

# Utjecaj klorpirifosa na molekularne biomarkere u različitim dijelovima tijela gujavice *Lumbricus terrestris* L.

---

**Bjedov, Dora**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2019**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:181:808930>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-19**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

ODJEL ZA BIOLOGIJU

Diplomski sveučilišni studij Biologije; smjer: znanstveni

Dora Bjedov

**Utjecaj klorpirifosa na molekularne biomarkere u različitim dijelovima tijela gujavice *Lumbricus terrestris* L.**

Diplomski rad

Osijek, 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA  
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Odjel za biologiju  
Diplomski sveučilišni studij Biologije; smjer: znanstveni

Diplomski rad

**Znanstveno područje:** Prirodne znanosti  
**Znanstveno polje:** Biologija

**Utjecaj klorpirifosa na molekularne biomarkere u različitim dijelovima tijela gujavice *Lumbricus terrestris* L.**

Dora Bjedov

**Rad je izrađen:** Zavod za kvantitativnu ekologiju, Odjel za biologiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Davora K. Hackenberger

**Komentor:** dr. sc. Željka Lončarić

**Kratak sažetak diplomskog rada:** Klorpirifos je organofosfatni insekticid koji se koristi u poljoprivrednoj industriji. Primarni mu je cilj suzbijanje štetnih kukaca, no utječe i na druge neciljne organizme tla. Gujavice održavaju kvalitetu tla perturbacijom i prozračivanjem. Svojom vlažnom kožom te unosom u probavilo apsorbiraju različite kemijske spojeve što ih čini idealnim modelnim organizmima za ekotoksikološka istraživanja. Cilj je ovoga istraživanja odrediti razlike u odgovoru molekularnih biomarkera: acetilkolinesteraze (AChE), katalaze (CAT), glutation S-transferaze (GST) i reaktivnih supstanci tiobarbiturne kiseline (TBARS) u prednjem i stražnjem dijelu te u cijelom tijelu gujavice *Lumbricus terrestris* uslijed izlaganja različitim koncentracijama klorpirifosa.

Ključne riječi: klorpirifos, AChE, CAT, GST, TBARS, *Lumbricus terrestris*

**Broj stranica:** 66

**Broj slika:** 27

**Broj tablica:** 4

**Broj literaturnih navoda:** 109

**Jezik izvornika:** hrvatski

Datum obrane: 20. rujna 2019.

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. prof. dr. sc. Branimir Hackenberger Kutuzović, predsjednik
2. izv. prof. dr. sc. Davora Hackenberger Kutuzović, mentor, član
3. doc. dr. sc. Olga Jovanović Glavaš, član

Rad je pohranjen u: knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i u Nacionalnoj sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, u elektroničkom obliku te je objavljen na web stranici Odjela za biologiju.

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek  
Department of Biology  
Graduate university study programme in Biology

**Scientific Area:** Natural science

**Scientific Field:** Biology

**Effect of chlorpyrifos on molecular biomarkers in different parts of the body of earthworm *Lumbricus terrestris* L.**

Dora Bjedov

**Thesis performed at:** Subdepartment of quantitative ecology, Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

**Supervisor:** Davorka Hackenberger Kutuzović, PhD, Associate Professor

**Co-supervisor:** Željka Lončarić, PhD

**Abstract:** Chlorpyrifos is an organophosphate insecticide used in agriculture. Primary goal is insect control, but it has effect on non-target organisms as well. Earthworms maintain soil quality by perturbation and aeration. They absorb different chemicals through their moist skin and with ingestion making them a perfect model organism in ecotoxicological research. Aim of this research is to assess different response in molecular biomarkers: acetylcholinesterase (AChE), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in anterior and posterior part, as well as in a whole body in earthworm *Lumbricus terrestris* during the chlorpyrifos exposure.

**Key words:** chlorpyrifos, AChE, CAT, GST, TBARS, *Lumbricus terrestris*

**Number of pages:** 66

**Number of figures:** 27

**Number of tables:** 4

**Number of references:** 109

**Original in:** Croatian

Date of the thesis defence: 20<sup>th</sup> September 2019

**Reviewers:**

1. Branimir Hackenberger Kutuzović, PhD, Full Professor, chair
2. Davorka Hackenberger Kutuzović, PhD, Associate Professor, supervisor, member
3. Olga Jovanović Glavaš, PhD, Assistant Professor, member

Thesis deposited in: Library of Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek and in National university library in Zagreb in electronic form. It is also available on the website of Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Ovaj rad je izrađen u okviru projekta „Različiti učinci okolišno relevantnih mješavina metal temeljenih nanočestica i pesticida na faunu tla: Nove smjernice za procjenu rizika (DEFENSoil)“ financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost (IP-09-2014-4459); voditelj projekta prof. dr. sc. Branimir K. Hackenberger.

*Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Davorki K. Hackenberger na prenesenom znanju, savjetima, vremenu i strpljenju tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Zahvaljujem svojoj komentorici dr. sc. Željki Lončarić na stručnom vodstvu i usmjeravanju, pomoći te motivaciji.*

*Zahvaljujem gospođi Luci Zelić na pomoći prilikom izrade eksperimentalnog dijela rada.*

*Zahvaljujem svojim roditeljima i sestri.*

*Hvala  .*

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Pesticidi.....	1
1.1.1. Insekticidi.....	2
1.1.1.1. Klorpirifos.....	3
1.2. Biomarkeri.....	5
1.3. Utjecaj pesticida na okoliš.....	6
1.3.1. Indikatori zagađenja tla pesticidima u beskralježnjacima.....	8
1.3.1.1. Promjena ponašanja kao indikator izloženosti pesticidima.....	8
1.3.1.2. Acetilkolinesteraza.....	8
1.3.1.3. Glutation S-transferaza i katalaza.....	10
1.3.2. Molekularni mehanizmi oksidativnog stresa uzrokovanog pesticidima.....	12
1.4. Gujavice.....	14
1.4.1. Biologija gujavica.....	14
1.4.2. Ekologija gujavica.....	15
1.5. Cilj istraživanja.....	18
2. MATERIJALI I METODE.....	19
2.1. Modelni organizam.....	19
2.2. Izlaganje gujavica.....	21
2.3. Filter papir test.....	21
2.4. Test s umjetnim tlom.....	23
2.5. Mjerenje biomarkera.....	24
2.5.1. Homogenizacija i priprema S9 frakcije gujavica.....	25
2.5.2. Određivanje aktivnosti acetilkolinesteraze (AChE).....	25
2.5.3. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT).....	26

2.5.4. Određivanje aktivnosti glutathion S-transferaze (GST).....	27
2.5.5. Određivanje ukupne koncentracije proteina.....	27
2.5.6. Određivanje reaktivnih supstanci tiobarbiturne kiseline (TBARS).....	28
2.5.7. Određivanje koncentracije lipida.....	30
2.6. Statistička obrada podataka.....	31
3. REZULTATI.....	32
3.1. Utjecaj klorpirifosa na aktivnost acetilkolinesteraze (AChE) u gujavici <i>L. terrestris</i> .....	32
3.2. Utjecaj klorpirifosa na aktivnost katalaze (CAT) u gujavici <i>L. terrestris</i> .....	34
3.3. Utjecaj klorpirifosa na aktivnost glutathion S-transferaze (GST) u gujavici <i>L. terrestris</i> .....	37
3.4. Utjecaj klorpirifosa na koncentraciju proteina u gujavici <i>L. terrestris</i> .....	39
3.5. Utjecaj klorpirifosa na koncentraciju reaktivnih supstanci tiobarbiturne kiseline (TBARS) u gujavici <i>L. terrestris</i> .....	42
3.6. Utjecaj klorpirifosa na koncentraciju lipida u gujavici <i>L. terrestris</i> .....	45
4. RASPRAVA.....	48
5. ZAKLJUČAK.....	54
6. LITERATURA.....	55



# 1. UVOD

## 1.1. Pesticidi

Pesticidi su kemijski spojevi koji se koriste za kontrolu štetnih organizama – kukaca, korova, biljnih bolesti, glodavaca, oblića, gujavica itd. Prirodno-sintetizirani pesticidi koriste se već stoljećima, no sintetički pesticidi počeli su se koristiti 40-tih godina prošlog stoljeća. Njihova korist danas je nužna u poljoprivredi, iako imaju štetne utjecaje na okoliš. Izumiranje neciljnih populacija često su rezultat korištenja pesticida. Tisuće jedinki riba, žaba, kornjača, dagnji, ptica močvarica, uključujući rijetke i ugrožene vrste – sivi sokol (*Falco peregrinus*), bjeloglavi orao (*Haliaeetus leucocephalus*) i orao bukoč (*Pandion haliaetus*) stradavaju zbog nenamjernog unosa pesticida u akvatičke sustave (Helfrich i sur., 2009). Utjecaj pesticida na okoliš ovisi o interakcijama fizikalno-kemijskih svojstava (stabilnost, topivost, isparavanje,  $pK_a$ ) pesticida, apsorpciji i perzistenciji tla, svojstvu tla (pH, organska i anorganska komponentna, vlažnost, mikroflora i fauna), biljnim vrstama i klimatskim uvjetima (Damalas i Eleftherohorinos, 2011). Pesticide možemo klasificirati prema vrsti štetočina koje suzbijaju (Tablica 1) ili na temelju kemijskih spojeva i aktivnih tvari. Prema kemijskom sastavu pesticide možemo podijeliti na četiri velike skupine: organoklorni, organofosfatni, karbamati te piretrini i piretroidi (Yadav i Devi, 2017).

Tablica 1. Klasifikacija pesticida prema štetočinama koje suzbijaju

Pesticidi	Ciljni organizam
Insekticidi	kukci i ostali člankonošci
Fungicidi	gljive
Baktericidi	bakterije
Herbicidi	korov i ostale biljke koje rastu gdje nisu poželjne
Akarinocidi	grinje
Rodenticidi	glodavci
Algacidi	alge
Larvacidi	ličinke
Repelenti	člankonošci, glodavci i drugi
Desikanti	biljke
Ovicidi	jajašca kukaca i grinja
Virucidi	virusi
Moluscidi	mekušci
Nematocidi	oblići
Avicidi	ptice
Mirisne kuglice	moljci
Lampricidi	ličinke paklara
Piscicidi	ribe
Silvicidi	drvena vegetacija
Termitocidi	termiti

### 1.1.1. Insekticidi

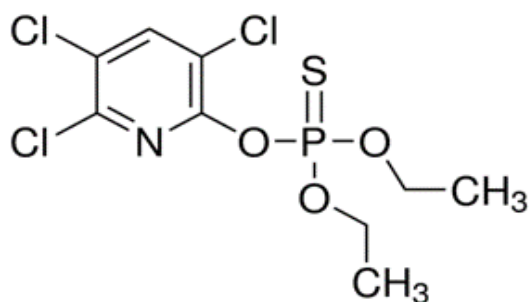
Insekticidi su kemijski ili biološki spojevi čija je funkcija kontrola kukaca. Počeli su se koristiti 1000 godina prije Krista, a najranije zapisani insekticid je sumpor koji se koristio za fumigaciju. Početkom Drugog svjetskog rata koristili su se insekticidi na bazi arsena, petroleja, nikotina, piretruma, rotenona, sumpora, vodikovog cijanida i kriolita. Drugi svjetski rat bio je početak modernog razdoblja kemijske kontrole kukaca i početak sinteze organskih pesticida od kojih je prvi bio insekticid na bazi arsena: diklor-difenil-trikloretran (DDT) (Web 1). Insekticidni organski spojevi klasificiraju se na 4 glavne skupine: organoklorni, organofosfatni, karbamati te piretrini i piretroidi (Tablica 2) (Yadav i Devi, 2017).

Tablica 2. Klasifikacija insekticida

<b>Insekticidi</b>	Prirodni	Biljna baza	Piretrum	
			Azadirahatin	
		Mineralna ulja		
	Umjetni	Anorganski		
		Organski	<b>Organoklorni</b>	DDT
				BHC
	<b>Organofosfatni</b>	Malation		
		Temefos		
		Fention		
		Diklorvos		
		Klorpirifos		
		Fenitrotrion		
		Pirimifos metil		
	<b>Karbamati</b>	Propoksur		
		Bendiokarb		
		Karbaril		
	<b>Piretroidi</b>	Deltametrin		
		Ciflutrin		
		Bifentrin		

#### 1.1.1.1. Klorpirifos

Klorpirifos je insekticid širokog spektra, prvi puta sintetiziran 1965. Primarna mu je funkcija bila kontrola ličinki komaraca, no danas se koristi za kontrolu gusjenica, kornjaša, žohara, muha, termita i mravi (Web 2). Pripada razredu organofosfatnih insekticidnih spojeva, čija se kemijska okosnica temelji na organofosfatnoj funkcionalnoj grupi (Slika 1). Kemijska formula klorpirifosa prema IUPAC je O,O-dietil O-3,5,6-trikloropiridin-2-il fosforotioat (Web 3).



Slika 1. Prikaz strukturne formule klorpirifosa (Web 3).

Najveću efektivnost postiže ako u sustav uđe direktnim kontaktom, ingestijom ili inhalacijom. Pri apsorpciji u organizmu brzo dolazi do ciljnih organa (Shah i sur., 1981). Poluživot eliminacije klorpirifosa iz različitih organa miševa je 10 – 16 sati, a iz masnog tkiva je 62 sata (Smith i sur., 1967). Eliminacijski poluživot klorpirifosa za ljude iznosi 27 sati (Nolan i sur., 1984).

Primarni organ biotransformacije klorpirifosa u kralježnjacima je jetra, gdje dolazi do njegove bioaktivacije u P-450-ovisnim monooksigenazama (Ma i Chambers, 1994). Nastaje metabolit klorpirifos-okson s 300 do 400 puta većim afinitetom za inhibiciju acetilkolinesteraze u mozgu miševa (Huff i sur., 1994). Stopa detoksifikacije oksona je brza, stoga se metaboliti klorpirifosa teško analiziraju, osim ako se ne izlažu velikim količinama klorpirifosa (Nolan i sur., 1984). Najčešće analizirani metabolit je 3,5,6-trikloro-2-piridinol (TCP) (Bakke i sur., 1976). Većina TCP-a eliminira se putem bubrega, urinom unutar 48 sati, stoga se TCP iz urina može koristiti kao kvalitativni biomarker izloženosti klorpirifosu (Chambers i Chambers, 1989).

Primarna funkcija klorpirifosa i metabolita klorpirifos-oksona je inhibicija enzima acetilkolinesteraze (AChE). Kovalentno se veže na aktivno mjesto kolinesteraze (ChE) što dovodi do prekomjernog nakupljanja acetilkolina (ACh) u sinaptičkoj pukotini. Akumulacija ACh prekomjerno stimulira neurone, ima neurotoksični utjecaj te na kraju uzrokuje smrt jedinke (Richendrfer i Creton, 2015). Klorpirifos ima sličan mehanizam toksičnosti s malationom i parationom, stoga nije efektivan u organofosfatno-otpornim populacijama kukaca.

Klorpirifos je stabilniji u bazičnom tlu, poluživot mu iznosi 7 – 120 dana, ovisno o početnoj količini nanosa. Veže se na čestice tla, perzistira i slabo se otapa u vodi. Klorpirifos u tlu razgrađuju UV-zrake, kemijska hidroliza, deklorinacija i mikroorganizmi tla (Web 5).

## 1.2. Biomarkeri

Biomarkeri su ksenobiotički inducirane promjene u staničnim ili biokemijskim procesima, spojevima, strukturama ili funkcijama koje se mogu mjeriti u biološkom sustavu (Peakall, 1994). Prvo su se počeli koristiti u polju humane medicine, a tijekom 90-tih godina prošlog stoljeća počinju se koristiti u polju ekotoksikologije. U današnjim ekotoksikološkim metodama koriste se u testiranju prisutnosti štetnih kemijskih spojeva i određivanje potencijalno štetnih utjecaja na okoliš. Samo određivanje koncentracije štetnih kemijskih spojeva ne daje dovoljno informacija o ekološkom utjecaju, zbog ekoloških varijacija u pH, temperaturi i vlažnosti. Različiti faktori utječu na svojstva kemijski štetnih tvari, njihovo vezanje i akumulaciju u okoliš te adsorpciju i apsorpciju u organizme. Uz određivanje koncentracije kemijskih spojeva uključuje se akutno i kronično praćenje staništa organizma koji je izložen toksikantima. Biološki markeri mjereni u divljim životinjama doprinose u detekciji, kvantifikaciji i razumijevanju važnosti izloženosti štetnim kemijskim tvarima u okolišu (Rojas-Garcia i sur., 2011).

Biomarkeri se primjenjuju u određivanju i kvantifikaciji trenutačne izloženosti i izloženosti u prošlosti specifičnim kemijskim tvarima te se uspješno koriste u biološkom praćenju utjecaja industrije na okoliš.

Specifični i nespecifični biomarkeri koriste se u ekološkim procjenama. Nespecifični biomarkeri ukazuju na prisutnost štetne tvari i njezinu koncentraciju, no ne daju informaciju o specifičnosti tvari. Specifični biomarkeri reagiraju sa specifičnom kemijskom tvari, bez informacija o njezinoj koncentraciji ili prisutnosti ostalih kemijskih spojeva.

Kriterij za određivanje biomarkera jesu biološka specifičnost, interpretacija, vrijeme odgovora i relativna osjetljivost. Analiza biomarkera ima prednost u odnosu na analizu kemijskih spojeva jer prikazuje razinu izloženosti organizma. U nekim skupinama perzistentnih organskih spojeva granica detekcije mjeri se u jedinici ppt (engl. *parts per trillion*). Testiranjem biomarkera moguće je odrediti postoje li značajne fiziološke promjene u organizmu, ako postoje, organizam je izložen kemijski štetnim spojevima. Ako nedostaju fiziološke promjene, organizam se ne smatra izložen kemijski štetnim tvarima, iako se tvari mogu detektirati (Shugart, 2005).

Biomarkeri se mogu podijeliti u tri kategorije: biomarker izloženosti, efekta i osjetljivosti. Biomarkeri izloženosti mjere se kao ukupna doza tvari (razina spoja u krvi, urinu ili dah), doza u određenom organu (metaboliti ili makromolekularni kompleksi spoja u organu ili tkivu) i biološki značajna doza (mjeri se ako je mehanizam indukcije poznat i može se pretpostaviti biološki efekt).

Biomarkeri izloženosti jesu promjene u biološkom sustavu koje predstavljaju kvalitativni ili kvantitativni poremećaj uzrokovan izlaganjem štetnoj tvari. Biomarkeri osjetljivosti obuhvaćaju indikatore koji utječu na okolišni odgovor u jedinki ili u populaciji (Henderson, 2005).

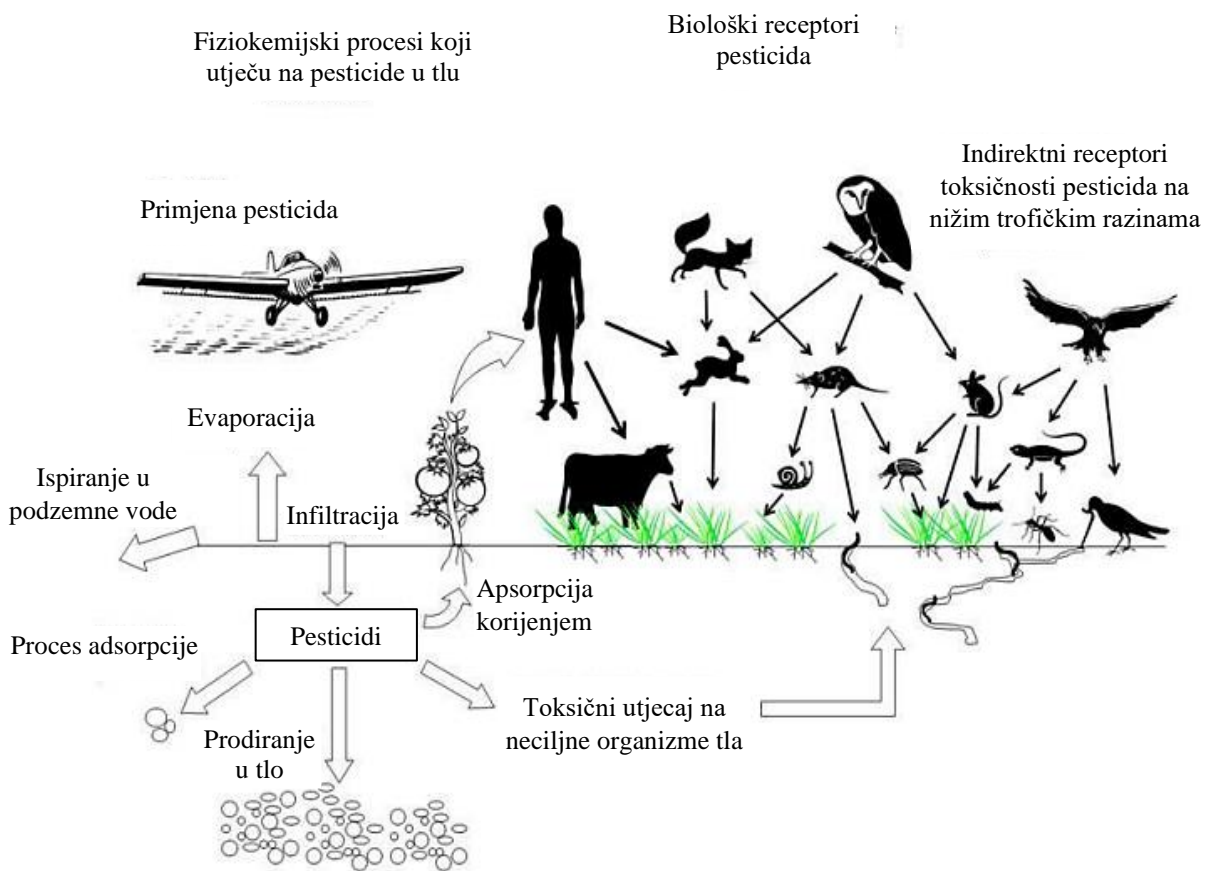
### **1.3. Utjecaj pesticida na okoliš**

Upotrebom insekticida na poljoprivrednim zemljištima, atmosfersko cirkuliranje i ispiranje kišom te sustavom podzemnih voda, klorpirifos ima utjecaja na organizme akvatičkog sustava (Racke, 1993). U slatkovodnim modelnim ekosustavima, prema Brock i sur. (1992) vodena leća *Eloдея nuttali* adsorbira većinu nanasene koncentracije klorpirifosa, a mali dio se veže na sediment. Klorpirifos iz vodenih sustava u atmosferu dolazi isparavanjem (Lyman i sur., 1990). U atmosferi se nakuplja zbog njegove upotrebe kao insekticid/akaricid. Isparava u atmosferu tijekom primjene na tlo ili primjenom zračne opreme prskanja insekticida. U atmosferi ostaje u plinovitom agregatnom stanju i veže se na čestice zraka (Eisenreich i sur., 1981). Direktnom primjenom klorpirifos se veže na čestice tla i nije mobilan. Niska mu je topljivost u vodi te perzistira u tlu čime se smanjuje kvaliteta i plodnost tla. Kvaliteta tla određena je njezinim kapacitetom prilagodbe unutar prirodnih ili umjetnih granica ekosustava, mogućnosti produkcije i održavanja flore i faune, održavanjem i poboljšanjem kvalitete vode i zraka te podržavanjem ljudskog zdravlja i staništa (Karlen i sur., 1997).

Količina klorpirifosa koja isparava iz vode reducirana je zbog adsorpcije na sediment. Prema Racke (1993) klorpirifos ima snažan afinitet za vezanje na koloide tla. Insekticidi u biosferi najčešće se akumuliraju u tlu gdje se fizikalno-kemijskim i biološkim procesima metaboliziraju i akumuliraju kroz trofičke razine hranidbenog lanca. Tlo pročišćava i reducira štetne spojeve koji se ispiru u podzemne vode, što predstavlja opasnost za floru i faunu tla (Slika 2). Korištenje pesticida uzrokuje smanjenje populacije plijena što bioakumulacijom i biomagnifikacijom uzrokuje smanjenje populacije predatora na vrhu hranidbenog lanca (Flavia i sur., 2010).

Pesticidi utječu na mikroorganizme tla koji omogućuju ciklus nutrijenata i bioremedijaciju. Metabolit organofosfatnog (OP) insekticida klorpirifosa, 3,5,6-trikloro-2-piridinol (TCP) inhibira proliferaciju mikroorganizama tla (Racke, 1993).

Insekticidi molekularno utječu na enzime tla. Enzimska aktivnost tla direktna je ekspresija zajednice mikroorganizama koji su uključeni u cikluse nutrijenata i služe kao indikatori plodnosti tla (Gianfreda i Rao, 2008).



Slika 2. Prikaz fizikalnih i bioloških procesa kruženja pesticida u prirodi (Preuzeto i modificirano iz Sanchez-Hernandez, 2011).

### 1.3.1. Indikatori zagađenja tla pesticidima u beskralježnjacima

U polju ekotoksikologije, biomarkeri su molekularni, biokemijski, fiziološki ili histološki indikatori izloženosti štetnim kemijskim tvarima, koji često uključuju i promjene ponašanja.

Biomarkeri imaju ekotoksikološku ulogu kao indirektna mjera biodostupnosti ili apsorpcije ksenobiotika u toksikološkom testiranju (Lanno i sur., 2004) te kao ključni elementi u razumijevanju mehanizma štetnih kemijskih tvari na razini organizma (Forbes i sur., 2006) i razlikovanju akutne toksičnosti od dugoročnih posljedica (Hagger i sur., 2009).

#### 1.3.1.1. Promjena ponašanja kao indikator izloženosti pesticidima

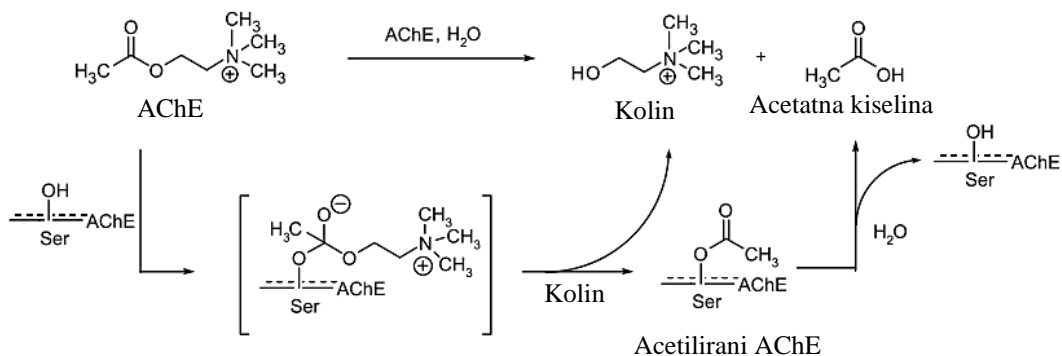
Ponašanje je rezultat različitih fizioloških procesa koji odgovaraju na okolišne biotičke i abiotičke faktore. Pesticidi uzrokuju promjene u ponašanju terestričkih beskralježnjaka (Hellou, 2011). Promjene uključuju usporeno uvlačenje plašta i zatvaranje ljuštura kod mekušaca, smanjena lokomotorna aktivnost (dužina puta, prosječna brzina, vrijeme aktivnosti) kod skokuna *Folsomia candida* (Sorensen i sur., 1995) i jednakonožaca *Porcellio dilatatus* (Engenheiro i sur., 2005). Promjene u ponašanju posljedica su inhibicije aktivnosti AChE u živčanom sustavu i neuromišićnim spojevima.

#### 1.3.1.2. Acetilkinesteraza

Aktivnost acetilkolinesteraze (AChE) najčešće je korištena biomarker u praćenju izloženosti organizama organofosfatima i karbamatima jer je primarni mehanizam akutne toksičnosti inhibicija aktivnosti AChE u tkivu živčanog sustava (Hernandez i sur., 2005). Biološka funkcija AChE je prekid živčanog impulsa tijekom otpuštanja acetikolina (ACh) u sinaptičku pukotinu i regulacija depolarizacije postsinaptičkog neurona (Thompson i Richardson 2004). Reakcija esteraza zasniva se na esterskoj vezi između hidroksilne i karboksilne skupine (Costa i sur., 2005). AChE hidrolizira ACh na acetat ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ) i kolin ( $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$ ).

Aktivno mjesto AChE čini katalitička trijada Ser200, His440 i Glu327. U katalitičkom ciklusu negativno nabijena OH skupina serina reagira s karbonilnom skupinom ACh. Intermedijer na kojem je vezan kolin, otpušta ga i nastaje nestabilni i reaktivni intermedijer – acetilirani AChE. Acetilirani AChE reagira s vodom te nastaju krajnji produkti: acetatna kiselina i AChE (Thompson i Richardson, 2004) (Slika 3).

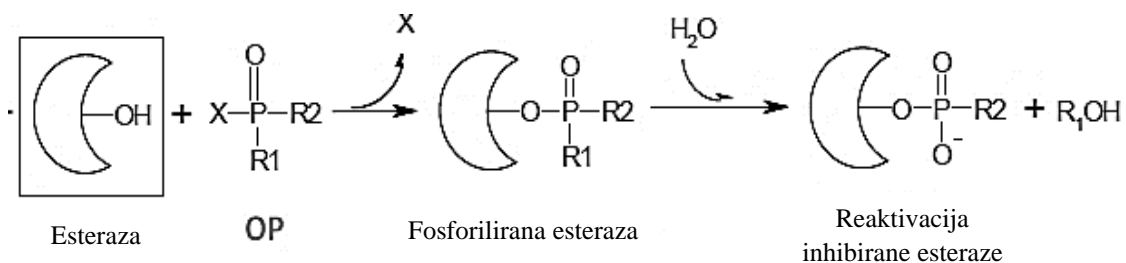




Slika 3. Prikaz katalitičkog ciklusa AChE (Shema preuzeta i modificirana iz Thompson i Richardson, 2004).

U ekotoksikologiji najčešće se prati aktivnost: acetilkolinesteraza (AChE), butirilkolinesteraza (BChE) i karboksilesteraza (CbE) zbog svoje reaktivnosti s pesticidima (Costa i sur., 2005). Organofosfatni spojevi snažni su inhibitori kolinesteraza, proteaza i esteraza. Fosforilna skupina OP kovalentno se veže na OH skupinu serinskog ostatka u aktivnom centru enzima (Slika 4). Spontanom hidrolizom kovalentne veze ili nukleofilnim spojevima moguća je reaktivacija enzima. Inhibirane kolinesteraze s vremenom gube sposobnost reaktivacije (Sun i sur., 1979).

Najčešći modelni organizmi u testiranju aktivnosti esteraza su gujavice *Eisenia fetida*, *Aporrectodea caliginosa*, *Allolobophora chlorotica* i *Lumbricus terrestris* (Thompson i Richardson, 2004). Collange i sur. (2010) zabilježili su veću inhibiciju aktivnosti CbE od ChE u gujavicama koje su bile izložene klorpirifosu u tlu.



Slika 4. Prikaz interakcije esteraza s organofosfatima (OP) (Shema preuzeta i modificirana iz Sanchez-Hernandez, 2011).

### 1.3.1.3. Glutation S-transferaza i katalaza

Agrokemikalije kao što su OP insekticidi induciraju oksidativni stres (Lukaszewicz – Hussain, 2010). Oksidativni je stres stanje u kojem je produkcija reaktivnih kisikovih jedinki (ROS, engl. *Reactive Oxygen Species*) veća od stanične antioksidativne obrane molekularnim i enzimatskim mehanizmima što uzrokuje oksidaciju lipida, proteina i DNA u stanici. Organizmi su razvili razne strategije i mehanizme obrane: sekvestracija, katalitička biotransformacija i druge. Stanice posjeduju razne enzime koji sudjeluju u enzimskoj detoksifikaciji ksenobiotika i neutralizaciji ROS. Metabolizam ksenobiotika podjeljen je u tri faze: I., II. i III. U I. i II. fazi ksenobiotici se transformiraju iz lipofilnih, nepolarnih molekula u molekule topljive u vodi što im smanjuje toksičnost i omogućuje lakšu ekskreciju iz organizma (III. faza) (Sheehan i sur., 2001). I. faza katalizirana je sustavom enzima citokrom P450 (CYP450). CYP450 su mikrosomalni proteini koji kataliziraju reakciju oksidacije ksenobiotika (Guengerich, 1990). Enzimi II. faze kataliziraju konjugaciju aktiviranog ksenobiotika u supstrat topljiv u vodi, npr. u reducirani glutation (GSH), UDP-glukoronsku kiselinu ili glicin. Konjugaciju u GSH katalizira enzim glutation S-transferaza (GST). GSH neutralizira perokside (1) ili slobodne radikale (2), a nastaje reakcijama aromatske nukleofilne supstitucije ili adicijom na nezasićene ketone (Sheehan i sur., 2001), a oksidirani glutation (GSSG) nastaje redukcijom hidrosiperoksidaza (Hayes i sur., 1999). U ostale enzimatske antioksidanse ubrajaju se: glutation reduktaza (GR), glutation peroksidaza (GPx), katalaza (CAT) i superoksid dismutaza (SOD). Razina glutationa u stanici najčešći je mjereni biomarker i pokazatelj oksidativnog stanja kod ptica (Koivula i Eeva, 2010) i riba (van der Oost i sur., 2003).



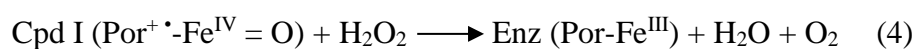
Glutation ima dvije uloge u detoksifikaciji organizma (van der Oost i sur., 2003):

- 1) Direktno reagira s ROS. GSH oksidira se u disulfidni oblik GSSG, stoga je omjer GSH/GSSG biomarker oksidativnog stresa.

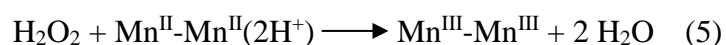
- 2) Glutation je kofaktor enzimatskih reakcija koje su uključene u metabolizam ksenobiotika. Vodikov peroksid i ostale hidroksiperoksidaze reduciraju se u alkohole djelovanjem glutacion peroksidaza koje za kofaktor koriste glutation te se GSH oksidira u GSSG.

Enzimatski antioksidativni enzim katalaza (CAT) metabolizira vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) na vodu ( $\text{H}_2\text{O}$ ) i elementarni kisik ( $\text{O}_2$ ) u peroksisomima. (Blondet i sur., 2018). CAT se sastoji od tetramera koji u aktivnom mjestu sadržavaju hemsku skupinu ili mangan.

Hemske katalaze razgrađuju  $\text{H}_2\text{O}_2$  u dvije reakcije. U prvom koraku jedna molekula  $\text{H}_2\text{O}_2$  oksidira hem u oksiferil te porfirinski prsten u porfirinski kationski radikal (Cpd I) (3). U drugom koraku kompleks katalaza-oksiferil-porfirinski kationski radikal reagira s drugom molekulom  $\text{H}_2\text{O}_2$  i vraća se u nereaktivno stanje katalaze s hemskom skupinom u aktivnom mjestu (Enz) (4) (Nicholls i sur., 2001).



Katalaze s manganom u aktivnom mjestu kataliziraju  $\text{H}_2\text{O}_2$  u dvije reakcije analogne reakcijama hemskih katalaza. Oksidacijsko stanje mangana u katalazi je  $\text{Mn}^{2+}$ . U prvoj reakciji  $\text{H}_2\text{O}_2$  djeluje kao oksidans, stoga  $\text{Mn}^{2+}$  prelazi u  $\text{Mn}^{3+}$  (5). U drugoj reakciji  $\text{H}_2\text{O}_2$  djeluje kao reducens i vraća  $\text{Mn}^{3+}$  u početno stanje  $\text{Mn}^{2+}$  (6) (Chelikani i sur., 2004). Ovim mehanizmima onemogućuje se daljnja reakcija  $\text{H}_2\text{O}_2$  i pretvorba u štetnije radikale te kovalentno vezanje ROS s biološkim molekulama u stanici (Blondet i sur., 2018).



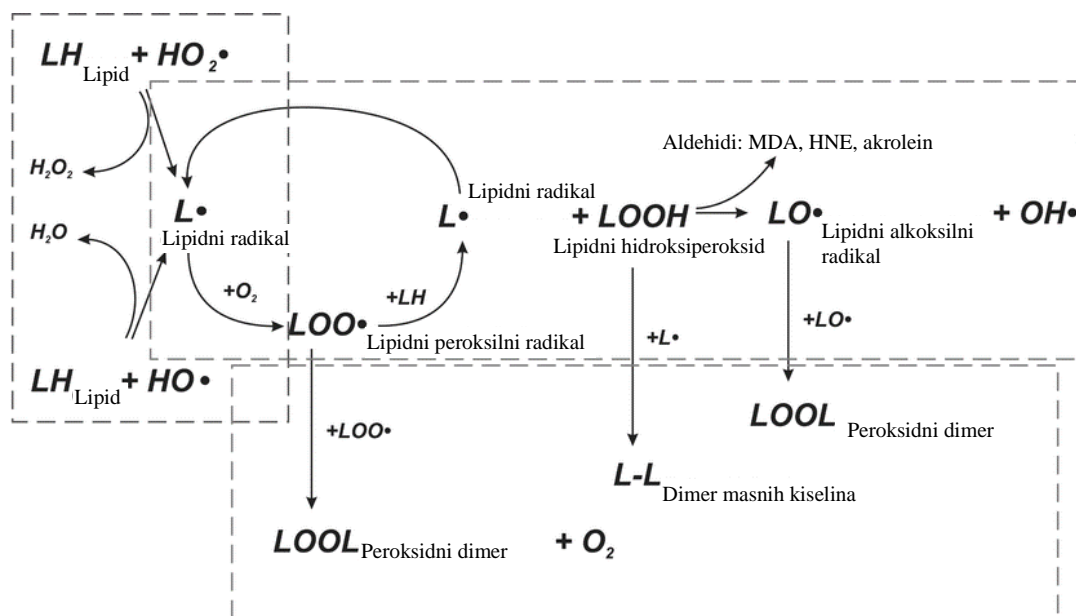
### 1.3.2. Molekularni mehanizmi oksidativnog stresa uzrokovanog pesticidima

Oksidativni stres nastaje prekomjernom produkcijom ROS što uzrokuje biomolekularne promjene u staničnoj funkciji. U ROS se ubrajaju reaktivni kisikovi produkti, slobodni radikali (molekula s jednim ili više nesparenih elektrona u vanjskoj valentnoj ljusci): superoksidni anion ( $O_2^{\cdot -}$ ), hidroksilni radikal ( $OH^{\cdot}$ ) i vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ). Produkcija ROS posljedica je aerobnog metabolizma. Velike količine kisika ( $O_2$ ) pretvaraju se u superoksidni anion u mitohondriju, iako može nastati oksidativnim reakcijama koje su katalizirane kompleksom CYP450, ostalim oksidoreduktazama i nikotinamid adenin dinukleotid fosfat-oksidadom (NADPH oksidaza). Superoksidni anion difuzno reagira s dušikovim (II) oksidom (NO) koji je produkt NO-sintaze (NOS) što dovodi do velike formacije oksidirajućih, nitrozanirajućih i nitrirajućih jedinki kao što je peroksinitrit ( $ONOO^{\cdot -}$ ). Superoksidni anion može se enzimatski ili neenzimatski dismutirati uz pomoć superoksid dismutaze (SOD) u  $H_2O_2$ . Vodikov peroksid razgrađuje se mijeloperoksidazama (MPO) na hipoklornu kiselinu i klorne spojeve ili se reducira na hidroksilni radikal Fentonovim reakcijama. Prevelika količina ROS uzrokuje oksidaciju DNA, proteina i lipida (Mena i sur., 2009).

Oksidaciju DNA najčešće uzrokuje  $OH^{\cdot}$  adicijom na dvostruke veze DNA baza ili oduzimanjem vodika s metilne grupe timina i s 2'-deoksiriboze. Adicija na C5-C6 dvostruku vezu pirimidina rezultira nastankom adukta C5-OH i C5-OH adukt radikala (Cooke i sur., 2003). Ostali produkti oksidacije DNA jesu 8-okso-deoksigvanozin, 8-okso-deoksiadenozin, deoksitimidin glikol te bazni C5-OH-6-peroksil radikali koji nastaju adicijom kisika na C5-OH (Franco i sur., 2009, 2010; Ryter i sur., 2007). Popravak DNA odvija se prema nekoliko staničnih mehanizama: popravak izrezivanjem baza, popravak izrezivanjem (oligo)nukleotida ili popravak glikozilacijom (Cooke i sur., 2003).

Lipidi su molekule koje možemo podijeliti prema svojstvu polarnosti na polarne i nepolarne. Nepolarni lipidi služe za skladištenje energije (adipozno tkivo), a polarni lipidi su glavne građevne molekule stanične membrane. Polarni lipidi grade polupropusnu membranu u obliku lipidnog dvosloja. Najčešći tipovi lipida su: steroli (kolesterol), slobodne masne kiseline, trigliceridi i fosfolipidi (fosfatidiletanolamin, fosfatidilkolin, fosfatidilserin, fosfatidilinozitol, sfingomijelin i dr.).

U strukturi stanične membrane nalaze se fosfolipidi na koji je vezan glicerol te se na taj način kontrolira fiziološko stanje stanice – mijenjanjem polarnosti i propusnosti. Fosfolipid se sastoji od fosfatne skupine, glicerola te jednog lanca zasićene masne kiseline i jednog lanca nezasićene masne kiseline. ROS najčešće reagira s dvostrukom vezom u nezasićenim masnim kiselinama. Strukturu masnih kiselina čine karboksilna skupina s dugim alifatskim lancem koji može biti zasićeni i nezasićeni. Najčešće podložne lipidnoj peroksidaciji su PUFA (višenezasićene masne kiseline, engl. *Polyunsaturated Fatty Acids*), radikali se vežu na mjesto vodika te nastaju lipidni peroksilni radikali i hidroperoksidi (Divecha i Irvine, 1995). Iz lipida se sintetiziraju razne signalne molekule. Ove reakcije sinteze kataliziraju enzimi lipooksigenaze, a produkti su lipoksini, leukotrieni, prostaglandini i CYP450. Ostale ciljne molekule oksidacije jesu glikolipidi, fosfolipidi i kolesterol. Lipide, osim ROS, mogu oksidirati enzimi lipooksigenaze, ciklooksigenaze i CYP450 (Ayala i sur., 2014). Lipidna peroksidacija je proces oksidacije lipida kisikovim ili dušikovim radikalima u 3 reakcije: inicijacija, propagacija i terminacija (Slika 5). Inicijacija se zasniva na reakciji radikala s vodikovim atomom iz PUFA. Formiraju se lipidni peroksil radikali ( $LOO^{\bullet}$ ) koji reagiraju s ostalim PUFA te započinje drugi korak lipidne peroksidacije – propagacija. U posljednjem koraku – reakciji terminacije – antioksidansi kao vitamin E doniraju vodikov atom  $LOO^{\bullet}$  te nastaju neradikalni produkti.



Slika 5. Shematski prikaz lipidne peroksidacije (Preuzeto i modificirano iz Kudryavtseva i sur., 2016).

Reakcije lipidne peroksidacije provodit će se sve dok ne nastanu krajnji produkti (Yin i sur., 2011). Terminacijom lipidne peroksidacije nastaju lipidni hidroksiperoksidni produkti malondialdehid (MDA), reaktivne supstance tiobarbiturne kiseline (TBARS), 4-hidroksiperoksi-2-nonenal, 4-okso-2-nonenal i 4-hidroksi-2-nonenal (4-HNE) (West i Marnett, 2006). MDA se najčešće koristi kao biomarker lipidne peroksidacije zbog reakcije s tiobarbiturnom kiselinom (TBA). Jedna molekula MDA reagira s dvije molekule TBA (Esterbauer i Cheeseman, 1990). Uz oksidaciju masnih kiselina MDA nastaje razgradnjom arahidonske kiseline. Pretpostavlja se da je uloga MDA dvostruka te ovisi o njezinoj koncentraciji. MDA sintetiziran enzimatskim putem regulira gensku ekspresiju te ima ulogu kao signalna molekula preko Wnt signalnog puta (Wang i sur., 2014). MDA sintetizirana neenzimatskim putem javlja se pri uvjetima stresa. 4-HNE je citotoksični produkt peroksidacije mikrosomalnih lipida u jetri. Vrlo su reaktivni, nastaju u velikim količinama u odnosu na ostale produkte te imaju ulogu sekundarnih slobodnih radikala (Benedetti i sur., 1980).

Pesticidi uzrokuju oksidativni stres indukcijom ROS koji nastaju promjenama mitohondrijske respiracije ili redukcijom i oksidacijom. U redoks ciklusima pesticidni spoj je enzimatski reduciran NADPH-ovisnom reduktazom, npr. NADPH-citokrom P450 reduktazom. Nastaje pesticidni radikal koji elektron donira kisiku stvarajući superoksidni radikal. Pesticidni spoj ulazi u drugi ciklus reduciranja s NADPH-ovisnom reduktazom te nastaju radikali koji štetno utječu na stanični metabolizam (Tebourbi i sur., 2011).

## **1.4. Gujovice**

### **1.4.1. Biologija gujavica**

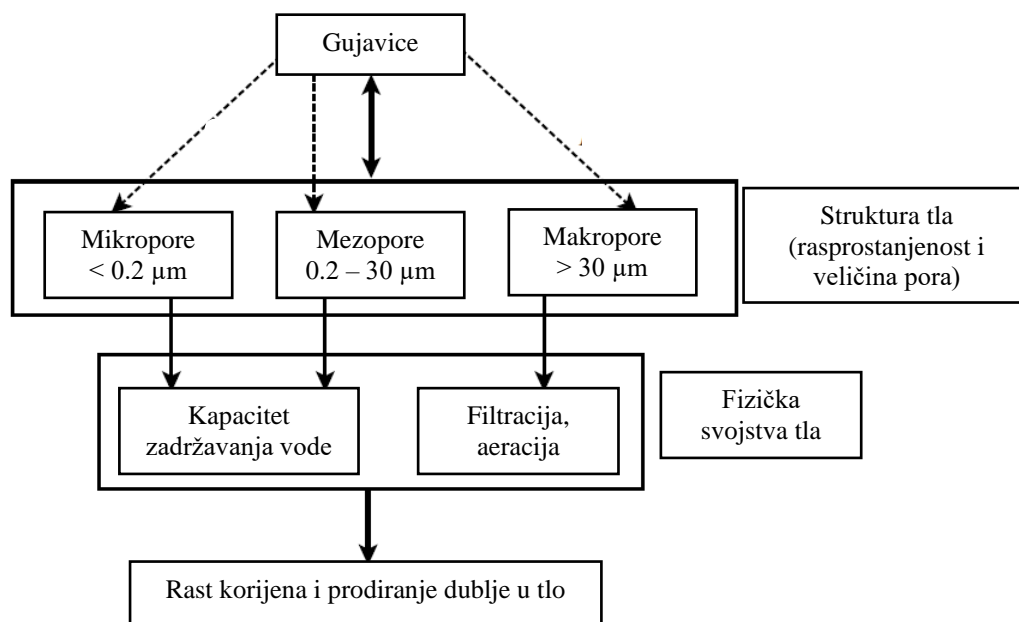
Gujavice pripadaju koljenu Annelida (kolutićavci), razredu Clitellata (pojasnici), podrazredu Oligochaeta (maločetinaši). Karakterizira ih velik broj kolutića i homonomna metamerija što znači da su im svi kolutići jednake morfološke građe, a odvojeni su intersegmentalnim brazdama. Epiderma sa žljezdanim stanicama prekrivena je tankom kutikulom. Između svakog kolutića postoje otvori kojima se regulira prolaz celomske tekućine koja čini osnovu hidroskeleta gujavice. Živčani im je sustav ljestvičavo razvijen i započinje cerebralnim ganglijem iz kojeg izlazi 5 glavnih živčanih vlakana. Centar motoričke kontrole i refleksa nalazi se ispod cerebralnoga ganglija, u podždrijelnom gangliju. Nemaju razvijene oči nego fotoreceptore u epidermi. Hrane se organskom tvari različitog stadija razgradnje.

Usta im se nalaze ispod prvog kolutića, prostomija. Probavilo je jednostavno i prohodno, sastoji se od usta, ždrijela i jednjaka na koji se nastavlja mišićni želudac. Uz jednjak se nalaze vapnene ili Morrenove žlijezde koje izlučuju kalcit u probavu. Ostatak probavila je crijevo čija je površina apsorpcije povećana tiflozolisom. Oko crijeva se nalazi kloragogeno tkivo u koje se nakupljaju otpadne tvari koje se odvajaju u celom i odstranjuju se kroz celomopore ili nefridije. Optjecajni sustav sastoji se od bočnih srca sa zaliscima, dorzalne i ventralne krve žile. Gujavice dišu preko kože uz pomoć kapilara koje stvaraju čvorove u epidermi. Respiratorni pigment je hemoglobin i prenosi oko 20 % ukupnog kisika. Sustav za ekskreciju čine metanefridiji koji se sastoje od nefrostoma, nefridijalne cijevi, nefridiopora i mjehura. Izlučuju ureu i amonijak. Gujavice su dvospolni organizmi koji se mogu razmnožavati spolnim i nespolnim putem.

Spolno razmnožavanje uključuje otpuštanje gameta iz gonada u celomske odjeljke – sjemene mjehuriće i jajne vrećice u kojima gamete sazrijevaju. Razmnožavanje gujavica uključuje kopulaciju, razvoj pojasa (klitelum, lat. *clitellum*) i razvoj kokona. Pojas nastaje iz 2 do 60 kolutića i nalazi se posteriorno u odnosu na spolni otvor. Pojas se sastoji od tri sloja: prvi sloj izlučuje sluz, drugi sloj izlučuje kokon, a treći sloj izlučuje album za prehranu embrija. Vanjska oplodnja odvija se u kokonu. Izlučena sluz razgrađuje se, a kokoni se polažu u tlo. Razmnožavanje je pod utjecajem hormona iz cerebralnoga ganglija. Jaja su im bogata hranjivim tvarima jer im je embrionalni razvoj izravan bez ličinačkog stadija. Jedinka se razvija te iz kokona izlazi nakon jednog tjedna do nekoliko mjeseci. Spolno su zrele sa 6 do 12 mjeseci, a prosječni im je životni vijek oko 6 godina, ovisno o ekološkim uvjetima (Habdića i sur., 2011).

#### **1.4.2. Ekologija gujavica**

Gujavice su inženjeri tla, svojom aktivnošću modificiraju kemijska i biološka svojstva te procese tla. Perturbacija tla uzrokovana gujavicama mijenja strukturu tla, agregaciju i poroznost za vodu i zrak (Slika 6). Svojim kretanjem stvaraju hodnike u tlu čime mijenjaju fizikalne funkcije tla važne za rast i produbljivanje korijenja, aeraciju, prijenos plinova, infiltraciju vode i kapacitet tla za vodu. Gujavice stvaraju makropore (pore veće od 30  $\mu\text{m}$ ), a svojom ekskrecijom stvaraju mezo- i mikroporoznost u tlu (pore manje od 30  $\mu\text{m}$ ) (Brown i sur., 2004).



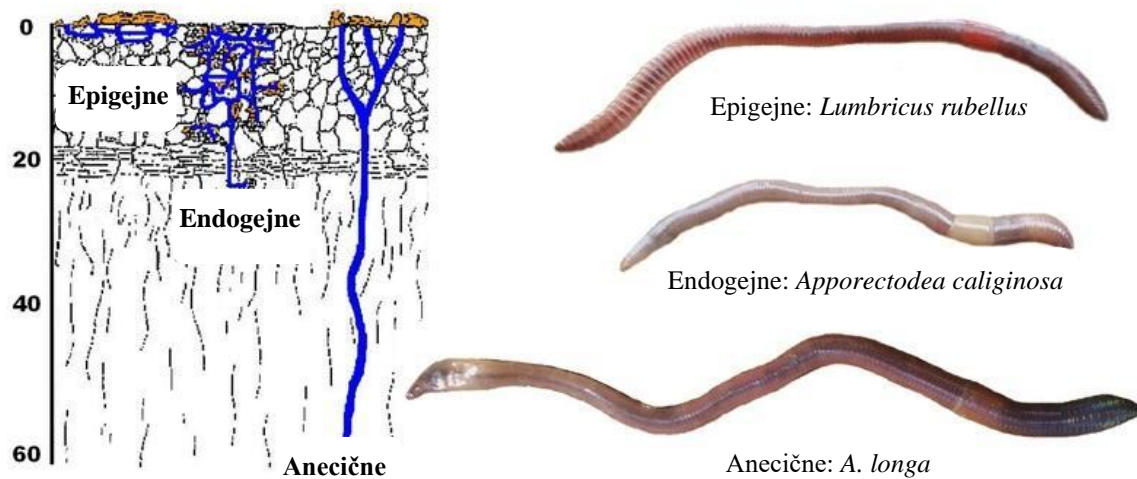
Slika 6. Shematski prikaz utjecaja gujavica na tlo i rast korijenja (Preuzeto i modificirano iz Brown i sur., 2004).

Gujavice su podijeljene u četiri ekotipa koja opisuju različite ekološke kategorije temeljene na njihovu ponašanju i načinu života (Slika 7):

1. Kompostne gujavice najčešće žive u kompostima i staništima punima trule vegetacije. Preferiraju toplu i vlažna staništa s čestim svježim kompostnim tvarima. Najčešće su svjetlocrvene boje s prugama. Često se koriste za razlaganje otpada i razgrađuju zagađivače u okolišu. Najčešće kompostne gujavice jesu *Eisenia fetida* i *Dendrobaena veneta*.
2. Epigejne gujavice žive na površini tla. Ne prave zemljane hodnike, hrane se lišćem i ostalim organskim tvarima na površini. Često su svjetlocrvene ili crveno-smeđe boje, bez pruga. Najčešće epigejne gujavice jesu: *Dendrobaena octaedra*, *Dendrobaena attemsi*, *Dendrodriulus rubidus*, *Eiseniella tetraedra*, *Helodrilus oculatus*, *Lumbricus rubellus*, *Lumbricus castaneus*, *Lumbricus festivus*, *Lumbricus friendi*, *Satchellius mammalis*.
3. Endogejne gujavice žive u središtu profila tla. Kopaju horizontalne tunele kroz tlo. Često su blijedih boja, sive, ružičaste, zelene ili plave. Najčešće endogejne gujavice jesu: *Allolobophora chlorotica*, *Apporectodea caliginosa*, *A. icterica*, *A. rosea*, *Murchieona muldali*, *Octolasion cyaneum* i *O. lacteum*.



4. Anecične gujavice kopaju trajne vertikalne tunele u tlu. Hrane se lišćem s površine tla koje odnose u tunele. Tamno su pigmentirane u anteriornom dijelu, a svjetlije u posteriornom dijelu tijela. Najčešće anecične gujavice jesu: *Lumbricus terrestris* i *Apporectodea longa* (Web 4).



Slika 7. Prikaz ekoloških kategorija gujavica (Web 4).

U hranidbenom lancu gujavice su primarni potrošači, a plijen su sekundarnim potrošačima. Zbog bioakumulacije tvari u ekosustavu dolazi do postupnog povećanja koncentracije ksenobiotika kroz hranibeni lanac - biomagnifikacije, rezultirajući najvećom koncentracijom ksenobiotika u top predatorima (Katagi i Ose., 2015).

### **1.5. Cilj istraživanja**

Glavni je cilj ovoga istraživanja odrediti razlike u odgovoru enzima acetilkolinesteraze, katalaze i glutation S-transferaze te sadržaju proteina, lipida i reaktivnih supstanci tiobarbiturne kiseline u prednjem i stražnjem dijelu te u cijelom tijelu gujavice *Lumbricus terrestris* pri izlaganju okolišno relevantnim koncentracijama klorpirifosa.

## 2. MATERIJALI I METODE

### 2.1. Modelni organizam

Carstvo: Animalia

Koljeno: Annelida

Razred: Clitellata

Red: Opisthopora

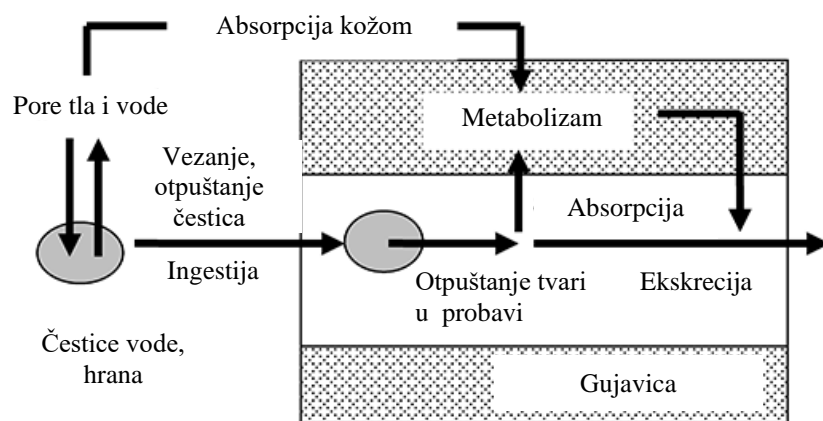
Porodica: Lumbricidae

Rod: *Lumbricus*

Vrsta: *Lumbricus terrestris*

Gujavice su često korištene kao modelni organizmi u eksperimentima u kojima se proučava njihov odgovor na okolišne čimbenike (fizikalne, kemijske ili biološke) ili se proučava njihov utjecaj na okoliš (fizikalni, kemijski i biotički utjecaj na tlo i svojstva ekosustava). Ciljevi istraživanja s gujavicama kao modelnim organizmima jesu razumijevanje biologije gujavica i njihove osjetljivosti na okolišni stres, uloga gujavica u kemijskom ciklusu tla, utjecaj na fizikalna svojstva tla, faunu i mikroorganizme tla, biljke i herbivorne organizme.

Zbog svoje konstantno vlažne kože, gujavice su idealni modelni organizmi i bioindikatori za ekotoksikološka istraživanja jer su direktno izloženi kemijskim spojevima i elementarnim tvarima u tlu. Toksikokinetika opisuje unos, transport, biotransformaciju i metabolizam te ekskreciju ksenobiotika. Toksikokinetika pesticida u gujavici ovisi o njihovom ekotipu u tlu, topljivosti pesticida u tlu i afinitetu vezanja pesticida za čestice tla (Slika 8).



Slika 8. Prikaz toksikokinetike pesticida u gujavici (Preuzeto i modificirano iz Katagi i Ose, 2015).

Rezultat različitih testiranja gujavica jest standardizacija ekotoksikoloških testova koji najčešće uključuju proučavanje preživljavanje jedinki, reproducijske testove i ostale fiziološke osobine jedinke.

Gujavice korištene u eksperimentu moraju biti zdrave i bez mehaničkih oštećenja (Slika 9). Indikatori su zdravlja oblik tijela bez lokalne konstrikcije, odsutnost oštećenja i epidermalnih lezija i mobilnost. Zdrave gujavice reagiraju na dodir, negativno su fototaksične i plivaju u vodi (Fründ i sur., 2010).



Slika 9. Prikaz odrasle, spolno zrele gujavice (*L. terrestris*) s izraženim klitelumom (foto: Dora Bjedov).

## 2.2. Izlaganje gujavica

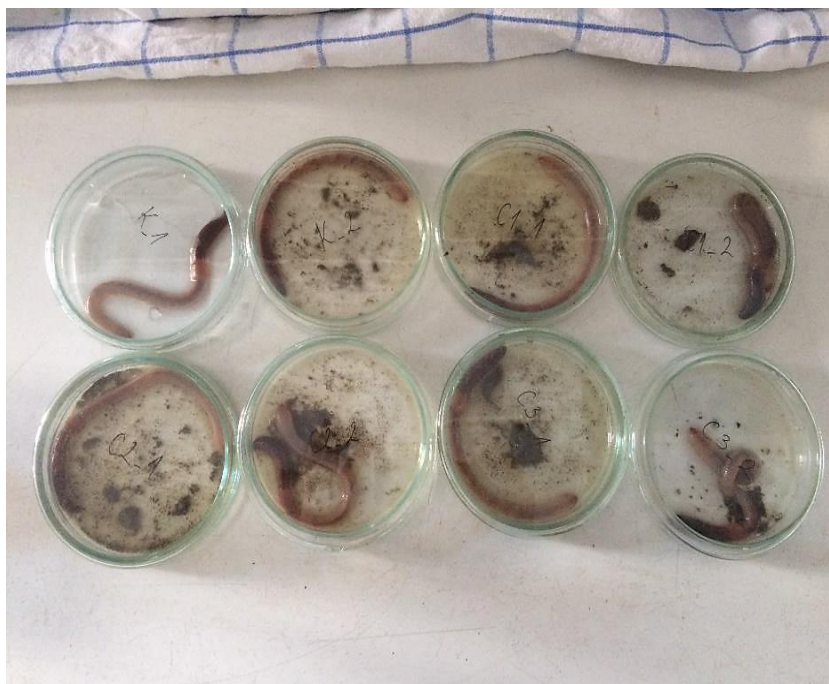
Za izlaganje gujavica korištena su 2 akutna testa toksičnosti: filter papir test i test s umjetnim tlom (OECD, 1984). Gujavice su izložene klorpirifosu različitim periodima: 48 sati (filter papir test) i 7 dana (test s umjetnim tlom).

## 2.3. Filter papir test

Filter papir test temelji se na izlaganju gujavica filter papiru u svrhu preliminarnog određivanja toksičnosti tvari. Gujavice su isprane u destiliranoj vodi (dH<sub>2</sub>O) i stavljene u veliku Petrijevu zdjelicu. Prije izlaganja gujavice se stavljaju 24 sata na čišćenje probavila (Slika 10, Slika 11). Ispiru se u dH<sub>2</sub>O, prosuše staničevinom te stavljaju u Erlenmeyerove tikvice u kojima je filter papir natopljen insekticidom.



Slika 10. Prikaz gujavica prije očišćenog probavila (foto: Dora Bjedov).



Slika 11. Prikaz gujavica nakon 24 sata s očišćenim probavilom (foto: Dora Bjedov).

Filter papir postavlja se u Erlenmeyerove tikvice i priprema se otopina različitih koncentracija aktivne tvari. Korišten je pripravak kontaktnog insekticida Nufosa koji sadrži aktivnu tvar klorpirifos (CHP). Količina aktivne tvari u Nufosu iznosi 48 %, odnosno 480 g/L. Priređene su tri koncentracije: C1 = 0.384  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , C2 = 3.84  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  i C3 = 38.4  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Tablica 3). Na filter papir stavljeno je ukupno 2 mL pripremljene otopine.

Tablica 3. Koncentracije aktivne tvari korištene u filter papir testu

		Koncentracija aktivne tvari ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )
<b>K</b>	Kontrola	0
<b>C1</b>	100 x manje od max. okolišnog doziranja	0.384
<b>C2</b>	10 x manje od max. okolišnog doziranja	3.84
<b>C3</b>	maksimalno okolišno doziranje	38.4

Svaki uzorak sastoji se od triplikata, po jedna gujavica u Erlenmeyerovoj tikvici. Ne stavlja se više od jedne gujavice u jednu tikvicu jer smrt jedne može utjecati na metabolizam ostalih gujavica. Tikvice s gujavicama stavljene su u inkubator na temperaturi od 20 ( $\pm$  2) °C.

Nakon 48 sati izlaganja gujavice su ispirane u dH<sub>2</sub>O, razrezane skalpelom ispred kliteluma (Slika 12), svaki uzorak prednjeg i stražnjeg dijela izvagao se i spremio na – 80 °C do daljnje analize.



Slika 12. Prikaz prednjeg i stražnjeg dijela gujavice (foto: Dora Bjedov).

#### **2.4. Test s umjetnim tlom**

Test s umjetnim tlom (engl. *artificial soil test*) je akutni test toksičnosti koji se temelji na izlaganju gujavica u tlu točno određenog kemijskog sastava i određene koncentracije ksenobiotika (ISO, 2012).

Kemijski sastav umjetnog tla:

10 % treset (pH 5.5 – 6.0, bez biljnih ostataka, mljeveno i osušeno)

20 % glina (udio kaolinita veći od 30 %)

70 % industrijski pijesak (udio čestica veličine 50 – 200 µm veći od 50 %)

1 % CaCO<sub>3</sub>

Vrijednost pH mijenja se dodatkom kalcijevog karbonata, a potreban pH tla je 6 (± 0.5). Prije miješanja tla s otopinom insekticida i stavljanja gujavica tlo je stajalo u komori na 20 °C, vlažnosti 60 %.

Pripremljene su tri različite koncentracije aktivne tvari kojima su gujavice izlagane u umjetnom tlu: C1 = 512.1 µg a.t./kg, C2 = 2560.2 µg a.t./kg i C3 = 7689.6 µg a.t./kg (Tablica 4).

Tablica 4. Koncentracije aktivne tvari korištene za izlaganje gujavica u testu s umjetnim tlom

	Koncentracija aktivne tvari (µg a.t./kg)
<b>K</b>	0
<b>C1</b>	512.1
<b>C2</b>	2560.2
<b>C3</b>	7680.6

Nakon 24 sata u svaku staklenku dodano je 400 g pripremljenog tla s otopinom insekticida. Staklenke su zatvorene plastičnim poklopcima s otvorima za zrak. U svaku staklenku stavljena je po jedna gujavica. Staklenke su bile u klimatskoj komori na 20 (± 2) °C.

Nakon sedam dana izlaganja gujavice su izvađene i isprane u dH<sub>2</sub>O, razrezane skalpelom ispred kliteluma, svaki uzorak prednjeg i stražnjeg dijela izvagan je i spremljen na – 80 °C do daljnje analize.

## 2.5. Mjerenje biomarkera

Mjerenja biomarkera oksidativnog stresa i aktivnosti acetilkolinesteraze provedena su u Laboratoriju za Kvantitativnu biologiju na Odjelu za biologiju u Osijeku. Priprema uzoraka uključuje homogenizaciju i S9 frakciju gujavica za mjerenje parametara:

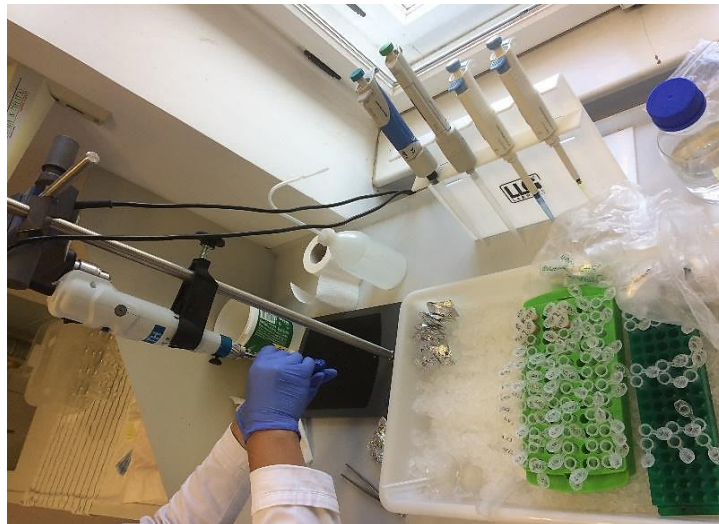
- određivanje aktivnosti acetilkolinesteraze
- određivanje aktivnosti katalaze
- određivanje aktivnosti glutathion S-transferaze
- određivanje ukupne koncentracije proteina
- određivanje produkta lipidne peroksidacije reaktivnih supstanci tiobarbiturne kiseline
- određivanje ukupne koncentracije lipida.



### 2.5.1. Homogenizacija i priprema S9 frakcije gujavica

Za homogenizaciju gujavica izvagan je prednji i stražnji dio, ispran u 0.1 M ohlađenom fosfatnom puferu pH = 7.2. Kivete u kojima se homogenizira dio gujavice ohlađene su zbog zagrijavanja uzorka (Slika 13). Povećanje temperature tijekom homogenizacije može denaturirati proteine, stoga je nužno postupke raditi na ledu.

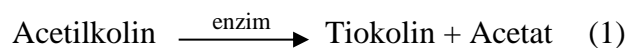
U kivetu se dodaje odgovarajući volumen rashlađenog pufera za homogeniziranje, omjer uzorka: pufer = 1:5 w/v. Uzorci se homogeniziraju Potter-Elvehjem teflonskim homogenizatorom. Homogenat se centrifugira na 9 000 x g, na 4 °C 30 minuta. Post-mitohondrijski supernatant (S9 frakcija) prebacuje se u Eppendorf krio posudicu te se sprema na – 80 °C do daljnjih analiza.



Slika 13. Prikaz homogenizacije prednjeg i stražnjeg dijela gujavice (foto: Dora Bjedov).

### 2.5.2. Određivanje aktivnosti acetilkolinesteraze (AChE)

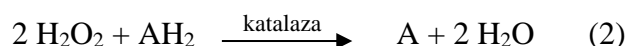
Aktivnost enzima određuje se kolorimetrijskom metodom, mjerenje nastanka tiokolina kao produkta hidrolize acetilkolina (1) (Ellman i sur., 1961). Tiokolin po nastanku reagira s Ellmanovim reagensom (5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzojevim) anionom) te nastaje žuto obojeni anion 5-tio-2-nitrobenzojeva kiselina, reakcija koja se odvija pri neutralnom ili alkalnom pH (2).



Aktivnost AChE mjeri se u kivetu od 1.5 mL u koju se dodaje 1.4 mL fosfatnog pufera, 25  $\mu\text{L}$  DTNB, 40  $\mu\text{L}$  S9 i 35  $\mu\text{L}$  acetiltiokolin jodida. U referentnu kivetu dodaje se pufer. Apsorbancija se mjeri na 412 nm tijekom 30 sekundi.

### 2.5.3. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT)

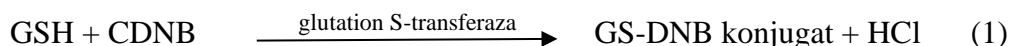
Katalaza je enzim koji je uključen u detoksifikaciju vodikovog peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), reaktivnih kisikovih jedinica koji su toksični produkti aerobnog metabolizma. CAT ima dvije aktivnosti: katalitičku i peroksidativnu. Katalitičkom aktivnosti razgrađuje vodikov peroksid na vodu (1), a u peroksidativnoj aktivnosti alkoholi male molekularne mase služe kao donori elektrona (2). Razgradnja  $\text{H}_2\text{O}_2$  prati se na 240 nm, a razlika u apsorbanci po jedinici vremena mjera je aktivnosti enzima. Optimalna vrijednost pH je 6.8 – 7.5 (Claiborne, 1984).



Aktivnost CAT mjeri se u kvarcnoj kivetu od 1.5 mL u koju se dodaje 780  $\mu\text{L}$  fosfatnog pufera, 20  $\mu\text{L}$  S9 frakcije, 700  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . U referentnu kivetu dodaje se pufer. Apsorbancija se mjeri na 240 nm tijekom 30 sekundi.

#### 2.5.4. Određivanje aktivnosti glutation S-transferaze (GST)

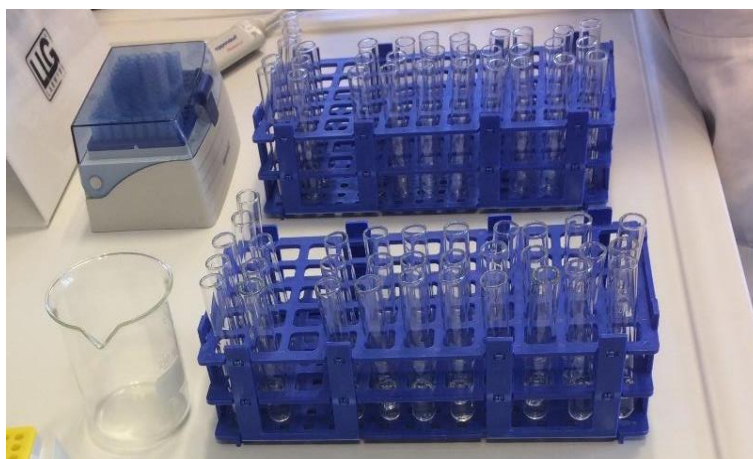
Glutation S-transferaza katalizira konjugaciju L-glutaciona s CDNB (1-kloro-2,4-dinitrobenzenom) kroz tiolnu skupinu L-glutaciona (1). Produkt reakcije je GS-DNB konjugat koji apsorbira pri 340 nm. Brzina porasta apsorbancije direktno je proporcionalna aktivnosti GST u uzorku.



Aktivnost GST mjeri se u kivetu od 1.5 mL u koju se dodaje 1 mL CDNB, 250  $\mu\text{L}$  GSH i 25  $\mu\text{L}$  S9 frakcije. U referentnu kivetu dodaje se pufer. Apsorbancija se mjeri na 340 nm tijekom 30 sekundi.

#### 2.5.5. Određivanje ukupne koncentracije proteina

Ukupna koncentracija proteina određuje se metodom po Lowry-u. Metoda se temelji na reakciji bakrenih iona vezanih na amino skupine peptidne veze i fenolne skupine bočnog ogranka aminokiseline tirozin (Tyr) u proteinu s Folin-Ciocalteu reagensom pri čemu nastaje kompleks plavo-ljubičastog obojenja (Slika 14). Apsorpcijski maksimum kompleksa je pri 750 nm. Folin-Ciocalteu reagens sadrži fosfovolframatnu i fosfomolidbensku kiselinu koju bakreni ioni koordinirano vezani na amino skupine peptidne veze i fenolna skupina Tyr reduciraju u volfram i molidben plavo. Metoda je osjetljiva u rasponu od 0.01 mg/mL do 1.0 mg/mL proteina u 50  $\mu\text{L}$  uzorka.



Slika 14. Prikaz plavo-ljubičastih uzoraka u kojima su proteini reagirali s Folin-Ciocalteu reagensom (foto: Dora Bjedov).

Za određivanje ukupne koncentracije proteina u uzorku potrebna je priprema standarda za kalibracijsku (baždarnu) krivulju. Standard (BSA) se priprema otapanjem 0.2 g BSA u 10 mL dH<sub>2</sub>O. Otopina se miješa na magnetnoj mješalici 15 minuta ili dok se BSA u potpunosti ne otopi.

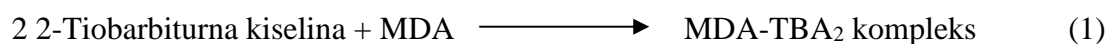
50 µL standarda ili uzorka razrijedi se s 2.6 mL 0.1 M natrijevim hidroksidom (NaOH). Za referentni uzorak miješa se 50 µL dH<sub>2</sub>O s 2.6 mL 0.1 M NaOH. Otopine se vorteksiraju.

Iz pripremljenih uzoraka pipetira se 500 µL i dodaje 2.6 mL kompleks-formirajućeg reagensa i vorteksira se. Otopine se ostavljaju 10 minuta na sobnoj temperaturi. U otopinu se dodaje 260 µL Folin-Ciocalteu reagensa i odmah se vorteksira. Otopine ne smiju stajati više od 60 minuta na sobnoj temperaturi. Apsorbanca uzoraka očitava se na 730 nm.

Baždarna krivulja računa se prema apsorbanci BSA standarda i koncentracije proteina u BSA standardima. Na temelju jednadžbe pravca računa se koncentracija proteina u uzorcima.

#### **2.5.6. Određivanje reaktivnih supstanci tiobarbiturne kiseline (TBARS)**

Fluorimetrijsko određivanje koncentracije reaktivnih supstanci tiobarbiturne kiseline temelji se na dva produkta lipidne peroksidacije: TBARS i MDA (Gagné, 2014). Jedna molekula MDA reagira s dvije molekule 2-tiobarbiturne kiseline (u kiselom mediju) u reakciji Knoevenagelove kondenzacije pri čemu nastaje kromofor s maksimumom apsorpcije na 532 nm (1).



Za određivanje koncentracije TBARS/MDA potrebno je pripremiti standard MDA za kalibracijsku krivulju.

200  $\mu\text{L}$  uzorka pipetira se Eppendorf tubicu s navojnim čepom. Pripremaju se dva referentna uzorka u koja se umjesto uzorka pipetira 200  $\mu\text{L}$  homogenizacijskog pufera. U uzorke i referentne uzorke dodaje se 600  $\mu\text{L}$  0.61 M TCA, 1.85 mM  $\text{FeSO}_4$  i 300  $\mu\text{L}$  46.5 mM TBA. Vorteksira se i stavlja u vodenu kupelj na 100  $^\circ\text{C}$  30 minuta. Uzorci se hlade na sobnoj temperaturi i talog se centrifugira 5 minuta na 10 000 x g.

U jažice se pipetira 300  $\mu\text{L}$  pripremljenog uzorka, referentnog uzorka i standarda te se fluorescencija očitava na 535/635 nm (Slika 15). Koncentracija malondialdehida izračunava se iz grafa kalibracijske krivulje.



Slika 15. Prikaz jažica s uzorcima u fluorometru (foto: Dora Bjedov).

### 2.5.7. Određivanje koncentracije lipida

Lipidi reagiraju s vanilinom u mediju sa sulfatnom i fosfatnom kiselinom pri čemu nastaje kromogen. Reakcija zahtijeva dvostruku vezu između dva atoma ugljika. Koncentrirana sulfatna kiselina reagira s nezasićenim lipidima pri čemu nastaje karbonijev ion. Fosfatna kiselina reagira s vanilinom pri čemu nastaje fosfatni ester što povećava reaktivnost karbonilne skupine. Karbonijev ion reagira s karbonilnom skupinom fosfovanilina pri čemu nastaje obojen spoj stabiliziran rezonancijom (Frings i sur., 1972).

Za određivanje lipida potrebno je pripemiti standard (Triton X-100). U Eppenderof kriotubicu dodaje se 20  $\mu\text{l}$  homogenata, u referentnu tubicu dodaje se 20  $\mu\text{l}$  pufera, a u tubicu za standard dodaje se 20  $\mu\text{l}$  Triton X-100. Zatim se dodaje 200  $\mu\text{l}$  koncentrirane  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , vorteksira se i stavlja u vodenu kupelj na 100 °C.

Nakon 10 minuta otopine se hlade na ledu, dodaje se 1 mL fosfovanilin reagensa. Vorteksira se i inkubira na 37 °C. Nakon 15 minuta otopine se ostavljaju na sobnoj temperaturi. Apsorbance se mjere na 540 nm unutar 30 minuta.

## **2.6. Statistička obrada podataka**

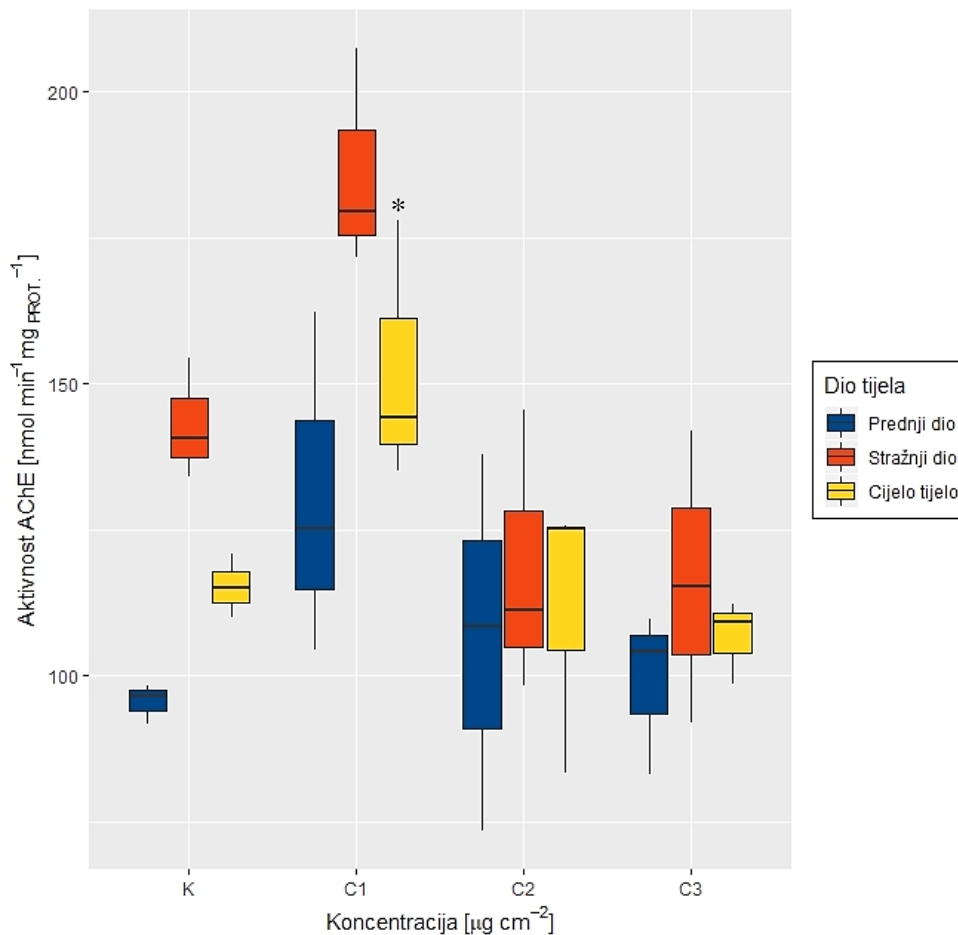
Podatci dobiveni ovim istraživanjem obrađeni su u statističkom programu R verzija 3.4.3. (RStudio Team, 2015). Rezultati su izraženi kao medijan, maksimalna i minimalna vrijednost. Za utvrđivanje razlika između pojedinih skupina uzoraka korišten je Kruskal Wallis test. Post-hoc Gao testom iz R paketa *nparcomp* utvrđene su razlike pri različitim koncentracijama aktivne tvari u odnosu na kontrolu. Bootstrap t testom (Web 6) testirane su razlike u odgovoru enzima acetilkolinesteraze, katalaze i glutation S-transferaze, sadržaja proteina, lipida i reaktivnih supstanci tiobarbiturne kiseline u prednjem i stražnjem dijelu tijela pri istoj koncentraciji. U svim statističkim testovima razina značajnosti (*p* vrijednost) iznosila je 0.05.

### 3. REZULTATI

#### 3.1. Utjecaj klorpirifosa na aktivnost acetilkolinesteraze (AChE) u gujavici *L. terrestris*

Rezultati filter papir testa (Slika 16) prikazuju jednak odgovor enzima AChE u prednjem i u stražnjem djelu te u cijelom tijelu gujavice. Najveća aktivnost AChE zabilježena je pri izlaganju najmanjoj C1 koncentraciji u odnosu na kontrolu, s povećanjem od 36.78 % u prednjem dijelu te s povećanjem od 30.15 % u stražnjem dijelu tijela. Najmanja aktivnost AChE zabilježena je pri izlaganju najvećoj C3 koncentraciji u odnosu na kontrolu, s povećanjem od 3.63 % u prednjem dijelu te sniženjem od 18.65 % u stražnjem dijelu tijela. U prednjem dijelu gujavice najveća aktivnost AChE zabilježena je tijekom izlaganja koncentraciji C1 ( $130.58 \pm 29.24 \text{ nmol min.}^{-1} \text{ mg}_{\text{prot}}^{-1}$ ), a najmanja aktivnost AChE zabilježena je tijekom izlaganja koncentraciji C3 ( $98.93 \pm 14.14 \text{ nmol min.}^{-1} \text{ mg}_{\text{prot}}^{-1}$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu. U stražnjem dijelu gujavice povećanje aktivnosti AChE zabilježeno je tijekom izlaganja koncentraciji C1 ( $186.15 \pm 18.77 \text{ nmol min.}^{-1} \text{ mg}_{\text{prot}}^{-1}$ ), a smanjenje aktivnost AChE zabilježeno je tijekom izlaganja koncentraciji C3 ( $116.35 \pm 25.07 \text{ nmol min.}^{-1} \text{ mg}_{\text{prot}}^{-1}$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu. U cijelom tijelu najveća aktivnost AChE zabilježena je pri najnižoj koncentraciji C1 ( $152.44 \pm 22.65 \text{ nmol min.}^{-1} \text{ mg}_{\text{prot}}^{-1}$ ). Statistički značajna razlika dobivena je pri izlaganju C1 koncentraciji s povećanjem aktivnosti AChE 32.27 % u cijelom tijelu u odnosu na kontrolu, a nije dobivena statistički značajna razlika u prednjem i stražnjem dijelu tijela. Pri najnižoj koncentraciji izražen je hormetički učinak u prednjem i stražnjem dijelu te u cijelom tijelu.

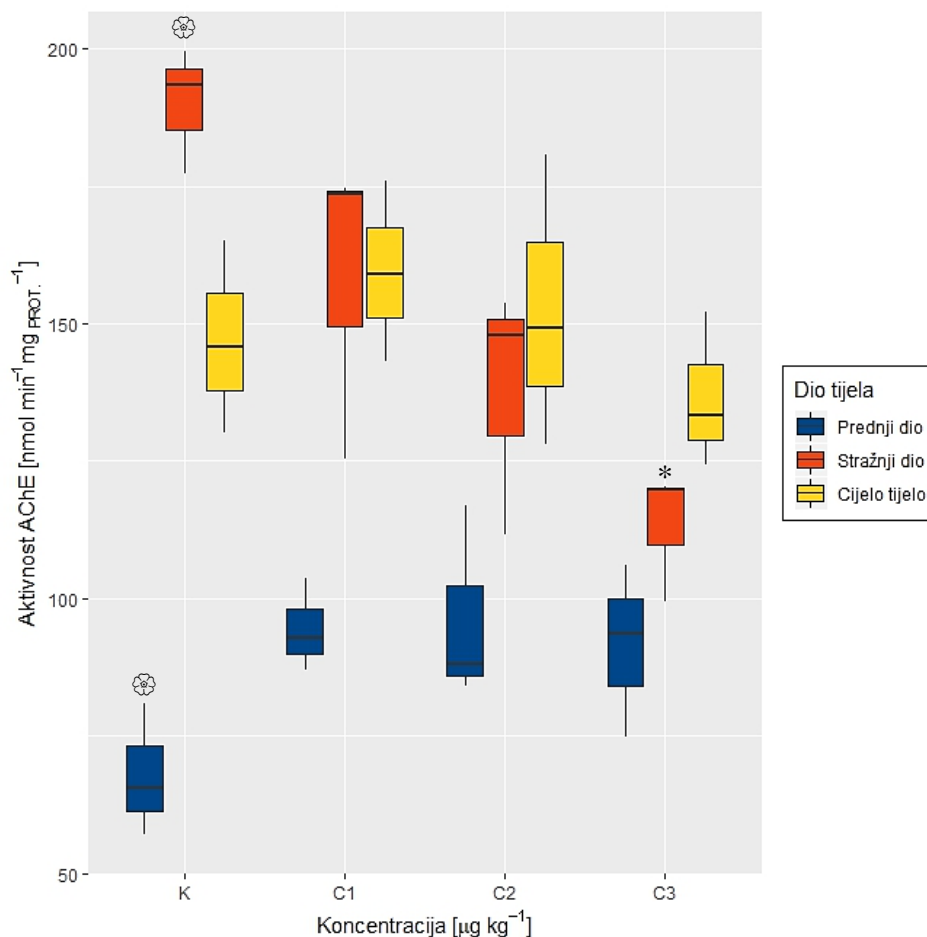




Slika 16. Filter papir test – aktivnost AChE u prednjem i stražnjem dijelu te u cijelom tijelu. Statistički značajne razlike ( $p < 0.05$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu označene su \*.

Rezultati izlaganja testa u umjetnom tlu (Slika 17) ne prikazuju jednak odgovor enzima AChE u prednjem i u stražnjem djelu tijela te u cijelom tijelu gujavice. Postoji statistički značajna razlika u aktivnosti AChE u prednjem i stražnjem dijelu tijela u kontrolnoj skupini. U prednjem dijelu gujavice dolazi do povećanja aktivnosti AChE pri svim koncentracijama. Najveća aktivnost u prednjem dijelu zabilježena je pri izlaganju C2 koncentraciji ( $96.28 \pm 17.97 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$ ) što je povećanje od 41.96 % u odnosu na kontrolu. U stražnjem dijelu tijela gujavice dolazi do inhibicije AChE pri svim koncentracijama. Pri izlaganju najvećoj C3 koncentraciji zabilježena je najniža aktivnost AChE s 40.38 % nižom aktivnošću u odnosu na kontrolu. Najniža aktivnost AChE u odnosu na kontrolnu skupinu zabilježena je pri izlaganju C3 koncentraciji ( $113.28 \pm 11.89 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$ ).

U cijelom tijelu gujavice zabilježena je najveća aktivnost AChE pri izlaganju C1 ( $159.35 \pm 16.46 \text{ nmol min.}^{-1} \text{ mg prot.}^{-1}$ ), a najmanja aktivnost uočena je pri izlaganju C3 ( $136.52 \pm 14.22 \text{ nmol min.}^{-1} \text{ mg prot.}^{-1}$ ).

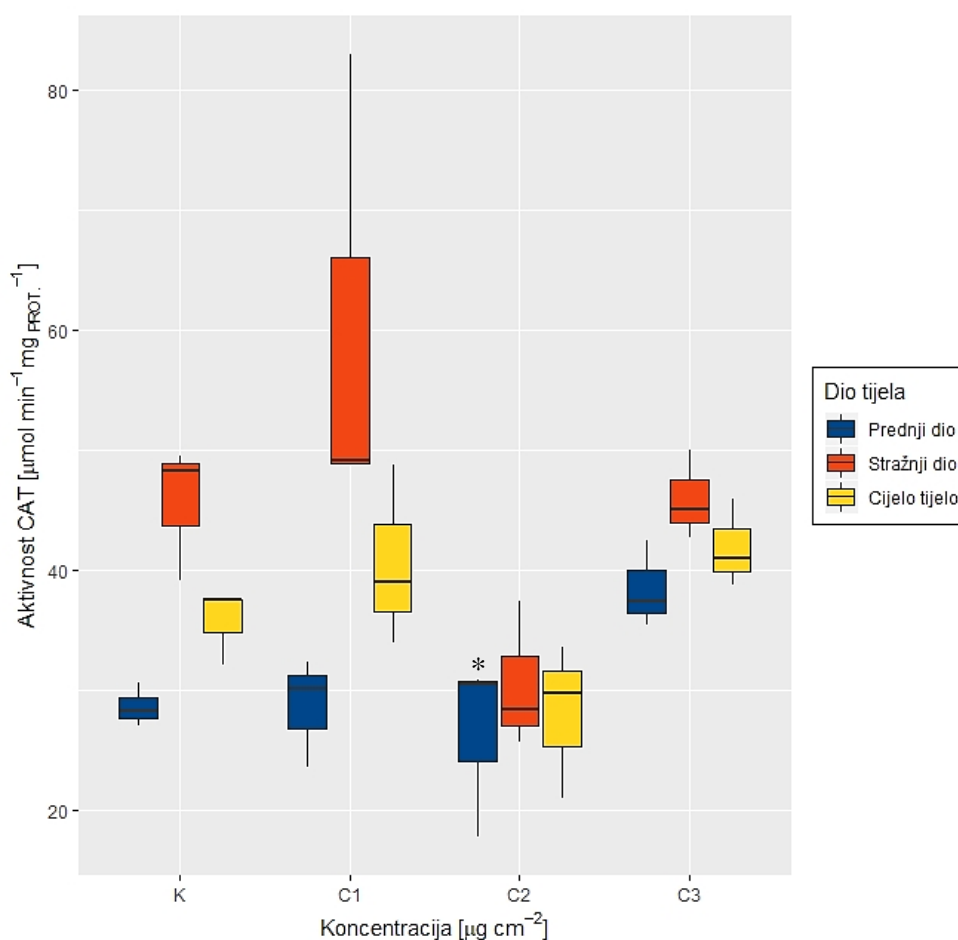


Slika 17. Test u umjetnom tlu – aktivnost AChE u prednjem i stražnjem dijelu te u cijelom tijelu. Statistički značajne razlike ( $p < 0.05$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu označene su \*, a značajne razlike ( $p < 0.05$ ) između prednjeg i stražnjeg dijela označene su ☼.

### 3.2. Utjecaj klorpirifosa na aktivnost katalaze (CAT) u gujavici *L. terrestris*

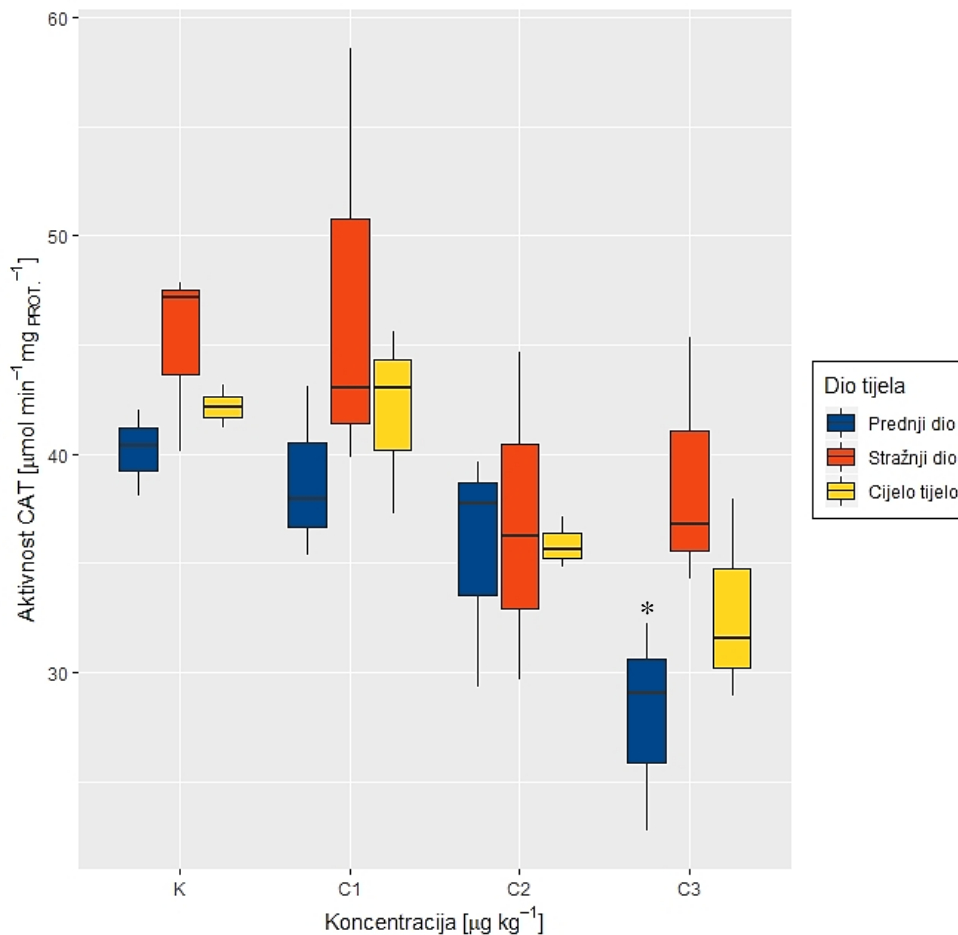
Rezultati filter papir testa (Slika 18) ne prikazuju jednak odgovor katalaze u prednjem i stražnjem dijelu te u cijelom tijelu gujavice. U prednjem dijelu tijela aktivnost CAT povećala se pri izlaganju C1 i C3 koncentraciji s najvećim povećanjem od 34.59 % pri izlaganju C3 koncentraciji.

Najveća aktivnost CAT zabilježena je tijekom izlaganja koncentraciji C3 ( $38.48 \pm 3.64 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$ ). Pri izlaganju C2 koncentraciji ( $26.37 \pm 7.47 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$ ) aktivnost CAT smanjila se za 7.77 % u odnosu na kontrolu. Postoji statistički značajna razlika u aktivnosti CAT pri izlaganju C2 koncentraciji u odnosu na kontrolnu skupinu u prednjem dijelu tijela. U stražnjem dijelu tijela aktivnost CAT povećala se pri izlaganju C1 ( $60.28 \pm 19.63 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$ ) i C3 ( $45.92 \pm 3.70 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$ ) koncentraciji s najvećim povećanjem pri izlaganju C1 koncentraciji (32.08 %). Aktivnost CAT smanjila se pri izlaganju C2 ( $30.47 \pm 6.11 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$ ) koncentraciji što je smanjenje od 33.35 % u odnosu na kontrolu. Rezultati enzimske aktivnosti CAT u cijelom tijelu ukazuju na povećanu aktivnost prilikom izlaganja C3 koncentraciji ( $83.76 \pm 7.41 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$ ), a smanjenje aktivnosti zabilježeno je tijekom izlaganja C2 koncentraciji ( $56.15 \pm 12.96 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$ ).



Slika 18. Filter papir test – aktivnost CAT u prednjem i stražnjem dijelu te u cijelom tijelu. Statistički značajne razlike ( $p < 0.05$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu označene su \*.

Rezultati testa s umjetnim tlom (Slika 19) ne prikazuju jednak odgovor CAT u prednjem i stražnjem dijelu tijela. U prednjem dijelu gujavice dolazi do postupne inhibicije CAT. Pri izlaganju C3 koncentraciji došlo je do smanjenja aktivnosti CAT od 27.81 % u odnosu na kontrolu. Najmanja aktivnost CAT u prednjem dijelu zabilježena je kod izlaganja C3 koncentraciji ( $28.01 \pm 4.83 \mu\text{mol min.}^{-1} \text{mg}_{\text{prot}}^{-1}$ ) i potvrđena je statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu. U stražnjem dijelu tijela dolazi do povećanja od 4.62 % pri izlaganju C1 koncentraciji, a pri C2 i C3 koncentraciji dolazi do inhibicije CAT. Pri izlaganju C2 koncentraciji došlo je do smanjenja aktivnost CAT od 18.21 % u odnosu na kontrolu. U stražnjem dijelu tijela pri C1 koncentraciji uočena je najveća aktivnost CAT ( $47.13 \pm 10.00 \mu\text{mol min.}^{-1} \text{mg}_{\text{prot}}^{-1}$ ), dok je C2 koncentracija imala najmanji učinak na aktivnost CAT ( $36.85 \pm 7.51 \mu\text{mol min.}^{-1} \text{mg}_{\text{prot}}^{-1}$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu. U cijelom tijelu najniža koncentracija C1 u cijelom dijelu tijela uzrokovala je najveće povećanje enzimske aktivnosti ( $83.96 \pm 8.56 \mu\text{mol min.}^{-1} \text{mg}_{\text{prot}}^{-1}$ ), dok je prilikom izlaganja najvećoj koncentraciji C3 uočena najmanja aktivnost CAT ( $65.62 \pm 9.34 \mu\text{mol min.}^{-1} \text{mg}_{\text{prot}}^{-1}$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu.

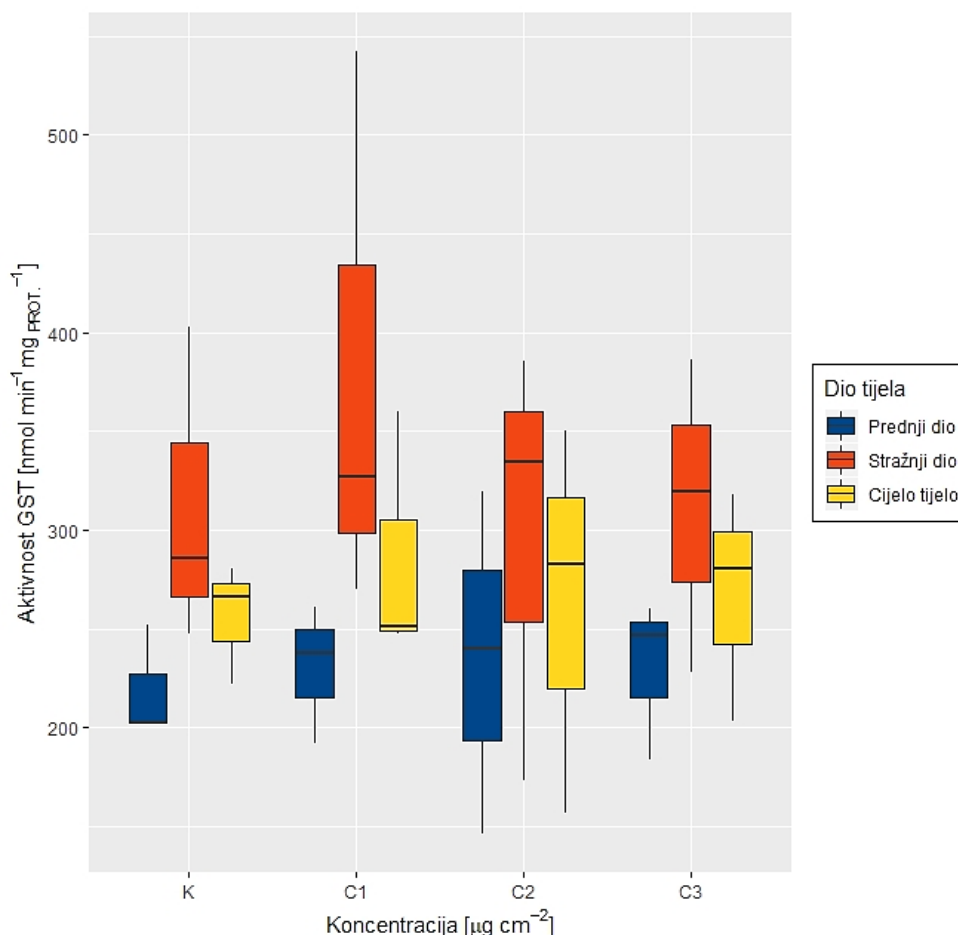


Slika 19. Test s umjetnim tlom – aktivnost CAT u prednjem i stražnjem dijelu te u cijelom tijelu. Statistički značajne razlike ( $p < 0.05$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu označene su \*.

### 3.3. Utjecaj klorpirifosa na aktivnost glutathion S-transferaze (GST) u gujavici *L. terrestris*

Rezultati filter papir testa (Slika 20) ne prikazuju jednak odgovor GST u prednjem i stražnjem dijelu tijela. U prednjem dijelu gujavice povećala se aktivnost GST pri svim izloženim koncentracijama (C1, C2 i C3) s najvećim povećanjem aktivnosti od 7.61 % u odnosu na kontrolnu skupinu pri izlaganju C2 koncentraciji ( $235.33 \pm 86.91 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$ ). U stražnjem dijelu tijela aktivnost GST povećala se za 21.65 % pri izlaganju C1 koncentraciji ( $379.57 \pm 143.35 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$ ), dok se aktivnost GST pri izlaganju C3 koncentraciji ( $311.32 \pm 79.47 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$ ) smanjila za 0.22 %.

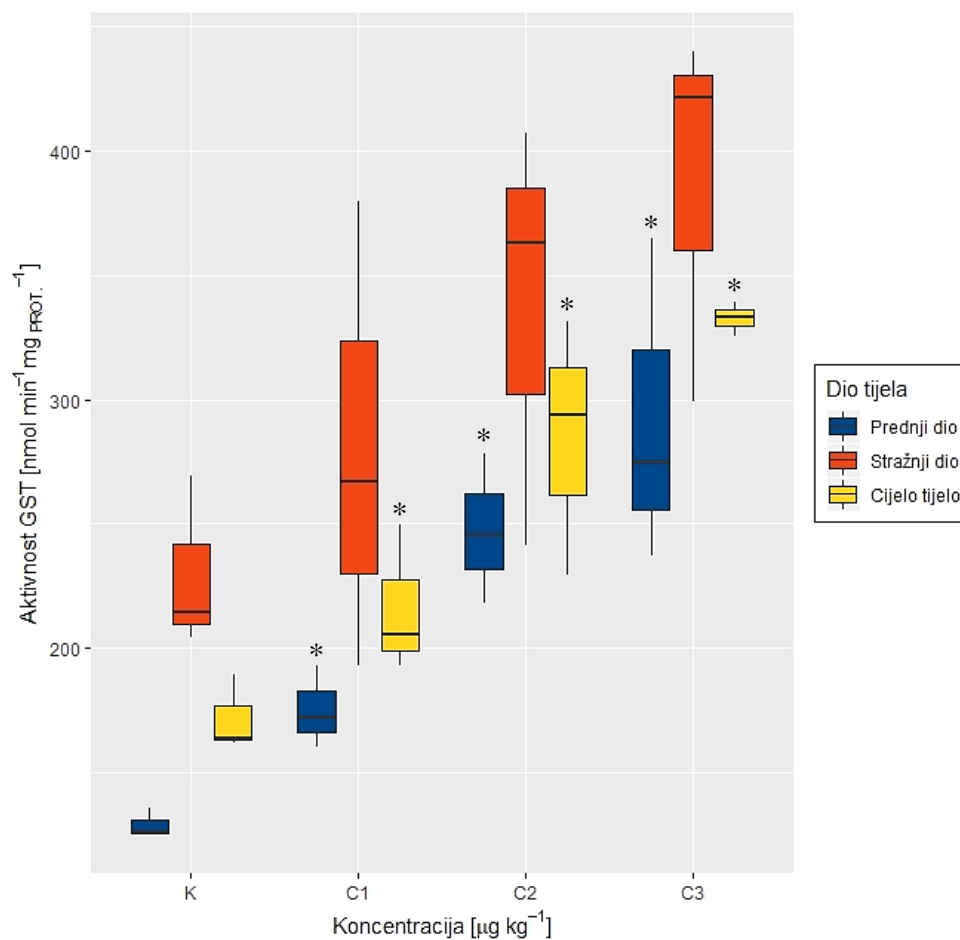
Aktivnost GST nije se statistički značajno mijenjala u odnosu na kontrolu, ni u odnosu na dio tijela. U cijelom tijelu enzimska aktivnost povećala se u odnosu na kontrolnu skupinu, s najvećom aktivnošću pri C1 koncentraciji ( $286.09 \pm 64.01 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$ ).



Slika 20. Filter papir test – aktivnost GST u prednjem i stražnjem dijelu te u cijelom tijelu.

Rezultati testa s umjetnim tлом (Slika 21) prikazuju jednak odgovor GST u prednjem i stražnjem dijelu tijela. U prednjem i stražnjem dijelu aktivnost GST postupno se povećava, s povećanjem od 126.96 % u prednjem dijelu tijela pri izlaganju C3 koncentraciji te s povećanjem od 68.54 % u stražnjem dijelu tijela pri izlaganju C3 koncentraciji u odnosu na kontrolu. U prednjem dijelu gujavice sve skupine pokazuju statistički značajno povećanje aktivnosti GST u odnosu na kontrolnu skupinu, s najvećom zabilježenom aktivnošću pri izlaganju C3 koncentraciji ( $292.22 \pm 65.79 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$ ).

U stražnjem dijelu gujavice uočen je porast enzimske aktivnosti, s najvećom vrijednošću pri C3 koncentraciji ( $386.66 \pm 76.57 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$ ). U cijelom tijelu aktivnost GST postupno se povećava i najviša aktivnost zabilježena je pri C3 koncentraciji ( $332.58 \pm 6.83 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu. U svim skupinama postoji statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

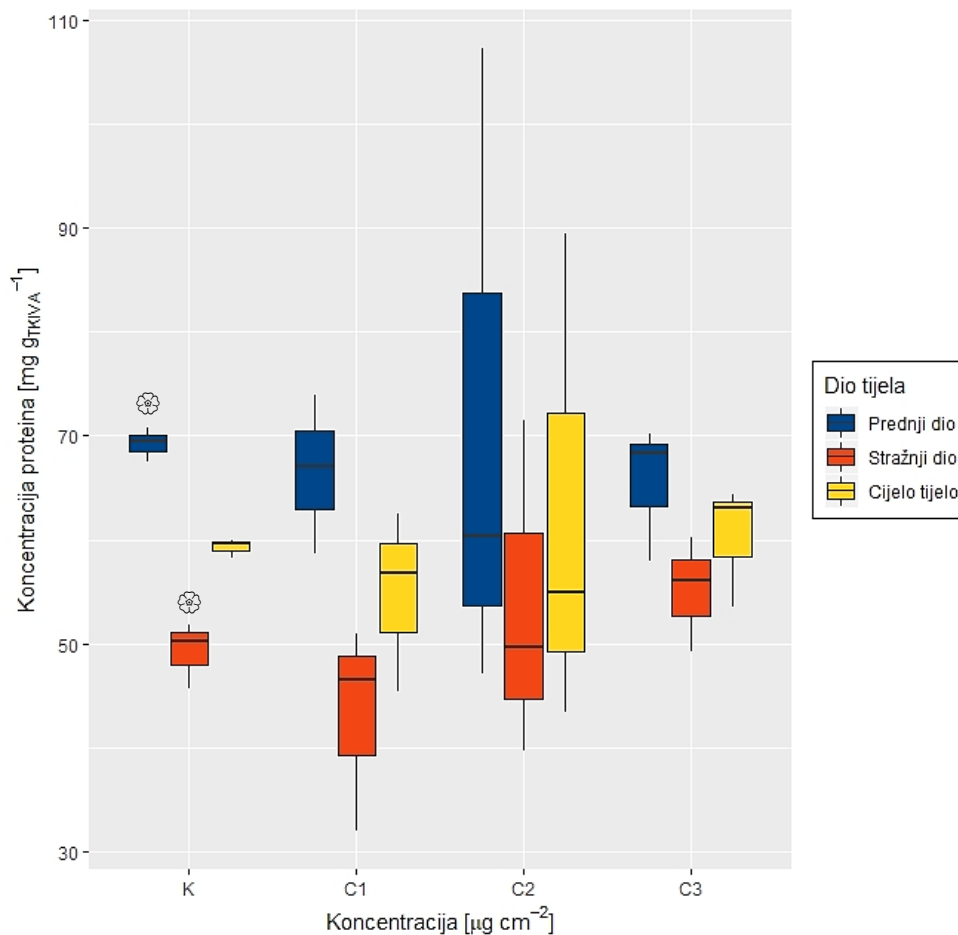


Slika 21. Test s umjetnim tlom – aktivnost GST u prednjem i stražnjem dijelu te u cijelom tijelu. Statistički značajne razlike ( $p < 0.05$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu označene su \*.

### 3.4. Utjecaj klorpirifosa na koncentraciju proteina u gujavici *L. terrestris*

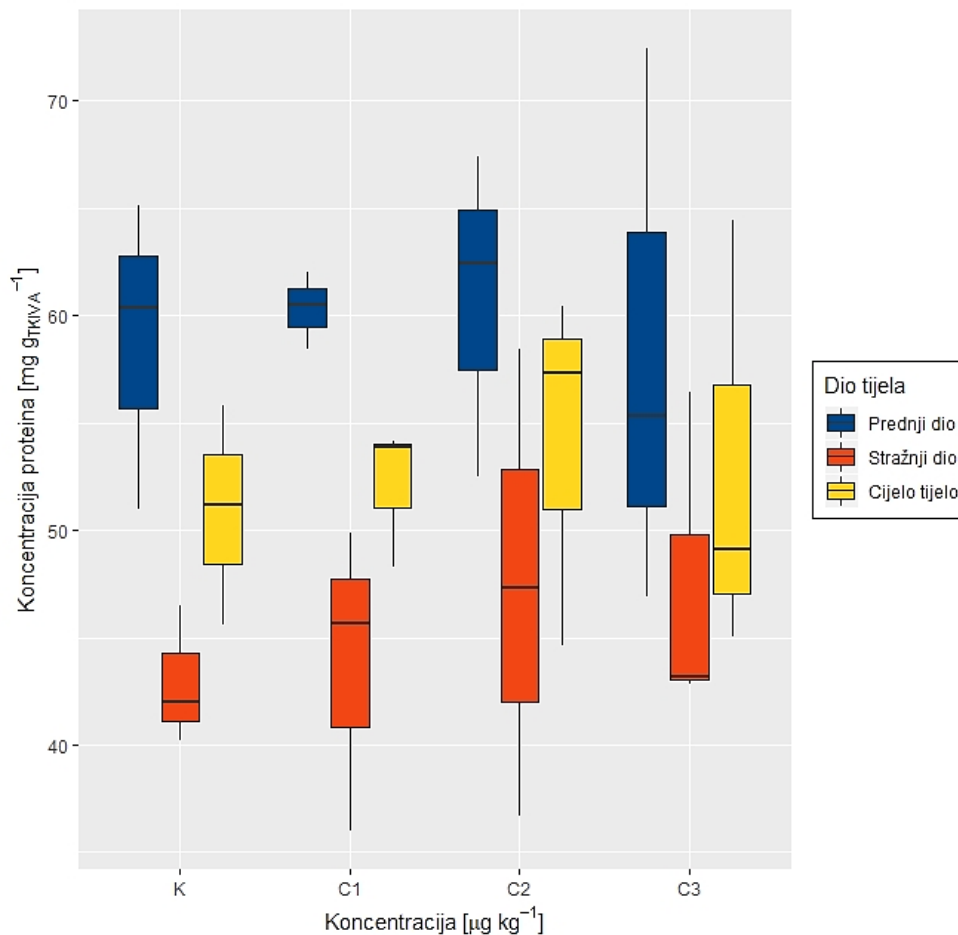
Rezultati filter papir testa (Slika 22) ne prikazuju jednake promjene koncentracije proteina u prednjem i stražnjem dijelu tijela. U prednjem dijelu gujavice pokazuju povećanje koncentraciju proteina od 3.37 % pri izlaganju C2 koncentraciji ( $71.57 \pm 31.64 \text{ mg g tkiva}^{-1}$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu, a smanjenje koncentracija proteina od 5.39 % zabilježeno je pri izlaganju C3 koncentraciji ( $65.50 \pm 6.57 \text{ mg g tkiva}^{-1}$ ). U stražnjem dijelu gujavice zabilježeno je povećanje koncentracije proteina od 11.94 % pri izlaganju C3 koncentraciji ( $55.14 \pm 5.59 \text{ mg g tkiva}^{-1}$ ), a smanjenje koncentracije proteina od 12.42 % zabilježeno je pri izlaganju C1 koncentraciji ( $43.14 \pm 9.96 \text{ mg g tkiva}^{-1}$ ). Postoji značajna razlika u koncentraciji proteina u prednjem i stražnjem dijelu gujavice u kontrolnoj skupini. Koncentracija proteina prednjeg i stražnjeg dijela nije se statistički značajno mijenjala u odnosu na kontrolu. U cijelom tijelu najveća vrijednost zabilježena je pri C2 ( $62.58 \pm 23.96 \text{ mg g tkiva}^{-1}$ ), a pri C1 ( $54.86 \pm 8.74 \text{ mg g tkiva}^{-1}$ ) zabilježena je najniža vrijednost ukupne koncentracije proteina.





Slika 22. Filter papir test – koncentracija proteina u prednjem i stražnjem dijelu te u cijelom tijelu. Statistički značajne razlike ( $p < 0.05$ ) između prednjeg i stražnjeg dijela označene su ☼.

Rezultati testa s umjetnim tlom (Slika 23) ne prikazuju jednake promjene koncentracije proteina u prednjem i stražnjem dijelu tijela. U prednjem dijelu tijela zabilježeno je povećanje koncentracije proteina od 3.33 % pri izlaganju C2 koncentraciji ( $60.78 \pm 7.56 \text{ mg g tkiva}^{-1}$ ), a smanjenje koncentracije proteina od 1.03 % zabilježeno je pri izlaganju C3 koncentraciji ( $58.22 \pm 12.99 \text{ mg g tkiva}^{-1}$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu. U stražnjem dijelu tijela koncentracija proteina postupno se povećava u odnosu na kontrolnu skupinu s najvećim povećanjem od 10.66 %. Najveća koncentracija proteina zabilježena je pri izlaganju C3 koncentraciji ( $47.48 \pm 7.76 \text{ mg g tkiva}^{-1}$ ). Koncentracije proteina nisu se statistički značajno mijenjale u odnosu na kontrolu, ni u odnosu na dio tijela. U cijelom tijelu koncentracije proteina povećale su se u odnosu na kontrolu, s najvećom koncentracijom proteina pri C2 koncentraciji ( $54.13 \pm 8.39 \text{ mg g tkiva}^{-1}$ ).

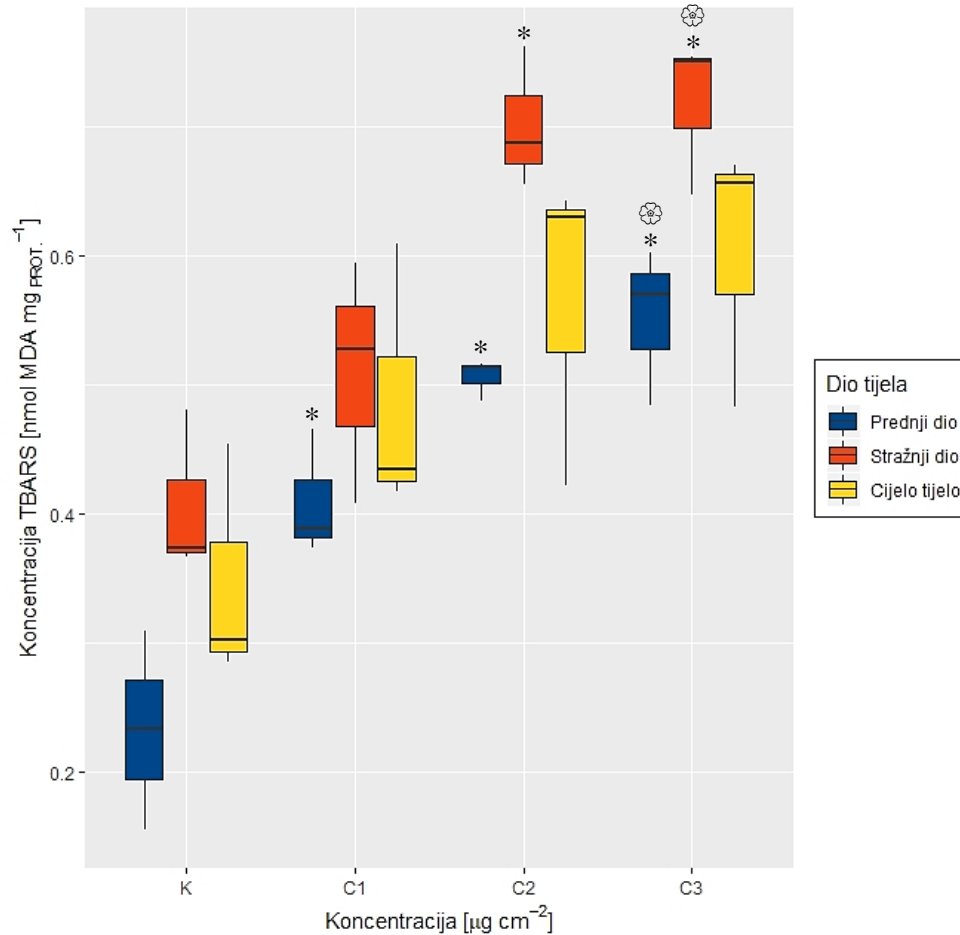


Slika 23. Test s umjetnim tlom – koncentracija proteina u prednjem i stražnjem dijelu te u cijelom tijelu.

### 3.5. Utjecaj klorpirifosa na koncentraciju reaktivnih supstanci tiobarbiturne kiseline (TBARS) u gujavici *L. terrestris*

Rezultati filter papir testa (Slika 24) prikazuju jednake promjene koncentracije TBARS u prednjem i stražnjem dijelu tijela. U prednjem i stražnjem dijelu povećava se koncentracija TBARS. Pri izlaganju koncentraciji C3 koncentracija TBARS povećala se u prednjem dijelu za 137.45 % te se povećala u stražnjem dijelu za 76.16 % u odnosu na kontrolu. U prednjem dijelu tijela gujavice pokazuju statistički značajno povećanje koncentracije TBARS u odnosu na kontrolu, s najvećom koncentracijom pri izlaganju C3 koncentraciji ( $0.55 \pm 0.06$  nmol MDA  $\text{mg}_{\text{prot}}^{-1}$ ). U stražnjem dijelu tijela najveća koncentracija TBARS izmjerena je pri izlaganju C3 koncentraciji ( $0.72 \pm 0.06$  nmol MDA  $\text{mg}_{\text{prot}}^{-1}$ ) u odnosu na kontrolu.

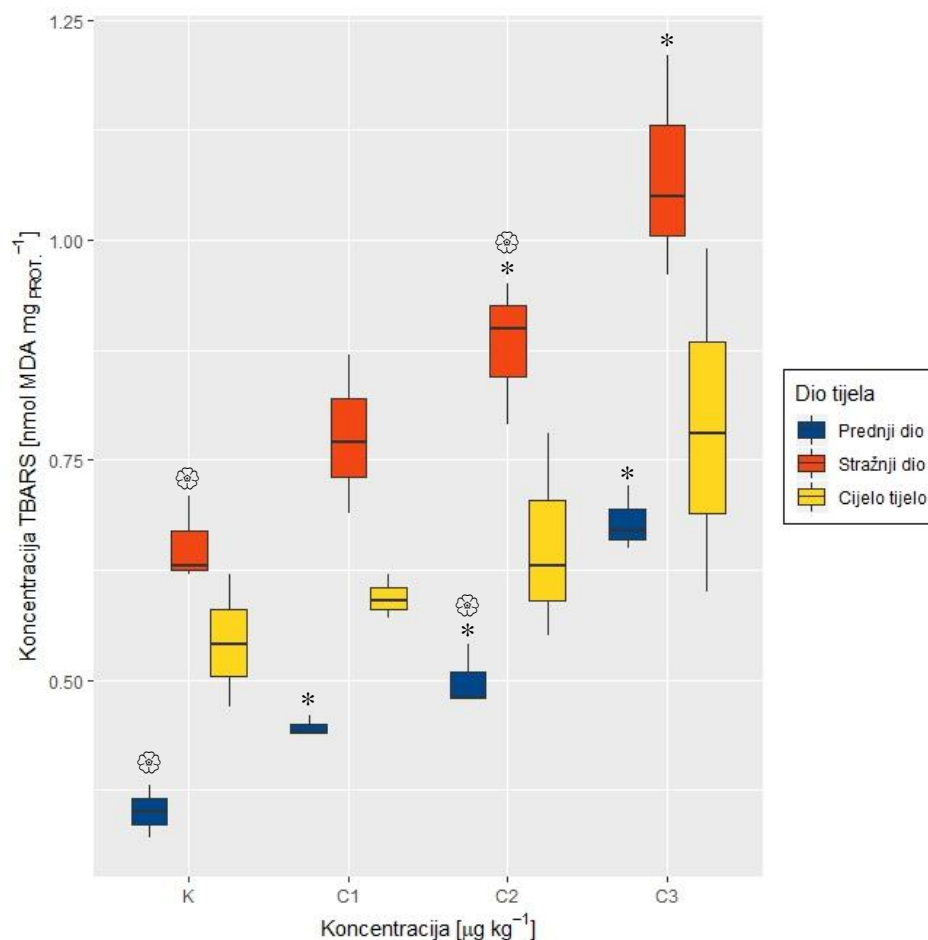
Statistički značajna razlika u stražnjem dijelu zabilježena je pri izlaganju koncentracijama C2 i C3 u odnosu na kontrolnu skupinu. Postoji statistički značajna razlika u koncentraciji TBARS prednjeg i stražnjeg dijela u skupini izloženoj C3 koncentraciji. Rezultati izlaganja cijelog tijela pokazuju povećanje koncentracije TBARS, s najvišom koncentracijom TBARS kod izlaganja C3 koncentraciji ( $0.60 \pm 0.10 \text{ nmol MDA mg prot.}^{-1}$ ).



Slika 24. Filter papir test – koncentracija TBARS u prednjem i stražnjem dijelu te u cijelom tijelu. Statistički značajne razlike ( $p < 0.05$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu označene su \*, a značajne razlike ( $p < 0.05$ ) između prednjeg i stražnjeg dijela označene su ⊛.

Rezultati testa s umjetnim tlom (Slika 25) prikazuju jednake promjene koncentracije TBARS u prednjem i stražnjem dijelu gujavice. U prednjem i stražnjem dijelu tijela zabilježeno je povećanje koncentracije TBARS.

U prednjem dijelu koncentracije TBARS povećala se za 94.74 % te u stražnjem dijelu koncentracije TBARS povećala se za 63.94 % u odnosu na kontrolu. U prednjem dijelu gujavice sve navedene koncentracije (C1, C2 i C3) uzrokovale su statistički značajan porast koncentracije TBARS, s najvećom koncentracijom pri izlaganju C3 koncentraciji ( $0.68 \pm 0.04$  nmol MDA mg<sub>prot</sub><sup>-1</sup>) u odnosu na kontrolu. U stražnjem dijelu tijela zabilježeno je statistički značajno povećanje koncentracije TBARS pri C2 i C3 izlaganju, s najvećom koncentracijom TBARS pri izlaganju C3 koncentraciji ( $1.07 \pm 0.13$  nmol MDA mg<sub>prot</sub><sup>-1</sup>) u odnosu na kontrolu. Postoji statistički značajna razlika u koncentraciji TBARS između prednjeg i stražnjeg dijela tijela u kontrolnoj skupini, a pri izlaganju C2 koncentraciji postoji statistički značajno povećanje koncentracije TBARS u stražnjem dijelu u odnosu na prednji dio tijela. U cijelom tijelu koncentracije TBARS postupno su se povećale u odnosu na kontrolu. Najveća koncentracija TBARS u cijelom tijelu izmjerena je pri izlaganju C3 koncentraciji ( $0.79 \pm 0.19$  nmol MDA mg<sub>prot</sub><sup>-1</sup>).

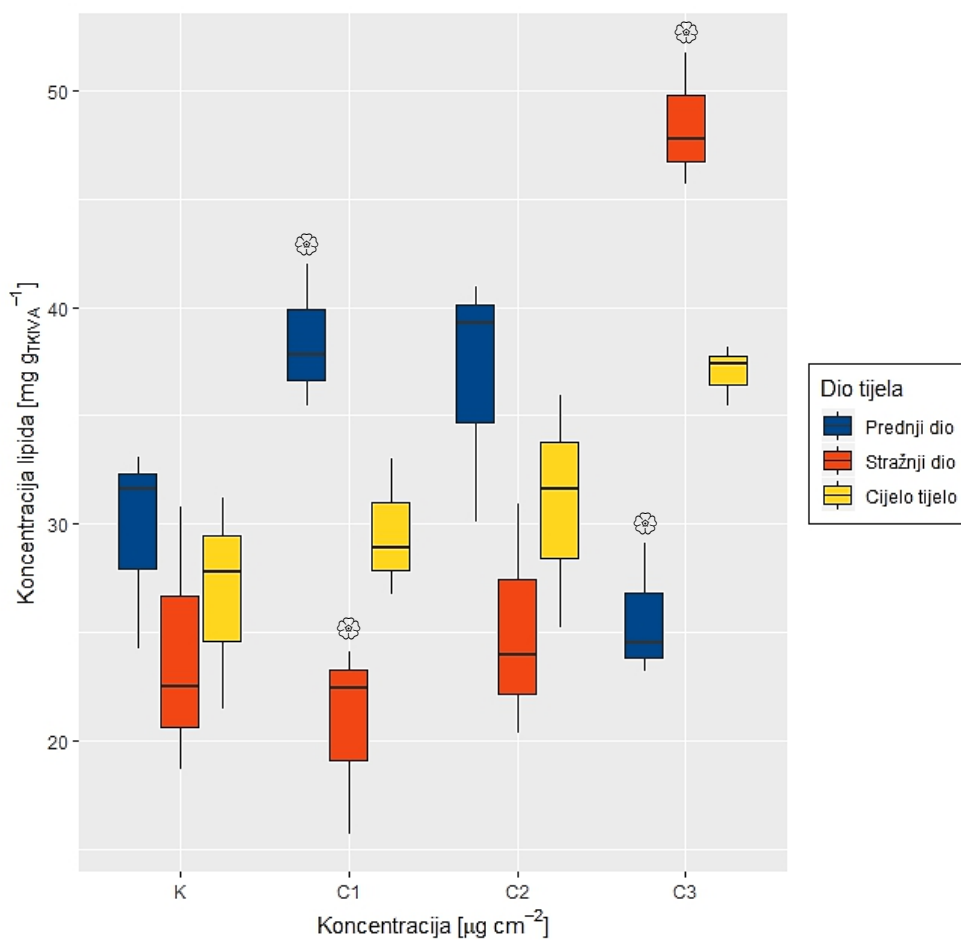


Slika 25. Test s umjetnim tlom – koncentracija TBARS u prednjem i stražnjem dijelu te u cijelom tijelu. Statistički značajne razlike ( $p < 0.05$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu označene su \*, a značajne razlike ( $p < 0.05$ ) između prednjeg i stražnjeg dijela označene su ⊗.

### 3.6. Utjecaj klorpirifosa na koncentraciju lipida u gujavici *L. terrestris*

Rezultati filter papir testa (Slika 26) ne prikazuju jednake promjene koncentracije lipida u prednjem i stražnjem dijelu tijela. U prednjem dijelu porast koncentracije lipida zabilježen je pri izlaganju C1 i C2 koncentracijama s najvećim povećanjem od 29.67 % u odnosu na kontrolu. Najveća koncentracija lipida u prednjem dijelu zabilježena je pri izlaganju C1 koncentraciji ( $38.42 \pm 3.30 \text{ mg g tkiva}^{-1}$ ). Pri izlaganju C3 koncentraciji ( $25.59 \pm 3.11 \text{ mg g tkiva}^{-1}$ ) zabilježen je pad koncentracije lipida od 13.62 % u odnosu na kontrolu. U stražnjem dijelu gujavice koncentracije lipida povećale su se pri izlaganju koncentracijama C2 i C3 za 101.84 % u odnosu na kontrolu. Najveća koncentracija lipida zabilježena je pri C3 ( $48.42 \pm 3.08 \text{ mg g tkiva}^{-1}$ ).

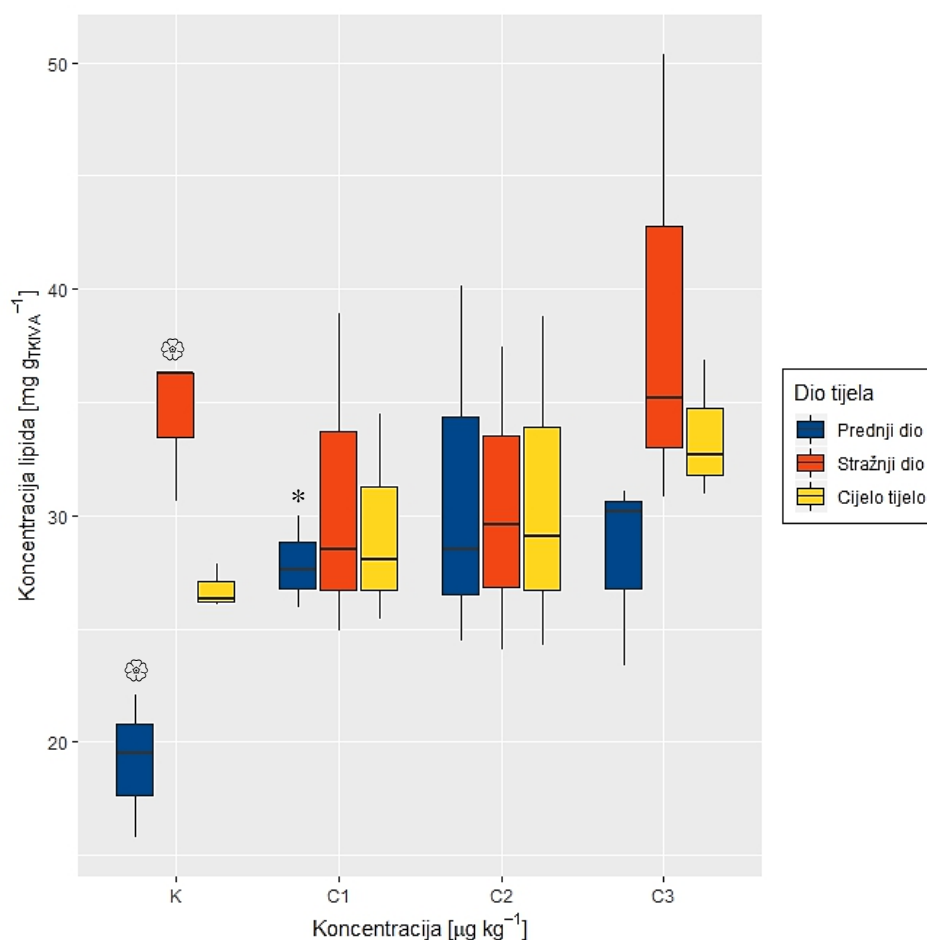
U stražnjem dijelu tijela pri izlaganju C1 koncentraciji ( $20.72 \pm 4.44 \text{ mg g tkiva}^{-1}$ ) došlo je do smanjenja koncentracije lipida za 13.60 % u odnosu na kontrolnu skupinu. Postoji statistički značajna razlika u koncentraciji lipida prednjeg i stražnjeg dijela gujavice pri koncentracijama C1 i C3. Postupni porast koncentracije lipida zabilježen je u cijelom tijelu, s najvećom koncentracijom pri C3 ( $37.01 \pm 1.37 \text{ mg g tkiva}^{-1}$ ).



Slika 26. Filter papir test – koncentracija lipida u prednjem i stražnjem dijelu te u cijelom tijelu. Statistički značajne razlike ( $p < 0.05$ ) između prednjeg i stražnjeg dijela označene su \*.

Rezultati testa s umjetnim tlom (Slika 27) ne prikazuju jednak odgovor promjene koncentracije lipida u prednjem i stražnjem dijelu tijela. U prednjem dijelu tijela koncentracija lipida povećala se 62.52 % pri izlaganju C2 koncentraciji u odnosu na kontrolu.

Statistički značajno povećanje koncentracije lipida potvrđeno je pri izlaganju C1 koncentraciji ( $27.84 \pm 2.06 \text{ mg g tkiva}^{-1}$ ), a najveća koncentracija lipida zabilježena je pri izlaganju C2 koncentraciji ( $31.04 \pm 8.13 \text{ mg g tkiva}^{-1}$ ) u odnosu na kontrolu. U stražnjem dijelu tijela zabilježeno je povećanje koncentracije lipida od 12.70 % pri izlaganju C3 koncentraciji ( $38.79 \pm 10.25 \text{ mg g tkiva}^{-1}$ ) u odnosu na kontrolu. Smanjenje koncentracije lipida od 10.55 % zabilježeno je pri koncentracijama C1 i C2. Najmanja količina lipida izmjerena je pri izlaganju C2 koncentraciji ( $30.38 \pm 6.71 \text{ mg g tkiva}^{-1}$ ) u odnosu na kontrolu. U kontrolnoj skupini postoji značajna razlika u količini lipida prednjeg i stražnjeg dijela. U cijelom tijelu zabilježen je porast koncentracije lipida s porastom koncentracije klorpirifosa. Najveća koncentracija lipida zabilježena je pri izlaganju C3 koncentraciji ( $33.49 \pm 3.04 \text{ mg g tkiva}^{-1}$ ).



Slika 27. Test s umjetnim tlom – koncentracija lipida u prednjem i stražnjem dijelu te u cijelom tijelu. Statistički značajne razlike ( $p < 0.05$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu označene su \*, a značajne razlike ( $p < 0.05$ ) između prednjeg i stražnjeg dijela označene su ☼.

## 4. RASPRAVA

Utjecaj pesticida na neciljne organizme u tlu ovisi o količini ukupne organske tvari, pH, kationskoj izmjeni, omjeru C:N, i dr. S obzirom na različito prodiranje pesticida i vezanje na čestice tla, utječu na različite vrste gujavica ovisno o njihovoj vertikalnoj distribuciji (Yasmin i D'Souza, 2010). Klorpirifos je insekticid širokog spektra. Veže se za čestice tla, perzistira i njegovi metaboliti uzrokuju zagađenje tla te podzemnih i površinskih voda. Njegova sve veća upotreba uzrokuje neurotoksičnost neciljnih organizama tla (Zhou i sur., 2007).

Ukupna koncentracija proteina mjerena je za izračunavanje specifične aktivnosti enzima. U ovom istraživanju količina proteina nije se značajno mijenjala u odnosu na koncentraciju klorpirifosa što potvrđuju prijašnja istraživanja. Schreck i sur. (2008) zabilježili su skoro jednake ukupne koncentracije proteina u gujavici *Aporrectodea caliginosa nocturna* u 14 dana izlaganja kombinaciji insekticida i fungicida, a nakon 34 dana primijetili su smanjenje ukupne koncentracije proteina. U ovome istraživanju u prednjem dijelu zabilježena je veća koncentracija proteina, nego u stražnjem dijelu tijela gujavice.

U terestričkim ekosustavima inhibicija AChE u gujavicama pokazatelj je zagađenosti tla OP pesticidima. Uz utjecaj na esterase živčanog sustava stresni uvjeti izloženosti pesticidima u gujavicama potiču proizvodnju reaktivnih kisikovih jedinki koje oksidiraju DNA, proteine i lipide što rezultira ometanjem fizioloških procesa ili apoptozom. AChE katalizira hidrolizu neurotransmitera acetilkolina na kolin i acetat. Aktivnost i sekrecija enzima ovisi o koncentraciji acetilkolina u mišićnom tkivu (Nayak i sur., 2018). Klorpirifos inhibira esteraznu aktivnost kovalentnom fosforilacijom serinskih ostataka u aktivnom mjestu. Vezanje OP rezultira prekomjernom akumulacijom acetilkolina i uzrokuje hiperaktivnost živčanog i mišićnog sustava. Prema Calisi i sur. (2011) jača aktivnost AChE očekuje se u prednjem dijelu tijela u odnosu na stražnji zbog veće koncentracije cerebralnih ganglija u regiji glave. Iako AChE nalazimo u živčanom i mišićnom tkivu, u prednjem dijelu gujavica zabilježena je veća ukupna aktivnost kolinesteraza u živčanom, nego u prednjem dijelu probave (Rault i sur., 2007). Nayak i sur. (2018) utvrdili su da tretman fosfogipsom (otpad proizvodnje gnojiva za korištenje u poljoprivredi) uzrokuje snažne mišićne kontrakcije što dovodi do povećane koncentracije acetilkolina. Najveća koncentracija AChE u tijelu zabilježena je u prednjem dijelu zbog cerebralnoga ganglija koji se nalazi u regiji glave (Tiwari i sur., 2016). Za razliku od navedenih istraživanja, u ovom istraživanju veća aktivnost AChE dobivena je u stražnjem dijelu tijela.



Iako su apsorbance u skladu s prijašnjim istraživanjima, prilikom izračuna specifične aktivnosti AChE došlo je do promjene u vrijednostima. Ukupna količina proteina i apsorbance AChE veće su u prednjem dijelu, nego u stražnjem dijelu tijela. Pri standardizaciji podataka prema ukupnoj količini proteina veća količina proteina u prednjem dijelu snižava specifičnu aktivnost AChE (Rault i sur., 2007). Pri najmanjoj C1 koncentraciji uočen je hormetički efekt, povećanje aktivnosti AChE u prednjem i stražnjem dijelu gujavice. Hormetički efekt javlja se pri vrlo niskim koncentracijama izlaganja nekoj tvari, a dolazi do odgovora koji je suprotan očekivanom. Hormetički efekt zabilježen je kod izlaganja *E. andrei* organofosfatu temefosu (Hackenberger i sur., 2008), izlaganja *E. andrei* formalinu (Hackenberger i sur., 2012) te izlaganja *E. andrei* pirimfos-metilu i deltametrinu (Velki i Hackenberger, 2013). U ovom istraživanju pri većim koncentracijama (C2 i C3) zabilježena je postupna inhibicija AChE jer je klorpirifos organofosfatni insekticid koji inhibira serinske esteraze. Fosforilirana AChE može se spontano reaktivirati u prisutnosti vode, reakcija je spora i enzim se nikad ne vrati u svoju primarnu funkciju. Moguća je kemijski inducirana reaktivacija oksimima, nukleofilnim spojevima koji reagiraju s fosfatnom skupinom vezanom u aktivnom mjestu AChE. Nakon duže inhibicije može doći do otpuštanja alkilne skupine iz kompleksa esteraza-fosfat (dealkilacija) što uzrokuje trajnu inaktivaciju AChE (engl. *aged*) (Thompson i Richardson, 2004). U testu s umjetnim tlom zabilježena je značajno veća aktivnost AChE u prednjem dijelu, nego u stražnjem dijelu tijela u kontrolnoj skupini. U prednjem dijelu tijela došlo je do povećanja enzimske aktivnost pri svim koncentracijama u odnosu na kontrolu što može biti rezultat brze hidrolize acetilkolina inducirane stresnim uvjetima (Nayak i sur., 2018). U stražnjem dijelu gujavice, s povećanjem koncentracije klorpirifosa, došlo je do inhibicije enzima. U testu s umjetnim tlom gujavica apsorbira klorpirifos na dva načina: dermalno i ingestijom, stoga se očekuje jači odgovor organizma u odnosu na filter papir test. Prema Rault i sur. (2007) aktivnost AChE gujavice *Lumbricus terrestris* ovisi i o dobu godine. Tijekom proljeća i jeseni zabilježena je tri puta veća specifična kolinesterazna aktivnost. U istraživanjima na gujavici *Eisenia fetida* o utjecaju pesticida na inhibiciju AChE dokazana je jača inhibicija aktivnosti AChE u kombinaciji pesticida cipemetrina i klorpirifosa nego individualnim tretmanima (Zhou i sur., 2011).

Pesticidi uzrokuju oksidativni stres u gujavicama povećanjem produkcije slobodnih radikala ili utjecajem na antioksidativne mehanizme: mijenjanje stope biotransformacije ksenobiotika (klorpirifos) i/ili utjecaj na antioksidativne enzime. Katalaza je peroksisomalni enzim s funkcijom metaboliziranja  $H_2O_2$  koji nastaje iz aktivnosti superoksid dismutaze (SOD).

Prekomjernom produkcijom ROS CAT veže  $H_2O_2$ .  $H_2O_2$  reagira s Asn148 i His75 u aktivnom mjestu i dolazi do prijenosa vodika. Krajnji produkti reakcije su  $H_2O$  i  $O_2$  (Heck i sur., 2010). U filter papir testu uočene su velike oscilacije aktivnost katalaze u prednjem i u stražnjem dijelu tijela. Pri izlaganju  $C_2$  koncentraciji u prednjem dijelu tijela postoji značajno smanjenje aktivnosti CAT. Nakon dva dana izlaganja gujavica klorpirifosu ne očekuju se statistički značajne razlike u aktivnosti CAT, tek nakon trećeg dana dolazi do aktivacije CAT (Schreck i sur., 2008). Povećana aktivnost CAT u stražnjem dijelu gujavice u skladu je s istraživanjem Fischer i Horvath (1978) o distribuciji enzima u gujavici. Najveća aktivnost CAT očekuje se u kloragogenom tkivu probavnog sustava. Stanice kloragogenog tkiva nalaze se u celomskom epitelu, neutraliziraju ksenobiotike i imaju funkciju u ekskretornom sustavu. U ovom istraživanju najmanja aktivnost zabilježena je pri  $C_2$  koncentraciji u prednjem i stražnjem dijelu tijela. Do nagle inhibicija može doći zbog prevelike toksičnosti reaktivnih kisikovih jedinki (Velki i Hackenberger, 2013). Prevelike količine superoksidnog aniona inhibiraju aktivnost katalaze (Schreck i sur., 2008). Prema istraživanju Geoffroy i sur. (2004) niske koncentracije oksifluorena u algi *Scenedesmus obliquus* povećavaju aktivnost CAT, dok prema Gultekin i sur. (2000) visoke koncentracije klorpirifos-etila značajno inhibiraju CAT *in vitro*. U ovom istraživanju rezultati testa s umjetnim tlom slažu se s prijašnjim istraživanjima prema Tiwari i sur. (2019). U prednjem dijelu tijela uočava se postupno snižavanje aktivnosti CAT s povećanjem koncentracije klorpirifosa, a u stražnjem dijelu tijela zabilježen je hormetički učinak klorpirifosa, odnosno bifazni odgovor organizma u kojemu se pri niskim koncentracijama organizam pokušava prilagoditi stresorima. S obzirom na duže vrijeme izlaganja u odnosu na filter papir test moguće je da je klorpirifos uzrokovao preveliku produkciju ROS te doveo do inhibicije katalaze.

Glutation S-transferaza je enzim koji sudjeluje u biotransformaciji aktivnih, štetnih tvari (ksenobiotika) u neaktivne tvari konjugacijom s elektrofilnim konjugatom – glutationom (Bernard i sur., 2015). Primarna funkcija GST je biotransformacija ksenobiotika te mu aktivnost ovisi o koncentraciji GSH. GST katalizira konjugaciju glutationa i ksenobiotika. Nastaje spoj glutation S-konjugat iz kojeg nastaje cistein S-konjugat, produkt reakcije koja je katalizirana gama-glutamyltranspeptidazom i dipeptidazom. Iz cisten S-konjugata nastaje merkaptorna kiselina koja se ekskrecijom eliminira iz organizma (Hayes i sur., 2005). Sekundarna funkcija GST je vezanje liganda koji sudjeluju u staničnoj signalizaciji. GST izozimi inhibiraju kinaze MAPK signalnog puta koji regulira staničnu proliferaciju i apoptozu (Laborde, 2010).

Prema prijašnjim istraživanjima povećanjem koncentracije klorpirifosa povećava se specifična aktivnost GST što rezultira boljim obrambenim sustavom organizma. U ovom istraživanju rezultati filter papir testa ne pokazuju statistički značajne razlike u aktivnosti GST najvjerojatnije zbog prekratkog vremena izlaganja, dok je u testu s umjetnim tlom došlo do statistički značajnog povišena aktivnosti GST u prednjem dijelu i cijelom tijelu gujavice pri svim koncentracijama u odnosu na kontrolu. Aktivnost GST povećava se s povećanjem koncentracije klorpirifosa u prednjem i stražnjem dijelu tijela što ukazuje na porast stope II. faze metabolizma, biotransformacije klorpirifosa (Hans i sur., 1993; Tiwari i sur., 2019). S obzirom na raspad insekticida u tlu njegova koncentracija se smanjuje, no razina GST ostaje visoka u organizmu. U filter papir testu i testu s umjetnim tlom aktivnost GST veća je u stražnjem dijelu nego u prednjem dijelu tijela. GST je distribuiran po cijelom tijelu, no najveće koncentracije nađene su u nefridijima, kloragogenom tkivu, ventralnoj živčanoj vrpci i režnjevima seminalnih vezikula, a najmanje u jednjaku, mišićnom želudcu, klitelumu i krvi (Stenersen i Øien, 1981; LaCourse i sur., 2009). GST je tkivno specifičan i u drugim vrstama beskralježnjaka, najveća koncentracija GST u kukcima nalazi se u probavnom sustavu (Enayati i sur., 2005). GST katalizira konjugaciju klorpirifosa s glutationom u nekoliko reakcija: P-oksidacija, O-dealkilacija i deklorinacija. Klorpirifos te metaboliti okson i trikloropiridinol konjugiraju se s glutationom i oslobađa se HCl (Mekonnen i sur., 2019). Prema Hans i sur. (1993) tretman aldrinom, lindanom i endosulfanom uzrokovali su visoku aktivnost GST u gujavici *Pheretima posthuma* nakon što se njihova početna koncentracija u tlu smanjila. Zbog metaboliziranja pesticida gujavice reapsorbiraju polarne metabolite, bioakumuliraju ih i uzrokuju povećanu aktivnost GST.

Lipidi su organske molekule čije su kovalentne veze bogate energijom. Osim energije služe za biosintezu molekula i prekursori su za sintezu drugih staničnih molekula (signalne molekule) (Birsoy i sur., 2013). Prema Albro i sur. (1992) količina lipida u gujavici *L. terrestris* čini 1.23 % njezine ukupne težine. Najčešći lipidi podložni peroksidaciji jesu slobodne masne kiseline koje čine 0.32 % ukupnih lipida i fosfolipidi koji čine 59.5 % ukupnih lipida. Koncentracija lipida u filter papir testu prednjeg dijela tijela statistički je veća nego u stražnjem dijelu tijela pri izlaganju najmanjoj C1 koncentraciji, a pri izlaganju C3 koncentraciji stražnji dio ima statistički značajno veću koncentraciju lipida u odnosu na prednji dio. U kontrolnoj skupini testa s umjetnim tlom postoji statistički značajna razlika u količini lipida prednjeg i stražnjeg dijela tijela te je pri izlaganju najmanjoj koncentraciji došlo do statistički značajnog povećanja količine lipida u prednjem dijelu u odnosu na kontrolnu skupinu.

Prema Hench i sur. (2010) najveća koncentracija lipida i masnog tkiva zabilježena je u području probave i reproduktivnih organa u vrsti *Caenorhabditis elegans*.

Lipidna peroksidacija (LP) proces je oksidacije lipida. PUFA su najčešće masne kiseline koje su podložne peroksidaciji, a mogu biti slobodne ili vezane na lipide (Halliwell i Chirico, 1993). LP nastaju štetni aldehidi: malondialdehid (MDA), akrolein i 4-hidroksinonenal (HNE). Aldehidi LP vrlo su toksični, reaktivniji su od hidroksiperoksida i lako difuzno reagiraju sa susjednim molekulama. MDA se koristi u određivanju LP, posebno kao biomarker oksidacije  $\omega$ -3 i  $\omega$ -6 masnih kiselina (Guéraud i sur., 2010). Analizom koncentracije TBARS određuje se stupanj lipidne peroksidacije. Produkcijom ROS dolazi do oksidacije staničnih i membranskih lipida te aktivacije citokrom P450 izozima u gujavicama izloženim pesticidima. Nezasićene masne kiseline podložnije su lipidnoj peroksidaciji zbog dvostrukih veza koje imaju u svojoj strukturi (Ifemeje i sur., 2015). U ovom istraživanju postoji statistički značajno povećanje koncentracije TBARS u stražnjem dijelu u odnosu na prednji dio tijela na filter papir testu tijekom izlaganja C3 koncentraciji. U prednjem dijelu tijela pri svakoj koncentraciji postoji značajno povećanje TBARS u odnosu na kontrolu, a pri izlaganju C2 i C3 koncentracijama u stražnjem dijelu tijela zabilježeno je značajno povećanje TBARS u odnosu na kontrolu. Povećanjem koncentracije klorpirifosa na filter papiru povećava se oksidativni stres u gujavici što rezultira povećanjem produkcije ROS. ROS oksidiraju nezasićene masne kiseline s najmanje tri nezasićene veze (dvostruke ili trostruke kovalentne veze) i nastaju malondialdehidi (Guéraud i sur., 2010). U testu s umjetnim tlom pri kontroli i izlaganju C2 koncentraciji postoji statistički značajno povećanje TBARS koncentracije u stražnjem dijelu u odnosu na prednji dio tijela gujavice. U prednjem dijelu tijela zabilježene su značajno veće koncentracije TBARS pri svakoj koncentraciji u odnosu na kontrolu, a pri C2 i C3 izlaganju u stražnjem dijelu tijela zabilježeno je značajno povećanje TBARS u odnosu na kontrolu. Povećanje koncentracije TBARS prati povećanje klorpirifosa u umjetnom tlu te ukazuje na povećanu LP. Produkti LP i ROS narušavaju integritet staničnih membrana oksidacijom PUFA te se mijenja fluidnost stanične membrane. Strukturu mitohondrijske i mikrosomalne membrane čine velike koncentracije PUFA koje su vezane na fosfolipide, stoga se njihovom oksidacijom narušava stanični metabolizam (Bidlack i Tappel, 1973). Prvi korak metaboliziranja produkata LP je konjugacija GSH. GST aktivnost inducirana je produktima LP, pri velikim koncentracijama 4-HNE povećava se genska ekspresija za GST (Fukuda i sur., 2010). Daljnji metaboliti GSH-konjugati mogu se metabolizirati CYP450 (Guéraud i sur., 2010).

U filter papir testu i u testu s umjetnim tлом dolazi do postupnog povećanja koncentracije TBARS pri svim koncentracijama što odgovara distribuciji lipida te prijašnjim istraživanjima prema Tiwari i sur. (2019). Primarni i sekundarni produkti LP ometaju homeostazu stanice reagiranjem s DNA formirajući DNA adukte, reagiraju s proteinima, ometaju staničnu signalizaciju, gensku ekspresiju te induciraju bolest organizma (Nam, 2011).

## 5. ZAKLJUČAK

Istraživanje je provedeno na anecičnoj vrsti gujavice *Lumbricus terrestris*, o utjecaju različitih koncentracija insekticida klorpirifosa na molekularne biomarkere u prednjem i stražnjem dijelu te u cijelom tijelu:

- Specifična aktivnost AChE veća je u stražnjem dijelu nego u prednjem dijelu tijela gujavice s izraženim hormetičkim efektom.
- Ukupna količina proteina i apsorbance AChE veće su u prednjem dijelu nego u stražnjem dijelu tijela, no pri standardizaciji podataka veća količina proteina snižava specifičnu aktivnost AChE u prednjem dijelu tijela.
- Povećanjem koncentracije klorpirifosa povećava se oksidativni stres i dolazi do inhibicije aktivnosti CAT u prednjem i u stražnjem dijelu tijela.
- Aktivnost GST veća je u stražnjem dijelu nego u prednjem dijelu tijela i povećava se s koncentracijom klorpirifosa.
- Koncentracije TBARS veće su u stražnjem dijelu nego u prednjem dijelu tijela i povećavaju se s koncentracijom klorpirifosa.

## 6. LITERATURA:

Albro, P. W., Schroeder, J. L., & Corbett, J. T. (1992) Lipids of the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Lipids* 27(2): 136-143.

Ayala, A., Muñoz, M. F., Argüelles, S. (2014) Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014: 1-31.

Bakke, J. E., Feil, V. J., Price, C.E. (1976) Rat urinary metabolites from O,O-diethyl-0(3,5,6-trichloro-2-pyridyl) phosphorothioate. *Journal of Environmental Science and Health* 3: 225-230.

Benedetti, A., Comporti, M., Esterbauer, H. (1980) Identification of 4-hydroxynonenal as a cytotoxic product originating from the peroxidation of liver microsomal lipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 620(2): 281-296.

Bernard, F., Brulle, F., Dumez, S., Lemiere, S., Platel, A., Nesslany, F., Cuny, D., Deram, A., Vandebulcke, F. (2015) Antioxidant responses of annelids, brassicaceae and fabaceae to pollutants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 114: 273-303.

Birsoy, K., Festuccia, W. T., Laplante, M. (2013) A comparative perspective on lipid storage in animals. *Journal of Cell Science* 126(7): 1541–1552.

Bidlack, W. R., Tappel, A. L. (1973) Fluorescent products of phospholipids during lipid peroxidation. *Lipids* 8(4): 203-207.

Blondet, N., Messner, D., Kowdley, K., Murray, K. (2018) Mechanisms of hepatocyte detoxification. U: Hamid M. Said (ur.) *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. Academic Press, United States, str. 981-1001.

Brock, T., van den Bogaert, M., Bos, A., van Breukelen, S., Reiche, R., Terwoert, J., Suykerbuyk, R., Roijackers, R. (1992) Fate and effects of the insecticide Dursban 4E indoor *Elodea*-dominated and macrophyte-free freshwater model ecosystems: II. Secondary effects on community structure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 23: 391-409.

Brown, G., Edwards, C., Brussaard, L. (2004) How Earthworms Affect Plant Growth: Burrowing into the Mechanisms. U: Edwards, C. (ur.) *Earthworm ecology*. CRC Press, Boca Raton, str. 13-49.

Calisi, A., Lionetto, M. G., Schettino, T. (2011) Biomarker response in the earthworm *Lumbricus terrestris*, exposed to chemical pollutants. *Science of the Total Environment* 409: 4456–4464.

Chambers, J. E., Chambers, H. W. (1989) Oxidative desulfuration of chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl, and leptophos by rat brain and liver. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 4(3): 201-203.

Chelikani, P., Fita, I., Loewen, P. C. (2004) Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 61(2): 192-208.

Claiborne, A. (1984) Catalase activity. U: Greenwald, R. A. (ur.) *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. CRC Press, Boca Raton, str. 283-284.

Collange, B., Wheelock, C. E., Rault, M., Mazzia, C., Capowiez, Y., Sanchez-Hernandez, J. C. (2010) Inhibition, recovery and oxime-induced reactivation of muscle esterases following chlorpyrifos exposure in the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Environmental Pollution* 158: 2266-2272.

Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., Lunec, J. (2003) Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal* 17(10): 1195-1214.

Costa, L. G., Cole, T. B., Vitalone, A., Furlong, C. E. (2005) Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochemical Pharmacology* 15;69(4): 541-50.



Damalas, C. A., Eleftherohorinos, I. G. (2011) Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *International journal of environmental research and public health* 8(5): 1402–1419.

Divecha, N., Irvine, R. F. (1995) Phospholipid signaling. *Cell* 80(2): 269-278.

Eisenreich, S.J., Looney, B. B., Thornton, J. D. (1981) Airborne organic contaminants in the Great Lakes ecosystem. *Environmental Science and Technology* 15: 30-38.

Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. Jr., Featherstone, R. M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7: 88-90.

Enayati, A. A., Ranson, H., Hemingway, J., (2005) Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology* 14: 3-8.

Engenheiro, E. L., Hankard, P. K., Sousa, J. P., Lemos, M. F., Weeks, J. M., Soares, A. M. V. M. (2005) Influence of dimethoate on acetylcholinesterase activity and locomotor function in terrestrial isopods. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24: 603-609.

Esterbauer, H., Cheeseman, K. H. (1990) Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology* 186: 407-421.

Fischer, E., Horvath, I. (1978) Evidence of the presence of extraperoxisomal catalase in chloragogen cells of the earthworm, *Lumbricus terrestris* L. *Histochemistry* 56(2): 165-171.

Flavia, G., Bengtssonb, J., Berendse, F., Weisser, W. W., Emmersond, M., Morales, M. B., Ceryngier, P., Liirah, J., Tschardtke, T., Winqvist, C., Eggers, S., Bommarcob, R., Pärt, T., Bretagnolle, V., Plantegenest, M., Clement, L.W., Dennis, C., Palmer, C., Oñate, J. J., Guerrero, I. Hawrog, V., Aavikh, T., Thies, C., Flohre, A., Hänke, S., Fischer, C., Goedhart, P. W., Inchausti, P. (2010) Persistent negative effects of pesticides on biodiversity and biological control potential on European farmland. *Basic and Applied Ecology* 11: 97-105.

Forbes, V. E., Palmqvist, A., Bach, L. (2006) The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25: 272-280.

Franco, R., Li, S., Rodriguez-Rocha, H., Burns, M., Panayiotidis, M. I. (2010) Molecular mechanisms of pesticide-induced neurotoxicity: Relevance to Parkinson's disease. *Chemico-Biological Interactions* 188: 289-300.

Franco, R., Sanchez-Olea, R., Reyes-Reyes, E. M., Panayiotidis, M. I. (2009) Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: ménage à trois. *Mutation Research* 674: 3-22.

Frings, C. S., Fendley, T. W., Dunn, R. T., Queen, C. A. (1972) Improved determination of total serum lipids by the sulfo-phospho-vanillin reaction. *Clinical Chemistry* 18(7): 673-4.

Fründ, H. C., Butt, K., Capowiez, Y., Eisenhauer, N., Emmerling, C., Ernst, G., Potthoff, M., Schädler, M., Schrader, S. (2010) Using earthworms as model organisms in the laboratory: Recommendations for experimental implementations. *Pedobiologia* 53: 119-125.

Fukuda, A., Nakamura, Y., Ohigashi, H., Osawa, T., Uchida, K. (1997) Cellular Response to the Redox Active Lipid Peroxidation Products: Induction of Glutathione S-Transferase P by 4-Hydroxy-2-nonenal. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 236(2): 505-509.

Gagné, F. (2014) Oxidative Stress. U: Gagné, F. (ur.) *Biochemical Ecotoxicology: Principles and Methods* 1<sup>st</sup> Edition. Elsevier, London, str: 103-115.

Geoffroy, L., Frankart, C., Eullaffroy, P. (2004) Comparison of different physiological parameter responses in *Lemna minor* and *Scenedesmus obliquus* exposed to herbicide flumioxazin. *Environmental Pollution* 131(2): 233-241.

Guéraud, F., Atalay, M., Bresgen, N., Cipak, A., Eckl, P. M., Huc, L., Uchida, K. (2010) Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radical Research* 44(10): 1098-1124.

Gianfreda, L., Rao, M. (2008) Interactions between xenobiotics and microbial and enzymatic soil activity. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 38: 269-310.

Guengerich, F. P. (1990) Enzymatic oxidation of xenobiotic chemicals. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 25: 97-153.

Guéraud, F., Atalay, M., Bresgen, N., Cipak, A., Eckl, P. M., Huc, L., Uchida, K. (2010) Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radical Research* 44(10): 1098-1124.

Gultekin, F., Ozturk, M., Akdogan, M. (2000) The effect of organophosphate insecticide chlorpyrifos-ethyl on lipid peroxidation and antioxidant enzymes (in vitro). *Archives of Toxicology* 74(9): 533-538.

Habdija, I., Habdija, B. P., Radanović, I., Špoljar, M., Matoničkin-Kepčija, R., Vujčić-Karlo, S., Miliša, M., Ostojić, A., Sertić-Perić, M. (2011) *Protista-Protozoa Metazoa-Invertebrata: Strukture i funkcije*. Alfa d.d., Zagreb.

Hackenberger, B. K., Jarić -Perkušić, D., Stepić, S. (2008) Effect of temephos on cholinesterase activity in the earthworm *Eisenia fetida* (Oligochaeta, Lumbricidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71: 583-589.

Hackenberger, B. K., Velki, M., Stepić, S., Hackenberger, D. K. (2012) The effect of formalin on acetylcholinesterase and catalase activities, and on the concentration of oximes, in the earthworm species *Eisenia andrei*. *The European Journal of Soil Biology* 50: 137-143.

Hagger, J. A., Galloway, T. S., Langston, W. J., Jones, M. B. (2009) Application of biomarkers to assess the condition of European Marine Sites. *Environmental Pollution* 157: 2003-2010.

Halliwell, B., Chirico, S. (1993) Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition* 57(5): 715S-725S.

Hans, R. K., Khan, M. A., Farooq, M., Beg, M. U. (1993) Glutathione-S-transferase activity in an earthworm (*Pheretima posthuma*) exposed to three insecticides. *Soil Biology and Biochemistry* 25(4): 509-511.

Hayes, J. D. and McLellan, L. I. (1999) Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radical Research* 31: 273-300.

Heck, D. E., Shakarjian, M., Kim, H. D., Laskin, J. D., Vetrano, A. M. (2010) Mechanisms of oxidant generation by catalase. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1203: 120-125.

Helfrich, L. A.; Weigmann, D.L. & Stinson, E.R. (2009). *Pesticides and Aquatic Animals: A Guide to Reducing Impacts on Aquatic Systems*. Virginia Polytechnic Institute and State University.

Hellou, J. (2011) Behavioural ecotoxicology, an “early warning” signal to assess environmental quality. *Environmental Science and Pollution Research* 18: 1-11.

Hench, J., Bratić Hench, I., Pujol, C., Ipsen, S., Brodesser, S., Mourier, A., Tolnay, M., Frank, S., Trifunović A. (2011) A Tissue-Specific Approach to the Analysis of Metabolic Changes in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE* 6(12): e28417.

Henderson, R. (2005). Biomarker Human Health, U: Wexler, P. (ur.) *Enciclopedia of Toxicology*. Elsevier, New York, str. 290-294.

Hernandez, A. F., Lopez, O., Rodrigo, L., Gil, F., Pena, G., Serrano, J. L., Parron, T., Alvarez, J. C., Lorente, J. A., Pla, A. (2005) Changes in erythrocyte enzymes in humans long-term exposed to pesticides: influence of several markers of individual susceptibility. *Toxicology Letters* 159: 13-21.

Huff, R. A., Corcoran, J. J., Anderson, J. K., Abou-Donia, M. B. (1994) Chlorpyrifos oxon binds directly to muscarinic receptors and inhibits CAMP accumulation in rat striatum. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 269: 329-335.

Ifemeje, J. C., Udedi, S. C., Okechukwu, A. U., Nwaka, A. C., Lukong, C. B., Anene, I. N., Egbuna, C., Ezeude, I. C. (2015) Determination of Total Protein, Superoxide Dismutase, Catalase Activity and Lipid Peroxidation in Soil Macro-fauna (Earthworm) from Onitsha Municipal Open Waste Dump. *Journal of Scientific Research and Reports* 6(5): 394-403.

ISO – International Organization for Standardization. (2012) Soil quality – Effects of pollutants on earthworms – Part 1: Determination of acute toxicity to *Eisenia fetida/Eisenia andrei*, ISO 11268-1. International Standardization Organization, Geneva, str. 18.

Hayes, J. D., Flanagan, J. U., Jowsey, I. R. (2005) Glutathione transferases. Annual Review of Pharmacology and Toxicology 45: 51-88.

Karlen, D. L., Mausbach, M. J., Doran, J. W., Cline, R. G., Harris, R. F., Schuman, G. E. (1997) Soil quality: a concept, definition, and framework for evaluation (a guest editorial). Soil Science Society American Journal 61: 4-10.

Katagi, T., Ose, K. (2015) Toxicity, bioaccumulation and metabolism of pesticides in the earthworm. Journal of Pesticide Science 40: 69-81.

Koivula, M. J., Eeva, T. (2010) Metal-related oxidative stress in birds. Environmental Pollution 158: 2359-2370.

Laborde, E. (2010) Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death. Cell Death and Differentiation 17(9): 1373-80.

LaCourse, E. J., Hernandez-Viadel, M., Jefferies, J. R., Svendsen, C., Spurgeon, D. J., Barrett, J., Morgan, A. J., Kille, P., Brophy, P. M. (2009) Glutathione transferase (GST) as a candidate molecular-based biomarker for soil toxin exposure in the earthworm *Lumbricus rubellus*. Environmental Pollution 157(8-9): 2459-2469.

Lanno, R., Wells, J., Conder, J., Bradham, K., Basta, N. (2004) The bioavailability of chemicals in soil for earthworms. Ecotoxicology and Environmental Safety 57: 39-47.

Lukaszewicz – Hussain, A. (2010) Role of oxidative stress in organophosphate insecticide toxicity – Short review. Pesticide Biochemistry and Physiology 98: 145-150.

Lyman, W. J., Reehl, W. F., Rosenblatt, D. H. (ur.) (1990) Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental behavior of organic compounds. American Chemical Society, Washington.

Ma, T., Chambers, J. E. (1994) Kinetic parameters of desulfuration and dearylation of parathion and chlorpyrifos by rat liver microsomes. *Food and Chemical Toxicology* 32(8): 763-767.

Mekonnen, T., Panne, U., Koch, M. (2019) Glucosylation and Glutathione Conjugation of Chlorpyrifos and Fluopyram Metabolites Using Electrochemistry/Mass Spectrometry. *Molecules* 24(5): 898.

Mena, S., Ortega, A., Estrela, J. M. (2009) Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. *Mutation Research* 674: 36-44.

Nam T. G. (2011) Lipid peroxidation and its toxicological implications. *Toxicological research* 27(1): 1-6.

Nayak, S., Mishra, C. S. K., Guru, B. C., Samal, S. (2018) Histological anomalies and alterations in enzyme activities of the earthworm *Glyphidrilus tuberosus* exposed to high concentrations of phosphogypsum. *Environmental Monitoring and Assessment* 190(9): 529.

Nicholls, P., Fita, I., Loewen, P. C. (2000) Enzymology and structure of catalases. *Advances in Inorganic Chemistry* 51: 51-106.

Nolan, R. J., Rick, D. L., Freshour, N. L., Saunders, J. H. (1984) Chlorpyrifos: pharmacokinetics in human volunteers. *Toxicology and Applied Pharmacology* 173(1): 8-15.

OECD. (1984) Test No. 207: Earthworm, Acute Toxicity Tests, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris.

Peakall, D. B., Walker C. H. (1994) The role of biomarker in environmental assessment. *Ecotoxicology* 3: 981-1001.

R Core Team. (2017) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Racke, K. D. (1993) Environmental fate of chlorpyrifos. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 131: 1-154.

Rault M., Mazzia C., Capowiez Y. (2007) Tissue distribution and characterization of cholinesterase activity in six earthworm species. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology* 147: 340-346.

Richendrfer, H., Creton, R. (2015) Chlorpyrifos and malathion have opposite effects on behaviors and brain size that are not correlated to changes in AChE activity. *NeuroToxicology* 49: 50-58.

Rojas-García, A. E., Medina-Díaz, I. M., Robledo-Marengo, M. L., Barrón-Vivanco, B. S., Pérez-Herrera, N. (2011) Pesticide Biomarkers. U: Stoytcheva, M. (ur). *Pesticides in the Modern World – Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity*. In: Tech, Hrvatska, str. 161-190.

Ryter, S. W., Kim, H. P., Hoetzel, A., Park, J. W., Nakahira, K., Wang, X., Choi, A. M. (2007) Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxidants and Redox Signaling* 9: 49-89.

Sanchez-Hernandez, J. C. (2011) Pesticide Biomarkers in Terrestrial Invertebrates. U: U: Stoytcheva, M. (ur). *Pesticides in the Modern World – Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity*. In: Tech, Hrvatska, str. 213-240.

Schreck, E., Geret, F., Gontier, L., Treilhou, M. (2008) Neurotoxic effect and metabolic responses induced by a mixture of six pesticides on the earthworm *Aporrectodea caliginosa nocturna*. *Chemosphere* 71(10): 1832-1839.

Shah, P. V., Monroe, R. J., Guthrie, F. E. (1981) Comparative rates of dermal penetration of insecticides in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* 59(3): 414-423.

Sheehan, D., Meade, G., Foley, V. M., Dowd, C. A. (2001) Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal* 360: 1-6.

Shugart, L. R. (2005) Biomarker Environmental, U: Wexler, P. (ur.) *Encyclopedia of Toxicology*. Elsevier, New York, str. 287-290.

Smith, G. N., Watson, B. S., Fischer, F. S. (1967) Investigations on dursban insecticide: Metabolism of [36Cl] O,O-diethyl-O- 3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 15: 132-138.

Sorensen, F. F., Bayley, M. & Baatrup, E. (1995) The effects of sublethal dimethoate exposure on the locomotor behavior of the collembolan *Folsomia candida* (isotomidae). *Environmental Toxicology and Chemistry* 14: 1587-1590.

Stenersen, J., Øien, N. (1981) Glutathione S-transferases in earthworms (Lumbricidae). Substrate specificity, tissue and species distribution and molecular weight. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 69(2): 243-252.

Sun, M., Chang, Z., Shau, M., Huang, R., Chou, T. (1979) The Mechanism of Ageing of Phosphorylated Acetylcholinesterase. *European Journal of Biochemistry* 100(2): 527-530.

Tebourbi, O., Sakly, M., Rhouma, B. K. (2011) Molecular Mechanisms of Pesticide Toxicity. U: Stoytcheva, M. (ur). *Pesticides in the Modern World – Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity*. In: Tech, Hrvatska, str. 297-332.

Thompson, C. M., Richardson, R. J. (2004) Anticholinesterase insecticides. U: Marrs, T. C., Ballantyne, B. (ur.) *Pesticide Toxicology and International Regulation*. John Wiley & Sons, England, str. 89-127.

Tiwari, R. K., Singh, S., Pandey, R. S. (2019) Assessment of acute toxicity and biochemical responses to chlorpyrifos, cypermethrin and their combination exposed earthworm, *Eudrilus eugeniae*. *Toxicology reports* 6: 288-297.

Tiwari, R. K., Singh, S., Pandey, R. S., Sharma, B. (2016) Enzymes of Earthworm as Indicators of Pesticide Pollution in Soil. *Advances in Enzyme Research* 4: 113-124.

van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N. P. E. (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13: 57-149.



van Erp, S., Booth, L., Gooneratne, R., O'Halloran, K. (2002) Sublethal responses of wolf spiders (Lycosidae) to organophosphorous insecticides. *Environmental Toxicology* 17: 449-456.

Velki, M., Hackenberger, B. K. (2013) Biomarker responses in earthworm *Eisenia andrei* exposed to pirimiphos-methyl and deltamethrin using different toxicity tests. *Chemosphere* 90(3): 1216-1226.

Wang, X., Lei, X. G., Wang, J. (2014) Malondialdehyde regulates glucose-stimulated insulin secretion in murine islets via TCF7L2-dependent Wnt signaling pathway. *Molecular and Cellular Endocrinology* 382(1): 8-16.

West, J. D., Marnett, L. J. (2006) Endogenous reactive intermediates as modulators of cell signaling and cell death. *Chemical Research in Toxicology*, 19., 173-194.

Yadav, I., Devi, N. (2017) Pesticides Classification and Its Impact on Human and Environment. U: Kumar, A., Singhal, J. C., Techato, K., Molina, L. T., Singh, N., Kumar, P., Kumar, P., Chandra, R., Caprio, S., Upadhye, S., Yonemura, S., Rao, S. Y., Zhang, T. C., Sharma U. C., Abrol Y. P. (ur.) *Environmental science and engineering*. Studium Press LLC, India, str. 140-158.

Yasmin, S., D'Souza, D. (2010) Effects of Pesticides on the Growth and Reproduction of Earthworm: A Review. *Applied and Environmental Soil Science* 2010: 1-9.

Yin, H., Xu, L., Porter, N. A. (2011) Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis. *Chemical Reviews* 111(10): 5944-5972.

Zhou S. P., Duan C. Q., Michelle W. H. G., Yang F. Z., Wang X. H. (2011) Individual and combined toxic effects of cypermethrin and chlorpyrifos on earthworm. *Journal of Environmental Sciences* 23: 676-680.

Zhou, S., Duan, C., Fu, H., Chen, Y., Wang, X., Yu, Z. (2007) Toxicity assessment for chlorpyrifos-contaminated soil with three different earthworm test methods. *Journal of Environmental Sciences* 19(7): 854-858.

Web 1: George W. Ware, David M. Whitacre: An Introduction to Insecticides

<https://ipmworld.umn.edu/ware-intro-insecticides> (13.11.2018.).

Web 2: Extension Toxicology Network (EXTOXNET): Chlorpyrifos

<http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extoxnet/carbaryl-diclotophos/chlorpyrifos-ext.html>  
(13.11.2018.).

Web 3: Wood, Alan: Chlorpyrifos

<http://www.alanwood.net/pesticides/chlorpyrifos.html> (13.11.2018.).

Web 4: The Earthworm Society of Britain: Earthworm Ecology

<https://www.earthwormsoc.org.uk/earthworm-ecology> (13.11.2018.).

Web 5: National pesticide information center: Chlorpyrifos

<http://npic.orst.edu/factsheets/archive/chlorptech.html> (24.4.2019.).

Web 6: Collection of methods for non-parametric analysis: R/boot.t.test.R

<https://rdr.io/github/tpepler/nonpar/src/R/boot.t.test.R> (3.9.2019.).