (Slika 6).

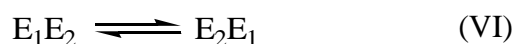


**Slika 6.** Shematski prikaz pumpe za natrijum i kalijum.

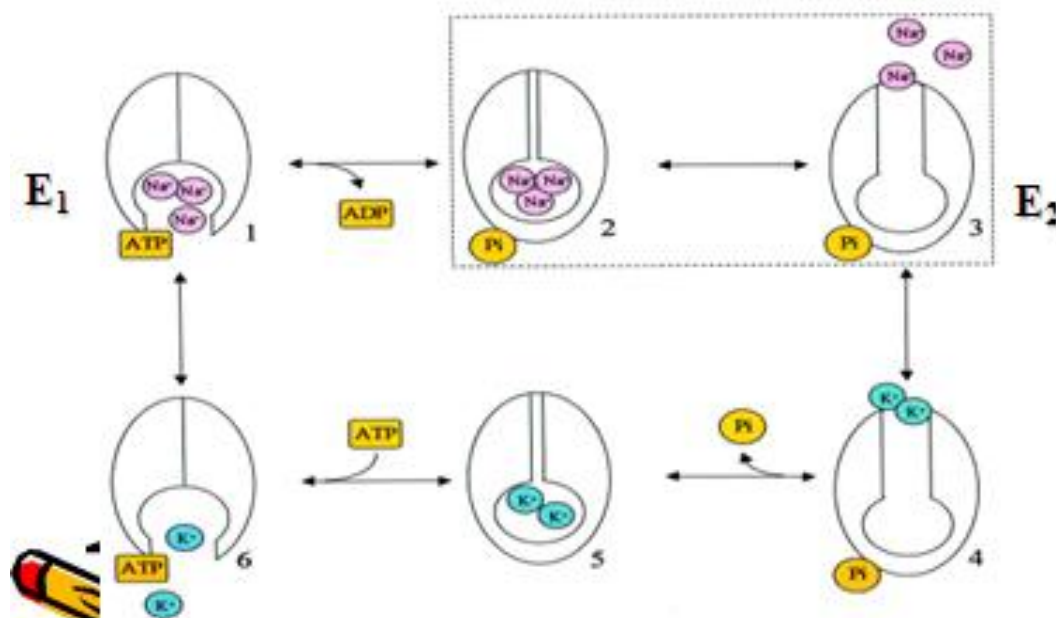
Pripada P-tipu ATPaza koje učestvuju u aktivnom transportu mnogih katjona, a kojima je zajednička osobina fosforilacija asparaginske kiseline, koja je smeštena u konzerviranoj sekvenci enzima,  $\gamma$ -fosfatnom grupom ATP. Uspostavljajući gradijent koncentracije jona kroz membranu, natrijumova pumpa omogućava održavanje osmotske ravnoteže u ćeliji, ćelijskog volumena, ekscitabilnost nervnih i mišićnih tkiva, kao i aktivan transport ugljenih hidrata i aminokiselina. Jedna od esencijalnih uloga ovog enzima je održavanje homeostaze elektrolita u telesnim tečnostima usled reasorpcije Na<sup>+</sup> jona i vode u bubrezima koju enzim kontroliše [107, 108, 109].

Aktivni enzimski kompleks Na,K-ATPaze je oligomer sastavljen od dva glavna polipeptida u stehiometrijskom odnosu,  $\alpha$  i  $\beta$  subjedinice.  $\alpha$  subjedinica je transmembranski protein sa deset transmembranskih domena molarne mase oko 112 kDa, čiji su –N i –C krajevi smešteni sa unutrašnje strane ćelije. Određuje katalitička i transportna svojstva enzima i sadrži mesta za vezivanje katjona i ATP, kao i mesta za vezivanje specifičnih inhibitora–kardijačnih glikozida (ouabain, kardioaktivni

steroidi). Ovi specifični modulatori aktivnosti Na,K-ATPaze se vezuju za ekstracelularni deo proteina sa veoma velikim afinitetom.  $\beta$  subjedinica je takođe transmembranska, sa jednim transmembranskim segmentom, molarne mase 40-60 kDa. Učestvuje u transportu  $\alpha$  subjedinice od endoplazmatskog retikuluma do ćelijske membrane, a i omogućava njenu pravilnu orijentaciju u membrani. Na,K-ATPaza sadrži i treću subjedinicu, mali membranski hidrofobni polipeptid molarne mase 12-14 kDa. Uloga ove subjedinice nije u potpunosti rasvetljena, ali se smatra da reguliše afinitet enzima prema ATP i jonima natrijuma i kalijuma [110-112]. Najprihvaćeniji model Na,K-ATPaze predstavlja enzim kao  $\alpha\beta$ -  $\alpha\beta$  dimer koji funkcioniše kao „flip-flop“ model, kod koga  $\alpha$  subjedinice pokazuju komplementarne konformacije koje se razlikuju po tercijernoj strukturi i afinitetu prema jonima natrijuma i kalijuma:



$\alpha$  subjedinice naizmenično prolaze kroz konformacione promene. Hidrolitički i transportni ciklus Na,K-ATPaze odvija se između ova dva katjon zavisna konformaciona stanja enzima,  $E_1$  i  $E_2$  [113]. Sekvencioni model (Slika 7) [114] pretpostavlja da enzimski reakcija počinje vezivanjem tri intracelularna jona  $Na^+$  i ATP sa velikim afinitetom za konformaciono stanje  $E_1$ , u prisustvu jona  $Mg^{2+}$ . U ovom stupnju enzim reaguje sa ATP i formira visoko reaktivan aspartil fosfat intermedijer. Fosforilovani enzim vezuje tri jona  $Na^+$  i konvertuje se u  $E_2$ -P  $3Na^+$  konformaciju, koja gubi afinitet za jone  $Na^+$  i otpušta ih u ekstracelularni prostor.



**Slika 7.** Sekvencioni model funkcionisanja Na,K-ATPaze.

Istovremeno, za E<sub>2</sub>-P konformaciju se vezuju dva ekstracelularna jona K<sup>+</sup> i dolazi do spontane defosforilacije E<sub>2</sub>-P konformacije. Intracelularni ATP izaziva otpuštanje jona K<sup>+</sup> u unutarćelijski prostor iz E<sub>2</sub> (2K<sup>+</sup>) konformacije, usled čega se enzim konvertuje iz E<sub>2</sub> u E<sub>1</sub> konformaciono stanje. Time se završava enzimski i transportni proces u toku koga dolazi do hidrolize jednog molekula ATP i transporta tri jona Na<sup>+</sup> iz ćelije i dva jona K<sup>+</sup> ćeliju.

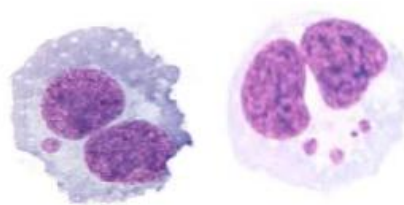
U zavisnosti od tkiva u kojima je Na,K-ATPaza prisutna, α subjedinica se pojavljuje u četiri različite izoforme (α<sub>1</sub>, α<sub>2</sub>, α<sub>3</sub>, α<sub>4</sub>), dok je β subjedinica prisutna u 3 izoforme (β<sub>1</sub>, β<sub>2</sub>, β<sub>3</sub>). Svaka izoforma ima različita svojstva, na šta ukazuju različiti kinetički parametri za aktiviranje katjona (Na<sup>+</sup> i K<sup>+</sup>), vezivanje supstrata i ouabaina. Ekspresija izoformi Na,K-ATPaze može biti izmenjena u različitim patološkim stanjima. Na primer, kod nekih bolesti srca sastav izoformi enzima je izmenjen. Brojne studije ukazuju na promene u ekspresiji i aktivnosti subjedinica Na,K-ATPaze u toku ranih stadijuma malignih bolesti. Maligne ćelije prostate pokazuju prekomernu ekspresiju α<sub>1</sub> izoforme u poređenju sa zdravim tkivima, dok je ekspresija β<sub>1</sub> izoforme smanjena u toku progresije kancera [115]. Na,K-ATPaza interaguje sa susednim membranskim proteinima i organizovanim citosolnim kaskadama proteina, koje prenose signale i šalju poruke intracelularnim organelama [116]. Natrijumovu pumpu specifično



inhibiraju kardijačni glikozidi, u koje spadaju kardenolidi i kardiotionični glikozidi. Ova jedinjenja su slična ouabainu i primarno se vezuju za ekstracelularni deo  $\alpha$  subjedinica. Činjenica da su kardiotionični steroidi prirodni ligandi i specifični inhibitori natrijumove pumpe ukazuje na mogućnost njihovog razvijanja i primene kao antikancerogenih agenasa koji inhibiraju prekomernu ekspresiju  $\alpha$  subjedinice natrijumove pumpe [117]. Međutim, aktivnost Na,K-ATPaze, koja je pod kontrolom hormona, može biti izmenjena pod uticajem različitih endogenih i egzogenih faktora [118]. Takođe, aktivnost ovog transmembranskog proteina zavisi od lipidnog statusa membrane [119]. Iako mehanizam toksičnog dejstva različitih modulatora Na,K-ATPaze nije u potpunosti poznat, ovaj enzim može da se koristi kao značajan parametar ćelijske aktivnosti i koristan model za evaluaciju toksičnog dejstva [120].

### **2.3.4 Testiranje genotoksičnosti određivanjem učestalosti mikronukleusa**

Kao što je prethodno rečeno, primarna toksičnost povezana sa akutnim izlaganjem organofosfatnim insekticidima je inhibicija AChE u nervno-mišićnim spojevima. Međutim, novije studije ukazuju da se toksičnost insekticida može dovesti u vezu sa povećanim nastajanjem reaktivnih vrsta kiseonika. Zbog izuzetne reaktivnosti i neselektivnosti, ROS narušavaju strukturu i funkciju mnogih biomolekula, poput lipida, proteina i DNK [121-123]. Rizik od genotoksičnosti, usled oštećenja genetskog materijala izazvanog pesticidima, može biti znatno veći od rizika koji predviđaju standardni testovi toksičnosti [92]. Određivanje učestanosti mikronukleusa i indeksa ćelijske proliferacije u limfocitima i fibroblastima je pogodno za evaluaciju citogenetskog oštećenja uzrokovanog organofosfatnim jedinjenjima i proizvodima njihove transformacije [124]. Pojava mikronukleusa je dovedena u vezu sa hromozomskim aberacijama još tridesetih godina XX veka [125]. Mikronukleusni test kao metoda za utvrđivanje genetskih oštećenja je značajno poboljšan od strane autora Feneča i Morlija (*Fenech-a* i *Morley-a*) [126] koji su uveli CB (citokonezis-blok) metod. Korišćenjem citohalazina B, koji zaustavlja kretanje aktinskih filamenata kortikalnog regiona plazma membrane, blokira se citokineza, dok deoba nukleusa neometano teče. Ćelije koje su prošle prvu deobu, i nalaze se u interfazi, su u obliku binukleusnih limfoblata i lako se mogu razlikovati od ostalih interfaznih blata (Slika 8) [126, 127].



**Slika 8.** Binukleusne ćelije sa mikronukleusima.

Učestalost mikronukleusa u ovim ćelijama je pouzdan indikator hromozomskih aberacija. Prednost CB metode je u tome što se iz jednog uzorka može analizirati više hiljada binukleusnih limfoblasta. Na taj način, dobijaju se pouzdani podaci o učestanosti i distribuciji hromozomskih aberacija. Mikronukleusni test se danas koristi kao prediktivni biomarker nestabilnosti genoma, tj. sklonosti ka oboljevanju od malignih bolesti [128]. Kod osoba obolelih od nekih vrsta kancera utvrđena je povećana učestalost mikronukleusa u limfocitima periferne krvi. Stoga, smatra se da kod zdravih osoba koje imaju povećanu učestalost hromozomskih aberacija postoji povećan rizik od oboljevanja od kancera [129]. Jednostavnost CB metode, koja se zasniva na prebrojavanju velikog broja ćelija, dovela je do njene primene u *in vitro* testiranju genotoksičnosti i u biološkom monitoringu [130-132].

## **2.4 Degradacija organofosfatnih insekticida**

### **2.4.1 Transformacija organofosfatnih insekticida u životnoj sredini**

Upotreba organohlornih insekticida, zbog njihove akumulacije u životnoj sredini, zamenjena je manje postojanim organofosfatnim jedinjenjima. Poslednje dve decenije organofosfati predstavljaju najviše primenjivanu grupu insekticida. Obimna primena pesticida u cilju povećanja prinosa u poljoprivredi i intenzivan razvoj novih hemikalija drastično je povećao broj i količine agrohemikalija prisutnih u okolini. Nekoliko studija ukazuju na prisustvo organofosfatnih jedinjenja u vodenim sistemima [133-137], koji se kontaminiraju obično nekoliko nedelja nakon primene insekticida. Zbog nespecifične inhibicije AChE, koja se odigrava kod insekata kao i kod ljudi, rasprostranjenost

organofosfatnih insekticida u životnoj sredini i prisustvo u izvorskim vodama predstavljaju ozbiljnu pretnju živom svetu kao i zdravlju ljudi [133, 138].

Organofosfati u životnoj sredini podležu prirodnoj degradaciji koja se u najvećoj meri odigrava putem homogene i heterogene hidrolize [133, 135, 139-141]. Hidroliza se dešava na nekoliko reaktivnih centara u molekulu, homogenim mehanizmom gde se  $H_2O$  i  $HO^-$  (ređe  $H^+$ ) ponašaju kao nukleofili, zbog čega ova reakcija jako zavisi od pH vrednosti i najefikasnija je u jako baznoj sredini. Prisustvo rastvorenih metalnih jona, mikroorganizama i drugih jedinjenja prisutnih u zemljištu povećava brzinu hidrolize [140, 142, 143]. Heterogene površine (oksidni gvožđa i aluminijuma i različite gline) takođe mogu ubrzati proces hidrolize obezbeđujući mesta na površini na kojima nukleofil i organofosfat reaguju [143]. Kako molekuli organofosfata imaju maksimum apsorpcije u UV oblasti (240-310 nm), svetlost može indukovati njihovu degradaciju koja se može odigrati direktnom ili indirektnom fotolizom. U direktnoj fotolizi molekul apsorbuje UV svetlost i zatim reaguje sa jedinjenjima u okolini ili se sam razgrađuje. Indirektna fotoliza je češća i prouzrokovana je kiseonikom i hidroksi ili peroksi radikalima, koji nastaju fotolizom organskih ili neorganskih jedinjenja [140, 143-146]. Organofosfatni insekticidi (najveći broj komercijalnih formulacija su organo-tiofosfati sa P=S grupom), kada se primene na polju i transportuju u vodene sisteme, mogu lako da se oksiduju do oksona usled prisustva prirodnih oksidanata i UV svetlosti [141, 143, 146]. Smatra se da se oksidacija odigrava putem oksidativne desulfuracije napadom  $OH^\bullet$  radikala na tiono grupu ili preko oksidativnog mehanizma koji se odigrava direktno na molekulu organo-tiofosfata [147]. Oksoni su u poređenju sa tio jedinjenjima polarniji, rastvorljiviji u vodi i manje se adsorbuju na zemljištu. Znatno su jači inhibitori AChE, a neki su postojaniji u životnoj sredini od tio analoga [138, 146, 148]. Zato, postojanost organofosfata u životnoj sredini uglavnom zavisi od katalitičkog kapaciteta zemljišta, fotodegradacionih procesa i atmosferskih padavina [140].

#### **2.4.2 Degradacija organofosfatnih insekticida u unapredjenim procesima oksidacije za prečišćavanje voda**

Relativna stabilnost insekticida u životnoj sredini i spora degradacija fotolizom i/ili transformacija do toksičnijih produkata tokom fotodegradacionih procesa rezultirali su

dodatnim ekološkim problemima, i velikim interesovanjem za istraživanje i razvoj tehnologija za prečišćavanje voda zagađenih organofosfatima, njihovim degradacionim produktima i komercijalnim koproduktima (izomeri i/ili O- i S- trimetil fosfati) [138] s ciljem njihovog efikasnog uklanjanja. Otpadne vode koje sadrže pesticide ne mogu se efikasno tretirati biološkim tehnikama, jer su toksični prema mikroorganizmima tako da njihova biodegradacija nije moguća [149]. Razvoj na polju hemijskog tretmana voda doveo je do nekoliko oksidativnih postupaka degradacije zasnovanih na generisanju visoko reaktivnih intermedijera koji iniciraju niz reakcija kojima se razgrađuju i uklanjaju organski zagađivači. Oni su poznati kao unapredjeni procesi oksidacije (AOP- *advanced oxidation processes*), koji se mogu podeliti u dve glavne grupe: fotohemijske i procese ozonizacije. Fotohemijski procesi se dalje mogu podeliti na: direktnu fotolizu, fotoosetljivu oksidaciju i fotokatalizu [150-155].

AOP se zasnivaju na produkciji  $\text{OH}^\bullet$ , druge najjače oksidativne vrste posle fluorina (redukcionni potencijal  $E^\circ = 2.8 \text{ V}$ ), koji neselektivno napadaju većinu organskih molekula, dovodeći do delimične ili totalne dekompozicije [156]. Međutim, mogućnost transformacija do toksičnijih i/ili stabilnijih proizvoda tokom fotodegradacionih procesa predstavlja ozbiljan problem za životnu sredinu. Zato, reakcioni mehanizmi i nova formirana jedinjenja moraju se detaljno istražiti pre nego što se prihvate kao metode bezopasne za okolinu [157].

## **2.5 Bioanalitičke metode za praćenje toksičnosti tokom unapredjenih procesa oksidacije za uklanjanje organofosfatnih insekticida**

Česta upotreba organofosfatnih insekticida dovodi do njihove akumulacije, zagađenja životne sredine, kao i akutnih i hroničnih trovanja [69]. Zato, primena ovih insekticida mora se strogo ograničiti i kontrolisati. Većina zemalja ima jake regulative za primenu pesticida; npr. u Evropskoj uniji, njihova upotreba je regulisana direktivom 91/41/EHS [158]. Prisustvo insekticida i proizvoda njihove transformacije u životnoj sredini, vodi i hrani je neophodno pratiti različitim bioanalitičkim tehnikama.

Toksičnost voda koje sadrže pesticide zavisi od količine i vrste pesticida i njihovih degradacionih produkata. Odnosi koncentracija-toksičnost su složeni i za čista jedinjenja, dok je za smeše nekoliko pesticida, uključujući njihove degradacione

produkte, nemoguće predvideti efekte. Zato bi trebalo koristiti odabrane eseje za određivanje toksičnosti zagađenih voda [159]. Za procenu zagađenosti voda koriste se celi organizmi kao bioeseji (invertebrate-*Daphnia* i *Ceriodaphnia*, biljke, ribe i alge-*Chlorella fusca*, *Selenastrum Capricornutum*, *Ceratophyllum oryzatorum*), koji daju indukovane biološke odgovore (inhibicija rasta, reprodukcije i pokretljivosti) u prisustvu toksičnih jedinjenja [160, 161]. Jajne ćelije morskog ježa i mekušaca se koriste kao bioeseji za testiranje toksičnosti morske vode [162]. Nedostatak ovih bioeseja je neophodna specijalna oprema i posebno obučeno osoblje, dok bi indikatori toksičnosti trebalo da budu brzi, jeftini i jednostavni za rukovanje. Poslednjih decenija razvijeni su bioeseji koji koriste mikroorganizme i zasnovani su na merenju elementarnih transformacija (ugljenik, sumpor i azot), potrošnje kiseonika, unosa glukoze, kao i praćenju rasta, smrtnosti, fotosinteze, luminiscencije ili enzimske aktivnosti. Pored bioeseja koji daju odgovore na nivou organizma, razvijeni su enzimski i imuno eseji koji povezuju toksičnost ciljanog jedinjenja i pad aktivnosti određenog enzima ili biomarkera (npr. organofosfatni i karbamatni insekticidi selektivno inhibiraju aktivnosti holinesteraza) [160, 161, 163].

Efikasnost primenjenih AOP za uklanjanje pesticida procenjuje se stepenom detoksikacije. U Tabeli 2 prikazano je nekoliko primera AOP za degradaciju organofosfatnih insekticida i primenjivani testovi za procenu toksičnosti. Najčešće korišćeni testovi za praćenje toksičnosti vode uzrokovane organofosfatima su *Microtox* test, *Daphnia* i AChE bioesej. *Microtox test* koristi bioluminiscenciju morske bakterije *Vibrio fischeri* kao meru njene aktivnosti. Nivoi toksičnosti se određuju praćenjem smanjenja luminiscencije usled inhibicije bakterijske luciferaze nakon kontakta sa toksičnim jedinjenjima. Prednosti *Microtox* testa su brzina, jednostavnost, osetljivost i reproduktivnost [164]. *Daphnia* test se zasniva na praćenju pokretljivosti izloženih organizama nakon 24 ili 48 sati. Time je ovaj test manje pogodan za *on-line* praćenje AOP, u poredjenju sa *Micro* testom i AChE esejom koji mogu dati informacije o toksičnosti uzoraka za nekoliko minuta [165].

**Tabela 2.** Unapređeni procesi oksidacije za degradaciju organofosfatnih insekticida i primenjeni testovi za praćenje toksičnosti

Analit	AOP	Proizvodi	Test toksičnosti	Toksičnost	Referenca
Dimetoat	TiO <sub>2</sub> i ZnO fotokataliza + oksidanti	–	<i>Microtox test/Vibrio fischeri</i>	Raste tokom prvih faza a zatim polako opada	[166]
Dihlorvos	TiO <sub>2</sub> i ZnO fotokataliza + oksidanti (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ili K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> )	–	<i>Microtox test/Vibrio fischeri</i>	Raste	[167]
Dimetoat	TiO <sub>2</sub> fotokataliza	+	<i>Microtox test/Vibrio fischeri</i>	Raste	[164]
Azinfos- metil; hlorpirifos; malation; malaokson	Fotoliza- ksenonska lampa	+	AChE–TLS ( <i>thermal lens spectrometric</i> ) spektrometrijski bioesej	Raste	[146]
Metil- paration	Fotoliza - ksenonska lampa	+	<i>Vibrio fischeri</i> ( <i>Lumistox</i> ) + konduktometrijski AChE biosenzor	Raste	[168]

### 2.5.1 Acetilholinesterazni biosenzor za detekciju i procenu toksičnosti organo-tiofosfata i proizvoda njihove transformacije

Za praćenje toksičnosti tokom degradacije organo-tiofosfata u AOP često se koristi *Vibrio fischeri* test, kojim se određuje bioluminiscencija kao mera aktivnost luciferaze morske bakterije. Iako je ovaj bioesej pogodan indikator organo-tiofosfata, manje je osetljiv na prisustvo neurotoksičnih okso formi koje su i do nekoliko stotina puta moćniji inhibitori AChE. Toksičnost metil-parationa, metil-paraoksona i 4-nitrofenola (proizvod hidrolize metil-parationa i/ili metil-paraoksona) ispitivana je AChE konduktometrijskim biosenzorom i *Lumistox* testom (*V. fischeri*) (Tabela 2). Dobijeni rezultati pokazuju da je *V. fischeri* osetljiviji prema metil-parationu više od tri puta u poređenju sa metil-paraoksonom, dok je AChE biosenzor pokazao nisku osetljivost za metil-paration i nije detektovao 4-nitrofenol, jedinjenje koji ne inhibira AChE [168]. Zato su AChE biosenzori pogodniji za praćenje degradacionih procesa organo-tiofosfata, jer tokom takvih procesa mogu da se formiraju njihovi okso analozi (mnogo jači inhibitori AChE), dok se tio jedinjenja prate inhibicijom bioluminiscencije. Ova prednost AChE bioseseja za testiranje neurotoksičnosti organofosfata ubrzala je istraživanje primene AChE biosenzora u AOP za degradaciju ovih insekticida.

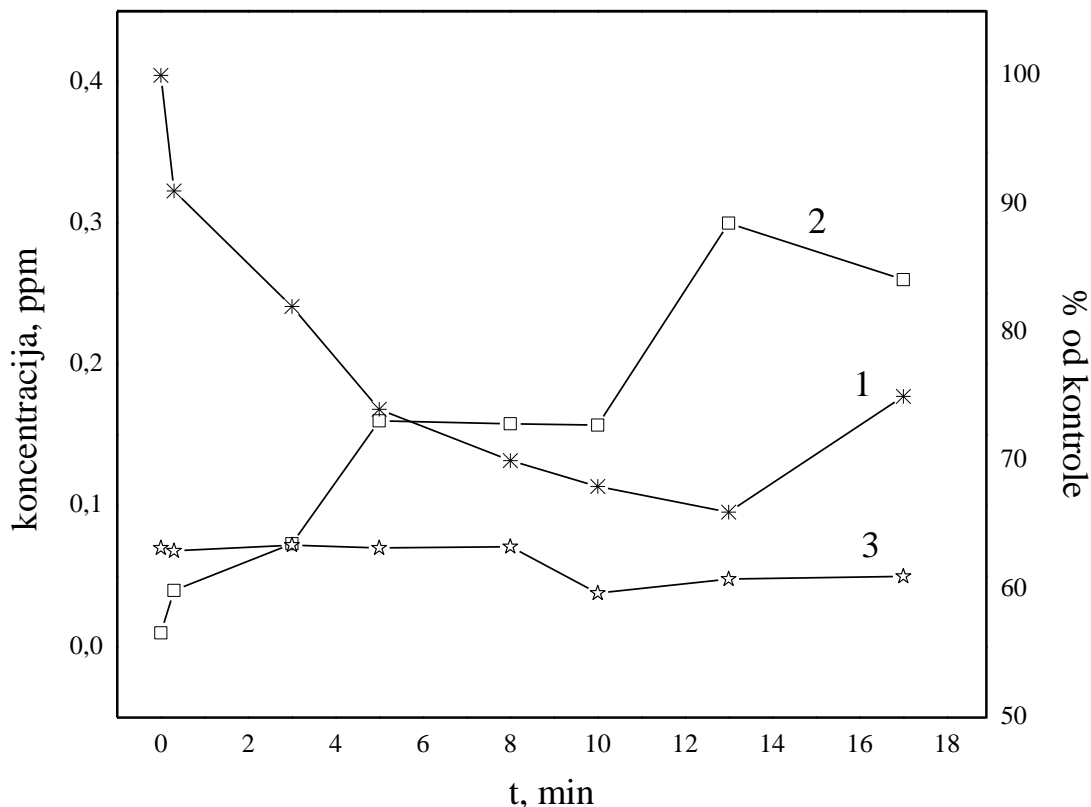
U Tabeli 3 navedeni su tretmani organo-tiofosfata tokom AOP za njihovo uklanjanje i trend toksičnosti praćen AChE biosenzorom. Mera toksičnosti je inhibicija, odnosno pad aktivnosti AChE.

**Tabela 3.** Praćenje toksičnosti organo-tiofosfata AChE biosenzorom tokom AOP za njihovo uklanjanje

<b>Analit</b>	<b>AOP</b>	<b>Proizvodi</b>	<b>Test toksičnosti</b>	<b>Toksičnost</b>	<b>Referenca</b>
Malation	$\gamma$ -zračenje	+	AChE-TLS biosenzor	Raste, a zatim sporo opada	[157]
Malation; malation u radotionu	TiO <sub>2</sub> fotokataliza	+	AChE-TLS biosenzor	Raste, a posle 30 min opada	[138]
Hlorpirifos	TiO <sub>2</sub> fotokataliza	+	AChE-TLS biosenzor	Raste	[157]
Azinfos-metil; hlorpirifos; malation; malaokson	Fotoliza-ksenonska lampa	+	AChE-TLS biosenzor	Raste	[146]
Hlorpirifos; hlorpirifos u pyrinex-u	Ozonoliza	+	AChE-TLS biosenzor	Raste	[157]



Promena toksičnosti tokom  $\gamma$ -zračenja malationa, najviše primenjivanog insekticida u proizvodnji pamuka [169], praćena je AChE-TLS biosenzorom [157]. Da bi se utvrdilo koji formirani produkti u ozračenim rastvorima utiču na aktivnost imobilizovanog enzima, GC (*gas chromatography*)-MS (*mass spectrometry*) analiza je primenjena za njihovu identifikaciju. Rezultati su pokazali da se tokom 17 minuta  $\gamma$ -zračenja malation u potpunosti degradira i nastaju okso i izo analog-malaokson i izomalation, jaki inhibitori AChE. Poređenjem zavisnosti formiranja malaoksona i inhibicije AChE (% od kontrole-preostala aktivnost enzima) od vremena zračenja (Slika 9), može se konstatovati da je toksičnost, odnosno pad aktivnosti enzima, u najvećoj meri posledica prisustva malaoksona. Na kraju  $\gamma$ -zračenja malationa, koncentracija formiranog malaoksona i izomalationa nije se značajno smanjila, što ukazuje na manju efikasnost degradacije malaoksona i izomalationa u odnosu na malation. Aktivnost AChE je manja u odnosu na početnu aktivnost, kada je u rastvoru bio prisutan netretirani malation (Slika 9). Na osnovu praćenja toksičnosti AChE biosenzorom može se zaključiti da  $\gamma$ -zračenje mineralizuje tretirani organo-tiofosfat, ali ga ne detoksikuje odnosno prouzrokuje nastajanje novih neurotoksičnih jedinjenja. Potpuno uklanjanje toksičnih jedinjenja moglo bi se postići dužim vremenom ozračivanja ili većim dozama zračenja u poređenju sa potrebnim za kompletno uklanjanje polaznog organo-tiofosfata [157].



**Slika 9.** Preostala aktivnost AChE (% od kontrole) (1) i formiranje malaoksiona (2) i izomalationa (3) tokom  $\gamma$ -zračenja malationa.

Studije fotolitičkog, fotokatalitičkog i tretmana ozonom organo-tiofosfata [138, 146, 157] pokazuju da je stepen degradacije polaznog jedinjenja obrnuto proporcionalan stepenu detoksikacije, odnosno da toksičnost izražena kao inhibicija aktivnosti AChE raste tokom tretmana (Tabela 3). Štaviše, formirana neurotoksična jedinjenja (okso i izo analozi), koja su snažni inhibitori AChE, veoma sporo se razgrađuju tokom AOP, dok je degradacija polaznog jedinjenja uglavnom potpuna. Efikasnost detoksikacije ne može se predvideti na osnovu koncentracije insekticida (komercijalni preparati su najčešće tio jedinjenja zbog bezbednosti za ljude tokom upotrebe) na kraju primenjenog tretmana, a određivanje koncentracije svakog pojedinačnog proizvoda transformacije standardnim analitičkim tehnikama (GC-MS, HPLC-UV/Vis i dr.) bi bilo komplikovano, skupo i dugotrajno. Iz navedenih razloga, primena AChE bioeseja za procenu efektivnosti AOP za uklanjanje organskih zagađivača iz voda, kao i za detekciju neurotoksičnih organofosfatnih jedinjenja u prirodnim uzorcima vode i hrani je svrsishodna i opravdana.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1 Hemikalije

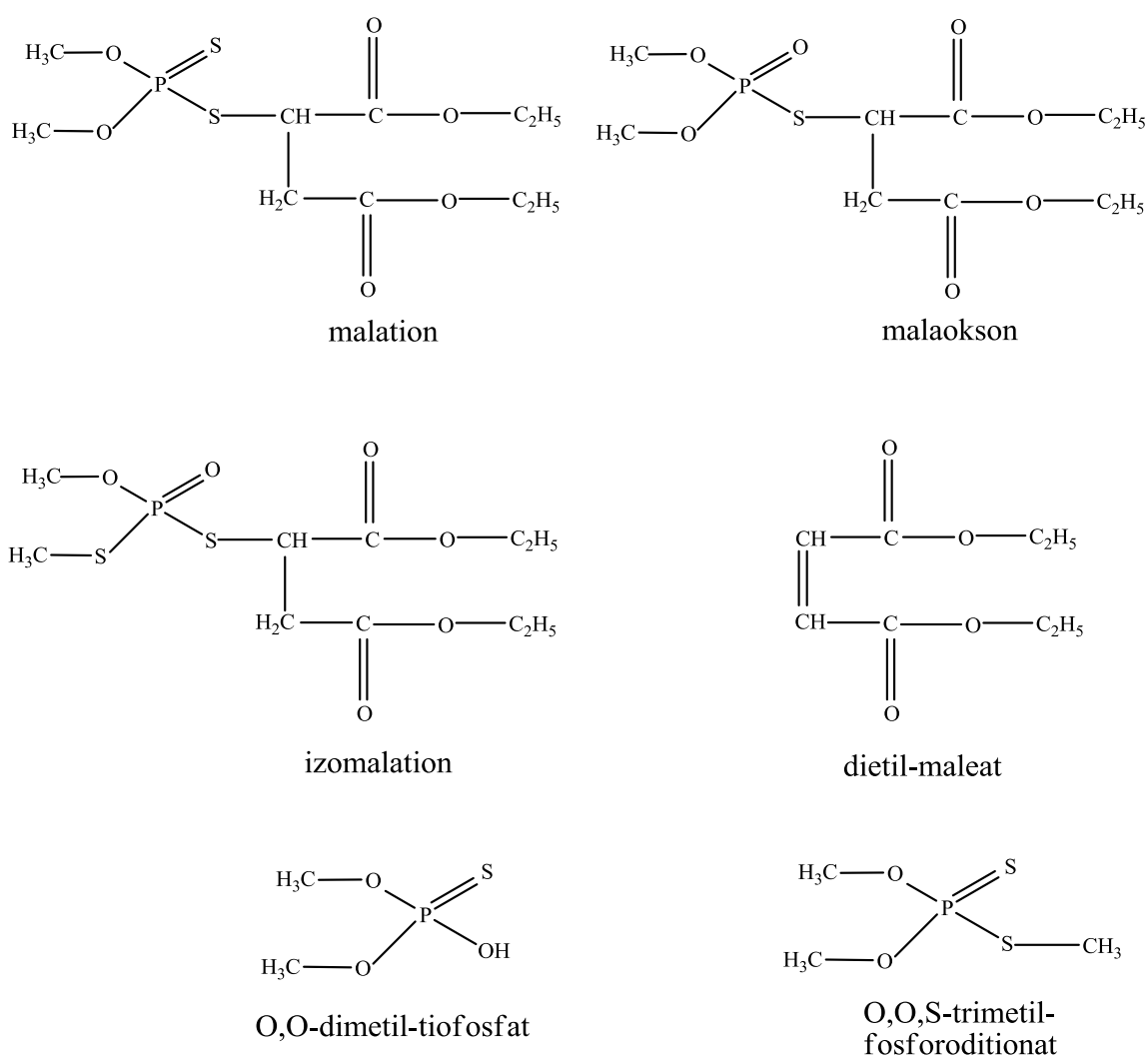
##### 3.1.1 Enzimi i hemikalije za enzimске eseje

Acetilholinesteraza poreklom iz električne jegulje (AChE, specifična aktivnost 288 IU/mg čvrste supstance, 408 IU/mg proteina), acetilholinesteraza iz govedih eritrocita (0,28 IU/mg čvrste supstance), acetilholinesteraza iz humanih eritrocita (500 IU/mg proteina), Na,K-ATPaza iz cerebralnog korteksa svinje (25,8  $\mu$ mol Pi/h/mg protein), acetiltioholin-jodid (ASChI), 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoeva kiselina) (DTNB), adenzin-trifosfat (ATP), adenzin-difosfat (ADP), propidijum jodid, staklene perlice sa kontrolisanom veličinom pora (CPG, *controlled pore glass* 240, 80–120 *mesh*) su dobijeni od Sigma Chemicals Co. (Nemačka). Magnezijum hlorid, TRIS, natrijum-hlorid, kalijum-hlorid, kalaj-hlorid, kalcijum-hlorid, kalijum-hidrogen-fosfat, natrijum-citrat, amonijum-molibdat, glutaraldehid, 3-aminopropil-trietoksisilan, natrijum-dodecil-sulfat (SDS), natrijum-dihidrogen-fosfat, natrijum-karbonat, natrijum-kalijum-tartarat, bakar(II)-sulfat, *Folin* i *Ciocalteu's* fenol reagens, piruvat, *N*-bromo-sukcinimid (NBS), triton X, vodonik-peroksid (30%), saharoza, natrijum-hidroksid, hlorovodonična kiselina, perhlorna kiselina, acetonitril i mravlja kiselina su dobijeni od Merck (Nemačka). Glutation reduktaza iz pekarskog kvasca (*Sacharomyces cerevisiae*) (205 units/ mg proteina, 2,2 mg proteina/ml), redukovani glutation (GSH), etilen-diamin-tetra sirćetna kiselina (EDTA), epinefrin (adrenalin), redukovani nikotinamid adenin dinukleotid (NADH), redukovani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH), tiobarbiturna kiselina, 2-hidroksiiminometil-1-metilpiridinium-jodid (2-PAM) i goveđi serum albumin (BSA) su dobijeni od Sigma Chemicals Co. (Nemačka).

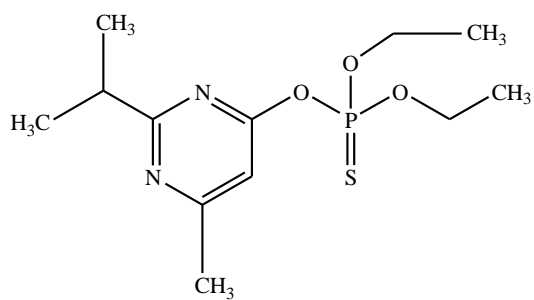
##### 3.1.2 Insekticidi

Malation (dietil (dimetoksi-fosfin-tioil-tio)sukcinat) (97,3%), O-analog malationa (malaokson), hlorspirifos (O,O-dietil-O-3,5,6-trihlor-2-piridil-tiofosfat) (99,8%), hlorspirifos-okson (rastvor, 10 ppm u cikloheksanu), diazinon (O,O-dietil-O-(2-

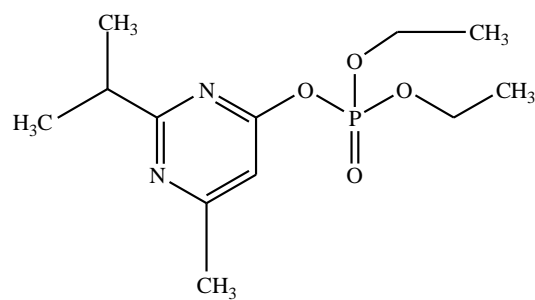
izopropil-6-metil-pirimidin-4-il)fosforotioat (97,3%), O-analog diazinona (diazokson) (rastvor 100 ppm in acetonitrilu), 2-izopropil-6-metil-4-pirimidinol (IMP) (93%) i 3,5,6-trihloro-2-piridinol (THP) (99,4%) su dobijeni od Pestanal (Nemačka). Strukturni izomer malationa (izomalation) (98,4%) je dobijen od Instituta za organsku industrijsku hemiju (Poljska), dietil-maleat (97%) od Aldrich (Nemačka), a O,O-dimetil-tiofosfat i O,O,S-trimetil-fosforoditionat od Sigma Chemicals Co (Nemačka). Radni rastvori insekticida su pripremani neposredno pre eksperimenta, razblaživanjem osnovnih rastvora koncentracije 0,1 M u odgovarajućem rastvaraču. Osnovni rastvori su čuvani na -20°C. Strukturne formule ispitivanih insekticida su date na Slikama 10a i 10b.



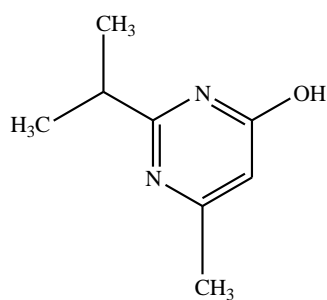
**Slika 10a.** Strukturne formule malationa i ispitivanih proizvoda njegove degradacije.



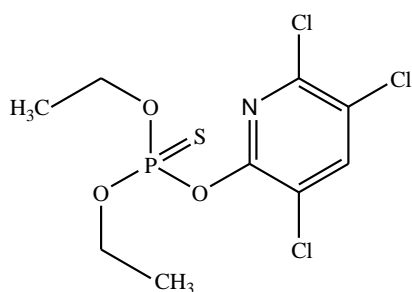
diazinon



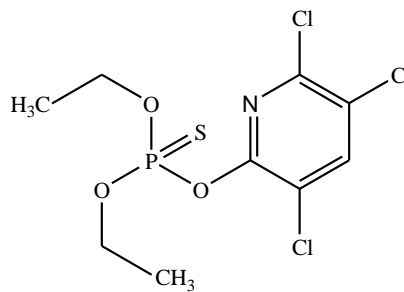
diazokson



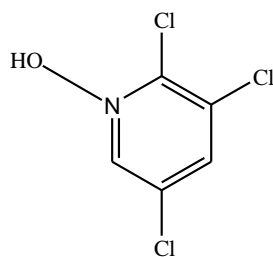
IMP



hlorpirifos



hlorpirifos-okson



THP

**Slika 10b.** Strukturne formule diazinona, hlorpirifosa i proizvoda njihove oksidacije i hidrolize.

### **3.1.3 Hemikalije za ispitivanje genotoksičnosti i citotoksičnosti**

Limfoprep je dobijen od PAA Laboratories (Austrija). Hranljivi medijum DMEM-*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, *PB-max karyotyping* medijum, smeša antibiotik/antimikotik, citohalazin B i teleći serum su dobijeni od Gibco, Invitrogen (SAD).

## **3.2 Korišćena oprema**

### **3.2.1 Spektrofotometrijska merenja**

Spektrofotometrijska merenja su rađena na UV/Vis Perkin Elmer Lambda 35 spektrofotometru, u kvarcnoj staklenoj kivetici sa svetlosnim putem 1 cm.

### **3.2.2 Tečna hromatografija**

Hromatografska merenja su rađena na Waters ACQUITY Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) – UV/Vis sistemu, sa ACQUITY UPLC™ BEH C<sub>18</sub>, 1,7 µm, kolonom dimenzija 50 mm × 2,1 mm. Sistem je kontrolisan Empower softverom.

### **3.2.3 Gasna hromatografija**

Hromatografske analize su rađene na sistemu GC/MS Agilent 7890A sistemu (SAD).

### **3.2.4 Centrifugiranje**

Za centrifugiranje su korišćene: centrifuga minispin plus (Eppendorf, Nemačka), centrifuga 5702 (Eppendorf, Nemačka), Sorvall centrifuga (Fisher Scientific, SAD) i ultracentrifuga Beckman L7-55 (SAD).

### 3.2.5 Mikroskopija

Za mikroskopska merenja je korišćen mikroskop sa uvećanjem  $400\times$  ili  $1000\times$  (AxioImager A1, Carl Zeiss, Nemačka).

### 3.2.6 Ostala laboratorijska oprema

Analitička vaga Mettler i tehnička vaga Mettler su korišćene za odmeravanje. Za mešanje uzoraka korišćena je magnetna mešalica VELP scientific, za merenje pH vrednosti rastvora pH metar Metrohm 713 sa kombinovanom elektrodom, a za homogenizovanje tkiva homogenizer ručno izrađen na Institutu za hemiju, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

### 3.3 Izolovanje sinaptozoma iz mozga pacova

U eksperimentima su korišćeni mužjaci pacova soja Wistar starosti 90 dana. Životinje su gajene u vivarijumu Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu pod standardnim laboratorijskim uslovima (temperatura od  $22^{\circ}\text{C}$  i veštačko osvetljenje od 7-19 sati) i imale su slobodan pristup hrani i vodi.

Mozgovi pacova su izolovani nakon žrtvovanja životinja dekapitovanjem pomoću giljotine (Hardvard Apparatus) u jutarnjim časovima. Izolovani celi mozgovi se ispiraju, a zatim homogenizuju u 10 ml hladne puferisane 0,32 M saharoze, pH 7,4 pomoću staklenog homogenizera sa teflonskim klipom. Klip je pričvršćen na motor, dok je brzina homogenizacije 900 rpm sa dvadeset zaveslaja tučkom. Homogenizovanje tkiva, kao i sve ostale faze tokom izolovanja, rade se na ledu ( $4^{\circ}\text{C}$ ). Dobijeni homogenat tkiva se centrifugira 10 minuta na  $1000 \times g$  u centrifugi Sorvall, čime se talože jedra. Supernatant se odlije, a talog se ispere sa 10 ml hladne puferisane 0,32 M saharoze i centrifugira na isti način. Supernatanti, koji sadrže sinaptozome (presinaptičke nervne završetke), se spoje i centrifugiraju 20 minuta na  $10000 \times g$  (ultracentrifuga) na  $4^{\circ}\text{C}$ . Dobijeni talog predstavlja neprečišćenu sinaptozomalnu frakciju u kojoj se nalaze sinaptozomi, mitohondrije i membranski fragmenti [170, 171]. Talog neprečišćenih sinaptozoma se resuspenduje u 3 ml puferisane 0,32 M saharoze i tretira odgovarajućim

koncentracijama organofosfatnih insekticida tokom 1 sata na 37°C. Neposredno nakon tretmana, određuje se aktivnost laktat dehidrogenaze (LDH) u uzorcima sinaptozoma, dok se ostatak tretiranih i netretiranih suspenzija (kontrola) čuva na temperaturi od -70°C za određivanje aktivnosti AChE, Na,K-ATPaze, antioksidantnih enzima, sadržaja MDA i koncentracije proteina.

### **3.4 Izolovanje membrana eritrocita iz humane krvi**

U 5 ml suspenzije eritrocita se doda 30 ml fiziološkog rastvora, i centrifugira 10 minuta na 2000 rpm (Eppendorf centrifuga 5702). Supernatant se odbacuje, a istaloženi eritrociti se ispiraju još dva puta na isti način. Isprani eritrociti se liziraju dodatkom 5 mM pufera TRIS, pH 7,4 i 1 mM EDTA. Suspenzija se zamrzne na -70°C tokom 1 dana, pri čemu pucaju membrane, odnosno eritrociti se dodatno liziraju. Narednog dana, suspenzija se odmrzne i centrifugira 20 minuta na 12500 rpm (Beckman ultracentrifuga) uz hlađenje rotora centrifuge do 4°C. Membrane eritrocita se talože, dok se u supernatantu izdvaja hemoglobin (crvena boja). Postupak se ponovi još nekoliko puta, odnosno dok supernatant ne bude svetlo ružičaste boje, kada je iz membrana uklonjen hemoglobin [172, 173]. Izolovane membrane se koncentrišu i čuvaju na -70°C do upotrebe.

### **3.5 Kulture limfocita i eritrocita**

Uzorak krvi je uzet od zdravog muškarca starosti 30 godina, nepušača u zdravstvenoj ustanovi u skladu sa važećim medicinskim i etičkim regulativama Republike Srbije [174]. Alikvoti od 0,5 ml heparinizirane krvi su zasađeni u 5 ml hranljivog medijuma za kulturu ćelija (*PB-max karyotyping medium*). Dva paralelne serije kultura krvi su tretirane sa različitim koncentracijama diazinona i IMP ( $2 \times 10^{-8}$  –  $2 \times 10^{-4}$  M) i rastvorima diazinona fotodegradiranim tokom 0, 5, 15, 30, 60 i 115 minuta. Koncentracija netretiranog rastvora diazinona (0 min) u medijumu za kultivaciju je  $2 \times 10^{-5}$  M. U prvoj seriji ćelijskih kultura i odgovarajućim kontrolama određena je učestalost mikronukleusa i indeks ćelijske proliferacije, dok je druga serija upotrebljena za merenje aktivnosti AChE i Na,K-ATPaze i sadržaja MDA.



Nakon 72 sata inkubacije, kultivisane ćelije su sakupljene centrifugiranjem na 1800 rpm, dok je supernatant (inkubacioni medijum u kome su gajene ćelije) dalje korišćen za određivanje sadržaja MDA. Sakupljena ćelijska suspenzija je nanescena na *lymphoprep* na kome su izdvojeni limfociti centrifugiranjem na 1200 rpm 10 minuta, a zatim 15 minuta na 3000 rpm, dok su eritrociti istaloženi na dnu. Izdvojeni limfociti su isprani u fiziološkom rastvoru i čuvani na  $-70^{\circ}\text{C}$  za analizu AChE, Na,K-ATPaze i MDA. Istaloženi eritrociti su isprani u fiziološkom rastvoru i dalje tretirani na način opisan u poglavlju 3.4 do izolovanja membrana.

### **3.6 Kulture fibroblasta**

Kulture fibroblasta kože gajene su u hranjivom medijumu (DMEM-*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, obogaćenom sa 15% telećeg seruma i 1% smešom antibiotik/antimikotik). Kada su ćelije dostigle adekvatnu gustinu, rasađene su na  $15 \times 2$  flaskova i 1 sat nakon tripsinizacije tretirane su diazinonom i IMP u opsegu koncentracija  $2 \times 10^{-8} - 2 \times 10^{-4}$  M, odnosno ozračenim rastvorima diazinona. Ozračeni rastvori diazinona su razblaženi 50 puta u kultivisanim fibroblastima, tako da je koncentracija netretiranog rastvora diazinona (0 min)  $2 \times 10^{-5}$  M. U tretiranim kulturama fibroblasta, kao i netretiranom kontrolnom uzorku, su merene aktivnosti AChE i Na,K-ATPaze, kao i sadržaj MDA. Za analizu mikronukleusa citokinezis-blok mikronukleusnim (CB MN) testom, ćelije su inkubirane 72 sata na  $37^{\circ}\text{C}$ , od čega poslednja 24 sata u prisustvu citohalazina B, finalne koncentracije  $4 \mu\text{g/mL}$ . Preparacija je izvršena prebacivanjem ćelijske suspenzije u staklene epruvete, nakon čega su ćelije podvrgnute istoj proceduri kao kulture limfocita.

### **3.7 Određivanje aktivnosti enzima**

#### **3.7.1 Određivanje aktivnosti acetilholinesteraze**

Aktivnost AChE je merena modifikovanom Elmanovom (*Ellman-ovom*) metodom [175]. U 50 mM fosfati pufer, pH 8 se doda  $10 \mu\text{l}$  komercijalnog enzimskog preparata ( $3 \text{ IU/ml}$ ), (ne)tretiranog uzorka sinaptozoma, membrana eritrocita, limfocita ili

fibroblasta. Enzim se izlaže odgovarajućoj koncentraciji ispitivanog organofosfatnog jedinjenja. Smeša se preinkubira na 37°C tokom 15 minuta u slučaju merenja specifične aktivnosti AChE u sinaptozomima, membranama eritrocita, limfocitima i fibroblastima. U eksperimentima sa komercijalnim enzimskim preparatom, vreme preinkubacije varira. Enzimska reakcija započinje dodatkom supstrata, 10 µl 0,075 M ASChI u kombinaciji sa reagensom za bojenje, 20 µl 0,1 mM DTNB. Proizvod enzimske reakcije, tiholin-jodid i DTNB daju jedinjenje žute boje, 5-tio-2-nitrobenzoeva kiselina, čije nastajanje se prati spektrofotometrijski na 412 nm. Enzimska reakcija se zaustavlja sa 50 µl 0,01 M SDS. Vreme inkubacije na 37°C, odnosno enzimske reakcije, je 3-5 minuta (vizuelno se prati nastajanje žute boje) u zavisnosti od aktivnosti enzima u ispitivanom uzorku. Ukupna zapremina reakcione smeše je 700 µl. Slepa proba ne sadrži enzim. Aktivnost AChE se izražava kao  $\Delta A/\text{min}/\text{mg}$  proteina. Svi eksperimenti su rađeni u triplikatu. Preliminarne studije su pokazale da organofosfatni insekticidi ne interaguju sa 5-tio-2-nitrobenzoevom kiselinom.

### **3.7.2 Određivanje aktivnosti Na,K-ATPaze**

#### **3.7.2.1 Određivanje aktivnosti Na,K-ATPaze preko oslobođenog ortofosfata**

Aktivnost Na,K-ATPaze je praćena po modifikovanoj metodi autora Seals i saradnika [176], praćenjem promene koncentracije ortofosfata koji se oslobađa tokom enzimske hidrolize ATP. Aktivnost Na,K-ATPaze se određuje kao razlika aktivnosti totalne-ATPaze i *ecto*-ATPaze, koje se nezavisno mere. Najpre se pripremi inkubaciona smeša koja sadrži 50 mM TRIS-HCl pH 7,4, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl i 20 mM KCl. U 50 µl inkubacione smese se dodaje 25 µl komercijalnog enzimskog preparata (5 mg/ml) i 20 µl rastvora ispitivanog organofosfata odgovarajuće koncentracije, odnosno (ne)retiranog uzorka fibroblasta, sinaptozoma, membrana eritrocita ili limfocita. Za merenje aktivnosti *ecto*-ATPaze, dodaje se i 20 µl 20 mM ouabaina koji selektivno inhibira aktivnost Na,K-ATPaze. Smeša se preinkubira 10 minuta na 37°C, nakon čega se dodaje 20 µl 20 mM ATP za započinjanje enzimske reakcije. Nakon 10 minuta inkubacije na 37°C, reakcija se zaustavlja dodavanjem 22 µl 3 M hladne perhlorne kiseline i stavljenjem epruvete na led. Ukoliko je specifična aktivnost Na,K-ATPaze u

uzorku veoma mala, potrebno je produžiti vreme inkubacije i do 1 sata. U slepoj probi inkubaciona smeša ne sadrži  $MgCl_2$ ,  $NaCl$  i  $KCl$ , već samo pufer TRIS pH 7,4. Finalna zapremina reakcione smeše iznosi 200  $\mu l$ , i podešava se dodatkom odgovarajuće zapremine dejonizovane vode. U reakcionu smešu, koja sadrži ortofosfat i ADP, koji su oslobođeni tokom hidrolize ATP katalitičkim delovanjem totalne-ATPaze, odnosno *ecto*-ATPaze, dodaje se 4,5 ml vode. Koncentracija oslobođenog ortofosfata određuje se bojenom reakcijom sa 200  $\mu l$  0,2 M amonijum-molibdata ( $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4 H_2O$ ) u 30% sumpornoj kiselini i dve kapi 2,5% rastvora  $SnCl_2$  u glicerolu. Aktivnost totalne-ATPaze, odnosno *ecto*-ATPaze je proporcionalna apsorbanciji formiranog rastvora plave boje, koja se meri na 690 nm. Aktivnost enzima se izražava kao  $\mu l$  ortofosfata/h/mg proteina. Koncentracija ortofosfata se određuje iz standardne prave, odnosno linearne zavisnosti  $A_{690}$  od koncentracije  $K_2HPO_4$  (Slika P1).

### 3.7.2.2 Određivanje aktivnosti Na,K-ATPaze preko oslobođenog ADP

Aktivnost Na,K-ATPaze je praćena i preko oslobođenog ADP koji se, pored ortofosfata (opisano u poglavlju 2.3.3), oslobađa tokom enzimske hidrolize supstrata, ATP. Koncentracija oslobođenog ADP je merena hromatografski upotrebom UPLC-UV/Vis sistema (Slika P7), modifikovanom metodom iz literature [177]. Mobilna faza se sastoji od 4 mM tetrabutilamonijum-hidroksida u 4 mM fosfatnom puferu (faza A) i metanola (faza B) u odnosu 75:25. Brzina protoka mobilne faze je 0,25 ml/min, zapremina injektiranog uzorka 10  $\mu l$ , temperatura kolone 40°C, dok je talasna dužina 254 nm. Koncentracija ADP oslobođenog tokom enzimske hidrolize je određena iz standardne prave za ADP (Slika P1).

### 3.7.3 Određivanje aktivnosti katalaze

Aktivnost katalaze se meri esejom koji prati degradaciju  $H_2O_2$  [178]. 50  $\mu l$  suspenzije sinaptozoma se dodaje u kvarcnu staklenu kivetu na sobnoj temperaturi, koja sadrži 2,975 ml 50 mM fosfatanog pufera u 0,4 mM EDTA. Enzimska reakcija počinje dodatkom 30  $\mu l$  3%  $H_2O_2$ . Prati se promena, odnosno smanjenje vrednosti apsorbancije, usled enzimske degradacije  $H_2O_2$ , na 240 nm tokom 3-5 minuta. Aktivnost katalaze se

izražava kao U/mg proteina. Jedna jedinica (U) enzimske aktivnosti se definiše kao 1  $\mu\text{mol}$  utrošenog  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min}$ .

### 3.7.4 Određivanje aktivnosti glutation peroksidaze

Za merenje aktivnosti GPx potrebno je najpre pripremiti reakcioni koktel koji sadrži (jedna mera): 8,9 ml fosfatnog pufera, pH 7 (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 0,40 mM EDTA), 50  $\mu\text{l}$  200 mM GSH, 1 mg  $\beta$ -NADPH i 100  $\mu\text{l}$  100 units/ml glutation reduktaze iz pekarskog kvasca (*Sacharomyces cerevisiae*). U kvarcnu staklenu kivetu (sobna temperatura) se dodaje 3 ml reakcionog koktela i 0,3 ml uzorka sinaptozoma. Kiveta se smesti u spektrofotometar, a zatim se započne enzimska reakcija dodatkom 50  $\mu\text{l}$  0,042%  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $A_{240} = 0,52-0,56$ ). Pad vrednosti apsorbancije se prati ( $\lambda = 340 \text{ nm}$ ) na 15 sekundi u toku 4-5 minuta tj. do prestanka promene. Aktivnost GPx se izražava kao  $\Delta A/\text{min}/\text{mg}$  proteina [179].

### 3.7.5 Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze

Aktivnost totalne SOD je merena prema metodi autora Misre i Fridoviča (*Misra-e i Fridovich-a*) [180]. 10-30  $\mu\text{l}$  suspenzije sinaptozoma se dodaje u 3 ml 0,5 M EDTA-natrijum karbonatnog pufera, pH 10,2. Enzimska reakcija počinje dodatkom 100  $\mu\text{l}$  adrenalina (30 mM u 0,1 M HCl) i aktivnost se meri na 480 nm tokom 4 minuta. Jedna jedinica (U) SOD se definiše kao količina enzima koja inhibira brzinu oksidacije adrenalina za 50%. Aktivnost enzima se izražava kao U/mg proteina.

### 3.7.6 Određivanje aktivnosti laktat dehidrogenaze

Brzina reakcije prevođenja piruvata u laktat katalitičkim dejstvom LDH, odnosno aktivnost enzima se meri praćenjem smanjenja apsorbancije na 340 nm. Jedna jedinica aktivnosti enzima oksiduje jedan mikromol NADH po minuti na 25°C i pH 7,3. U smešu, smeštenu u kvarcnu kivetu, koja sadrži: 2,8 ml 0,2 M pufera TRIS-HCl, pH 7,3, 0,1 ml 6,6 mM NADH u istom puferu i 0,1 ml 30 mM natrijum-piruvata se dodaje 0,1 ml uzorka sinaptozoma. Odmah nakon dodavanja uzorka, koji sadrži LDH čija aktivnost

se meri, početi sa merenjem vrednosti apsorbancije na svakih 15 sekundi tokom 4-5 minuta, odnosno do stabilizacije njene vrednosti. Aktivnost enzima se izražava kao  $\Delta A/\text{min}/\text{mg}$  proteina [181]. Jedan od uzoraka sinaptozoma se tretira sa 0,1% rastvorom tritona X (finalna koncentracija) koji razara ćelijske membrane. Vrednost LDH u prisustvu tritona X je maksimalna i predstavlja referentnu vrednost sa kojom se poredi aktivnost enzima izmerena u analiziranim uzorcima sinaptozoma.

### **3.8 Određivanje sadržaja malondialdehida**

Za određivanje sadržaja MDA u uzorcima sinaptozoma i limfocita koristi se tiobarbiturni esej [182]. U 500  $\mu\text{l}$  uzorka se dodaje 500  $\mu\text{l}$  25% HCl i 500  $\mu\text{l}$  1% tiobarbiturne kiseline u 50 mM NaOH. Smeša se zagreva 10 minuta na ključalom vodenom kupatilu, a zatim ohladi do sobne temperature. Dodaje se 3 ml 1-butanola za ekstrakciju i promućka na vorteksu 30 sekundi. Za uspešno odvajanje faza potrebno je centrifugiranje 10 minuta na  $2000\times g$  u centrifugi Sorvall. Sadržaj MDA se određuje spektrofotometrijskim merenjem apsorbancije organske faze (gornji sloj) na 532 nm. Slepe probe sadrže 50 mM NaOH umesto tiobarbiturne kiseline, i pripremaju se za svaki uzorak posebno. Vrednosti sadržaja MDA se izražavaju kao nmol MDA/mg protein, a određuju se na osnovu izmerene vrednosti apsorbancije i molarnog apsorpcionog koeficijenta formiranog kompleksa MDA-tiobarbiturna kiselina.

### **3.9 Genotoksičnost i citotoksičnost**

#### **3.9.1 Citokinezis-blok mikronukleusni test**

Analiza mikronukleusa je rađena CB MN testom [183]. Kulture limfocita i fibroblasta su gajene 72 sata na  $37^{\circ}\text{C}$ , od čega poslednjih 28 sati u prisustvu citohalazina B finalne koncentracije 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Nakon toga ćelije su isprane blagim hipotoničnim rastvorom (0.56 % KCl : 0.9 % NaCl, 1:1), a zatim fiksirane u McCarnoy fiksativu (metanol: glacijalna sirćetna kiselina, 3:1) 3-4 puta. Između svakog koraka ćelije su centrifugirane 10 min na 1800 rpm, a supernatant aspiriran. Preparati su pravljeni nakapavanjem ćelijske suspenzije na mikroskopska predmetna stakla. Na vazduhu

osušeni preparati su obojeni 2%-tnim rastvorom alkalne Gimze. Analizirano je najmanje 1000 binukleusnih ćelija, tj. ćelija koje su prošle deobu, po uzorku upotrebom AxioImager A1 mikroskopa na uveličanju  $400 \times$  ili  $1000 \times$ , kako bi se procenio procenat ćelija sa mikronukleusima. Učestalost mikronukleusa na 1000 binukleusnih ćelija je izračunata na osnovu određenog broja mikronukleusa u binukleusnim ćelijama.

### 3.9.2 Citokinezis-blok proliferativni indeks

Proliferativni potencijal ćelija *in vitro* procenjen je izračunavanjem citokinezis-blok proliferativnog indeksa (CBPI) [184]. CBPI je izračunat prema sledećoj formuli:

$$\text{CBPI} = \text{MI} + 2\text{MII} + 3[\text{MIII} + \text{MIV}] / \text{N} \quad (3)$$

gde MI – MIV predstavljaju broj ćelija sa jednim, dva, tri, odnosno 4 jedra, a N predstavlja ukupan broj prebrojanih ćelija.

Za određivanje CBPI korišćeni su isti preparati na kojima je izvršena analiza mikronukleusa, upotrebom AxioImager A1 mikroskopa na uveličanju  $400 \times$ .

### 3.10 Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina je određivana po metodi autora Markvela (*Markweel-a*) i saradnika [185], koja predstavlja modifikovanu metodu autora Lorija (*Lowry-a*) i saradnika [186]. Za razliku od originalne Lorijeve metode, po ovoj metodi se dodaje SDS u alkalni reagens, čime se povećava količina bakar-tartaratnog reagensa. Time je ova metoda pogodna za određivanje koncentracije membranskih proteina bez prethodne solubilizacije i ekstrakcije lipida, kao i za uzorke koji sadrže saharozu i EDTA.

Za određivanje koncentracije proteina koristi se 10  $\mu\text{l}$  uzorka, u koji se dodaje 890  $\mu\text{l}$  vode. Slepa proba sadrži vodu umesto uzorka. Zatim se dodaje 0,1 ml 1M NaOH, a nakon 10 min i 2 ml reagensa koji sadrži 4%  $\text{CuSO}_4$  i smešu 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0,16% Na,K-tartarata ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6$ ) i 1% SDS u odnosu 1:100. Posle 15 minuta dodaje se 0,3 ml Folin & Ciochalaten's phenol reagensa, prethodno razblaženog sa vodom u odnosu 1:1. Apsorbancija rastvora tamno zelene boje se meri nakon 30-45 minuta na 750 nm.

Koncentracija proteina se očitava iz standardne prave, na osnovu vrednosti izmerene apsorbancije. Standardna prava predstavlja linearnu zavisnost izmerenih apsorbancija na 750 nm od poznatih koncentracija BSA (Slika P1).

### **3.11 Fotodegradacija rastvora diazinona**

4 mg diazinona se rastvori u 10 ml apsolutnog etanola, a zatim se pripremljeni 10 mM rastvor razblaži 10 puta sa deionizovanom vodom. 10 ml 1 mM rastvora diazinona (u 20 % etanolu) se fotolitički tretira paraboličnom lampom (Cermax Xenon, 125 W) koja emituje svetlost talasnih dužina od 200 do 400 nm, i ozračuje kvarcnu ćeliju (10 × 10 × 40 mm) u koju je smešten uzorak. Ćelija je udaljena 65 cm od izvora svetlosti, a dužina optičkog puta je 1 cm. Rastvor diazinona se izlaže dejstvu svetlosti tokom 0, 5, 15, 30, 60 i 115 minuta. Ozračeni rastvori se čuvaju na –20°C, i dalje se koriste za UPLC analizu i tretman kulture ćelija humane krvi, AChE i Na,K-ATPaze.

#### **3.11.1 Određivanje sastava ozračenih rastvora diazinona UPLC-UV/Vis sistemom**

Za određivanje koncentracije diazinona i proizvoda njegove degradacije u alikvotima ozračenih rastvora diazinona korišćen je UPLC-UV/Vis sistem [187]. Analize su radjene pod izokratskim uslovima sa mobilnom fazom koja sadrži 0,1% mravlju kiselinu (faza A) i acetonitril (faza B) u odnosu 25:75 (za analizu diazinona i diazoksona), dok je za analizu IMP odnos faza 10:90. Brzina protoka mobilne faze je 0,3 ml/min, zapremina uzorka koji se injektira 10 µl, a temperatura kolone 25°C. Diazinon i diazokson su praćeni na 245 nm, dok je za određivanje IMP talasna dužina podešena na 230 nm. Retencionna vremena za diazinon, diazokson i IMP su 1,9, 1,2 i 0,9 minuta (Slika P7).

#### **3.11.2 Određivanje sastava ozračenih rastvora diazinona GC/MS sistemom**

Ozračeni rastvori diazinona su ekstrahovani dihlormetanom (10 ml) dva puta. Odvojene faze dihlormetana su tretirane bezvodnim natrijum sulfatom, uparene do 1 ml na rotacionom vakuum uparivaču i razblažene acetonom do 5 ml. Rastvarač je ponovo

koncentrisan u uparivaču do 1 ml, a zatim uparen do suva u atmosferi azota. Suvi ostatak je ponovo rastvoren u 200  $\mu$ l acetona i koncentrovani ekstrakt je korišćen za GC/MS analizu. Injekciona zapremina je 1  $\mu$ l, a temperatura injektora 250°C. Temperatura kolone je programirana na linearan porast (10 °C/min) u opsegu od 80 °C do 300 °C. Protok nosećeg gasa helijuma je 1,3 ml/min, temperatura 80 °C, a pritisak konstantan. Kolizioni gas je azot sa energijom kolizije od 15 eV. Maseni spektri su dobijeni u MRM (*multiple reaction monitoring*) modu (Slika P8) [147].

### 3.12 Imobilizacija acetilholinesteraze

0,55 mg prečišćene AChE iz goveđih eritrocita, komercijalno dostupne je imobilizovano na 0,15 g aktiviranih staklenih perlica sa kontrolisanom veličinom pora prema metodi iz literature [188]. Staklo je komercijalno dostupno-CPG 24, 80-120 *mesh* (0,177-0,125 mm). Perlice stakla su kuvane u 5% azotnoj kiselini 30 minuta, a zatim isprane dejonizovanom vodom i osušene u sušnici na 95°C tokom 30 minuta. Za aktiviranje površine stakla korišćen je 3-aminopropil-trietoksisilan. Aminoalkilirajući agens je pripremljen rastvaranjem 10 ml 3-aminopropil-trietoksisilana u 90 ml vode, i pH rastvora je podešen na 3,5 koncentrovanom hlorovodoničnom kiselinom. Osušeno staklo je dodato u ovaj rastvor i smeša je inkubirana 150 minuta na 75°C, uz mešanje na svakih 15 minuta. Aktivirano staklo je profiltrirano, isprano dejonizovanom vodom i osušeno. Postupak aktivacije površine za imobilizaciju je ponovljen tri puta. Zatim su alkilamino grupe aktiviranog stakla umrežene pomoću 2,5 % rastvora glutaraldehida. Rastvor umreživača je pripremljen dodavanjem 5 ml 25% glutaraldehida u 45 ml 0,1 M fosfatnog pufera, pH 7. U 2 ml rastvora glutaraldehida je dodato aktivirano staklo i proces umrežavanja je trajao 1 sat uz barbotiranje azota kroz rastvor, nakon čega je staklo isprano dejonizovanom vodom. Enzim je rastvoren u 3 ml hladnog 20 mM fosfatnog pufera, pH 6 i pomešan sa prethodno tretiranim staklom, uz strujanje azota tokom 2,5 sata. Zatim je smeša filtrirana na vakuum filteru, dok je filtrat sakupljan u maloj graduisanoj menzuri da bi se izmerila njegova tačna zapremina. Imobilizovani enzim je ispran fosfatnim puferom i vodom kao bi se uklonili ostaci eventualno nevezanog enzima, a zatim je skladišten u fosfatnom puferu pH 6 na 4°C do upotrebe.



### 3.13 Statistička obrada rezultata

Eksperimenti su radjeni u triplikatu. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost tri merenja, koja predstavlja aritmetičku sredinu vrednosti pojedinačnih merenja. Odstupanja od srednje vrednosti su predstavljena kao standardne devijacije srednje vrednosti ( $\pm$  S.E.M.). Za statističku obradu vrednosti učestalosti mikronukleusa u binukleusnim ćelijama, indeksa ćelijske proliferacije i sadržaja MDA u tretiranim kulturama ćelija korišćeni su Studentov t-test i Produkt-Moment i parcijalne korelacije, softverski paket Statistics, verzija 6 Microsoft Windows. Vrednosti  $P < 0.05$  su smatrane značajnim.

## **4. REZULTATI**

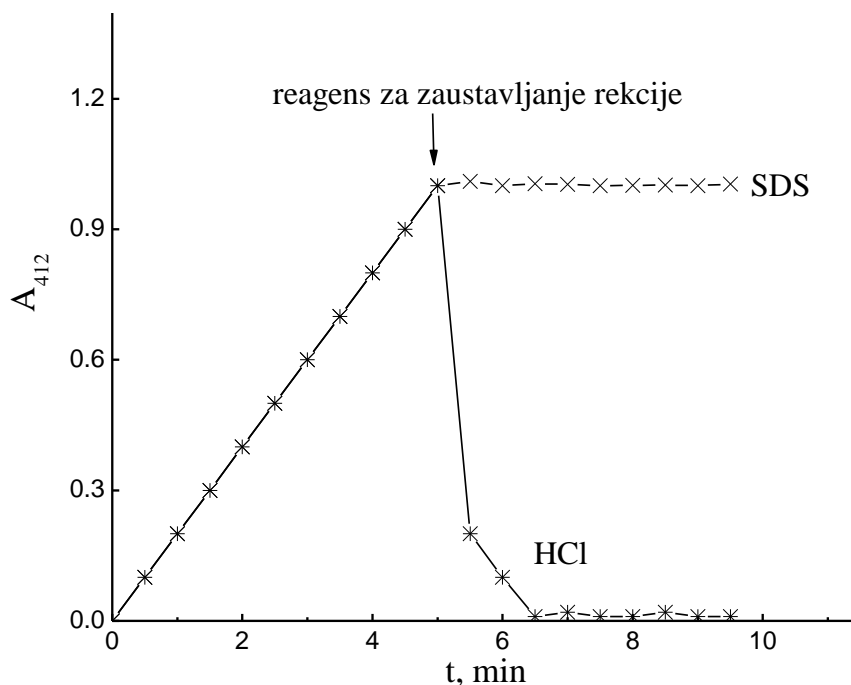
### **4.1 Modifikacije i unapredjenje bioanalitičkih testova na bazi acetilholinesteraze za detekciju organofosfata**

Organofosfatna jedinjenja su specifični inhibitori AChE i njihova primarna toksičnost se zasniva na inhibiciji ovog enzima dovodeći do prekida nervne transmisije [3]. Među najčešće primenjivanim iz ove grupe jedinjenja su malation, diazinon i hlörpirifos, koji se u životnoj sredini mogu transformisati u druge, često toksičnije proizvode (Slike 10a i 10b). Inhibitorno dejstvo ovih jedinjenja je mera njihovog neurotoksičnog potencijala, a na osnovu pada aktivnosti enzima može da se detektuje prisustvo ovih insekticida. Kao model sistemi za procenu neurotoksičnosti i detekciju insekticida i proizvoda njihove hemijske transformacije, primenjuje se najčešće AChE izolovana iz električne jegulje, kao i enzim poreklom iz govedih eritrocita. U cilju poboljšanja osetljivosti ovih bioeseja i mogućnosti da detektuju niže koncentracije organofosfata, ispitan je uticaj vremena njihove preinkubacije sa AChE, uvedena je oksidacija kao korak koji prethodi analizi bioanalitičkom metodom i konstruisan protočni sistem sa imobilizovanim enzimom.

#### **4.1.1 Modifikacija Elmanove metode za praćenje aktivnosti acetilholinesteraze**

Za određivanje aktivnosti AChE u prisustvu i odsustvu organofosfatnih jedinjenja koristi se Elmanova metoda [175] (poglavlje 3.7.1) koja se zasniva na spektrofotometrijskom praćenju nastajanja žuto obojenog jedinjenja na 412 nm tokom nekoliko minuta. Prema originalnoj metodi, reagens za zaustavljenja enzimske reakcije se ne dodaje, već se prati povećanje apsorbancije na 412 nm u termostatiranoj kiveti spektrofotometra. Na taj način, mora se analizirati jedan po jedan uzorak, što nije pogodno za merenje aktivnosti enzima u većem broju uzoraka. Da bi se analiza učinila efikasnijom, neophodno je enzimsku reakciju zaustaviti, a zatim meriti vrednosti apsorbancija bez vremenskog ograničenja. U slučaju većeg broja proba, znatno se skraćuje vreme analize.

Najpre je za zaustavljenje enzimske reakcije dodato 50  $\mu$ l 3 M hlorovodonične kiseline u inkubacionu smešu. Ideja je bila da se nadvlada kapacitet fosfatnog pufera i enzim denaturiše i inaktivira u kiseloj sredini. Međutim, neposredno nakon dodavanja kiseline vrednost apsorbancije se naglo smanjila, što se moglo vizuelno uočiti obezbojavanjem žutog rastvora (Slika 11).



**Slika 11.** Promena apsorbancije na 412 nm u zavisnosti od vremena tokom hidrolize ACh katalizovane sa AChE uz dodavanje reagenasa za inaktivaciju enzima.

Kako je u prethodnim eksperimentima SDS u potpunosti inhibirao aktivnost AChE u koncentracija većim od 0,1 mM, u enzimski esej je dodato 50  $\mu$ l 100 mM SDS. Boja je ostala stabilna, a vrednost apsorbancije se dalje nije menjala (Slika 11), što je ukazivalo da je katalitičko delovanje AChE zaustavljeno. U narednim eksperimentima, aktivnost AChE je merena modifikovanom Elmanovom procedurom koja uključuje i dodavanje reagenasa za zaustavljenje reakcije, što je učinilo izvođenje eksperimenata znatno efikasnijim.

#### 4.1.1.1 Uticaj vremena preinkubacije organofosfata sa enzimom na limit detekcije

Primenom modifikovane Elmanove procedure ispitan je uticaj vremena preinkubacije organofosfata sa enzimom i određena je granica detekcije (*LOD-limit of detection*) malationa, diazinona, hlorthirfosa i ispitivanih proizvoda njihove degradacije (Tabela 4) AChE bioesejom. Kao LOD ispitivanih jedinjenja uzima se koncentracija inhibitora koja smanjuje aktivnost enzima za 10% pod određenim uslovima eksperimenta. 10% inhibicije kontrolne aktivnosti enzima statistički je značajna promena i nesumnjivo ukazuje na prisustvo inhibitora u testiranom uzorku. Razlike u izračunatim granicama detekcije odgovaraju razlikama u inhibitornoj moći testiranih jedinjenja.

Granica detekcije organofosfatnih jedinjenja (koncentracija koja izaziva pad aktivnosti enzima za 10%) je izračunata iz eksperimentalno dobijenih sigmoidnih funkcija inhibicije aktivnosti AChE u prisustvu testiranih insekticida i degradacionih proizvoda. Vrednosti su date u Tabeli 4 za sva ispitivana jedinjenja tokom preinkubacije od  $\approx 0, 5$  i 20 minuta [189].

**Tabela 4.** Granice detekcije diazinona, hlorpirifosa, malationa i proizvoda njihove transformacije dobijene AChE esejom nakon  $\approx 0, 5$  i 20 minuta preinkubacije enzima sa ispitivanim jedinjenjima. Vrednosti LOD su određene kao koncentracija inhibitora koja smanjuje aktivnost enzima za 10%.

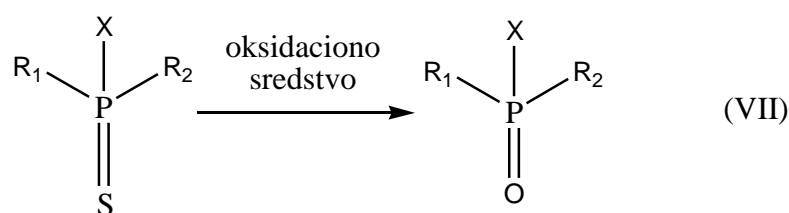
Jedinjenje	LOD (0 min), M	LOD (5 min), M	LOD (20 min), M
Diazinon	$(3,5 \pm 0,2) \times 10^{-5}$	$(1,9 \pm 0,1) \times 10^{-5}$	$(1,5 \pm 0,1) \times 10^{-5}$
Diazokson	$(8,1 \pm 0,4) \times 10^{-7}$	$(1,1 \pm 0,1) \times 10^{-7}$	$(8,1 \pm 0,2) \times 10^{-9}$
IMP*	-	-	-
Hlorpirifos	$(5,7 \pm 0,3) \times 10^{-5}$	$(1,9 \pm 0,2) \times 10^{-5}$	$(5,5 \pm 0,3) \times 10^{-7}$
Hlorpirifos-okson	$(3,5 \pm 0,1) \times 10^{-7}$	$(8,9 \pm 0,4) \times 10^{-8}$	$(3,1 \pm 0,3) \times 10^{-9}$
THP*	-	-	-
Malation	$(1,6 \pm 0,1) \times 10^{-4}$	$(1,5 \pm 0,1) \times 10^{-5}$	$(8,0 \pm 0,4) \times 10^{-6}$
Malokson	$(7,7 \pm 0,3) \times 10^{-7}$	$(1,4 \pm 0,1) \times 10^{-7}$	$(2,8 \pm 0,2) \times 10^{-9}$
Izomalation	$(1,1 \pm 0,1) \times 10^{-6}$	$(2,0 \pm 0,1) \times 10^{-7}$	$(4,1 \pm 0,2) \times 10^{-8}$
Dietil-maleat*	-	-	-
O,O-dimetil-tiofosfat*	-	-	-
O,O,S-trimetil-fosforoditionat*	-	-	-

\*Jedinjenje ne izaziva statistički značajnu inhibiciju AChE od 10%

Na osnovu vrednosti LOD (Tabela 4) može se zaključiti da produžavanje vremena kontakta enzima i inhibitora povećava osetljivost AChE bioeseja i za oko 100 puta. Ukoliko se enzim i inhibitor drže u kontaktu 20 minuta, sistem je osetljiv na prisustvo degradacionih proizvoda insekticida koncentracije 1–10 nM, dok se polazni organo-fosforoditionati mogu detektovati u mikromolarnim koncentracijama (Tabela 4) [189].

#### 4.1.1.2 Snižavanje detekcionog limita bioeseja oksidacijom organo-tiofosfatnih jedinjenja

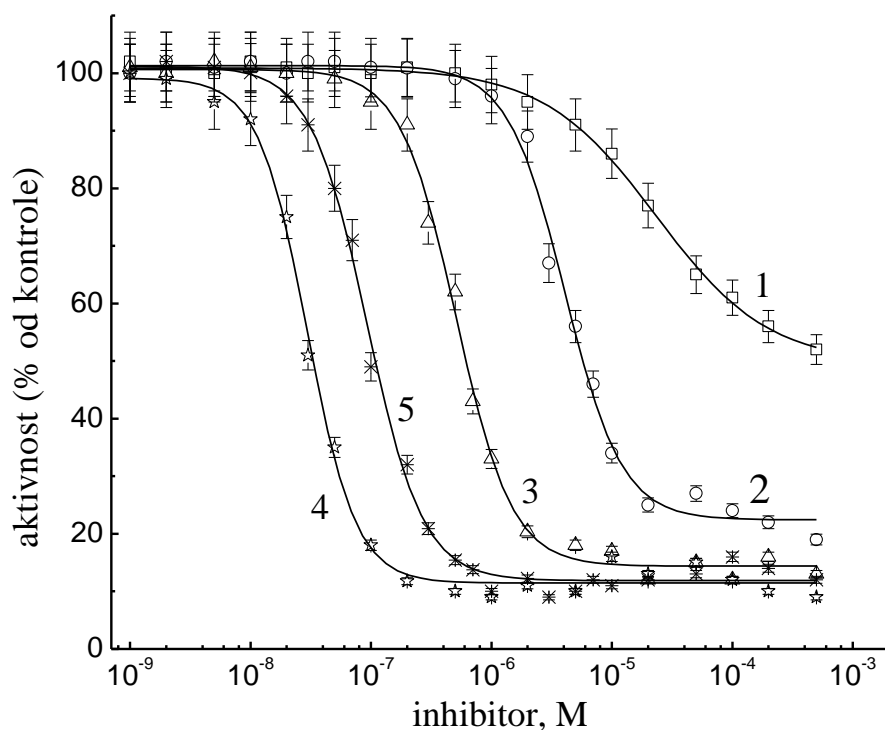
Kao što prethodna istraživanja pokazuju, organo-tiofosfatni insekticidi, koji se koriste kao komercijalni preparati zbog veće bezbednosti po zdravlje ljudi tokom njihove primene u poređenju sa okso oblicima, su oko 100 puta slabiji inhibitori AChE u odnosu na analogne oksone do kojih mogu da se transformišu. Time je i granica detekcije organo-tiofosfata, odnosno najniža koncentracija koja se može detektovati AChE bioesejom znatno viša od granice detekcije odgovarajućih oksona. Jedan od načina da se smanji limit detekcije organo-tiofosfatnih insekticida je njihova konverzija do okso oblika, koji u istim koncentracijama dovode do većeg pada aktivnosti enzima:



U literaturi se navodi više oksidacionih sredstava kojima se tretiraju organo-tiofosfati: vodonik-peroksid, bromna voda, NBS, enzimi (mijeloperoksidaza, citohrom C oksidaze) [190-192], kao i indirektnom elektrohemijском oksidacijom [193]. Kako se NBS pokazao kao efikasno oksidaciono sredstvo [190], malation je tretiran sa njim u odnosima koncentracija 1:1, 1:2, 1:10 i 1:20. Nakon 10 minuta, reakcija oksidacije je zaustavljena dodavanjem 100 puta veće koncentracije askorbinske kiseline u odnosu na koncentraciju NBS. AChE iz električne jegulje je izložena delovanju tretiranog organo-tiofosfata u trajanju od 20 minuta. Nakon zaustavljanja oksidacije i dodavanja oksidovanog organo-tiofosfata u 50 mM fosfatni pufer, pH 8,0 AChE eseja (poglavlje 3.7.1), pH vrednost je proveravana lakmus hartijom. U slučaju snižene pH vrednosti (< 8,0) dodavano je nekoliko kapi 1 M natrijum-hidroksida do postizanja pH optimalnog za katalitičku aktivnost AChE. Malation je tretiran u opsegu koncentracija  $1 \times 10^{-9}$  -  $5 \times 10^{-4}$  M.

Dobijene inhibicione krive (Slika 12), odnosno zavisnosti preostale aktivnosti AChE od koncentracije malationa pre i posle oksidacije sa odgovarajućom koncentracijom NBS, pokazuju da je oksidacija organo-tiofosfata najefikasnija u slučaju kada je koncentracija NBS 10 puta veća. Zapravo, tada se inhibiciona kriva u najvećoj

meri pomera prema nižim koncentracijama, što ukazuje na smanjenje granice detekcije malationa, odnosno povećanje osetljivosti AChE na njegovo prisustvo. Ukoliko se poveća koncentracija NBS u odnosu na koncentraciju malationa (odnos 1:20) (Slika 12), dolazi do pomeranja sigmoidne inhibicione krive u desno ka višim koncentracijama, što ukazuje na smanjenje osetljivosti AChE i povećanje LOD (koncentracija koja izaziva 10% inhibicije enzima) za malation. Prema podacima iz literature, razlog je dalja konverzija formiranog malaoksona usled delovanja povišene koncentracije NBS. Ova pretpostavka je i eksperimentalno dokazana HPLC metodom koja daje umanjene pik malaoksona sa povećavanjem odnosa malation:NBS [190]. Ukoliko se uporede inhibicione krive za malaokson (Slika 21) i oksidovani malation (1:10) (Slika 12), može se uočiti sličnost ( $IC_{50} \approx 10^{-8}$ ), što ukazuje na konverziju oksidovanog malationa u malaokson.



**Slika 12.** Koncentraciono zavisna inhibicija AChE iz električne jegulje dobijena tokom 20-minutnog izlaganja enzima malationu (1), kao i malationu prethodno tretiranom sa NBS tokom 10 minuta u odnosima: 1:1 (2), 1:2 (3), 1:10 (4) i 1:20 (5).

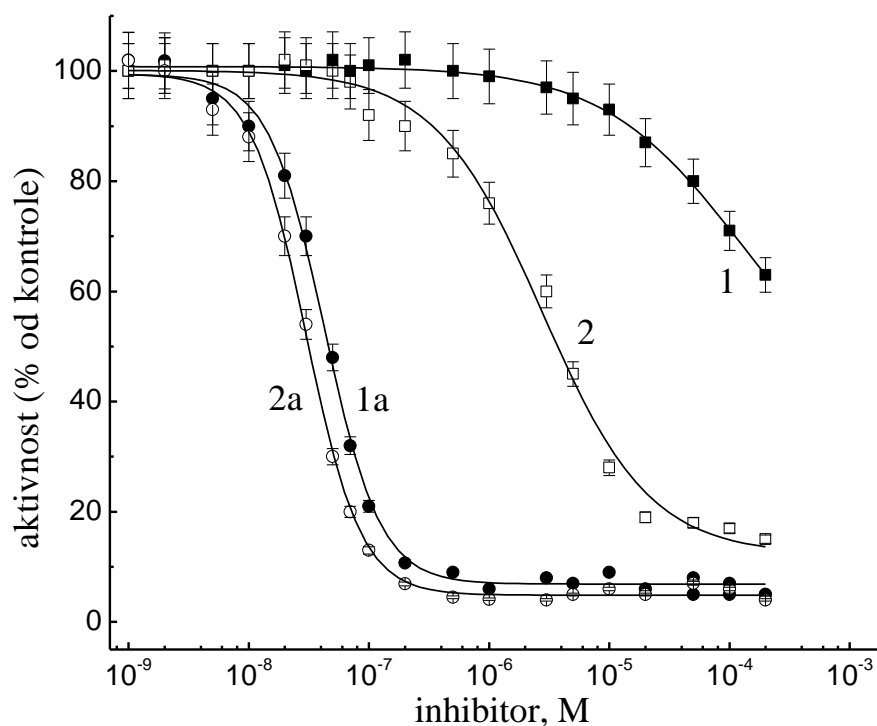
U Tabeli 5 su date vrednosti  $IC_{50}$  i LOD malationa pre i nakon oksidacije sa NBS u različitim odnosima. Vrednosti su očitane iz odgovarajućih inhibicionih krivih (Slika 12). U optimalnom odnosu malation:NBS, 1:10  $IC_{50}$  vrednost se smanjila za nekoliko hiljada puta ( $3,2 \times 10^{-8}$  M) u odnosu na  $IC_{50}$  neoksidovanog malationa ( $5,0 \times 10^{-4}$  M). Nakon oksidacije moguće je detektovati AChE bioesejom malation prisutan u koncentraciji  $1,0 \times 10^{-8}$  M, što je više od 100 puta niža koncentracija u poređenju sa AChE bioesejom kome ne prethodi tretman oksidacije organo-tiofosfata (LOD =  $5,1 \times 10^{-6}$  M).

**Tabela 5.**  $IC_{50}$  i LOD vrednosti dobijene iz sigmodnih inhibicionih krivih za malation i oksidovani malation sa NBS u odnosima 1:1, 1:2, 1:10 i 1:20. Malation i oksidovani malation su izlagani AChE iz električne jegulje tokom 20 minuta, a reakcija oksidacije sa NBS je trajala 10 minuta.

	Malation	Malation : NBS			
		1:1	1:2	1:10	1:20
$IC_{50}$ , M	$5,0 \times 10^{-4}$	$5,6 \times 10^{-6}$	$6,1 \times 10^{-7}$	$3,2 \times 10^{-8}$	$1,1 \times 10^{-7}$
LOD, M	$5,1 \times 10^{-6}$	$1,5 \times 10^{-6}$	$1,8 \times 10^{-7}$	$1,0 \times 10^{-8}$	$3,3 \times 10^{-8}$

Kako se odnos 1:10 organo-tiofosfata, malationa i NBS pokazao kao najpovoljniji za detekciju AChE bioesejom, ispitan je i uticaj oksidacije na diazinon i hlörpirifos. Diazinon i hlörpirifos su tretirani na isti način kao i malation (10 puta većom koncentracijom NBS) i testirani AChE (električna jegulja) bioesejom (20 minuta preinkubacije). Dobijeni su inhibicioni dijagrami sigmoidnog oblika za netretirane organo-tiofosfate i nakon njihove oksidacije (Slika 13), koji su međusobno udaljeni za 2-3 reda veličine koncentracija. U Tabeli 6 su date vrednosti  $IC_{50}$  i LOD dobijene iz inhibicionih krivih za neoksidovani i oksidovani diazinon i hlörpirifos (Slika 13).





**Slika 13.** Koncentraciono zavisna inhibicija AChE iz električne jegulje dobijena tokom 20-minutnog izlaganja enzima diazinonu (1), hlorpirifosu (2) i prethodno oksidovanim organo-tiofosfatima, diazinonu (1a) i hlorpirifosu (2a), sa NBS tokom 10 minuta u odnosu 1:10.

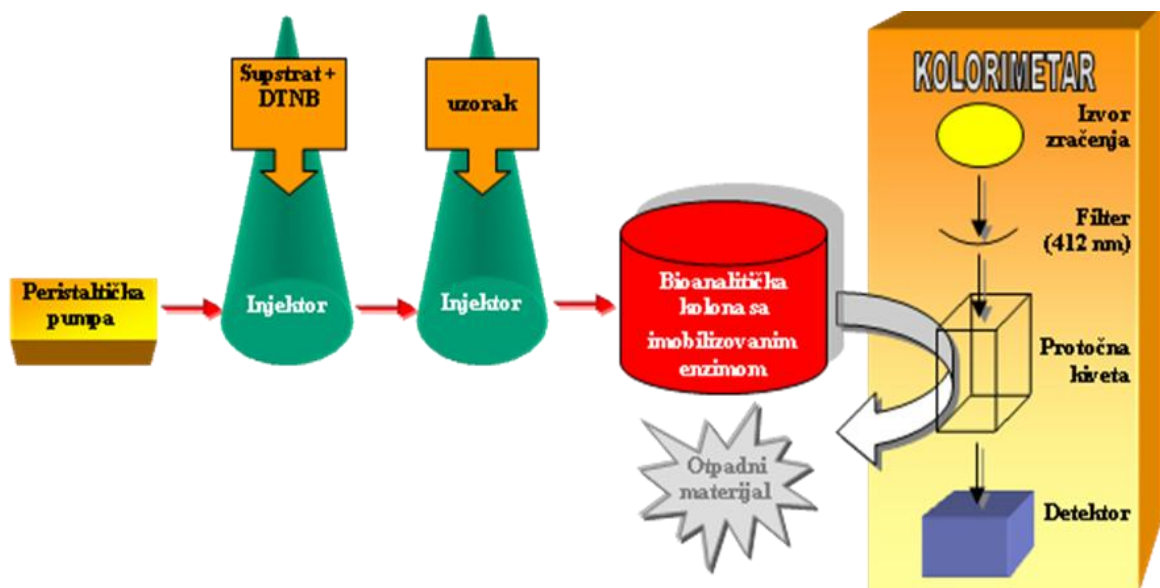
**Tabela 6.** IC<sub>50</sub> i LOD vrednosti dobijene iz sigmodnih inhibicionih krivih za diazinon, hlorpirifos, malation i nakon oksidacije sa NBS u odnosu 1:10. Organo-tiofosfati i njihovi oksidovani oblici su izlagani AChE iz električne jegulje tokom 20 minuta, a reakcija oksidacije sa NBS je trajala 10 minuta.

Organo-tiofosfat	IC <sub>50</sub> , M	LOD, M	Oksidovani organo-tiofosfat	IC <sub>50</sub> , M	LOD, M
Diazinon	$> 2 \times 10^{-4}$	$1,3 \times 10^{-5}$	Diazinon + NBS	$4,6 \times 10^{-8}$	$1,3 \times 10^{-8}$
Hlorpirifos	$3,5 \times 10^{-6}$	$3,1 \times 10^{-7}$	Hlorpirifos + NBS	$3,2 \times 10^{-8}$	$1,3 \times 10^{-8}$
Malation	$5,0 \times 10^{-4}$	$5,1 \times 10^{-6}$	Malation + NBS	$3,2 \times 10^{-8}$	$1,0 \times 10^{-8}$

Vrednosti u Tabeli 6 pokazuju da je tretman oksidacije nejefektniji u slučaju diazinona, jer se LOD smanjio za 1000 puta. Stoga, oksidacija sa NBS, koja prethodi AChE testu, omogućava detekciju 10 nM koncentracija diazinona. Efekat oksidacije se pokazao znatno manje efikasan za malation i hlörpirifos-vrednosti LOD su se smanjile za oko 20, odnosno 3 puta u poređenju sa netretiranim organo-tiofosfatom.

#### **4.1.2 Detekcija organofosfata u protočnom sistemu sa imobilizovanom acetilholinesterazom**

Da bi se smanjio utrošak enzima i bioesej učinio ekonomski isplativijim, konstruisan je protočni injekcioni (*FIA-flow injection analysis*) sistem sa imobilizovanom AChE. Prototip biosenzora (Slike 14 i 15) se sastoji od HPLC pumpe (Dionex AMP-1), injektora (Waters U6K) u koji se unosi uzorak sa ispitivanim insekticidom, supstrat i DTNB, bionalitičke kolone (40 × 4 mm) povezane sa protočnim sistemom u koju se pakuje imobilizovana AChE i spektrofotometra sa protočnom kivetom zapremine 250 µl i dužine svetlosnog puta 10 mm. Uzorak koji sadrži pesticide prolazi kroz bioanalitičku kolonu kontrolisanom brzinom protoka i inhibira aktivnost enzima. Zatim se u protočni sistem uvode reagensi za merenje aktivnosti enzima. Određivanje aktivnosti enzima se zasniva na Elmanovoj reakciji (poglavlje 3.7.1). Krajnji proizvod reakcije (5-tio-2-nitrobenzoeva kiselina) je žuto obojen i lako se detektuje spektrofotometrijski na 412 nm. Intenzitet žutog obojenja je mera aktivnosti enzima i proporcionalan je stepenu inhibicije enzima, odnosno koncentraciji ciljanog analita.



**Slika 14.** Shematski prikaz FIA sistema na bazi imobilizovane AChE za detekciju i evaluaciju toksičnosti organofosfata.



**Slika 15.** Prototip biosenzora razvijen u Institutu „Vinča“.

#### 4.1.2.1 Imobilizacija acetilholinesteraze

0,55 mg AChE iz goveđih eritrocita je imobilizovano na 0,15 g aktiviranih perlica stakla kontrolisane veličine pora prema proceduri [188] opisanoj u poglavlju 3.12. Koncentracija proteina pre i posle imobilizacije enzima je merena Lowry metodom [186], opisanoj u poglavlju 3.10. Standardna prava za BSA je data u prilogu (Slika P1). Aktivnost neimobilizovane AChE u početnom rastvoru i u filtratu sakupljenom nakon vezivanja enzima za staklenu površinu je merena Elmanovom metodom [175] (poglavlje 3.7.1). Količina proteina vezana za staklo ( $P_g$ ,  $\text{mg g}^{-1}$ ) i efikasnost imobilizacije (%) su određeni na osnovu jednačina:

$$P_g = (c_o V_o - c_f V_f) / w = 1,9 \text{ mg g}^{-1} \quad (4)$$

$$\text{Efikasnost imobilizacije} = [(E_o V_o - E_f V_f) / E_o V_o] \times 100 = 95\% \quad (5)$$

gde je  $c_o$  koncentracija proteina u početnom rastvoru AChE ( $\text{mg ml}^{-1}$ ),  $E_o$  aktivnost AChE u početnom rastvoru ( $\text{IU ml}^{-1}$ ),  $V_o$  zapremina početnog rastvora AChE (ml);  $c_f$  je koncentracija proteina u filtratu ( $\text{mg ml}^{-1}$ );  $E_f$  aktivnost AChE u filtratu ( $\text{IU ml}^{-1}$ );  $V_f$  zapremina filtrata (ml) i  $w$  masa perlica stakla (g). Step en adsorpcije je izračunat kao:

$$\alpha = P_g / P_{g,m} = 0,9 \quad (6)$$

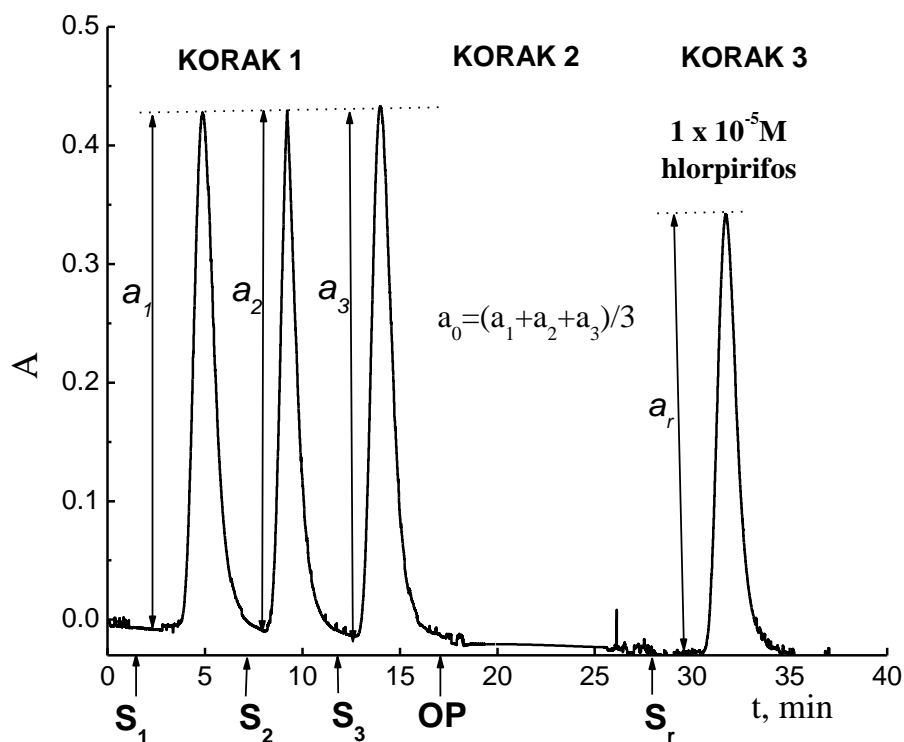
gde je  $P_{g,m}$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ) najveća količina proteina koja se može adsorbovati na staklo sa kontrolisanom veličinom pora [194].

Imobilizovana AChE iz goveđih eritrocita je spakovana u bioanalitičku kolonu i čuvana u frižideru na  $+4^\circ\text{C}$ . Enzim je zadržao početnu aktivnost tokom 1 meseca kada je aktivnost pala na oko 60% početne vrednosti. Enzim je izgubio aktivnost posle 3 meseca upotrebe. Imobilizovana je i AChE iz električne jegulje koja ima znatno veću specifičnu aktivnost i nižu cenu, ali je enzim izgubio aktivnost posle 20 dana pod istim uslovima čuvanja [189].

#### 4.1.2.2 Princip rada protocnog sistema sa imobilizovanim enzimom

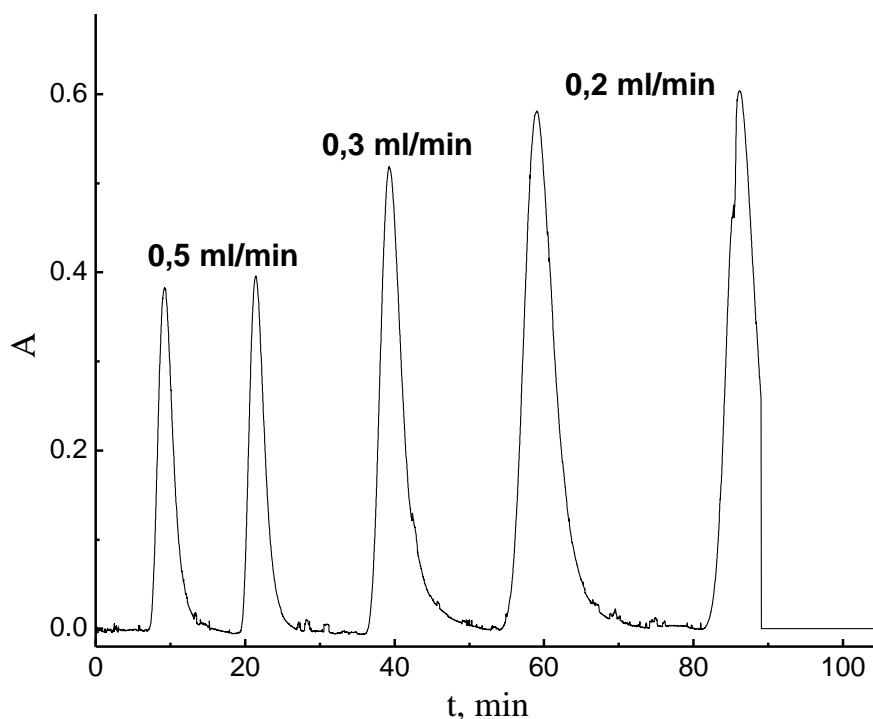
Najpre se optimizuju parametri rada biosenzora kako bi se postigla najbolja osetljivost i najkraće vreme analize. ASChI je izabran kao optimalan supstrat zbog brze reakcije sa AChE i slabe apsorpcije na 412 nm. Uzorak koji sadrži organofosfate inhibira aktivnost imobilizovanog enzima tokom prolaska kroz bioanalitičku kolonu. Posledica je smanjenje enzimske aktivnosti, koje se ispoljava kao smanjenje intenziteta žutog obojenja (optički signal), koje se meri spektrofotometrijski. Spektrofotometrijski signal zavisi od koncentracije insekticida. 10% inhibicije početne aktivnosti enzima se uzima kao statistički značajna vrednost koja ukazuje na prisustvo organofosfata u ispitivanom uzorku. Za reaktivaciju inhibiranog enzima koristi se oksimski reaktivator, pralidoksim (2-PAM) (poglavlje 2.2.2, Slika 5).

Postupak za određivanje koncentracije organofosfata sastoji se od tri koraka (Slika 16): 1) određivanje polazne aktivnosti imobilizovanog enzima (kontrola) u bioanalitičkoj koloni ( $a_0$ ) sa tri uzastopna injektiranjem supstrata ( $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$ ); 2) injektiranje uzorka koji sadrži organofosfat(e) (OP); 3) određivanje preostale aktivnosti enzima ( $a_r$ ) injektiranjem supstrata ( $S_r$ ). Početna aktivnost (kontrola) imobilizovanog enzima se izračunava kao aritmetička sredina aktivnosti dobijenih tokom 3 injektiranja supstrata ( $a_1$ ,  $a_2$ , i  $a_3$ ), pre injektiranja inhibitora.



**Slika 16.** Spektrofotometrijski signal dobijen tokom analize  $1,25 \times 10^{-5}$  M hlorpirifosa.  $a_1$ ,  $a_2$ , i  $a_3$  predstavljaju polazne aktivnosti enzima,  $a_r$  odgovara preostaloj aktivnosti inhibiranog enzima.

Da bi se optimizovala brzina proticanja nosećeg fosfatnog pufera kroz sistem, merena je aktivnost imobilizovanog enzima pri protocima 0,5 ml/min, 0,3 ml/min i 0,2 ml/min. Dobijeni signali su prikazani na Slici 17. Sa smanjenjem protoka dobija se veći signal, pa je moguće dobiti merljiv signal i pri nižim aktivnostima inhibiranog enzima koje karakteriše slab intenzitet žute boje. Manjom brzinom proticanja inhibitora kroz bioanlitičku kolonu povećava se njegovo vreme kontakta sa enzimom, a time i stepen vremenski zavisne inaktivacije enzima. Na taj način, niže koncentracije ispitivanih organofosfata dovode do 10% inhibicije, odnosno snižava se njihova granica detekcija. S druge strane, sporo proticanje nosećeg pufera kroz sistem produžava vreme analize pa se mora napraviti kompromis između trajanja analize i osetljivosti FIA-AChE sistema.

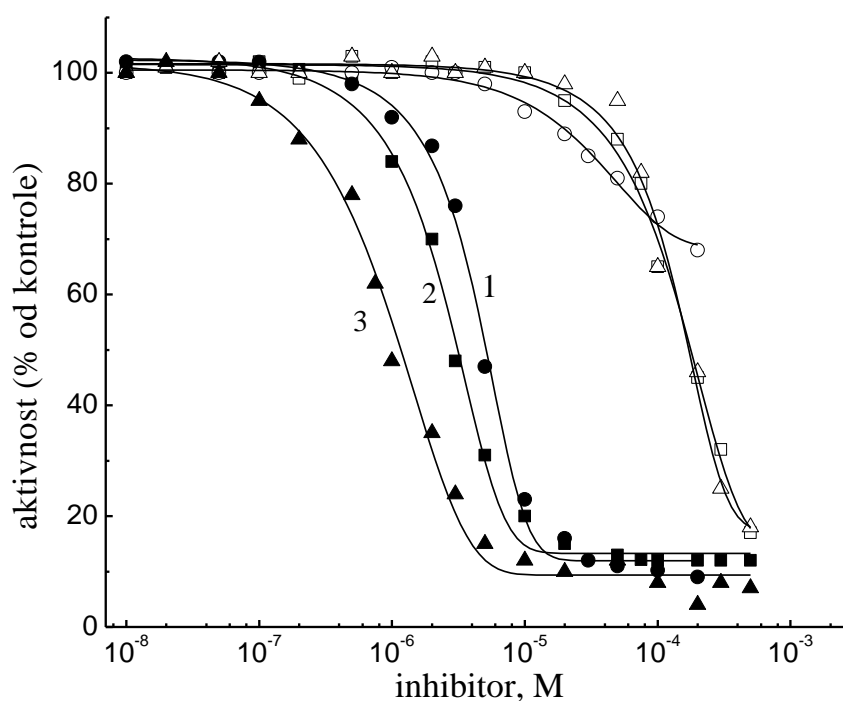


**Slika 17.** Visina signala dobijenih FIA-AChE biosenzorom u zavisnosti od protoka nosećeg fosfatnog pufera.

HPLC pumpa obezbeđuje konstantan protok (0,2 ml/min) fosfatnog pufera, pH 8 kroz sistem do protočne ćelije u kojoj se meri intenzitet žutog obojenja nastalog usled enzimske hidrolize supstrata, ASChI. Kontrolna aktivnost imobilizovane AChE se određuje injektiranjem 25  $\mu$ l smeše  $4,3 \times 10^{-3}$  M ASChI i  $2,52 \times 10^{-4}$  M reagensa za bojenje, DTNB. Apsorbancija se meri spektrofotometrijski na 412 nm. Nakon merenja početne aktivnosti imobilizovane AChE ( $a_0$ ), injektira se uzorak koji sadrži organofosfat. Preostala aktivnost inhibiranog enzima ( $a_r$ ) se određuje sledećim injektiranjem smeše supstrata i reagensa za bojenje (Slika 16). Posle svakog injektiranja rastvora organofosfata, aktivnost enzima se reaktivira do početne vrednosti injektiranjem 125  $\mu$ l reaktivatora, 4 mM 2-PAM.

#### 4.1.2.3 Snižavanje detekcionog limita FIA sistema oksidacijom organo-tiofosfatnih jedinjenja

U cilju poboljšanja osetljivosti FIA-AChE sistema, analizi je prethodio tretman organo-tiofosfatnih insekticida-malationa, diazinona i hlorthirifosa sa NBS (odnos 1:10). Reakcija oksidacije je trajala 10 minuta nakon čega je zaustavljena sa 100 puta većom koncentracijom redukcionog sredstva (u odnosu na NBS), askorbinskom kiselinom. Dobljene inhibicione krive su pomerene ka nižim koncentracijama u slučaju oksidovanih polaznih jedinjenja (Slika 18).



**Slika 18.** Koncentraciono zavisna inhibicija imobilizovane AChE iz goveđih eritrocita u FIA sistemu dobijena za diazinon (prazni krugovi), malation (prazni kvadrati), hlorthirifos (prazni trouglovi), oksidovani diazinon (1), malation (2) i hlorthirifos (3). Oksidacija ispitivanih organo-tiofosfata je izvedena sa 10 puta većom koncentracijom NBS u trajanju 10 minuta.

U Tabeli 7 su prikazani parametri osetljivosti FIA-AChE biosenzora,  $IC_{50}$  i LOD dobijeni iz inhibicionih krivih za ispitivane organo-tiofosfate pre i posle oksidacije



(Slika 18). Vrednosti pokazuju da je oksidacija najviše uticala na snižavanje granice detekcije hlörpirifosa (oko 200 puta), dok je u slučaju diazinona i malationa osetljivost FIA-AChE sistema smanjena za jedan red veličine. Stoga, kada se tio oblici organofosfata oksiduju na odgovarajući način, pre injektiranja u protočni AChE biosensor, moguće je detektovati prisustvo *parent* insekticida u koncentracijama nižim od mikromolarnih (Tabela 7).

**Tabela 7.** IC<sub>50</sub> i LOD vrednosti dobijene iz sigmodnih inhibicionih krivih za diazinon, hlörpirifos, malation i nakon 10-minutne oksidacije organo-tiofosfata sa NBS u odnosu 1:10. Organo-tiofosfati i njihovi oksidovani oblici su testirani u FIA-AChE sistemu.

Organo-tiofosfat	IC <sub>50</sub> , M	LOD, M	Oksidovani organo-tiofosfat	IC <sub>50</sub> , M	LOD, M
Diazinon	$> 2 \times 10^{-4}$	$1,8 \times 10^{-5}$	Diazinon + NBS	$5,1 \times 10^{-6}$	$1,3 \times 10^{-6}$
Hlörpirifos	$1,7 \times 10^{-4}$	$4,1 \times 10^{-5}$	Hlörpirifos + NBS	$1,2 \times 10^{-6}$	$1,8 \times 10^{-7}$
Malation	$1,8 \times 10^{-4}$	$3,4 \times 10^{-5}$	Malation + NBS	$3,1 \times 10^{-6}$	$7,2 \times 10^{-7}$

## 4.2 Uticaj diazinona, hlörpirifosa, malationa i proizvoda njihove degradacije na aktivnost acetilholinesteraze

### 4.2.1 Acetilholinesteraza izolovana iz električne jegulje

Ispitan je *in vitro* uticaj organo-tiofosfata, diazinona, hlörpirifosa, malationa i proizvoda njihove degradacije, koji mogu nastati tokom transformacije u životnoj sredini, AOP i skladištenja preparata insekticida, na aktivnost AChE. Eksperimenti su izvođeni izlaganjem 0,03 IU komercijalno dostupnog enzimskog preparata (288 IU/mg čvrste supstance, 408 IU/mg proteina) izolovanog iz električne jegulje različitim koncentracijama ispitivanih jedinjenja. Vreme preinkubacije inhibitora i enzima je 20 minuta. Testirani su hlörpirifos-okson i THP - proizvod oksidacije odnosno hidrolize hlörpirifosa, diazokson i IMP – proizvodi oksidacije i hidrolize diazinona. Od derivata

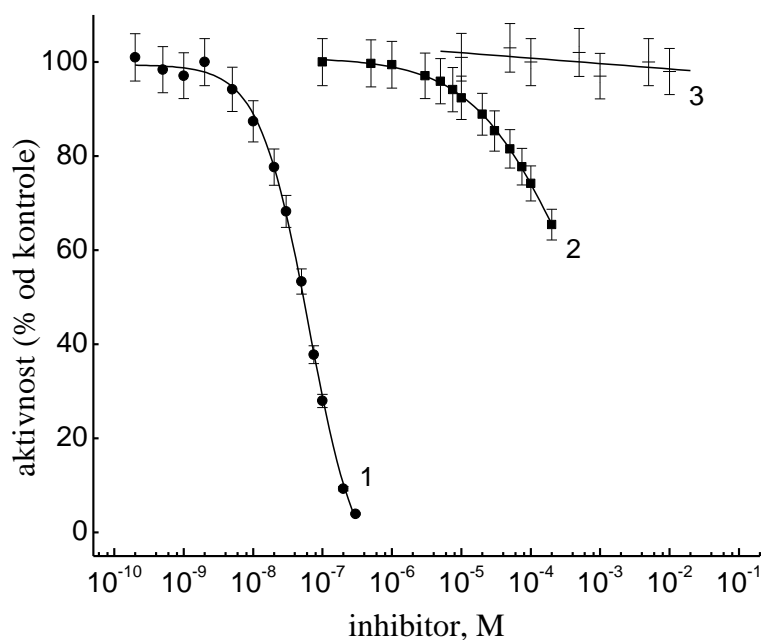
malationa testirani su: dietil-maleat, O,O-dimetil-tiofosfat, O,O,S-trimetil-fosforoditionat–prozvodi hidrolize, malaokson-oksidacioni proizvod i izomalation-strukturni izomer malationa. Opseg koncentracija ispitivanih jedinjenja je  $1 \times 10^{-10}$  -  $1 \times 10^{-2}$  M u zavisnosti od rastvorljivosti insekticida. Naime, maksimalna dozvoljena koncentracija rastvarača u inkubacionoj smeši je 10%, koja inhibira aktivnost AChE. U tom slučaju, kao kontrola u odnosu na koju se izražava preostala aktivnost enzima uzima se aktivnost AChE u prisustvu 10% rastvarača.

#### 4.2.1.1 Inhibicija aktivnosti acetilholinesteraze iz električne jegulje

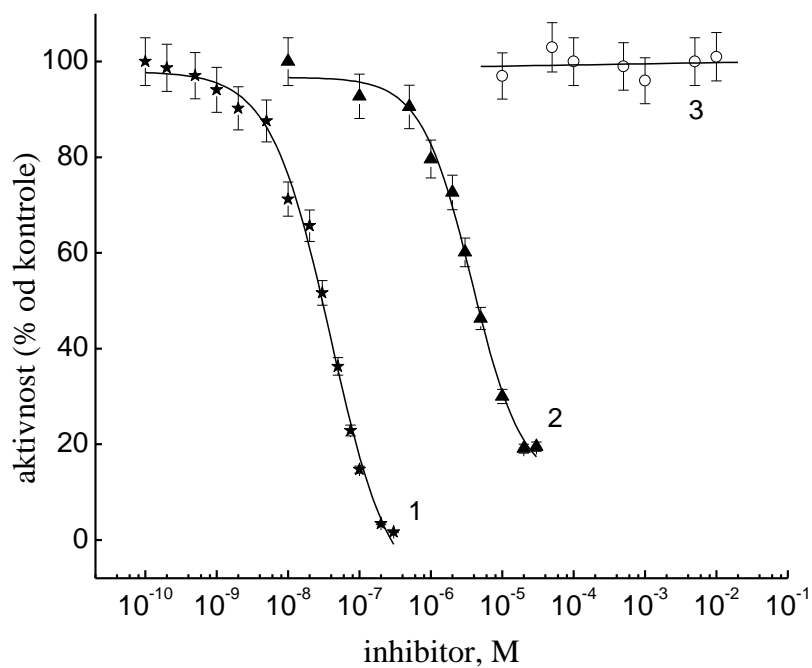
Dobijeni rezultati pokazuju da tio jedinjenja-diazinon, hlorpirifos, malation, njihovi okso derivati-diazokson, hlorpirifos-okson i malaokson, kao i izomer malationa-izomalation inhibiraju aktivnost AChE na koncentraciono zavisani način, ali sa različitim inhibitornim potencijalima. Zavisnost aktivnosti AChE, izražene kao procenat od kontrolne vrednosti (dobijene bez prisustva inhibitora, odnosno u prisustvu odgovarajuće koncentracije etanola), od koncentracije inhibitora prati sigmoidnu funkciju (Slike 19, 20 i 21):

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + (x/x_0)^n} + A_2 \quad (7)$$

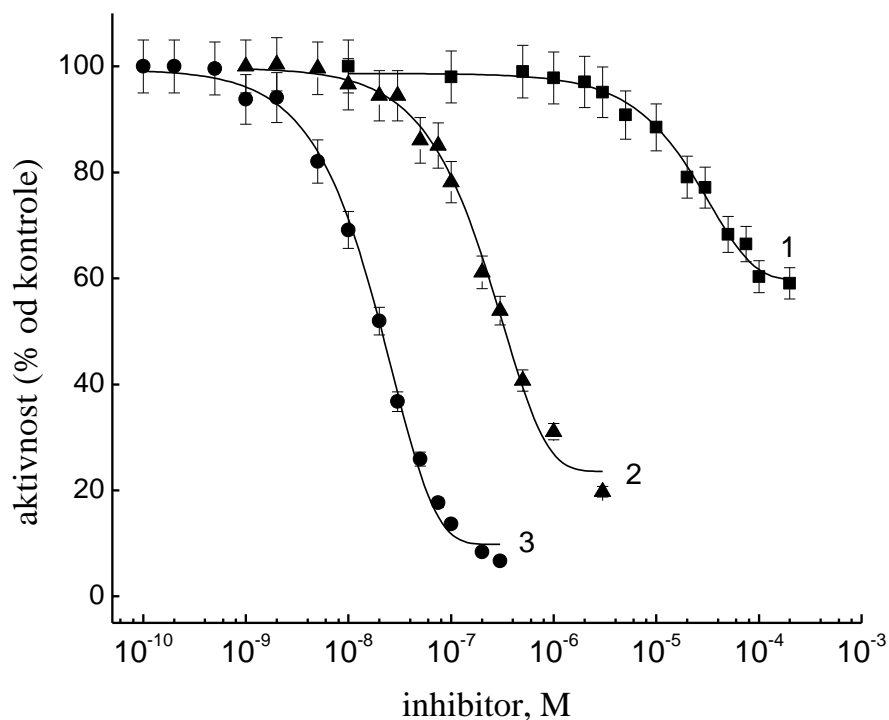
gde je y aktivnost enzima, x koncentracija inhibitora,  $x_0$  odgovara  $IC_{50}$  vrednosti,  $A_1 \approx 100$ ,  $A_2 \approx 0$ , dok je n vrednost Hilovog (*Hill*-ovog) koeficijenta.



**Slika 19.** Koncentraciono zavisna inhibicija AChE iz električne jegulje diazoksonom (1), diazinonom (2) i IMP (3).



**Slika 20.** Koncentraciono zavisna inhibicija AChE iz električne jegulje hlörpirifosoksonom (1), hlörpirifosom (2) i THP (3).

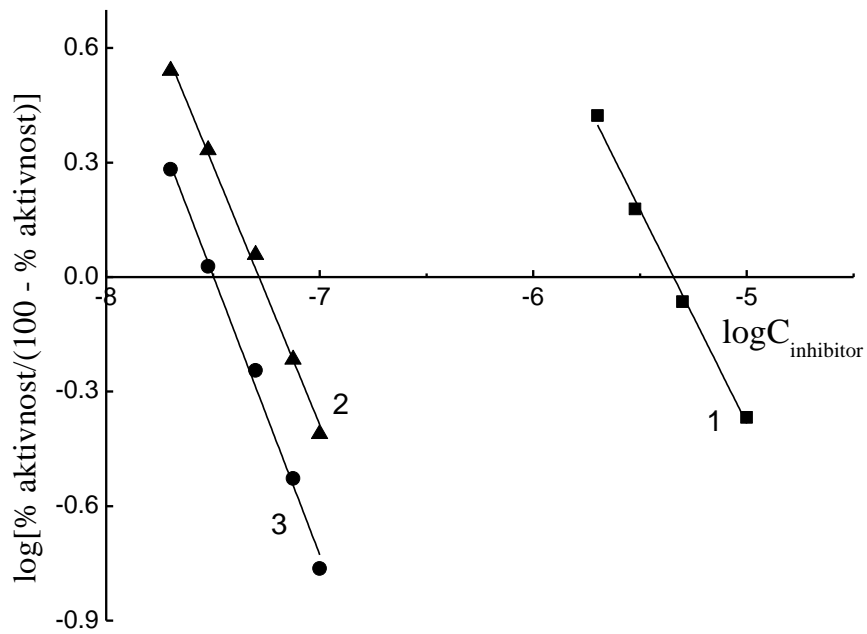


**Slika 21.** Koncentraciono zavisna inhibicija AChE iz električne jegulje malationom (1), izomalationom (2) i malaoksonom (3).

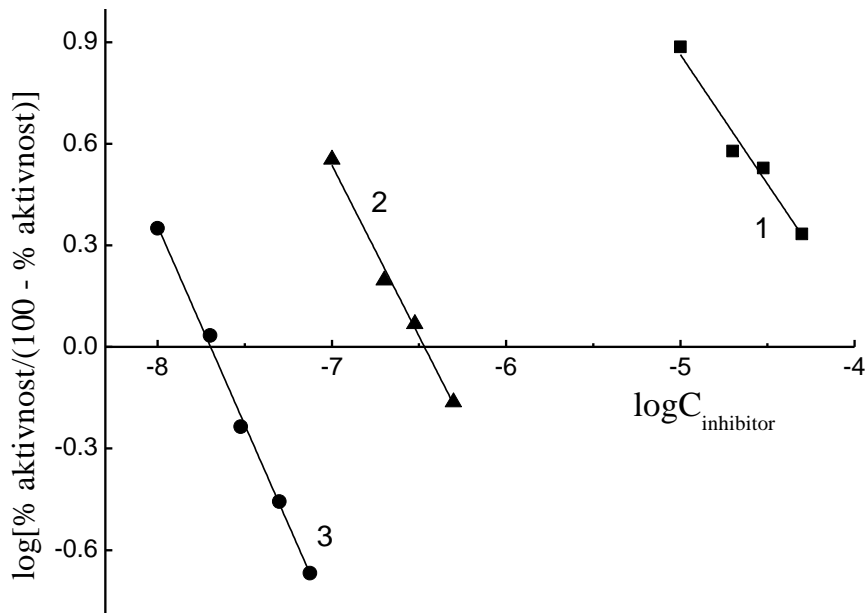
Matematičkom transformacijom sigmoidne funkcije dobija se Hilova zavisnost:

$$\log\left(\frac{\% \text{ aktivnost}}{100 - \% \text{ aktivnost}}\right) = -n \log [I] + n \log IC_{50} \quad (8)$$

gde je % aktivnost preostala aktivnost enzima nakon inhibicije odnosno % od kontrolne vrednosti, n je Hilov koeficijent, [I] koncentracija inhibitora, dok je  $IC_{50}$  koncentracija inhibitora koja dovodi do smanjenja aktivnosti enzima za 50% nakon određenog vremena izlaganja. Vrednost inhibicionih parametara,  $IC_{50}$  i n, se određuju Hilovom metodom iz vrednosti nagiba i odsečka linearne zavisnosti  $\log [\% \text{ aktivnost}/(100 - \% \text{ aktivnost})]$  od  $\log [I]$ . Na Slici 22 su prikazane Hilove zavisnosti za diazokson, hlorpirifos i hlorpirifos-okson, a na Slici 23 za malation i njegove derivate, malaokson i izomalation.



**Slika 22.** Hilova analiza inhibicije AChE iz električne jegulje hlorpirifosom (1), diazoksonom (2) i hlorpirifos-oksonom (3).



**Slika 23.** Hilova analiza inhibicije AChE iz električne jegulje malationom (1), izomalationom (2) i malaoksonom (3).

**Tabela 8.** Inhibicioni parametri ( $IC_{50}$  (20 min) i Hilov koeficijent, n) diazinona, hlorspirifosa, malationa i proizvoda njihove degradacije za AChE iz električne jegulje, dobijeni Hilovom analizom i fitovanjem eksperimentalnih podataka sigmoidnom funkcijom.

Jedinjenje	sigmoidna funkcija		Hilova analiza
	$IC_{50}$ (20 min), M	$IC_{50}$ (20 min), M	n
Diazinon	$> 2 \times 10^{-4}$	-	-
Diazokson	$(5,1 \pm 0,3) \times 10^{-8}$	$5,2 \times 10^{-8}$	$1,4 \pm 0,1$
IMP*	-	-	-
Hlorpirifos	$(4,3 \pm 0,2) \times 10^{-6}$	$4,5 \times 10^{-6}$	$1,2 \pm 0,1$
Hlorpirifos-okson	$(3,0 \pm 0,1) \times 10^{-8}$	$3,2 \times 10^{-8}$	$1,5 \pm 0,1$
THP*	-	-	-
Malation	$> 2 \times 10^{-4}$	-	$0,9 \pm 0,1$
Malokson	$(2,1 \pm 0,1) \times 10^{-8}$	$2,0 \times 10^{-8}$	$1,2 \pm 0,1$
Izomalation	$(3,3 \pm 0,2) \times 10^{-7}$	$3,4 \times 10^{-7}$	$1,1 \pm 0,1$
Dietil-maleat*	-	-	-
O,O-dimetil-tiofosfat*	-	-	-
O,O,S-trimetil-fosforoditionat*	-	-	-

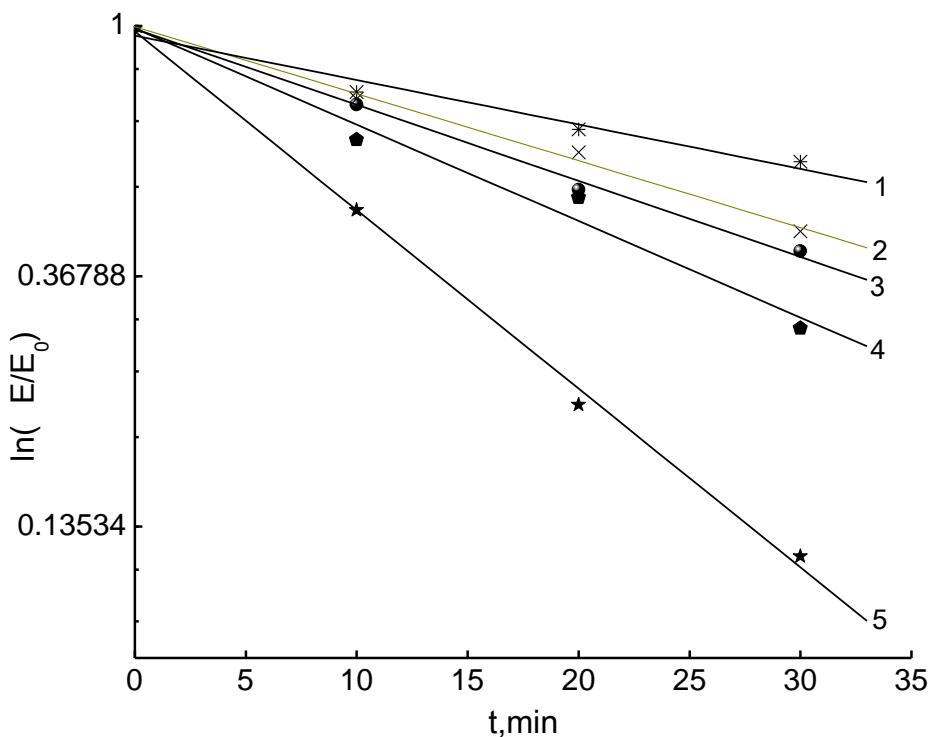
\* Inhibicija AChE manja od 10%

U Tabeli 8 su date  $IC_{50}$  vrednosti za diazinon, hlörpirifos, malation i proizvode njihove degradacije dobijene iz sigmoidnih krivih i Hilovom analizom, kao i vrednosti  $n$ . Vrednosti  $IC_{50}$  ukazuju na inhibitorni potencijal ispitivanih jedinjenja, odnosno njihov neurotoksični efekat koji izazivaju inhibicijom AChE.  $IC_{50}$  vrednosti zavise, pored strukture jedinjenja koje se ispituje, i od vremena preinkubacije tj. kontakta enzima i inhibitora, izvora i količine enzima. Zato, neophodno je ove parametre držati konstantnim tokom ispitivanja i poređenja neurotoksičnog potencijala organofosfatnih insekticida.

Grafici na Slikama 19-21 i vrednosti u Tabeli 8 pokazuju da se inhibitorne moći organo-tiofosfatnih insekticida malationa, hlörpirifosa i diazinona znatno razlikuju. Zapravo, skoro potpuna inhibicija AChE je postignuta u prisustvu  $2 \times 10^{-5}$  M hlörpirifosa (Slika 20), dok je efekat iste koncentracije diazinona i malationa manje od 20% inhibicije. U slučaju diazinona i malationa, najveća ispitivana koncentracija,  $2 \times 10^{-4}$  M, izaziva smanjenje aktivnosti AChE za oko 40% (Slike 19 i 21). Kada se uporede uticaji okso formi sa *parent* organo-tiofosfatima, može se zaključiti da su oksoni nekoliko stotina, odnosno hiljada puta jači inhibitori AChE. Na primer, koncentracija hlörpirifos-oksona  $2 \times 10^{-7}$  M potpuno inhibira aktivnost AChE, dok je efekat iste koncentracije hlörpirifosa neznatan (Slika 20). 50% inhibicije je dostignuto pri koncentraciji hlörpirifosa  $(4,3 \pm 0,2) \times 10^{-6}$  M ( $IC_{50}$ ), dok je isti efekat postignut izlaganjem enzima  $(3,0 \pm 0,1) \times 10^{-8}$  M hlörpirifos-oksonu, odnosno  $(5,1 \pm 0,3) \times 10^{-8}$  M diazoksonu (Tabela 8). Najveće ispitivane koncentracije diazinona i malationa ( $2 \times 10^{-4}$  M) ne mogu da smanje aktivnost za 50%, odnosno manje su od vrednosti  $IC_{50}$  (Slike 19 i 21).  $IC_{50}$  za proizvod oksidacije malationa je približan ( $\approx 10^{-8}$  M) vrednosti za okso oblike diazinona i hlörpirifosa dok je izo oblik malationa za oko 10 puta slabiji inhibitor. Dobijene vrednosti Hilovog koeficijenta,  $n$  su veće od 1, što ukazuje na kooperativno vezivanje molekula inhibitora za enzim (Tabela 8). Za razliku od proizvoda oksidacije i izomerizacije, proizvodi hidrolitičke razgradnje ispitivanih organo-tiofosfatnih insekticida ne utiču značajno (% inhibicije je manji od 10) na aktivnost AChE (Slike 19 i 20, Tabela 8) [195].

#### 4.2.1.2 Kinetička analiza

Mehanizam vezivanja organofosfatnih jedinjenja za –OH grupu serina u aktivnom mestu AChE, koje ometa vezivanje supstrata i katalitičku aktivnost enzima dovodeći do smanjenja brzine enzimske reakcije, je opisan u poglavlju 2.2.1. Brzina ireverzibilne inhibicije za hlorspirifos, malation, diazokson, hlorspirifos-okson, malaokson i izomalation je merena prema metodi iz literature za ireverzibilnu inhibiciju enzima [41]. 0,03 IU AChE iz električne jegulje je izlagano različitim koncentracijama ispitivanih organo-tiofosfata i njihovih degradacionih proizvoda pri različitim vremenima preinkubacije enzima i inhibitora. Dobijeni rezultati pokazuju da inhibicija aktivnosti AChE ispitivanim jedinjenjima raste kao funkcija vremena izlaganja u ispitivanom vremenskom interval ukazujući na ireverzibilan tip inhibicije. Rezultati za hlorspirifos-okson su prikazani na Slici 24a kao linerana zavisnost preostale aktivnosti enzima od vremena preinkubacije (jednačina 1, poglavlje 2.2.1):

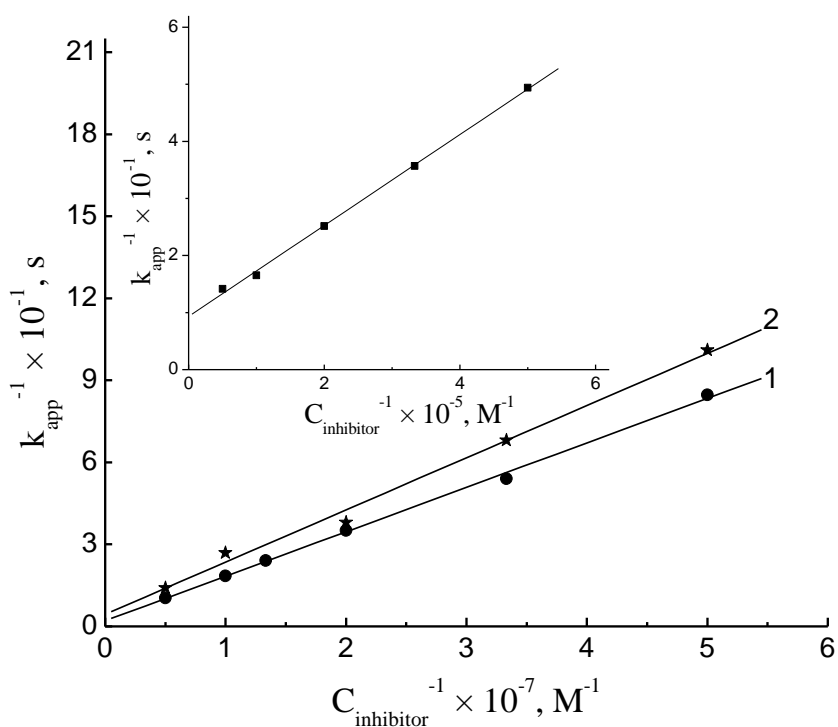


**Slika 24a.** Progresivan razvoj inhibicije tokom reakcije AChE sa različitim koncentracijama hlorspirifos-oksona. Koncentracije diazoksona (u M) su: (1)  $1 \times 10^{-8}$ , (2)  $2 \times 10^{-8}$ , (3)  $5 \times 10^{-8}$ , (4)  $1 \times 10^{-7}$  i (5)  $2 \times 10^{-7}$ .



Vremenski zavisna inhibicija AChE za različite koncentracije hlorpirifosa, malationa, malaoksona i izomalationa je data u prilogu (Slika P2).

Vrednosti inhibicionih parametara,  $K_I$  i  $k_3$ , izračunavaju se iz nagiba i odsečka linearne zavisnosti  $1/k_{app} - 1/(I)$  (jednačina 2, poglavlje 2.2.1), koje su date na Slici 24b za diazokson, hlorpirifos i hlorpirifos-okson i na Slici P3 u prilogu za malation, malaokson i izomalation. Izračunate vrednosti inhibicionih parametara su date u Tabeli 9 [195].



**Slika 24b.** Zavisnost  $1/k_{app}$  od recipročne vrednosti koncentracije diazoksona (1), hlorpirifos-oksona (2) i hlorpirifosa (inset).

Dobijene prave seku pozitivan deo x ose, što potvrđuje nastajanje reverzibilnog enzim-inhibitor kompleksa (poglavlje 2.2.1, reakcija I) u ispitivanom opsegu koncentracija inhibitora [41].

**Tabela 9.** Kinetički parametri ( $K_I$  i  $k_3$ ) za ireverzibilnu inhibiciju AChE diazoksonom, hlörpirifosom, malationom i proizvodima njihove degradacije.

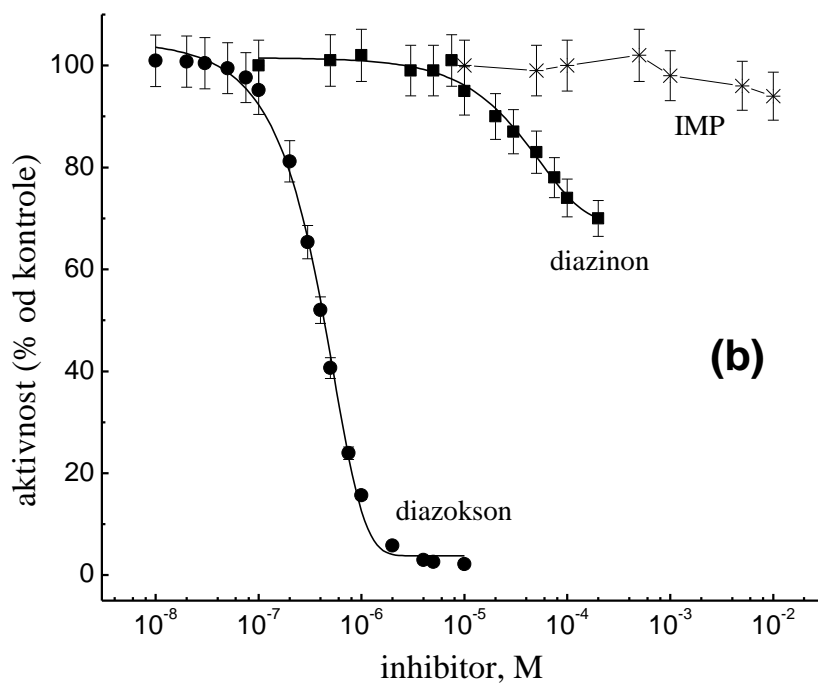
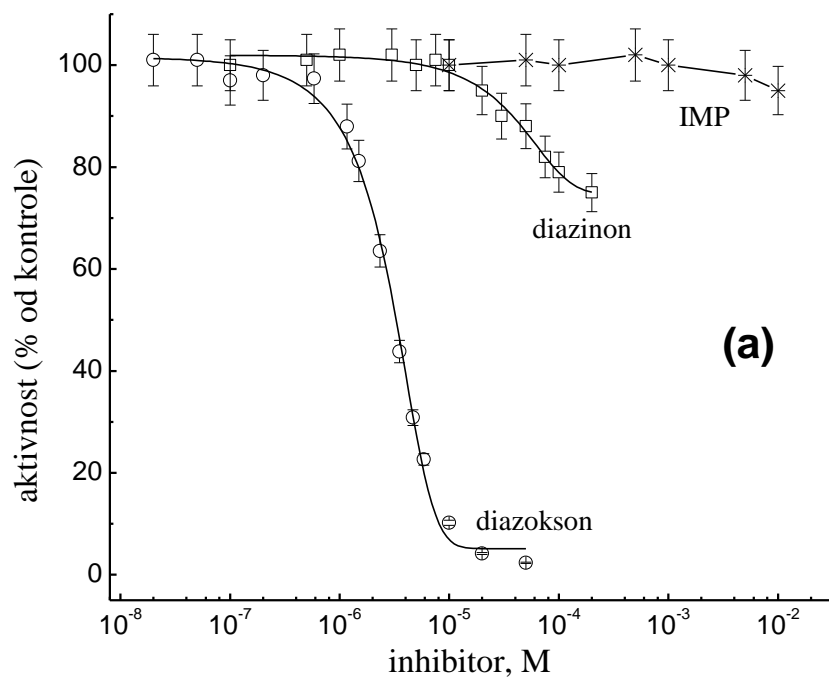
Jedinjenje	$K_I$ , M	$k_3$ , s <sup>-1</sup>	$k_3/K_I$ , M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>
Diazokson	$7,9 \times 10^{-7}$	$0,48 \pm 0.09$	$6,1 \times 10^5$
Hlorpirifos	$9,6 \times 10^{-6}$	$0,12 \pm 0.06$	$1,2 \times 10^4$
Hlorpirifos-okson	$4,3 \times 10^{-7}$	$0,23 \pm 0.03$	$5,3 \times 10^5$
Malation	$2,0 \times 10^{-5}$	$0,02 \pm 0.01$	$8,33 \times 10^2$
Malaokson	$2,9 \times 10^{-8}$	$0,05 \pm 0.01$	$1,6 \times 10^6$
Izomalation	$2,3 \times 10^{-7}$	$0,03 \pm 0.01$	$1,4 \times 10^5$

#### 4.2.2 Uticaj diazinona, hlörpirifosa, malationa i proizvoda njihove degradacije na aktivnost acetilholinesteraze iz govedih eritrocita

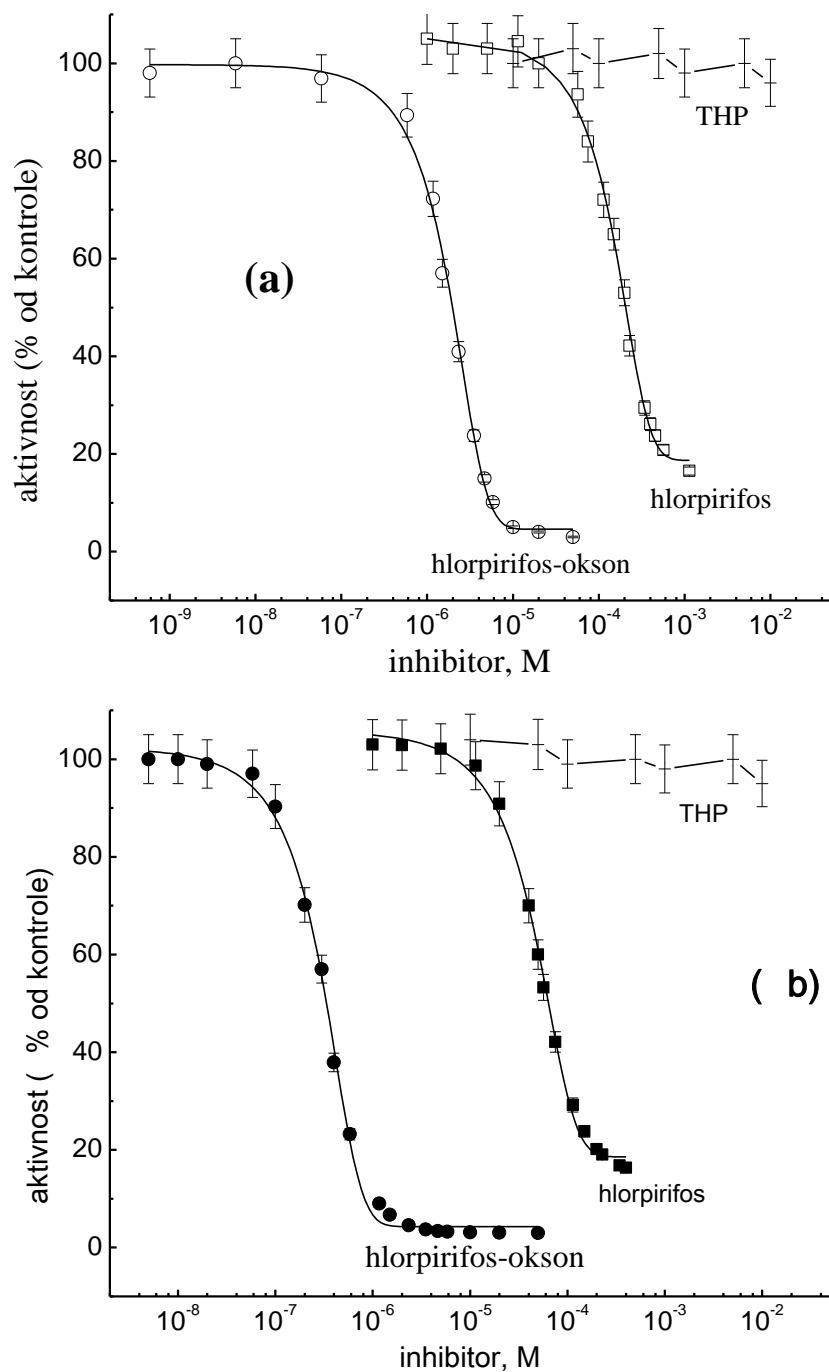
Testirana je i osetljivost AChE izolovane iz govedih eritrocita (0,28 IU/mg čvrste supstance) na prisustvo organo-tiofosfatnih insekticida, diazinona, hlörpirifosa i malationa i proizvoda njihove oksidacije, izomerizacije i hidrolize, koji nastaju tokom njihove degradacije. Iako je AChE iz električne jegulje ekonomski isplativija, imobilizovani enzim iz govedih eritrocita pokazao se kao stabilniji zadržavajući aktivnost tokom tri meseca. Stoga, ovaj model sistem je ispitivan kao referentni sistem za poređenje sa protočnim sistemom, koji sadrži imobilizovanu AChE, za detekciju organofosfatnih jedinjenja. *In vitro* eksperimenti su izvođeni izlaganjem 110 µg enzima ispitivanim organo-tiofosfatima i njihovim derivatima u opsegu koncentracija od  $1 \times 10^{-9}$  do  $1 \times 10^{-2}$  M, u skladu sa rastvorljivošću insekticida u odgovarajućim koncentracijama organskog rastvarača. U jednoj seriji eksperimenata, enzimska reakcija je započeta dodavanjem supstrata odmah nakon mešanja AChE i ispitivanih jedinjenja. U drugoj seriji, vreme preinkubacije je produženo na 5 min, kako bi se utvrdilo da li se menja osetljivost testiranog AChE bioeseja.

#### 4.2.2.1 Inhibicija aktivnosti acetilholinesteraze iz govedih eritrocita

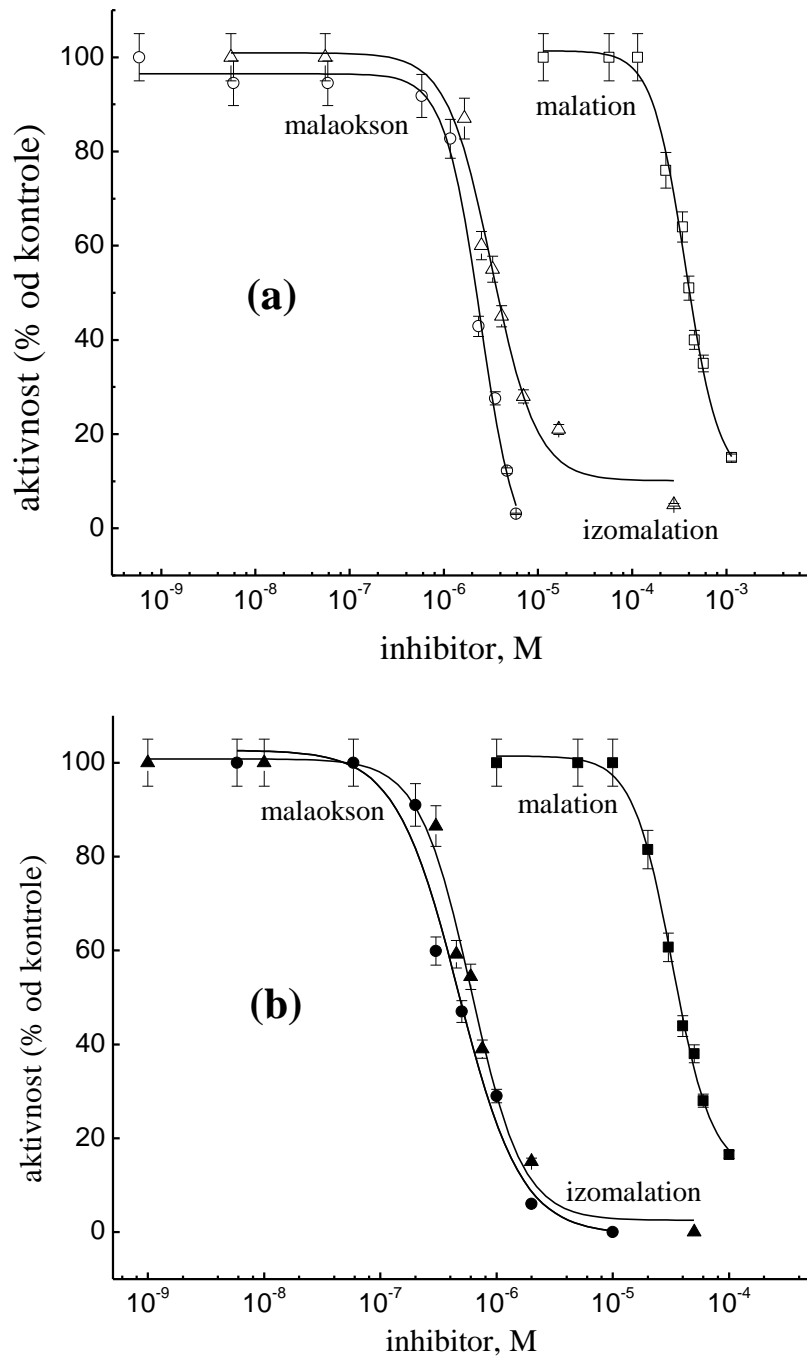
Dobijene inhibicione krive za diazinon, hlorpirifos, malation i njihove degradacione proizvode (Slike 25-27), pokazuju da organo-tio fosfati, proizvodi oksidacije (dizokson, hlorpirifos-okson, malaokson) i izomerizacije (izomalation) smanjuju aktivnost AChE sa povećanjem koncentracije inhibitora, ali sa različitim inhibitorynim moćima različitih struktura jedinjenja. Zavisnost aktivnosti enzima, izražene kao % od vrednosti kontrole (aktivnost dobijena bez prisustva inhibitora), od koncentracije inhibitora sledi sigmoidnu funkciju (jednačina 7). Proizvodi hidrolize ispitivanih insekticida (IMP, THP, dietil-maleat, O,O-dimetil-tiofosfat, O,O,S-trimetil-fosforoditionat), koji nastaju kao rezultat raskidanja P-S ili P-O veze usled hemijske konverzije ili fotohemijjskog tretmana organo-tiofosfata, ne menjaju aktivnost testirane AChE iz govedih eritrocita ni sa produžavanjem vremena preinkubacije.



**Slika 25.** Uticaj različitih koncentracija diazinona i njegovih degradacionih proizvoda, diazoksona i IMP na aktivnost AChE iz govedih eritrocita nakon 0 (a) i 5 minuta (b) preinkubacije.

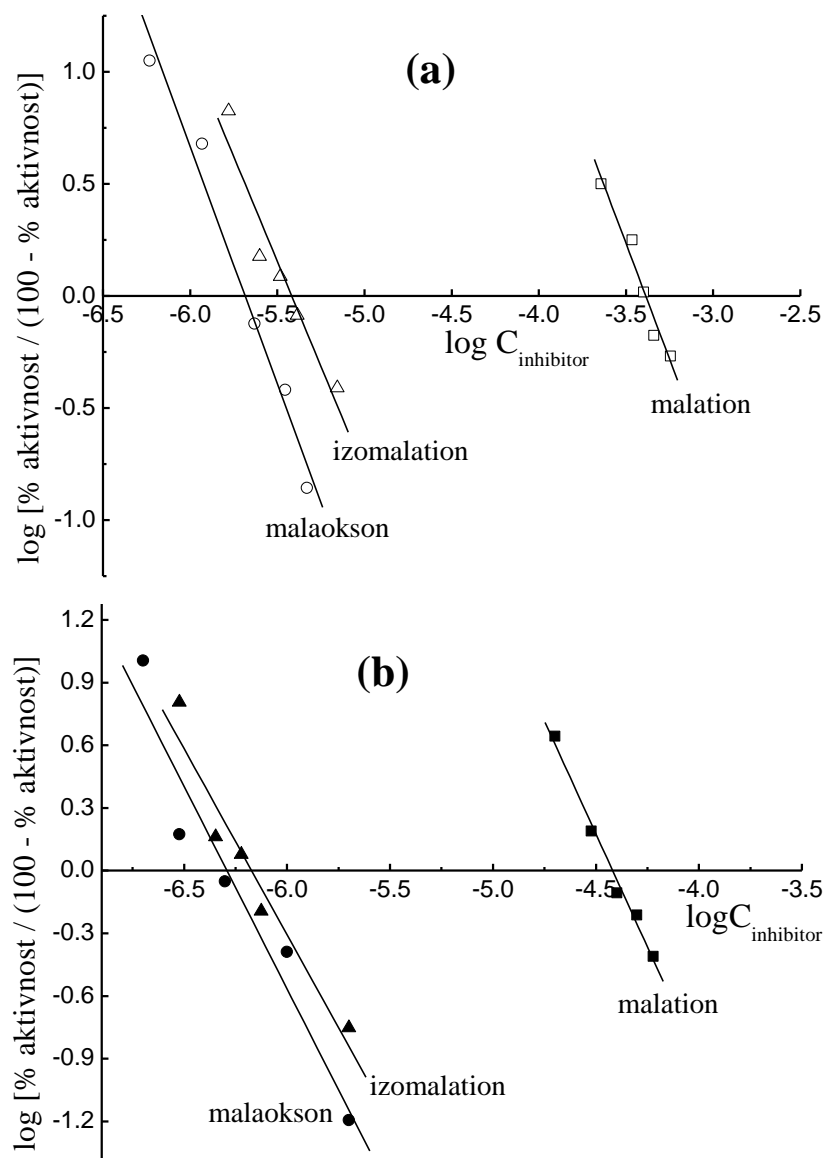


**Slika 26.** Uticaj različitih koncentracija hlorpirifosa i njegovih degradacionih proizvoda, hlorpirifos-oksona i IMP na aktivnost AChE iz govedjih eritrocita nakon 0 (a) i 5 minuta (b) preinkubacije.



**Slika 27.** Koncentraciono zavisna inhibicija AChE iz govedih eritrocita malationom, malaoksonom i izomalationom nakon 0 (a) i 5 minuta (b) preinkubacije.

Linearizacijom sigmoidnih zavisnosti aktivnosti AChE od koncentracije ispitivanih organo-tiofosfatnih insekticida i proizvoda njihove transformacije dobijeni su Hilovi dijagrami prikazani na Slici 28 za malation i proizvode transformacije, malaokson i izomalation. Hilove linearne zavisnosti za diazokson, hlorpirifos i hlorpirifos-okson su prikazane u prilogu (Slika P4).



**Slika 28.** Hilova analiza inhibicije aktivnosti AChE iz goveđih eritrocita nakon 0 (a) i 5 minuta (b) preinkubacije sa malationom, malaoksonom i izomalationom.

U Tabelama 10 i 11 su nevedene vrednosti inhibicionih parametara,  $IC_{50}$  i  $n$ , određenih iz sigmoidnih inhibicionih funkcija i Hilovom metodom za sva testirana jedinjenja posle 5 minuta preinkubacije, kao i započinjanjem enzimske reakcije odmah nakon mešanja AChE i inhibitora [189].

**Tabela 10.** Inhibicioni parametri ( $IC_{50}$  (0 min) i Hilov koeficijent,  $n$ ) diazinona, hlorspirifosa, malationa i proizvoda njihove degradacije za AChE iz goveđih eritrocita, dobijeni Hilovom analizom i fitovanjem eksperimentalnih podataka sigmoidnom funkcijom. Vreme kontakta enzima i inhibitora je  $\approx 0$  minuta ( $< 10$  sekundi).

Jedinjenje	sigmoidna funkcija		Hilova analiza
	$IC_{50}$ (0 min), M	$IC_{50}$ (0 min), M	$n$
Diazinon	$> 2 \times 10^{-4}$	-	-
Diazokson	$(3,2 \pm 0,2) \times 10^{-6}$	$1,7 \times 10^{-6}$	$2,0 \pm 0,1$
IMP*	-	-	-
Hlorpirifos	$(2,0 \pm 0,1) \times 10^{-4}$	$2,1 \times 10^{-4}$	$1,7 \pm 0,1$
Hlorpirifos-okson	$(1,9 \pm 0,1) \times 10^{-6}$	$1,9 \times 10^{-6}$	$1,8 \pm 0,1$
THP*	-	-	-
Malation	$(3,7 \pm 0,2) \times 10^{-4}$	$3,1 \times 10^{-4}$	$1,8 \pm 0,2$
Malokson	$(2,4 \pm 0,3) \times 10^{-6}$	$2,0 \times 10^{-6}$	$1,9 \pm 0,1$
Izomalation	$(3,2 \pm 0,3) \times 10^{-6}$	$3,1 \times 10^{-6}$	$1,8 \pm 0,1$
Dietil-maleat*	-	-	-
O,O-dimetil- tiofosfat*	-	-	-
O,O,S-trimetil- fosforoditionat*	-	-	-

\* Inhibicija AChE manja od 10%



**Tabela 11.** Inhibicioni parametri ( $IC_{50}$  (5 min) i Hilov koeficijent, n) diazinona, hlorspirifosa, malationa i proizvoda njihove degradacije za AChE iz goveđih eritrocita, dobijeni Hilovom analizom i fitovanjem eksperimentalnih podataka sigmoidnom funkcijom. Vreme kontakta enzima i inhibitora je 5 minuta.

Jedinjenje	sigmoidna funkcija		Hilova analiza
	$IC_{50}$ (5 min), M	$IC_{50}$ (5 min), M	n
Diazinon	$> 2 \times 10^{-4}$	-	-
Diazokson	$(4,3 \pm 0,2) \times 10^{-7}$	$4,1 \times 10^{-7}$	$2,0 \pm 0,1$
IMP*	-	-	-
Hlorpirifos	$(6,1 \pm 0,3) \times 10^{-5}$	$6,5 \times 10^{-5}$	$1,8 \pm 0,2$
Hlorpirifos-okson	$(3,3 \pm 0,1) \times 10^{-7}$	$3,2 \times 10^{-7}$	$1,8 \pm 0,2$
THP*	-	-	-
Malation	$(3,2 \pm 0,1) \times 10^{-5}$	$3,8 \times 10^{-5}$	$2,2 \pm 0,2$
Malokson	$(4,7 \pm 0,3) \times 10^{-7}$	$5,1 \times 10^{-7}$	$1,9 \pm 0,2$
Izomalation	$(6,0 \pm 0,3) \times 10^{-7}$	$6,7 \times 10^{-7}$	$1,8 \pm 0,2$
Dietil-maleat*	-	-	-
O,O-dimetil-tiofosfat*	-	-	-
O,O,S-trimetil-fosforoditionat*	-	-	-

\* Inhibicija AChE manja od 10%

#### 4.2.3 Simultano delovanje diazinona, hlorspirifosa, malationa i njihovih degradacionih proizvoda na aktivnost acetilholinesteraze

Degradacijom organo-tiofosfatnih insekticida, u životnoj sredini ili tokom AOP za njihovo uklanjanje, nastaje smeša jedinjenja različitog toksičnog delovanja. Njihovo

zbirno štetno dejstvo ne može se sa sigurnošću predvideti, a i toksičnost jedne komponente može biti „povećana“ ili „smanjena“ prisustvom druge. Kako bi se ispitalo simultano dejstvo organo-tiofosfata i proizvoda njihove degradacije na inhibiciju AChE, pripremane su sintetičke smeše malationa, diazinona, hlorspirifosa i proizvoda njihove degradacije različitog sastava kojima je izlagan enzim. Inhibitorni efekat koji izazivaju ispitivane smeše jedinjenja je upoređivan sa inhibitornim kapacitetima pojedinačnih komponenata. Statistička analiza (One-way ANOVA) je korišćena za poređenje matematičke sume inhibicija enzima uzrokovanih odvojenim izlaganjem pojedinačnim organofosfatima sa inhibicijama dobijenim izlaganjem kombinaciji oba jedinjenja istovremeno (simultano delovanje). Kada je dobijena statistički značajna vrednost F ( $P < 0.05$ ), *post-hoc Bonferoni* test je korišćen za određivanje razlika.

#### **4.2.3.1 Simultano delovanje diazinona i njegovih degradacionih proizvoda**

U fotodegradacionoj studiji diazinona [196], rastvor diazinona je fotodegradiran dejstvom ksenonske lampe (125 W Cermax) koja emituje svetlost talasnih dužina iznad 200 nm tokom: 0, 5, 15, 30, 60 i 115 minuta. Koncentracije diazinona i proizvoda njegove degradacije, IMP i diazoksona, u alikvotima ozračenih rastvora su određene UPLC-UV/Vis sistemom. Pripremljene su sintetičke smeše čistih proizvoda degradacije (komercijalni diazinon, diazokson i IMP) kojima je tretirana AChE u cilju ispitivanja simultanog neurotoksičnog dejstva diazinona i njegovih proizvoda degradacije, koji istovremeno mogu biti prisutni u otpadnim vodama, kao i nakon procesa za njihovo prečišćavanje. Koncentracije diazinona i degradacionih proizvoda u smešama su birane prema dva kriterijuma: 1) koncentracije komponenata smeše su slične identifikovanim koncentracijama u ozračenim rastvorima posle fotodegradacije  $1 \times 10^{-4}$  M diazinona u vremenskom intervalu od 0 do 115 minuta; 2) koncentracije diazinona i njegovog proizvoda oksidacije koji ima jak inhibitorni uticaj na aktivnost AChE, diazoksona su u opsegu koncentracija koje smanjuju aktivnost enzima za oko 50% ili više. 1) Inhibicije aktivnosti AChE iz električne jegulje dobijene nakon 20 minuta preinkubacije enzima sa odgovarajućim kombinacijama diazinona i/ili njegovih derivata su prikazane u Tabeli 12. Inhibicija enzima usled simultanog izlaganja smešama su upoređivane sa aktivnostima postignutim u prisustvu svake pojedinačne komponente smeše. Iz

vrednosti u Tabeli 12 može se uočiti da početni neozračeni  $1 \times 10^{-4}$  M diazinon inhibira aktivnost AChE za 25%. Zračenje u trajanju od 5 minuta dovodi do skoro potpune inhibicije aktivnosti enzima (98,6%). Drastično smanjenje aktivnosti se pripisuje konverziji 0,2% količine početnog *parent* organo-tiofosfata do okso analoga, pošto  $2 \times 10^{-7}$  M dizokson uzrokuje 90,2% inhibiciju.  $2 \times 10^{-5}$  M diazinon i  $4 \times 10^{-8}$  M diazokson u 15-minutnom ozračenom rastvoru dovode do inhibicije od 20,2%, odnosno 41,1% tokom odvojenog delovanja. Sintetička smeša ovih jedinjenja snižava aktivnost AChE za 52%, što je niža vrednost od zbira njihovih pojedinačnih inhibicionih kapaciteta, odnosno ukazuje na antagonistički efekat diazinona i diazoksona u ovim koncentracijama. Kombinacije diazinona i IMP formiranih tokom 30-60 minuta dovode do povećanja aktivnosti AChE (15,8% i 8,0% inhibicija), dok je potpuna regeneracija aktivnosti postignuta u slučaju 115-minutnog fototretmana, kada je 45% ozračenog diazinona razgrađeno do IMP koji ne menja aktivnost AChE. Prisustvo IMP ne utiče na inhibitorne potencijale diazinona i diazoksona u svim ispitivanim smešama [195].

**Tabela 12.** Inhibicija AChE dobijena pojedinačnim i simultanim izlaganjem različitim koncentracijama diazinona i/ili proizvodima njegove fotodegradacije.

Vreme ozračivanja, min [190]		0	5	15	30	60	115
		<b>Inhibicija (%) [koncentracija inhibitora, M]</b>					
<b>Pojedinačno izlaganje</b> <sup>*</sup> [196]	Diazinon	25,1 [1,0 × 10 <sup>-4</sup> ]	23,4 [9,0 × 10 <sup>-5</sup> ]	20,2 [7,2 × 10 <sup>-5</sup> ]	14,1 [4,1 × 10 <sup>-5</sup> ]	9,2 [2,0 × 10 <sup>-5</sup> ]	/
	Diazokson	/	90,2 [2,0 × 10 <sup>-7</sup> ]	41,1 [4,0 × 10 <sup>-8</sup> ]	/	/	/
	IMP	/	0 [3,2 × 10 <sup>-6</sup> ]	0 [6,4 × 10 <sup>-6</sup> ]	0 [1,1 × 10 <sup>-5</sup> ]	0 [2,7 × 10 <sup>-5</sup> ]	0 [4,5 × 10 <sup>-5</sup> ]
<b>Simultano izlaganje</b> <sup>**</sup>	Diazinon + diazokson	/	97,5	49,7	/	/	/
	Diazinon + IMP	/	24,1	21,7	15,8	8,0	/
	Diazokson + IMP	/	88,7	43,2	/	/	/
	Diazinon + diazokson	/	98,6	52,0	/	/	/
	+ IMP						

\* Podaci iz literature [196]

\*\* Koncentracije komponenata smeša korišćene u eksperimentu simultanog dejstva su iste kao i u eksperimentima pojedinačnog delovanja inhibitora koji su prisutni u ozračenim rastvorima nakon određenog vremena fototretmana.

/ - navedena jedinjenja nisu detektovana nakon određenog vremena ozračivanja

2) Sinergizam/antagonizam između inhibitornih moći diazinona i diazoksone je proučavan 20-minutnom preinkubacijom AChE iz električne jegulje sa smešama diazinona i diazoksone u koncentracijama koje, tokom pojedinačnog izlaganja, dovode do 50% inhibicije ili manje. U Tabeli 13 su prikazane eksperimentalno dobijene

inhibicije enzima izloženog simultanom uticaju diazinona i diazoksna različitih koncentracija, kao i matematički izračunate sume inhibicija enzima izazvanih delovanjem pojedinačnih organofosfata. Na osnovu dobijenih vrednosti može se uočiti da niže koncentracije diazinona i diazoksna (diazinon (M)/diazokson (M):  $2 \times 10^{-5}/5 \times 10^{-9}$ ,  $2 \times 10^{-5}/7,5 \times 10^{-9}$ ,  $2 \times 10^{-5}/1 \times 10^{-8}$ ,  $5 \times 10^{-5}/5 \times 10^{-9}$ ,  $5 \times 10^{-5}/7,5 \times 10^{-9}$ ,  $5 \times 10^{-5}/1 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-4}/5 \times 10^{-9}$  and  $1 \times 10^{-4}/7,5 \times 10^{-9}$ ) pokazuju aditivan inhibitorski efekat (Tabela 13, osenčeni deo). Zapravo, vrednost inhibicije enzima dobijene u prisustvu smeše inhibitora određenih koncentracija je jednaka sumi inhibicija koje izaziva odvojeno delovanje pojedinačnih komponenti smeše. U prisustvu većih koncentracija inhibitora dobijena je statistički značajna antagonistička inhibicija koja je manja od sume pojedinačnih inhibicija tokom odvojenog delovanja ispitivanih koncentracija jedinjenja (Tabela 13) [195].

**Tabela 13.** Inhibicija aktivnosti AChE izazvana simultanim izlaganjem enzima smešama diazinona i diazoksna. Vrednosti u zagradi predstavljaju vrednosti inhibicije enzima usled pojedinačnog delovanja diazinona odnosno diazoksna određenih koncentracija.

		Inhibicija (%)					
Diazokson (M)	Diazinon (M)	$5 \times 10^{-9}$	$7,5 \times 10^{-9}$	$1 \times 10^{-8}$	$2 \times 10^{-8}$	$3 \times 10^{-8}$	$5 \times 10^{-8}$
		(5,5%)	(7,7%)	(14,6%)	(25,5%)	(35,5%)	(50,7%)
	$2 \times 10^{-5}$ (8,0%)	13,0%	16,4%	17,9%	26,2%	33,3%	48,5%
	$5 \times 10^{-5}$ (15,5%)	22,4%	23,2%	25,3%	24,6%	37,8%	44,4%
	$1 \times 10^{-4}$ (22,7%)	28,6%	29,1%	22,4%	28,5%	36,7%	43,4%
	$2 \times 10^{-4}$ (34,2%)	31,8%	27,9%	30,1%	37,3%	38,7%	44,3%

#### 4.2.3.2 Simultano delovanje hlorspirifosa i njegovih degradacionih proizvoda

Bavcon Kralj i saradnici su ispitivali fotodegradaciju hlorspirifosa tokom 120 minuta delovanja UV svetlosti [146]. Analiza sastava ozračenih rastvora hlorspirifosa pokazala je prisustvo hlorspirifos-oksona, kao glavnog proizvoda fotodegradacije, i THP, proizvoda hidrolize hlorspirifosa nastalog kao rezultat raskidanja P-O veze. Proizvod oksidacije je detektovan u prva 3,5 minuta fototretmana, dostigao je maksimalnu vrednost posle 15 minuta, a njegovo prisustvo je primećeno u ozračenom rastvoru tretiranom 120 minuta. Kako bi se procenila toksičnost fotodegradiranog hlorspirifosa, potrebno je ispitati simultani uticaj hlorspirifosa i njegovog oksona, jakog inhibitora

(Slika 20), na aktivnost AChE. Stoga, pravljene su sintetičke smeše hlörpirifosa i hlörpirifos-oksona (čistih komercijalnih jedinjenja) u različitim odnosima koncentracija i testirane esejom AChE iz električne jegulje tokom 20 minuta preinkubacije. Finalne koncentracije *parent* organo-tiofosfata i njegovog okso analoga su približne njihovim IC<sub>50</sub> vrednostima ili niže. Rezultati simultanog i pojedinačnog delovanja izabranih koncentracija hlörpirifosa i/ili hlörpirifos-oksona na aktivnost AChE su dati u Tabeli 14. Kao i u slučaju diazinon/diazokson smeša, aditivan inhibicioni efekat je dobijen u prisustvu nižih koncentracija inhibitora (hlörpirifos (M)/hlörpirifos-okson (M):  $3 \times 10^{-7}/3 \times 10^{-9}$ ,  $3 \times 10^{-7}/5 \times 10^{-9}$ ,  $3 \times 10^{-7}/1 \times 10^{-8}$ ,  $3 \times 10^{-7}/2 \times 10^{-8}$ ,  $3 \times 10^{-7}/3 \times 10^{-8}$ ,  $5 \times 10^{-7}/3 \times 10^{-9}$ ,  $5 \times 10^{-7}/5 \times 10^{-9}$ ,  $5 \times 10^{-7}/1 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-6}/3 \times 10^{-9}$ ,  $1 \times 10^{-6}/5 \times 10^{-9}$ ,  $2 \times 10^{-6}/3 \times 10^{-9}$ ,  $2 \times 10^{-6}/5 \times 10^{-9}$ ). Više koncentracije ispitivanih organofosfata deluju antagonistički (Tabela 14). Ispitivanja izvedena u prisustvu proizvoda hidrolize hlörpirifosa, THP, u smešama hlörpirifosa i hlörpirifos-oksona pokazuju da ovaj neinhibirajući proizvod, identifikovan u ozračenim rastvorima, ne menja inhibitorno dejstvo komponenata smeše (podaci nisu prikazani) [195].

**Tabela 14.** Inhibicija aktivnosti AChE izazvana simultanim izlaganjem enzima hlорpirifosu i hlорpirifos-oksonu. Vrednosti u zagradama predstavljaju inhibiciju usled pojedinačnog delovanja inhibitora.

		Inhibicija (%)					
Okson, M	Hlorpirifos, M	$3 \times 10^{-9}$	$5 \times 10^{-9}$	$1 \times 10^{-8}$	$2 \times 10^{-8}$	$3 \times 10^{-8}$	$5 \times 10^{-8}$
		(12,5%)	(20,7%)	(28,4%)	(41,0%)	(50,6%)	(60,0%)
	$3 \times 10^{-7}$ (5,5%)	15,9%	23,5%	33,3%	44,8%	53,0%	55,0%
	$5 \times 10^{-7}$ (11,2%)	20,6%	27,4%	35,7%	45,5%	54,0%	58,1%
	$1 \times 10^{-6}$ (16,2%)	26,9%	37,9%	37,5%	47,5%	57,0%	60,4%
	$2 \times 10^{-6}$ (26,0%)	38,1%	42,9%	46,3%	50,7%	61,0%	68,2%
	$3 \times 10^{-6}$ (44,3%)	45,0%	49,9%	60,9%	64,7%	71,0%	78,0%
	$5 \times 10^{-6}$ (53,0%)	56,9%	64,1%	71,2%	73,6%	77,1%	84,8%

#### 4.2.3.3 Simultano delovanje malationa i njegovih degradacionih proizvoda

Praćeno je i simultano delovanje malationa i proizvoda njegove transformacije sa izraženim neurotoksičnim dejstvom, malaoksone i izomalationa na aktivnost AChE iz



goveđih eritrocita (5-minutna preinkubacija). Izabrane koncentracije analognih organofosfata u sintetičkim smešama su slične identifikovanim koncentracijama tokom fotodegradacije  $1 \times 10^{-5}$  M malationa u trajanju od 60 minuta [138]. Rezultati zajedničkog i pojedinačnog dejstva inhibitora na aktivnost enzima su prikazani u Tabeli 15. Konverzija 10% malationa ( $1 \times 10^{-5}$  M) do malaoksona smanjila je aktivnost AChE za oko 70%. Preostala količina malationa nakon 10 minuta fotodegradacije ( $9 \times 10^{-6}$  M) nije uticala na inhibitorski kapacitet nastalog malaoksona ( $1 \times 10^{-6}$  M), jer je ista koncentracija samog malaoksona inhibirala aktivnost enzima za 71%. Kombinacije malationa, malaoksona i izomalationa nastalih tokom 15-30 minuta fotodegradacije potpuno su inhibirale AChE. Ovakav efekat je očekivan jer sam malaokson ( $2 \times 10^{-6}$  M) inhibira 90% enzima, a izlaganje enzima izomalationu ( $3 \times 10^{-6}$  M) dovodi do smanjenja aktivnosti za 80%. Prisustvo malationa (u koncentracijama koje ne utiču na AChE) u kombinacijama malation/malaokson ili malation/izomalation ne utiče na inhibiciju izazvanu pojedinačnim izlaganjem malaoksonu ili izomalationu (Tabela 15) [197].

**Tabela 15.** Inhibicija AChE pojedinačnim i simultanim izlaganjem različitim kombinacijama malationa i/ili njegovih fotodegradacionih proizvoda. Vrednosti u zagradama predstavljaju identifikovane koncentracije organofosfata prisutne u ozračenim rastvorima  $1 \times 10^{-5}$  M malationa [138].

Vreme ozračivanja, min		0	10	15	20	30	45	60
		<b>Inhibicija (%) [koncentracija inhibitora, M ]</b>						
<b>Pojedinačno izlaganje [138]</b>	Malation	0 [ $1 \times 10^{-5}$ ]	0 [ $9 \times 10^{-6}$ ]	0 [ $5 \times 10^{-6}$ ]	0 [ $2 \times 10^{-6}$ ]	/	/	/
	Malaokson	/	71 [ $1 \times 10^{-6}$ ]	94 [ $2 \times 10^{-6}$ ]	94 [ $2 \times 10^{-6}$ ]	94 [ $2 \times 10^{-6}$ ]	/	/
	Izomalation	/	/	80 [ $3 \times 10^{-6}$ ]	80 [ $3 \times 10^{-6}$ ]	80 [ $3 \times 10^{-6}$ ]	80 [ $3 \times 10^{-6}$ ]	67 [ $1 \times 10^{-6}$ ]
<b>Simultano izlaganje</b>	Malation + malaokson	/	74,0	9,4	92,7	/	/	/
	Malation + izomalation	/	/	78,6	76,4	/	/	/
	Malation + malaokson + izomalation	/	/	9,0	98,5	/	/	/

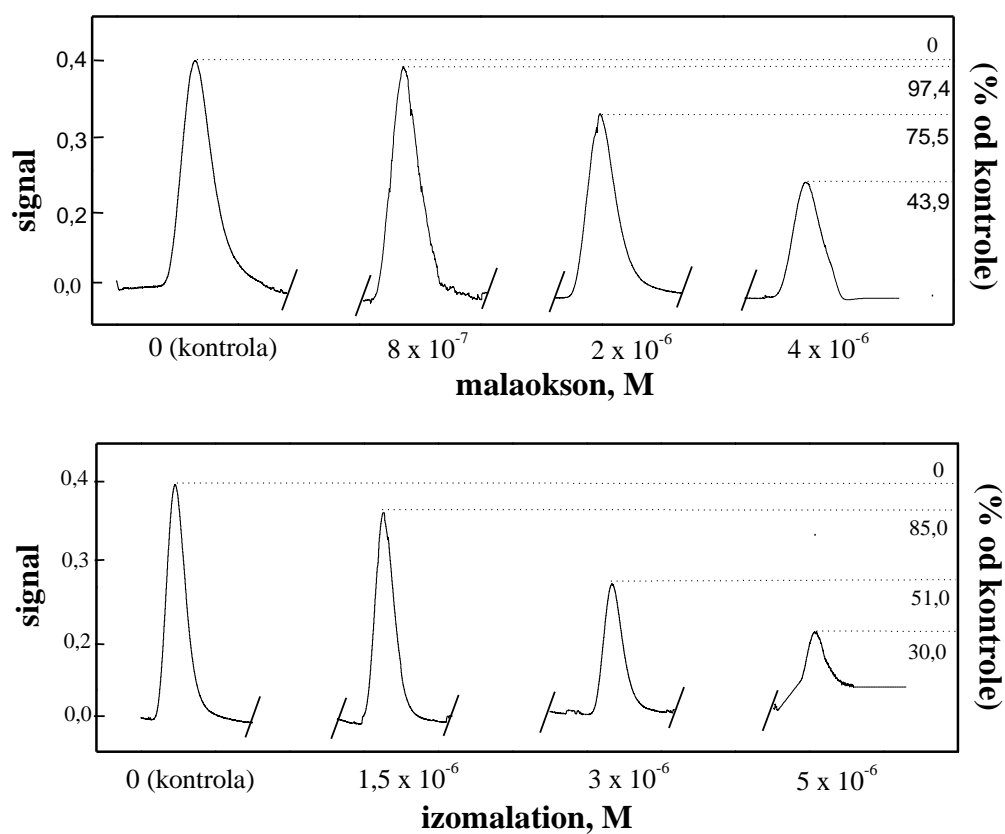
Ispitan je i simultani uticaj malaoksone i izomalationa, proizvoda degradacije malationa koji su u najvećoj meri odgovorni za neurotoksično dejstvo degradiranog malationa, na aktivnost AChE iz goveđih eritrocita. 110  $\mu$ g enzima je izlagano smešama različitih koncentracija inhibitora tokom 5 minuta. Kako bi se uočio efekat inhibitornog delovanja smeša, izabrane su koncentracije malaoksone i izomalationa niže od  $IC_{50}$ . Aditivan efekat je dobijen pri nižim koncentracijama inhibitora (Tabela 16, osenčeni deo), dok je statistički značajan antagonistički efekat uočen pri višim koncentracijama [197].

**Tabela 16.** Simultani uticaj smeša malaoksona i izomalationa na aktivnost AChE.

		Inhibicija (%)			
<b>Izomalation, M</b>	$2 \times 10^{-7}$				
	(10%)				
<b>Malaokson, M</b>	$2 \times 10^{-7}$				
	(9%)				
	$3 \times 10^{-7}$				
	(41%)				
	$4 \times 10^{-7}$				
	(57,1%)				
		21,3%	25,0%	42,0%	39,7%
		39,5%	40,3%	63,1%	51,5%
		53,5%	56,9%	57,9%	67,5%

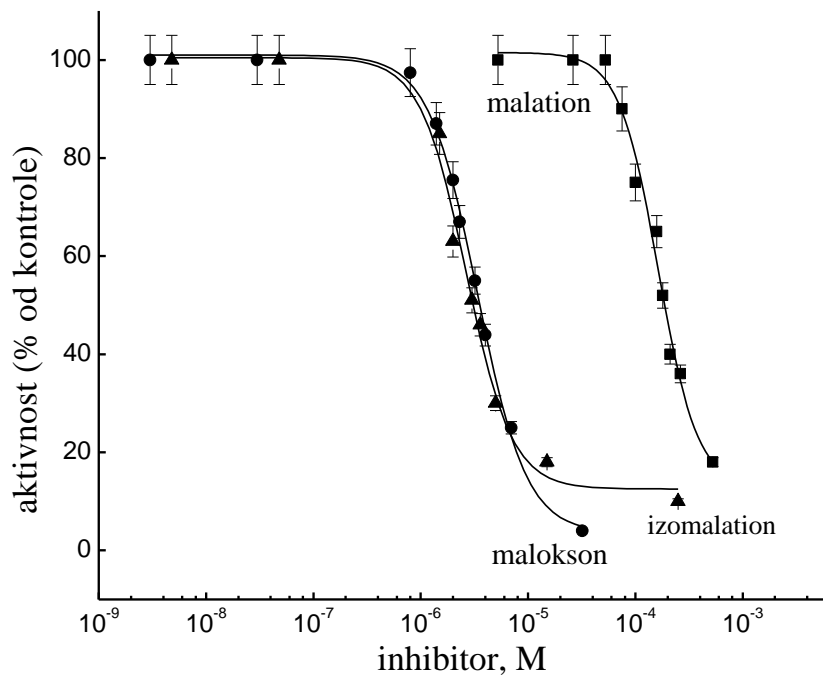
#### 4.3 Primena FIA sistema za detekciju i evaluaciju toksičnosti diazinona, hlorpirifosa, malationa i proizvoda njihove transformacije

Odgovor bioanalitičkog FIA sistema, koji sadrži imobilizovanu AChE iz goveđih eritrocita, na prisustvo diazinona, hlorpirifosa, malationa i njihovih degradacionih proizvoda je praćen u istom opsegu koncentracija ( $1 \times 10^{-9}$  –  $1 \times 10^{-2}$  M) kao i kod *in vitro* izlaganja slobodnom enzimu. FIA signali dobijeni u odsustvu (kontrolna aktivnost enzima) i prisustvu nekoliko koncentracija malaoksona i izomalationa su predstavljeni na Slici 29.

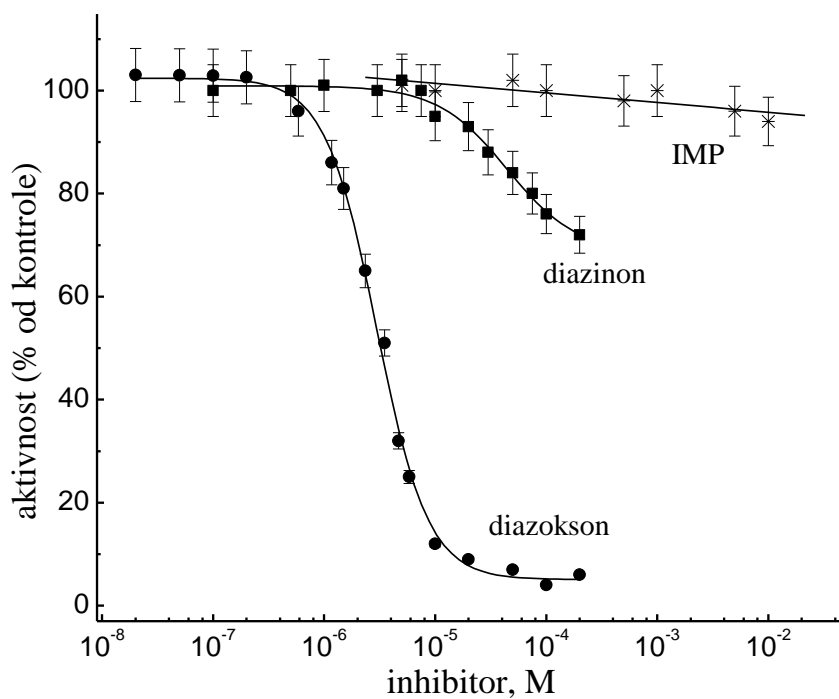


**Slika 29.** FIA signali dobijeni u odsustvu (kontrola) i prisustvu nekoliko koncentracija malaoksona i izomalationa.

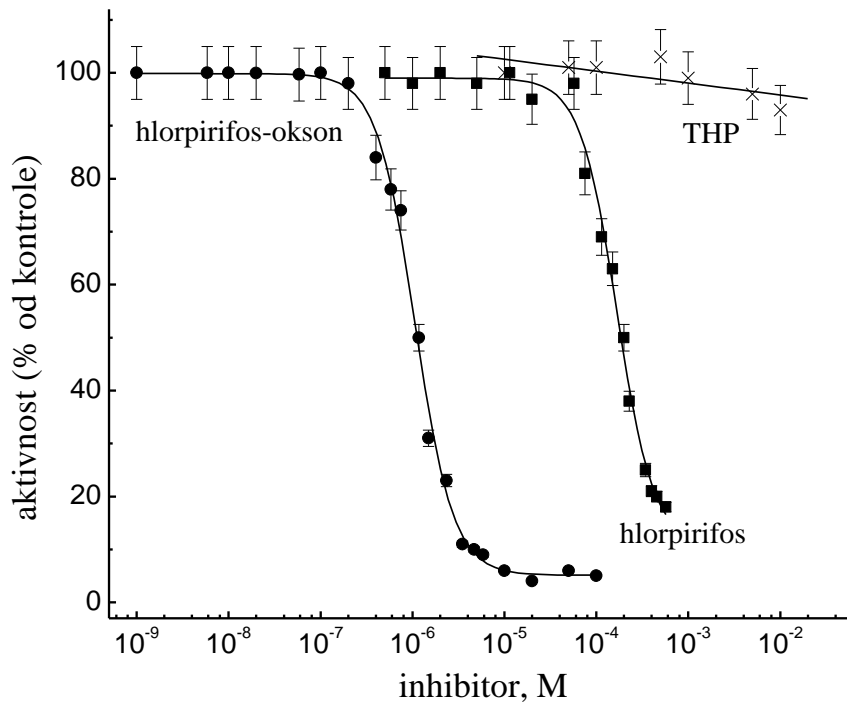
Dobijene su inhibicione krive sigmoidnog oblika, koje opisuju zavisnost aktivnosti imobilizovane AChE od koncentracije diazinona, hlorpirifosa, malationa i proizvoda njihove transformacije (Slike 30, 31 i 32). Hilovi dijagrami za ispitivana jedinjenja su dati u prilogu (Slika P5).



**Slika 30.** Koncentraciono zavisna inhibicija imobilizovane AChE u FIA sistemu malationom, malaoksonom i izomalationom.



**Slika 31.** Koncentraciono zavisna inhibicija imobilizovane AChE u FIA sistemu diazinom i proizvodima njegove degradacije, dizoksonom i IMP.



**Slika 32.** Koncentraciono zavisna inhibicija imobilizovane AChE u FIA sistemu hlorpirifosom i proizvodima njegove degradacije, hlorpirifos-oksonom i THP.

Koncentracije koje smanjuju aktivnost imobilizovane AChE u FIA sistemu, odnosno visinu signala kao odgovora FIA sistema na injektiranje organofosfatnog inhibitora, za 50% ( $IC_{50}$ ) u odnosu na aktivnost enzima pre tritiranja inhibitorom su date u Tabeli 17. Vrednosti su izračunate iz sigmoidne zavisnosti dobijene fitovanjem eksperimentalnih podataka i Hilovom analizom.

**Tabela 17.** Inhibicioni parametri ( $IC_{50}$  i Hilov koeficijent, n) diazinona, hlорpirifosa, malationa i proizvoda njihove degradacije za imobilizovanu AChE iz govedih eritrocita u FIA sistemu, dobijeni Hilovom analizom i fitovanjem eksperimentalnih podataka sigmoidnom funkcijom.

Jedinjenje	sigmoidna funkcija		Hilova analiza	
	$IC_{50}$ , M	$IC_{50}$ , M	$IC_{50}$ , M	n
Diazinon	$> 2 \times 10^{-4}$	-	-	-
Diazokson	$(3,1 \pm 0,1) \times 10^{-6}$	$3,3 \times 10^{-6}$	$3,3 \times 10^{-6}$	$1,8 \pm 0,1$
IMP*	-	-	-	-
Hlorpirifos	$(1,8 \pm 0,2) \times 10^{-4}$	$1,9 \times 10^{-4}$	$1,9 \times 10^{-4}$	$1,6 \pm 0,2$
Hlorpirifos-okson	$(1,1 \pm 0,1) \times 10^{-6}$	$1,2 \times 10^{-6}$	$1,2 \times 10^{-6}$	$1,9 \pm 0,2$
THP*	-	-	-	-
Malation	$(1,6 \pm 0,1) \times 10^{-4}$	$1,9 \times 10^{-4}$	$1,9 \times 10^{-4}$	$1,9 \pm 0,3$
Malokson	$(3,4 \pm 0,1) \times 10^{-6}$	$3,5 \times 10^{-6}$	$3,5 \times 10^{-6}$	$1,7 \pm 0,1$
Izomalation	$(2,7 \pm 0,2) \times 10^{-6}$	$3,2 \times 10^{-6}$	$3,2 \times 10^{-6}$	$2,0 \pm 0,3$
Dietil-maleat*	-	-	-	-
O,O-dimetil-tiofosfat*	-	-	-	-
O,O,S-trimetil-fosforoditionat*	-	-	-	-

\* Inhibicija AChE manja od 10%

Vrednosti LOD FIA-AChE sistema koje pokazuju koju najnižu koncentraciju ispitivanih organofosfatnih jedinjenja konstruisani biosensor može da detektuje su prikazane u Tabeli 18.

**Tabela 18.** Granice detekcije FIA-AChE sistema za diazinon, hlorpirifos, malation i proizvode njihove transformacije. Vrednosti LOD su određene kao koncentracija ispitivanog jedinjenja koja smanjuje aktivnost imobilizovanog enzima za 10%.

Jedinjenje	LOD, M	Jedinjenje	LOD, M	Jedinjenje	LOD, M
Diazinon	$(2,5 \pm 0,1) \times 10^{-5}$	Hlorpirifos	$(5,9 \pm 0,3) \times 10^{-5}$	Malation	$(7,5 \pm 0,4) \times 10^{-5}$
Diazokson	$(1,0 \pm 0,3) \times 10^{-6}$	Hlorpirifos-okson	$(3,8 \pm 0,2) \times 10^{-7}$	Malaokson	$(1,1 \pm 0,1) \times 10^{-6}$
IMP*	-	THP*	-	Izomalation	$(9,3 \pm 0,4) \times 10^{-7}$
Dietil-maleat*	-	O,O-dimetil-tiofosfat*	-	O,O,S-trimetil-fosforoditionat*	-

\*Jedinjenje ne izaziva statistički značajnu inhibiciju AChE od 10%

Inhibicione krive ispitivanih organofosfata za imobilizovanu AChE u FIA sistemu (Slike 30-32) su veoma slične sigmoidnim zavisnostima dobijenim testiranjem istih jedinjenja slobodnim enzimom iz goveđih eritrocita za  $\approx 0$  minuta preinkubacije (Slike 25a, 26a i 27a). Vrednosti  $IC_{50}$  i LOD ukazuju na sličnu osetljivost protočnog (Tabele 17 i 18) i šaržnog bioeseja (Tabele 4 i 10) prema ispitivanim insekticidima i njihovim derivatima.  $IC_{50}$  malaoksona ( $3,5 \times 10^{-6}$  M) i izomalationa ( $3,2 \times 10^{-6}$  M) su dva reda veličine niže od vrednosti  $IC_{50}$  za malation ( $1,9 \times 10^{-4}$  M). FIA-AChE biosenzor je najosetljiviji na prisustvo hlorpirifos-oksona ( $IC_{50} = 1,2 \times 10^{-6}$  M), dok je njegov tio analog, hlorpirifos ( $IC_{50} = 1,9 \times 10^{-4}$  M) oko 100 puta slabiji inhibitor imobilizovanog enzima. Zato, AChE biosenzorom je moguće detektovati prisustvo i do 100 puta nižih koncentracija oksona, u poređenju sa organo-tio insekticidima čijom transformacijom



nastaju (Tabela 18). Analizirani proizvodi hidrolize malationa-dietil-maleat, O,O-dimetil-tiofosfat i O,O,S-trimetil-fosforodionat, diazinona i hlorthiokvina -IMP i THP, u koncentracijama ispod 10 mM, nisu doveli do značajnog pada FIA signala (< 10%) (Slike 31 i 32, Tabele 17 i 18). Prisustvo proizvoda nastalih usled raskidanja kovalentne veze u molekulu organo-tiofosfata i/ili okso, odnosno izo analoga nije moguće detektovati AChE biosenzorom [189, 198].

Iako FIA sistem na bazi imobilizovane AChE nije osetljiviji od neprotičnog *in vitro* bioeseja koji sadrži slobodan enzim, prednost protičnog sistema je njegova ekonomičnost. Naime, imobilizovani enzim je moguće regenerisati oksimskim reaktivatorima nakon inhibicije, a i stabilnost enzima je veća nakon imobilizacije. Zato, jednom imobilizovani enzim se može koristiti više puta i očuvati aktivnost tokom tri meseci ukoliko se pravilno čuva.

#### **4.4. Toksični efekti fotodegradiranog diazinona**

Jedan od načina uklanjanja insekticida i drugih organskih zagađivača tokom prečišćavanja voda je njihova fotolitička razgradnja delovanjem UV zračenja [138, 146, 199]. Cilj ovih AOP procesa je degradacija i detoksikacija organskih jedinjenja. Međutim, degradacija polaznih jedinjenja može biti praćena nastajanjem znatno toksičnijih proizvoda, koji se ciljano ne analiziraju analitičkim tehnikama. Jedan od načina detekcije toksičnih proizvoda nakon tretmana i procene efikasnosti detoksikacije polaznih zagađivača je analiza primenom bioanalitičkih metoda. Kao odgovor na prisustvo toksičnog jedinjenja, dolazi do promene nekog parametra u zavisnosti od primenjenog bioeseja [157] (poglavlje 2.5). U cilju ispitivanja stepena detoksikacije diazinona tokom tretmana sa UV svetlošću, analiziran je sastav ozračenog diazinona i njegovi neurotoksični, genotoksični i citotoksični efekti, kao i prooksidativna svojstva. U tom cilju, ispitan je uticaj ozračenih rastvora diazinona, samog diazinona i proizvoda njegove degradacije, IMP na aktivnost AChE, Na,K-ATPaze, sadržaj MDA, učestalost mikronukleusa i indeks ćelijske proliferacije. Sistemi u kojima su parametri toksičnosti ispitivani su: kultivisane ćelije humane krvi - limfociti i eritrociti, humane fibroblasti, kao i prečišćeni, komercijalno dostupni enzimski preparati AChE i Na,K-ATPaze.

#### **4.4.1 Kvalitativna i kvantitativna analiza proizvoda fotohemijski ozračenih rastvora diazinona**

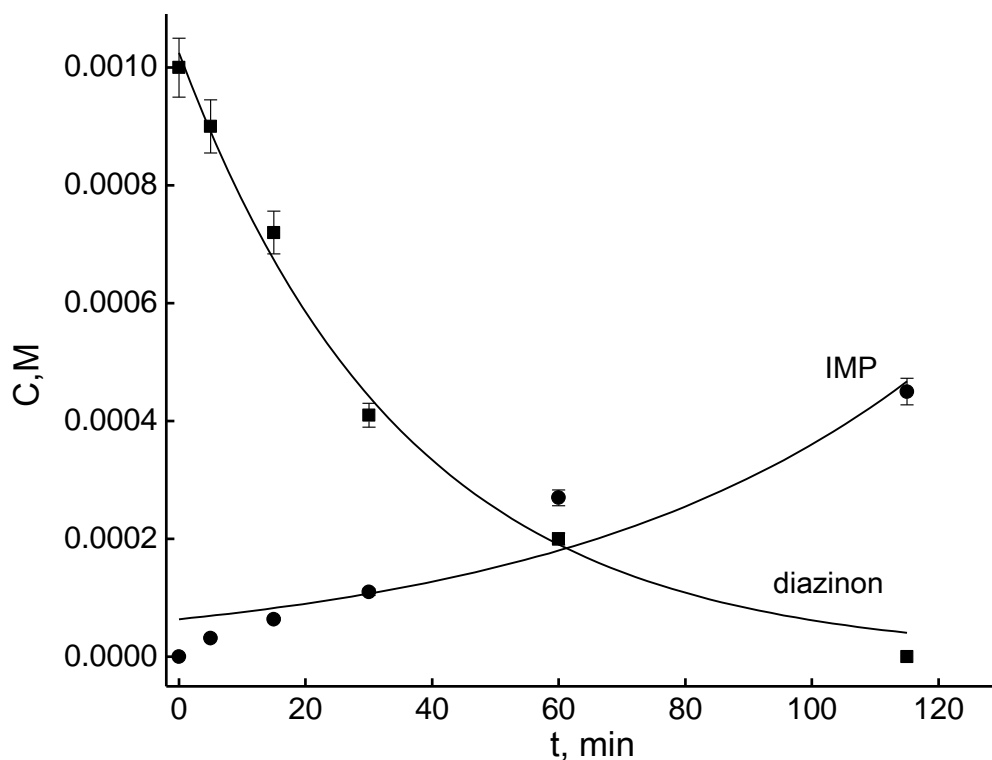
Apsorpcioni spektri diazinona, proizvoda njegove oksidacije, diazoksona, i proizvoda kovalentnog raskidanja P-O veze, IMP, ukazuju na jaku apsorpciju u opsegu talasnih dužina od 200 do 280 nm (Slika P6). Ova činjenica ukazuje da ova jedinjenja poseduju mogućnost fotolitičkog razlaganja pod dejstvom svetlosti talasnih dužina ispod 280 nm. Ozračeni rastvori diazinona, tretirani sa UV svetlošću tokom 0, 5, 15, 30, 60 i 115 minuta su analizirani hromatografskom metodom pomoću UPLC-UV/Vis sistema pod uslovima opisanim u poglavljima 3.11.1 i 3.11.2. Identifikacija diazinona, diazoksona i IMP tokom fotolitičkih eksperimenata je zasnovana na retencionim vremenima pripremljenih standardnih rastvora jedinjenja poznatih koncentracija. Koncentracije identifikovanih jedinjenja su određene iz standardnih pravih datih u prilogu (Slika P1). Koncentracije diazinona i proizvoda njegove transformacije, diazoksona i IMP, formiranih tokom izlaganja UV zracima 1 mM rastvora diazinona kao funkcija vremena ozračivanja su prikazane u Tabeli 19.

**Tabela 19.** Koncentracije proizvoda formiranih tokom izlaganja  $1,0 \times 10^{-3}$  M diazinona UV svetlosti kao funkcija vremena zračenja.

Vreme zračenja,			
min	Diazinon, M	Diazokson, M	IMP, M
0	$1,0 \times 10^{-3}$	-	-
5	$9,0 \times 10^{-4}$	$3,8 \times 10^{-6*}$	$3,2 \times 10^{-5}$
15	$7,2 \times 10^{-4}$	$2,1 \times 10^{-6*}$	$6,4 \times 10^{-5}$
30	$4,1 \times 10^{-4}$	-	$1,1 \times 10^{-4}$
60	$2,0 \times 10^{-4}$	-	$2,7 \times 10^{-4}$
115	-	-	$4,5 \times 10^{-4}$

\*jedinjenje identifikovano na osnovu inhibicionih krivih AChE dobijenih u prisustvu ozračenih rastvora diazinona i različitih koncentracija diazoksiona (Slike 37 i 41)

Rezultati dobijeni UPLC analizom pokazuju da je polazno (*parent*) tretirano jedinjenje potpuno degradirano posle 115 minuta delovanja UV svetlosti. Proizvod hidrolitičke razgradnje diazinona, IMP je primećen već nakon 5 minuta ozračivanja ( $3,2 \times 10^{-5}$  M), a dostigao je maksimalnu koncentraciju na kraju eksperimenta, kada je 45% ozračenog polaznog diazinona konvertovano u IMP. Na Slici 33 su prikazani eksponencijalni pad koncentracije diazinona i eksponencijalni rast koncentracije IMP u ozračenim rastvorima diazinona, sa produžavanjem vremena delovanja UV svetlosti.



**Slika 33.** Eksponencijalni pad koncentracije diazinona i rast koncentracije IMP tokom izlaganja 1 mM rastvora diazinona UV zracima.

Hromatogrami dobijeni UPLC analizom ozračenih rastvora nisu ukazivali na prisustvo diazoksiona. Zapravo, nisu uočeni jasni pikovi na retencionom vremenu standardnog rastvora diazoksiona. Međutim, inhibiciona kriva prečišćene AChE iz humanih eritrocita za ozračene rastvore diazinona (finalna koncentracija neozračenog diazinona ( $t=0$  min) u enzimskoj smeši je  $2 \times 10^{-5}$  M) (Slika 41) ukazivala je na prisustvo jakog inhibitora u rastvorima diazinona tretiranim 5 i 15 minuta (% aktivnosti enzima je 48%, odnosno 67%), što se svakako nije moglo pripisati inhibitornom uticaju samog diazinona. Ukoliko se pretpostavi da pad aktivnosti AChE potiče od formiranog diazoksiona, inhibicione krive za različite koncentracije diazoksiona (Slika 37) ukazuju na nastajanje  $3,8 \times 10^{-6}$  i  $2,1 \times 10^{-6}$  M diazoksiona posle 5, odnosno 15 minuta fototretmana 1 mM diazinona (Tabela 19).

GC/MS analizom je dobijeno opadanje visine pika diazinona u ozračenim rastvorima tokom fotodegradacije. Hromatogrami su dati u prilogu (Slika P8). Za analizu su korišćeni standardni rastvori diazinona i diazoksiona, dok standardni rastvor

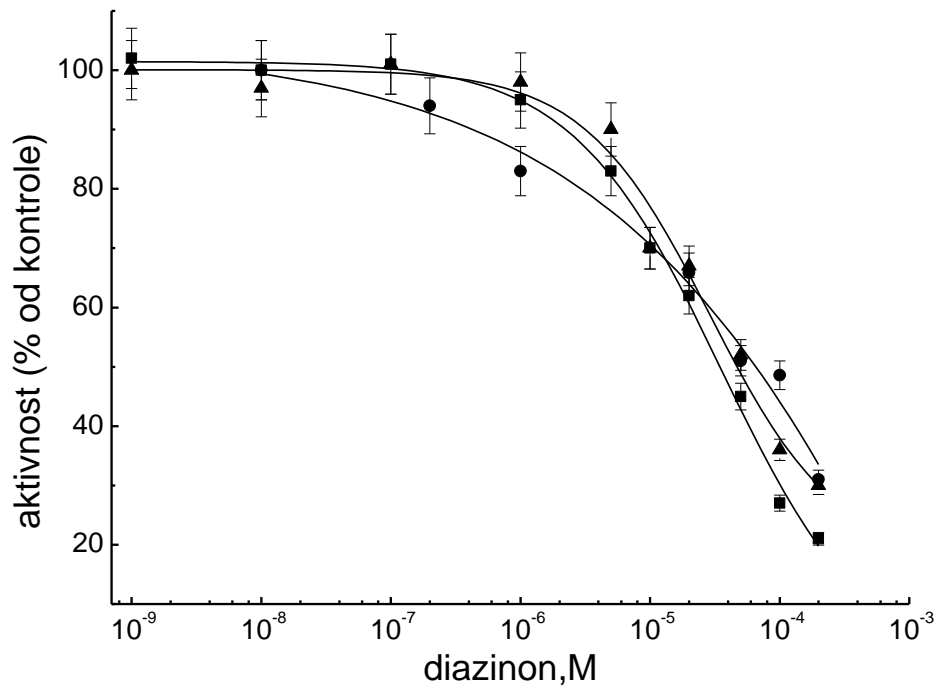
IMP nije davao odgovarajući pik pri datim uslovima analize (poglavljje 3.11.2). U ozračenim rastvorima nije uočen pik diazoksiona.

Analiziranjem vrednosti prikazanih u Tabeli 19, može se uočiti da je suma koncentracija diazinona, diazoksiona i IMP u svakom momentu fotodegradacije manja od početne koncentracije diazinona. Ovaj podatak ukazuje na prisustvo drugih jedinjenja, koja nisu detektovana, u ozračenim smešama [196].

#### **4.4.2 Uticaj diazinona i njegovih ozračenih rastvora na aktivnost enzima**

##### **4.4.2.1 Uticaj diazinona na aktivnost Na,K-ATPaze**

Najpre je ispitan uticaj različitih koncentracija čistog rastvora diazinona na aktivnost Na,K-ATPaze u humanim limfocitima, eritrocitima i fibroblastima, koje su kultivisane tokom 72 sata u odsustvu (kontrola) i prisustvu diazinona u opsegu koncentracija od  $1 \times 10^{-9}$  –  $2 \times 10^{-4}$  M. Specifične aktivnosti enzima u korišćenim model sistemima su određivane prema proceduri opisanoj u poglavljima 3.7.2.1 i 3.7.2.2. Dobijeni rezultati su prikazani na Slici 34 i pokazuju dozno-zavisnu inhibiciju aktivnosti Na,K-ATPaze u prisustvu diazinona u svim ispitivanim ćelijama. Zavisnost aktivnosti enzima, izražene kao procenat od kontrolne vrednosti, od koncentracije diazinona odgovara sigmoidalnoj funkciji u svim slučajevima (Slika 34).



**Slika 34.** Inhibicija aktivnosti Na,K-ATPaze u fibroblastima (kvadrati), limfocitima (trouglovi) i eritrocitima (krugovi) izazvanama različitim koncentracijama diazinona.

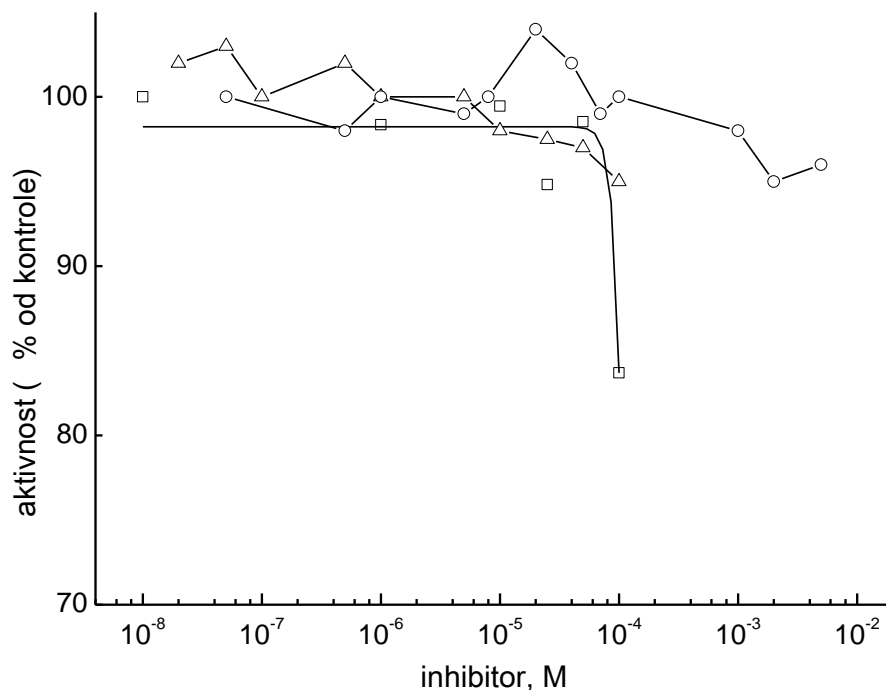
Koncentracije inhibitora koje umanjuju aktivnost enzima za 50% (IC<sub>50</sub> vrednosti diazinona) su određene iz sigmoidne zavisnosti eksperimentalno dobijenih rezultata i prikazane su u Tabeli 20.

**Tabela 20.** Uticaj diazinona na aktivnost Na,K-ATPaze u različitim humanim ćelijama posle 72 sata izlaganja.

Tkivo	Specifična aktivnost (kontrola), $\mu\text{mol P}_i/\text{h}/\text{mg}$ protein	$\text{IC}_{50}$ (M)
Fibroblasti	1,1	$3,4 \times 10^{-5}$
Eritrociti	0,2	$6,6 \times 10^{-5}$
Limfociti	0,1	$4,6 \times 10^{-5}$

Rezultati u Tabeli 20 pokazuju približne  $\text{IC}_{50}$  vrednosti za sva tri ispitivana model sistema ( $\approx 5,0 \times 10^{-5}$  M), što kazuje na sličnu osetljivost Na,K-ATPaze u tretiranim fibroblastima, eritrocitima i limfocitima prema diazinonu.

Kako bi se utvrdilo da li inhibicija Na,K-ATPaze diazinonom u humanim ćelijama potiče od specifičnog vezivanja organofosfata za enzim, prečišćena komercijalno dostupna Na,K-ATPaza izolovana iz korteksa svinje (referentni model sistem) je *in vitro* izlagana različitim koncentracijama diazinona ( $1 \times 10^{-9}$  –  $2 \times 10^{-4}$  M). Opis eksperimenta je dat u poglavlju 3.7.2. Takođe, inhibitorne moći diazoksone i IMP (proizvoda fotodegradacije diazinona) prema Na,K-ATPazi su testirane na ovom referentnom model sistemu. Dobijeni rezultati su prikazani na Slici 35 kao zavisnost preostale aktivnosti enzima (% od kontrole) od koncentracije insekticida, odnosno proizvoda transformacije. Eksperimentalno dobijene vrednosti pokazuju da je aktivnost prečišćene Na,K-ATPaze nepromenjena u prisustvu koncentracija diazinona, kao i diazoksone i IMP, manjih od  $1 \times 10^{-4}$  M [196]. Na osnovu ovih rezultata se može zaključiti da se organofosfati ne vezuju direktno za enzim, već je njihov inhibicioni uticaj u humanim tkivima posledica indirektnog, nespecifičnog poremećaja strukture, odnosno aktivnosti Na,K-ATPaze [200, 201].

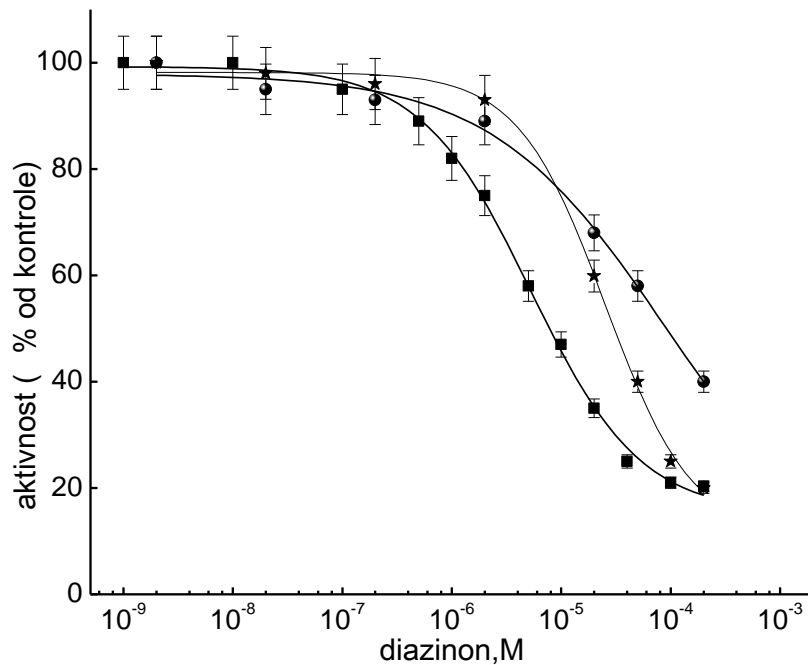


**Slika 35.** Inhibicija aktivnosti komercijalne prečišćene Na,K-ATPaze izazvane različitim koncentracijama diazinona (kvadrati), diazoksona (trouglovi) i IMP (krugovi).

#### 4.4.2.2 Uticaj diazinona na aktivnost acetilholinesteraze

Ispitan je i uticaj diazinona na specifičnu aktivnost AChE u humanim fibroblastima, limfocitima i eritrocitima kultivisanim tokom 72 sata, kao i na aktivnost komercijalno dostupne, prečišćene AChE iz humanih eritrocita. Postupak je opisan u poglavlju 3.7.1. Dobijena koncentraciono zavisna inhibicija u svim ispitivanim ćelijama, izazvana diazinonom u opsegu koncentracija od  $1 \times 10^{-9}$  –  $2 \times 10^{-4}$  M, prikazana je na Slici 36. Eksperimentalne vrednosti su fitovane sigmoidnom funkcijom iz koje su određene  $IC_{50}$  vrednosti i prikazane u Tabeli 21.





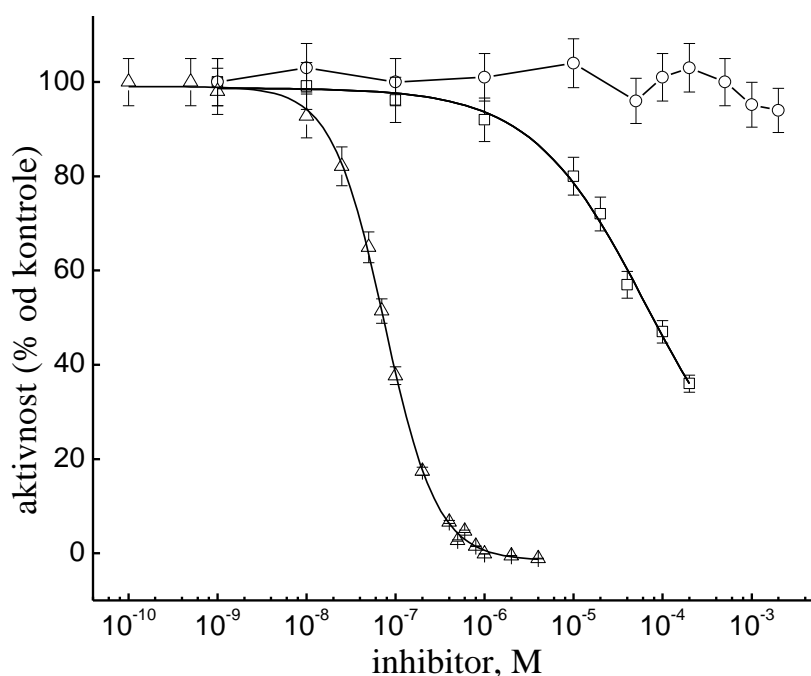
**Slika 36.** Inhibicija aktivnosti AChE u fibroblastima (kvadrati), limfocitima (zvezde) i eritrocitima (krugovi) izazvanama različitim koncentracijama diazinona.

**Tabela 21.** Uticaj diazinona na aktivnost AChE u humanim fibroblastima, eritrocitima i limfocitima posle 72 sata izlaganja.

Tkivo	Specifična aktivnost	
	(kontrola), $\Delta A_{412}/\text{min}/\text{mg}$ protein	$IC_{50}$ (M)
Fibroblasti	0,109	$7,5 \times 10^{-6}$
Eritrociti	0,518	$8,7 \times 10^{-5}$
Limfociti	0,929	$3,0 \times 10^{-5}$

Vrednosti iz Tabele 21 ukazuju na najveću osetljivost AChE u fibroblastima ( $IC_{50} = 7,5 \times 10^{-6}$  M), dok je u eritrocitima AChE za jedan red veličine manje osetljiva prema ispitivanom organo-tiofosfatu ( $IC_{50} = 8,7 \times 10^{-5}$  M) [196].

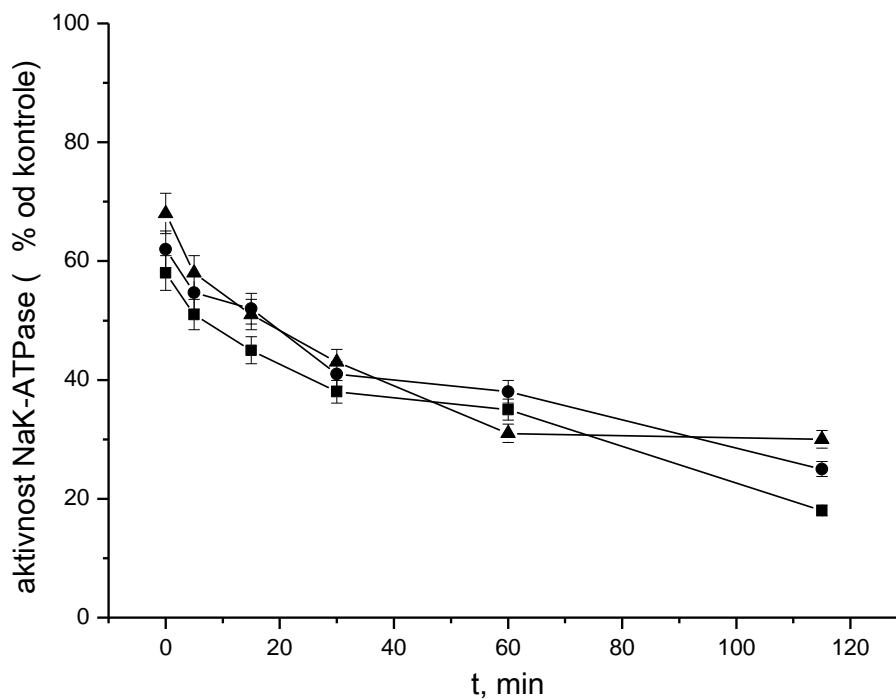
*In vitro* uticaj diazinona na aktivnost AChE je praćen izlaganjem referentnog model sistema (komercijalno dostupan, prečišćen enzim iz humanih eritrocita) ispitivanom jedinjenju u istom opsegu koncentracija. Na istom sistemu su testirani i diazokson i IMP. Dobijena dozno-zavisna inhibicija AChE (Slika 37) pokazuje sličan odgovor u prisustvu diazinona, u poređenju sa inhibicijom dobijenom u kultivisanim humanim eritrocitima. Naime,  $IC_{50}$  vrednost, očitana iz sigmoidne zavisnosti (Slika 37), iznosi  $7,8 \times 10^{-5}$  M, i slična je vrednosti dobijenoj za kultivisane humane eritrocite (Tabela 21). S druge strane, vrednost  $IC_{50}$  za testirani enzim iz fibroblasta je 10 puta niža (Tabela 21) [196].



**Slika 37.** Inhibicija prečišćene AChE iz humanih eritrocita izazvane diazinonom (kvadrati), diazoksonom (trouglovi) i IMP (krugovi).

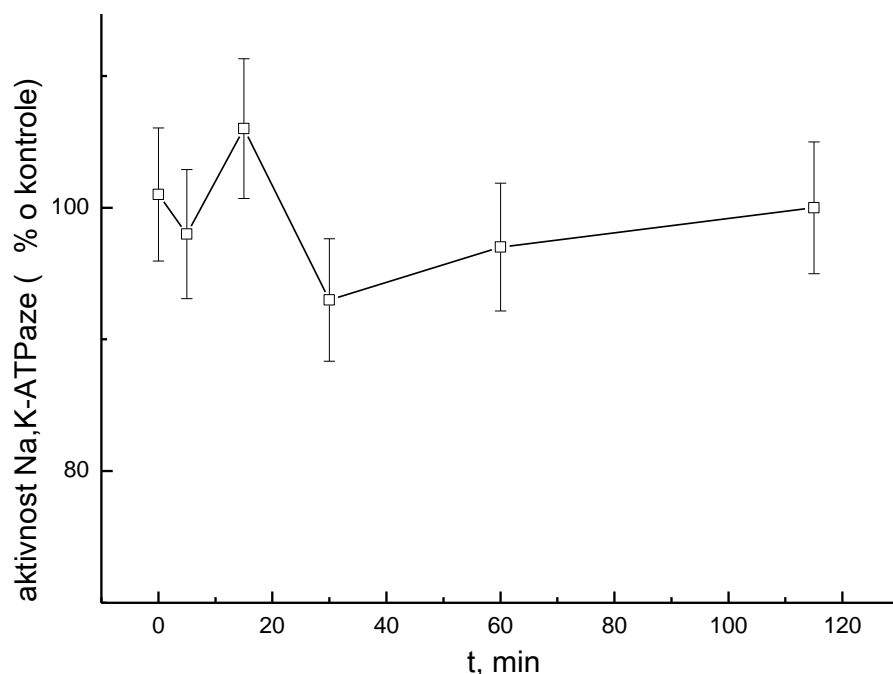
#### 4.4.2.3 Uticaj ozračenih rastvora diazinona na aktivnost Na,K-ATPaze

Uticaj rastvora diazinona, fotohemijski tretiranih tokom 5, 15, 30, 60 i 115 minuta pod uslovima opisanim u poglavlju 3.11, na Na,K-ATPazu je ispitan određivanjem specifične aktivnosti enzima u humanim fibroblastima, eritrocitima i limfocitima. Humani model sistemi su kultivisani tokom 72 sata u prisustvu  $2 \times 10^{-5}$  M rastvora diazinona ( $t = 0$  min), prethodno tretiranih sa UV svetlošću tokom različitih vremenskih perioda. Aktivnost Na,K-ATPaze je određena prema proceduri opisanoj u poglavljima 3.7.2.1 i 3.7.2.2. Na Slici 38 je prikazan uticaj vremena ozračivanja diazinona na inhibiciju Na,K-ATPaze (izražena kao procenat od vrednosti kontrole) u svim model sistemima. Inhibitorna moć ozračenih rastvora diazinona povećava se kao funkcija vremena fotodegradacije u svim ispitivanim ćelijama. Postepeno smanjenje aktivnosti Na,K-ATPaze je dobijeno tokom tokom 115 minuta fotohemijskog tretmana. Prisustvo rastvora tretiranog tokom 115 minuta, koji sadrži samo IMP (Tabela 19) dovelo je do smanjenja aktivnosti enzima za 35-40% u odnosu na početnu aktivnost ( $t = 0$  min), dobijenu u prisustvu neozračenog  $2 \times 10^{-5}$  M rastvora diazinona (Slika 38) [196].



**Slika 38.** Inhibicija aktivnosti Na,K-ATPaze u humanim fibroblastima (kvadrati), limfocitima (trouglovi) i eritrocitima (krugovi) pod uticajem ozračenih rastvora  $2 \times 10^{-5}$  M diazinona tokom različitih vremenskih perioda. Ozračeni rastvori  $1 \times 10^{-3}$  M diazinona (0 min) su razblaženi 50 puta u kulturama krvi i fibroblasta.

*In vitro* uticaj fotohemijjskog tretmana na aktivnost Na,K-ATPaze je praćen izlaganjem komercijalnog prečišćenog enzima iz cerebralnog korteksa svinje ozračenim rastvorima  $2 \times 10^{-5}$  M diazinona. Dobijeni rezultati (Slika 39) pokazuju da se preostala aktivnost enzima (% od kontrole) kreće od 93-105% u prisustvu ozračenih rastvora, koji sadrže diazinon i/ili proizvode njegove degradacije.



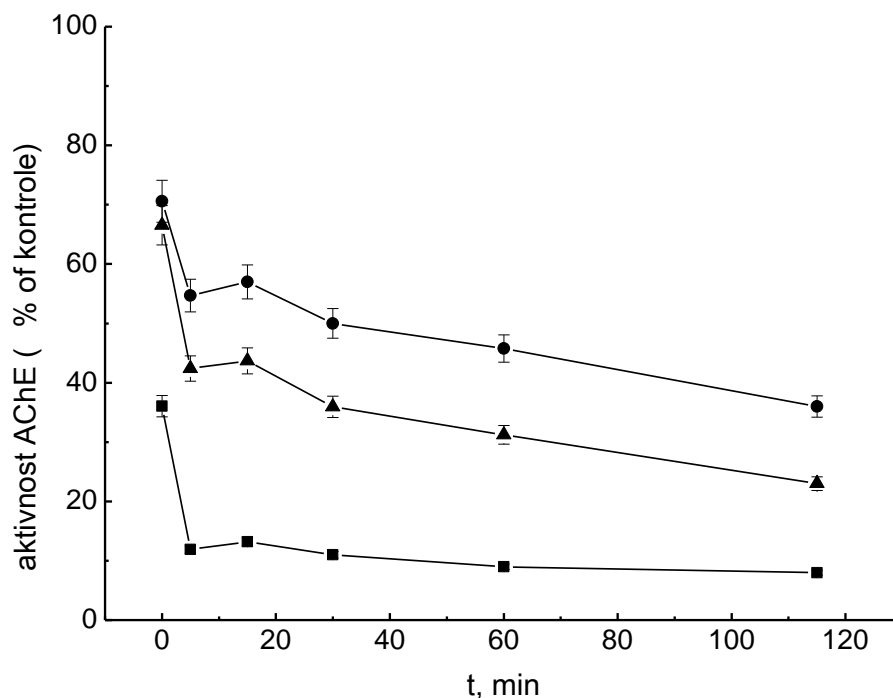
**Slika 39.** Uticaj vremena ozračivanja  $2 \times 10^{-5}$  M fototretiranog rastvora diazinona na aktivnost prečišćene komercijalne Na,K-ATPaze.

Očuvanje aktivnosti prečišćene Na,K-ATPaze u prisustvu fotodegradiranih rastvora diazinona (Slika 39) ukazuje da se diazinon, odnosno proizvodi njegove transformacije ne vezuju direktno za neko mesto u molekulu enzima, što bi izazvalo poremećaj aktivnosti. Pad aktivnosti Na,K-ATPaze u kultivisanim ćelijskim sistemima (Slika 38) mogao bi biti posledica posrednog dejstva fotodegradiranog organo-tiofosfata preko slobodnih radikala [196, 201]. Ova pretpostavka će biti istražena praćenjem delovanja diazinona i fotodegradiranih rastvora na produkciju MDA, indikatora oksidativnog stresa, u tretiranim kulturama.

#### 4.4.2.4 Uticaj ozračenih rastvora diazinona na aktivnost acetilholinesteraze

Ispitan je uticaj fotohemijski tretiranog diazinona na specifičnu aktivnost AChE u humanim fibroblastima, eritrocitima i limfocitima kultivisanim 3 dana u odsustvu (kontrola) i prisustvu ozračenih rastvora  $2 \times 10^{-5}$  M diazinona. Praćenje aktivnosti AChE je opisano u poglavlju 3.7.1. Slika 40 pokazuje da se inhibitorski efekat ozračenih rastvora diazinona povećava kao funkcija vremena fotodegradacije u svim ispitivanim

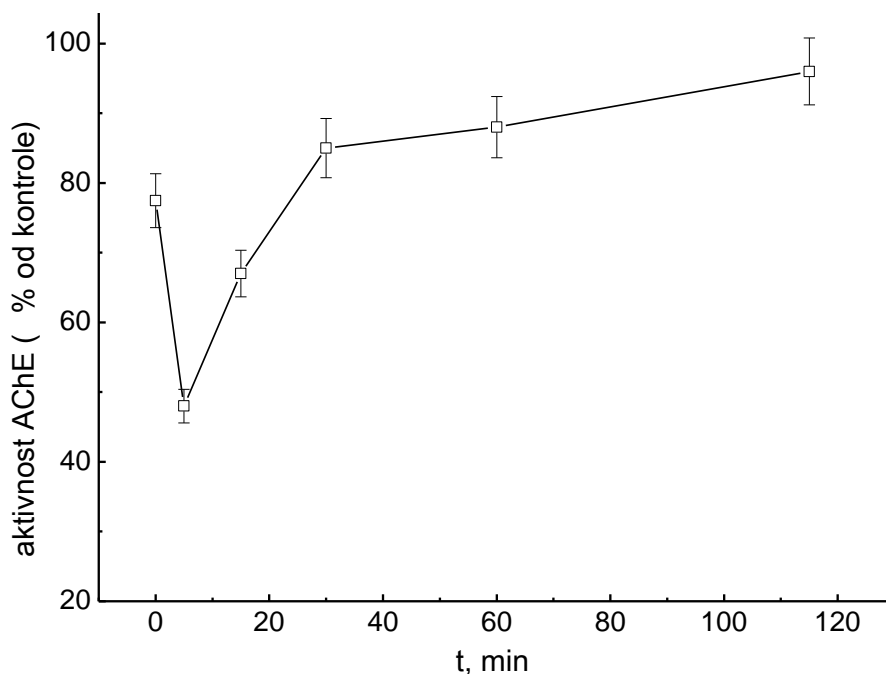
ćelijama. Rastvor diazinona koji je 5 minuta izlagan UV svetlosti uzrokovao je značajno smanjenje aktivnosti enzima (oko 25%) u odnosu na neozračeni (0 min)  $2 \times 10^{-5}$  M rastvor diazinona. Tokom narednih 110 minuta fotohemijskog tretmana diazinona primećen je postepen, sporiji pad aktivnosti AChE (Slika 40).



**Slika 40.** Inhibicija aktivnosti AChE u humanin fibroblastima (kvadrati), limfocitima (trouglovi) i eritrocitima (krugovi) u u zavisnosti od vremena izlaganja UV svetlosti  $2 \times 10^{-5}$  M rastvora diazinona. Ozračeni rastvori  $1 \times 10^{-3}$  M diazinona (0 min) su razblaženi 50 puta u kulturama krvi i fibroblasta.

Ispitan je i uticaj fotohemijskog tretmana na inhibitornu moć diazinona prema prečišćenju AChE, organo-tiofosfatnog insekticida koji se specifično vezuje za aktivno mesto enzima i na taj način blokira njenu aktivnost [40]. Kao model sistem je uzeta prečišćena AChE iz humanih eritrocita, komercijalno dostupna, koja je izlagana rastvorima diazinona prethodno tretanim sa UV svetlošću tokom 0, 5, 15, 30 i 115 minuta. Koncentracija početnog neozračenog rastvora (0 min) je  $2 \times 10^{-5}$  M. Dobijeni rezultati (Slika 41) pokazuju maksimalno povećanje inhibitorne moći rastvora koji su

tretirani tokom 5 minuta. Međutim, produžavanje vremena ozračivanja je praćeno povećanjem aktivnosti AChE, a posle 115 minuta ozraćeni rastvor, u kome je detektovan samo IMP (Tabela 19), nije značajno uticao na aktivnost enzima (96% od kontrole) (Slika 41) [196].



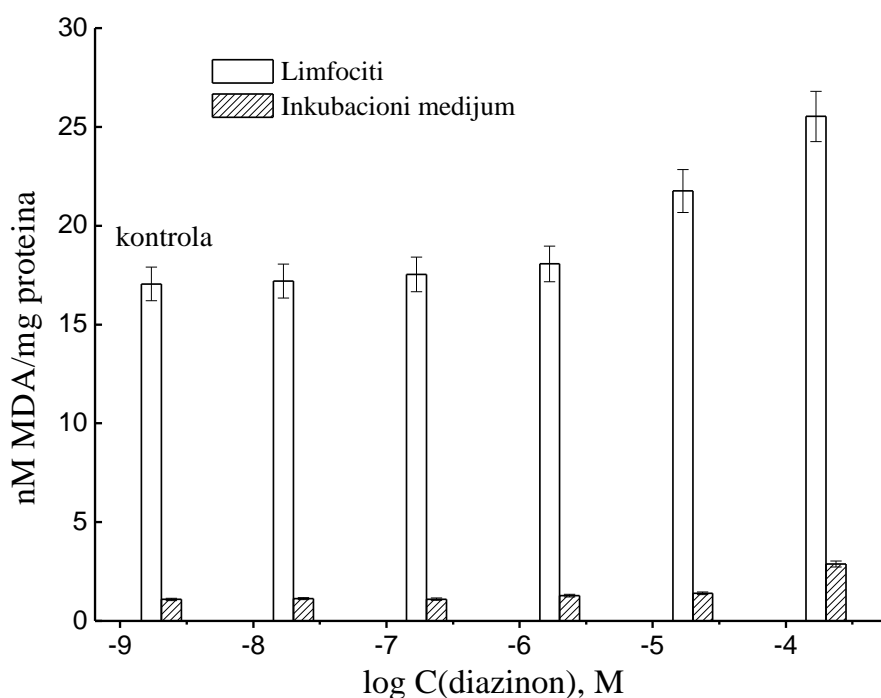
**Slika 41.** Zavisnost aktivnosti AChE od vremena fotodegradacije  $2 \times 10^{-5}$  M rastvora diazinona.

#### 4.4.3 Proksidativne osobine diazinona i proizvoda njegove fotodegradacije

##### 4.4.3.1 Uticaj diazinona i 2-izopropil-6-metil-4-pirimidinola na sadržaj malondialdehida u humanim limfocitima

Sadržaj MDA, indikatora lipidne peroksidacije izazvane povećanom koncentracijom ROS, je određen u limfocitima prethodno kultivisanim u odsustvu (kontrola) i prisustvu rastvora čistog diazinona i IMP različitih koncentracija. Pripremljeni rastvori diazinona i IMP su u opsegu koncentracija  $2 \times 10^{-8}$  -  $2 \times 10^{-4}$  M. Postupak pripreme limfocita i merenja sadržaja MDA je opisan u poglavljima 3.5 i 3.8.

Dobijeni rezultati (Slika 42) pokazuju da ispitivane koncentracije diazinona niže od  $2 \times 10^{-6}$  M ne utiču primetno ( $p > 0,05$ ) na promenu sadržaja MDA (u odnosu na vrednost sadržaja MDA za kontrolu) ni u limfocitima ni u inkubacionom medijumu. U limfocitima, kao i u inkubacionom medijumu, tretiranim sa  $2 \times 10^{-4}$  M rastvorom diazinona izmereno je povećanje sadržaja MDA za 1,5, odnosno 2,8 puta u odnosu na kontrolu (Slika 42).

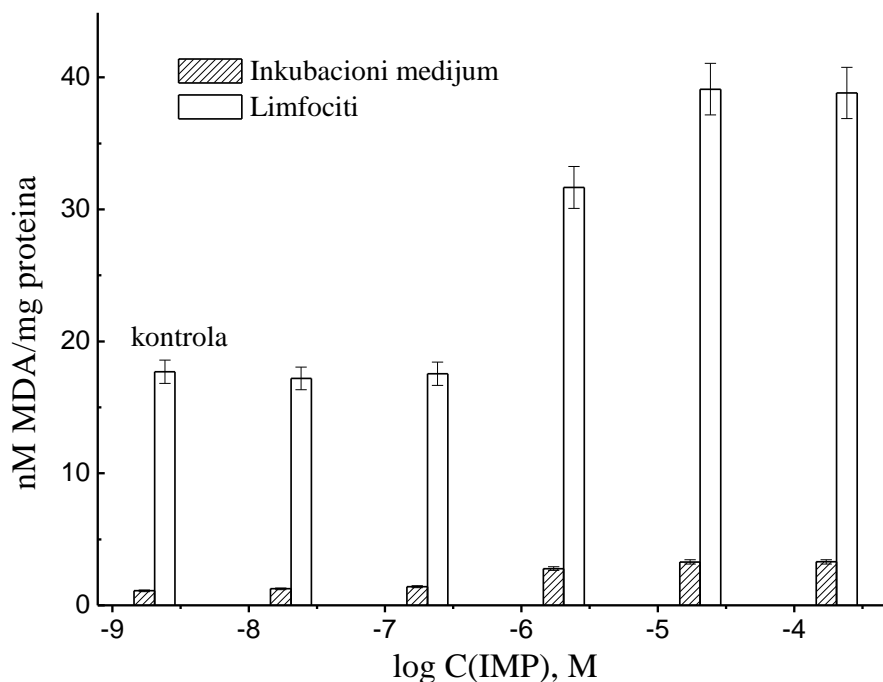


**Slika 42.** Sadržaj MDA u limfocitima i inkubacionom medijumu posle izlaganja različitim koncentracijama diazinona.

Kako bi se uporedile prooksidativne osobine diazinona i proizvoda formiranog tokom njegove fotodegradacije, IMP, kulture krvi su tretirane različitim koncentracijama IMP. Sadržaj MDA, proizvoda lipidne peroksidacije, u limfocitima je izmeren i prikazan na Slici 43 u funkciji od koncentracije IMP. IMP takođe dovodi do povećanja MDA, i u limfocitima i u inkubacionom medijumu, na dozno-zavisano način. Sadržaj MDA u limfocitima, u prisustvu rastvora IMP koncentracija iznad  $2 \times 10^{-6}$  M, je za 50-80% veći (statistički značajan,  $t = 11,32$ ,  $p = 0,008$ ) od vrednosti MDA dobijenih pri istim



koncentracijama diazinona. Pojačana prooksidativna svojstva IMP su primećena i analizom dobijenih vrednosti za inkubacioni medijum (Slika 43) [196].

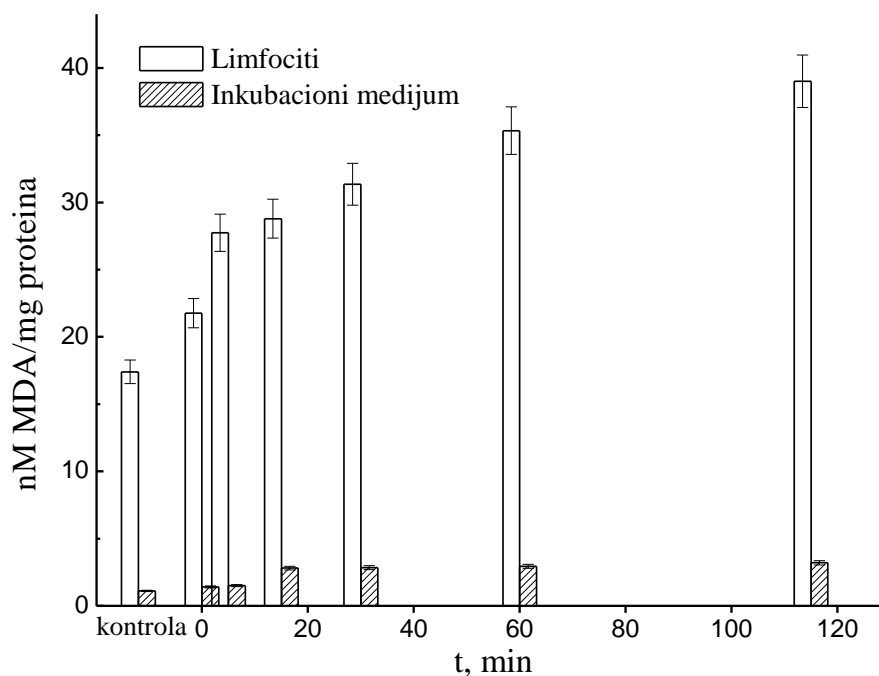


**Slika 43.** Sadržaj MDA u limfocitima i inkubacionom medijumu tretiranim sa različitim koncentracijama IMP.

#### 4.4.3.2 Uticaj ozračenih rastvora diazinona na sadržaj malondialdehida u humanim limfocitima

Ispitan je i uticaj fotohemijjskog tretmana na sposobnost diazinona da izaziva povećenu produkciju slobodnih radikala, koja bi mogla biti uzrok nespecifičnih toksičnih efekata ispitivanog organo-tiofosfata. Stoga, humana krv je kultivisana tokom 3 dana u odsustvu (kontrola) i prisustvu rastvora diazinona ozračenih tokom 0, 5, 15, 30, 60 i 115 minuta. Koncentracija netretiranog (0 min) rastvora diazinona u medijumu je  $2 \times 10^{-5}$  M. Sadržaj MDA je određen u izdvojenim limfocitima i inkubacionom medijumu na način opisan u poglavljima 3.5 i 3.8. Iz dobijenih rezultata, prikazanih na Slici 44, može se uočiti postepeno povećanje sadržaja MDA (statistički značajno,  $t = -3,22$ ,

$p = 0,018$ ) sa produženjem vremena ozračivanja diazinona, uz dostizanje maksimalne vrednosti na kraju tretmana. Vrednost za MDA posle najdužeg ispitivanog vremena fotodegradacije je oko 2 puta veća, u poređenju sa sadržajem MDA dobijenim u prisustvu neozračenog ( $t = 0$  min) diazinona i za kontrolu (Slika 44) [196].



**Slika 44.** Sadržaj MDA u limfocitima i inkubacionom medijumu nakon izlaganja ozračenim rastvorima  $2 \times 10^{-5}$  M diazinona u zavisnosti od vremena delovanja UV svetlosti.

#### 4.4.4 Genotoksični i citotoksični efekti diazinona i proizvoda njegove fotodegradacije

##### 4.4.4.1 Genotoksični i citotoksični efekti diazinona i 2-izopropil-6-metil-4-pirimidinola

Genotoksični efekti diazinona i identifikovanog proizvoda njegove fotodegradacije, IMP su procenjeni na osnovu eksperimentalno određenih vrednosti učestalosti mikronukleusa (MN), kao indikatora izazvanih genomskih ozleda, u kulturama limfocita

i fibroblasta prethodno tretiranih sa različitim koncentracijama organo-tiofosfata, odnosno proizvoda razgradnje. Eksperimentalna procedura je opisana u poglavljima 3.5, 3.6 i 3.9.1. Kao parametar citotoksičnog uticaja ispitivanih jedinjenja uzeta je vrednost indeksa (potencijala) ćelijske proliferacije, CBPI (poglavlje 3.9.2) koja je indikator rasta ćelija. Rezultati dobijeni u opsegu koncentracija ispitivanih jedinjenja od  $2 \times 10^{-8}$  –  $2 \times 10^{-4}$  M su prikazani u Tabeli 22.

**Tabela 22.** Učestalost mikronukleusa i indeks ćelijske proliferacije u humanim limfocitima i fibroblastima tretiranim sa različitim koncentracijama diazinona i IMP.

Koncentracija, M	kontrola	$2 \times 10^{-8}$	$2 \times 10^{-7}$	$2 \times 10^{-6}$	$2 \times 10^{-5}$	$2 \times 10^{-4}$
<b>Diazinon</b>						
<i>Limfociti</i>						
MN/1000 BN ćelija	4,61	10,18	14,07	15,04	12,9	-
CBPI	1,53	1,42	1,35	1,27	1,26	-
<i>Fibroblasti</i>						
MN/1000 ćelija	3,50	9,20	11,10	12,30	9,10	-
CBPI	1,32	1,31	1,26	1,26	1,31	-
<b>IMP</b>						
<i>Limfociti</i>						
MN/1000 BN ćelija	4,61	10,21	11,75	20,95	20,21	18,63
CBPI	1,53	1,40	1,31	1,27	1,20	1,19
<i>Fibroblasti</i>						
MN/1000 BN ćelija	3,50	8,30	9,20	16,10	15,30	15,10
CBPI	1,32	1,29	1,28	1,18	1,17	1,12

U kulturama limfocita, primećeno je značajno povećanje ( $p < 0,05$ ) učestalosti mikronukleusa, u poređenju sa kontrolom, na dozno-zavisan način u svim uzorcima tretiranim i sa diazinonom i IMP u ispitivanom opsegu koncentracija. Štaviše, niske koncentracije oba jedinjenja, ispod  $2 \times 10^{-6}$  M, pokazuju klastogena svojstva koja se

manifestuju kao povećana indukcija mikronukleusa i smanjen potencijal proliferacije. Značajno je istaći da je IMP jači uzročnik nastajanja mikronukleusa od diazinona (Tabela 22), *parent* jedinjenja čijom degradacijom je nastao. Učestalost mikronukleusa dostigla je maksimalnu vrednost delovanjem  $2 \times 10^{-6}$  M ispitivanih jedinjenja, dok je dalje povećanje koncentracija izazvalo smanjenje njene vrednosti i inhibiciju potencijala ćelijske proliferacije. Ova pojava je verovatno posledica smanjenja aktivnosti svih biohemijskih procesa u ćelijama. Koncentraciono-zavisno smanjenje vrednosti CBPI u limfocitima tretiranim sa diazinonom i IMP je statistički značajno ( $t = 4,08$ ,  $p = 0,009$  i  $t = 4,61$ ,  $p = 0,004$ ). Korelacija između vrednosti učestalosti mikronukleusa i CBPI, dobijenih i u prisustvu diazinona i IMP, je inverzna i statistički značajna ( $r = 0,92$ ,  $p = 0,027$  i  $r = 0,93$ ,  $p = 0,008$ ).

U eksperimentima sa fibroblastima, tretiranim sa rastućim koncentracijama diazinona i IMP, dobijen je sličan trend parametara genotoksičnosti i citotoksičnosti (Tabela 22). Učestalost mikronukleusa se značajno povećava na dozno-zavisnan način u fibroblastima u prisustvu diazinona, kao i proizvoda njegove fotodegradacije. Koncentracija  $2 \times 10^{-6}$  M uzrokuje maksimalnu vrednost ovog indikatora genomskih ozleda ( $t = -7,37$ ,  $p = 0,02$  i  $t = -3,12$ ,  $p = 0,035$ ). Vrednosti za CBPI u Tabeli 22 pokazuju značajno smanjenje ( $t = -2,49$ ,  $p = 0,047$ ) proliferacionog potencijala fibroblasta sa povećanjem koncentracije IMP. Međutim, tretman sa diazinonom nije izazvao značajne promene vrednosti CBPI u ispitivanom opsegu koncentracija ( $p > 0,05$ ). Naime, vrednost indeksa proliferacije ćelija fibroblasta gajenih u prisustvu  $2 \times 10^{-6}$  M diazinona je smanjena za oko 5% (u poređenju sa kontrolom), a sa daljim povećanjem doze organo-tiofosfata ostaje skoro nepromenjena (u odnosu na kontrolu).

U kulturama limfocita tretiranim sa IMP, dobijena je pozitivna korelacija između učestalosti mikronukleusa (Tabela 22) i sadržaja MDA (Slika 43) ( $r = 0,91$ ,  $p = 0,03$ ), dok su vrednosti za MDA i CBPI korelirale inverzno (Slika 43, Tabela 22) ( $r = 0,93$ ,  $p = 0,02$ ) [196].

#### 4.4.4.2 Genotoksični i citotoksični efekti ozračenih rastvora diazinona

Uticaj fototretmana diazinona na njegove genotoksične i citotoksične osobine praćen je određivanjem učestalosti mikronukleusa i indeksa ćelijske proliferacije u zavisnosti od vremena ozračivanja diazinona. Naime, ćelije fibroblasta i limfocita su tretirane rastvorima diazinona ozračenim tokom 0, 5, 15, 30, 60 i 115 minuta (poglavlja 3.5 i 3.6). Genotoksični i citotoksični potencijal fotodegradiranih rastvora diazinona je određen na način opisan u poglavljima 3.9.1 i 3.9.2. Eksperimentalno dobijene vrednosti učestalosti mikronukleusa i indeksa proliferacije ćelija u fibroblastima i limfocitima tretiranim sa ozračenim rastvorima diazinona (koncentracija neozračenog rastvora diazinona (0 min) u uzorcima kultura ćelija iznosi  $2 \times 10^{-5}$  M) su prikazane u Tabeli 23.

**Tabela 23.** Učestalost mikronukleusa i indeks ćelijske proliferacije u humanim limfocitima i fibroblastima tretiranim sa ozračenim rastvorima diazinona, u zavisnosti od vremena fotodegradacije (koncentracija početnog, neozračenog rastvora diazinona je  $2 \times 10^{-5}$  M).

Vreme ozračivanja, min	0	5	15	30	60	115
<b><i>Limfociti</i></b>						
MN/1000 BN ćelija	12,90	15,20	21,44	24,22	43,74	49,45
CBPI	1,26	1,20	1,17	1,15	1,11	1,10
MNC+	7	6	5	6	5	5
MNC-	6	8	17	18	39	45
<b><i>Fibroblasts</i></b>						
MN/1000 BN ćelija	9,10	13,00	16,00	17,00	29,00	31,00
CBPI	1,31	1,24	1,22	1,28	1,24	1,20
MNC+	7	6	5	6	5	5
MNC-	2	7	11	11	24	26

Učestalost mikronukleusa u fibroblastima i limfocitima raste sa vremenom fototretmana diazinona (Tabela 23), tokom kojeg se razgrađuje organo-tiofosfat, a nastaje proizvod kovalentnog raskidanja P-O veze, IMP (Slika 33, Tabela 19). Porast indikatora genomskih ozleda je statistički značajan u fibroblastima ( $t = -2,49$ ,  $p = 0,047$ ), dok je u limfocitima na granici značajnosti. U oba tkiva, maksimalne vrednosti MN su uočene nakon tretmana sa rastvorom diazinona prethodno zračenim tokom 115 minuta, u kome je identifikovan samo IMP (Tabela 19). Proliferacioni potencijal ćelija značajno opada

sa produžavanjem vremena ozračivanja diazinona u oba tkiva (limfociti –  $t = 4,35$ ,  $p = 0,005$ ; fibroblasti –  $t = 3,78$ ,  $p = 0,009$ ) (Tabela 23). U kulturama limfocita, statistički značajna inverzna korelacija između vrednosti MN i CBPI je dobijena ( $r = 0,91$ ,  $p = 0,012$ ), dok su vrednosti MDA (Slika 44) i MN u pozitivnoj korelaciji ( $r = 0,94$ ,  $p = 0,005$ ).

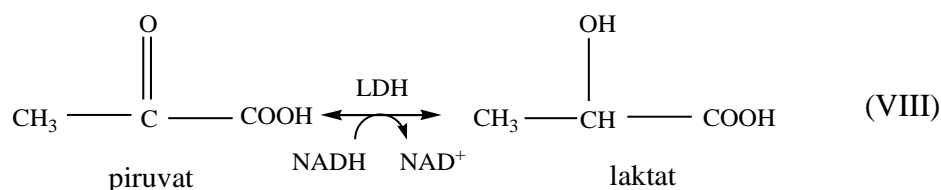
#### 4.5 Toksični efekti diazinona i proizvoda degradacije testirani u sinaptozimima mozga pacova

Toksični efekti diazinona i proizvoda njegove degradacije, diazoksona i IMP su ispitani određivanjem specifične aktivnosti LDH, antioksidantnih enzima (katalaze, GPx i SOD), parametra lipidne peroksidacije i aktivnosti Na,K-ATPaze i AChE u neprečišćenim sinaptozomima pacova soja *Wistar albino*. Postupak pripreme i tretiranja neprečišćenih sinaptozoma opisan je u poglavlju 3.3. Tretman izolovanih sinaptozoma različitim koncentracijama ispitivanih organofosfata je trajao 1h na 37°C.

##### 4.5.1 Citotoksični efekti diazinona i proizvoda njegove degradacije

Citotoksični efekti diazinona i proizvoda njegove oksidacije i hidrolize je testirana merenjem aktivnosti LDH neposredno nakon tretmana sinaptozoma. Specifična aktivnost ovog biomarkera oštećenja je određivana prema proceduri opisanoj u poglavlju 3.7.6.

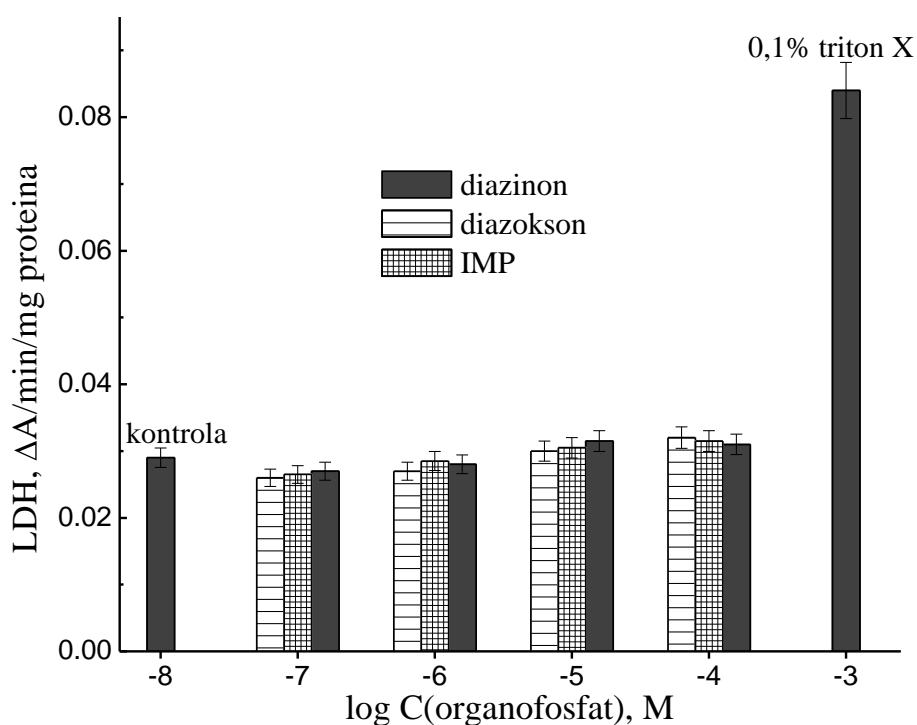
LDH je  $\text{NAD}^+$  oksidoreduktaza koja katalizuje redukciju piruvata u laktat koristeći NADH kao donor vodonika. Reakcija je reverzibilna i kod fiziološkog pH favorizirana je redukcija piruvata u laktat:



Enzim je široko rasprostranjen u životinjama, biljkama i prokariotima. U organizmu čoveka je prisutan u svim ćelijama u različitim količinama, a najviše u ćelijama krvi i



srčanom mišiću. Sastoji se od četiri polipeptidna lanca koji pripadaju tipu H (*heart*) i M (*muscle*). H podjedinica preovladava u tkivima sa povećanom potrošnjom kiseonika, a M u tkivima sa visokom glikolitičkom aktivnošću. LDH je citosolni enzim koji se oslobađa kada je plazma membrana oštećena, zbog čega se koristi kao biomarker citotoksičnosti i citolize [202].



**Slika 45.** Uticaj različitih koncentracija diazinona, diazoksone i IMP na specifičnu aktivnost LDH u sinaptosomima mozga pacova.

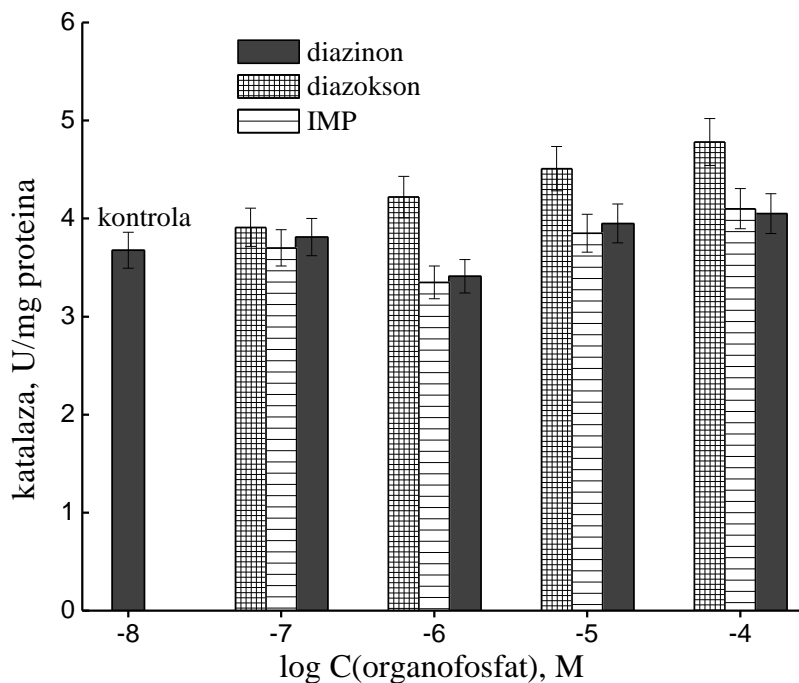
Na Slici 45 su prikazani dobijeni rezultati izraženi kao specifična aktivnost LDH u funkciji od različitih koncentracija ( $1 \times 10^{-7}$  -  $1 \times 10^{-4}$  M) diazinona, diazoksone i IMP. Izmerene vrednosti pokazuju da se aktivnost LDH u prisustvu organofosfata ne razlikuje značajno (najviše 10%) od kontrolne vrednosti dobijene u netretiranim sinaptosomima. To znači da diazinon i njegovi proizvodi degradacije ne dovode do oštećenja plazma membrana tokom 1h tretmana sinaptosoma, odnosno ne pokazuju citotoksično dejstvo. U poređenju sa 0,1% tritonom X koji uzrokuje oštećenje tkiva, što se manifestuje kao

povećana aktivnost LDH usled njenog oslobađanja iz citoplazme, aktivnost enzima u netretiranim i tretiranim uzorcima sinaptozoma je oko 3 puta manja (Slika 45).

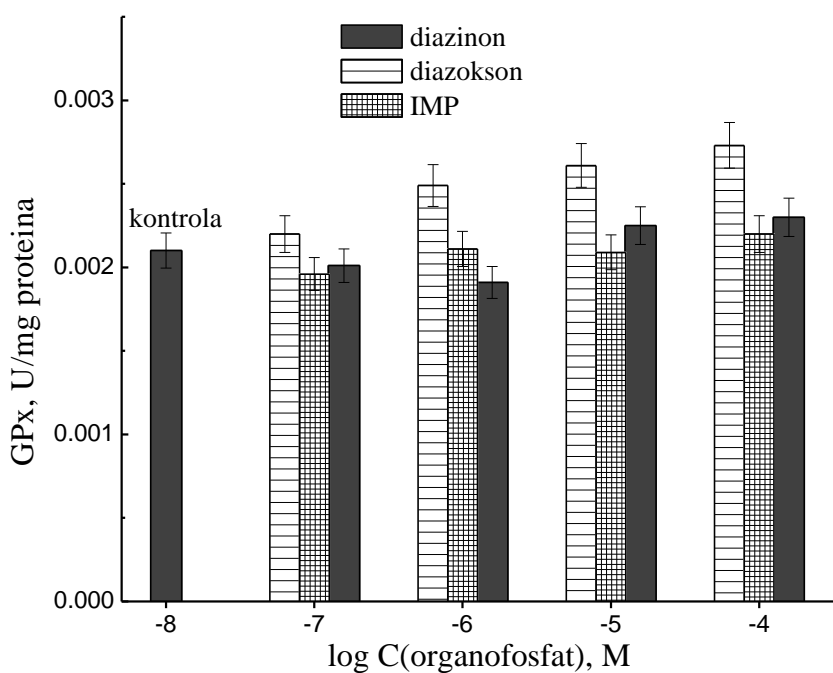
#### **4.5.2 Prooksidativna svojstva diazinona i proizvoda njegove degradacije**

Sposobnost diazinona, diazoksona i IMP da generišu slobodne radikale, i time aktiviraju enzimski sistem antioksidantne zaštite, je određivana merenjem specifične aktivnosti katalaze, GPx i SOD u sinaptozomima nakon tretmana sa organofosfatnim jedinjenjima u opsegu koncentracija  $1 \times 10^{-7}$  -  $1 \times 10^{-4}$  M. Metode za određivanje aktivnosti antioksidantnih enzima su opisane u poglavljima 3.7.3-3.7.5.

Na Slikama 46 i 47 su prikazane dobijene specifične aktivnosti katalaze i GPx, enzima koji kao supstrat koriste vodonik-peroksid, u zavisnosti od koncentracije ispitivanih organofosfata, kao i kontrolna vrednost za netretirane sinaptozome. Rezultati pokazuju da proizvod oksidacije diazinona, diazokson dovodi do najznačajnijeg povećanja aktivnosti katalaze i GPx. Naime, sa povećanjem koncentracije diazoksona dolazi do postepenog rasta aktivnosti i katalaze i GPx, tako da najveća ispitivana koncentracija ( $1 \times 10^{-4}$  M) izaziva za oko 30% veću aktivnost enzima u poređenju sa kontrolnom vrednošću. Za razliku od diazoksona, organo-tiofosfatni analog (diazinon) i proizvod njegove hidrolitičke razgradnje, IMP ne menjaju značajno aktivnost ovih antioksidantnih enzima ( $\pm 10\%$ ) u odnosu na kontrolnu vrednost (Slike 46 i 47).

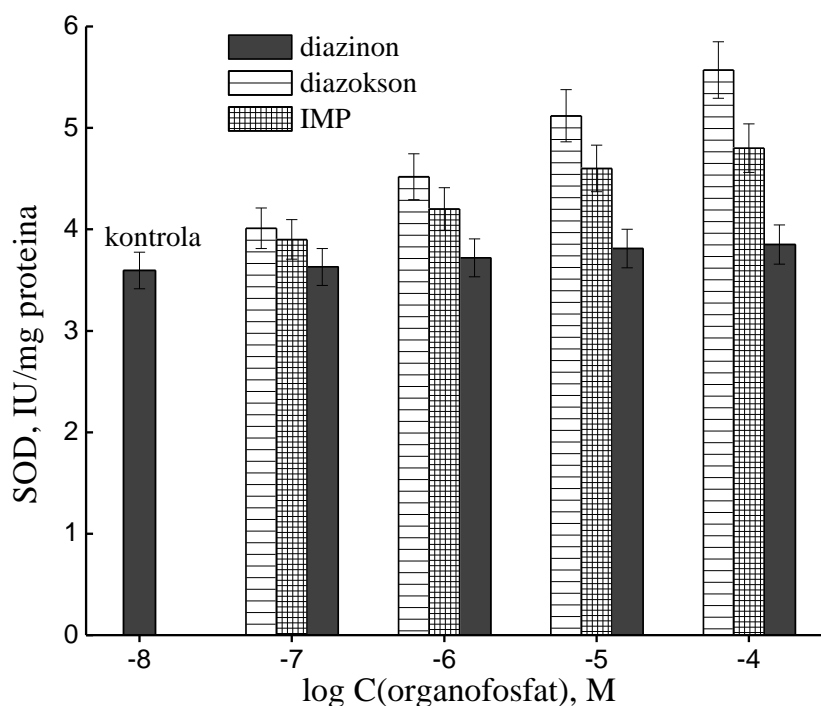


**Slika 46.** Uticaj različitih koncentracija diazinona, diazoksona i IMP na specifičnu aktivnost katalaze u sinaptozomima mozga pacova.



**Slika 47.** Uticaj različitih koncentracija diazinona, diazoksona i IMP na specifičnu aktivnost GPx u sinaptozomima mozga pacova.

Na Slici 48 su prikazani rezultati eksperimentalno određene specifične aktivnosti SOD u netretiranim (kontrola) i tretiranim sinaptozomima. Sa porastom koncentracija ispitivanih organofosfata dolazi do aktivacije SOD, koja katalizuje superoksidni anjon radikal. Najznačajnije povećanje aktivnosti SOD se uočava kod diazoksona, zatim kod IMP, dok je najmanje povećanje dobijeno kod diazinona. Pri najvećoj ispitivanoj koncentraciji (0,1 mM), diazokson povećava aktivnost SOD za 1,55 puta u odnosu na kontrolu, dok diazinon i IMP dovode do povećanja od 10%, odnosno 30% (Slika 48).

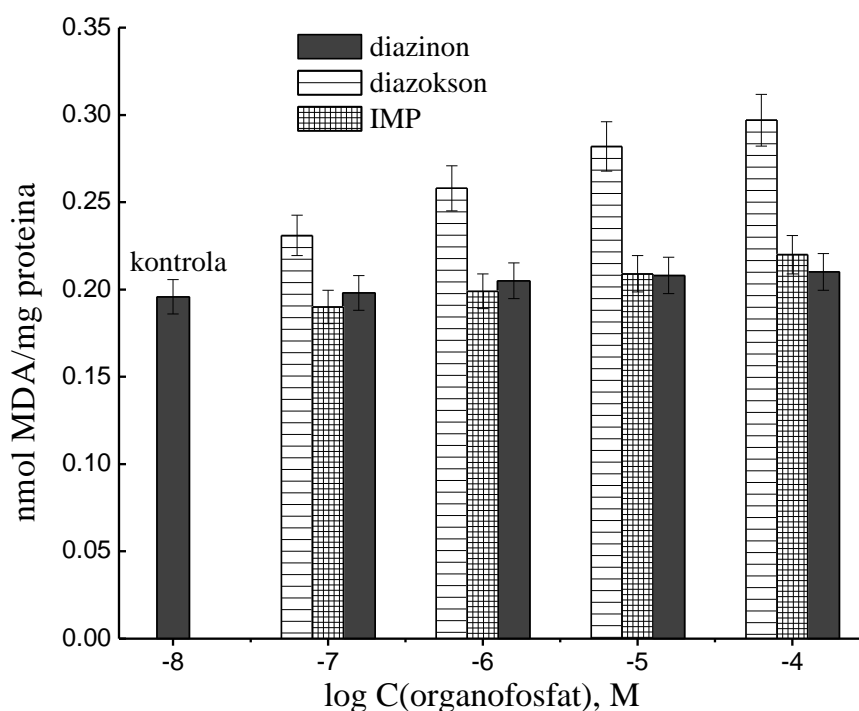


**Slika 48.** Uticaj različitih koncentracija diazinona, diazoksona i IMP na specifičnu aktivnost SOD u sinaptozomima mozga pacova.

#### 4.5.3 Uticaj diazinona i proizvoda njegove degradacije na lipidnu peroksidaciju

Uticaj diazinona, diazoksona i IMP na lipidni status membrane sinaptozoma je ispitivan određivanjem sadržaja MDA u sinaptozomima nakon 1h tretmana u opsegu koncentracija organofosfata od  $1 \times 10^{-4}$  -  $1 \times 10^{-7}$  M. Metoda za određivanje sadržaja

MDA je opisana u poglavlju 3.8. Dobijeni rezultati za sva ispitivana jedinjenja i kontrolu (sadržaj MDA u netretiranim sinaptozomima) su prikazani na Slici 49. U slučaju diazinona i IMP, sadržaj MDA se promenio za oko 10% u odnosu na netretirane sinaptozome, pri najvećoj ispitivanoj koncentraciji (0,1 mM). Diazokson se pokazao kao znatno jači uzročnik lipidne peroksidacije. Zapravo, 0,1  $\mu$ M diazoksona povećao je sadržaj MDA za oko 18% u odnosu na kontrolu. Sa povećanjem koncentracije diazoksona nivo indikatora lipidne peroksidacije i oksidativnog stresa je postepeno rastao, i dostigao povećanje (u odnosu na kontrolu) od 50% pri koncentraciji 0,1 mM (Slika 49).

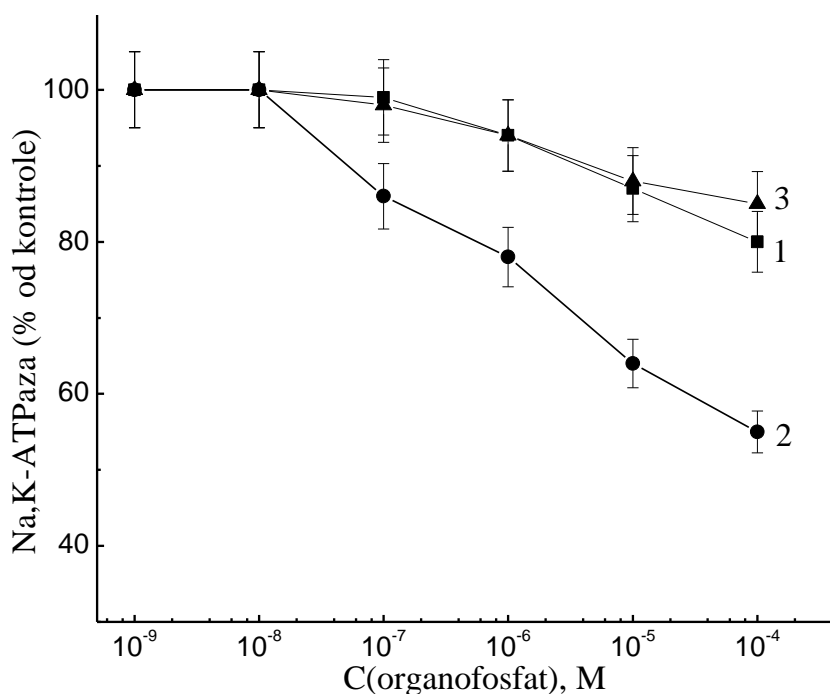


**Slika 49.** Sadržaj parametra lipidne peroksidacije, MDA u sinaptozomima tretiranim sa različitim koncentracijama diazinona, diazoksona i IMP.

#### 4.5.4 Uticaj diazinona i proizvoda njegove degradacije na aktivnost Na,K-ATPaze i acetilholinesteraze

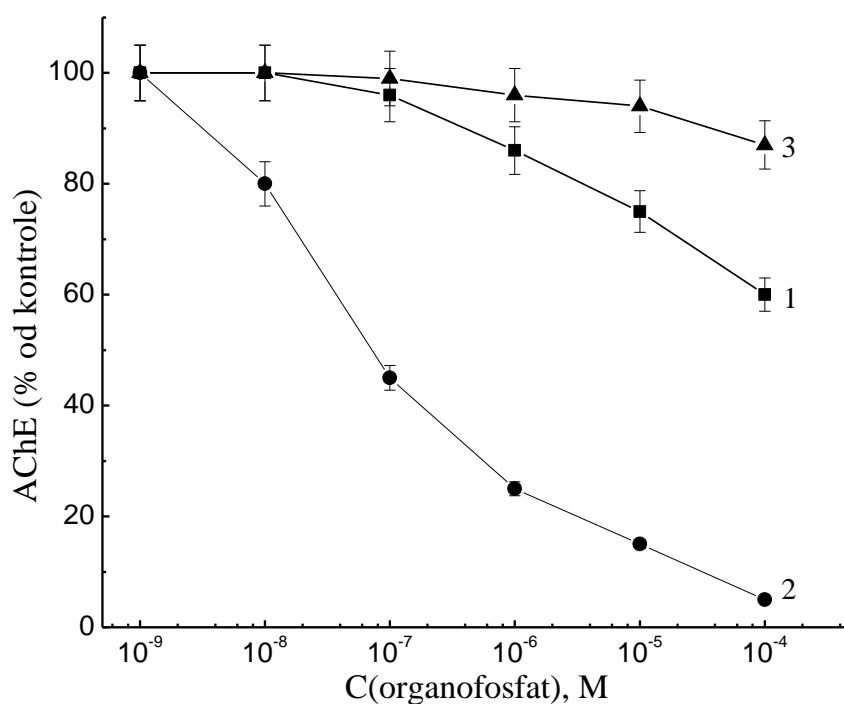
Ispitan je i uticaj diazinona, diazoksona i IMP na specifičnu aktivnost Na,K-ATPaze i AChE u sinaptozomima tretiranim sa organofosfatima u opsegu koncentracija  $1 \times 10^{-9}$  -  $1 \times 10^{-4}$  M. Specifična aktivnost enzima je merana prema procedurama opisanim u poglavljima 3.7.1 i 3.7.2.

Na Slici 50 je prikazana dobijena aktivnost Na,K-ATPaze, izražena kao % od kontrolne vrednosti enzima dobijene u netretiranim uzorcima sinaptozoma, u zavisnosti od koncentracije ispitivanog organofosfata. Dobijeni rezultati ukazuju da diazinon i njegovi degradacioni proizvodi inhibiraju Na,K-ATPazu na dozno zavisnan način, ali sa različitim inhibitornim potencijalima. Diazokson u najvećoj meri smanjuje aktivnost Na,K-ATPaze-do 45%, dok najveće ispitivane koncentracije diazinona i IMP (0,1 mM) inhibiraju aktivnost 15-20% u odnosu na kontrolu.



**Slika 50.** Koncentraciono zavisna inhibicija Na,K-ATPaze, izražena kao % od kontrolne aktivnosti enzima, dobijena u prisustvu diazinona (1), diazoksona (2) i IMP (3) u sinaptozomima.

Na Slici 51 su prikazani rezultati dobijeni za AChE, koji pokazuju koncentraciono zavisnu inhibiciju enzima. Daleko najjači neurotoksični potencijal poseduje diazokson, koji pri koncentraciji 0,1 mM skoro potpuno dezaktivira enzim. Koncentracija 0,1  $\mu$ M dovodi do smanjenja aktivnosti AChE za oko 50%. Inhibitorski potencijal polaznog organo-tiofosfata, diazinona je za više od 1000 puta slabiji u poređenju sa okso derivatom. 0,1 mM diazinon (najveća ispitivana koncentracija) inhibira aktivnost AChE oko 40%. Proizvod hidrolize diazinona, IMP inhibira aktivnost enzima do 15%, što je na granici statistički značajne inhibicije (10%).



**Slika 51.** Koncentraciono zavisna inhibicija AChE, izražena kao % od kontrolne aktivnosti enzima, dobijena u prisustvu diazinona (1), diazoksona (2) i IMP (3) u sinaptozomima.

## 5. DISKUSIJA

Ideja ove teze je da se ispituju toksični efekti organo-tiofosfatnih insekticida i proizvoda njihove degradacije na različitim model sistemima koji mere aktivnost određenog enzima ili parametra toksičnosti. Promena ovih parametara je indikator prisustva toksičnih jedinjenja i može se koristiti kao metoda za detekciju organofosfatnih jedinjenja i evaluaciju njihove toksičnosti [159-161]. Organo-tiofosfatna jedinjenja se koriste kao komercijalni preparati za suzbijanje štetnih insekata u poljoprivredi i domaćinstvu zbog manje štetnosti po zdravlje ljudi tokom njihove primene. Iako okso i izo forme, koje se formiraju iz tio formi u metabolizmu insekata, imaju jače insekticidno dejstvo, izbegava se njihova direktna primena kao preparata insekticida zbog štetnog delovanja na ljude koji dolaze u kontakt sa njima [9]. Do degradacije organo-tiofosfata dolazi delovanjem faktora životne sredine (svetlosti, sunca, mikroorganizama, stavnih komponenata zemljišta) nakon njihove primene na poljima, tokom skladištenja preparata insekticida, sterilizacijom hrane UV zracima, kao i tokom fizičko-hemijskih procesa (AOP) za prečišćavanje voda tokom kojih se organski zagađivači razgrađuju [139, 140, 143]. Tokom degradacije polaznih organo-tiofosfata mogu nastati proizvodi koji su znatno toksičniji, a čija je identifikacija analitičkim metodama (HPLC, GC/MS) skupa, komplikovana i zahteva specijalno obučeno osoblje. Štaviše, i u slučaju njihove identifikacije veoma je teško predvideti toksično delovanje istovremeno prisutnih više proizvoda degradacije organo-tiofosfa u smeši [163-166]. Stoga, za procenu stepena degradacije i detoksikacije organo-tiofosfatnih insekticida znatno pogodnije, brže i jeftinije je koristiti bioanalitičke metode koje se zasnivaju na merenju aktivnosti određenih parametara kao indikatora prisustva jedinjenja sa toksičnim delovanjem [157-162]. U ovoj tezi su ispitivani organo-tiofosfati-malation, diazinon i hlörpirifos, proizvodi njihove oksidacije-malaokson, diazokson i hlörpirifos-okson, strukturni isomer malationa-izomalation, i proizvodi njihove hidrolitičke razgradnje-dietil-maleat, O,O-dimetil-tiofosfat, O,O,S-trimetil-fosforoditionat, IMP i THP (Slike 10a i 10b). Neurotoksični efekti organofosfata su ispitivani određivanjem aktivnosti AChE prečišćenih enzimskih preparata iz električne jegulje, humanih i govedih eritrocita, kao i u kultivisanim humanim eritrocitima, limfocitima i fibroblastima i sinaptozomima mozga pacova. Za procenu genotoksičnog



potencijala ispitivanih jedinjenja je merena učestalost mikronukleusa u binukleusnim ćelijama, indikatora genomskih ozleda u kulturama humanih limfocita i fibroblasta. Kao pokazatelj citotoksičnog delovanja korišćen je indeks ćelijske proliferacije, čija vrednost ukazuje na sposobnost ćelijske deobe, kao i aktivnost LDH kao indikatora oštećenja tkiva. Za evaluaciju prooksidativnih svojstava ograno-tiofosfatnih insekticida i degradacionih proizvoda, ispitivana je aktivnost antioksidantnih enzima (katalaze, GPx i SOD) koji ukazuju na indukovanu produkciju slobodnih radikala, kao i sadržaj MDA, parametra lipidne peroksidacije i indikatora oštećenja lipidnog sloja membrane izazvanog slobodnim radikalima. Kao mera nespecifičnog toksičnog delovanja organofosfata određivana je i aktivnost Na,K-ATPaze, prečišćenog enzimskog preparata i enzima prisutnog u kulturama ćelija humane krvi i sinaptozomima pacova.

Najpre je ispitan uticaj malationa, diazinona, hlörpirifosa i proizvoda njihove degradacije na aktivnost AChE iz električne jegulje tokom izlaganja enzima različitim koncentracijama ispitivanih organofosfata u trajanju od 20 minuta. AChE je primarna, specifična meta na koju deluju organofosfatni insekticidi. Step en izazvane inhibicije enzima je pokazatelj neurotoksičnog potencijala organofosfata na kome se zasniva njihovo insekticidno delovanje [3, 5, 12]. Rezultati ispitivanja pokazuju da diazinon, hlörpirifos, malation i proizvodi njihove oksidacije (diazokson, hlörpirifos-okson i malaokson) i proizvod izomerizacije malationa (izomalation) inhibiraju aktivnost AChE na koncentraciono zavis an način koji odgovara sigmoidnoj funkciji, ali sa različitim inhibitornim potencijalima (Slike 19-21). Dobijene  $IC_{50}$  vrednosti, koje se koriste za procenu inhibitorne moći organofosfata i osetljivosti enzima na njihovo delovanje, su reda veličine  $10^{-8}$  M za oksone i  $10^{-7}$  M za izomalation. U poređenju sa ovim degradacionim proizvodima, polazni tio oblici pokazuju oko sto puta slabiju inhibitornu moć u slučaju malationa, i preko nekoliko desetina hiljada puta u slučaju diazinona i hlörpirifosa. Naime, koncentracije hlörpirifosa oko  $10^{-6}$  M, i koncentracije malationa i diazinona veće od  $2 \times 10^{-4}$  M dovode do smanjenja aktivnosti enzima za 50% (Tabela 8). Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa ranije publikovanim istraživanjima koja pokazuju da toksičnost organo-tiofosfata raste usled nastajanja proizvoda njihove razgradnje [3, 5, 12, 146]. Iz Hilove linearne zavisnosti, dobijene linearizacijom sigmoidnih inhibicionih krivih za različite koncentracije organofosfata, izračunata je vrednost Hilovog koeficijenta koja je veća od 1 za sva ispitivana jedinjenja (Tabela 8).

Vrednost  $n > 1$  ukazuje na kooperativno vezivanje molekula organofosfata za alosteričan enzim, što znači da vezivanje jednog molekula inhibitora dovodi do povećanog afiniteta enzima za vezivanje narednog molekula [40]. Izračunate vrednosti  $n$  su u skladu sa podacima iz literature za hlörpirifos i druge organofosfatne insekticide [5], kao i sa alosteričnim efektima između vrha i dna aktivnog mesta AChE koje izgleda kao uski i duboki žleb [38]. Poznato je da su organofosfati specifični inhibitori AChE, što za posledicu ima prekid prenosa nervnih impulsa. Naime, organofosfati, kao i prirodni supstrat AChE-ACh, ulaze u aktivno mesto enzima koje čini katalitička trijada serina, glutationa i histidina smeštena na dnu 2 nm dubokog žleba [35]. Kao i u acetilovanju supstrata (Reakciona shema 1), organofosfat se razlaže i kovalentno vezuje za –OH grupu serina, pri čemu nastaje fosforilovani enzim (Reakciona shema 2). Dok acil enzim koji se formira tokom katalitičke hidrolize ACh hidrolizuje brzo i regeneriše AChE, defosforilacija enzima za koji je kovalentno vezan fosfor organofosfata je veoma spora. Fosforilovani enzim ne može da hidrolizuje supstrat-neurotransmitter, usled čega dolazi do akumulacije ACh i prekomerne stimulacije nikotinskih i muskarinskih receptora. Post-sinaptička membrana ostaje depolarizovana i sinaptička transmisija ne radi [38]. Dobijena značajna razlika u  $IC_{50}$  vrednostima za organo-tiofosfate i njihove okso i izo analoge, koja ukazuje na znatno veći afinitet vezivanja okso i izo formi za enzim, može se objasniti kombinacijom supstituenata vezanih za atom fosfora u molekulu organofosfata (Slika 1). Zamena atoma sumpora (organo-tiofosfati) sa kiseonikom (okso i izo forme) dovodi do povećanja pozitivnog naelektrisanja na fosforu usled jačeg privlačenja elektrona  $\pi$  veze ka elektronegativnijem kiseoniku. Pozitivno naelektrisanje na fosforu ima jači afinitet za nukleofilni napad –OH grupe serina iz enzima, što za posledicu ima bržu fosforilaciju enzima i jaču inhibitornu moć proizvoda oksidacije i izomerizacije organo-tiofosfatnih insekticida. Proizvodi hidrolize ispitivanih organo-tiofosfata - dietil-maleat, O,O-dimetil-tiofosfat, O,O,S-trimetil-fosforoditionat, IMP i THP nisu smanjili aktivnost AChE više od 10% (Tabela 8), što se smatra statistički neznačajnim. Ovi rezultati su u skladu sa literaturnim podacima o odsustvu neurotoksičnog delovanja proizvoda hidrolitičke razgradnje organo-tiofosfata [138, 146, 199]. Međutim, ova jedinjenja mogu da se aktiviraju metaboličkim transformacijama, verovatno putem oksidacije ili izomerizacije. Nastali metaboliti ispoljavaju toksično delovanje usled njihove sposobnosti da ubrzaju starenje („aging“) inhibiranog enzima

(Reakciona shema 2), koji nije moguće reaktivirati primenom oksimskih reaktivatora [49, 52]. Kinetička analiza inhibicije enzima organofosfatima ukazuje da produženje vremena kontakta enzima i određene koncentracije inhibitora dovodi do većeg stepena inhibicije enzima (Slika 24a). Dobijeni progresivan razvoj inhibicije odgovara ireverzibilnom kovalentnom vezivanju organofosfata za AChE, koje pretpostavlja nastajanje kratkoživećeg enzim-inhibitor kompleksa u reverzibilnoj reakciji, koji se transformiše u fosforilovani enzim u nepovratnoj reakciji konstante brzine  $k_3$  (reakcija I) [40, 41]. Izračunate vrednosti za  $K_i$  (konstanta ravnoteže povratne reakcije disocijacije enzim-inhibitor kompleksa) i  $k_3$  (Tabela 9) su u saglasnosti sa dobijenim  $IC_{50}$  vrednostima kao pokazateljima inhibitorne moći jedinjenja. Naime, vrednosti odnosa  $k_3/K_i$  su za nekoliko stotina ili hiljada puta veće za okso i izo forme u odnosu na tio analoge (Tabela 9). Veće vrednosti za  $k_3$ , a manje za  $K_i$  ukazuju na veći afinitet vezivanja organofosfata za enzim, odnosno za veću brzinu nastajanja fosforilovanog enzima koji sprečava hidrolizu ACh.

Kako tokom degradacije organo-tiofosfata nastaju proizvodi prisutni istovremeno sa drugim proizvodima razgradnje i/ili polaznim jedinjenjima [146], ispitani su simultani uticaji smeša diazinon/diazokson, hlorspirifos/hlorspirifos-okson i malaokson/izomalation. Aditivni inhibicioni efekat je dobijen simultanim izlaganjem AChE nižim koncentracijama ispitivanih kombinacija organofosfata, dok je antagonistički efekat primećen u prisustvu smeša inhibitora u višim koncentracijama (Tabele 13, 14 i 16). Ovi efekti potvrđuju da se tio, okso i izo oblici organofosfata vezuju za isto mesto u molekulu enzima. Naime, u prisustvu niže koncentracije inhibitora, odnosno manjeg broja molekula, svi molekuli imaju dovoljan broj raspoloživih vezujućih mesta na molekulu enzima. Zato je inhibicija kod simultanog aditivnog delovanja jednaka zbiru inhibicija izazvanih pojedinačnim delovanjem ispitivanih organofosfata prisutnih u analiziranoj smeši. Antagonistička inhibicija, dobijena u prisustvu većih koncentracija inhibitora u smeši, može se objasniti takmičenjem između inhibitora za ograničen broj vezujućih mesta na enzimu. Zapravo, ukupan broj molekula inhibitora u smeši je veći od ukupnog broja vezujućih mesta na enzimu, pa je inhibitorni efekat smeše manji od zbira pojedinačnih uticaja komponenata smeše [173]. Dobijeni uticaj smeša malationa i proizvoda njegove degradacije, koje nastaju tokom ozračivanja malationa (Tabela 15) [146], kao i smeša ozračenih rastvora

diazinona (Tabela 12) pokazuju da pad aktivnost AChE u najvećoj meri potiče od degradacionih proizvoda organo-tiofosfata. Ova činjenica potvrđuje potrebu korišćenja i razvijanja bioeseja na bazi AChE za procenu neurotoksičnog potencijala organo-tiofosfatnih insekticida i degradacionih proizvoda koji nastaju tokom AOP procesa za prečišćavanje voda, odnosno za utvrđivanje stepena detoksikacije procesa kao mere njihove efikasnosti. Prisustvo neinhibirajućih proizvoda hidrolize organo-tiofosfata u smešama organofosfata nije uticalo na odgovor AChE bioeseja, što ukazuje na specifičnu detekciju prisutnih neurotoksičnih komponenti i odsustvo interferirajućeg uticaja drugih jedinjenja.

Konstruisan je protočni FIA sistem na bazi imobilizovane AChE iz goveđih eritrocita koji daje odgovore u obliku signala čija visina ukazuje na prisustvo neurotoksičnih organofosfata (Slika 16). Za imobilizaciju enzima izabrane su perlice stakla sa kontrolisanom veličinom pora (komercijalno dostupne). Imobilizacija enzima je izvedena kovalentnim vezivanjem za aktiviranu površinu stakla i umrežavanjem pomoću glutaralaldehida. Metoda je preuzeta iz literature [188]. Izmereni stepen vezivanja proteina za nosač (0,9) i efikasnost imobilizacije (95%) enzima su zadovoljavajući, a enzim je ostao stabilan tokom 3 meseca (čuvan na +4°C). Izabrana je ova metoda imobilizacije zbog jednostavnosti izvođenja, dostupnosti CPG stakla, relativno niske cene i lakog uklanjanja iz bioanalitičke kolone i zamene sa svežim aktivnim enzimom [188]. Prema podacima iz literature, CPG staklo je često korišćen materijal kao nosač za imobilizaciju enzima [203, 204]. Optimalan protok FIA sistema je 0,2 ml/min koji je dao zadovoljavajuću visinu signala. Pri većem protoku, visine signala su bile manje zbog kraćeg vremena kontakta supstrata i enzima (Slika 17), što bi uticalo na smanjenje osetljivosti sistema. Niži protok bi doveo do dužeg zadržavanja inhibitora u bioanalitičkoj koloni, što bi omogućilo duži kontakt sa enzimom i reakciju fosforilacije enzima. Kako je inhibicija AChE organofosfatnim jedinjenjima vremenski zavisna, niži protok bi doveo do većeg pada aktivnosti u prisustvu iste koncentracije inhibitora, odnosno do povećanja osetljivosti sistema. Međutim, vreme trajanja analize bi bilo duže pa je sa protokom od 0,2 ml/min nađen kompromis između zadovoljavajuće osetljivosti AChE biosenzora i vremena analize. Iako je za određivanje aktivnosti imobilizovane AChE dovoljno 20 µl smeše supstrata i reagensa za bojenje, petlja u injektoru je zapremine 200 µl. Injektiranje veće zapremine organofosfata određene

koncentracije povećava količinu insekticida koji reaguje sa enzimom u bioanalitičkoj koloni, što dovodi do većeg pada aktivnosti i povećanja osetljivosti FIA sistema. Za imobilizaciju je izabrana prečišćena AChE iz goveđih eritrocita, iako su ranije publikovani radovi ukazivali na veću osetljivost enzima iz električne jegulje na većinu testiranih pesticida [188]. U slučaju nekih pesticida (paraokson, propoksur), AChE iz goveđih eritrocita je pokazala sličnu osetljivost kao i iz električne jegulje [188]. Najveći LOD, odnosno najmanja osetljivost za različite organofosfatne i karbamatne pesticide je dobijena za AChE iz humanih eritrocita [188, 203]. Zatim, AChE iz električne jegulje je jeftina i ima veliku specifičnu aktivnost. Međutim, testirana je njena stabilnost nakon imobilizacije, koja je pokazala da je enzim stabilan tokom 20 dana. To je znatno kraće od stabilnosti AChE iz goveđih eritrocita (3 meseca), što je bio odlučujući razlog za odustajanje od njenog korišćenja u FIA sistemu. Aktivnost AChE u FIA sistemu je praćena spektrofotometrijskom detekcijom, merenjem apsorpcije žuto obojenog jedinjenja na 412 nm. Spektrofotometrijska detekcija je jednostavna, laka za implementaciju i jeftina. S druge strane, njena najveća mana je niska osetljivost [205], u poređenju sa elektrohemijskom detekcijom koja se najviše koristi kod protočnih enzimskih senzora za analizu pesticida [206], i *thermal lens* spektrometrijom [188, 203]. Dobijeni rezultati analize malationa, hlorspirifosa, diazinona i proizvoda njihove degradacije (oksidacije, hidrolize i izomerizacije) pokazuju koncentraciono zavisnu sigmoidnu inhibiciju AChE (Slike 30-32), slično kao kod neprotočnog AChE bioeseja. Međutim, osetljivost FIA biosenzora je za oko sto puta manja u poređenju sa AChE bioesejom iz električne jegulje. Dobijene  $IC_{50}$  vrednosti za organo-tiofosfate su oko  $10^{-4}$  M, dok su za okso i izo derivate sto puta manje ( $10^{-6}$  M) (Tabela 17). Proizvodi hidrolize nisu indukovali odgovore FIA AChE sistema. Razlog za veću osetljivost može se pronaći u dužem vremenu preinkubacije (20 minuta), dok se vreme proticanja organofosfata kroz sistem procenjuje na manje od 5 minuta. Osetljivost FIA sistema je slična neprotočnom AChE bioeseju iz goveđih eritrocita, koji se izvodi praktično bez preinkubacije-nakon dodavanja inhibitora enzimu odmah se započinje enzimska reakcija dodavanjem supstrata (Slike 25a, 26a i 27a). Sa produžavanjem vremena preinkubacije na 5 minuta osetljivost AChE bioeseja se povećava za oko 10 puta (Slike 25b, 26b i 27b). Međutim, poređenje protočnog i šaržnog sistema je veoma nezahvalno zbog nemogućnosti precizne procene perioda kontakta imobilizovanog enzima u

bioanalitičkoj koloni i inhibitora koji protiče, kao i uslova pod kojim teku enzimске reakcije. Jedan od bitnih činilaca je temperatura koja na eksponencijalan način utiče na brzinu reakcije, kao i na optimalnu aktivnost enzima [40]. U slučaju FIA sistema temperatura iznosi 20-25°C, dok se neprotični bioesej izvodi na optimalnoj temperaturi za aktivnost AChE (37°C). Pored toga, inhibitorski efekat organofosfata, koji određuje osetljivost AChE bioeseja, zavisi od više faktora istovremeno (vrste, količine enzima, vremena preinkubacije) [40]. Za FIA sistem su izračunate i vrednosti Hilovog koeficijenta, čija vrednost iznosi preko 1 (Tabela 17) kao i u slučaju šaržnog sistema (Tabele 10 i 11), što ukazuje na kooperativno vezivanje organofosfata za imobilizovani enzim. U cilju smanjenja LOD organo-tiofosfata upotrebom AChE bioeseja, malation, hlorspirifos i diazinon su tretirani oksidacionim sredstvom (NBS) koje prevodi tih oblike u odgovarajuće okso forme koje dovode do većeg pada aktivnosti enzima za iste koncentracije. Ukoliko dođe do kvantitativnog prevođenja tiona u oksone, moguće je smanjiti LOD tih oblika i do nekoliko hiljada puta. Za oksidaciju se često koriste i enzimi (različite peroksidaze) [191, 192], elektrohemijska oksidacija [193] i različiti organski i neorganski reagensi (vodonik-peroksid, bromna voda, NBS) [190]. NBS je izabran zbog efikasne oksidacije koja je dobijena u ranije publikovanim radovima [190], kao i jednostavnosti izvođenja oksidacije, niske cene, dostupnosti na tržištu, što nije slučaj kod enzimске i elektrohemijske oksidacije. Nedostatak NBS kao oksidacionog sredstva je njegova neselektivnost, zbog čega može da deluje i na nastale oksone i smanji njihovu koncentraciju [190]. Zato je neophodno optimizovati vreme delovanja NBS na organo-tiofosfate, kao i njihov kvantitativni odnos. Dobijeni rezultati ukazuju na smanjenje LOD organo-tio jedinjenja deset do hiljadu puta AChE bioesejima, ukoliko se prethodno oksiduju (Tabele 6 i 7). Nakon oksidacije, moguće je detektovati koncentracije organo-tiofosfata reda veličine  $10^{-8}$  M upotrebom AChE eseja iz električne jegulje (20 minuta preinkubacija), i koncentracije od  $10^{-6}$ - $10^{-7}$  M korišćenjem FIA AChE sistema. Ovaj rezultat je naročito značajan za FIA sistem koji ne može da detektuje koncentracije organo-tiofosfata niže od 0,1  $\mu$ M. Na ovaj način se povećava osetljivost FIA biosenzora koji ima svoje prednosti u poređenju sa šaržnim AChE bioesejom. Pre svega, ekonomičniji je u potrošnji enzima, koji nije jeftina hemikalija, jer se enzim nakon analize može regenerisati oksimskim reaktivatorima [49, 50, 52] i koristiti tokom nekoliko meseci. U slučaju neprotičnog sistema, enzim se koristi

jednokratno i baca nakon analize, što dovodi do potrošnje velike količine enzima pri analiziranju većeg broja uzoraka. Kod FIA biosenzora, izbegnuta je eventualna interakcija komponentata analiziranog uzorka i eseja, što bi moglo dovesti do smanjenja intenziteta žutog obojenja i maskiranja rezultata analize.

Kako se UV zračenje koristi za uklanjanje organskih zagađivača iz voda kao metoda za njihovo prečišćavanje (direktna fotoliza), organo-tiofosfatni insekticid diazinon je tretiran sa UV svetlošću tokom 115 minuta. Za praćenje stepena detoksikacije i degradacije diazinona tokom UV zračenja ispitivani su neurotoksični, genotoksični, citotoksični efekti i proosidativno dejstvo ozračenih rastvora. Paralelno su praćeni i parametri toksičnog dejstva u prisustvu različitih koncentracija diazinona i IMP, identifikovanog proizvoda degradacije diazinona. Kao model sistemi su korišćeni kultivisani humani eritrociti, limfociti i fibroblasti tretirani ozračenim rastvorima tokom 3 dana. Rezultati UPLC-UV/Vis analize sastava ozračenih rastvora diazinona pokazuju eksponencijalni pad koncentracije diazinona i rast koncentracije proizvoda njegove hidrolize, IMP (Slika 33). Prisustvo identifikovanog IMP ukazuje na istovremeno nastajanje dietil-tiofosforne kiseline, drugog proizvoda koji nastaje uporedo sa IMP, kao rezultat raskidanja kovalentne P-O veze u molekulu diazinona [147].

Rezultati ispitivanja uticaja različitih koncentracija diazinona na aktivnost AChE i Na,K-ATPaze u limfocitima, eritrocitima i fibroblastima pokazuju dozno zavisnu inhibiciju enzima (Slike 34 i 36). Slični rezultati za ove enzime su dobijeni u ribama i pacovima u prisustvu diazinona, malationa i parationa [207, 208]. Dobijena je veća osetljivost AChE prema diazinonu u fibroblastima i limfocitima u poređenju sa prečišćenim enzimskim preparatom (Slike 36 i 37), što se može pripisati oksidativnoj desulfuraciji diazinona preko citohrom P450 enzimskog sistema do diazoksiona i pirimidinolskih metabolita, koji mogu dovesti do jače inhibicije enzima [209]. S druge strane, dobijena manja osetljivost AChE u ćelijama krvi u odnosu na fibroblaste (Slika 36, Tabela 21) može se objasniti detoksifikacijom usled delovanja karboksilesteraza nepoznate fiziološke uloge prisutnih u plazmi. Inhibicija ovih enzima, zastupljenih kod sisara u jetri i serumu, ne uzrokuje vidljive toksične efekte. Fosforilacija ovih karboksilaza koje cirkulišu u plazmi može da razgradi najmanje jedan molekul diazinona pre njegovog kontakta sa ciljanim enzimom, AChE [4]. Pored karboksilaza, u serumu i jetri sisara su zastupljene fosfotriesteraze (u većim koncentracijama) koje

raskidaju vezu između fosfora i odlazeće grupe u molekulu organofosfata [63]. Ovi enzimski načini detoksikacije organofosfata su detaljno opisani u poglavlju 2.2.3. Fotodegradacioni tretman utiče na inhibitornu efikasnost diazinona (Slike 40 i 41). Ozračivanje diazinona u trajanju od 5 minuta smanjuje aktivnost AChE u kultivisanim ćelijama i prečišćenom enzimu. Pad aktivnosti prečišćene, komercijalno dostupne AChE iz humanih eritrocita je posledica nastajanja jačeg inhibitora od diazinona, najverovatnije diazoksone koji poseduje više od hiljadu puta jači inhibicioni potencijal (Slika 41). Dobijena manja inhibicija AChE u ćelijama krvi (45-55%) u odnosu na fibroblaste (90%) (Slika 40) u prisustvu 5-minutnih ozračenih rastvora diazinona sugeriše da krv, za razliku od fibroblasta, može da detoksikuje smešu diazinona i nastalih proizvoda degradacije, što je u skladu sa enzimskom detoksikacijom putem karboksilaza i fosfotriesteraza prisutnih u krvi sisara [4, 62, 63]. Produženo vreme ozračivanja dovodi do postepenog povećanja inhibitorne efikasnosti ozračenih rastvora diazinona u ispitivanim ćelijama (Slika 40). Prisustvo rastvora diazinona tretiranog tokom 115 minuta smanjuje aktivnost AChE oko 25% u odnosu na početni neozračeni rastvor. S druge strane, dobijena postepena reaktivacija aktivnosti prečišćene AChE (Slika 41) između 15. i 115. minuta ozračivanja je posledica degradacije diazinona i diazoksone i nastajanja IMP kao rezultat raskidanja P-O veze [133, 210]. Ovi rezultati su u saglasnosti sa publikovanim studijama o uticaju sličnih organo-tiofosfata i njihovih degradacionih proizvoda na prečišćenu AChE iz različitih izvora [146], kao i sa činjenicom da je IMP manje potentan inhibitor u poređenju sa njegovim *parent* organo-tiofosfatom, diazinonom [211]. Kako su i Na,K-ATPaza i AChE membranski vezani enzimi, strukturni i funkcionalni poremećaj dvostrukog fosfolipidnog sloja membrane izazvan oksidativnim stresom, menja aktivnosti ovih enzima [212]. Zato, smanjenje aktivnosti Na,K-ATPaze u ćelijama u prisustvu rastvora diazinona zračenih od 30-115 minuta (Slika 38) se može objasniti povećanjem sadržaja MDA pod uticajem IMP (Slika 43) koji ne utiče na aktivnost prečišćenog enzima (Slika 35). Lipidna peroksidacija, kao jedan od glavnih procesa izazvanih oksidativnim stresom, je verovatno odgovorna za inhibiciju Na,K-ATPaze diazinonom i njegovim degradacionim proizvodima u svim ćelijama (Slike 34 i 38). Ovu pretpostavku potvrđuju kao opravdanu rezultati dobijeni za komercijalnu prečišćenu Na,K-ATPazu, čija aktivnost se ne menja pod uticajem diazinona i njegovih fotodegradacionih proizvoda (Slike 35 i



39). Takođe, podaci iz literature pokazuju da je aktivnost Na,K-ATPaze veoma osetljiva na delovanje ROS. Smatra se da dva različita mehanizma mogu da dovedu do inhibicije Na,K-ATPaze: direktan uticaj ROS i indirektan uticaj promena u fluidnosti membrane [213, 214].

Dobijena dozno zavisna lipidna peroksidacija, odnosno povećanje sadržaja MDA u prisustvu diazinona (Slika 42) odgovara prooksidativnim osobinama organofosfatnih jedinjenja [215, 216], kao i parametrima oksidativnog stresa u različitim tkivima *Cyprinus carpio* izazvanih diazinonom [208]. IMP, poznat kao manje toksičan proizvod direktne fotolize diazinona [135], nije pokazao statistički značajan uticaj na prečišćenu AChE i Na,K-ATPazu (Slike 35 i 37), ali je izazvao veći porast sadržaja MDA od diazinona u kulturama limfocita (Slika 43). U eksperimentima sa ozračenim rastvorima diazinona, sadržaj MDA dobijen u prisustvu ozračenog  $2 \times 10^{-5}$  M diazinona se povećava kao funkcija vremena fotodegradacije (Slika 44). Ovo povećanje MDA je posledica prisustva nastalog IMP u ozračenim rastvorima diazinona (Tabela 19). MDA, proizvod lipidne peroksidacije, ima sposobnost da reaguje sa amino grupama proteina i formira Šifove baze (*cross linking*) [217]. Prisustvo MDA se dovodi u vezu i sa polimerizacijom specifičnih membranskih proteina, koja obično izaziva ćelijsku smrt putem apoptoze i smanjen potencijal ćelijske proliferacije (deobe) [217].

Diazinon i IMP su izazvali povećanje učestalosti mikronukleusa (Tabela 22), indikatora genetskih ozleda, na dozno zavisan način putem klastogenog načina delovanja, indukujući prekide jednog i oba lanca u molekulu DNK. Klastogeni mehanizam delovanja organofosfatnih insekticida je dobijen u *in vivo* studijama rađenim na miševima [218]. Dobijeni rezultati su saglasni sa jednim brojem publikacija u kojima je izlaganje pesticidima dovelo do povećanja učestalosti mikronukleusa u kulturama limfocita izolovanih iz periferne krvi testiranih osoba [90, 91]. Najveći genotoksični efekat je dobijen delovanjem koncentracija diazinona, odnosno IMP  $2 \times 10^{-6}$  M (Tabela 22). Sa povećanjem koncentracije ispitivanih organofosfata vrednost parametra genotoksičnosti se smanjivala (Tabela 22) jer je veoma mali broj ćelija preživio prekomerne doze toksičnih jedinjenja. Potvrda za ovu pretpostavku je dobijena inhibicija ćelijske proliferacije (indikatora citotoksičnog delovanja) iznad  $2 \times 10^{-6}$  M (Tabela 22), koja ukazuje na usporavanje biohemijskih procesa u ćelijama, zaustavljenje njihove deobe i odumiranje jednog broja. Smanjenje vrednosti CBPI je praćeno

povećanjem učestalosti mikronukleusa i sadržaja MDA (Tabela 22, Slike 42 i 43). Proizvod fotodegradacije diazinon, IMP poseduje jači genotoksični i citotoksični potencijal od samog diazinona i u fibroblastima i u limfocitima (Tabela 22). U svim uzorcima limfocita i fibroblasta tretiranim sa ozračenim rastvorima diazinona dobijen je značajan porast sadržaja MDA (Slika 44) i učestalosti mikronukleusa i smanjenje indeksa ćelijske proliferacije (Tabela 23). Naizraženiji genotoksični i citotoksični efekti su dobijeni nakon 115 minuta ozračivanja, kada je i sadržaj MDA 80% veći u poređenju sa neozračenim polaznim rastvorom diazinona (0 minuta). Najduže tretirani rastvor diazinona, u kome je identifikovan samo IMP (Tabela 19), dovodi do skoro četverostrukog povećanja učestalosti mikronukleusa u kulturama limfocita (Tabela 23). Učestalost mikronukleusa i sadržaj MDA koreliraju pozitivno i statistički značajno ( $p = 0,005$ ). Rezultati za tretman ozračenim rastvorima diazinona ukazuju da fotodegradacioni tretman u potpunosti razgrađuje diazinon, ali ga ne detoksikuje. Naprotiv, dovodi do povećanja njegovih genotoksičnih i citotoksičnih efekata, kao i prooksidativnih svojstava.

Dobijena inhibicija Na,K-ATPaze u kulturama humanih ćelija u prisustvu diazinona i proizvoda njegove degradacije (Slike 34 i 38), verovatno usled oksidativnog oštećenja ćelijske membrane, može biti odgovorna za dozno zavisno smanjenje vrednosti CBPI (Tabele 22 i 23). Ova pretpostavka je u saglasnosti sa podacima iz literature, prema kojima neki modulatori aktivnosti Na,K-ATPaze inhibiraju deobu ćelija [219, 220]. Slobodni radikali utiču na ekspresiju gena, a preko nje na proliferativnu sposobnost ćelije. Moguće je da povećan sadržaj MDA može da dovede do odsustva regulacije u ćeliji, a time i do apoptoze koja vodi ćeliju u smrt [221].

Na sinaptozomima izolovanim iz mozga pacova su ispitivana prooksidativna svojstva, neurotoksični i citotoksični efekat diazinona i proizvoda njegove transformacije, diazoksona i IMP. Rezultati za diazinon pokazuju da ne utiče značajno na aktivnost antioksidantnih enzima (katalaze, GPx i SOD) (Slike 46, 47 i 48), kao ni na sadržaj indikatora lipidne peroksidacije, MDA (Slika 49). Najveća ispitivana koncentracija ( $1 \times 10^{-4}$  M) dovodi do smanjenja aktivnosti Na,K-ATPaze za oko 20% (Slika 50), a AChE za oko 40 % (Slika 51). Proizvod hidrolize diazinona–IMP, koji ne ispoljava neurotoksične efekte specifičnim vezivanjem za AChE, aktivira SOD za oko 30% u koncentraciji  $1 \times 10^{-4}$  M (Slika 48). Aktivnost katalaze i GPx ostaje gotovo

nepromenjena (Slike 46 i 47), kao i sadržaj MDA (Slika 49). Iz ovih rezultata bi se moglo zaključiti da IMP u određenoj meri generiše superoksidni anjon radikal koji je supstrat za SOD. Međutim, izostanak lipidne peroksidacije ukazuje da je aktiviranjem SOD dalje delovanje formiranih ROS onemogućeno [121, 222]. IMP nije značajno inhibirao aktivnost Na,K-ATPaze i AChE (Slike 50 i 51). To se može objasniti izostankom oštećenja lipidnog sloja membrane, koji bi mogao da izmeni aktivnost ovih enzima vezanih za membranu, a sam molekul IMP direktno ne menja strukturu i funkciju ovih enzima (Slike 35 i 37). Ovi rezultati su u skladu sa podacima iz literature o prooksidativnim svojstvima organofosfatnih insekticida [121, 208, 216, 222]. Prema dostupnim podacima, uglavnom su ispitivani organo-tiofosfati, koji se najčešće koriste kao komercijalni preparati insekticida, koji indukuju oksidativni stres u različitim model sistemima [208, 216]. S druge strane, nedostaju naučne studije o proizvodima degradacije organo-tiofosfata. Nešto jača prooksidativna svojstva IMP u odnosu na diazinon mogle bi se pripisati –OH grupi u molekulu IMP, koja ima potencijal da generiše slobodne radikale kiseonika, među kojima je OH<sup>•</sup> radikal najreaktivniji (poglavlje 2.3.1) [77]. Jaka prooksidativna svojstva je pokazao proizvod oksidacije diazinona, diazokson koji sadrži P=O grupu. Ovaj specifični inhibitor AChE sa izraženim neurotoksičnim delovanjem (Slika 37) povećao je aktivnost svih ispitivanih antioksidantnih enzima, a najviše aktivnost SOD i sadržaj MDA (Slike 46-49).  $1 \times 10^{-4}$  M diazokson inhibirao je aktivnost Na,K-ATPaze za oko 50% (Slika 50), što može biti posledica indukovanog oštećenja membrane [213, 214], dok je inhibicija AChE potpuna pri istoj koncentraciji (Slika 51). Izražen neurotoksični potencijal diazoksona je očekivan jer je poznato da se on direktno vezuje za –OH grupu serina u aktivnom mestu enzima sa velikim afinitetom [36-38]. U sinaptozomima mozga pacova verovatno nisu zastupljene karboksilaze i fosfotriesteraze koje bi mogle razgraditi molekul i umanjiti njegovu inhibitornu moć [4, 62, 63]. Iz dobijenih rezultata može se zaključiti da je diazokson sposoban da generiše ROS (poglavlje 2.3.1) koje nadvladavaju enzimске antioksidantne odbrane ćelije i izazivaju oksidativni stres koji se manifestuje povećanjem sadržajem MDA. Time, diazokson ne ispoljava kao organofosfat samo specifično neurotoksično dejstvo, već i nespecifične toksične efekte koji se zasnivaju na prooksidativnim svojstvima i sposobnosti izazivanja oksidativnog stresa [121-123]. Rezultati citotoksičnosti, dobijeni merenjem aktivnosti LDH kao

indikatorom oštećenja tkiva [202] u tretiranim sinaptozomima (Slika 45) pokazuju da nijedan ispitivani organofosfat nije doveo do povećanja aktivnosti LDH. Izostanak citotoksičnog delovanja diazinona i degradacionih proizvoda, kao i prooksidativnih svojstava diazinona i IMP mogao bi se objasniti kratkim vremenskim periodom tretiranja sinaptozoma (1h). U slučaju ispitivanja toksičnog delovanja ozračenog diazinona i proizvoda fotodegradacije, humane ćelije su kultivisane tokom 3 dana i dobijene su znatno jači toksični efekti. Ova činjenica govori da je za delovanje oksidaza na organofosfate i generisanje slobodnih radikala verovatno potrebno duže vreme izlaganja.

## 6. ZAKLJUČAK

Na osnovu prikazanih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Za detekciju neurotoksičnih jedinjenja i procenu njihovog neurotoksičnog potencijala najbolja svojstva je pokazao bioesej na bazi AChE iz električne jegulje. Najbolju osetljivost bioesej je pokazao u prisustvu proizvoda oksidacije i izomerizacije organo-tiofosfata, potentnih inhibitora AChE. LOD za malaokson, malation i hlorspirifos-okson su oko  $10^{-9}$  M, dok je LOD za izomalation oko 10 puta veći. Ovaj sistem je znatno manje osetljiv na prisustvo tih oblika organofosfata, i njime je moguće detektovati mikromolarne koncentracije ovih insekticida. LOD organo-tiofosfata se može smanjiti nekoliko desetina, ili čak nekoliko stotina puta ukoliko AChE testu prethodi oksidacija insekticida sa NBS.

2. Protočni FIA AChE biosensor na bazi AChE može da detektuje koncentracije oko i izo formi organofosfata, koji nastaju degradacijom organo-tiofosfatnih insekticida, u opsegu  $10^{-7}$ - $10^{-6}$  M. LOD za organo-tiofosfate je reda veličine  $10^{-5}$  M, može se sniziti za 10-100 puta u zavisnosti od vrste insekticida.

3. Citotoksična i genotoksična svojstva organofosfata mogu se proceniti određivanjem učestalosti mikronukleusa i indeksa ćelijske proliferacije u kulturama humanih fibroblasta i limfocita. Ovom metodom mogu se detektovati proizvodi hidrolize organo-tiofosfatnih insekticida, koji nastaju kao krajnji proizvodi fotohemijske degradacije insekticida. Ova jedinjenja ne mogu se detektovati bioesejima na bazi AChE, jer ne poseduju neurotoksični potencijal. Na ovaj način moguće je detektovati organo-tiofosfate i proizvode njihove hidrolize u koncentracijama većim od  $2 \times 10^{-8}$  M.

4. Prooksidativna svojstva organofosfata se određuju na osnovu porasta sadržaja MDA, parametra lipidne peroksidacije i oksidativnog stresa u kulturama humanih limfocita. Ovom metodom može se detektovati prisustvo  $2 \times 10^{-5}$  M diazinona i  $2 \times 10^{-6}$  M IMP u fotodegradiranim rastvorima diazinona.

5. Inhibicija aktivnosti Na,K-ATPaze u kulturama ćelija humane krvi i fibroblastima je indikator prisustva organo-tiofosfata, diazinona i proizvoda njegove fotohemijske degradacije, IMP.

6. Povećana aktivnost antioksidantnih enzima i MDA u sinaptozomima mozga pacova, kao i pad aktivnosti AChE i Na,K –ATPaze mogu se primeniti kao indikatori toksičnih

jedinjenja. Diazokson, proizvod oksidacije diazinona, doveo je do promene vrednosti ovih parametara, pa se može detektovati njegovo prisustvo u koncentracijama približno  $10^{-8}$  M.

7. Prečišćena AChE, FIA biosensor na bazi AChE, kulture ćelija humane krvi, humane fibroblasti i sinaptozomi mozga pacova, u kojima se određuje promena odgovarajućih parametara toksičnosti, mogu se koristiti za praćenje fizičko-hemijskih procesa kojima se degradiraju organo-tiofosfatni insekticidi i procenu njihove efikasnosti, odnosno stepena detoksikacije.

## 7. LITERATURA

- [1] M.J. Levine, *Pesticides: A Toxic Time Bomb in our Midst*, 1st ed., Praeger Publishers Inc., U.S., 2007.
- [2] S.A. Greene, R.P. Pohanish, *Sittig's Handbook of Pesticides and Agricultural Chemicals*, William Andrew Publishing, Norwich, New York, 2005.
- [3] J. Bajgar, Organophosphates/nerve agent poisoning: Mechanism of action, diagnosis, prophylaxis, and treatment, *Adv. Clin. Chem.* **38** (2004) 151–216.
- [4] M.A. Sogorb, E. Vilanova, Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis, *Toxicol. Lett.* **128** (2002) 215–228.
- [5] C.J. Smulders, T.J. Bueters, S. Vailati, R.G. van Kleef, H.P. Vijverberg, Block of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by organophosphate insecticides, *Toxicol. Sci.* **82** (2004) 545–554.
- [6] C.R.D. Assis, A.G. Linhares, V.M. Oliveira, R.C.P. França, E.V.M.M. Carvalho, R.S. Bezerra, L.B. de Carvalho Jr., Comparative effect of pesticides on brain acetylcholinesterase in tropical fish, *Sci. Total Environ.* **441** (2012) 141-150.
- [7] K.C.C. Silva, C.R.D. Assis, V.M. Oliveira, L.B. de Carvalho Jr., R.S. Bezerra, Kinetic and physicochemical properties of brain acetylcholinesterase from the peacock bass (*Cichla ocellaris*) and *in vitro* effect of pesticides and metal ions, *Aquat. Toxicol.* **126** (2013) 191-197.
- [8] C. Cox, Diazinon, *J. Pesticide Reform.* **12** (1992) 30-35.
- [9] J.E. Chambers, P.E. Levi, *Organophosphates, Chemistry, Fate, and Effects*, Academic Press, San Diego, 1992.
- [10] Y. Solberg, M. Belkin, The role of excitotoxicity in organophosphorous nerve agents central poisoning, *Trends Pharmacol. Sci.* **18** (1997) 183–185.
- [11] M. O'Malley, Clinical evaluation of pesticide exposure and poisonings, *Lancet* **349** (1997) 1161–1166.
- [12] J. Bajgar, Laboratory diagnosis of organophosphates/nerve agent poisoning, *Klin. Biochem. Metab.* **13** (2005) 40–47.

- [13] Effects of organophosphorus insecticides on the nervous system, In: Organophosphorus Insecticides: a General Introduction, World Health Organization (WHO), Geneva, (1986) 58-69.
- [14] J. Massoulie, L. Pezzementi, S. Bon, E. Krejci, F.M. Vallette, Molecular and cellular biology of cholinesterases, *Prog. Neurobiol.* **41** (1993) 31-91.
- [15] L.W. Chacho, J.A. Cerf, Histochemical localization of cholinesterase in the amphibian spinal cord and alterations following ventral root section, *J. Anat.* **94** (1960) 74-81.
- [16] G.B. Koelle, The histochemical localization of cholinesterases in the central nervous system of the rat, *J. Comp. Anat.* **100** (1954) 211-235.
- [17] E. Perry, M. Walker, J. Grace, R. Perry, Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness? *Trends. Neurosci.* **22** (1999) 273-280.
- [18] D. Voet, J. Voet, *Biochemistry*, John Wiley and Sons, New York, 1995.
- [19] B.G. Katzung, *Basic and clinical pharmacology*, The McGraw Hill Companies, Columbus, USA, 2001.
- [20] E.A. Barnard, In: J.I. Hubbard, *The Peripheral Nervous System*, Plenum, New York, 1974.
- [21] D.M. Quinn, Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states, *Chem. Rev.* **87** (1987) 955-979.
- [22] P. Taylor, Z. Radic, The cholinesterases: from genes to proteins, *Annu. Rev. Pharmacol.* **34** (1994) 281-320.
- [23] P. Manavalan, P. Taylor, W.C. Johnson Jr., Circular dichroism studies of acetylcholinesterase conformation. Comparison of the 11 S and 5.6 S species and the differences induced by inhibitory ligands, *BBA- Protein Struct. M.* **829** (1985) 365-370.
- [24] D. Nachmansohn, I.B. Wilson, The enzymic hydrolysis and synthesis of acetylcholine, *Adv. Enzymol.* **12** (1951) 259-339.
- [25] I.B. Wilson, C. Quan, Acetylcholinesterase studies on molecular complementarity, *Arch. Biochem. Biophys.* **73** (1958) 131-143.
- [26] G. Mooser, D.S. Sigman, Ligand binding properties of acetylcholinesterase determined with fluorescent probes, *Biochemistry* **13** (1974) 2299-2307.



- [27] H.C. Froede, I.B. Wilson, Acetylcholinesterase, In: P.D. Boyer, The Enzymes, Academic Press, New York, **5** (1971) 87-114.
- [28] Z. Radic, G. Gibney, S. Kawamoto, K. MacPhee-Quigley, C. Bongiorno, P. Taylor, Expression of recombinant acetylcholinesterase in a baculovirus system: kinetic properties of glutamate 199 mutants, *Biochemistry* **31** (1992) 9760-9767.
- [29] A. Ordentlich, D. Barak, C. Kronman, N. Ariel, Y. Segall, B. Velan, A. Shafferman, Contribution of Aromatic Moieties of Tyrosine 133 and of the Anionic Subsite Tryptophan 86 to Catalytic Efficiency and Allosteric Modulation of Acetylcholinesterase, *J. Biol. Chem.* **270** (1995) 2082-2091.
- [30] N. Ariel, A. Ordentlich, D. Barak, T. Bino, B. Velan, A. Shafferman, The 'aromatic patch' of three proximal residues in the human acetylcholinesterase active centre allows for versatile interaction modes with inhibitors, *Biochem. J.* **335** (1998) 95-102.
- [31] A. Ordentlich, D. Barak, C. Kronman, Y. Flashner, M. Leitner, Y. Segall, N. Ariel, S. Cohen, B. Velan, A. Shafferman, Dissection of the human acetylcholinesterase active center determinants of substrate specificity. Identification of residues constituting the anionic site, the hydrophobic site, and the acyl pocket, *J. Biol. Chem.* **268** (1993) 17083-17095.
- [32] V. Tougu, Acetylcholinesterase: Mechanism of Catalysis and Inhibition, *Curr. Med. Chem.-CNS Agents* **1** (2001) 155-170.
- [33] Taylor, P. Lappi, S. Interaction of fluorescence probes with acetylcholinesterase. Site and specificity of propidium binding, *Biochemistry* **14** (1975) 1989-1997.
- [34] E. Reiner, N. Aldridge, V. Simeon, Z. Radic, P. Taylor, In: J. Massoulie, Cholinesterases: structure, function, mechanism, genetics, and cell biology, American Chemical Society, Washington, (1991) 227-234.
- [35] J.L. Sussman, M. Harel, F. Frolow, C. Oefner, A. Goldman, L. Toker, I. Silman, Atomic Structure of Acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: A Prototypic Acetylcholine-Binding Protein, *Science* **253** (1991) 872-879.
- [36] W.N. Aldridge, E. Reiner, Acylated amino acids in inhibited B-esterases, In: Enzyme Inhibitors as Substrates, A. Neuberger, E.L. Tatum, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, (1972) 170-175.

- [37] Metabolism and mode of action, In: Organophosphorus Insecticides: a General Introduction, World Health Organization (WHO), Geneva, (1986) 39-48.
- [38] Y. Boublik, P. Saint-Aguet, A. Lougarre, M. Arnaud, F. Villatte, S. Estrada-Mondaca, D. Fournier, Acetylcholinesterase engineering for detection of insecticide residues, *Protein Eng. Des. Sel.* **15** (2002) 43-50.
- [39] W.N. Aldridge, Some properties of specific cholinesterase with particular reference to the mechanism of inhibition by diethyl *p*-nitrophenyl thiophosphate and analogs (E605), *Biochem. J.* **46** (1950) 451–460.
- [40] Z.D. Knežević-Jugović, *Enzimsko inženjerstvo, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, 2008.*
- [41] R. Kitz, I. Wilson, Esters of methanesulfonic acid as irreversible inhibitors of acetylcholinesterase, *J. Biol. Chem.* **237** (1962) 3245–3249.
- [42] Đ. Petrović, *Osnovi enzimologije, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd, 1998.*
- [43] K. Hayden, M. Norton, D. Darcey, T. Ostbye, P. Zandi, J. Breitner, K. Welsh-Bohmer, Occupational exposure to pesticides increases the risk of incident AD: the Cache County study, *Neurology* **74** (2010) 1524–1530.
- [44] L.G. Costa, Current issues in organophosphate toxicology, *Clin. Chim. Acta* **366** (2006) 1-13.
- [45] P. Eyer, The Role of Oximes in the Management of Organophosphorus Pesticide Poisoning, *Toxicol. Rev.* **22** (2003) 165-190.
- [46] J. Bajgar, J. Fusek, K. Kuca, L. Bartosova, D. Jun, Treatment of organophosphate intoxication using cholinesterase reactivators: facts and fiction, *Mini-Rev. Med. Chem.* **7** (2007) 461-466.
- [47] F. Worek, N. Aurbek, M. Koller, C. Becker, P. Eyer, H. Thiermann, Kinetic analysis of reactivation and aging of human acetylcholinesterase inhibited by different phosphoramidates, *Biochem. Pharmacol.* **73** (2007) 1807-1817.
- [48] J. Bajgar, J. Zdarova Karasova, J. Kassa, J. Cabal, J. Fusek, V. Blaha, S. Tesarova, Tabun-inhibited rat tissue and blood cholinesterases and their reactivation with the combination of trimedoxime and HI-6 in vivo, *Chem.-Biol. Interact.* **187** (2010) 287-290.

- [49] K. Musilek, M. Dolezal, F. Gunn-Moore, K. Kuca, Design, evaluation and structure-activity relationship studies of the AChE reactivators against organophosphorus pesticides, *Med. Res. Rev.* **31** (2011) 548-575.
- [50] K. Musilek, O. Holas, A. Horova, M. Pohanka, J. Zdarova-Karasova, D. Jun, K. Kuca, Progress in Antidotes (Acetylcholinesterase Reactivators) Against Organophosphorus Pesticides, In: M. Stoytcheva, *Pesticides in the Modern World- Effects of Pesticides Exposure*, InTech, Croatia, (2011) 341-358.
- [51] N.M. Herkert, G. Freude, U. Kunz, H. Thiermann, F. Worek, Comparative kinetics of organophosphates and oximes with erythrocyte, muscle and brain acetylcholinesterase, *Toxicol. Lett.* **209** (2012) 173-178.
- [52] G.A. Petroianu, M.Y. Hasan, S.M. Nurulain, N. Nagelkerke, J. Kassa, K. Kuca, New K-Oximes (K-27 and K-48) in Comparison with Obidoxime (LuH-6), HI-6, Trimedoxime (TMB-4), and Pralidoxime (2-PAM): Survival in Rats Exposed IP to the Organophosphate Paraoxon, *Toxicol. Mech. Method.* **17** (2007) 401-408.
- [53] G.A. Petroianu, S.M. Nurulain, N. Nagelkerke, M. Shafiullah, J. Kassa, K. Kuča, Five oximes (K-27, K-48, obidoxime, HI-6 and trimedoxime) in comparison with pralidoxime: survival in rats exposed to methyl-paraoxon, *J. Appl. Toxicol.* **27** (2007) 453-457.
- [54] V.N. Atanasov, I. Petrova, C. Dishovsky, In vitro investigation of efficacy of new reactivators on OPC inhibited rat brain acetylcholinesterase, *Chem.-Biol. Interact.* **203** (2013) 139-143.
- [55] M. Balali-Mood, H. Saber, Recent advances in the treatment of organophosphorous poisonings, *Iran. J. Med. Sci.* **37** (2012) 74-91.
- [56] M. Eddleston, N.A. Buckley, P. Eyer, A.H. Dawson, Management of acute organophosphorus pesticide poisoning, *Lancet* **371** (2008) 597-607.
- [57] E. Robenshtok, S. Luria, Z. Tashma, A. Hourvitz, Adverse reaction to atropine and the treatment of organophosphate intoxication, *Isr. Med. Assoc. J.* **4** (2002) 535-539.
- [58] T.C. Marrs, Diazepam in the Treatment of Organophosphorus Ester Pesticide Poisoning, *Toxicol. Rev.* **22** (2003) 75-81.
- [59] V.C. Moser, S. Padilla, Esterase metabolism of cholinesterase inhibitors using rat liver in vitro, *Toxicology* **281** (2011) 56-62.

- [60] A.C. Hemmert, T.C. Otto, M. Wierdl, C.C. Edwards, C.D. Fleming, M. MacDonald, J.R. Cashman, P.M. Potter, D.M. Cerasoli, M.R. Redinbo, Human Carboxylesterase 1 Stereoselectively Binds the Nerve Agent Cyclosarin and Spontaneously Hydrolyzes the Nerve Agent Sarin, *Mol. Pharmacol.* **77** (2010) 508-516.
- [61] A.N. Bigley, F.M. Raushel, Catalytic mechanisms for phosphotriesterases, *Biochim. Biophys. Acta* **1834** (2013) 443-453.
- [62] M.A. Sogorb, S. Garcia-Arguelles, V. Carrera, E. Vilanova, Serum albumin is as efficient as paraxonase in the detoxication of paraoxon at toxicologically relevant concentrations, *Chem. Res. Toxicol.* **21** (2008) 1524-1529.
- [63] E. Vilanova, M.A. Sogorb, The role of phosphotriesterases in the detoxication of organophosphorus compounds, *Crit. Rev. Toxicol.* **29** (1999) 21-57.
- [64] M. Kanamori-Kataoka, Y. Seto, Paraoxonase activity against nerve gases measured by capillary electrophoresis and characterization of human serum paraoxonase (PON1) polymorphism in the coding region (Q192R), *Anal. Biochem.* **385** (2009) 94-100.
- [65] M. Trovaslet-Leroy, L. Musilova, F. Renault, X. Brazzolotto, J. Misik, L. Novotny, M.-T. Froment, E. Gillon, M. Loiodice, L. Verdier, P. Masson, D. Rochu, D. Jun, F. Nachon, Organophosphate hydrolases as catalytic bioscavengers of organophosphorus nerve agents, *Toxicol. Lett.* **206** (2011) 14-23.
- [66] T.C. Otto, J.R. Scott, M.A. Kauffman, S.M. Hodgins, R.C. diTargiani, J.H. Hughes, E.P. Sarricks, G.A. Saturday, T.A. Hamilton, D.M. Cerasoli, Identification and characterization of novel catalytic bioscavengers of organophosphorus nerve agents, *Chem.-Biol. Interact.* **203** (2013) 186-190.
- [67] A. Gahlaut, A. Gothwal, A.K. Chhillar, V. Hooda, Electrochemical Biosensors for Determination of Organophosphorus Compounds: Review, *Open J. Appl. Biosens.* **1** (2012) 1-8.
- [68] S. Hussain, T. Siddique, M. Arshad, M. Saleem, Bioremediation and Phytoremediation of Pesticides: Recent Advances, *Crit. Rev. Env. Sci. Tec.* **39** (2009) 843-907.

- [69] R. Rahimi, S. Nikfar, M. Abdollahi, Increased morbidity and mortality in acute human organophosphate-poisoned patients treated by oximes: a meta-analysis of clinical trials, *Hum. Exp. Toxicol.* **25** (2006) 157-162.
- [70] K. Savolainen, Understanding the toxic action of organophosphates. In: *Handbook of Pesticide Toxicology*, Academic Press, USA, (2001) 1013-1043.
- [71] Y. Sharma, S. Bashir, M. Irshad, S.D. Gupta, T.D. Dogra, Effects of acute dimethoate administration on antioxidant status of liver and brain of experimental rats, *Toxicology* **206** (2005) 49-57.
- [72] K. Soltatinejad, M. Abdollahi, Current opinion on the science of organophosphate pesticides and toxic stress: a systematic review, *Med. Sci. Monit.* **15** (2009) 75-90.
- [73] M. Buyukokuroglu, M. Cemek, Y. Yurumez, Y. Yavuz, A. Aslan, Antioxidative role of melatonin in organophosphate toxicity in rats, *Cell Biol. Toxicol.* **24** (2008) 151-158.
- [74] J. Fortunato, F. Agostinho, G. Reus, F. Petronilho, F. Dal-Pizzol, J. Quevedo, Lipid peroxidative damage on malathion exposure in rats, *Neurotox. Res.* **9** (2006) 23-28.
- [75] A. Ranjbar, H. Solhi, F.J. Mashayekhi, A. Susanabdi, A. Rezaie, M. Abdollahi, Oxidative stress in acute human poisoning with organophosphorus insecticides; a case control study, *Environ. Toxicol. Phar.* **20** (2005) 88-91.
- [76] J.E. Chambers, R.L. Carr, S. Boone, H.W. Chambers, The metabolism of organophosphorus insecticides, In: *Handbook of Pesticide Toxicology*, Academic Press, USA, (2001) 919-927.
- [77] V. Đorđević, D. Pavlović, G. Kocić, *Biohemija slobodnih radikala*, Medicinski fakultet, Niš, 2000.
- [78] M. Akhgari, M. Abdollahi, A. Kebryaezadeh, R. Hosseini, O. Sabzevari, Biochemical evidence for free radical induced lipid peroxidation as a mechanism for subchronic toxicity of malathion in blood and liver of rats, *Hum. Exp. Toxicol.* **22** (2003) 205-208.
- [79] M. Abdollahi, A. Rainba, S. Shadnia, S. Nikfar, A. Rezaie, Pesticide and oxidative stress: a review, *Med. Sci. Monitor* **10** (2004) RA141-RA147.

- [80] F. Teimouri, N. Amirkabirian, H. Esmaily, A. Mohammadirad, A. Aliahmadi, M. Abdollah, Alteration of hepatic cells glucose metabolism as a non-holinergic detoxication mechanism in counteracting diazinon-induced oxidative stress, *Hum. Exp. Toxicol.* **25** (2006) 697-703.
- [81] F.P. Possamai, J.J. Fortunato, G. Feier, F.R. Agostinho, J. Quevedo, D. Wilhelm Filho, F. Dal-Pizzol, Oxidative stress after acute and sub-chronic malathion intoxication in Wistar rats, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **23** (2007) 198-204.
- [82] M. Dandapani, A. Zachariah, M.R. Kavitha, L. Jeyaseelan, A. Oommen, Oxidative damage in intermediate syndrome of acute organophosphorus poisoning, *Indian J. Med. Res.* **117** (2003) 253-259.
- [83] H. Petrovitch, G.W. Ross, R.D. Abbott, W.T. Sandersen, D.S. Sharp, C.M. Tanner, K.H. Masaki, P.L. Blanchette, J.S. Popper, D. Foley, L. Launer, L.R. White, Plantation Work and Risk of Parkinson Disease in a Population-Based Longitudinal Study, *Arch. Neurol.* **59** (2002) 1787-1792.
- [84] J.M. Mates, C. Perez-Gomez, I. De Castro, Antioxidant enzymes and human diseases, *Clin. Biochem.* **32** (1999) 595-603.
- [85] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, Oxidative stress: Adaptation, damage, repair and death, In: *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, Oxford, (1999) 246-349.
- [86] M. Valko, M. Izakovic, M. Mazur, C.J. Rhodes, J. Telser, Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence, *Mol. Cell. Biochem.* **266** (2004) 37-56.
- [87] A. Roszczenko, J. Rogalska, J. Moniuszko-Jakoniuk, M.M. Brzóska, The effect of exposure to chlorfenvinphos on lipid metabolism and apoptotic and necrotic cells death in the brain of rats, *Exp. Toxicol. Pathol.* (2012) doi:10.1016/j.etp.2012.03.002.
- [88] S.S. Wallace, Detection and repair of DNA base damages produced by ionizing radiation, *Environ. Mol. Mutagen.* **12** (1988) 431-477.
- [89] P. Das, A. Shaik, K. Jamil, Genotoxicity induced by pesticide mixtures: *in-vitro* studies on human peripheral blood lymphocytes, *Toxicol. Ind. Health* **23** (2007) 449-458.

- [90] C. Bolognesi, Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies, *Mutat. Res.-Rev. Mutat.* **543** (2003) 251-272.
- [91] S. Bull, K. Fletcher, A.R. Boobis, J.M. Battershill, Evidence for genotoxicity of pesticides in pesticide applicators: a review, *Mutagenesis* **21** (2006) 93-103.
- [92] S.M. Attia, Chromosomal composition of micronuclei in mouse bone marrow treated with rifampicin and nicotine, analyzed by multicolor fluorescence *in situ* hybridization with pancentromeric DNA probe, *Toxicology* **235** (2007) 112-118.
- [93] N.D. Turner, L.A. Braby, J. Ford, J.R. Lupton, Opportunities for nutritional amelioration of radiation-induced cellular damage, *Nutrition* **18** (2002) 904-912.
- [94] L. Settimi, A. Masina, A. Andrion, O. Axelson, Prostate cancer and exposure to pesticides in agricultural settings, *Int. J. Cancer* **104** (2003) 458-461.
- [95] P.J. Mink, H.-O. Adami, D. Trichopoulos, N.L. Britton, J.S. Mandel, Pesticides and prostate cancer: a review of epidemiologic studies with specific agricultural exposure information, *Eur. J. Cancer Prev.* **17** (2008) 97-110.
- [96] P.R. Band, Z. Abanto, J. Bert, B. Lang, R. Fang, R.P. Gallagher, N.D. Le, Prostate cancer risk and exposure to pesticides in British Columbia Farmers, *Prostate* **71** (2011) 168-183.
- [97] U.S. Environmental Protection Agency. Integrated Risk Information System. Carcinogenicity Assessment for Lifetime Exposure: Available from: <<http://www.epa.gov/iris/subst/0327.htm>>.
- [98] R.V. Žikić, A.Š. Štajn, Z.S. Saičić, M.B. Spasić, S.R. Milovanović, Toksikološki značaj zaštite od oksidacionih oštećenja, Prirodno-matematički fakultet, Kragujevac, 2000.
- [99] E. Niki, Y. Yoshida, Y. Saito, N. Noguchi, Lipid peroxidation: Mechanism, inhibition, and biological effects, *Biochem. Bioph. Res. Co.* **338** (2005) 668-676.
- [100] L.D. Nelson, M.M. Cox, Principles of Biochemistry, W.H. Freeman & Co., New York, USA, (2008) 661–665.
- [101] G. Barrera, S. Pizzimenti, U.M. Dianzani, Lipid peroxidation: control of cell proliferation, cell differentiation and cell death, *Mol. Aspects Med.* **29** (2008) 1–8.
- [102] J.L. Marnett, Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage, *Toxicology* **181-182** (2002) 219–222.

- [103] B. Halliwell, J.M. Gutteridge, Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview, *Methods Enzymol.* **186** (1990) 1-85.
- [104] C.C. Winterbourn, The biological chemistry of hydrogen peroxide, *Methods Enzymol.* **528** (2013) 3-25.
- [105] J. Boonstra, J.A. Post, Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells, *Gene*, **337** (2004) 1-13.
- [106] P.K. Suresh, A.K. Sah, Free radicals: generation, defense and implications in various diseases, *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, **4** (2013) 247-269.
- [107] J.C. Skou, M. Essman, The Na,K-ATPase, *J. Bioenerg. Biomembr.* **24** (1992) 249-261.
- [108] P.L. Jorgensen, K.O. Hakansson, J.D. Karlish, Structure and mechanism of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, *Annu. Rev. Physiol.* **65** (2003) 817-849.
- [109] G. Scheiner-Bobis, The sodium pump, its molecular properties and mechanism of ion transport, *Eur. J. Biochem.* **269** (2002) 2424-2433.
- [110] T.A. Pressley, Structure and function of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup> pump: ten years of molecular biology, *Miner. Electrolyte Metab.* **22** (1996) 264-271.
- [111] D.C. Chow, J.G. Forte, Functional significance of the  $\beta$  subunit for heterodimeric P-type ATPases, *J. Exp. Biol.* **198** (1995) 1-17.
- [112] P. Beguin, X. Wang, D. Firsov, A. Puoti, D. Claeys, J.D. Horisberger, K. Geering, The gamma subunit is a specific component of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and modulates its transport function, *EMBO J.* **16** (1997) 4250-4260.
- [113] E. Skriver, A.B. Manusch, H. Hebert, G. Scheiner-Bobis, W. Schonert, Two-dimensional crystalline arrays of Na,K-ATPase with new subunit interactions induced by cobalt-tetrammine-ATP, *J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.* **102** (1989) 189-195.
- [114] R.W. Albers, Biochemical aspects of active transport, *Annu. Rev. Biochem.* **36** (1967) 727-756.
- [115] T. Mijatović, E. Van Quaquebeke, B. Delest, O. Debeir, F. Darro, R. Kiss, Cardiotonic steroids on the road to anti-cancer therapy, *Biochim. Biophys. Acta* **1776** (2007) 32-57.



- [116] Z. Xie, T. Cai, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase-mediated signal transduction: From protein interaction to cellular function, *Mol. Interv.* **3** (2003) 157–168.
- [117] O. Hansen, Interaction of cardiac glycosides with (Na<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>)-activated ATPase. A biochemical link to digitalis-induced intropy, *Pharmacol. Rev.* **36** (1984) 143–163.
- [118] P.A. Doris, Endogenous inhibitors of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup> pump, *Miner. Electrolyte Metab.* **22** (1996) 303–310.
- [119] H. Lima Santos, C. Fortes Rigos, P. Ciancaglini, Kinetics behaviors of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase: Comparison of solubilized and DPPC:DPPE-liposome reconstituted enzyme, *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **142** (2006) 309–316.
- [120] P. Duchnowicz, P. Szczepaniak, M. Koter, Erythrocyte membrane protein damage byphenoxyacetic herbicides and their metabolites, *Pestic. Biochem. Physiol.* **82** (2005) 59–65.
- [121] A. Lukaszewicz-Hussain, Role of oxidative stress in organophosphate insecticide toxicity, *Pestic. Biochem. Phys.* **98** (2010) 145–150.
- [122] E.O. Oruc, Oxidative stress, steroid hormone concentrations and acetylcholinesterase activity in *Oreochromis niloticus* exposed to chlorpyrifos, *Pestic. Biochem. Physiol.* **96** (2010) 160–166.
- [123] N. Aly, K. EL-Gendy, F. Mahmoud, A.K. El-Sebae, Protective effect of vitamin C against chlorpyrifos oxidative stress in male mice, *Pestic. Biochem. Physiol.* **97** (2010) 7–12.
- [124] M. Fenech, Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, *Nat. Protoc.* **2** (2007) 1084–1104.
- [125] H. Brenneke, Strahlenschädigung von mause und Rattensperm, beobachtet an der Frühentwicklung der Eir, *Strahlenther.* **60** (1937) 214-238.
- [126] M. Fenech, A.A. Morley, Measurement of micronuclei in human lymphocytes, *Mutat. Res.* **148** (1985) 29-36.
- [127] M. Fenech, A.A. Morley, Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in vivo* ageing and low dose X-irradiation, *Mutat. Res.* **161** (1986) 193-198.

- [128] M. Fenech, N. Holland, W.P. Zhang, E. Zeiger, S. Bonassi, The HUMN project: an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans, *Mutat. Res.* **428** (1999) 271-283.
- [129] S. Bonassi, L. Hagmar, U. Stromberg, A. Huici Montagud, H. Tinneberg, A. Forni, P. Heikkila, S. Wanders, P. Wilhardt, I.L. Hainsteen, L.E. Knudsen, H. Norppa, Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens, *Cancer Res.* **60** (2000) 1619-1625.
- [130] G. Joksić, S. Petrović, Ž. Ilić, Age-related changes in radiation-induced micronuclei among healthy adults, *Braz. J. Med. Biol. Res.* **37** (2004) 1111-1117.
- [131] G. Joksić, S. Petrović, Lack of adaptive response of human lymphocytes exposed *in vivo* to low doses of ionizing radiation, *J. Environ. Pathol. Tox.* **23** (2004) 195-206.
- [132] S. Petrović, A. Leskovac, G. Joksić, Radioprotective properties of *Gentiana dinarica* polyphenols on human lymphocytes *in vitro*, *Curr. Sci. India* **95** (2008) 1035-1041.
- [133] H. Shemer, K.G. Linden, Degradation and by-product formation of diazinon in water during UV and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment, *J. Hazard. Mater. B* **136** (2006) 553–559.
- [134] I. Dubus, J. Hollis, C. Brown, Pesticides in rainfall in Europe, *Environ. Pollut.* **110** (2000) 331–344.
- [135] P.C.H. Li, E.J. Swanson, F.A.P.C. Gobas, Diazinon and its degradation products in agricultural water courses in British Columbia, Canada, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **69** (2002) 59–65.
- [136] S. Garcia, C. Ake, B. Clement, H. Huebner, K. Donnelly, S. Shalat, Initial results of environmental monitoring in the Texas Rio Grande valley, *Environ. Int.* **26** (2001) 465–474.
- [137] R.H. Coupe, J.D. Blomquist, Water-soluble pesticides in finished water of community water supplies, *J. AWWA* **96** (2004) 56–68.
- [138] M. Bavcon Kralj, U. Černigoj, M. Franko, P. Trebše, Comparison of photocatalysis and photolysis of malathion, isomalathion, malaoxon and commercial malathion-products and their toxicity studies, *Water Res.* **41** (2007) 4504–4514.

- [139] K.D. Racke, Degradation of organophosphorus insecticides in environmental matrices, In: J.E. Chambers, P.E. Levi (Eds.), *Organophosphates, Chemistry, Fate, and Effects*, Academic Press, San Diego, (1992) 47–73.
- [140] M. Bavcon, P. Trebse, L. Zupancic-Kralj, Investigations of the determination and transformations of diazinon and malathion under environmental conditions using gas chromatography coupled with a flame ionisation detector, *Chemosphere* **50** (2003) 595–601.
- [141] T.S. Kim, J.K. Kim, K. Choi, M.K. Stenstrom, K.D. Zoh, Degradation mechanism and the toxicity assessment in TiO<sub>2</sub> photocatalysis and photolysis of parathion, *Chemosphere* **62** (2006) 926–933.
- [142] A. Dannenberg, S.O. Pehkonen, Investigation of the heterogeneously catalyzed hydrolysis of organophosphorus pesticides, *J. Agric. Food Chem.* **46** (1998) 325–334.
- [143] S.O. Pehkonen, Q. Zhang, The degradation of organophosphorus pesticides in natural waters: a critical review, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **32** (2002) 17–72.
- [144] R. Doong, W. Chang, Photoassisted titanium dioxide mediated degradation of organophosphorus pesticides by hydrogen peroxide, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **107** (1997) 239–244.
- [145] C. Zamy, P. Mazellier, B. Legube, Phototransformation of selected organophosphorus pesticides in dilute aqueous solutions, *Water Res.* **38** (2004) 2305–2314.
- [146] M. Bavcon Kralj, M. Franko, P. Trebše, Photodegradation of organophosphorus insecticides – investigations of products and their toxicity using gas chromatography mass-spectrometry and AChE-thermal lens spectrometric bioassay, *Chemosphere* **67** (2007) 99–107.
- [147] V.N. Kouloumbos, D.F. Tsipi, A.E. Hiskia, D. Nikolic, R.B. van Breemen, Identification of photocatalytic degradation products of diazinon in TiO<sub>2</sub> aqueous suspensions using GC/MS/MS and LC/MS with quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectr.* **14** (2003) 803-817.
- [148] T. Lazarević-Pašti, B. Nastasijević, V. Vasić, Oxidation of chlorpyrifos, azinphos-methyl and phorate by myeloperoxidase, *Pestic. Biochem. Phys.* **101** (2011) 220-226.

- [149] M. Hincapie, M.I. Maldonado, I. Oller, W. Gernjak, J.A. Sanchez-Perez, M.M. Ballesteros, S. Malato, Solar photocatalytic degradation and detoxification of EU priority substances, *Catal. Today* **101** (2005) 203–210.
- [150] H.D. Burrows, M. Canle, J.A. Santaballa, S. Steenken, Reaction pathways and mechanisms of photodegradation of pesticides, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **67** (2002) 71–108.
- [151] J. Wu, T. Luan, C. Lan, T.W.H. Lo, G.Y.S. Chan, Removal of residual pesticides on vegetable using ozonated water, *Food Control* **18** (2007) 466–472.
- [152] J. Wu, C. Lan, G.Y.S. Chan, Organophosphorus pesticide ozonation and formation of oxon intermediates, *Chemosphere* **76** (2009) 1308–1314.
- [153] Y. Hirahara, H. Ueno, K. Nakamuro, Aqueous photodegradation of fenthion by ultraviolet B irradiation: contribution of singlet oxygen in photodegradation and photochemical hydrolysis, *Wat. Res.* **37** (2003) 468–476.
- [154] I.K. Konstantinou, T.A. Albanis, Review, photocatalytic transformation of pesticides in aqueous titanium dioxide suspensions using artificial and solar light: intermediates and degradation pathways, *Appl. Catal. B: Environ.* **42** (2003) 319–335.
- [155] A.S. Derbalah, N. Nakatani, H. Sakugawa, Photocatalytic removal of fenitrothion in pure and natural waters by photo-Fenton reaction, *Chemosphere* **57** (2004) 635–644.
- [156] E. Evgenidou, E. Bizani, C. Christophoridis, K. Fytianos, Heterogeneous photocatalytic degradation of prometryn in aqueous solutions under UV/Vis irradiation, *Chemosphere* **68** (2007) 1877–1882.
- [157] M. Bavcon Kralj, P. Trebše, M. Franko, Applications of bioanalytical techniques in evaluating advanced oxidation processes in pesticide degradation, *Trends Anal. Chem.* **26** (2007) 1020–1031.
- [158] M. Pohanka, Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology, *Biomed. Pap.* **155** (2011) 219–230.
- [159] A.R. Fernandez-Alba, D. Hernando, A. Aguera, J. Caceres, S. Malato, Toxicity assays: a way for evaluating AOPs efficiency, *Water Res.* **36** (2002) 4255–4262.
- [160] C. Nistor, J. Emneus, Bioanalytical tools for monitoring polar pollutants, *Waste Manage.* **19** (1999) 147–170.

- [161] M. Farre, R. Brix, D. Barcelo, Screening water for pollutants using biological techniques under European Union funding during the last 10 years, *Trends Anal. Chem.* **24** (2005) 532–545.
- [162] N. Kobayashi, S. Yamato, H. Harino, M. Kitano, A bioassay using sea urchin egg development to identify organotin pollution in sea water, *Coast. Mar. Sci.* **32** (2008) 77–81.
- [163] S.V. Dzyadevych, A.P. Soldatkin, V.N. Arkhypova, A.V. Elskaya, J.M. Chovelon, C.A. Georgiou, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault, Early-warning electrochemical biosensor system for environmental monitoring based on enzyme inhibition, *Sensors Actuat. B* **105** (2005) 81–87.
- [164] D. Neela Priya, Jayant M. Modak, P. Trebše, R. Žabar, A.M. Raichur, Photocatalytic degradation of dimethoate using LbL fabricated TiO<sub>2</sub>/polymer hybrid films, **195** (2011) 214–222.
- [165] S. Malato, J. Blanco, A. Vidal, D. Alarcon, M.I. Maldonado, J. Caceres, W. Gernjak, Applied studies in solar photocatalytic detoxification: an overview, *Sol. Energy* **75** (2003) 329–336.
- [166] E. Evgenidou, K. Fytianos, I. Poulios, Photocatalytic oxidation of dimethoate in aqueous solutions, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **175** (2005) 29–38.
- [167] E. Evgenidou, K. Fytianos, I. Poulios, Semiconductor-sensitized photodegradation of dichlorvos in water using TiO<sub>2</sub> and ZnO as catalysts, *Appl. Catal. B* **59** (2005) 81–89.
- [168] S.V. Dzyadevych, J.M. Chovelon, A comparative photodegradation studies of methyl parathion by using Lumistox test and conductometric biosensor technique, *Mater. Sci. Eng. C* **21** (2002) 55–60.
- [169] National Agricultural Statistics Service (NASS), Agricultural Chemical Usage 2005, Field Crops Summary, Agricultural Statistics Board, May 2006, NASS, USDA, Washington, DC, USA, 2006.
- [170] V. Vasić, D. Jovanović, D. Krstić, G. Nikezić, A. Horvat, Lj. Vujisić, N. Nedeljković, Prevention and recovery of CuSO<sub>4</sub> induced inhibition of Na,K-ATPase and Mg-ATPase in rat brain synaptosomes by EDTA, *Toxicol. Lett.* **110** (1999) 95–104.

- [171] R.S. Cohen, F. Blomberg, K. Berzins, P. Siekevitz, The structure of postsynaptic densities isolated from dog cerebral cortex. I. Overall morphology and protein composition, *J. Cell. Biol.* **74** (1977) 181-203.
- [172] R.I. Post, C.R. Merit, C.R. Kosolving, C.D. Albright, Membrane adenosinetriphosphatase as a participant in the active transport of sodium and potassium in the human erythrocyte, *J. Biol. Chem.* **235** (1960) 1796–1802.
- [173] D. Krstić, K. Krinulović, V. Spasojević-Tišma, G. Joksić, T. Momić, V. Vasić, Effects of Digoxin and Gitoxin on the Enzymatic Activity and Kinetic Parameters of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, **19** (2004) 409-415.
- [174] Law on health care, 2005. Official Gazette of the Republic of Serbia, Parliament of the Republic of Serbia. 107, 112-161.
- [175] G.L. Ellman, K.D. Courtney, V. Andreas, R.M. Featherstone, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharm.* **7** (1961) 88–90.
- [176] J.R. Seals, J.M. McDonald, D. Bruns, L. Jarett, A sensitive and precise isotopic assay of ATPase activity, *Anal. Biochem.* **90** (1978) 785–795.
- [177] J. Sudo, J. Terui, H. Iwase, K. Kakuno, Assay of ATPase and Na,K-ATPase activity using high-performance liquid chromatographic determination of ADP derived from ATP, *J. Chromatogr. B* **744** (2000) 19–23.
- [178] E. Beutler, *Red Cell Metabolism, A Manual of Biochemical Methods* (third ed.), Grune and Startton, New York, 1984. p. 133.
- [179] A. Wendel, *Enzymatic basis of detoxication*, Academic Press, New York, 1980. p. 333.
- [180] H.P. Misra, I. Fridovich, The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase, *J. Biol. Chem.* **247** (1972) 3170–3175.
- [181] O. Chilson, L. Costello, N. Kaplan, Studies on the Mechanism of Hybridization of Lactic Dehydrogenases *in Vitro*, *Biochemistry* **4** (1965) 271-281.
- [182] O.I. Aruoma, B. Halliwell, M.J. Laughton, G.J. Quinlan, J.M.C. Gutteridge, The mechanism of initiation of lipid peroxidation. Evidence against a requirement for an iron (II)-iron (III) complex, *Biochem. J.* **258** (1989) 617–620.

- [183] M.Fenech, The cytokinesis blocks micronucleus technique: a detailed description on the method and its application to genotoxicity studies in human population, *Mutat. Res.* **285** (1993) 35-44.
- [184] J. Surrales, N. Xamena, A. Creus, R.Marco, The suitability of the micronucleus assay in human lymphocytes as a new biomarker of excision repair, *Mutat. Res.* **342** (1995) 43-59.
- [185] A. K. Markwel, S. M. Haas, L.L. Bieber, N. E. Tolbert, A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples, *Anal. Biochem.* **87** (1978) 206–210.
- [186] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin-Phenol reagents, *J. Biol. Chem.* **193** (1951) 265-275.
- [187] S. Islam, M.S. Hossain, N. Nahar, M. Mosihuzzaman, M.I.R. Mamun, Application of high performance liquid chromatography to the analysis of pesticide residues in eggplants, **9** (2009) 973-977.
- [188] L. Pogačnik, M. Franko, Optimisation of FIA system for detection of organophosphorous and carbamate pesticides based on cholinesterase inhibition, *Talanta* **54** (2001) 631–641.
- [189] D. Krstić, M.Čolović, M.Bavcon-Kralj, M.Franko, K.Krinulović, P.Trebše, V.Vasić, Inhibition of AChE by malathion and some structurally similar compounds, *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.* **23** (2008) 562-573.
- [190] M. Bavcon Kralj, P. Trebše, M. Franko, Oxidation as a prestep in determination of organophosphorus compounds by the AChE-TLS bioassay, *Acta Chim. Slov.* **53** (2006) 43–51.
- [191] A. Boškin, C.D. Tran, M. Franko, Oxidation of organophosphorus pesticides with chloroperoxidase enzyme in the presence of an ionic liquid as co-solvent, *Environ. Chem. Lett.* **7** (2009) 267-270.
- [192] T. Lazarević-Pašti, T. Momić, A. Onija, Lj. Vujisić, V. Vasić, Myeloperoxidase-mediated oxidation of organophosphorus pesticides as a pre-step in their determination by AChE based bioanalytical methods, *Microchim. Acta* **170** (2010) 289-297.

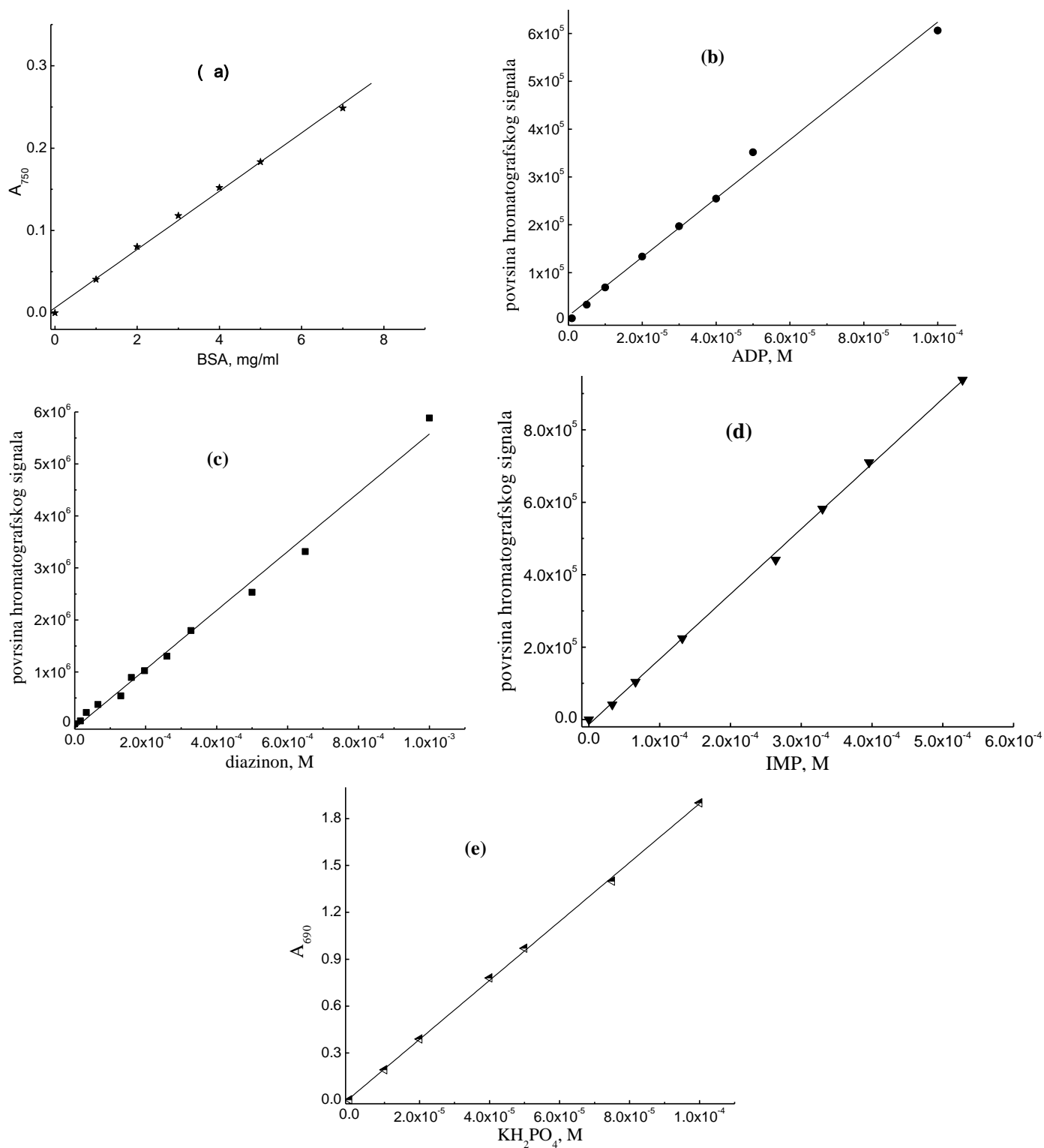
- [193] T.D. Lazarević-Pašti, A.M. Bondžić, Igor A. Pašti, Vesna M. Vasić, Indirect electrochemical oxidation of organophosphorous pesticides for efficient detection via acetylcholinesterase test, *Pestic. Biochem. Phys.* **104** (2012) 236–242.
- [194] Z. Knežević, L. Mojović, B. Adnadjević, Immobilization of lipase on a hydrophobic zeolite type Y, *J. Serb. Chem. Soc.* **63** (1998) 257–264.
- [195] M.B. Čolović, D.Z. Krstić, G.S. Ušćumlić, V.M. Vasić, Single and simultaneous exposure of acetylcholinesterase to diazinon, chlorpyrifos and their photodegradation products, *Pestic. Biochem. Phys.* **100** (2011) 16–22.
- [196] M. Čolović, D. Krstić, S. Petrović, A. Leskovic, G. Joksić, J. Savić, M. Franko, P. Trebše, V. Vasić, Toxic effects of diazinon and its photodegradation products, *Toxicol. Lett.* **193** (2010) 9–18.
- [197] D. Krstić, M. Čolović, K. Krinulović, D. Djurić, V. Vasić, Inhibition of AChE by single and simultaneous exposure to malathion and its degradation products, *Gen. Physiol. Biophys.* 2007, **26**, 247–253.
- [198] D. Krstić, M. Čolović, M. Bavcon Kralj, P. Trebše, K. Krinulović, V. Vasić, The influence of malathion and its decomposition products on free and immobilized acetylcholinesterase, *Russ. J. Phys. Chem. A* **82** (2008) 663–668.
- [199] M. Franko, M. Sarakha, A. Čibej, A. Boškin, M. Bavcon, P. Trebše, Photodegradation of pesticides and application of bioanalytical methods for their detection, *Pure Appl. Chem.* **77** (2005) 1727-1736.
- [200] N. Uner, E.O. Oruc, Y. Sevgiler, Oxidative stress-related and ATPase effects of etoxazole in different tissues of *Oreochromis niloticus*, *Environ. Toxicol. Phar.* **20** (2005) 99-106.
- [201] E.O. Oruc, N. Uner, L. Tamer, Comparison of Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase activities and malondialdehyde contents in liver tissue for three fish species exposed to azinphosmethyl, *B. Environ. Contam. Tox.* **69** (2002) 271-277.
- [202] K. Avezov, LDH enzyme activity in human saliva: The effect of exposure cigarette smoke and its different components, *Arch. Oral Biol.* **59** (2014), article in press.
- [203] L. Pogacnik, M. Franko, Determination of organophosphate and carbamate pesticides in spiked samples of tap water and fruit juices by a biosensor with photothermal detection, *Biosens. Bioelectron.* **14** (1999) 569–578.



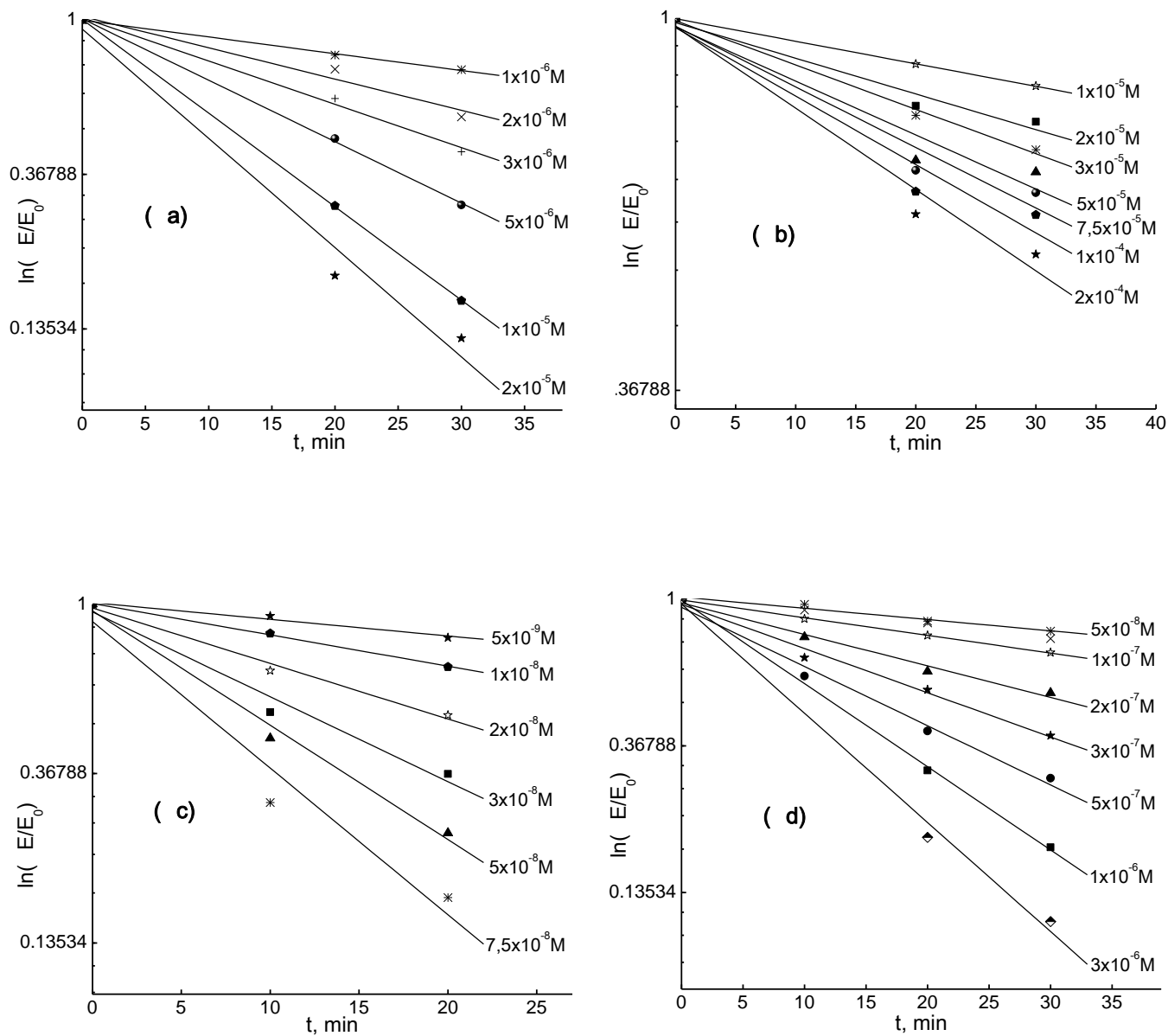
- [204] M. Trojanowicz, M. Szewczynska, Biosensing in high-performance chemical separations, *Trends Anal. Chem.* **24** (2005) 92–106.
- [205] A.F. Danet, B. Bucur, M-C. Cheregi, M. Badea, S. Serban, Spectrophotometric determination of organophosphoric insecticides in a FIA system based on AChE inhibition, *Anal. Lett.* **36** (2003) 59–73.
- [206] B. Prieto-Simon, M. Campas, S. Andreescu, J.L. Marty, Trends in flow-based biosensing systems for pesticide assessment, *Sensors* **6** (2006) 1161–1186.
- [207] P. Basha, M. Nayeemunnisa, Effect of methyl parathion on Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> and Mg<sup>2+</sup> adenosine triphosphatase activity in developing central nervous system in rats, *Indian J. Exp. Biol.* **31** (1993) 785–787.
- [208] E.O. Oruc, D. Usta, Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*, *Environ. Toxicol. Phar.* **23** (2007) 48–55.
- [209] G. Amitai, D. Moorad, R. Adani, B.P. Doctor, Inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase by chlorpyrifos-oxon, *Biochem. Pharmacol.* **56** (1998) 293–299.
- [210] T.S. Poet, H. Wu, A.A. Kousba, C. Timchalk, *In vitro* rat hepatic and intestinal metabolism of the organophosphate pesticides chlorpyrifos and diazinon, *Toxicol. Sci.* **72** (2003) 193–200.
- [211] Y. Ku, J.L. Chang, S.C. Cheng, Effect of solution pH on the hydrolysis and photolysis of diazinon in aqueous solution, *Water Air Soil Poll.* **108** (1998) 445–456.
- [212] A. Sahoo, L. Samanta, A. Das, K.S. Patra, B.N.G. Chai, Hexachlorocyclohexane-induced behavioural and neurochemical changes in rat, *J. Appl. Toxicol.* **19** (1999) 13–18.
- [213] J.I. Kourie, Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms, *Am. J. Physiol.* **275** (1998) C1–C24.
- [214] M.J. Shattock, H. Matsuura, Measurement of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> pump current in isolated rabbit ventricular myocytes using the whole cell voltage-clamp technique. Inhibition of the pump by oxidant stress, *Circ. Res.* **72** (1993) 91–101.

- [215] B.D. Banerjee, V. Seth, A. Bhattacharya, S.T. Pasha, A.K. Chakraborty, Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers, *Toxicol. Lett.* **107** (1999) 33–47.
- [216] L.J. Franco, T. Posser, J.J. Mattos, R. Trevisan, S.P. Brocardo, S.A.L. Rodrigues, B.R. Leal, M. Farina, R.F.M. Marques, C.D.A. Bairy, L.A. Dafre, Zinc reverses malathion-induced impairment in antioxidant defenses, *Toxicol. Lett.* **187** (2009) 137–143.
- [217] A.A. Radi, B. Matcovics, Effects of metal ions on the antioxidant enzyme activities, protein contents and lipid peroxidation of carp tissues, *Comp. Biochem. Phys.* **90** (1988) 69–72.
- [218] R. Cicchetti, M. Bari, G. Argentin, Induction of micronuclei in bone marrow by two pesticides and their differentiation with CREST staining: an *in vivo* study in mice, *Mutat. Res.* **439** (1999) 239–248.
- [219] A.D. Gentile, J. Henry, J.A. Katz, P.D. Skoner, Inhibition of peripheral blood mononuclear cell proliferation by cardiac glycosides, *Ann. Allerg. Asthma Im.* **78** (1997) 466–472.
- [220] V.M. Vasić, T.G. Momić, M. Petković, D.Z. Krstić, Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase as the target enzyme for organic and inorganic compounds, *Sensors* **8** (2008) 8321–8360.
- [221] Z. Jia, P.H. Misra, Reactive oxygen species in *in vitro* pesticide induced neuronal cell (SH-SY5Y) cytotoxicity: Role of NFκB and caspase-3, *Free Radical Bio. Med.* **42** (2007) 288–298.
- [222] F. Gultekin, M. Ozturk, M. Akdogan, The effect of OP insecticide chlorpyrifos ethyl on lipid peroxidation and antioxidant enzyme (*in vitro*), *Arch. Toxicol.* **74** (2000) 533–538.

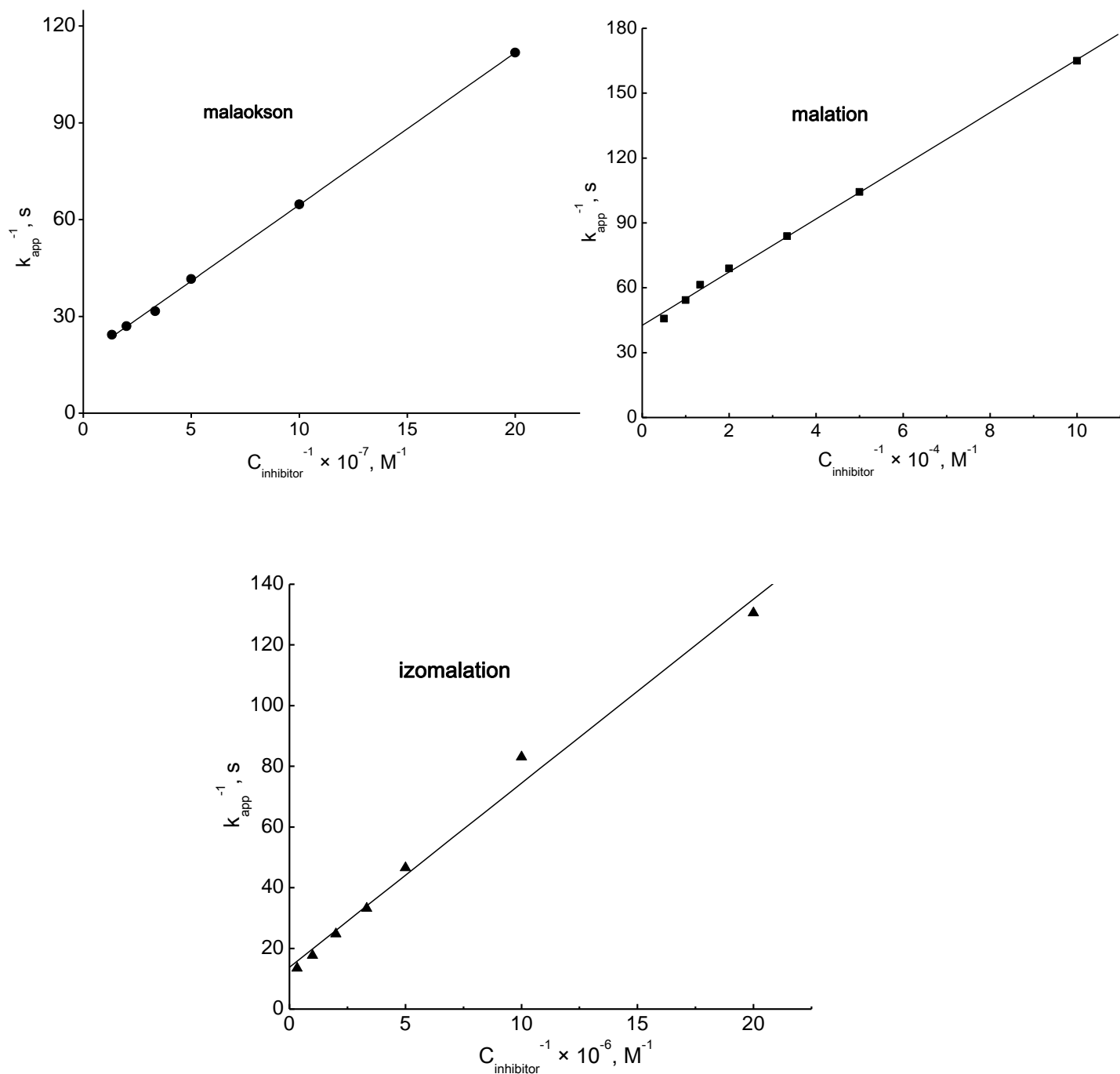
## 8. PRILOZI



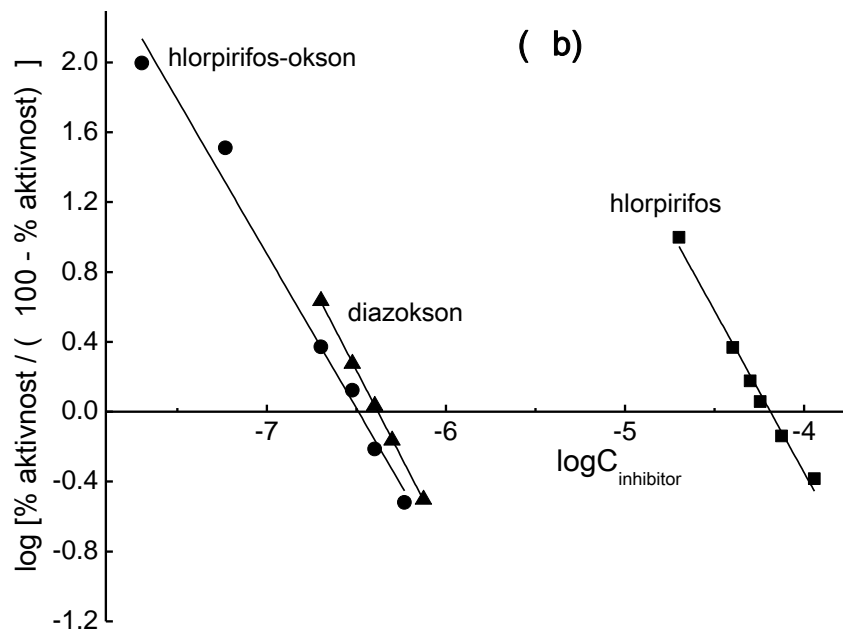
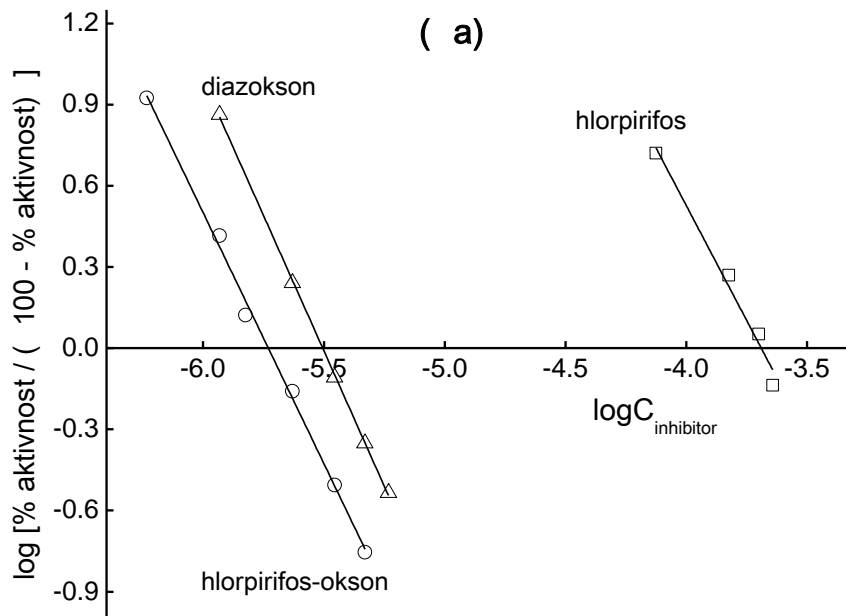
**Slika P1.** Standardne prave za određivanje koncentracija: a) proteina, b) ADP, c) diazinona, d) IMP i e) fosfata.



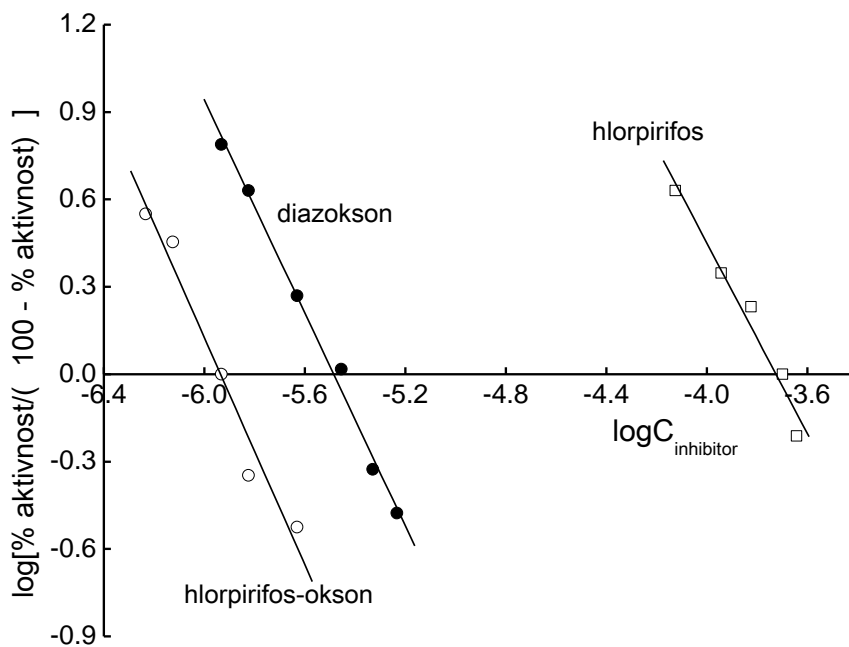
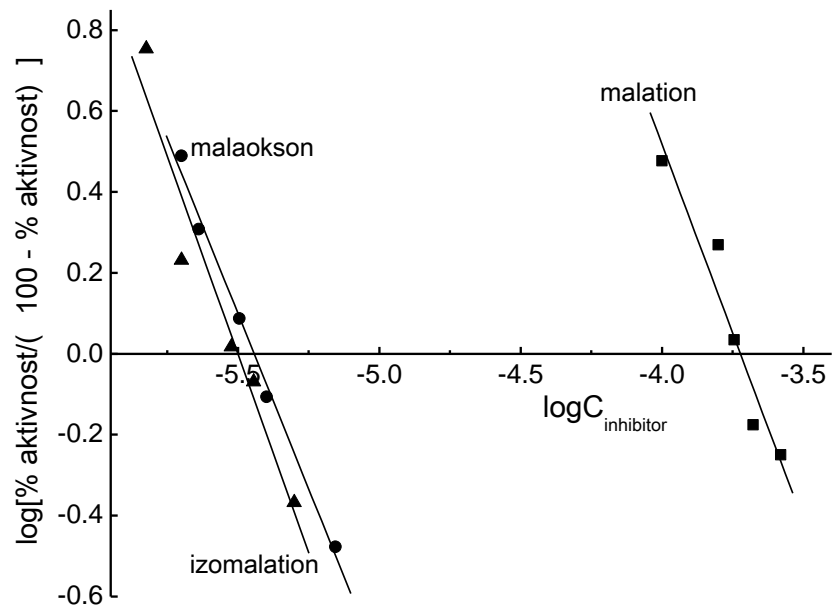
**Slika P2.** Progresivan razvoj inhibicije tokom reakcije AChE iz električne jegulje sa različitim koncentracijama: a) hlorpirifosa, b) malationa, c) malaoksona i d) izomalationa.



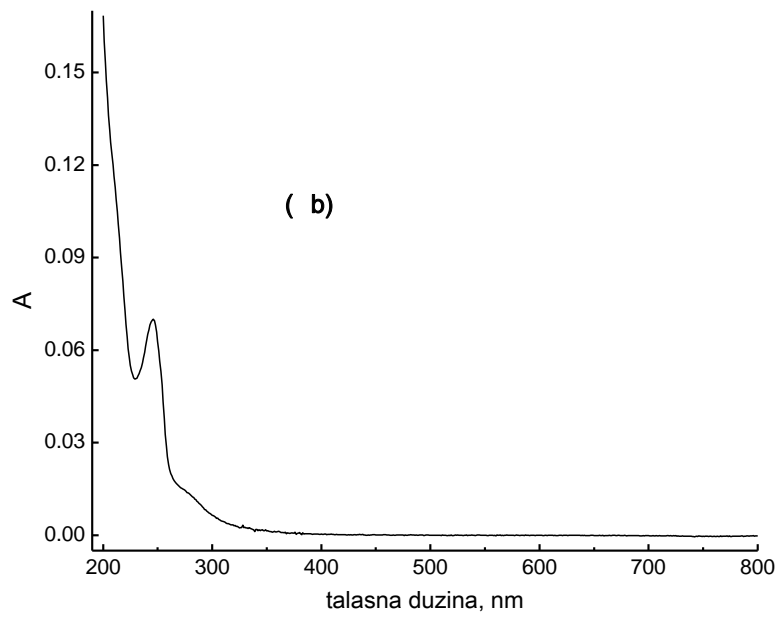
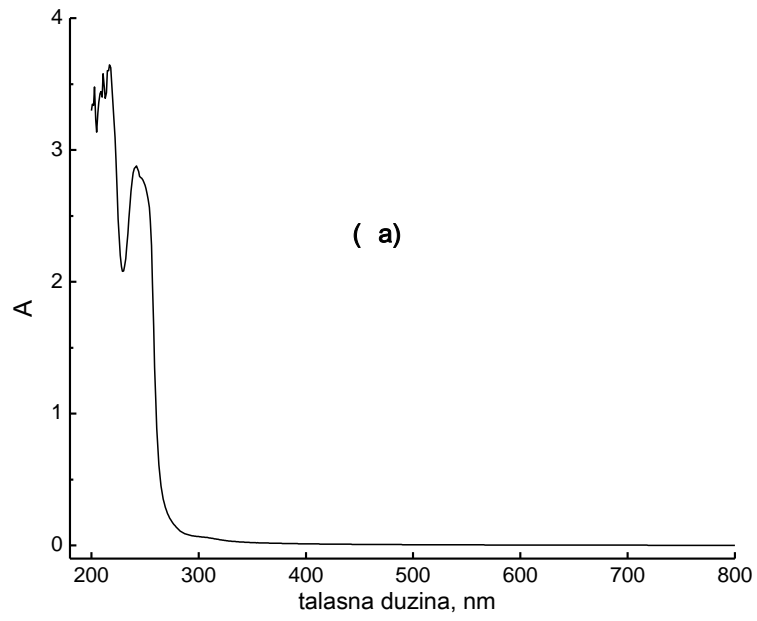
**Slika P3.** Zavisnost  $1/k_{app}$  od recipročne vrednosti koncentracije malaoksona, malationa i izomalationa.



**Slika P4.** Hilova analiza inhibicije aktivnosti AChE iz goveđih eritrocita nakon 0 (a) i 5 minuta (b) preinkubacije sa hlorpirifosom, hlorpirifos-oksonom i diazoksonom.

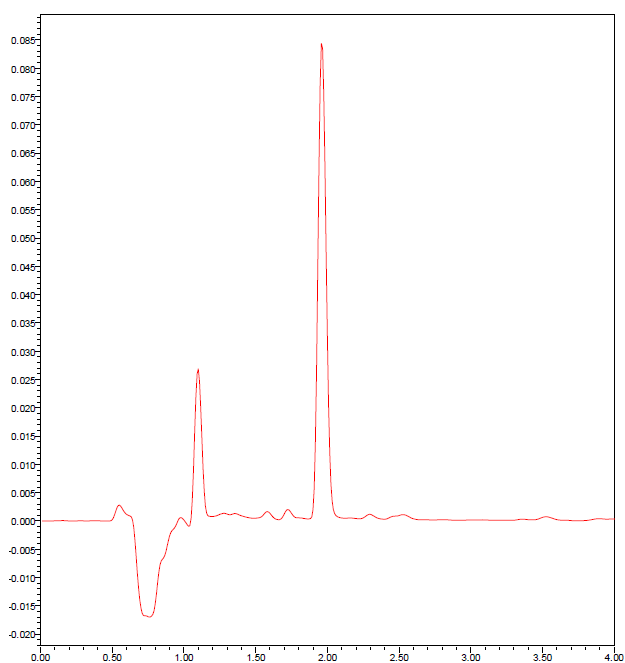


**Slika P5.** Hilova analiza inhibicije aktivnosti imobilizovane AChE u FIA sistemu u prisustvu malationa, malaoksona, izomalationa, hlorpirifosa, hlorpirifos-oksona i diazoksona.

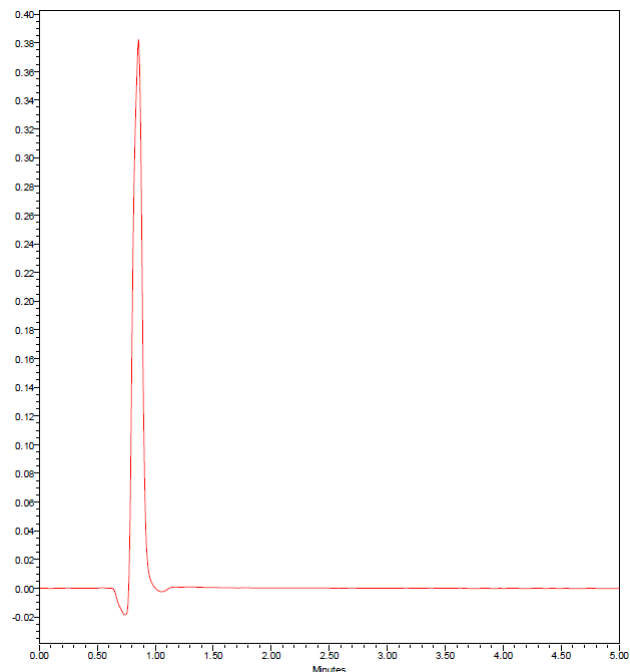


**Slika P6.** Apsorpcioni spektri 1 mM diazinona (a) i 0,01 mM diazoksona (b).

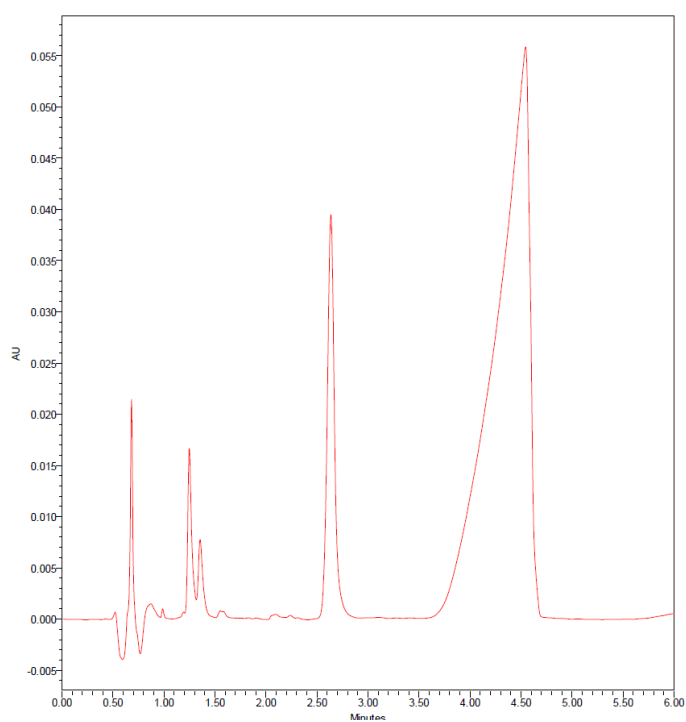




(a)



(b)

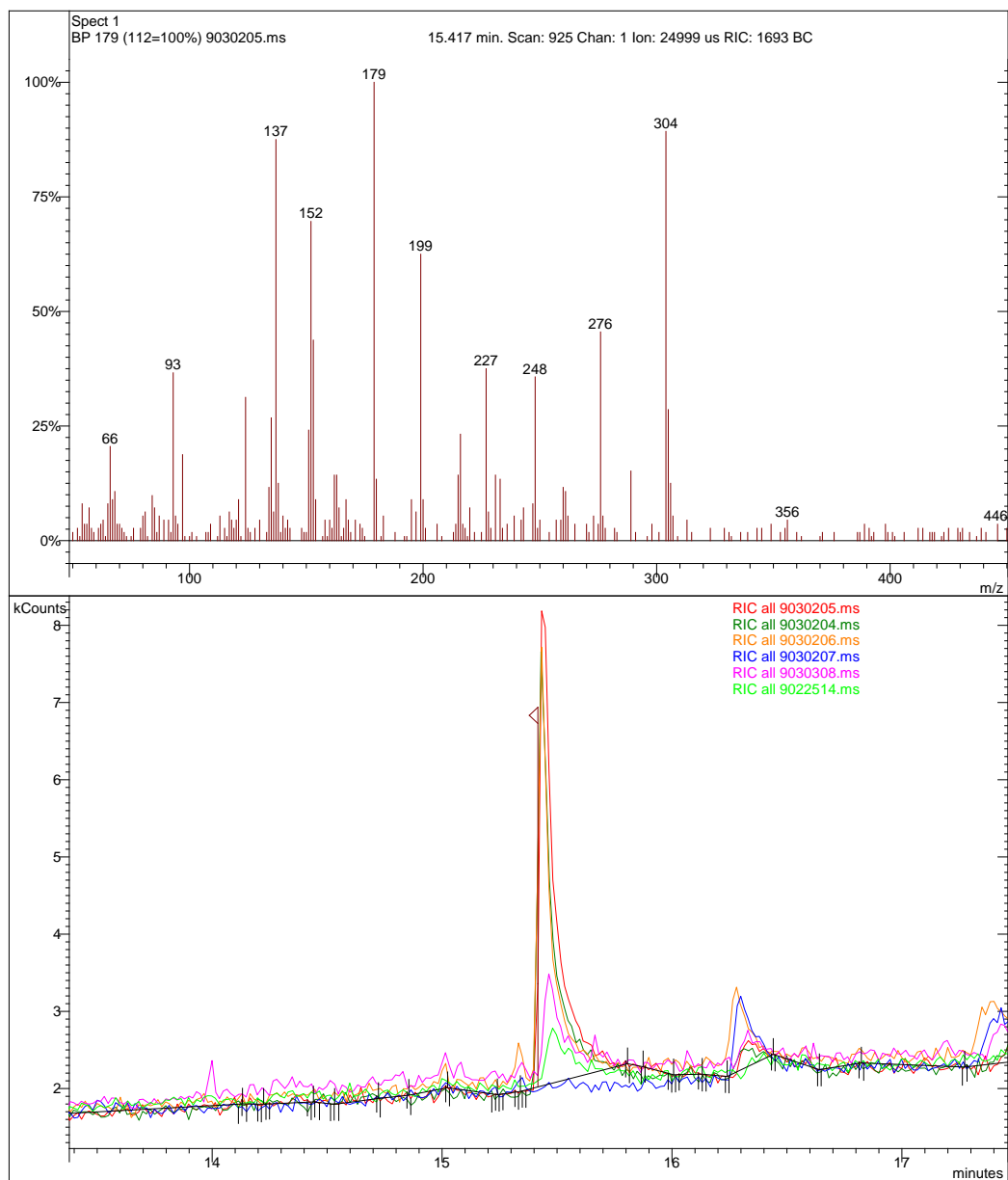


(c)

**Slika P7.** Hromatogrami standardnih rastvora diazinona (0,1 mM) i diazoksona (0,03 mM) (a), IMP (0,5 mM) (b) i ADP u esaju za određivanje aktivnosti Na,K-ATPaze, dobijeni UPLC-UV/Vis analizom.

## Overlaid Chromatogram Plots

Plot 1: c:\analyze\vinca\lab 050\9030205.ms RIC all  
Plot 2: c:\analyze\vinca\lab 050\9030204.ms RIC all  
Plot 3: c:\analyze\vinca\lab 050\9030206.ms RIC all  
Plot 4: c:\analyze\vinca\lab 050\9030207.ms RIC all  
Plot 5: c:\analyze\vinca\lab 050\9030308.ms RIC all  
Plot 6: c:\analyze\vinca\lab 050\9022514.ms RIC all



**Slika P8.** Maseni spektri i hromatogrami ozračenih rastvora diazinona dobijeni GC-MS analizom.

## BIOGRAFIJA

Mirjana B. Čolović je rođena 14.03.1976. u Pljevljima (Crna Gora) gde je završila osnovnu školu i gimnaziju prirodno-matematičkog smera. Na Tehnološko-metalurškom fakultetu u Beogradu, smeru biohemijско inženjerstvo i biotehnologija diplomirala je 10. 05. 2004. godine sa prosečnom ocenom 8,67 i odbranjenim diplomskim radom sa ocenom 10. U junu 2005. godine započela je volonterski rad u Laboratoriji za fizičku hemiju, INN „Vinča“ gde je 01.01.2006. zaposlena na projektu Ministarstva za nauku Republike Srbije „Mehanizmi interakcije fiziološki aktivnih jedinjenja sa biomolekulima“. Trenutno je angažovana na nacionalnom projektu „Istraživanja interakcija enzima sa toksičnim i farmakološki aktivnim molekulima“. Istraživački rad je usmeren na toksične efekte organofosfatnih insekticida i proizvoda njihove degradacije i bioanalitičke sisteme za njihovu detekciju. Bavi se i istraživanjem interakcija polioksometalata (polioksovanadata, polioksovolframata) i metalnih kompleksa sa ATPazama, holinesterazama i antioksidantnim enzimima. Do sada je bila angažovana na dva nacionalna i tri međunarodna naučna projekta. U inostranstvu je pohađala kurseve i treninge iz oblasti biosenzora, tačne hromatografije, hemije izotopa i kaskadnih hemo-enzimskih procesa. Autor je ili koautor 21 rada publikovanih u međunarodnim časopisima, 2 rada u časopisima nacionalnog značaja, kao i 30 saopštenja na međunarodnim i domaćim naučnim skupovima. Koautor je i poglavlja u knjizi istaknutog međunarodnog izdavača. Recenzirala je radove za 2 vrhunska međunarodna časopisa. Citiranost (bez autocitata) je 65.

## Изјава о ауторству

Потписана Мирјана Б. Чоловић

број уписа ДС 32/07

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Биоаналитичке методе за детекцију и евалуацију токсичности орвано-тиофосфатних  
инсектицида и производа њихове деградације

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

**Потпис докторанда**

У Београду, 02. 03. 2014.

Чоловић Мирјана

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Мирјана Б. Чоловић

Број уписа ДС 32/07

Студијски програм Хемија и хемијска технологија

Наслов рада Биоаналитичке методе за детекцију и евалуацију токсичности органо-  
тиофосфатних инсектицида и производа њихове деградације

Ментор проф. др Ушћумлић Гордана  
др Васић Весна

Потписани Мирјана Б. Чоловић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис докторанда**

У Београду, 02. 03. 2014.

Чоловић Мирјана

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Биоаналитичке методе за детекцију и евалуацију токсичности органо-  
тиофосфатних инсектицида и производа њихове деградације

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

**Потпис докторанда**

У Београду, 02. 03. 2014.

Тереза Милана