



# ***Organska zagađivala u okolišu – markeri i biomarkeri toksičnosti***

***Istraživački projekt  
HrZZ IP-2013-11-8366***



INSTITUT ZA MEDICINSKA ISTRAŽIVANJA I MEDICINU RADA

HRVATSKA ZAKLADA ZA ZNANOST



## Impressum

---

### Naziv projekta

Organska zagađivala u okolišu –  
markeri i biomarkeri toksičnosti

### Akronim

OPENTOX

### Vrsta projekta

Istraživački projekt u području  
biomedicine i zdravstva

### Nositelj

Institut za medicinska  
istraživanja i medicinu rada,  
Zagreb

### Glavni istraživač

Davor Želježić  
E-adresa: dzeljezi@imi.hr  
Tel: (+385 1) 4682 500

### Pokrovitelj

Hrvatska zaklada za znanost  
(HrZZ, šifra: 8366)

### Trajanje

1. 9. 2014. – 31. 8. 2018.

### Web stranica

<http://opentox.imi.hr/>

### Prijelom i tisak brošure

Denona d.o.o.

© 2017. Institut za medicinska  
istraživanja i medicinu rada,  
Zagreb. Sva prava pridržana.

### Istraživači na projektu (abecedno)

Nataša Brajenović  
Irena Brčić Karačonji  
Vlasta Drevenkar  
Marija Dvorščak  
Sanja Fingler Nuskern  
Radovan Fuchs  
Snježana Herceg Romanić  
Vilena Kašuba  
Darija Klinčić  
Zorana Kljaković-Gašpić  
Nevenka Kopjar  
Ana Lucić Vrdoljak  
Ana Marija Marjanović Čermak  
Gordana Mendaš Starčević  
Vedran Micek  
Anja Mikolić  
Mirta Milić  
Vedran Mužinić  
Ivan Pavičić  
Alica Pizent  
Ružica Rozgaj  
Sanja Stipičević  
Blanka Tariba Lovaković  
Ivančica Trošić  
Želimira Vasilić  
Davor Želježić  
Tanja Živković Semren  
Suzana Žunec

### Tehnički suradnici

Krešimir Nekić  
Maja Nikolić  
Lea Stančin  
Kristina Vajković  
Vesna Triva

## Sadržaj

---

Nositelj projekta .....	3
OPENTOX – sažetak .....	4
Genetička toksikologija pesticida .....	6
Stanična i substancična toksičnost .....	7
Biokemijski markeri toksičnosti i oksidacijski stres .....	8
Razdioba zagađivala u okolišu .....	9

## Nositelj projekta

---

Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada (IMI) osnovan je 1947. godine sa sjedištem na adresi Ksaverska cesta 2, Zagreb. Danas je IMI druga po veličini znanstvenoistraživačka ustanova u Hrvatskoj koja djeluje u nadležnosti Ministarstva znanosti i obrazovanja Republike Hrvatske. Područja znanstvenoistraživačkog interesa i stručnih usluga Instituta:

- istraživanje kvalitete radnog i životnog okoliša povezane s prisutnošću različitih ksenobiotika (pesticida, mikotoksina, teških metala, radionuklida, nanočestica, droga i dr.) te ionizirajućeg i neionizirajućeg zračenja
- stanična i substancična istraživanja utjecaja štetnih agenasa iz okoliša
- istraživanje razvoja i liječenja imunoloških i profesionalnih bolesti ljudi

Djelatnici Instituta sudjeluju u obrazovnom sustavu na brojnim sveučilišnim i stručnim studijima. Institut je izdavač najstarijeg znanstvenog časopisa u Hrvatskoj – *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, koji objavljuje originalne radove iz područja medicine rada, toksikologije, ekologije, kemije, biologije, biokemije, farmakologije i psihologije (<http://hrcak.srce.hr/aiht>).

## OPENTOX – sažetak

OPENTOX (*Organska zagađivala u okolišu – markeri i biomarkeri toksičnosti*) je projekt Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u potpori Hrvatske zaklade za znanost. Projekt se temelji na smjernicama Direktive 2009/128/EC, Tematske strategije Europske Unije o održivoj uporabi pesticida, stavovima akademije znanstvenika *Collegium Ramazzini* te ciljevima Stockholmske konvencije. Navedeni akti ukazuju na potrebu održive uporabe pesticida radi smanjenja njihovih štetnih učinaka na ljudsko zdravlje i okoliš.

U današnje vrijeme okoliš je pojačano opterećen organskim kemijskim spojevima koje nastaju kao posljedica čovjekovih aktivnosti.



Mnoge od njih su pesticidi namijenjeni suzbijanju nepoželjnih biljnih, životinjskih i mikrobioloških vrsta u proizvodnji hrane.



Mnogim postojećim pesticidima je zbog dokazane štetnosti i nakupljanja u okolišu danas zabranjena uporaba direktivama na razini Europske unije, no zbog velikog gospodarskog značaja takvih pesticida u pojedinim je zemljama njihova uporaba postala ograničena u okviru mjera za upravljanje rizikom. Istodobno, dolazi do povećanja potrošnje novih vrsta pesticida, razvijenih kao zamjena za *konvencionalne* pesticide, a za koje ne postoje dostatni znanstveni dokazi o netoksičnosti za ne ciljane organizme (korisni kukci, divljač i domaće životinje), kao niti o toksičnosti njihovih metabolita i potencijalu zadržavanja u okolišu (tlu i vodi).





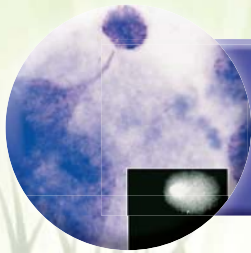
Navedene činjenice ukazuju na potrebu istraživanja mehanizama toksičnosti te razdiobe pesticida i postojećih organoklorovih zagađivala u biosferi.

Unutar pet projektnih skupina OPENTOX-a istražuje se:

- mehanizam genotoksičnosti odabranih pesticida
- oksidacijski potencijal klasičnih i novorazvijenih skupina pesticida, kao i njihova međusobna povezanost i povezanost s biomarkerima neuroloških rizika i karcinogeneze
- stanična i substancijska toksičnost odabranih pesticida
- negativni učinci na izlučivanje spolnih hormona i njihova povezanost s transplacentalnom genotoksičnošću
- razdioba pesticida i postojećih organoklorovih zagađivala u biosferi i okolišu

Istraživanja se provode na četiri koncentracijske razine pesticida koje predstavljaju stvarnu izloženost ljudi: razina profesionalne izloženosti (engl. *Occupational Exposure Limit* – OEL), dopuštena razina izloženosti primjenitelja (engl. *Acceptable Operator Exposure Level* – AOEL), prihvatljiv dnevni unos (engl. *Acceptable Daily Intake* – ADI) i razina izloženosti stanovništva (engl. *Residential Exposure Level* – REL).

Dobivena saznanja značajno će umanjiti izloženost stanovništva pri rukovanju pesticidima i boravku u blizini tretiranih poljoprivrednih površina. Uklapanjem u Hrvatski nacionalni plan održive uporabe pesticida i emisije poliklorbifenila, nova će se saznanja koristiti i pri donošenju zakona o ekološkoj proizvodnji hrane te zaštiti tla, poljoprivrednog zemljišta i vode.

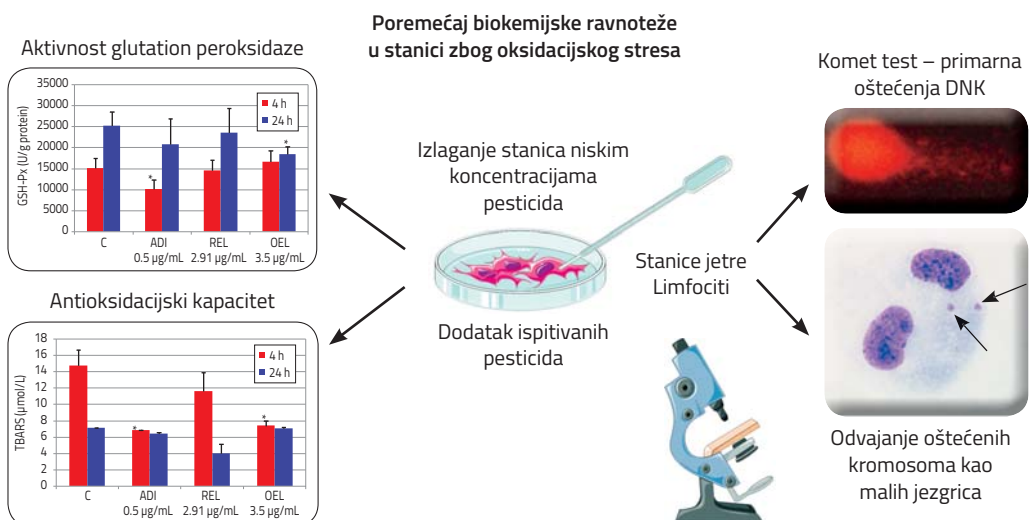


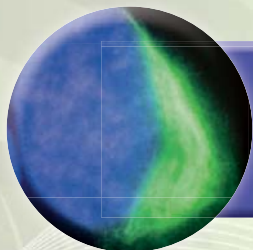
# Genetička toksikologija pesticida

Prema smjernicama OECD-a, ispitivanja štetnosti pesticida na genetičkom materijalu provedena su na ljudskim limfocitima i ljudskim stanicama jetre s metaboličkom aktivacijom. Toksičnost pesticida ispitana je i u uvjetima *in vivo* na životinjskim modelima, što je bitno zbog različitih međudjelovanja pojedinih organa u organizmu i stoga što odražava scenarij izloženosti čovjeka. Stanice i životinjski modeli izlagani su različitim koncentracijama pesticida koje odgovaraju dozama izloženosti ljudi tijekom života i rada u poljoprivredi.

## Rezultati

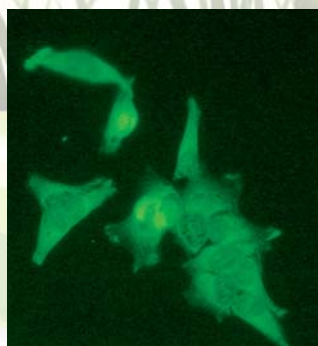
Niske doze  $\alpha$ -cipermetrina, klorpirifosa i imidakloprida mogu uzrokovati oštećenje DNK u stanicama jetre i limfocitima te poticati njihovo umiranje. Pesticidi utječu na mogućnost dijeljenja stanica, a tembotrion je posebno djelovao na smanjenje razine folata (vitamina B<sub>9</sub> u ljudskom organizmu) posebice važnog za sintezu DNK, diobu stanica te u trudnoći za pravilan razvoj živčanog sustava. Glifosat i  $\alpha$ -cipermetrin onemogućavaju uobičajeno funkcioniranje genetičkog materijala. Rezultati su pokazali da niske dopuštene doze mogu imati utjecaj na DNK i na oštećenja DNK koja se generacijski prenose.



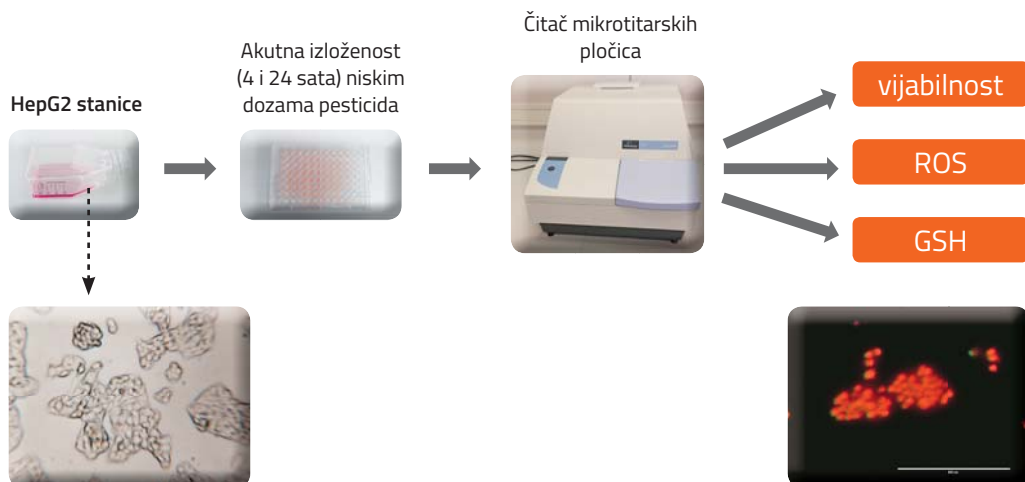


## Stanična i substanična toksičnost

Toksičnost niskih koncentracija pesticida na koje nailazimo u svakodnevnom životu ispitana je za tri insekticida: klorpirifos, imidakloprid i  $\alpha$ -cipermetrin te za herbicid tembotrion. *In vitro* istraživanje provedeno je na tumorskoj staničnoj liniji ljudskih stanica jetre HepG2. Sposobnost preživljenja stanica (vijabilnost) određena je spektrofotometrijski mjerenjem količine obojanog produkta koji nastaje kao rezultat aktivnosti staničnih dehidrogenaza u živim stanicama. Nakon 24-satne izloženosti  $\alpha$ -cipermetrinu pri koncentraciji koja odražava profesionalnu razinu izloženosti zabilježena je značajno smanjena vijabilnost stanica HepG2.



Toksičnom djelovanju pesticida na stanicu dodatno može pridonijeti i narušena ravnoteža između reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i antioksidacijske obrane stanice. Količina ROS-ova i antioksidansa glutationa (GSH) izmjerena je pomoću fluorescentne boje nakon izlaganja stanica tembotrionu. Nakon 24 sata zabilježena je značajno povećana razina ROS-ova pri svim ispitanim koncentracijama herbicida, dok je smanjenje GSH zabilježeno pri dozama ADI i REL.

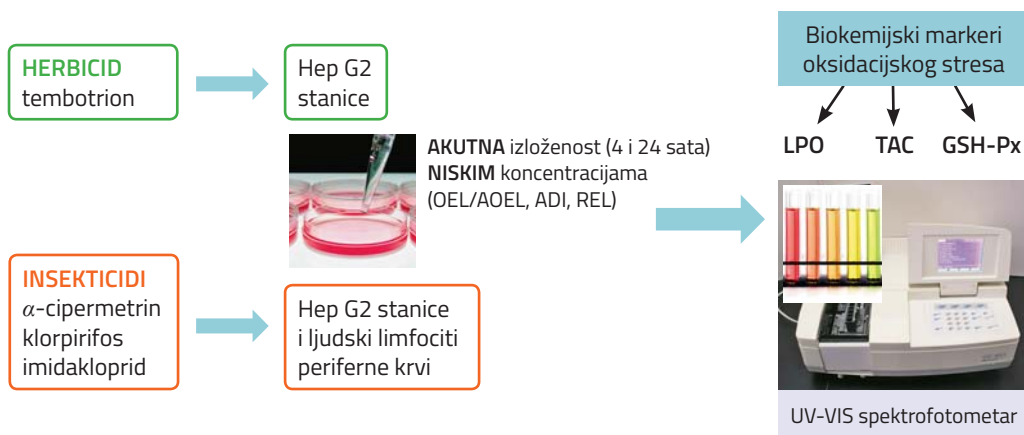




## Biokemijski markeri toksičnosti i oksidacijski stres

Biokemijski markeri oksidacijskog stresa poput lipidne peroksidacije (engl. *Lipid Peroxidation* – LPO), ukupnog antioksidacijskog kapaciteta (engl. *Total Antioxidant Capacity* – TAC) i aktivnosti glutation peroksidaze (engl. *Glutathione Peroxidase* – GSH-Px) određeni su u ljudskim stanicama karcinoma jetre HepG2 nakon izloženosti herbicidu tembotrionu te u ljudskim limfocitima periferne krvi i HepG2 stanicama nakon izloženosti insekticidima:  $\alpha$ -cipermetrinu, klorpirifosu i imidaklopridu. Stanice su tretirane akutno (4 i 24 sata) koncentracijama pesticida koje odgovaraju stvarnoj izloženosti ljudi: OEL/AOEL, ADI i REL.

Krajnji produkti LPO-a izmjereni su metodom određivanja reaktivnih supstanci tiobarbiturne kiseline uz modifikacije. TAC je određen modificiranom FRAP metodom. Za mjerenje aktivnosti GSH-Px-a korištena je Europska standardizirana metoda.



Rezultati su pokazali da akutna izloženost HepG2 stanica tembotrionu, kao i HepG2 stanica i limfocita trima insekticidima, nije uzrokovala promjene u niti jednom od istraživanih biomarkera oksidacijskog stresa.





## Razdioba zagađivala u okolišu

Projektom je obuhvaćena razrada kromatografskih analitičkih metoda za određivanje najčešće primjenjivanih herbicida i insekticida te postojećih organskih zagađivala u okolišu i biološkim materijalima.

MAJČINO MIŠIĆNO  
MLIJEKO – TKIVO RIBA – ZRAK – TLO – VODA – URIN – KRVNA – TKIVA  
PLAZMA  
POSTOJANA ORGANSKA ZAGAĐIVALA  
organoklorovi pesticidi (OCP),  
poliklorbifenili (PCB)

PESTICIDI  
triazini, triketoni, organofosfati,  
neonikotinoidi, piretroidi

### *Rezultati određivanja pesticida i organoklorovih zagađivala*

**ZRAK.** Udjel organoklorovih zagađivala u zraku ovisi o temperaturi. Ljeti je zrak opterećen nižekloriranim lakohlapljivim kongenerima PCB-a i lindanom, dok su zimi u zraku zastupljeniji produkti procesa izgaranja, uglavnom izomeri HCB-a.

**TLO.** U površinskom tlu urbane sredine često su detektirani indikatorski kongeneri PCB-a te pesticidi: HCB, lindan, DDT i DDE. Razine ovih spojeva upućuju na njihov stari unos u okoliš.

**VODA.** Koncentracije herbicida u vodovodnoj i podzemnoj vodi Zagreba i okolice su ispod zakonski dopuštene granice. Pritisak poljoprivredne prakse na vode opaža se u površinskim vodama u periodu nakon primjene herbicida (lipanj – kolovoz).

**BIOLOŠKI UZORCI.** U mišićnom tkivu riba iz istočnog Jadranskog mora izmjerene su niske razine organoklorovih spojeva koje ne upućuju na rizik od kroničnih oboljenja, ali upućuju na bioakumulaciju zagađivala porastom starosti i tjelesne mase riba. Kongeneri PCB-a: 153, 138, 180 i 170 te metabolit *p,p*-DDE nađeni su u majčinom mlijeku višerotkinja u RH, ali niske razine tih spojeva ne upućuju na zdravstveni rizik kod dojenčadi. Analiza 24-satnog urina štakora oralno izloženih niskim dozama herbicida terbutilazina tijekom 28 dana pokazala je da se više od 98 % terbutilazina izlučuje u obliku njegovih metabolita. Maseni udjeli izlučenih spojeva ovisni su o dozi.





