



ACADEMIA MEDICA GEDANENSIS
FACULTAS PHARMACEUTICA

BARTOSZ WIELGOMAS

Badania interakcji chloropiryfosu i cypermetryny na szczurach

Rozprawa na stopień
doktora nauk farmaceutycznych
Promotor:
Prof. dr hab. Jerzy Krechniak

Kierownik Katedry:
Prof. dr hab. Wojciech Czarnowski

Katedra i Zakład Toksykologii
Akademia Medyczna w Gdańsku

GDAŃSK 2006

*Panu prof. dr hab. Jerzemu Krechniakowi –
– serdecznie dziękuję za propozycję tematu pracy
i uzyskaną pomoc w trakcie jego realizacji.*

*Składam również podziękowania:
Panu prof. dr hab. Wojciechowi Czarnowskiemu-
-Kierownikowi Katedry i Zakładu Toksykologii-
za umożliwienie przeprowadzenia badań.*

*Wszystkim Pracownikom Katedry i Zakładu Toksykologii,
a w szczególności Pani Teresie Pawłowskiej
za opiekę nad zwierzętami doświadczalnymi i wykonanie zabiegów.*

Pracę dedykuję mojej Żonie - Agnieszce

1 SPIS TREŚCI

1	SPIS TREŚCI	4
2	WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	5
3	WSTĘP	8
3.1	CHLOROPIRYFOS ETYLOWY (CPF, ang. chlorpyrifos-ethyl).....	10
3.1.1	<i>Właściwości fizyczne i chemiczne</i>	10
3.1.2	<i>Los w ustroju</i>	12
3.1.3	<i>Mechanizm działania</i>	18
3.1.4	<i>Działanie mutagenne, teratogenne, kancerogenne</i>	21
3.1.5	<i>Zatrucia i postępowanie</i>	21
3.2	α -CYPERMETRYNA (CM, ang. alfa-cypermethrin).....	26
3.2.1	<i>Właściwości fizyczne i chemiczne</i>	27
3.2.2	<i>Los w ustroju</i>	28
3.2.3	<i>Mechanizm działania</i>	30
3.2.4	<i>Działanie mutagenne, teratogenne, kancerogenne</i>	32
3.2.5	<i>Zatrucia i postępowanie</i>	32
3.3	METODY OZNACZANIA CPF, CM I ICH METABOLITÓW	34
3.3.1	<i>Ekstrakcja</i>	34
3.3.2	<i>Metody oznaczeń końcowych</i>	38
3.4	REAKTYWNE FORMY TLENU I USZKODZENIA WOLNORODNIKOWE ...	42
3.5	WPŁYW CPF I CM NA PARAMETRY WOLNORODNIKOWE – STAN BADAŃ.....	47
4	CEL PRACY	50
4.1	METODYKA BADAŃ.....	52
4.1.1	<i>Zwierzęta doświadczalne i opis ekspozycji</i>	52
4.1.2	<i>Oznaczanie pestycydów w tkankach</i>	54
4.1.3	<i>Oznaczanie metabolitów w moczu</i>	60
4.1.4	<i>Oznaczanie stężenia grup tiolowych</i>	66
4.1.5	<i>Oznaczanie stężenia TBARS</i>	67
4.1.6	<i>Oznaczanie aktywności katalazy</i>	68
4.1.7	<i>Oznaczanie aktywności cholinoesterazy</i>	69
4.1.8	<i>Oznaczanie stężenia białka</i>	70
5	WYNIKI I OPRACOWANIE STATYSTYCZNE	71
6	OMÓWIENIE WYNIKÓW	94
6.1	Toksykokinetyka	94
6.2	Stężenia CM i CPF w tkankach.....	94
6.2.1	<i>α-Cypermetryna</i>	94
6.2.2	<i>Chloropiryfos</i>	95
6.3	Metabolity: TCP, 4OH3PBA w moczu.....	96
6.4	Grupy tiolowe.....	96
6.5	TBARS	97
6.6	Katalaza.....	97
6.7	Cholinoesteraza	98
7	DYSKUSJA WYNIKÓW	99
8	WNIOSKI.....	106
9	STRESZCZENIE	107
10	SUMMARY	109
11	PIŚMIENNICTWO	111

2 WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

(v/w)	– procent objętościowo wagowy
(v/v)	– procent objętościowo objętościowy
\bar{X}	– średnia
$^1\text{H-NMR}$	– <i>nuclear magnetic resonance</i> – magnetyczny rezonans jądrowy
λ	– długość fali analitycznej
®	– znak towarowy
-SH	– grupy tiolowe (sulfhydrylowe)
2-PAM	– metylojodek pirydyno-2-aldoksymu; pralidoksym
3PBA	– kwas 3-fenoksybenzoesowy
4OHCM	– 4-(hydroksy)-cypermetryna
4OH3PBA	– kwas 4-(hydroksy)-3-fenoksybenzoesowy
8OH2dG	– 8-hydroksy-2-deoksyguanozyna
ACh	– acetylocholina
AChE	– acetylocholinoesteraza
ACN	– acetonitryl
ALT	– aminotransferaza alaninowa
AST	– aminotransferaza asparaginianowa
ATChI	– jodek acetylotiocholiny
AUC	– <i>area under the curve</i> – pole powierzchni pod krzywą zależności stężenie-czas po podaniu ksenobiotyku
BChE	– butyrylocholinoesteraza
BHT	– <i>butylated hydroxytoluen</i> – 3,5-diizobutylo-4-hydroksytoluen
CAS	– <i>Chemical Abstract Service</i> – przydzielony numer pozwalający na identyfikację substancji
CAT	– katalaza
ChE	– cholinoesteraza
CM	– α -cypermetryna
C_{max}	– stężenie maksymalne
CPF	– chloropiryfos etylowy
CPFM	– chloropiryfos metylowy
CPFO	– okson chloropiryfosu
CYP 450	– cytochrom P 450
DAD	– <i>diode array detector</i> – detektor z matrycą diodową
DCCA	– kwas dichlorowinylocyklopropanokarboksylowy
DDT	– 1,1,1-trichloro-2,2-bis-(4-chlorofenylo)-etan
DEL	– deltametryna
DEP	– dietylofosforan
DETP	– dietylotiofosforan
DNA	– <i>deoxyribonucleic acid</i> – kwas deoksyrybonukleinowy
DTNB	– kwas 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoesowy)
EC	– <i>enzyme classification</i> – klasa enzymu
ECD	– <i>electron capture detector</i> – detektor wychwytu elektronów
FID	– <i>flame ionization detector</i> – detektor płomieniowo-jonizacyjny
FPD	– <i>flame photometric detector</i> – detektor płomieniowo-fotometryczny
GABA	– kwas γ -aminomasłowy
GC	– <i>gas chromatography</i> – chromatografia gazowa

GR	– <i>glutathione reductase</i> – reduktaza glutationowa
GPx	– <i>glutathione peroxidase</i> – peroksydaza glutationowa
GSH	– glutation (forma zredukowana)
GSSG	– glutation (forma utleniona); disulfid glutationu
GST	– transferaza glutationowa
γ-GTP	– gamma-glutamylotranspeptydaza
HDL	– <i>high density lipoprotein</i> – lipoproteina wysokiej gęstości
HNE	– hydroksynonenal
HPLC	– <i>high performance liquid chromatography</i> – wysokosprawna chromatografia cieczowa
HS	– <i>head-space</i> – faza nadpowierzchniowa
IPO	– Instytut Przemysłu Organicznego
IU	– jednostka międzynarodowa aktywności enzymatycznej; ilość enzymu, który katalizuje przemianę 1 μM substratu w ciągu jednej minuty.
k	– stała szybkości reakcji
K _{ow}	– współczynnik podziału n-oktanol-woda
LC-ESI-MS/MS	– <i>liquid chromatography electrospray ionization - tandem mass spectrometry</i> - chromatografia cieczowa z elektrorozpraszaniem i tandemową spektrometrią mas
LD ₅₀	– dawka śmiertelna medialna
LOAEL	– <i>lowest observed adverse effect level</i> – najniższy obserwowany poziom działania szkodliwego
LOQ	– <i>limit of quantification</i> – granica oznaczalności
m.c.	– masa ciała
m.m.	– mokra masa
MDA	– <i>malonyldialdehyde</i> – dialdehyd malonowy
MBSTFA	– <i>N-metylo-N-tert-butyldimetylosilotrifluoroacetamid</i>
min.	– minuta
MRiRW	– Ministerstwo Restrukturyzacji i Rozwoju Wsi
MS	– <i>mass spectrometer</i> – spektrometr mas
MSPDE	– <i>matrix solid phase dispersion extraction</i> - ekstrakcja z fazy stałej
NDS	– najwyższe dopuszczalne stężenie
NDSch	– najwyższe dopuszczalne stężenie chwilowe
NOAEL	– <i>no observed adverse affect level</i> – poziom bez obserwowanego działania
NPD	– detektor azotowo-fosforowy
NTE	– <i>neuropathy target esterase</i> – esteraza neurotoksyczna
obr.	– obroty
OPIDN	– <i>organophosphorous induced delayed neuropathy</i> – opóźnione działanie neurotoksyczne
OUN	– ośrodkowy układ nerwowy
p	– poziom istotności
pK _a	– ujemny logarytm ze stałej kwasowości
PON	– paraoksonaza
ppb	– <i>parts per billion</i> – jednostka stężenia określająca liczbę cząsteczek substancji przypadającą na miliard cząsteczek rozpuszczalnika
r	– współczynnik korelacji
RFT	– reaktywne formy tlenu
RNA	– <i>ribonucleic acid</i> – kwas rybonukleinowy
SD	– <i>standard deviation</i> – odchylenie standardowe
SDS	– sulfododecylan sodowy

SFE	– <i>supercritical fluid extraction</i> – ekstrakcja cieczami w stanie nadkrytycznym
SOD	– <i>superoxide dismutase</i> – dysmutaza nadtlenkowa
SPE	– <i>solid phase extraction</i> – ekstrakcja do fazy stałej
SPME	– <i>solid phase microextraction</i> – mikroekstrakcja do fazy stałej
$t_{1/2}$	– okres półtrwania
TBA	– <i>thiobarbituric acid</i> – kwas tiobarbiturowy
T_{max}	– czas, po którym ksenobiotyk osiąga stężenie C_{max} .
TCA	– <i>trichloroacetic acid</i> – kwas trichlorooctowy
TCP	– 3,5,6-trichloro-2-pirydynol
TBARS	– <i>thiobarbituric acid reactive substances</i> – substancje reagujące z kwasem tiobarbiturowym
TNF	– <i>tumor necrosis factor</i> – czynnik martwicy nowotworu
TRIS	– tris-(hydroksymetylo)aminometan
UV-Vis	– zakres promieniowania nadfioletowego i widzialnego
WNKT	– wielonienasycone kwasy tłuszczowe
ZFO	– związki fosforoorganiczne

3 WSTĘP

Dynamiczny postęp cywilizacyjny jaki dokonał się w ubiegłym wieku w każdej dziedzinie życia człowieka, a także wzrost liczby ludności, wymusił intensyfikację produkcji rolnej. Wzrosła efektywność wytwarzania i jakość produktów spożywczych dzięki nowoczesnym technologiom produkcyjnym. Ze względów ekonomicznych, opłacalność zapewnia tylko produkcja wielkotowarowa zarówno roślinna jak i zwierzęca. Tego typu system produkcji pociąga za sobą wiele niekorzystnych konsekwencji, takich jak: wyjaławianie gruntów ornych, stwarzanie możliwości powstawania ognisk epidemii i sprzyjające warunki do rozmnażania i rozprzestrzeniania się niekorzystnych form biologicznych jak grzyby, bakterie, owady. Pasożyty stanowią z kolei istotne zagrożenie w hodowli zwierząt. Trudno sobie wyobrazić współczesne rolnictwo bez stosowania środków chemicznych do nawożenia upraw, ochrony roślin, zwierząt a także utrzymywania higieny w budynkach gospodarczych i mieszkalnych. Wszystkie produkty przemysłu chemicznego, które służą zwalczaniu niekorzystnych form życia zaliczamy do pestycydów (*pestis* – szkodnik, *cedeo* – niszczyć). Wyróżniono poszczególne grupy wśród pestycydów w zależności od przeznaczenia:

1. Zoocydy – środki do zwalczania szkodników zwierzęcych –

- insektycydy – środki owadobójcze,
- akarycydy – do zwalczania roztoczy,
- nematocydy – do zwalczania nicieni,
- aficydy – do zwalczania mszyc,
- rodentocydy – do zwalczania gryzoni,
- moluskocydy – do zwalczania ślimaków,
- atraktanty – środki zwabiające,
- repelenty – środki odstrasżające.

2. Bakteriocydy – środki do zwalczania bakterii.

3. Herbicydy – środki chwastobójcze.

4. Fungicydy – środki grzybobójcze.

Największe ilości pestycydów zużywa się w rolnictwie, lecz stosowane są także w medycynie weterynaryjnej i gospodarstwach domowych. Są także składnikami niektórych środków higieny do zwalczania pasożytów u zwierząt domowych. Dzięki stosowaniu insektycydów można kontrolować rozprzestrzenianie się chorób zakaźnych przenoszonych

przez owady (śpiączka – mucha Tse-tse, malaria, Gorączka Zachodniego Nilu – samica komara). Spośród wyżej wymienionych grup, duże znaczenie toksykologiczne posiadają insektycydy, które przejawiają swoje działanie również wobec ssaków. Wprawdzie z założenia związki te mają charakteryzować się wybitną wybiórczością wobec owadów, jednak jak dotąd idealny pestycyd pozostaje nieosiągalny. Pestycydy, które trafiają w trakcie aplikacji do środowiska, w zależności od trwałości w nim, rozpoczynają obieg w łańcuchu troficznym. Jednymi z pierwszych insektycydów, szeroko stosowanych od połowy XX wieku, były związki chloroorganiczne o wysokiej skuteczności biobójczej, lecz posiadające bardzo niekorzystną właściwość jaką jest znikoma biotransformacja dzięki czemu ulegają biomagnifikacji w kolejnych ogniwach łańcucha troficznego. Mimo zakazu ich stosowania (w Polsce od 1973 r.) nadal w znacznych ilościach są wykrywane w różnych elementach środowiska, także w tych rejonach świata, gdzie nigdy nie były bezpośrednio stosowane (Arktyka, Antarktyka).

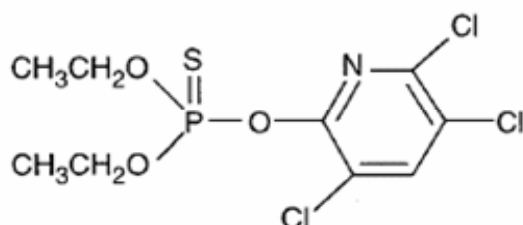
Obecnie miejsce insektycydów chloroorganicznych zajęły nowsze grupy, a wśród nich związki fosforoorganiczne i syntetyczne piretroidy. Pierwsze z nich wywodzą się z bojowych środków trujących (sarin, soman, tabun), posiadają wspólny z nimi mechanizm działania, lecz charakteryzują się mniejszą toksycznością wobec ludzi. Są estrami kwasu fosforowego lub tiofosforowego, które w organizmach ulegają bioaktywacji, są szybko metabolizowane a głównym mechanizmem działania jest hamowanie acetylocholinoesterazy. Syntetyczne piretroidy wywodzą się z kolei ze związków pochodzenia naturalnego wykazujących umiarkowane działanie owadobójcze. Naturalne związki zwane piretrynami (wyizolowane z roślin z rodzaju *Chrysanthemum*, podrodzaju *Pyrethrum*) są estrami kwasu chryzantemowego i piretrowego oraz alkoholi: piretrolu, cynerolu i jasmolonu. Wysoki wskaźnik bezpieczeństwa wobec ludzi, znaczna toksyczność wobec szkodników spowodowały, że zainteresowanie tą grupą insektycydów doprowadziło ostatecznie do modyfikacji struktur chemicznych związków naturalnych, które charakteryzowały się światłoczułością, a pozyskiwanie ich z surowca roślinnego było nieopłacalne. Wprowadzenie w 1973 roku, estrów 3-fenoksybenzylowych kwasu winylocyklopropanokarboksylowego, zapoczątkowało nową generację światłotrwałych piretroidów o wysokiej skuteczności. Budowa estrowa determinuje ich szybki metabolizm i wydalanie, natomiast wysoka lipofilność ułatwia wchłanianie i dystrybucję do tkanek bogatych w lipidy, w tym tkanki nerwowej. Mechanizm działania jest zbliżony do DDT, polega na zaburzeniu funkcjonowania kanałów sodowych, a także wywieraniu wpływu na aktywność wielu układów enzymatycznych.

Przedstawicielami wyżej wspomnianych grup insektycydów jest spośród związków fosforoorganicznych - chloropiryfos etylowy oraz α -cypermetryna – syntetyczny piretroid. Związki te obecnie są stosowane w wielu formułacjach do zwalczania szkodników w uprawach rolnych a także do kontrolowania liczby uciążliwych owadów w budynkach mieszkalnych i bliskim otoczeniu skupisk ludzkich. Mimo, że główne mechanizmy działania są znane, stale trwają badania nad metabolizmem i toksykologicznymi właściwościami tych związków. Powszechne zastosowanie insektycydów powoduje, że populacja generalna jest narażona na ich pozostałości w żywności czy wodzie. Chemizacja życia dodatkowo zwiększa ryzyko zajścia interakcji pomiędzy poszczególnymi substancjami, co może powodować nieprzewidziane efekty w organizmach żywych. Badania populacyjne w wielu krajach dowodzą obecności metabolitów insektycydów fosforoorganicznych jak i piretroidów w moczu – mając w pamięci szybką biotransformację – wydalanie odzwierciedla więc aktualne narażenie, które sprowadza się w zasadzie do spożywania pozostałości insektycydów.

Wśród licznych mechanizmów działania toksycznego związków czynnych na organizm, w ostatnich latach zwraca się szczególną uwagę na rolę wolnych rodników w etiologii wielu schorzeń – przede wszystkim chorób cywilizacyjnych. Uzasadnionym wydaje się podejrzenie, że przy chronicznym narażeniu na pozostałości pestycydów w żywności, mechanizm wolnorodnikowy działania tych ksenobiotyków może wywierać niekorzystny wpływ na homeostazę organizmu.

3.1 CHLOROPIRYFOS ETYLOWY (CPF, ang. chlorpyrifos-ethyl)

3.1.1 Właściwości fizyczne i chemiczne



Ryc. 1. Struktura chemiczna chloropiryfosu etylowego.

Nazwa chemiczna: tiofosforan-O,O-dietylu-O-3,5,6-trichloro-2-pirydyłu

Wzór sumaryczny: $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$

Numer CAS: 2921-88-2

Masa cząsteczkowa: 350,57

Temperatura wrzenia: 162 °C (z rozkładem)

Log K_{ow} 4,82 (McCall i in. 1980)

NDS: 0,2 mg/m³

NDSCh: 0,6 mg/m³ (Dz.U. 2002, 217, poz. 1833)

Czysty chloropiryfos etylowy występuje w postaci białych lub blado-żółtych, krystalicznych granulek o temperaturze topnienia 41-42°C. Praktycznie nie rozpuszcza się w wodzie (2 mg/L w 24°C), natomiast jest dobrze rozpuszczalny w rozpuszczalnikach organicznych m.in.: acetonie, benzenie, chloroformie, eterze etylowym, disiarczku węgla (Moffat i in. 2004).

W kwaśnych wodnych roztworach jest trwały, natomiast w środowisku zasadowym ulega łatwo hydrolizie (Hayes i Laws 1991). Ze względu umiarkowaną prężność par, może odparowywać z powierzchni stałych, na których był stosowany, a także z powierzchni wód.

Chloropiryfos etylowy został wprowadzony do produkcji przez amerykańską firmę Dow Chemical Company w 1965 roku. Końcowy etap syntezy polega na reakcji 3,5,6 – trichloro-2-pirydynolu (TCP) w zasadowym środowisku w dimetyloformamidzie z O,O – dietylofosforochlorotionianem.

Występuje w wielu formułacjach do stosowania zarówno przez wykwalifikowany personel jak i w gospodarstwach domowych.

Obecnie w Polsce dopuszczone są do obrotu środki ochrony roślin zawierające chloropiryfos etylowy (według Rejestru MRiRW z 31 maja 2006 roku) – wyciąg z rejestru - załącznik 1.

Chloropiryfos jest stosowany głównie jako insektycyd, ale także jako akarycyd i nematocyd. Używa się go zarówno w ochronie roślin na plantacjach wielkotowarowych, ale

także w ogrodnictwie, medycynie weterynaryjnej i gospodarstwach domowych do zwalczania szkodników i robaków biegających. Jest niesystemicznym związkami o działaniu kontaktowym, żołądkowym i inhalacyjnym. Nie jest pobierany przez korzenie roślin. W glebie jest stosunkowo trwały w środowisku zbliżonym do obojętnego, jego czas połowicznego rozpadu wynosi 60 do 120 dni.

Umieszczony jest w decyzji nr 2455/2001/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 20 listopada 2001 r. ustanawiającej wykaz priorytetowych substancji w dziedzinie polityki wodnej. Wymienia go również Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 10 listopada 2005 r. w sprawie wykazu substancji priorytetowych w dziedzinie polityki wodnej (Dz. U. 2005, nr 242, poz. 2047). Znajduje się także w „Wykazie substancji niebezpiecznych wraz z ich klasyfikacją i oznakowaniem” jako załącznik to Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dn. 28 września 2005 (Dz.U. 2005, nr 201, poz. 1647). Oznakowana jest tam jako substancja działająca bardzo toksycznie na organizmy wodne i mogąca powodować długo utrzymujące się niekorzystne zmiany w środowisku wodnym.

Jego roczne zużycie w Unii Europejskiej wynosiło około 1000 ton (dane z 2000 roku).

W Polsce obok preparatów chloropiryfosu do stosowania na plantacjach, dostępne są w handlu preparaty do zwalczania owadów w gospodarstwach domowych. Preparaty te w postaci roztworów do sporządzania emulsji, mikrokapsulek polimerowych do powolnego uwalniania substancji aktywnej a także żelu są ogólnie dostępne.

3.1.2 Los w ustroju

Wchłanianie

Chloropiryfos dobrze wchłania się do organizmu przez drogi oddechowe – w literaturze opisane są przypadki zatruc ostrych u ludzi pracujących bez masek ochronnych w sadzie bezpośrednio po zabiegu agrotechnicznym z użyciem chloropiryfosu (Aprea i in. 1994). Dla szczurów inhalacyjny NOAEL wynosi 20,6 ppb (Corley i in. 1989).

Absorpcja skórna i doustna była badana w doświadczeniu na 6 dorosłych mężczyznach – ochotnikach. Przeciętnie 70% doustnej dawki ulegało wchłonięciu, natomiast tylko 3% podanej dawki penetrowało przez skórę. Średni czas półtrwania chloropiryfosu w różnych tkankach jest porównywalny i wynosi około 10-16 godzin z wyjątkiem tłuszczu, gdzie czas półtrwania wynosi 62 godziny. Czas półtrwania TCP w moczu oszacowano na 27 godzin. Wchłanianie przez skórę stanowi więc u człowieka nieznaczającą drogę narażenia. Istotny wpływ na wielkość wchłaniania ma stan naskórka. Skóra podrażniona lub uszkodzona,

choćby wskutek działania dużych dawek CPF, może stanowić mniejszą barierę ochronną niż naskórek zdrowy (Nolan i in. 1984).

Wchłanianie przez układ pokarmowy było przedmiotem badań zarówno z udziałem zwierząt laboratoryjnych jak i ludzi. U szczurów (Bakke i in. 1976, Smith i in. 1967) i myszy (Ahdaya i Guthrie 1981-82) w badaniach z zastosowaniem znakowanego węglem ^{14}C chloropiryfosu, wykazano na podstawie radioaktywności odzyskanej w kale i moczu, że 90% podanej dawki zostało wchłonięte w ciągu 48-60 godzin po podaniu.

Dystrybucja

Chloropiryfos, bez względu na drogę wchłaniania do organizmu, bardzo szybko ulega dystrybucji do wszystkich organów przy czym ma zdolność gromadzenia się w tkance tłuszczowej i innych organach bogatych w lipidy. Największe pozostałości CPF obserwuje się w tkance tłuszczowej > krwi > wątrobie > mięśniach szkieletowych. We krwi może się wiązać z białkami i hemoglobina (Sultatos i in. 1984, Cui i in. 2006). Łożysko stanowi tylko częściową barierę dla chloropiryfosu (Hunter i in. 1999)

Metabolizm i wydalanie

Chloropiryfos etylowy podobnie jak większość insektycydów fosforoorganicznych jest fosforotionianem, który zarówno u ssaków jak i owadów ulega bioaktywacji (oksydatywna desulfuracja) przez mikrosomalny układ monooksygenaz kojarzonych z CYP 450 do aktywnego metabolitu – oksonu (CPFO) (Ma i Chambers 1994, Sultatos i Murphy 1983), głównie z udziałem izoform CYP 3A4/5, 2C8, 1A2, 2C19 i 2D6 (Mutch i Williams 2006). Produkt tej reakcji jest kilka rzędów wielkości silniejszym inhibitorem AChE niż związek macierzysty (Huff i in. 1994). Oksydatywna desulfuracja zachodzi 140-2100 razy bardziej intensywnie w wątrobie niż w mózgu (Chambers i Chambers 1989). Aktywacja i hydroliza jest silniejsza w przypadku wcześniejszej indukcji mikrosomów przez fenobarbital – nie ma to jednak wpływu na aktywność AChE, co może świadczyć o istnieniu pozawątrobowych miejsc aktywacji i metabolizmu CPF (Sultatos 1988). U ssaków, aktywacja zachodzi głównie w wątrobie, natomiast hydroliza oksonu oprócz wątroby również w osoczu. Degradacja CPF i jego oksonu na drodze hydrolizy prowadzi do powstania głównych metabolitów: 3,5,6-trichloro-2-pirydynolu (TCP) oraz dietylotiofosforanów (DETP) i dietylofosforanów (DEP). O ile TCP jest metabolitem charakterystycznym, DETP i DEP powstają również wskutek hydrolizy innych dietylofosforotionianów. Hydroliza może zachodzić przed jak i po utlenieniu, około połowa CPF ulega hydrolizie przed utlenieniem, 10-20% jest utleniane i hydrolizowane do TCP i DEP, natomiast 30% jest dealkilowane do fosforanu-TCP po oksydacji (Sunaga i in. 1989). Mniej ważnym szlakiem przemian

chloropiryfosu jest uwalnianie reszty monoetylo-fosforanowej. Różnica polarności między CPF, CPFO i metabolitami tłumaczy bardzo wydajną eliminację produktów przemian CPF z moczem. TCP w organizmie szczura podlega sprzężeniu z kwasem glukuronowym (Bakke i in. 1967), siarkowym (Nolan i in. 1984), ale także może występować w moczu w postaci glikozydu (Bakke i in. 1967, Bicker i in. 2005). 80% wydalonych metabolitów stanowił glukuronid, 4% glukozyd a 12% wolny TCP. Bicker i in. (2005) zaproponowali pełniejszy schemat biotransformacji CPF u człowieka (Ryc. 2), identyfikując w moczu obecność połączeń z aminokwasami i glutationem.

Kinetyka procesów desulfuracji jak i hydrolizy (dearylacja) jest zależna od płci i to może być powodem zwiększonej wrażliwości osobników płci żeńskiej na CPF. Zwiększona wrażliwość samic może również wynikać ze stosunku bioaktywacji do detoksykacji, który u samic jest 2-3 krotnie wyższy niż u samców (Chambers i Chambers 1989, Sultatos 1991, Chambers i in. 1994, Ma i Chambers 1994, Gordon i in. 1997). Samice i młode szczury mają niższą aktywność karboksyloesteraz i A-esteraz niż dorosłe samce (Moser i in. 1998, Karanth i Pope 2000). Młode szczury reagują podobnym stopniem zahamowania AChE przy pięciokrotnie niższych dawkach niż szczury dorosłe. Ponadto u młodych szczurów nie są widoczne różnice we wrażliwości wobec CPF wynikające z płci (Moser i Padilla 1998).

Farmakokinetykę CPF i TCP na zdrowych ochotnikach zbadano podając jednorazową dawkę doustną CPF 0,5 mg/kg m.c., a następnie po 2 tygodniach jednorazową dawkę dermalną 0,5 lub 5,0 mg/kg m.c.. Stężenia CPF w osoczu były poniżej granicy wykrywalności (30 ng/ml). W moczu nie stwierdzono obecności niezmienionej substancji. Stężenie maksymalne TCP we krwi występowało po 6 godzinach od podania dawki doustnej i 24 h po podaniu dermalnym (5 mg/kg m.c.), przy czym stężenie TCP przy podaniu naskórnym było 10 razy niższe niż w przypadku podania doustnego (Nolan i in. 1984). Metabolizm chloropiryfosu u ludzi badano także w przypadkach zatruc (Drevenkar i in. 1993). CPF był wykrywalny w osoczu do 15 dnia od zatrucia, osiągając najwyższe stężenia w czasie przyjęcia pacjentów do szpitala – następnie zawartość CPF w osoczu spadała z czasem półtrwania wynoszącym 1,1-3,3 h, wolniej usuwane z osocza były dietylofosforany ($t_{1/2} = 2,2-5,5$ h), natomiast wydalanie dietylofosforanów z moczem przebiegało najwolniej ($t_{1/2} = 5,1-9,5$ h). Dwufazowy model wydalania jakiego podlega chloropiryfos i jego metabolity powoduje, że po szybkich spadkach stężeń związku macierzystego i metabolitów następuje faza wolna, gdzie czasy półtrwania wynoszą odpowiednio 40,6; 21,9; i 38,8 h dla CPF w osoczu oraz dietylofosforanów w osoczu i moczu. Autorzy na podstawie stosunku stężeń DEP do DETP w

osoczu i moczu wnioskuje, że hydroliza chloropiryfosu może zachodzić również przed procesem aktywacji do oksonu.

Nowe spojrzenie na metabolizm CPF przedstawił Bicker i in. (2005). Badając przypadek zatrucia u człowieka, zastosowali HPLC w połączeniu z tandemową spektrometrią mas do analizy moczu. Zidentyfikowano kolejne metabolity CPF a także monitorowano wydalanie DEP, DETP i TCP przez 14 dni od momentu zatrucia. Wśród zidentyfikowanych metabolitów obecne są: połączenia cysteiny z dehalogenowanymi pochodnymi (w pozycji 6 pierścienia pirydyny) i deetylowanymi (reszta etylowa w grupie estrowej), deetylowany chloropiryfos oraz jego okson (M01, M02, M08, M10, M12 na ryc. 2.). W moczu nie wykryto natomiast związku macierzystego ani jego aktywnego metabolitu oksonu w formie wolnej.

Interakcję toksykokinetyczną i toksykodynamiczną między CPF a innym przedstawicielem tej samej grupy insektycydów – diazinonem zbadano na szczurach (Timchalk i in. 2005). Grupy zwierząt otrzymały odpowiednio: 15, 30 lub 60 mg/kg m.c. pojedynczych związków lub ich mieszaniny, a następnie oznaczono stężenia związków macierzystych i ich metabolitów w osoczu oraz ilość wydalonych z moczem metabolitów. Stężenie maksymalne CPF osiągał we krwi po około 3 godzinach i wynosiło one odpowiednio: 100 i 1140 ng/ml po podaniu CPF w dawce 15 i 60 mg/kg m.c.. Czterokrotny wzrost dawki powodował więc ponad dziesięciokrotny wzrost stężenia maksymalnego we krwi. W przypadku mieszaniny związków podanych w wyższej dawce (60 mg/kg m.c.) stężenie maksymalne CPF występowało po 6 godzinach, natomiast TCP podobnie jak w przypadku pojedynczego podania pojedynczego związku po 6 godzinach. Autorzy nie odnotowali obecności macierzystych związków w moczu zwierząt eksponowanych. Ilość wydalonego TCP z moczem w ciągu 24 h była proporcjonalna do dawki CPF, natomiast po podaniu mieszaniny ilość TCP ulegała zmniejszeniu o 20-50 %.

W innym doświadczeniu przeprowadzonym na szczurach wykazano istnienie liniowej zależności pomiędzy podaną dawką CPF a wydaloną ilością TCP w moczu. Podanie doustnych dawek w zakresie od 1,1 do 8,7 mg/kg m.c. powodowało pojawienie się TCP w moczu w stężeniach od 6 do niemal 53 µg/ml (Chang i in. 1996).

Hunter i in. (1999) po podaniu CPF badali dystrybucję TCP u ciężarnych szczurów. Dawkę 7 mg/kg m.c. podawano doustnie przez pięć kolejnych dni (14-18 dzień ciąży) i 5 godzin po ostatnim podaniu zwierzęta poddawano eutanazji. W mózgu i wątrobie zarówno samic jak i płodów oznaczano stężenie TCP, który był jedynym związkiem wykrywalnym zastosowaną metodą analityczną (HPLC-UV). W żadnej próbce, nie stwierdzono obecności CPF ani jego oksonu. Stężenie TCP było najwyższe 5 godzin po ostatnim podaniu w

badanych tkankach a następnie gwałtownie spadało, by po 48 h osiągnąć poziom poniżej granicy wykrywalności. Zawartość TCP w wątrobie samic była 5-krotnie wyższa niż u płodu w każdym punkcie czasowym, natomiast nieoczekiwanie w mózgu stężenia TCP były dwukrotnie wyższe u płodu niż u ich matek.

Podjęto także próbę wyznaczenia profilu toksykokinetycznego i oceny transportu przez łożysko po dożylnym podaniu CPF znakowanego ^{14}C ciężarnym szczurom (Abdel-Rahman i in. 2002). CPF był wykrywalny tylko w wątrobie i osoczu samic do odpowiednio 24 i 36 godzin po podaniu. Najwyższą radioaktywność w tkankach stwierdzono 12 godzin po podaniu wykazywały w malejących stężeniach w: wątrobie, mózgu, łożysku i płodzie.

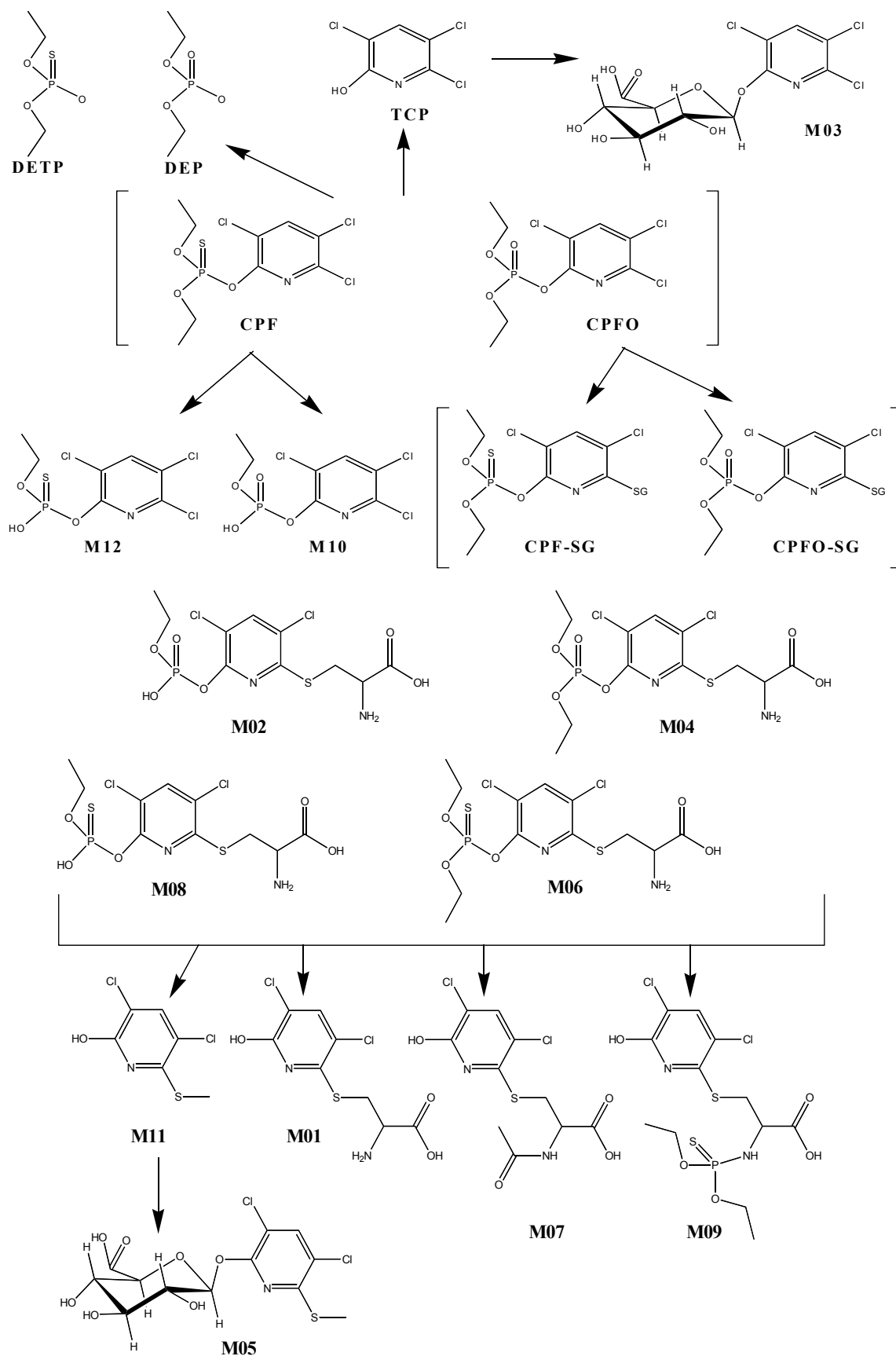
O szybkości przemian CPF i jego oksonu może świadczyć fakt, że nie udaje się wykryć tego drugiego w materiale biologicznym, natomiast CPF jest wykrywany w badanych tkankach tylko przy wysokiej ekspozycji. W doświadczeniach z perfundowaną wątrobą wykazano, że w perfuzacie obecny był tylko produkt hydrolizy – TCP, wątroba więc jest też głównym miejscem hydrolizy CPF i CPFO. Aktywacja CPF może wobec tego zachodzić także w tkankach innych niż wątroba (Sultatos i in. 1985).

W moczu zwierząt laboratoryjnych otrzymujących CPF drogą pokarmową nie wykrywa się niezmiennego związku w moczu.

Za tak szybki metabolizm odpowiedzialny jest kompleks esteraz – enzymów hydrolitycznych, których aktywność jest obecna we wszystkich tkankach ssaków. Enzymy te podzielono na esterazy A i B, w zależności od wrażliwości na insektycydy fosforoorganiczne. Osocze i tkanki ssaków bogate są w A-esterazy: aryloesterazę (EC 3.1.1.2) i paraoksonazę (EC 3.1.8.1), enzymy te biorą udział w biotransformacji insektycydów i są na nie niewrażliwe. Do B-esteraz zaliczamy: karboksyloesterazy (EC 3.1.1.1) i cholinoesterazy – enzymy te są hamowane przez substancje tej grupy, po związaniu z np. CPFO tracą aktywność hydrolityczną.

Największą aktywność A-esterazową posiadają: wątroba, surowica i frakcja mitochondrialno-mikrosomalna wątroby. Aliesteraza z kolei dominuje w jelicie cienkim i wątrobie, w mniejszych ilościach występuje w nerce, surowicy i płucach (Pond i in. 1995).

CPF-oksonaza jest enzymem rozkładającym aktywny metabolit okson chloropiryfosu – jest Ca^{2+} -zależną A-esterazą, która nie przejawia aktywności w mózgu, ale czynna jest w wątrobie i osoczu. Młode szczury posiadają niższą aktywność CPF-oksonazy niż dorosłe zarówno w wątrobie jak i osoczu (Mortensen i in. 1996).



Ryc. 2. Schemat przemian metabolicznych chlorpiryfosu u człowieka (Bicker i in. 2005)
 CPF-SG, CPFO-SG – połączenia CPF i CPFO z glutationem.

Na szczególną uwagę zasługuje rodzina paraoksonaz (PON), biorących między innymi udział w rozkładzie CPFO. Enzymy te związane są z lipoproteinami HDL i przejawiają szeroką hydrolityczną aktywność fizjologiczną, biorą udział w biotransformacji leków oraz inhibitorów esterazy cholinowej z grupy insektycydów fosforoorganicznych, a także przeciwdziałają arteriosklerozie (Mackness i in. 1998, Harel i in. 2004).

Niska aktywność PON w znacznym stopniu podnosi wrażliwość wobec insektycydów fosforoorganicznych, ekspresja genów kodujących PON odgrywa kluczową rolę we wrażliwości na CPFO (Furlong i in. 2005).

3.1.3 Mechanizm działania

Główne efekty toksyczne działania chloropiryfosu wynikają podobnie jak w przypadku większości insektycydów fosforoorganicznych z hamowania cholinoesteraz zarówno przez CPF jak i jego okson (Namba i in. 1971). Acetylocholinoesteraza (prawdziwa cholinoesteraza) należy do klasy hydrolaz estrów choliny, do której zaliczamy również butyrylocholinoesterazę. AChE zlokalizowana jest w postsynaptycznych cholinergicznym zakończeniach nerwowych w układzie ośrodkowym jak i obwodowym, włączając przedzwojowe autonomiczne synapsy a także pozazwojowe parasympatyczne (Palmer i in. 1981). Obecna jest w płytkach motorycznych a także w erytrocytach (Ballantyne i Marrs 1992). BChE z kolei obecna jest w osoczu, wątrobie i tkance tłuszczowej. Aktywność BChE może zależeć od wieku, płci czy narażenia na inhibitory. Choć jest stosowana jako wskaźnik ekspozycji, jej zahamowanie nie powoduje żadnych efektów zdrowotnych, gdyż funkcja fizjologiczna nie jest, jak do tej pory, do końca poznana. Udowodniono, że BChE hydrolizuje sukcylocholinę (Sparks i in. 1999).

U człowieka w surowicy dominuje BChE, natomiast u szczura aktywność cholinoesterazowa osocza rozkłada się równo między BChE i AChE, w mózgu natomiast 90% aktywności stanowi AChE natomiast 10% BChE.

Aktywności esteraz różnią się znacznie między poszczególnymi gatunkami zwierząt, ale także nawet w jednorodnych populacjach spotyka się znaczne rozrzuty w aktywnościach, spowodowane jest to m.in. znacznym substrato-zależnym polimorfizmem tej grupy enzymów oraz zależnością od czynników środowiskowych, genetycznych oraz wieku.

ZFO mogą nieodwracalnie hamować ChE poprzez powstanie stabilnego wiązania kowalencyjnego w centrum aktywnym enzymu. Stabilność tego wiązania może ulegać

utrwaleniu w procesie zwanym starzeniem (aging), który polega na utracie, odszczepieniu jednej lub obu reszt dietyloestrowych – proces ten jest w przypadku zatrucia o tyle niekorzystny, że uniemożliwia reaktywację enzymu przy zastosowaniu 2-PAM. Jediną drogą przywrócenia aktywności ChE jest wówczas jej synteza *de novo*.

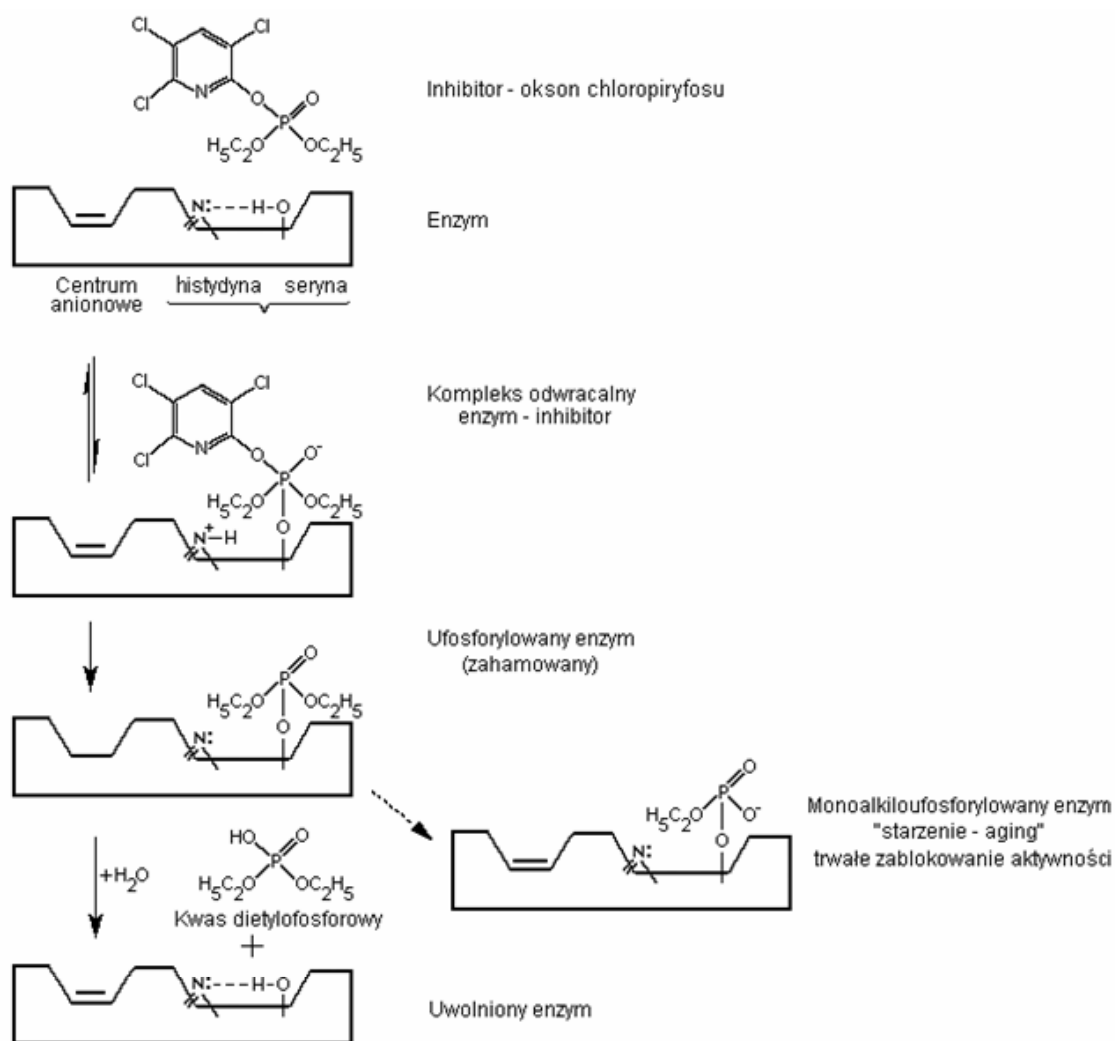
Efektom zahamowania esterazy cholinowej jest zwiększona stymulacja układu cholinergicznego, wynikająca z nagromadzenia nierozłożonej acetylocholino. W wyniku ciągłej stymulacji obserwuje się charakterystyczne objawy kliniczne pobudzenia układu cholinergicznego: bóle głowy, senność, wymioty, biegunka, skurcze żołądka, bradykardia, zaburzone widzenie, zwężenie źrenicy, skurcz oskrzeli i zwiększone wydzielanie śluzu, ślinotok, łzawienie, nietrzymanie moczu (Ballantyne i Marrs 1992). Ekspozycja na wysokie dawki może w konsekwencji spowodować tachykardię, obrzęk płuc, utratę kontroli nad zwieraczami, konwulsje, śpiączkę i ostatecznie śmierć.

Dodatkowo, oprócz ChE są hamowane przez CPF także inne esterazy, m.in.: trypsyna i chymotrypsyna oraz lipaza, lecz każdy inhibitor – insektycyd fosforoorganiczny w charakterystyczny sposób hamuje poszczególne enzymy (Quistad i in. 2006). U szczura, aliesterazy obecne w wątrobie są bardzo wrażliwe na ZFO.

Inhibitory esteraz mogą być podzielone na dwie podstawowe grupy – nieodwracalne i odwracalne. Klasyfikacja ta oparta jest częściowo na zdolności regeneracji zahamowanego enzymu. Karbaminiany – insektycydy pochodne kwasu karbaminowego – są przykładami inhibitorów odwracalnych, natomiast insektycydy fosforoorganiczne nieodwracalnych. Różnica w powinowactwie naturalnego substratu i odwracalnego inhibitora decyduje o stopniu zahamowania aktywności enzymatycznej.

W przypadku zatrucia karbaminianami powrót aktywności ChE do wartości przed zatruciem wynosi kilka godzin, natomiast w przypadku insektycydów fosforoorganicznych okres ten trwa kilka dni.

Zarówno substrat jak i inhibitory łączą się kowalencyjnie z esterazą poprzez modyfikację reszty seryny obecnej w centrum aktywnym. W przypadku rozkładu acetylocholino zachodzi przejściowa acetylacja enzymu, lecz powstający kompleks jest na tyle nietrwały, że umożliwia dysocjację i powrót do początkowej konformacji. Enzym karbamylowany czy fosforylowany przez odpowiednio: karbaminiany czy związki fosforoorganiczne jest bardziej stabilny i nie ulega tak łatwo dysocjacji jak w przypadku przemian ACh.



Ryc. 3. Schemat hamowania aktywności acetylocholinoesterazy przez okson chloropiryfosu (Seńczuk, 2002).

Mechanizmy pozaantycholinoesterazowe

CPF wpływa także na presynaptyczne zakończenia nerwowe powodując uwalnianie noradrenaliny (Dam i in. 1999). Okson chloropiryfosu ma zdolność wiązania się w niskich stężeniach bezpośrednio z receptorem muskarynowym w prążkowie (*stratum*). Autorzy sugerowali, że wiązanie takie może być powodem hamowania cykazy adenylnowej przez CPFO. W kolejnej pracy na liniach komórkowych potwierdzili zdolność wiązania się z receptorem M₂, jednak odrzucili uprzednio postawioną tezę o muskarynowym mechanizmie hamowania cykazy na rzecz bezpośredniego oddziaływania CPFO z cząsteczką enzymu (Huff i Abou-Donia 1995).

U szczurów otrzymujących 1/10 LD₅₀ przez 4 tygodnie obserwowano hamowanie transaminaz, γ -glutamylotranspeptydazy i dehydrogenazy mleczanowej. Kwas askorbinowy jako dodatek do diety powodował zwiększenie toksyczności CPF (Enan i in. 1982).

CPF ma także zdolność do bioalkilacji kwasów nukleinowych u myszy. Modyfikowana grupami etylowymi guanina była głównym produktem alkilacji RNA (Mostafa i in. 1983). Dietylofosforylacji może ulegać pod wpływem CPFO również receptor M (Bomsler i Casida 2001).

Chloropiryfos hamuje również syntezę DNA i RNA (Dam i in. 1998, Johnson i in. 1998) w mózgu, w okresie prenatalnym przy nasilonych podziałach komórkowych, co może powodować ewentualne komórkowe, synaptyczne i behawioralne zakłócenia rozwoju przy chronicznym narażeniu na małe dawki CPF (Whitney i in. 1995).

CPF w dawkach 10-80 mg/kg m.c. u szczurów powoduje w pierwszej kolejności hipotermię, natomiast po 1-2 dniach pojawia się gorączka, którą znoszą salicylany. Samice i kastraty są bardziej wrażliwe niż samce (Gordon 1997). Uważa się, że TNF wpływa na etiologię hipotermii i gorączki powodowanej przez CPF (Rowsey i Gordon 1999).

Okson chloropiryfosu może wiązać się odwracalnie z receptorami nikotynowymi w miejscu innym niż wiąże się acetylocholina. CPFO znosi wrażliwość tych receptorów (Katz i in. 1997). Przy dużych dawkach CPF (ok. 100 mg/kg m.c.) obserwuje się spadek liczby receptorów muskarynowych w różnych rejonach mózgu (Nostrandt i in. 1997).

3.1.4 Działanie mutagenne, teratogenne, kancerogenne

Brak jest udowodnionych doniesień na temat działania mutagennego, teratogennego czy kancerogennego chloropiryfosu.

3.1.5 Zatrucia i postępowanie

Zatrucia ostre

Wskutek zatrucia przypadkowego (inhalacja, kontakt skórny, spożycie skażonej żywności) lub rozmyślnego (próba samobójcza) dochodzi do przejściowego lub nieodwracalnego zahamowania esterazy cholinowej, co prowadzi do wewnątrzpochodnego zatrucia acetylocholiną. W efekcie następuje bardzo silne pobudzenie układu cholinergicznego. Pobudzenie receptorów muskarynowych i nikotynowych powoduje pojawienie się kompleksu objawów:

- wynikające z pobudzenia receptorów muskarynowych: efekt pobudzenia pozazwojowych nerwów cholinergicznym w układzie oddechowym, przewodzie pokarmowym, sercu, nerkach, gruczołach ślinowych, mięśniach;

- objawy nikotynowe: dotyczą pobudzenia zwojów autonomicznych oraz płytek motorycznych mięśni poprzecznie prążkowanych,

- objawy ośrodkowe: wynikające z nagromadzenia acetylocholino w OUN i oddziaływania na receptory cholinergiczne. W zależności od wielkości wchłoniętej dawki obserwuje się różny nasilenie objawów, stąd zatrucie może przybrać postać lekką lub ciężką. Objawy muskarynowe przeważają w postaci lekkiej zatrucia i przejawiają się jako: osłabienie, zaburzenia widzenia (akomodacji), ze strony gruczołów: ślinienie, łzawienie, ze strony układu pokarmowego: wymioty, bóle brzucha, brak łaknienia. Obserwuje się także zwężenie źrenic i niewielki skurcz oskrzeli. Obok objawów muskarynowych, występują także objawy nikotynowe związane z pobudzeniem receptorów w płytce motorycznej mięśni szkieletowych: nerwowo-mięśniowe porażenie oddechu, drżenia włókienkowe mięśni. W lekkim zatruciu aktywność esterazy cholinowej osiąga 60% aktywności wyjściowej, stan taki trwa od 1 do 3 dni.

W postaci średniociężkiej objawy muskarynowe ulegają nasileniu i pojawiają się objawy nikotynowe. Występuje dodatkowe ogólne osłabienie i uczucie lęku. Pojawia się biegunka, rzadkoskurcz, hipertonia, drżenia mięśni twarzy, sinica błon śluzowych, rzęzenie przy oddychaniu. Aktywność esterazy cholinowej wynosi w postaci średniociężkiej od 10-40% a okres powrotu do zdrowia ok. 14 dni.

Przy zahamowaniu ChE do wartości ok. 10% i niższej, dominują objawy zatrucia ze strony OUN, są to: drgawki napadowe przechodzące w drgawki uogólnione, zaburzenia psychiczne, sinica a także obrzęk płuc i śpiączka. W tak silnym zatruciu może dojść do zgonu wskutek porażenia ośrodka oddechowego.

Zatrucia przewlekłe

Insektycydy fosforoorganiczne ze względu na szybki metabolizm u ssaków nie powodują zatruc przewlekłych wskutek braku kumulacji materialnej. Systematyczne narażenie na niskie dawki powoduje natomiast kumulację czynnościową.

W przypadkach długotrwałego narażenia na chloropiryfos może wytwarzać się tolerancja na zwiększone stężenia ACh, dochodzi do obniżenia wrażliwości receptorów poprzez zmniejszenie ich liczby i/lub zwiększenie wchłaniania zwrotnego z przestrzeni

międzysynaptycznej i jednocześnie zmniejszenie syntezy ACh. Jest to tzw. tolerancja behawioralna. Mimo znacznego zahamowania esterazy cholinowej w narażeniu przewlekłym, objawy zanikają lub są mniej intensywne (Bushnell i in. 1993).

Innym, pozacholinoesterazowym działaniem insektycydów fosforoorganicznych jest efekt określany jako opóźnione działanie neurotoksyczne (OPIDN – organophosphorous induced delayed neuropathy) – jest to rodzaj neuropatii obwodowej, która objawia się porażeniem kończyn dolnych, niezdolnością do ruchów, zaburzeniami czuciowymi i porażeniem ogólnym. Objawy te pojawiają się zazwyczaj po ostrym zatruciu, kiedy cholinergiczne efekty działania zanikają (8-14 dni). W obrazie histologicznym obecne są zwyrodnienia nerwów długich w części dystalnej, z wtórnym zniszczeniem osłonek mielinowych. Dokładny mechanizm powstawania OPIDN nie jest dotąd poznany. Zwraca się jednak uwagę na funkcję esterazy neurotoksycznej (NTE – neuropathy target esterase) – integralnego białka błonowego obecnego w neuronach kręgowców. Jego fizjologiczna rola jest także nieznana. OPIDN było obserwowane m.in. u weteranów wojny w Zatoce Perskiej (Gulf War Syndrom), u których zauważalne były zaburzenia psychiczne i neurologiczne.

Aktywność NTE wykazują też limfocyty krwi. W przypadku ostrego zatrucia CPF, po 17 dniach objawy cholinergiczne zanikały, natomiast limfocyty NTE była zahamowana w 60%. Dopiero 43 dnia od momentu zatrucia stwierdzono u pacjenta objawy OPIDN (Lotti i in. 1986).

Modelowym zwierzęciem w badaniach OPIDN są kury (Richardson i in. 1993). Neuropatia występowała po dawkach na tyle wysokich, po zastosowaniu których konieczna była intensywna reaktywacja pralidoksymem (Capodicasa i in. 1991).

Haley i in. (2000) przy użyciu spektroskopii ¹H-NMR oceniali zmiany u ludzi w pniu mózgu i jądrach podstawnych oraz mierzyli aktywność PON (typ Q). Obserwowano zmniejszenie masy neuronów i obniżenie aktywności PON u weteranów wojny w Zatoce Perskiej w stosunku do kontroli. Zdaniem ekspertów przygotowujących raport, efekty te mogły być wynikiem ekspozycji na związki fosforoorganiczne.

Postępowanie w zatruciach

W leczeniu zatruc ostrych obowiązują zasady pierwszej pomocy, leczenie objawowe i podtrzymujące oraz zastosowanie odtrutek.

Stosuje się więc:

- atropinę – farmakologicznego antagonistę acetylocholino. Znosi objawy muskarynowe (głównie obwodowe). Nie pomaga wobec pobudzenia nerwowo-mięśniowego, ani też nie hamuje rozwoju opóźnionego działania neurotoksycznego.

- reaktywatory AChE – silne, nukleofilowe właściwości IV-rzędowego ugrupowania amoniowego pochodnych oksymów powodują reaktywację ufosforylowanego enzymu – powstaje w tej reakcji kompleks oksym-reszta fosforanowa, który odłącza się od enzymu.

W praktyce klinicznej stosuje się związki z grupy oksymów mono- i bispirydynowych:

- 2-PAM – (pralidoksym) – metyljodek pirydyno-2-aldoksymu

- obidoksym – dichlorowodorek eteru bis-[4-hydroksyiminometylopirydyno-(1)-metylowego]

Obidoksym jest skuteczniejszy w cięższych przypadkach, prawdopodobnie dlatego, że przenika przez barierę krew-mózg i w ten sposób może znosić objawy ośrodkowe.

Charakterystyczne jest to, że reaktywacja oksymami nie przynosi skutków, jeśli zaszło już „starzenie” kompleksu poprzez dealkilację. Z tego względu w przypadku zatrucia konieczne jest jak najszybsze podanie: atropiny i oksymów. Udowodniono, że środki te podane osobno działają 50 razy słabiej niż ich kombinacja.

Siarczan atropiny podaje się domięśniowo w dawce 2 mg, powtarzając co 5-10 minut do momentu pełnej atropinizacji. Niekiedy całkowita dawka dobową w leczeniu zatruc insektycydami fosforoorganicznymi dochodzi do 200 mg.

Reaktywatory AChE podaje się dożylnie do 4,0 g/24h.

W przypadkach spożycia dużych ilości CPF dobre skutki daje stosowanie ciągłego wlewu 2-PAM (500 mg/h) wraz z atropiną aż do zniesienia objawów nikotynowych (Tush i Anstead 1997).

W zatruciach inhibitorami AChE nie podaje się środków wpływających depresyjnie na ośrodek oddechowy (barbiturany, morfina) a także aminofiliny i neuroleptyków.

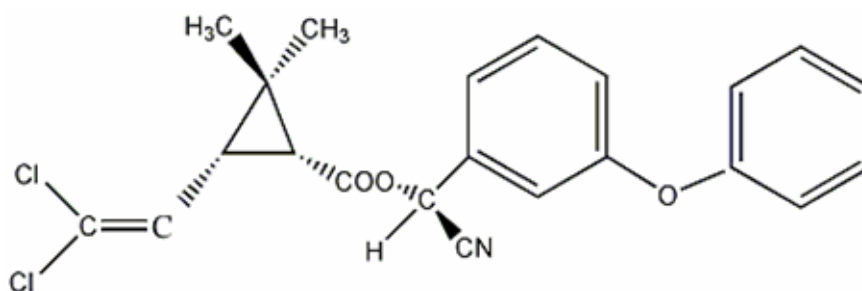
Stosuje się natomiast leki przeciwdrgawkowe: diazepam (5-10 mg) i bromek suksametonium (10-50 mg).

Dostępny jest również preparat Serum Cholinesterase[®] - skoncentrowany, liofilizowany, wysokooczyszczony ludzki enzym. 45 mg suchego koncentratu posiada aktywność jaką wykazuje 500 ml osocza ludzkiego.

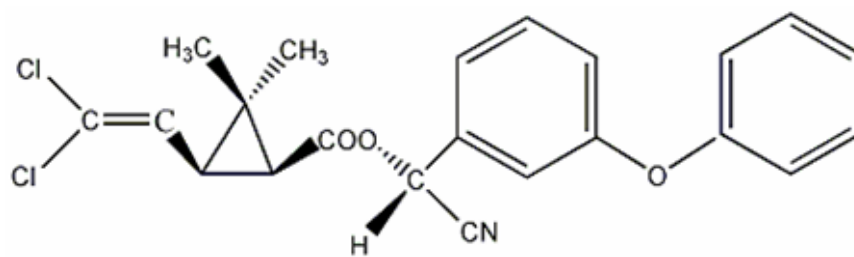
Wprowadzenie do organizmu rekombinowanego adenowirusa zawierającego kodony PON1 – podnosiło aktywność aromatazy surowiczej o 60% co znacząco zmniejszało wrażliwość na inhibitory AChE (Cowan i in. 2001).

3.2 α -CYPERMETRYNA (CM, ang. alfa-cypermethrin)

Obecnie stosowane insektycydy piretroidowe są grupą związków otrzymywanych syntetycznie. Wywodzą się z naturalnych składników ekstraktu z koszyczków kwiatowych niektórych gatunków złoćenia – *Chrysanthemum*, podrodzaju *Pyrethrum* – *P. cinerariaefolium* i *P. carneum*. Składniki ekstraktu – Piretryna I i Piretryna II – estry kwasu chryzantemowego i piretrowego z alkoholem – piretrolelem wykazują właściwości owadobójcze, jednak wysoki koszt ich pozyskiwania oraz nietrwałość (rozkład pod wpływem światła i tlenu) spowodowały, że nie wprowadzono ich do powszechnego i trwałego stosowania w ochronie upraw rolnych. Prace naukowe dotyczące modyfikacji struktur chemicznych naturalnych piretroidów doprowadziły do syntezy wielu pochodnych, które ustanowiły nową klasę pestycydów – syntetyczne piretroidy – charakteryzujące się zwiększoną aktywnością szkodnikobójczą i korzystniejszymi właściwościami fizykochemicznymi. Jedną z takich pochodnych jest cypermetryna, zarejestrowana po raz pierwszy w 1977 roku. Syntetyczne piretroidy posiadają w swojej strukturze charakterystyczną komponentę kwasu chryzantemowego zazwyczaj w połączeniu estrowym z alkoholem 3-fenoksybenzylowym. Cypermetryna zawiera w swej cząsteczce trzy centra chiralne, w tym dwa w pierścieniu cyklopropanowym i jedno w grupie alfa-cyjanowej, w sumie tworzy więc 8 izomerów – 4 *cis*- i 4 *trans*-, z tym jednak, że większą aktywnością owadobójczą wyróżniają się *cis*- izomery. Warto zaznaczyć, że określenie „cypermetryna” odnosi się zazwyczaj do mieszaniny izomerów *cis*- i *trans*- w proporcjach pomiędzy 50:50 a 40:60. α -Cypermetryna to z kolei dwa spośród ośmiu występujących izomerów, mieszanina (1*S*,3*S*)-3-(2,2-dichlorowinylo)-2,2-dimetylocyklopropanokarboksylanu (R)-cyjano (3-fenoksyfenylo)metylu i (1*R*,3*R*)-3-(2,2-dichlorowinylo)-2,2-dimetylocyklopropanokarboksylanu (S)-cyjano (3-fenoksyfenylo)metylu.



(1*R*, *cis*) (α S)



(1S, *cis*) (α R)

Ryc. 4. Struktura chemiczna izomerów α -cypermetryny.

3.2.1 Właściwości fizyczne i chemiczne

Wzór sumaryczny: $C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$

Numer CAS: 67375-30-8

Masa cząsteczkowa: 416,30

Temperatura topnienia: 81,5 °C

Temperatura wrzenia: 200 °C

Log K_{ow} : 6,94

NDS: 1 mg/m³ (Dz.U. 2002, 217, poz. 1833)

O fizycznej postaci cypermetryny decyduje jej skład izomeryczny. Im większy stosunek *cis:trans*, tym bardziej krystaliczną formę przybiera, α -cypermetryna ma postać białej lub lekko-żółtej krystalicznej masy o słabym, aromatycznym zapachu. Jest dobrze rozpuszczalna w większości rozpuszczalników organicznych: toluenie, octanie etylu, heksanie, metanolu, natomiast z dichlorometanem i acetonem miesza się w każdym stosunku w temperaturze pokojowej.

Cypermetyryna jest trwała w środowisku kwaśnym, natomiast w alkalicznym ulega hydrolizie, co wynika z jej budowy estrowej.

3.2.2 Los w ustroju

Zarówno wchłanianie CM jak i wydalanie zachodzi stosunkowo szybko, wiąże się to z właściwościami lipofilowymi związku i łatwością hydrolizy do bardziej polarnych metabolitów, które są usuwane z moczem.

Różnice we właściwościach izomerów cypermetyryny powodują, że w badaniach kinetyki oraz metabolizmu należy je bezwzględnie ująć. Najpełniejszego obrazu dostarczają badania z zastosowaniem technik z użyciem związków znakowanych izotopem ^{14}C w różnych elementach cząsteczki. Badania Crawforda i in. (1981) nad kinetyką poszczególnych izomerów wykazały, że to właśnie *cis*-izomery są wolniej metabolizowane i wydalone z organizmu szczurów, które otrzymały doustną jednorazową dawkę 2,5 mg/kg m.c.. W przypadku samców, w ciągu 48 godzin po podaniu, 40% podanej dawki izomerów *cis*- zostało wydalone z moczem natomiast z kałem 26%. 72 godziny po podaniu największą radioaktywność wykazywała tkanka tłuszczowa i skóra. W tym samym eksperymencie wykazano, że *cis*-izomery są znacznie wolniej eliminowane z tłuszczu niż z innych tkanek, okres połowicznego zaniku radioizotopu wyniósł średnio 11,7 dnia.

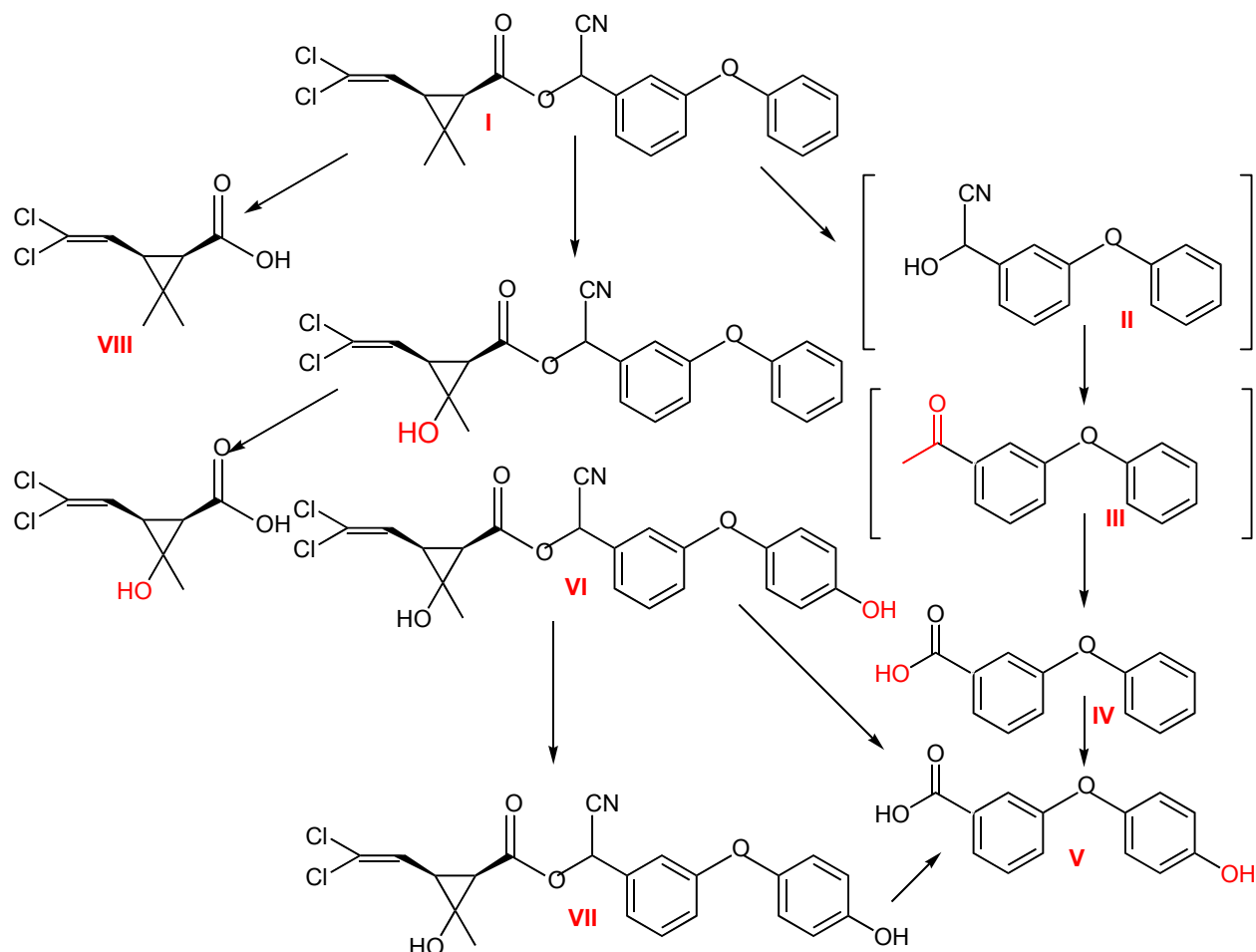
Cypermetyrynę znakowaną węglem ^{14}C w pierścieniu cyklopropanowym w jednorazowej dawce (1,2 i 2,1 mg/kg m.c. odpowiednio u samic i samców) podano szczurom. Największą radioaktywność notowano w tkance tłuszczowej, przy czym poziom u samic był 2-3 krotnie wyższy niż u samców. Z kolei w wątrobie samców znajdowano wyższe stężenia niż u samic. Po 3 dniach od podania CM, bardzo niski poziom radioaktywności obserwowano u obu płci w nerkach, mięśniach, mózgu i krwi (Crawford i in. 1981).

Niewielkie ilości CM ulegają przemianom do CO_2 , podane przez różnych autorów wartości wahają się w granicach: 0,005 – 1,5 % (Crawford i in. 1981, Rhodes i in. 1984)

U szczurów obu płci otrzymujących 2 mg/kg m.c. CM znakowanej ^{14}C w pierścieniu benzylovym codziennie przez 28 dni najwyższe ilości radioaktywnego węgla obserwowano w tkance tłuszczowej, natomiast stężenia w wątrobie, nerkach i innych narządach mieściły się w zakresie 400-900 ng/g tkanki. Bardzo niskie stężenia stwierdzono w mózgu, poniżej 10 ng/g. Potwierdzono, że retencji w tkance tłuszczowej ulegają głównie izomery *cis*- (Rhodes 1984).

Metabolity CM u szczurów obu płci, wydalone są szybko z moczem, około 50-65% podanej dawki wydala się w ciągu 48 godzin. Wydalanie z kałem zachodzi wolniej i należy

podkreślić, że tą drogą może być wydalana niezmiennona CM. W tkance tłuszczowej również jest gromadzona niezmiennona CM, a okres jej połowicznego zaniku wynosi kilkanaście dni. (Crawford i in. 1981)



Ryc. 5. Schemat przemian CM w organizmach ssaków.

Wszystkie izomery CM podlegają ogólnie tym samym reakcjom w organizmach ssaków (Soderlund i Casida 1977). Główne szlaki biotransformacji to hydroliza wiązania estrowego oraz utlenianie pierścienia aromatycznego przy udziale monooksygenaz zależnych od cytochromu P-450. Produktami hydrolizy są: kwas 3-fenoksybenzoesowy (IV) i kwas dichlorowinylocyklopropanokarboksyłowy (DCCA) (VIII), ten pierwszy może dalej ulegać procesowi utlenienia do kwasu 4-hydroksy-3-fenoksybenzoesowego (V), a następnie w w cyklu przemian II fazy produkty ulegają sprzęganiu i w takiej postaci są wydalane z moczem. Puła powstających metabolitów I fazy jest dla większości badanych gatunków, w tym szczura i człowieka, podobna, różnice pojawiają się w powstających koniugatach II fazy. U szczura głównym metabolitem CM wydalonym z moczem jest siarczan 4OH3PBA i 3PBA (Huckle i

in. 1981a, Crayford i Hutson 1980). Tylko nieznaczna część wspomnianych metabolitów ulega sprzężeniu z kwasem glukuronowym czy aminokwasami (Huckle i in. 1981b). U człowieka z kolei dominuje sprzężanie z kwasem glukuronowym.

Początkowa biotransformacja polega na reakcjach z udziałem esteraz (hydroliza wiązania estrowego) lub monooksygenaz zależnych od cytochromu P-450 (reszta kwasowa lub alkoholowa). W konsekwencji opisanych przemian, jakkolwiek inhibicja tych dwóch szlaków skutkować będzie spowolnieniem przemian związku macierzystego do mniej aktywnych lub całkowicie pobawionych aktywności farmakologicznej metabolitów (Soderlund i Casida 1977).

Brak jest dowodów, że CM może ulegać w trakcie przemian metabolicznych procesom racemizacji w jelicie, kale czy tkance tłuszczowej. W kale 75% radioaktywności po podaniu znakowanej CM, to niezmienny związek, pozostałe 25% stanowią: dihydroksypochodna CM (VII), 4OH3PBA (V) i 3PBA (IV).

W tkance tłuszczowej rejestrowana radioaktywność głównie pochodziła z niezminionej CM, choć także były wykrywalne lipofilne metabolity: 4OHCM, 3PBA (Hutson i Logan 1986).

3.2.3 Mechanizm działania

Podziału piretroidów dokonano na podstawie ich budowy chemicznej oraz działania na organizmy ssaków – w większości podziały te pokrywają się. Insektycydy typu I (m.in. permetryna) nie posiadają w swej strukturze ugrupowania cyjanowego w odróżnieniu od związków należących do grupy II (cypermetryna, deltametryna). Drugi podział oparty jest na kompleksie objawów zatrucia ostrego u ssaków:

-zespół T (tremor)

-zespół CS (choreoathetosis and salivation)

Objawy zatrucia piretroidami są charakterystyczne i można je sprowadzić do nadpobudliwości, konwulsji, drgawek i ostatecznie porażenia. Biofizyczne podstawy tego zjawiska badane wieloma metodami dowodzą jednego: mechanizm ten oparty jest podobnie jak w przypadku DDT na oddziaływaniu cząsteczki insektycydu ze strukturą kanału sodowego w komórkach nerwowych. Interakcja z kanałem sodowym polega na zmianie przepływu jonów przez ten kanał, powodując długotrwałe przedłużenie stanu przejściowego zwiększenia przepuszczalności jonów sodowych w czasie pobudzenia.

Obecność kanałów jonowych warunkuje przekazywanie impulsów nerwowych w żywych organizmach. Każda zmiana w ich funkcjonowaniu będzie miała wpływ na działanie poszczególnych układów lub całego organizmu.

Piretroidy typu II działają poprzez przedłużenie trwania otwarcia kanału i spowodowanie napływania jonów Na^+ do wnętrza komórki, uważa się że jest to wynikiem stereospecyficznego wiązania cząsteczki insektycydu z białkami kanału i oddziaływania allosterycznego. Wydłużony czas trwania prądu sodowego jest bezpośrednio odpowiedzialny za powstawanie przedłużonego potencjału depolaryzacyjnego, który w efekcie wytwarza powtarzające się pobudzenia (Vivjerberg i van den Bercken 1990, Narahashi 1992).

Oprócz działania wydłużającego depolaryzację, piretroidy również wpływają na aktywację kanałów sodowych (Lund i Narahashi 1981, 1982).

Kanał sodowy pod wpływem piretroidów jest niezdolny do szybkiego zamknięcia się po fazie repolaryzacji, wskutek czego następuje dalszy napływ jonów Na^+ do wnętrza komórki, następcze potencjały depolaryzacyjne, powtarzające się wyładowania i w efekcie nadpobudliwość całego układu nerwowego.

Opisanych jest co najmniej 6 miejsc wiązania neurotoksyn w kanale sodowym, jedno z nich jest utożsamiane z piretroidami (Lombet i in. 1988, Catterall 1988). Kanały wapniowe są także miejscem działania insektycydów piretroidowych (Orchard 1980, Clark i Brooks 1989). Piretroidy mają zdolność do wypierania blokera kanału wapniowego – nimodypiny, z jego miejsc wiązania w mózgu szczura, jednak niezbędne stężenie insektycydu do skutecznego wyparcia było wyższe niż jest to potrzebne do działania na kanał sodowy (Ramadian i in. 1988).

Kanały potasowe są modyfikowane przez piretroidy, ale tylko przy wysokich stężeniach i efekt ten nie jest tak silny jak w przypadku kanałów sodowych (Narahashi 1971). Podobnie jest z kanałem chlorkowym, lecz w tym wypadku efekt oddziaływania na ten kanał potęguje działanie główne na kanały sodowe (Forshaw i Ray 1990).

Przedmiotem badań były również interakcje piretroidów z kompleksami receptor GABA-kanał chlorkowy. Lawrence i Casida (1983), na podstawie badania siły wiązania znakowanego agonisty w obecności deltametryny, stwierdzili że kompleks GABA- Cl^- może stanowić punkt uchwytu dla piretroidów, jednak w stężeniach 200-1000 razy wyższych niż na kanały sodowe. Późniejsze badania elektrofizjologiczne podważają jednak możliwość oddziaływania na przewodnictwo GABA (Chalmers i Osborne 1986, Ogata i in. 1988).

Piretroidy oddziałują także z receptorem nikotynowym jednak w sposób, który nie powoduje zmian w transporcie jonów (Abbassy i in. 1982, 1983a i b) i wobec tego nie stanowi o toksyczności piretroidów (Oortgiesen i in. 1989).

Cypermetyryna oraz inne piretroidy typu II mają również zdolność wiązania się z receptorem benzodiazepinowym w stężeniach, w których działają również na kanały sodowe (Gammon i Sander 1985, Lawrence i in. 1985).

Naturalne piretryny wywołują uczulenia kontaktowe i zapalenia skóry o różnym nasileniu. Uczulenia w przypadku kontaktu z syntetycznymi piretroidami należą do rzadkości. Robotnicy pracujący z syntetycznymi piretroidami typu II (zawierające ugrupowanie α -cyjanowe: deltametryna, cypermetyryna, fenwalerat) skarżą się na parestezję skórną, objawiającą się: mrowieniem, cierpieniem, kłuciem i pieczeniem. Zawodowe narażenie powodować może także: zawroty głowy, uczucie gorąca, swędzenie. Objawy te zazwyczaj ustępują samoistnie w ciągu 24 godzin.

3.2.4 Działanie mutagenne, teratogenne, kancerogenne

Brak jest potwierdzonych doniesień na temat embriotoksyczności, teratogenności lub kancerogenności cypermetyryny.

3.2.5 Zatrucia i postępowanie

Z powodu szybkiego metabolizmu insektycydów piretroidowych, wywoływany efekt szkodliwy jest przejściowy i w pełni odwracalny, stąd leczenie zatruc sprowadza się do minimalizowania objawów klinicznych. Przede wszystkim należy kontrolować drgawki, hipertermię, ślinienie i choreoatetozę, oczywiście od rodzaju wchłoniętego związku zależy jaki kompleks objawów wystąpi. Początkowo zalecano stosowanie ośrodkowo działających środków rozluźniających mięśnie jak mefenazyne, która stanowiła ochronę w przypadku narażenia na średniej wielkości dawki cismetryny i deltametryny (Bradbury i in. 1983). Podobną ochronę dawał metokarbamol, mniej toksyczny od mefenazyny i dłużej działający. Testowano także użyteczność innych środków zwiotczających mięśnie: chlorfenezynę, chloroksazon czy metaksalon. Wszystkie wyżej wymienione środki znacznie lepiej znoszą objawy spowodowane piretroidami typu II niż I (Bradbury i in. 1983, Hiromori i in. 1986). Środki o działaniu przeciwdrgawkowym nie są specyficzną odtrutką w leczeniu zatruc piretroidami. Benzodiazepiny, anestetyki (uretan, pentobarbital) oraz sole kwasu walproinowego dają tylko ograniczoną ochronę (Thieabult i in. 1985). Atropina znosi objawy cholinergiczne: ślinienie, bradykardię i zwiększone wydzielanie oskrzelowe a także częściowo nadpobudliwość (Ray i Cremer 1979).

Przy zatruciu drogą doustną do płukania żołądka stosowano roztwór wodorowęglanu sodowego (Kaloyanova i El Batawi 1991).

W przypadku kontaktu skórno-powierzchniowego zaleca się stosowanie preparatów o dużej zawartości tłuszczu, które mają zdolność zmniejszenia absorpcji zarówno profilaktycznie jak i po wystąpieniu ekspozycji. Stosowano witaminę E, kremy z witaminą E i oleje (Tucker i in. 1984, Flannigan i Tucker 1985).

Według zaleceń amerykańskiej Agencji Ochrony Środowiska, w pierwszej kolejności należy dokonać dekontaminacji zanieczyszczonej powierzchni skóry przy użyciu wody z mydłem. Następnie zaleca się stosowanie kremów z witaminą E, natomiast nie wskazany jest tlenek cynku, który nasila objawy. Można zastosować olej kukurydziany, który jest bardziej skuteczny niż wazelina (Reigat i Roberts 1999).

Jeśli nastąpił kontakt preparatu z okiem, należy płukać intensywnie czystą wodą lub solą fizjologiczną.

W zależności od czasu jaki upłynął od połknięcia preparatu stosuje się: płukanie żołądka, a w przypadku późnego zgłoszenia podanie węgla aktywowanego i środków przeczyszczających, chyba że występuje biegunka lub niedrożność jelit.

3.3 METODY OZNACZANIA CPF, CM I ICH METABOLITÓW

Systematyczna analiza pozostałości pestycydów w materiale biologicznym zazwyczaj ukierunkowana jest na poszczególne grupy związków chemicznych: chloroorganiczne, fosforoorganiczne, piretroidy, itp.. Cechy charakterystyczne, jak: lipofilność, obecność charakterystycznych grup funkcyjnych pozwalają w sposób selektywny wyodrębnić ksenobiotyki ze skomplikowanych matryc a także dobierać pod kątem właściwości chemicznych i fizycznych odpowiednią metodę oznaczenia końcowego.

Pestycydy poza nielicznymi wyjątkami jak: zatrucia przypadkowe czy rozmyślne a także ekspozycja zwierząt na wysokie dawki w pracach doświadczalnych, oznaczane są w badanym materiale często w nano- lub subnanogramowych ilościach. Badając los ksenobiotyków w organizmie, zadaniem analityka jest właściwy dobór procedur analitycznych celem skutecznego wyizolowania, oczyszczenia oraz ilościowego oznaczenia substancji macierzystej i/lub jej metabolitów. Skomplikowana matryca jaką jest materiał biologiczny: krew, tkanki miękkie, mocz; powodują, że kluczowym procesem dla całej analizy staje się ekstrakcja, czyli jak najbardziej selektywne usunięcie analitu z kompleksu substancji balastowych z jednoczesnym zagęszczeniem, wzbogaceniem.

Dodatkowym problemem w analizie metabolitów, staje się uwolnienie zazwyczaj polarnych pochodnych, które wydalane są z moczem w postaci sprzężonej, jako siarczany, glukuroniany czy glikozydy. W zależności od natury chemicznej metabolitu przeprowadza się hydrolizę kwaśną lub alkaliczną, bądź enzymatyczną przy użyciu β -glukuronidazy/sulfatazy.

3.3.1 Ekstrakcja

W procesie tym wykorzystuje się charakterystyczne właściwości fizyko-chemiczne analizowanej substancji, które pozwalają w sposób jak najbardziej wybiórczy wyodrębnić analit z matrycy. Najczęściej metodę ekstrakcji dobiera się na podstawie rozpuszczalności, współczynnika podziału, prężności par czy stałej kwasowości. Ogólnie w procesie tym mamy do czynienia z dwiema fazami, z których ekstrahująca posiada właściwości takie, które pozwalają na ilościowy transfer masy analitu z matrycy.

Obecnie w analityce pestycydów i ich metabolitów wykorzystuje się szereg metod, od klasycznej ekstrakcji ciecz-ciecz przez ekstrakcję do fazy stałej po mikroekstrakcję do fazy stałej. Mimo znacznego postępu i tendencji do stosowania procedur proekologicznych („*green chemistry*”, „*non-solvent techniques*”) z niskim zużyciem rozpuszczalników

organicznych oraz coraz większej wadze przywiązywanej do możliwości automatyzacji procesów i miniaturyzacji urządzeń do ekstrakcji nadal metody tzw. wyczerpujące (takie, gdzie bezwzględny odzysk analitu sięga 100%) są uznawane jako metody odniesienia i w dalszym ciągu są respektowane przez najbardziej wpływowe organizacje ochrony środowiska na świecie.

Wśród technik ekstrakcji stosowanych w analizie CPF i CM w materiale biologicznym możemy wyróżnić:

- Ekstrakcja ciecz-ciecz (klasyczna). Materiał biologiczny ekstrahuje się zazwyczaj w obecności bezwodnego siarczanu sodowego rozpuszczalnikiem organicznym. W tym celu używa się albo pojedynczych rozpuszczalników: heksan, aceton, acetonitryl, dichlorometan lub ich mieszanin. Ekstrakcję w celu zwiększenia wydajności można prowadzić w sposób ciągły w aparatach Soxhleta. Uzyskany ekstrakt przed analizą GC podlega zagęszczeniu i oczyszczeniu. Zaletą jest wysoki odzysk, natomiast wadą zużycie drogich i toksycznych rozpuszczalników, duży nakład pracy oraz ograniczone możliwości automatyzacji procesu.
- Ekstrakcja do fazy stałej (*Solid Phase Extraction*). Próbkę materiału (rozcieńczone osocze, homogenat tkankowy) przepuszcza się przez odpowiednie złożo fazy stałej (zazwyczaj C_{18}), na której zachodzi adsorpcja analitu. Następnym etapem, jest płukanie celem usunięcia polarnych interferentów i ostatecznie wymywanie analitów rozpuszczalnikiem o dużej sile elucyjnej. W zoptymalizowanej metodzie otrzymuje się czyste ekstrakty, które często bez dalszego oczyszczania można poddać analizie chromatograficznej. SPE jest metodą prostą, o niskim zużyciu rozpuszczalników organicznych, ponadto dostępne są na rynku gotowe zestawy do jednoczesnej obróbki wielu próbek.
- Mikroekstrakcja do fazy stałej (*Solid Phase Microextraction*). Istotą tej techniki jest urządzenie w kształcie strzykawki chromatograficznej, gdzie do końca tłoczka przymocowane jest włókno pokryte fazą stacjonarną. Włókno mieści się całkowicie we wnętrzu igły strzykawki. Naciskając tłoczek włókno wysuwa się z igły i w ten sposób substancje o wysokim powinowactwie do fazy stacjonarnej ulegają na jej powierzchni absorpcji, a następnie włókno wciąga się do igły i podobnie jak w przypadku manualnego dozowania przebija igłą uszczelkę dozownika i wysuwa ponownie włókno. W temperaturze dozownika następuje desorpcja analitów z włókna, które może być po raz kolejny wykorzystane. Początkowo ta bezrozpuszczalnikowa technika była stosowana do ekstrakcji próbek o nieskomplikowanej matrycy (woda),

lecz później zaczęto ją stosować do analizy pestycydów w materiale biologicznym. Stosuje się ją zarówno do ekstrakcji w fazie nadpowierzchniowej jak i bezpośrednio z roztworu. Prostota i możliwość automatyzacji to główne zalety. Jednak koszt włókien (przy pomocy jednego włókna można wykonać 50-100 analiz), oraz możliwość niecałkowitej desorpcji, przez to zanieczyszczenie kolejnej próbki (tzw. „carryover”), a przede wszystkim niskie bezwzględne odzyski (technika niewyczerpująca) powodują, że SPME ustępuje metodom odniesienia.

- Mikroekstrakcja do fazy ciekłej (*Solvent Microextraction = Single Drop Microextraction*) Technika w zamyśle zbliżona do SPME. Ekstrakcja podobnie jak SPME może być prowadzona w fazie nadpowierzchniowej jak i bezpośrednio przez zanurzenie w roztworze. Włókno w tej metodzie zastępuje kropla (ok. 2 μ l) rozpuszczalnika organicznego (zazwyczaj n-oktanol), która „wisi” na wylocie igły standardowej strzykawki chromatograficznej i jest ekspozycja w fazie nadpowierzchniowej lub zanurzona w analizowanych roztworze. Znaczny stosunek fazy ekstrahowanej do ekstrakcyjnej powoduje, że następuje wielokrotne zagęszczenie analitu. Podobnie jak SPME jest techniką niewyczerpującą. Dużym ograniczeniem jest niestabilność kropli przy technice zanurzeniowej. Dobre efekty osiąga się stosując ten typ ekstrakcji w fazie nadpowierzchniowej. Ogromną zaletą jest możliwość zastosowania jej w każdym laboratorium posiadającym chromatograf gazowy bez dodatkowych kosztów. Łatwo też można tą technikę zautomatyzować.
- Ekstrakcja cieciami w stanie nadkrytycznym (*SFE – Supercritical Fluid Extraction*). Ciecz w stanie nadkrytycznym ma właściwości dyfuzyjne zbliżone do gazu i małą lepkość, dzięki czemu ekstrakcja przebiega szybciej i z większą wydajnością. Najczęściej używa się CO₂, który jest tani, łatwo dostępny i nieszkodliwy. Możliwy jest dodatek rozpuszczalnika organicznego, najczęściej metanolu, w celu dobrania pożądanej siły elucyjnej.
- Przyspieszona ekstrakcja rozpuszczalnikowa (*Accelerated Solvent Extraction*). W technice tej stosuje się te same rozpuszczalniki, których używa się w technikach klasycznych typu ciecz-ciecz. Przyspieszenie procesu osiąga się przez zastosowanie rozpuszczalników pod zwiększonym ciśnieniem i w podwyższonej temperaturze w specjalnych, zautomatyzowanych aparatach. Dzięki tym warunkom, ekstrakcja trwa krócej, zużywana jest mniejsza objętość rozpuszczalników przy zachowaniu wyższych odzysków analitów wobec technik klasycznych. Wadą jest wysoka cena urządzenia.

- Ekstrakcja z fazy stałej (*Matrix Solid Phase Dispersion Extraction – MSPDE*). Próbkę zazwyczaj homogenizuje się ze stałym sorbentem (florisil, żel krzemionkowy, tlenek glinu i in.) i umieszcza wraz z bezwodnym siarczanem sodowym w kolumnach szklanych. Wymywanie pestycydów prowadzi się odpowiednio dobranym rozpuszczalnikiem lub układem kilku rozpuszczalników. Technika ta w jednym procesie łączy: ekstrakcję, frakcjonowanie i oczyszczanie dzięki temu oszczędza czas poświęcony na przygotowanie próbek. Ekstrakty często bez dalszego oczyszczania nadają się do oznaczeń chromatograficznych. Prostota i efektywność, umożliwiają jednoczesną analizę dużej liczby próbek.
- Współdestylacja – ma zastosowanie głównie do lotnych, niepolarnych pestycydów (zw. fosforoorganiczne). Lotność tych insektycydów wykorzystuje się w celu oddzielenia ich od nielotnych lipidów. Próbkę rozgrzanego, ciekłego tłuszczu nastrzykuje się do ogrzewanej rurki wypełnionej kulkami silanizowanej waty szklanej, przez którą przepuszcza się gaz obojętny, np. azot. Tłuszcz w postaci cienkiej warstwy odkłada się na wacie, natomiast lotne pestycydy wraz z gazem przenoszone są do „pułapki” z florisilem. Przemycując florisil rozpuszczalnikiem o odpowiedniej polarności uzyskuje się ekstrakt, który po zagęszczeniu poddaje się analizie GC.
- Chromatografia adsorpcyjna – technika ta w szczególności wykorzystywana jest w procesie oczyszczania niepolarnych ekstraktów z polarnych zanieczyszczeń i tłuszczów. Stosując jako wypełnienia kolumn odpowiednio przygotowane (wygrzane w temperaturze powyżej 120°C i zdeaktywowane dodatkiem wody <10%) polarne złoża: żelu krzemionkowego, florisilu (SiO_2 – 84,0%; MgO – 15,5%, Na_2SO_4 – 0,5%) czy tlenku glinu można oczyścić ekstrakty z tłuszczów, barwników żółciowych i innych polarnych zanieczyszczeń, które zatrzymywane są na powierzchni złoża i w przeciwieństwie do analitów nie ulegają wymywaniu. Dobierając siłę elucyjną rozpuszczalnika, przeprowadzić można frakcjonowanie analitów na podstawie różnic w polarności i rozdzielić poszczególne ich grupy. n-Heksan jest najczęściej stosowanym rozpuszczalnikiem w celu naniesienia próby na kolumnę, do wymywania używa się z kolei mieszanin n-heksanu z dichlorometanem, bądź eterem dietylowym w różnych proporcjach. Kolumny z tlenkiem glinowym efektywnie usuwają siarkę z próbek środowiskowych przed oznaczeniem chromatograficznym.

3.3.2 Metody oznaczeń końcowych

W analizie pestycydów zarówno w próbkach środowiskowych (woda, ścieki, powietrze, gleba) jak i w materiale biologicznym zastosowanie znalazła w szczególności chromatografia gazowa. Wynika to przede wszystkim z właściwości fizykochemicznych badanych związków (lotność, termostabilność, wysoka lipofilność), ale także z charakteru próbek. Śladowa analiza pozostałości nastręcza wielu problemów analitycznych ze względu na stopień skomplikowania matrycy i subnanogramowe ilości oznaczanych związków. Analityk musi się też liczyć z obecnością innych substancji o podobnych właściwościach, które mogą przeszkadzać w oznaczeniu końcowym. Chromatografia gazowa ze względu na bardzo wysoką zdolność rozdzielczą dzięki zastosowaniu kolumn kapilarnych, szeroki wybór selektywnych detektorów jest użytecznym narzędziem w analizie pestycydów. Należy jednak pamiętać, że najdroższy, najbardziej zaawansowany technologicznie sprzęt analityczny nie spełni swojego zadania, jeśli popełniono błędy w procedurze przygotowania próbki. Począwszy od pobrania próbki, poprzez przechowywanie, ekstrakcję, oczyszczanie, do odmierzania objętości próbki do nastrzyku procedura analityczna jest narażona na wystąpienie błędów systematycznych, przypadkowych oraz grubych. Zastosowanie metody wzorca wewnętrznego jako metody kalibracji pozwala na skompensowanie niektórych błędów.

Wyzwaniem dla analityka jest jednoczesne oznaczenie kilku związków często znacznie różniących się między sobą właściwościami fizykochemicznymi. Z problemem takim mamy do czynienia w przypadku badania metabolizmu ksenobiotyków. Ksenobiotyki w organizmie ssaków ulegają przemianom metabolicznym głównie w wątrobie do produktów, które zazwyczaj są bardziej polarne (np. poprzez hydroksylację pierścienia aromatycznego) i po reakcjach II fazy, są wydalane z moczem w postaci sprzężonej. Ze względów ekonomicznych, celowym wydaje się poszukiwanie metod pozwalających jednocześnie wyodrębnić i ilościowo oznaczyć interesujące nas związki.

CPF i metabolity w materiale biologicznym – przegląd metod

Chlorpyrifos w organizmach żywych bardzo szybko ulega biotransformacji i tylko przy masywnej ekspozycji jest wykrywalny w materiale biologicznym. Zdarza się to w przypadku doświadczeń na zwierzętach lub w przypadku ostrych zatruc u ludzi. Metabolit pośredni jakim jest CPFO ulega bardzo łatwo hydrolizie w osoczu i wątrobie. Z tego powodu

nie jest wykrywalny mimo zastosowania czułych metod analitycznych, chociaż opisane są metody ilościowego oznaczania CPFO. W badaniach nad metabolizmem CPF najczęściej oznacza się jego dalsze metabolity: TCP, DETP i DEP w osoczu, tkankach oraz moczu (Vasilić i in. 1993, Bartels i Kastl 1992, Heudorf i in. 2004, Hernandez i in. 2002, Kupferman i in. 2004, Corrion i in. 2005). Szybkość wydalania polarnych metabolitów z moczem powoduje, że jest on użytecznym materiałem do badań, w materiale tym nie stwierdza się obecności CPF nawet przy wysokiej ekspozycji (Jitsunari i in. 1989, Nolan i in. 1984, Chang i in. 1996, Koch i Angerer 2001). Wymienione wyżej produkty przemian CPF występują w moczu w postaci połączeń z kwasem glukuronowym i siarkowym, dlatego w celu oznaczenia sumy metabolitów konieczne jest przeprowadzenie hydrolizy połączeń. Stosowane są dwie metody hydrolizy: kwaśna – stosuje się dodatek najczęściej stężonego kwasu siarkowego lub solnego (0,2 ml stężonego kwasu/ml moczu) i ogrzewa przez 90 minut w temperaturze 90°C; enzymatyczna – stosuje się β -glukuronidazę (również z aktywnością sulfatazy) w buforze pH 4-5, w temperaturze 37°C, najczęściej przez ponad 12 godzin. Uwolnione metabolity ekstrahuje się w układzie ciecz-ciecz ze środowiska kwaśnego (eterem dietylowym, toluenem) a następnie w zależności techniki oznaczenia końcowego, poddaje derywatywacji przed analizą GC lub bez derywatywacji analizuje się przy użyciu HPLC. Hunter i in. (1999) wykazali, że w tkankach i osoczu TCP występuje w postaci wolnej.

CPF oraz jego okson ekstrahowano z osocza i krwi n-heksanem (Drevenkar i in. 1993) i jego mieszaniną z metanolem (Brzak i in. 1998), a także toluenem (Timchalk i in. 2005), acetonitrylem (Jacobsen i in. 2004) i octanem etylu (Hunter i in. 1999) uzyskując odzyski powyżej 80%. Z powodzeniem ekstrahowano CPF do fazy stałej stosując kolumny Sep-Pak C₁₈ (Waters) (Nolan i in. 1984, Abou-Quare i Abou-Donia 2001).

Oznaczenia końcowe prowadzono z użyciem chromatografii gazowej i detektorów: FPD (Nolan i in. 1984, Takamiya i in. 1994), MS (Musshoff i in. 2002, Brzak i in. 1998, Drevenkar i in. 1993) a także HPLC z detekcją UV (Hunter i in. 1998, Abou-Quare i Abou-Donia 2001) lub tandemową spektrometrią mas (Jacobsen i in. 2004, Bicker i in. 2005). Ze względu na umiarkowaną prężność par chloropiryfosu, można go także ekstrahować w fazie nadpowierzniowej (head-space). Musshoff i in. (2002) oraz Tsoukali i in. (2005) zastosowali HS-SPME do oznaczania szeregu insektycydów fosforoorganicznych we krwi ludzkiej i szczurzej, w połączeniu z GC-MS lub GC-NPD.

Aby umożliwić izolację metabolitów chloropiryfosu z materiału biologicznego konieczne jest zakwaszenie próbki przed ekstrakcją przy pomocy kwasu solnego lub octowego. Opisane są metody ekstrakcji zarówno w układzie ciecz-ciecz jak i SPE. Koch i in. (2001) badając

narażenie populacji generalnej na CPF, poddawali hydrolizat moczu destylacji z parą wodną, TCP z destylatu ekstrahowali z użyciem kolumnienek Isolute® 101. W ekstrakcji ciecz-ciecz stosowano natomiast następujące rozpuszczalniki: octan etylu (Hunter i in. 1999, Brzak i in. 1998), eter dietylowy (Drevenkar i in. 1993), toluen (Timchalk i in. 2005) oraz acetonitryl (Jacobsen i in. 2004). W przypadku zastosowania HPLC, jako techniki końcowego oznaczenia, uzyskane ekstrakty nadawały się po odparowaniu i zmianie rozpuszczalnika do analizy. Analizę GC zawsze poprzedzał proces derywatywacji polarnych i słabo lotnych metabolitów (DEP, DETP) do odpowiednich silylowanych pochodnych. Zazwyczaj stosowano do derywatywacji MTBSTFA (Nolan i in. 1984, Brzak i in. 1998, Timchalk i in. 2005, Koch i in. 2001) lub rakotwórczy diazometan (Drevenkar i in. 1993).

Bioczujniki

Właściwość hamowania AChE przez insektycydy fosforoorganiczne została wykorzystana do konstruowania bioczujników – urządzeń analitycznych, służących do wykrywania i ilościowego oznaczania analitów, gdzie detekcja zachodzi przy udziale elementu biologicznego (Biziuk red., 2001). Element ten może stanowić enzym, kwas nukleinowy, organizmy jednokomórkowe. Bioczujniki opracowane w celu wykrywania związków fosforoorganicznych, najczęściej zawierają immobilizowaną na elektrodzie szklanej AChE (z węgorza elektrycznego lub muszki owocowej, rozkłada substrat: jodek acetylotiocholiny), lub hydrolazę (rozkłada insektycydy fosforoorganiczne z wytworzeniem dwóch protonów). ZFO w badanym roztworze hamują AChE lub są rozkładane z uwolnieniem protonów – w obu przypadkach rejestrowane jest to jako zmiana pH proporcjonalna do stężenia inhibitora esterazy cholinowej (Gaberlein i in. 2000, Andreescu i in. 2002).

Piretroidy i ich metabolity w materiale biologicznym – przegląd metod

Szybki metabolizm piretroidów sprawia, że w materiale biologicznym w postaci niezmienionej znajduje się je w niskich ilościach. Wysoka lipofilność powoduje z kolei, że pozostałości tych pestycydów mogą osiągać najwyższe stężenia w tkankach bogatych w lipidy i stąd procedury analityczne dla tego typu tkanek zawierają kilka etapów oczyszczania ekstraktów co znacznie komplikuje i wydłuża czas analizy. Metabolity piretroidów charakteryzują się znacznie niższą lipofilnością (3PBA, DCCA) albo posiadają właściwości

polarne (4OH3PBA). W badaniach pozostałości w tkankach wykorzystuje się najczęściej metody oznaczania związków macierzystych za pomocą chromatografii gazowej, natomiast w przypadku oceny narażenia populacji generalnej ludzi, bada się stężenia metabolitów (DCCA, 3PBA, 4OH3PBA) w moczu, zazwyczaj przy użyciu GC i HPLC po derywatywacji w celu obniżenia granicy wykrywalności (Loper i Anderson 2003, Ramesh i Ravi 2004, Smith i in. 2002, Cocker i in. 2002, Colume i in. 2001, Corrion i in. 2005, Leng i Gries 2005, Kim i in. 2006, Hardt i Angerer 2003).

Niezmienioną CM z tkanek można ekstrahować acetonitrylem lub n-heksanem (w obecności bezwodnego Na_2SO_4). Uzyskane ekstrakty oczyszcza się na kolumnach wypełnionych żelem krzemionkowym lub florisilem (Marei i in. 1982). Cypermetrynę oznacza się najczęściej przy pomocy chromatografii gazowej z detektorem wychwytu elektronów (ECD).

Ekstrakcję metabolitów z moczu prowadzi się po uprzedniej hydrolizie kwaśnej (Kühn i in. 1996, Schettgen i in. 2002 a,b) lub enzymatycznej (Baker i in. 2004).

Eadsforth i in. (1983) połączyli hydrolizę i derywatyzację w jednym procesie, ogrzewając mocz z kwasem siarkowym w metanolu. Metylowe pochodne metabolitów ekstrahowano n-heksanem.

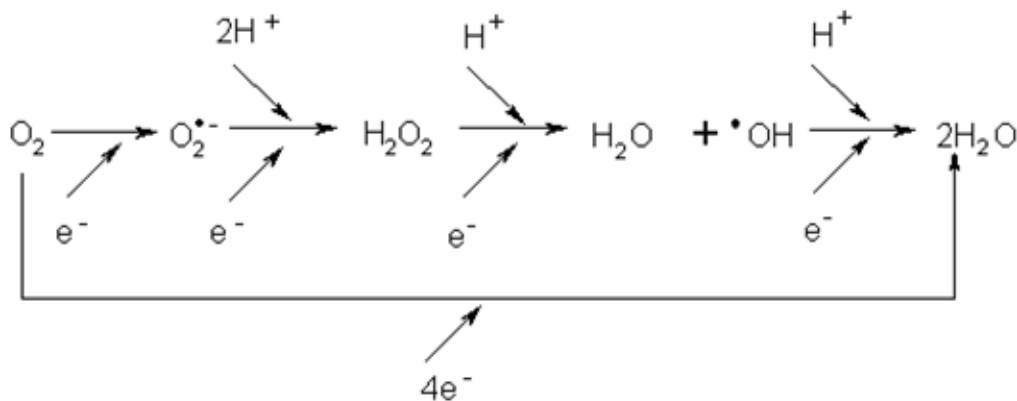
3PBA oraz DCCA można ekstrahować z kwaśnego hydrolizatu n-heksanem (Kühn i in. 1996 b, Schettgen i in. 2002) lub eterem dietylowym (3PBA i 4OH3PBA) (Wollen i in. 1992). Smith i in. (2002) nie stosowali hydrolizy moczu, a 3PBA z zakwaszonej próbki ekstrahowali chloroformem.

Do oznaczania metabolitów w moczu stosowano także ekstrakcję do fazy stałej (Baker i in. 2004), natomiast próbki osocza ekstrahowano acetonitrylem (Ding i in. 2004). DCCA, 3PBA i 4OH3PBA wymagają derywatywacji przed końcowym oznaczeniem z użyciem GC. Stosuje się metylację przez ogrzewanie ze stężonym kwasem siarkowym w metanolu (Eadsforth i in. 1983), MTBSTFA (Schettgen i in. 2002 b) oraz bezwodnik pentafluoropropionowy i 1H,1H-pentafluoropropanol (Wollen i in. 1992).

Metabolity 3PBA i 4OH3PBA można oznaczać za pomocą HPLC z detekcją UV (Smith i in. 2002, Ding i in. 2004) lub MS/MS (Baker i in. 2004). Po derywatywacji zaś metodą chromatografii gazowej z detektorami ECD (Eadsforth i in. 1983), MS (Wollen i in. 1992, Khün i in. 1996, Schettgen i in. 2002 a, b).

3.4 REAKTYWNE FORMY TLENU I USZKODZENIA WOLNORODNIKOWE

Tlen jest pierwiastkiem dominującym w skorupie ziemskiej i stanowi 21% składu atmosfery. W trakcie ewolucji organizmy żywe musiały przystosowywać się do zmian stężenia tlenu, które wahało się w granicach 18-35%. Wysokie stężenia tlenu działają toksycznie poprzez utlenianie poszczególnych struktur komórkowych powodując uszkodzenie organizmu. Cząsteczka tlenu ma właściwości utleniające, w reakcjach może przyjmować elektrony, w ten sposób ulegać redukcji. Całkowita redukcja O_2 prowadzi do powstania dwóch cząsteczek wody poprzez przyjęcie czterech elektronów oraz dwóch protonów. Proces całkowitej redukcji zachodzi stosunkowo rzadko ze względu na paramagnetyczne właściwości cząsteczki tlenu (liczba kwantowa całkowitego spinu =1). Cząsteczka tlenu może również ulegać (częściowej) jednoelektronowej redukcji. Produktami pośrednimi są tzw. **reaktywne formy tlenu** (RFT), popularnie choć niezbyt poprawnie nazywane wolnymi rodnikami: anionorodnik ponadtlenkowy $O_2^{\bullet-}$, nadtlenek wodoru H_2O_2 oraz rodnik hydroksylowy $\bullet OH$.



Ryc. 6. Schemat redukcji cząsteczki tlenu (Bartosz 2003).

Rodnik jest atomem lub cząsteczką zdolną do samodzielnego istnienia, posiadającą jeden lub więcej niesparowanych elektronów. Kluczową cechą o dużym znaczeniu w biologii jest ich wysoka reaktywność, która determinuje oddziaływania ze strukturami komórkowymi. Mogą reagować z ważnymi elementami subkomórkowymi wywierając poważny wpływ na ich funkcjonowanie i tym samym cały organizm.

Jednoelektronowe reakcje redukcji tlenu mają miejsce w niektórych procesach fizjologicznych – głównie w oddychaniu mitochondrialnym i fagocytozie.

Równowagą dla RFT w komórkach są mechanizmy obronne, do których zaliczyć można: obecność przeciwutleniaczy i enzymatyczne układy unieszkodliwiania. Elementy tej ochrony to:

- Czynniki, które w sposób enzymatyczny usuwają wolne rodniki. Przykładami są: dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), peroksydaza glutationowa (GPx) czy katalaza (CAT).
- Białka minimalizujące dostępność pro-oksydantów (katalizatorów reakcji wolnorodnikowych) takich jak: żelazo, miedź czy hem. Przykładami są: transferyna, haptoglobiny i metalotioneina. Do tej kategorii można zaliczyć także ceruloplazminę – białko utleniające jony żelaza.
- Białka chroniące białczące przed zniszczeniem przez inne czynniki, np.: białka szoku termicznego.
- Niskocząsteczkowe substancje o właściwościach „zmiatania” wolnych rodników. Do grupy tej zalicza się między innymi: glutation, tokoferol i kwas askorbinowy, kwas moczowy oraz bilirubinę.

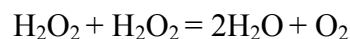
Antyoksydanty są to substancje, występujące w niskich stężeniach w porównaniu z substratem mającym ulec utlenianiu, które znacznie zmniejszają lub całkowicie zapobiegają utlenianiu.

Zaznaczyć trzeba, że wymienione antyoksydanty nie działają uniwersalnie w każdych okolicznościach. Mogą na przykład zapobiegać uszkodzeniom lipidów w danych warunkach stresu oksydacyjnego, lecz nie będą jednocześnie hamować utleniania białek.

Katalaza

Katalaza jest hemoproteiną, katalizującą reakcje:

- dysproporcjonowania H_2O_2



- utleniania innych substratów: metanolu, etanolu, mrówczanu oraz chinonów.

Aktywność tego enzymu jest zlokalizowana w większości narządów zwierząt, a największą aktywnością charakteryzuje się wątroba. Wysoką aktywność obserwuje się także w erytrocytach, gdzie spełnia funkcje ochronne przed H_2O_2 powstającym wskutek dysmutacji $O_2^{\cdot-}$ w trakcie autoutlenienia hemoglobiny. Szybka dyfuzja H_2O_2 , jej zdolność do przenikania przez błony erytrocytów sprawia, że katalaza krwinkowa może spełniać funkcje ochronne dla

całego organizmu. Enzym zlokalizowany jest w subkomórkowych strukturach zwanych peroksyosomami (Halliwell i Gutteridge 2003).

Glutation i inne tiole

Niskocząsteczkowy tripeptyd – glutation (GSH) oraz reszty sulfhydrylowe białek (głównie reszty –SH cysteiny) są jednymi z głównych elementów obrony antyoksydacyjnej. GSH występuje w cytoplazmie w stężeniach milimolowych i jest głównym rozpuszczalnym tiolem. Grupy tiolowe białek stanowią zarówno rozpuszczalną jak i związaną z błonami frakcję ogólnych tioli. Atom siarki w grupie sulfhydrylowej łatwo oddaje elektron, co powoduje jego wysoką reaktywność.

GSH jest substratem wielu reakcji enzymatycznych (GPx, GST, GR), wraz z GSSG – jego utlenioną formą, stanowi bufor tiolowy. Stan tego układu, mierzony stosunkiem stężeń GSH/GSSG, jest wskaźnikiem stresu oksydacyjnego.

Obecność mechanizmów ochrony przed RFT jest podstawą istnienia homeostazy w komórkach. Zachwianie równowagi poprzez stymulację produkcji RFT lub/i osłabienie ochrony antyoksydacyjnej prowadzi do stanu, który określa się mianem „stresu oksydacyjnego”.

Stres oksydacyjny to całokształt procesów biochemicznych, których przyczyną są wolne rodniki.

Istnieją dwie metody badania procesów wolnorodnikowych: bezpośrednia detekcja w materiale biologicznym lub określanie stopnia uszkodzeń struktur komórkowych. Pierwsza metoda nastęrcza trudności wynikających z reaktywności i ultrakrótkiego „życia” rodników, druga z kolei jest niespecyficzna a wyniki często trudne do interpretacji.

Wolne rodniki są pojęciem szerszym od RFT, bo obejmują także rodniki o innym charakterze: azotowe czy alkilowe. Nasilone procesy wolnorodnikowe mogą powodować uszkodzenia w strukturze komórki. W zasadzie wszystkie elementy komórki: lipidy, białka, kwasy nukleinowe czy węglowodany ulegają tego typu uszkodzeniom (Ryc. 7).

Lipidy ulegają pod wpływem RFT peroksydacji, która głównie dotyczy WNKT (wielonienasycone kwasy tłuszczowe) błon komórkowych i jest reakcją łańcuchową prowadzącą do wytworzenia nadtlenków kwasów tłuszczowych. W procesie peroksydacji jak w każdej reakcji wolnorodnikowej można wyróżnić etapy inicjacji, propagacji i terminacji. Powstałe w wyniku terminacji produkty w wyniku dalszych przemian (głównie β -eliminacji)

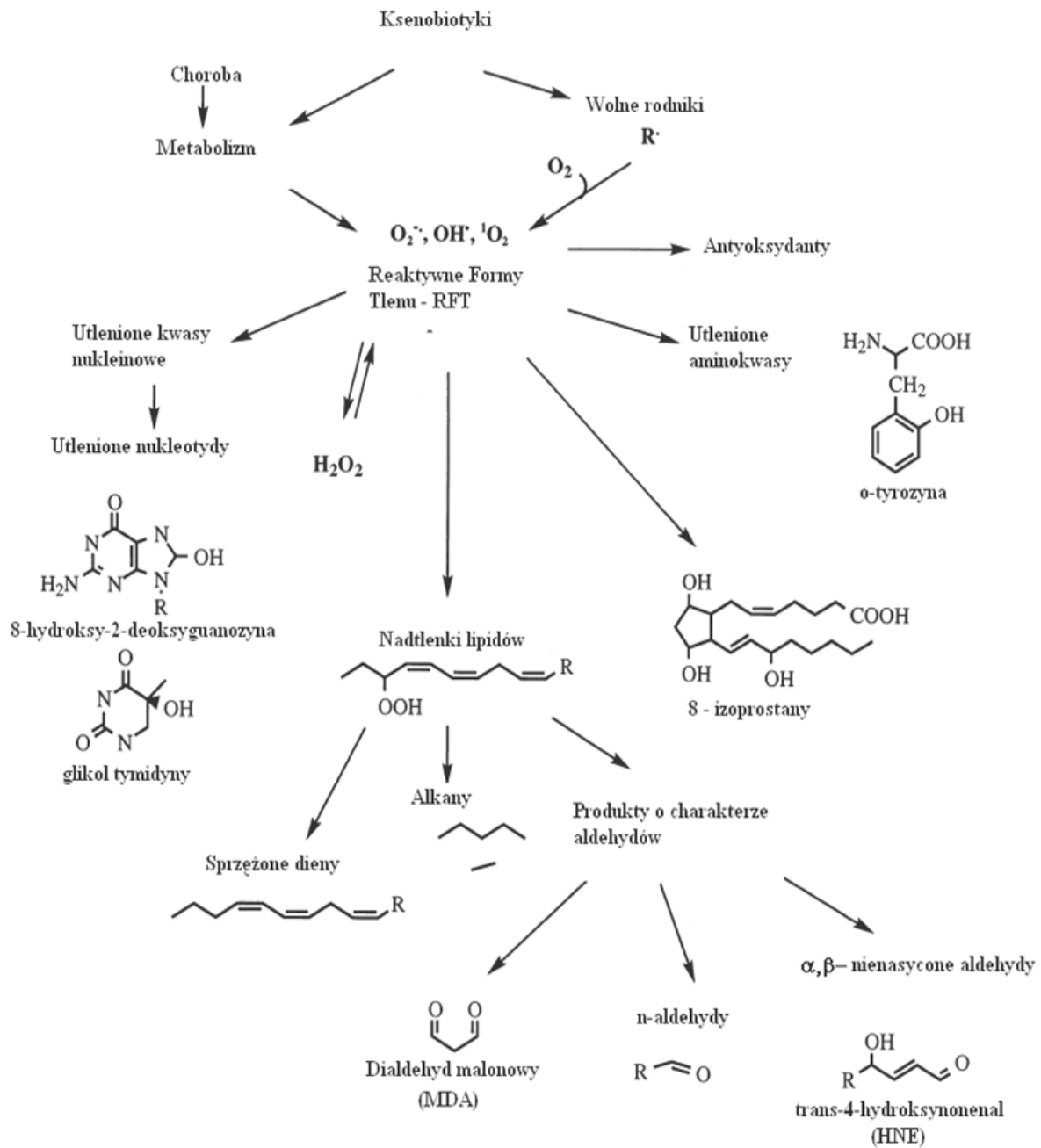
prowadzą do powstania kilku-, kilkunastowęglowych: aldehydów, hydroksyaldehydów, a także węglowodorów, jak etan czy pentan (Ryc. 7) (Bartosz 2003, de Zwart i in. 1999).

Spośród tych produktów największym zainteresowaniem badaczy cieszy się di aldehyd malonowy (MDA) i 4-hydroksynonenal (HNE). Aldehydy te mogą reagować z grupami tiolowymi i aminowymi białek, lipidów, aminocukrów i zasad azotowych, wchodzących w skład kwasów nukleinowych. Reaktywność MDA i innych produktów peroksydacji lipidów wykorzystano do oznaczeń ilościowych, kwas tiobarbiturowy (TBA) w kwaśnym środowisku tworzy z nimi różowy kompleks, który wykazuje maksimum absorpcji przy 532 nm lub fluorescencji przy 553 nm. Kompleks ten można również poddać ekstrakcji np. n-butanołem przed oznaczeniem kolorymetrycznym. Ze względu na małą wybiórczość tego testu, precyzyjniej jest określać oznaczane produkty peroksydacji lipidów jako substancje reagujące z kwasem tiobarbiturowym (TBARS).

Istnieje wiele modyfikacji tego najczęściej wykonywanego testu peroksydacji lipidów, z których najbardziej specyficzne opierają się na końcowej analizie metodą HPLC.

Produkty peroksydacji lipidów modyfikują też właściwości fizyczne błon komórkowych. Wprowadzenie polarnych grup nadtlenkowych, ketonowych czy aldehydowych do fosfolipidów wewnątrz błony obniża jej hydrofobowość jednocześnie zwiększając przepuszczalność dla substancji polarnych.

Peroksydacja lipidów jest uważana za jeden z głównych mechanizmów działania RFT na organizmy żywe.



Ryc. 7. Schemat oddziaływań RFT ze składnikami struktur komórkowych (de Zwart i in. 1999)

3.5 WPŁYW CPF I CM NA PARAMETRY WOLNORODNIKOWE – STAN BADAŃ

W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie badaniami stresu oksydacyjnego. Poszukuje się dotychczas nieznanymi mechanizmów działania ksenobiotyków.

Udowodniono, że uszkodzenia powodowane przez RFT są przyczynami wielu chorób: nowotworów, cukrzycy, arteriosklerozy, jaskry i in.. Prowadzono też badania nad tym w jaki sposób ekspozycja na pestycydy wpływa na produkcję RFT i ochronę antyoksydacyjną organizmu.

Dostępnych jest niewiele doniesień na temat udziału reaktywnych form tlenu w toksyczności syntetycznych piretroidów i insektycydów fosforoorganicznych. Opisanie badania przeprowadzono zarówno *in vivo* jak i *in vitro* na szczurach, myszach, królikach a także badano parametry stresu oksydacyjnego u ludzi narażonych zawodowo na kontakt z wymienionymi pestycydami (Prakasam i in. 2001).

Szczególny nacisk kładzie się na wpływ CPF na układ nerwowy, który jest szczególnie wrażliwy na uszkodzenia wolnorodnikowe, wskutek wysokiego zużycia tlenu, dużej zawartości lipidów oraz niskiego stężenia endogennych antyoksydantów w mózgu. Nasilenie produkcji RFT może być jedną z przyczyn uszkodzeń neuronów.

Wyniki uzyskane przez wielu autorów, często różnią się między sobą, co może wynikać z odmiennego sposobu dawkowania pestycydów, gatunku zwierząt czy stosowanych metod biochemicznych.

Chloropiryfos w doświadczeniu *in vitro* wzmagał peroksydację lipidów i powodował obniżenie aktywności katalazy w erytrocytach. Autorzy tego raportu stosowali stężenia CPF w zakresie 0,01-100 g/L. Mając na uwadze rozpuszczalność chloropiryfosu w wodzie (2 mg/L), wyniki tego eksperymentu nie wydają się miarodajne (Gultekin i in. 2000). Narażenie populacji generalnej na CPF, Lodovici i in. (1997) określili na 10 µg/kg m.c./dzień. Taką ilość insektycydu podawano szczurom wraz z paszą przez 10 dni i oznaczano stężenie 8OH₂dG w hepatocytach. Nie stwierdzono różnic pomiędzy grupą narażoną i kontrolną.

Goel i in. (2005) obserwowali u szczurów otrzymujących CPF w dawce dziennej 13,5 mg/kg m.c. przez 8 tygodni istotny wzrost stężenia produktów peroksydacji lipidów w wątrobie, a także wzrost aktywności SOD, GPx i GR, natomiast nastąpił spadek stężenia GSH oraz inhibicja aktywności CAT i GST.

Wzrost stężenia TBARS oraz zmniejszenie stosunku GSH/GSSG obserwowali Verma i Srivastava (2001) w mózgu szczurów otrzymujących chloropiryfos.

Ponadto przy narażeniu na inny insektycyd fosforoorganiczny – malation, u szczurów obserwowano wzrost stężenia TBARS w osoczu i ślinie (Abdollahi i in. 2004), a u ludzi zatrutych malationem spadek stężenia GSH w limfocytach (Seth i in. 2001).

Grajeda-Cota i in. (2004) w doświadczeniu *in vitro* badali wpływ kwasu askorbinowego na cytotoksyczność cypermetryny i metabolizm GSH w hepatocytach szczurów. W obecności CM stwierdzono istotny wzrost aktywności ASP i ALT, a także spadek aktywności GST i γ -GTP. Obecność kwasu askorbinowego znacznie zmniejszała rozmiar uszkodzeń powodowanych przez cypermetrynę.

Zbadano wpływ piretroidów: cypermetryny i permetryny na uszkodzenia limfocytarnego DNA u szczurów narażanych doustnie na wymienione insektycydy. Uszkodzenia DNA mogą m.in. wynikać z działania wolnych rodników na nici DNA. Metoda kometowa wykazała, że tylko permetryna w dawce 150 mg/kg m.c. podawana przez 60 dni powodowała wzrost wszystkich parametrów metody. CM nie powodowała takich skutków nawet przy dawce równej 10% LD₅₀ (25 mg/kg m.c.). Ponadto permetryna (300 mg/kg m.c.) istotnie obniżała aktywność CAT, natomiast nie powodowała zmian w aktywności SOD (Gabbianelli i in. 2004).

Nasuti i in. (2003) badali zachowanie m.in. SOD, CAT, GPx w błonach erytrocytów szczurów otrzymujących doustnie techniczną CM (62,8:37,2 *trans:cis*) w dawce niskiej 2,5 mg/kg m.c. (1/100 LD₅₀) i wysokiej 25 mg/kg m.c. oraz permetrynę w dawce niskiej 15 i wysokiej 150 mg/kg m.c. przez 60 dni. Miarą peroksydacji lipidów w tym doświadczeniu było stężenie sprzężonych dienów. Niskie dawki insektycydów nie powodowały indukcji peroksydacji lipidów, wysokie dawki z kolei istotnie zwiększały ilość sprzężonych dienów. Podobnie niskie dawki nie powodowały zmian aktywności: GPx, CAT czy SOD. Aktywność GPx ulegała obniżeniu tylko w grupie otrzymującej permetrynę, aktywność SOD i CAT ulegały podwyższeniu w obu grupach otrzymujących wyższe dawki insektycydów.

Wpływ technicznej cypermetryny (brak danych odnośnie składu izomerycznego) po podaniu dawki jednorazowej (170 mg/kg m.c.) lub wielokrotnej (75 mg/kg m.c. przez 5 dni) na peroksydację lipidów w mózgu i wątrobie zbadano w doświadczeniu na szczurach. We wszystkich grupach doświadczalnych obserwowano nasilenie peroksydacji lipidów w wątrobie oraz mózgu, z tym że w mózgu istotny wzrost widoczny był tylko w 4 godziny po podaniu jednorazowej dawki, a po upływie doby, nastąpił powrót do poziomu grupy

kontrolnej. Ponadto, obserwowano istotne statystycznie obniżenie poziomu GSH w wątrobie we wszystkich wariantach ekspozycji, w mózgu natomiast spadek GSH był znaczący 4 godziny po podaniu dawki 170 mg/kg m.c. CM nie wykazywała żadnego wpływu na aktywność GST. Suplementacja allopurinolem (inhibitor oksydazy ksantynowej) i witaminą E przed ekspozycją na CM powodowała spadek intensywności peroksydacji lipidów w wątrobie i mózgu (Giray i in. 2001).

4 CEL PRACY

Celem pracy było zbadanie interakcji chloropiryfosu i α -cypermetryny w fazie toksykokinetycznej oraz określenie wpływu pojedynczych substancji oraz ich mieszaniny na wybrane parametry stresu oksydacyjnego a także aktywność cholinoesterazy u szczurów.

Doboru dawek insektycydów dokonano w odniesieniu do danych literaturowych a także w oparciu o własne, wstępne doświadczenia. Założeniem było zastosowanie dawki zbliżonej do najniższej nie powodującej widocznych efektów szkodliwych (NOAEL) lub najniższej dawki powodującej słabe efekty toksyczne (LOAEL). Na podstawie prac Malaviya i in. (1993), Breslina i in. (1996) oraz Mosera (1995) dawki nie powodujące widocznych efektów toksycznych mieszczą się w zakresie 5-15 mg/kg m.c. w ekspozycji doustnej, podostrej zarówno dla chloropiryfosu jak i cypermetryny.

We wstępnym doświadczeniu wykazano, że zwierzęta dobrze znosiły dawki ok. 10% LD₅₀ obu pestycydów przez 14 dni (LD₅₀ dla CPF i CM to odpowiednio 145 i 250 mg/kg m.c.). Mając na uwadze wpływ chloropiryfosu na podwyższenie toksyczności cypermetryny, zastosowano dawki pojedynczych insektycydów wielkości 10 mg/kg m.c., natomiast w przypadku ekspozycji łącznej posłużono się zasadą sumowania LD₅₀ w mieszaninie stosując 5 mg/kg m.c. każdego z nich.

W doświadczeniu w pierwszej kolejności zbadano toksykokinetykę substancji we krwi po jednorazowej, dożołądkowej dawce zarówno pojedynczych związków jak i ich mieszaniny. W trakcie pierwszej, a także 13-tej i 27-mej doby doświadczenia prowadzono zbiórkę moczu w celu oceny wielkości wydalania głównych metabolitów insektycydów. We krwi, wątrobie oraz mózgu oznaczono stężenia niezmiennych insektycydów po 14 oraz 28 dniach ekspozycji celem sprawdzenia zdolności chloropiryfosu i cypermetryny do kumulacji materialnej. Mimo szybkiego metabolizmu obu ksenobiotyków i braku dowodów na istnienie zjawiska kumulacji materialnej w tkankach innych niż tłuszczowa, można przypuszczać że łączna ekspozycja będzie zwiększać retencję cypermetryny w organizmie. W konsekwencji takiego procesu mogłoby dojść do wywołania działania toksycznego przez nagromadzony insektycyd.

Jako miarę potencjalnego działania toksycznego wybrano dotychczas mało poznany w toksykologii pestycydów, ich wpływ na procesy wolnorodnikowe. Ze względu na istniejące dowody o działaniu odległym związków fosforoorganicznych na układ nerwowy (opóźnione

działanie neurotoksyczne) oraz nie w pełni wyjaśnione mechanizmy działania piretroidów, podjęto próbę połączenia tychże zagadnień w tej rozprawie.

Antycholinoesterazowy mechanizm działania chloropiryfosu jest dobrze poznany, aktywność zaś tego enzymu stanowi biochemiczny marker narażenia na związki fosforoorganiczne. Wpływ syntetycznych piretroidów na cholinoesterazę był już wielokrotnie badany, jednak wyniki doświadczeń są często sprzeczne, a badania przeprowadzono na różnych gatunkach zwierząt laboratoryjnych, z zastosowaniem różnych dawek i dróg podania cypermetryny o różnym składzie izomerycznym. Dlatego w obecnym doświadczeniu zbadano również wpływ ekspozycji badanych insektycydów na aktywność cholinoesterazy w osoczu i mózgu narażanych zwierząt.

4.1 METODYKA BADAŃ

4.1.1 Zwierzęta doświadczalne i opis ekspozycji

Do eksperymentu na zwierzętach przystąpiono po uzyskaniu pozytywnej opinii Lokalnej Komisji Etycznej nr 53/04 (załącznik nr 2).

Badania przeprowadzono na dwumiesięcznych szczurach, samcach szczepu Wistar o początkowej masie ok. 300 ± 5 g, pochodzących z jednolitej hodowli (Katedra i Zakład Toksykologii Akademii Medycznej w Poznaniu). Po 14 – dniowym okresie aklimatyzacji, zwierzęta podzielono na 4 grupy:

1. kontrolna - otrzymująca codziennie, dożołądkowo 0,5 ml oleju rzepakowego (18 sztuk)
2. CM - otrzymująca codziennie, dożołądkowo α -cypermetrynę w dawce 10 mg/kg masy ciała w 0,5 ml oleju rzepakowego (12 sztuk)
3. CPF - otrzymująca codziennie, dożołądkowo chloropiryfos w dawce 10 mg/kg masy ciała w 0,5 ml oleju rzepakowego (12 sztuk)
4. CMCPF - otrzymująca codziennie, dożołądkowo łącznie α -cypermetrynę oraz chloropiryfos w dawce po 5 mg/kg masy ciała w 0,5 ml oleju rzepakowego (12 sztuk)

Zwierzęta umieszczone były w klatkach po 6 sztuk w pomieszczeniu, w którym utrzymywano temperaturę 22-24 °C, wilgotność względną ok. 70%, z zachowaniem cyklu oświetlenia (dzień/noc) 12/12 godz. z nieograniczonym dostępem do wody pitnej oraz standardowej paszy bytowej dla zwierząt laboratoryjnych LABOFEED B (Wytwórnia Pasz, mgr inż. A. Morawski, Kcynia, Polska). Rozwory olejowe pestycydów sporządzano poprzez rozpuszczenie preparatów technicznych w jadalnym oleju rzepakowym. Korektę dawki uwzględniającą wzrost masy zwierząt wykonywano w cyklach tygodniowych. Szczury grupy kontrolnej otrzymywały przez cały czas trwania doświadczenia olej rzepakowy.

W dniu rozpoczęcia podawania insektycydów, 6 zwierząt kontrolnych poddano eutanazji, a w pozyskanych tkankach oznaczono wyjściowe parametry biochemiczne (grupa K 0).

Po podaniu pierwszej dawki pestycydów, 3 zwierzęta z każdej grupy doświadczalnej umieszczano w indywidualnych, szklanych klatkach metabolicznych (firmy SIMAX) i zbierano mocz po 12 i 24 godzinach od momentu podania. Zwierzęta miały nieograniczony

dostęp do wody. Rejestrowano objętość uzyskanego moczu, który następnie w polietylenowych pojemnikach zamrażano w temperaturze -20 °C do czasu analizy metabolitów. Stężenia metabolitów w próbkach moczu oznaczono metodą gradientowej wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem wielodiodowym, poprzedzoną hydrolizą kwaśną i ekstrakcją do fazy stałej.

W celu porównania kinetyki wchłaniania pestycydów i zbadania ich wpływu na aktywność ChE w osoczu, 3 zwierzętom, po 14 godzinnym odstawieniu paszy podano jednorazową dawkę pojedynczych związków (10 mg/kg m.c.) lub mieszaniny (po 5 mg/kg m.c.) i pobierano krew z żyły ogonowej po 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 12; 24 ; 48 oraz 96 godzinach.

13-go i 27-go dnia 6 zwierząt z każdej grupy umieszczano w klatkach metabolicznych firmy SIMAX na jedną dobę w celu zebrania moczu (mocz uzyskany od zwierząt kontrolnych wykorzystano do kalibracji metody oznaczania metabolitów oraz jako „próbki ślepe”). W tym czasie zwierzęta pozbawione były dostępu do paszy, natomiast do wody miały dostęp nieograniczony. Dnia 14-go i 28-go zwierzęta po przeniesieniu do klatek bytowych otrzymały ostatnią dawkę pestycydów i po 4 godzinach poddawano je eutanazji (uśmiercania dokonywano w lekkiej narkozie eterowej poprzez skrwawienie). Do badań pobierano krew z serca (na heparynę litową), wątrobę oraz mózg, które przemywano i umieszczano w izotonicznym NaCl w lodzie (nadmiar krwi oraz tkanek pochodzących od zwierząt kontrolnych wykorzystywano do kalibracji metod oznaczania niezmiennych pestycydów). Próbki tkanek homogenizowano w buforze KCl – TRIS – HCl¹ w szklanych homogenizatorach Pottera – Elvehjema, które także były umieszczone w trakcie homogenizacji w lodzie.

Próbki krwi pobierano do analizy pestycydów. Uzyskane 20% homogenaty oraz pozostałą krew wirowano przez 10 minut przy 3000 obr./min. w temperaturze 4°C, w supernatancie (frakcja postjądrowa) oraz osoczu oznaczano parametry biochemiczne.

W dniu sekcji przeprowadzono oznaczenia: stężeń TBARS i wolnych grup tiolowych, aktywność katalazy i cholinoesterazy oraz analizę niezmiennych pestycydów we krwi metodą GC-ECD.

¹ Bufor KCl-TRIS-HCl. Bufor TRIS-HCl sporządzono przez zmieszanie 121 g TRIS-u z 700 ml 2N HCl. Po ustaleniu pH = 7.4 roztwór uzupełniano wodą redestylowaną do 1000 ml i przechowywano w temp. 4°C; roztwór KCl-TRIS-HCl (środowisko), sporządzony *ex tempore* przez zmieszanie 10 ml 1M KCl z 1.32 ml r-ru TRIS-HCl i uzupełnienie do 66 ml wodą redestylowaną.

Pozostałe tkanki oraz mocz przechowywano w temperaturze -20°C do analizy związków macierzystych i metabolitów.

4.1.2 Oznaczanie pestycydów w tkankach

Zasada oznaczenia

Pestycydy z krwi ekstrahowano n-heksanem. Uzyskany ekstrakt, bez dalszego oczyszczania poddawano analizie chromatograficznej (GC-ECD). Z tkanek ekstrakcję analitów prowadzono z użyciem mieszaniny aceton – n-heksan (metoda Marei i in. 1982, w modyfikacji własnej). Uzyskany ekstrakt przemywano wodą i oczyszczano na kolumnach wypełnionych florisilem. Oznaczeń ilościowych dokonywano z użyciem GC-ECD.

Odczynniki:

- Chloropiryfos etylowy 99,3%, IPO Warszawa
- Chloropiryfos metylowy 99,6 ± 0,1%, IPO Warszawa
- α-Cypermetryna 99,1 ± 0,2%, IPO Warszawa
- Deltametryna > 99%, ROUSSEL UCLAF, Francja
- n- Heksan „Baker Ultra - Resi Analyzed”, J.T. Baker, Holandia
- Aceton „Baker Ultra - Resi Analyzed”, J.T. Baker, Holandia
- Eter dietylowy „Baker Ultra - Resi Analyzed”, J.T. Baker, USA
- Florisil 60-100 mesh, Fluka AG, Szwajcaria
- Siarczan sodowy bezwodny, POCh S.A.
- Azot N 5.6 badawczy, PRAXAIR

Aparatura:

- wirówka MPW-50, Mechanika Precyzyjna - Warszawa
- wirówka MPW-360 Mechanika Precyzyjna – Warszawa
- wytrząsarka uniwersalna typu 327, PREMEDI
- homogenizatory szklane, pojemności 10 ml
- mikrostrzykawka Hamilton, poj. 10 µl
- kolumny szklane, średnica wewnętrzna 3 mm, długość 20 cm

Krew

200 µl krwi umieszczano w probówce typu Eppendorf, dodawano 600 µl *n*-heksanu i poddawano ekstrakcji, wytrząsając w wytrząsarce laboratoryjnej przez 15 minut. Po odwirowaniu (13000 obr./min.), pobierano warstwę heksanową i 2 µl poddawano analizie chromatograficznej. Analizy ilościowej dokonywano na podstawie krzywej wzorcowej wykonanej poprzez ekstrakcję próbek krwi, pochodzących od szczurów nienarażanych, wzbogaconych w znane ilości CPF i CM w zakresie 10 – 500 ng/ml.

Tabela 1. Parametry walidacyjne metody oznaczania CM i CPF we krwi pełnej.

Analit	Zakres stężeń ng/ml	Liniowość r	LOQ ng/ml	Precyzja ^a %
CPF	5-500	0,9993	5	3,59
CM	10-500	0,9997	10	5,09

^a- liczba pomiarów 6, homogenna próbka pochodząca od narażanych zwierząt. Precyzja wyrażona jako: odchylenie standardowe x 100% / średnia

Tkanki

Odważano ok. 0,5 g wątroby lub 0,25 g mózgu (z dokładnością do 0,001) bezpośrednio do szklanego homogenizatora typu Pottera – Elvehjema (mózg przed odważeniem, w celu ujednoczenia próbki rozdrabniano przy użyciu nożyczek chirurgicznych), dodawano następnie 100 µl roztworów wzorców wewnętrznych (3 µg/ml chloropiryfosu metylowego i 3 µg/ml deltametryny, w *n*-heksanie) i homogenizowano w 5 ml mieszaniny *n*-heksan – aceton (1:1, v/v). Uzyskany ekstrakt przenoszono do szklanych fiolek, homogenizator zaś popłukiwano 5 ml mieszaniny *n*-heksan – aceton i łączono z ekstraktem. Po wymieszaniu 4 ml uzyskanego ekstraktu poddawano dwukrotnemu płukaniu 3 ml wody redestylowanej w probówkach szklanych. Pozostały po przemyciu wyciąg heksanowy zagęszczano do objętości mniejszej niż 1 ml, odparowując go w strumieniu powietrza.

Oczyszczanie na kolumnach wypełnionych florisilem.

Zagęszczone wyciągi heksanowe poddawano oczyszczaniu na kolumnach wypełnionych florisilem.

Przygotowanie florisilu oraz kolumn

florisil przed użyciem kondycjonowano przez 16 godz. w 140 °C, następnie po wystudzeniu w eksykatorze, dezaktywowano go dodatkiem 2% (v/w) wody redestylowanej, pozostawiając w szczelnie zamykanym, szklanym naczyniu na 2 godziny, mieszając co pewien czas.

Korzystano z kolumn szklanych, o średnicy wewnętrznej 3 mm i długości 20 cm, umieszczano w nich kolejno: watę szklaną, warstwę bezwodnego siarczanu sodowego, 2 g florisilu oraz drugą warstwę bezwodnego siarczanu sodowego. Przez tak przygotowane kolumny przepuszczano 5 ml heksanu a następnie próbkę. Anality eluowano 18 ml mieszaniny eter etylowy – heksan (1:9, v/v). Eluat odparowywano w strumieniu powietrza, pozostałość rozpuszczano w 500 µl n-heksanu i 2 µl poddawano analizie chromatograficznej.

W interpretacji ilościowej stosowano metodę wzorca wewnętrznego.

Sprzęt oraz warunki oznaczeń chromatograficznych.

Analiz dokonywano przy użyciu chromatografu gazowego Varian 3400 wyposażonego w detektor wychwyty elektronów (ECD) oraz sprzężony z komputerem PC posiadającym program VARIAN WORKSTATION wersja 4.5 do interpretacji danych chromatograficznych. Rozdziału analitów dokonano stosując kolumnę o następujących parametrach: VARIAN WCOT 25m*0,53 mm ID, coating CP-SIL 13CB, grubość filmu 1,0 µm.

Gaz nośny: azot, 5.6 N badawczy

Przepływ gazu nośnego: 7 ml/min

Doładowanie bazy detektora: 23 ml/min

Temperatura dozownika: 270°C

Temperatura kolumny: 140°C → 270°C (25°C/min) w ciągu 5,2 minut; przez następne 11 minut izotermicznie 270°C

Temperatura detektora: 300°C

Przesuw taśmy: 0,5 cm/min

Objętość próbki: 2 µl.

Czasy retencji:

4,59 min – chloropiryfos metylowy – CPFM (wzorzec wewnętrzny dla CPF),

4,91 min – chloropiryfos etylowy – CPF,

8,12 min – α-cypermetryna – CM,

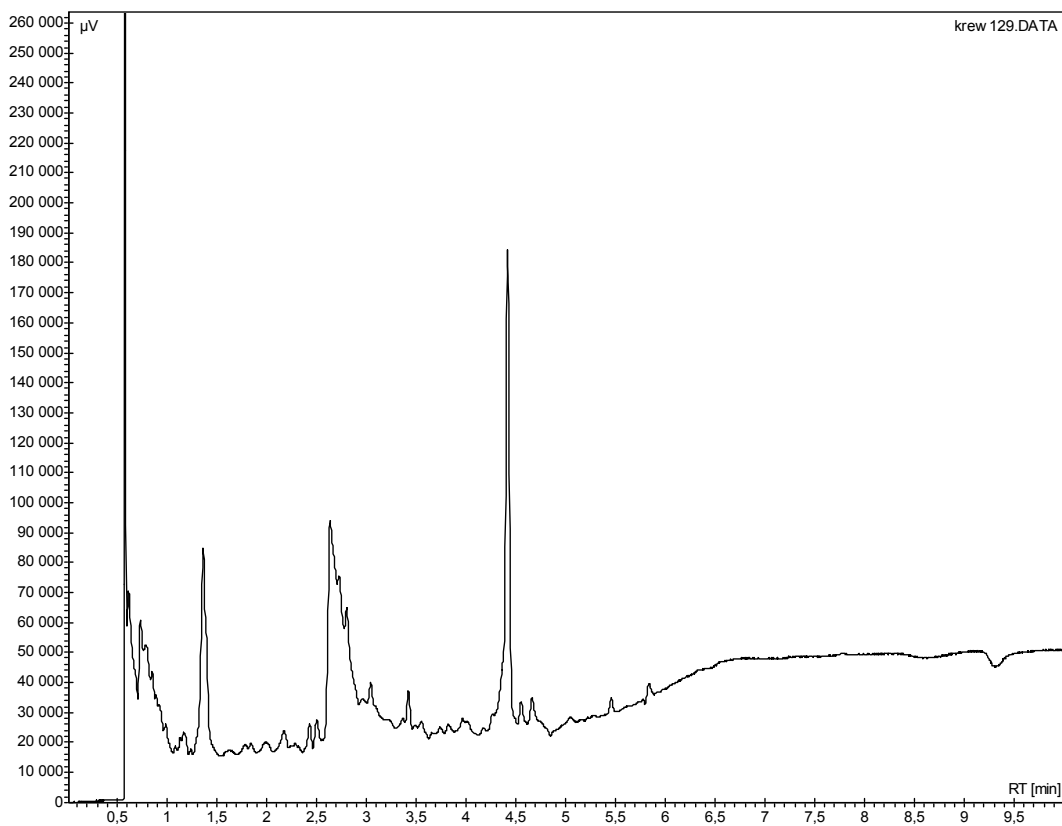
9,68 min – deltametryna – DEL (wzorzec wewnętrzny dla CM).

Całkowity czas analizy: 16,2 minuty.

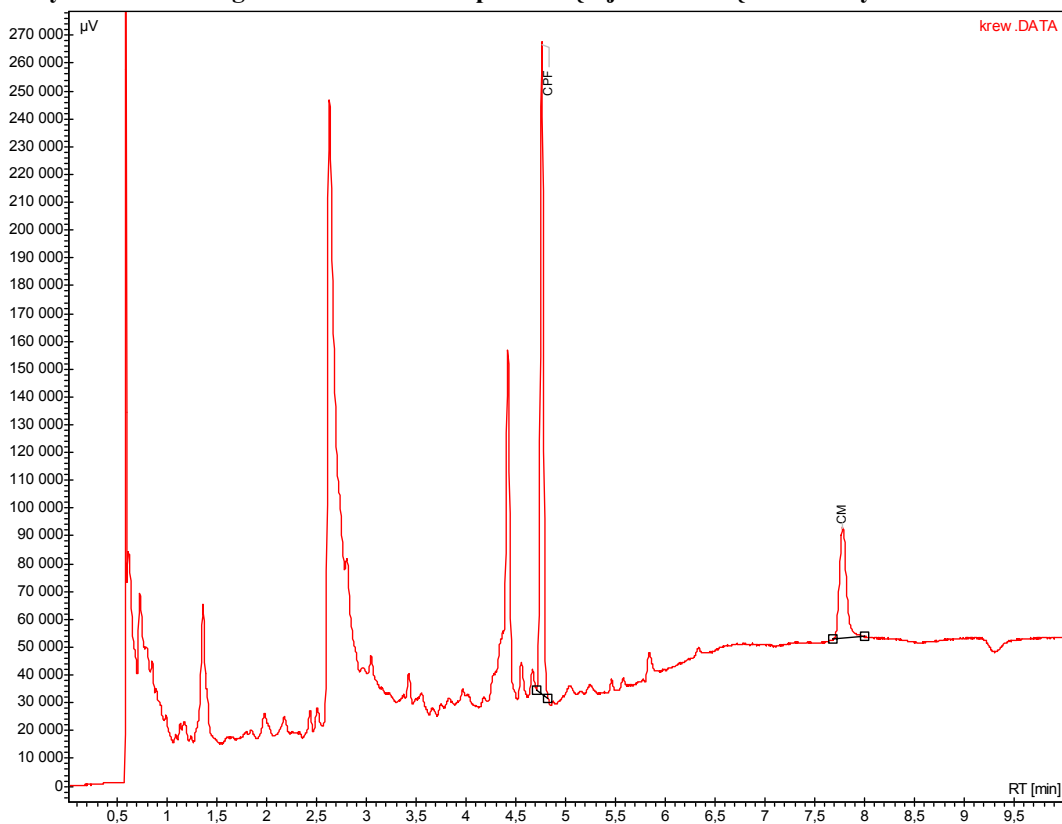
Tabela 2. Parametry walidacyjne dla oznaczeń CPF i CM w tkankach.

Analit	LOQ ng/g m.m.	Precyzja %	Odzysk %
CPF	2,5	2,81	99,3
CM	10	3,30	106,9

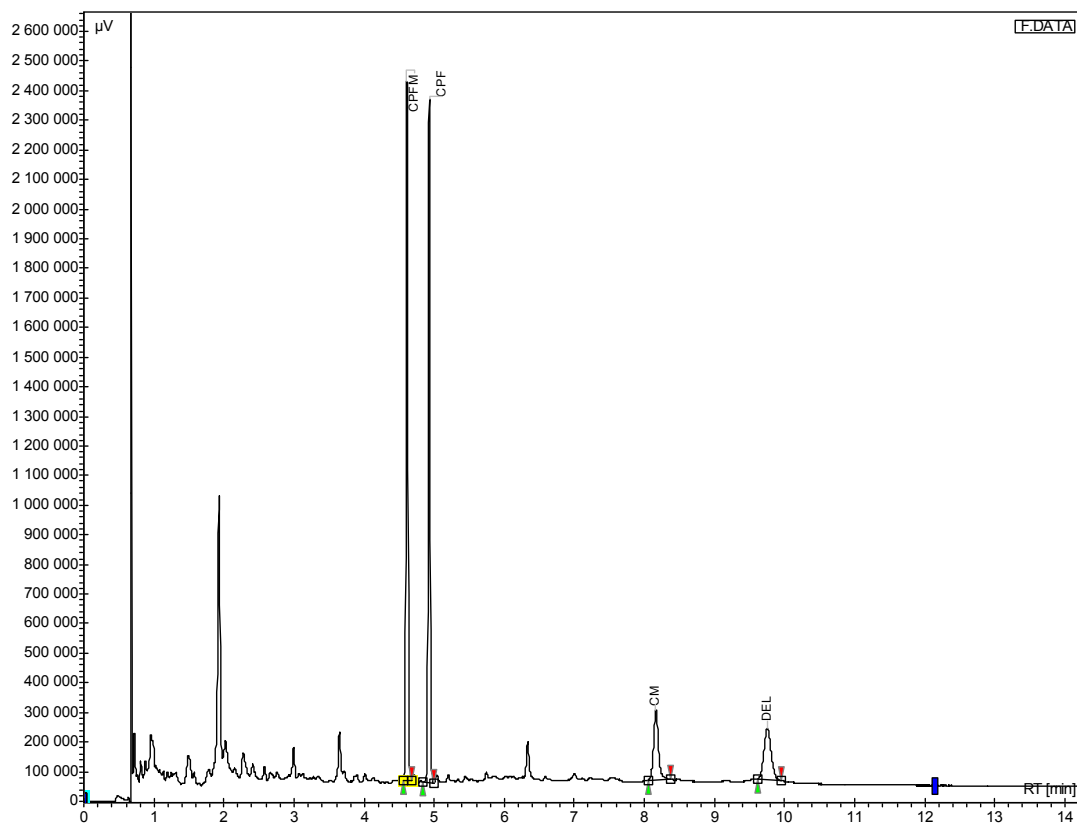
Odzysk względny, obliczany z wykorzystaniem średnich współczynników korekcyjnych.



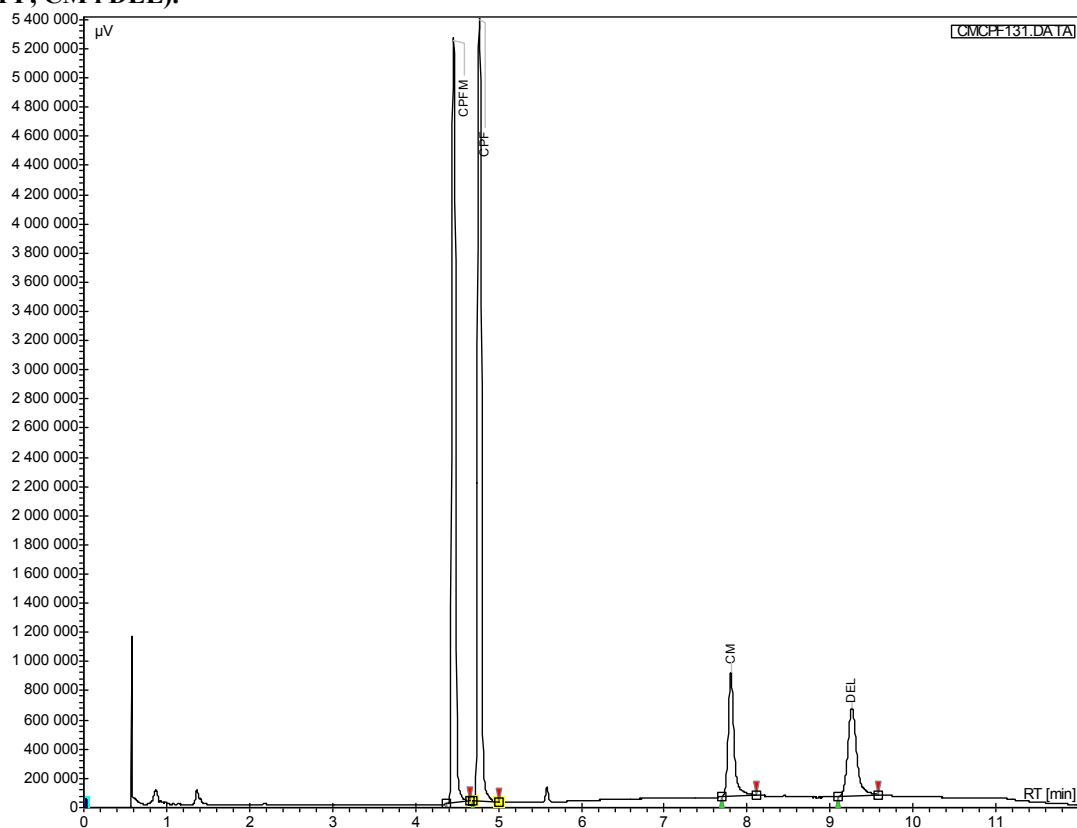
Ryc. 8. Chromatogram ekstraktu krwi pochodzącej od zwierząt kontrolnych.



Ryc. 9. Chromatogram ekstraktu krwi zwierząt otrzymujących CM i CPF.



Ryc. 10. Chromatogram próbki wątroby wzbogaconej równymi ilościami (1000 ng/g tkanki) wzorców (CPFM, CPF, CM i DEL).



Ryc. 11. Chromatogram próbki mózgu wzbogaconego równymi ilościami (1000 ng/g tkanki) wzorców (CPFM, CPF, CM i DEL)

4.1.3 Oznaczanie metabolitów w moczu

Do oznaczeń metabolitów zmodyfikowano metodę Abu-Quare i Abou-Donia (2001). Próbki moczu poddano hydrolizie kwaśnej w celu uwolnienia metabolitów z połączeń z kwasami glukuronowym i siarkowym. Następnie anality ekstrahowano do fazy stałej, po płukaniu złoża 20% roztworem ACN w celu usunięcia polarnych interferencji, metabolity wymywano ze złoża acetonitrylem do kolbek miarowych i uzupełniano do 10 ml. Ekstrakty analizowano przy użyciu gradientowej HPLC z detektorem wielodiodowym.

Kalibrację metody przeprowadzono poprzez wzbogacenie próbek moczu pochodzącego od zwierząt kontrolnych we wzrastające ilości substancji wzorcowych i poddanie ich procedurze analitycznej równoległe z próbkami o nieznanym stężeniu.

Odczynniki:

- Kwas solny, stężony – POCH S.A.
- Acetonitryl do HPLC (*gradient grade*) – POCH S.A.
- Kwas fosforowy, stężony – Riedel-de-Haën
- Woda oczyszczona Milli-Q, 18 M Ohm · cm
- 3,5,6-trichloro-2-pirydynol, Supelco (Bellefonte, USA)
- Kwas 4-hydroksy-3-fenoksybenzoesowy, Roussell-Uclaf (Paris, Francja)
- Kwas 3-fenoksybenzoesowy, Lancaster (Eastgate, Wielka Brytania)

Roztwory podstawowe substancji wzorcowych przygotowano w acetonitrylu w stężeniu 1 mg/ml i przechowywano w -20°C.

Przygotowanie próbek

Mocz rozmrażano, po starannym wymieszaniu pobierano próbkę i poddawano hydrolizie kwaśnej w celu uwolnienia metabolitów z połączeń z kwasem glukuronowym i siarkowym. Do 1 mL moczu dodawano 0,2 ml stężonego kwasu solnego i umieszczano szczelnie zamknięte fiolki szklane w suszarce laboratoryjnej na 90 minut w temperaturze 95 °C. Po ochłodzeniu, hydrolizat rozcieńczano wodą (1:1) i poddawano ekstrakcji do fazy stałej.

Ekstrakcja

Do ekstrakcji zastosowano zestaw Bakerbond 12-G, kolumny szklane pojemności 3 ml wypełniano 300 mg złoże Bakerbond C₁₈ PolarPlus. Kondycjonowano przepuszczając przez złoże 4 ml acetonitrylu a następnie 4 ml wody zakwaszonej kwasem fosforowym do pH 3, nanoszono 1,5 ml rozcieńczonego hydrolizatu, probówkę popłukiwano 1 ml wody (pH 3). Nie dopuszczając do wysuszenia złoże przemywano 4 ml 20% acetonitrylu w wodzie (pH 3). Następnie suszono złoże przepuszczając powietrze. Anality eluowano 2 ml acetonitrylu do 10 ml kolbek miarowych i uzupełniano do kreski wodą o pH 3. Krzywą wzorcową wykonywano poprzez analizę próbek moczu pochodzących od szczurów kontrolnych, wzbogaconych wzrastającymi stężeniami oznaczanych analitów.

Analiza HPLC - DAD

Aparatura.

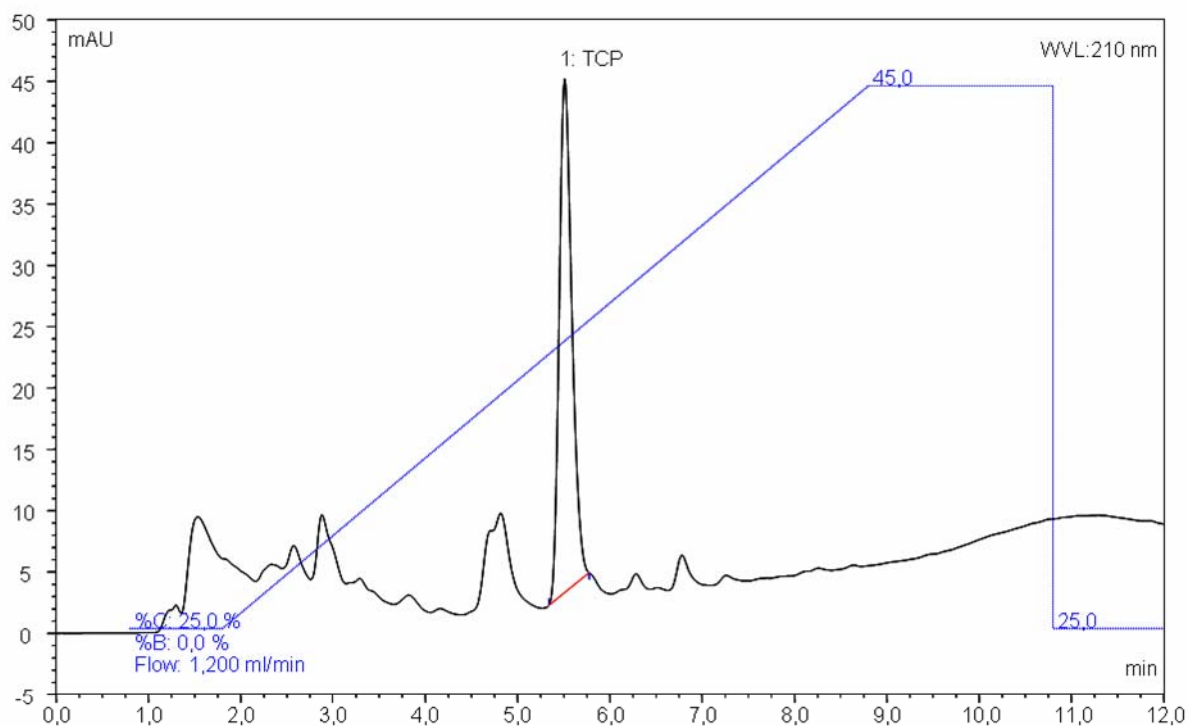
Użyto zestawu firmy DIONEX składającego się z: czterokanałowej, gradientowej pompy P580, termostatu kolumny STH 585, detektora z matrycą diodową UVD 340 S. Do obsługi aparatury oraz obróbki danych chromatograficznych użyto programu komputerowego Chromeleon wersja 6.2. Rozdział prowadzono w 40°C, przy prędkości przepływu fazy ruchomej 1,2 ml/min. Zastosowano kolumnę: C₁₈ TSKgel SuperODS (10 cm, 4.6 mm, 2 µm) firmy TosoHaas (Montgomeryville, USA). Fazę ruchomą stanowiły: A – woda zakwaszona kwasem fosforowym do pH 3 oraz B – acetonitryl.

Zastosowano elucję gradientową według programu: 0-1 min. – 25 % B, 1-8 min. – 25-45 % B, 8-10 min. – 45 % B, 10-12 min. – 25 % B.

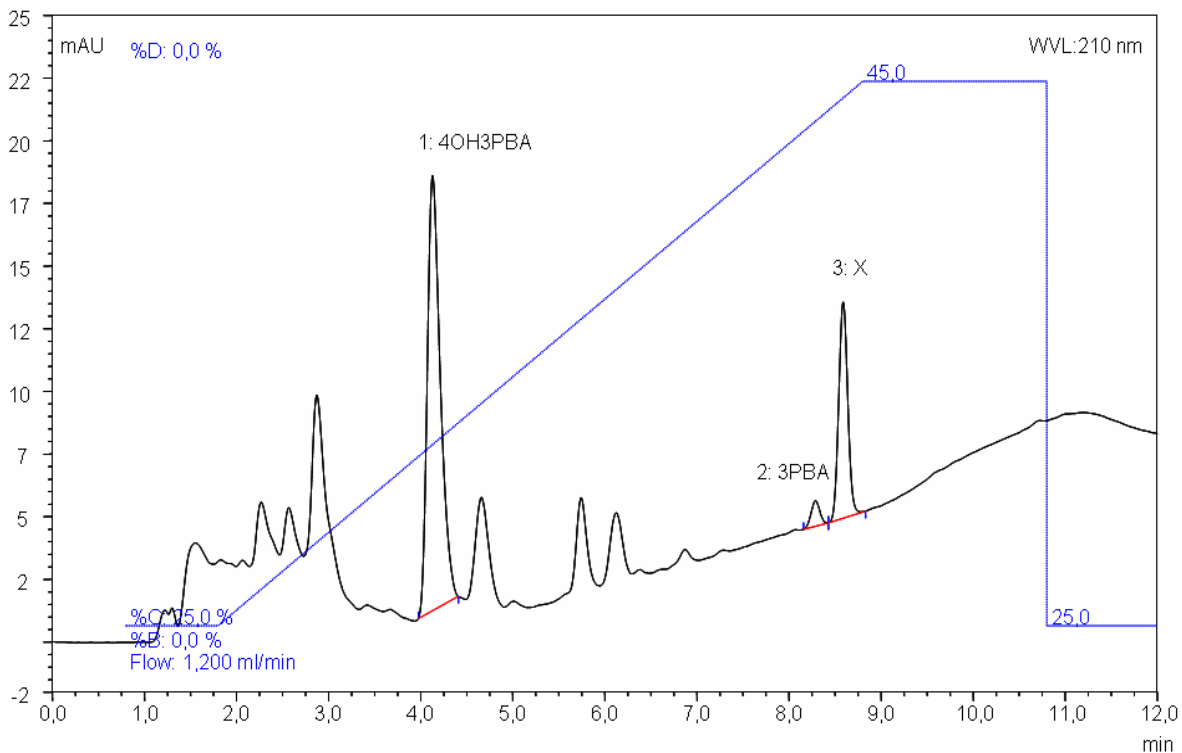
Nastrzykiwano 20 µl próbki.

Analizy ilościowej dokonywano w oparciu o chromatogramy uzyskane przy długości fali 210 nm.

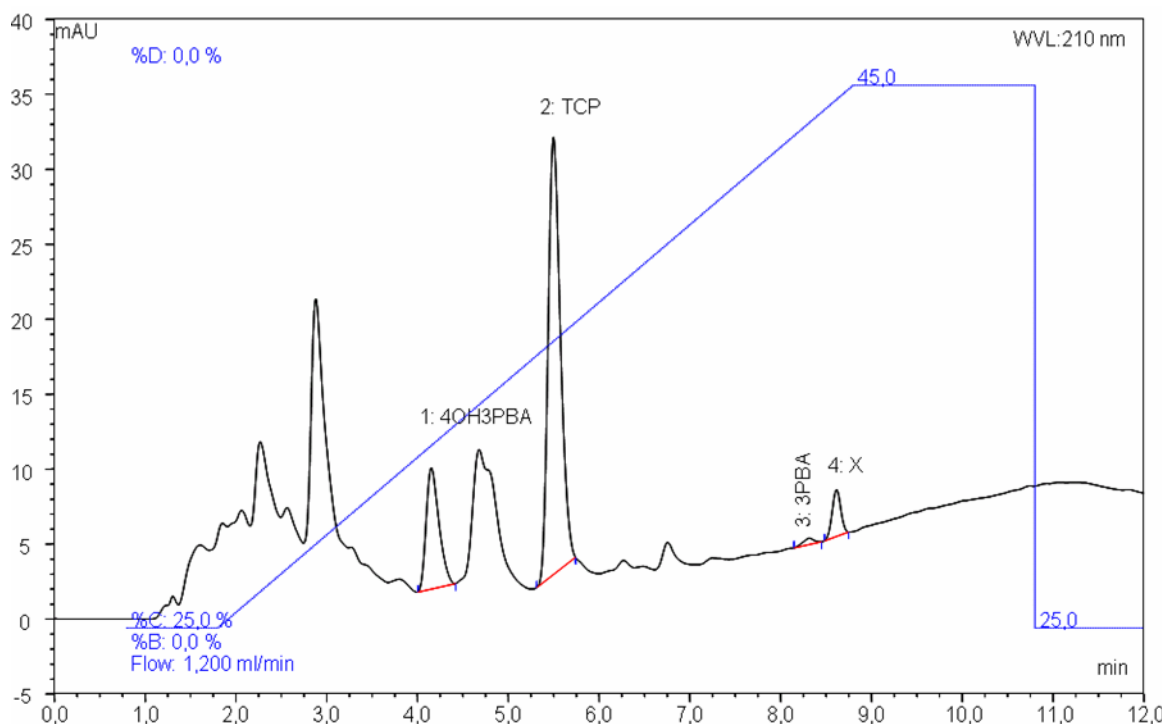
Identyfikacji pików chromatograficznych dokonywano w oparciu o zgodność czasów retencji i uzyskanych widm UV-Vis. Analizy ilościowej dokonywano na podstawie wielkości pól powierzchni pików. Wyniki przedstawiono jako ilość wydalonych metabolitów w przedziale czasowym oraz przeliczono je na równoważny procent podanej dawki związków macierzystych.



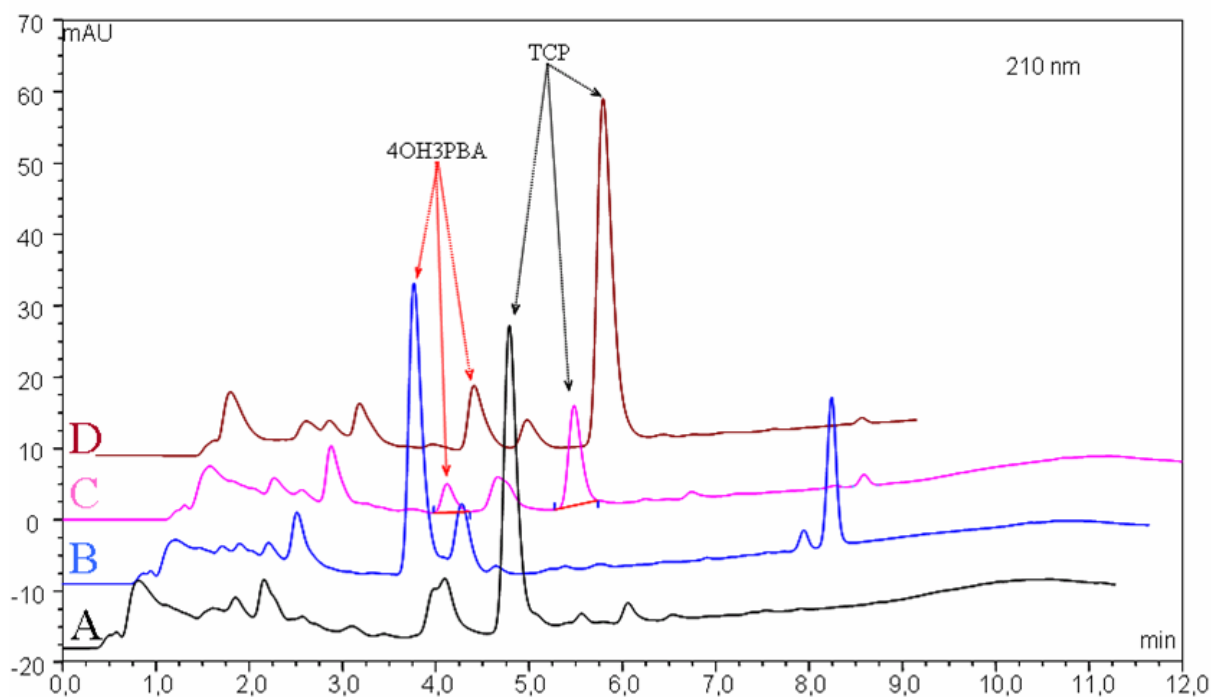
Ryc. 12. Chromatogram uzyskany z ekstraktu próbki moczu pochodzącego do zwierząt otrzymujących wyłącznie CPF.



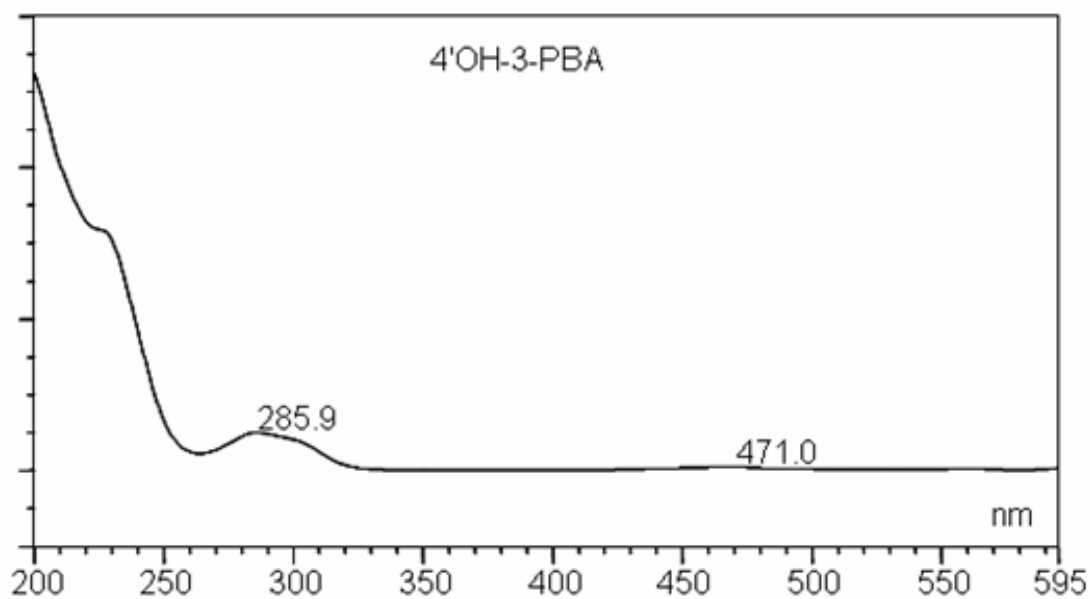
Ryc. 13. Chromatogram uzyskany z ekstraktu próbki moczu pochodzącego do zwierząt otrzymujących wyłącznie CM.



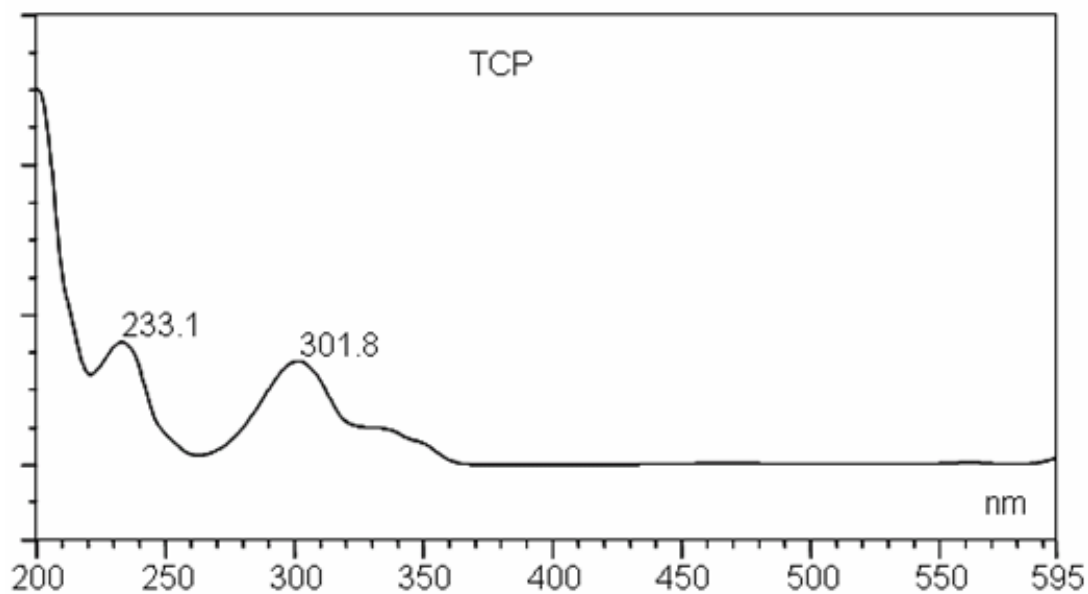
Ryc. 14. Chromatogram uzyskany z ekstraktu próbki moczu pochodzącego do zwierząt otrzymujących CM i CPF. (pik oznaczony numerem 4:X – niezidentyfikowany metabolit cypermetryny)



Ryc. 15. Porównanie chromatogramów. A – próbka pochodząca od zwierząt otrzymujących CPF; B – próbka pochodząca od zwierząt otrzymujących CM; C – próbka moczu pochodząca od zwierząt otrzymujących CM i CPF, D – próbka pochodząca od zwierząt kontrolnych wzbogacona dodatkiem wzorców.



Ryc. 16. Widmo UV-Vis 4OH3PBA.



Ryc. 17. Widmo UV-Vis TCP.

Tabela 3. Parametry walidacyjne metody oznaczania metabolitów: TCP i 4OH3PBA w moczu.

Analit	Zakres stężeń μg/ml	Liniowość r	LOQ μg/ml	Precyzja %
TCP	10 - 90	0,9999	1	1,4
4OH3PBA	0,5 - 50	0,9998	0,5	8,3

4.1.4 Oznaczanie stężenia grup tiolowych metodą Sedlaka i Lindsaya (1968)

Zasada oznaczenia

Kwas 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoesowy) reaguje z grupami tiolowymi (-SH) białek. Produkt tej reakcji, żółty anion 5-tio-2-nitrobenzoesowy jest miarą liczby tych grup w badanym materiale. Anion ten wykazuje maksimum absorpcji przy $\lambda = 412$ nm.

Odczynniki

- Bufor fosforanowy 10 mM, pH 8 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$),
- Kwas 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoesowy) (DTNB) – 10mM roztwór w buforze,
- 10% roztwór SDS w metanolu.

Wykonanie

Do: 100 μl osocza,

100 μl homogenatu mózgu,

100 μl rozcieńczonego (1:4) homogenatu wątroby, dodawano 600 μl 10% SDS a następnie po wymieszaniu 2 ml buforu fosforanowego pH 8 oraz 300 μl 10mM DTNB i po 15 minutach odczytywano wartość absorbancji przy 412 nm wobec próby ślepej. Wyniki obliczano na podstawie milimolowego współczynnika absorpcji dla jonu 5-tio-2-nitrobenzoesowego, który wynosi $13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ l cm}^{-1}$.

Wyniki przedstawiono w mM lub $\mu\text{M/g}$ białka.

Precyzja 6 oznaczeń jednorodnej próbki wyniosła: 1,99%.

4.1.5 Oznaczanie stężenia TBARS w osoczu i tkankach wg Rice-Evans (1991)

Zasada oznaczenia

W metodzie tej, dokonuje się pomiaru absorbancji barwnego (różowego) kompleksu, produktu reakcji kwasu tiobarbiturowego z MDA oraz innymi aldehydami, przy $\lambda = 532$ nm.

Odczynniki

- 2 % roztwór etanolowy BHT
- 40 % roztwór TCA
- 5 M roztwór kwasu solnego
- 2 % roztwór TBA, sporządzony przez rozpuszczenie 2 g TBA w ok. 70 ml wody redestylowanej, alkalizację wodorotlenkiem sodu do pH 10 ÷ 14 i uzupełnienie do 100 ml wodą redestylowaną;

Wykonanie

Odmierzano 300 μ l materiału biologicznego (osocze, homogenat tkankowy) i uzupełniano do 1970 μ l środowiskiem KCl – TRIS – HCl. Następnie kolejno dodawano, za każdym razem starannie mieszając:

- 30 μ l 2 % etanolowego roztworu BHT
- 500 μ l 40 % TCA
- 250 μ l 5 M HCl
- 500 μ l 2 % TBA.

W sposób analogiczny wykonywano krzywą wzorcową, zastępując materiał biologiczny odpowiednią objętością 5 μ M roztworu tetrametoksypropanu w zakresie 0,5 – 1,5 nM na próbkę.

Po starannym wymieszaniu, próbki umieszczano we wrzącej łaźni wodnej na 20 minut. Po odwirowaniu przy 3000 obr./min., dokonywano pomiaru absorbancji supernatantów przy użyciu 1 cm kuwety szklanej wobec próby ślepej.

Wyniki przedstawiono jako nM/mg białka.

Precyzja metody wyznaczona na podstawie 6 pomiarów jednorodnej próbki osocza wyniosła: 5%.

4.1.6 Oznaczanie aktywności katalazy metodą spektrofotometryczną wg Aebi (1984)

Zasada oznaczenia

Katalaza rozkłada nadtlenek wodoru, który absorbuje promieniowanie UV ($\lambda=240$ nm). Spadek absorbancji w czasie jest miarą aktywności enzymu.

Odczynniki

- Bufor fosforanowy pH 7,0:
 - 2,817 g KH_2PO_4 rozpuszczano w 500 ml wody redestylowanej
 - 7,828 g Na_2HPO_4 rozpuszczano w 500 ml wody redestylowanejUzyskane roztwory mieszano ze sobą do osiągnięcia pH 7, a następnie uzupełniano wodą redestylowaną do objętości 1L.
- 30 mM nadtlenek wodoru w buforze fosforanowym pH 7
 - 340 μL 30% H_2O_2 uzupełniano w kobie miarowej do objętości 100 ml buforem
- 1% roztwór Tritonu X-100 w buforze fosforanowym
- 0,9% roztwór NaCl

Krwinki

Pełną krew wirowano przy 3000 obr./min przez 10 minut. Osocze i białe krwinki odrzucano, a krwinki czerwone płukano trzykrotnie równą objętością 0,9% NaCl. 100 μl krwinek hemolizowano w 400 μl wody redestylowanej w probówkach typu Eppendorf. Hemolizat rozcieńczano 500-krotnie buforem fosforanowym o pH 7. Do analizy pobierano po 2 ml rozcieńczonego hemolizatu i 1 ml roztworu H_2O_2 (30 mM) w buforze fosforanowym o pH 7. Spadek absorbancji mierzono w ciągu 30 s w kuwecie kwarcowej o grubości 1 cm, przy długości fali $\lambda = 240$ nm.

Wątroba

0,5 ml homogenatu rozcieńczano równą ilością roztworu Tritonu X-100 (1%) w buforze fosforanowym o pH 7, tak otrzymany homogenat rozcieńczano 500-krotnie buforem fosforanowym o pH 7. Do analizy pobierano po 2 ml rozcieńczonego homogenatu i dodawano 1 ml roztworu H_2O_2 (30 mM) w buforze fosforanowym o pH 7.

Warunki oznaczenia jak w przypadku krwinek.

Precyzję oznaczeń aktywności katalazy wyznaczono na podstawie sześciu pomiarów jednorodnych próbek pochodzących z tego samego materiału. W ten sposób wyliczona precyzja wyniosła: 5,4%.

4.1.7 Oznaczanie aktywności cholinoesterazy metodą Ellmana i in. (1961)

Zasada oznaczenia

Cholinoesteraza hydrolizuje jodek acetylotiocholiny do tiocholiny i octanu. Tiocholina reaguje z kwasem 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoesowym) (DTNB) tworząc żółty anion 5-tio-2-nitrobenzoesowy, którego stężenie jest mierzone przy $\lambda = 412$ nm.

Odczynniki

- 0,05 M bufor fosforanowy o pH 7,9
- roztwór DTNB w 0,05M buforze fosforanowym o pH 7,9
- 0,156 M wodny roztwór ATChI

Aparatura

- spektrofotometr, Spekol 11 C. Zeiss
- termostat blokowy TBU-1, Cabrolab Electronic
- ultratermostat

Wykonanie oznaczenia

Do próbki szklanej odmierzano 3 ml DTNB w buforze fosforanowym, dodawano 20 μ l osocza lub homogenatu mózgu i inkubowano w 37 °C. Po inkubacji dodawano 100 μ l ATChI i dokonywano pomiaru kinetycznego w ciągu 2 minut, przy $\lambda = 412$ nm. Wykonywano także pomiar nieenzymatycznego rozkładu ATChI, w próbce zawierającej DTNB oraz substrat w nieobecności próbki. Wyniki oznaczeń w materiale biologicznym pomniejszono o wartość nieenzymatycznego rozkładu.

Pomiar prowadzony był w kuwetach 1 cm w termostatowanej przystawce w 37°C.

Aktywność enzymu wyrażono jako ilość μ moli substratu rozłożonego w ciągu minuty przez enzym zawarty w 1L osocza lub 1g tkanki.

W każdej serii oznaczeń dokonywano pomiaru aktywności ChE w certyfikowanym materiale odniesienia (Validate A, Organon –Teknika), co stanowiło kontrolę jakości oznaczeń.

Precyzja wyznaczona na podstawie 6 pomiarów jednorodnej próbki osocza wyniosła: 5,1%

4.1.8 Oznaczanie stężenia białka

Do oznaczania zawartości białka w materiale biologicznym zastosowano metodę Lowry'ego i in. (1951) z wołową albuminą surowiczą jako wzorcem.

5 WYNIKI I OPRACOWANIE STATYSTYCZNE

Rezultaty badań przedstawiono w tabelach oraz w postaci graficznej.

W tabelach liczba pomiarów dla każdej średniej, o ile nie zaznaczono inaczej, wynosi 6. Oceny statystycznej dokonano na podstawie porównania średnich pomiędzy grupami doświadczalnymi za pomocą testu istotności t-studenta poprzedzonego testem jednorodności wariancji F.

Do obliczeń i tworzenia wykresów stosowano programy komputerowe: Microsoft Office Excel 2003[®] Microsoft oraz Statistica 7.1, StatSoft Polska.

Przyjęto następujące oznaczenia i poziomy istotności:

n.s. – brak różnicy statystycznej

* - $p < 0,05$

** - $p < 0,02$

*** - $p < 0,01$

**** - $p < 0,001$

Legenda do wykresów:

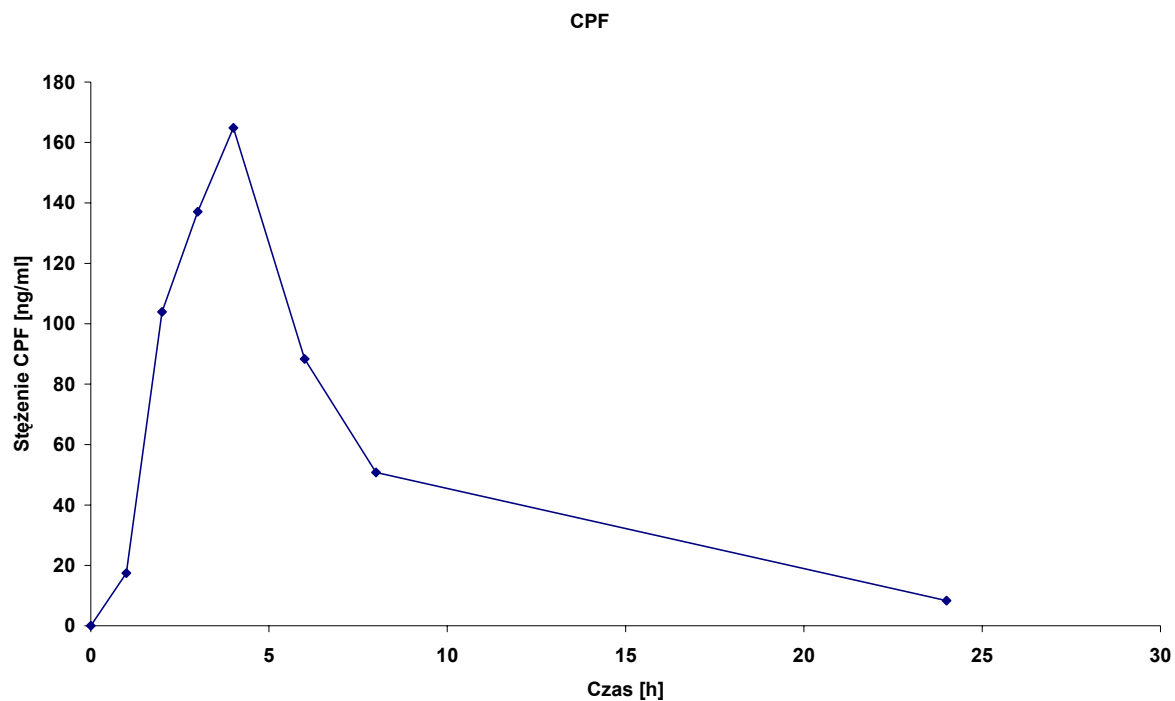
□ - średnia

▭ - błąd standardowy

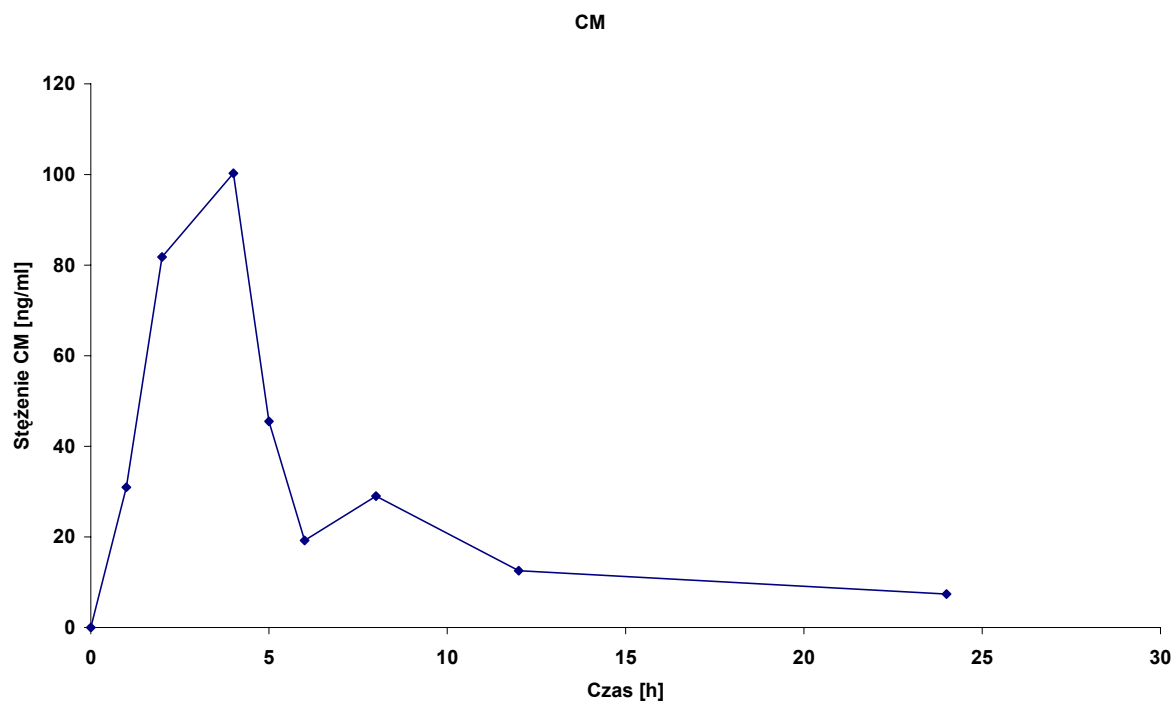
⊥ - odchylenie standardowe

Tabela 4. Wybrane parametry toksykokinetyczne po podaniu jednorazowej dawki insektycydów oraz ich mieszaniny.

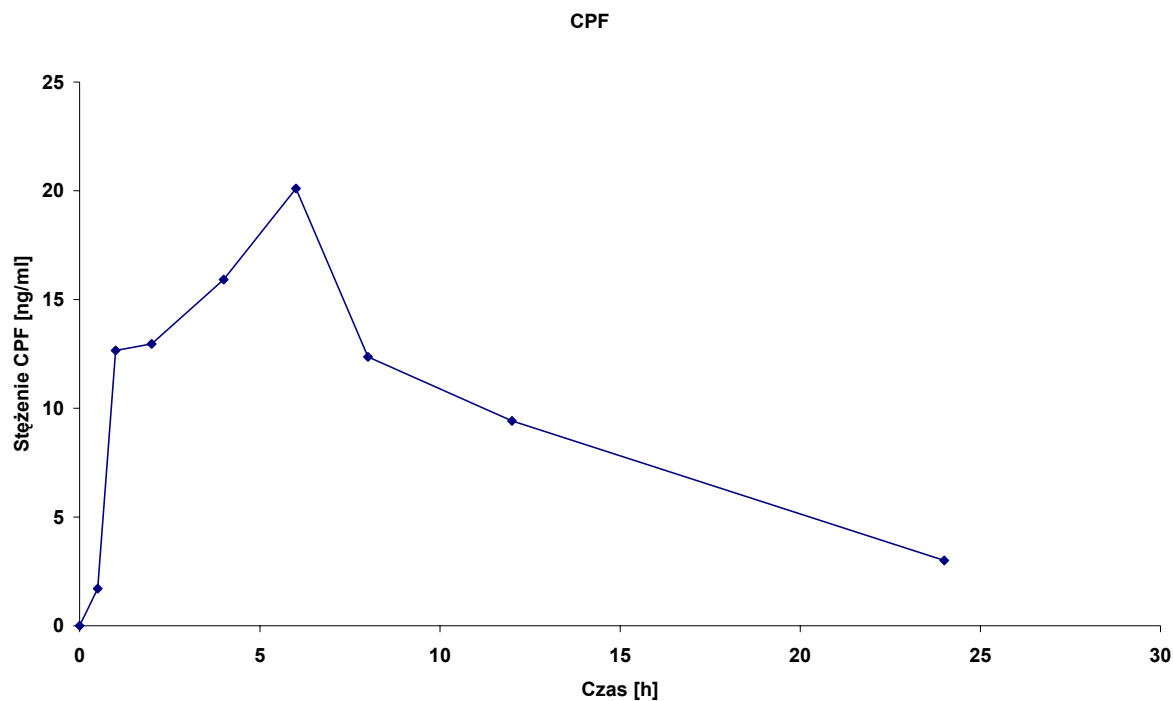
Parametr	CM 10 mg/kg m.c.	CPF 10 mg/kg m.c.	CMCPF 5 mg/kg m.c.	
			<i>CM</i>	<i>CPF</i>
T _{max} . (h)	3	4	6	6
C _{max} . (ng ml ⁻¹)	123,9±8,92	164,9±9,34	347,1±43,3	17,3±3,3
AUC _{total} (h ng ml ⁻¹)	671,9±42,1	1164,1±84,7	1553,5±184,2	163,6±26,9



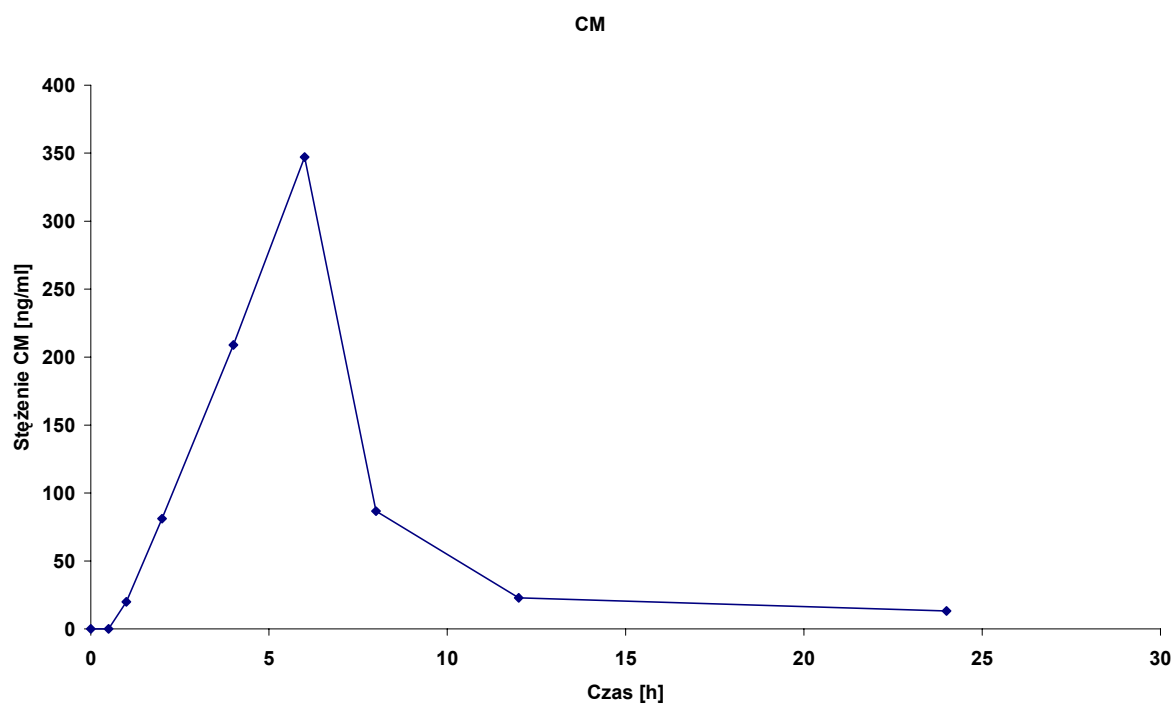
Ryc. 18. Wykres zależności pomiędzy stężeniem CPF we krwi a czasem po podaniu insektycydu w dawce 10 mg/kg m.c.



Ryc. 19. Wykres zależności pomiędzy stężeniem CM we krwi a czasem po podaniu insektycydu w dawce 10 mg/kg m.c.



Ryc. 20. Wykres zależności pomiędzy stężeniem CPF we krwi a czasem po podaniu jednorazowej dawki zawierającej po 5 mg/kg m.c. CPF i CM.



Ryc. 21. Wykres zależności pomiędzy stężeniem CM we krwi a czasem po podaniu jednorazowej dawki zawierającej po 5 mg/kg m.c. CM i CPF.

Tabela 5. Stężenia pestycydów w badanych tkankach.

Grupa zwierząt		Krew (ng/ml)		Wątroba (ng/g)		Mózg (ng/g)	
		<i>CM</i>	<i>CPF</i>	<i>CM</i>	<i>CPF</i>	<i>CM</i>	<i>CPF</i>
CM	14 dni	168,2±84,4	-	144,5±73,0	-	109,1±37,2	-
	28 dni	287,3±142,6	-	273,0±99,7	-	198,0± 64,5	-
CPF	14 dni	-	68,9±12,5	-	1053,6±736,0	-	345,7±275,2
	28 dni	-	59,8±60,5	-	1044,8±932,7	-	272,6±277,9
CM/CPF	14 dni	250,2±92,3	18,2±7,5	342,8±143,6	250,7±48,1	53,2±15,1	78,5±30,7
	28 dni	154,9±31,4	14,4±7,6	631,9±283,3	195,8±110,3	128,3±29,2	75,3±69,0

Wyniki podane w tabeli są wyrażone jako średnia wartość sześciu oznaczeń ± odchylenie standardowe.

Tabela 6. Wydalanie metabolitów z moczem.

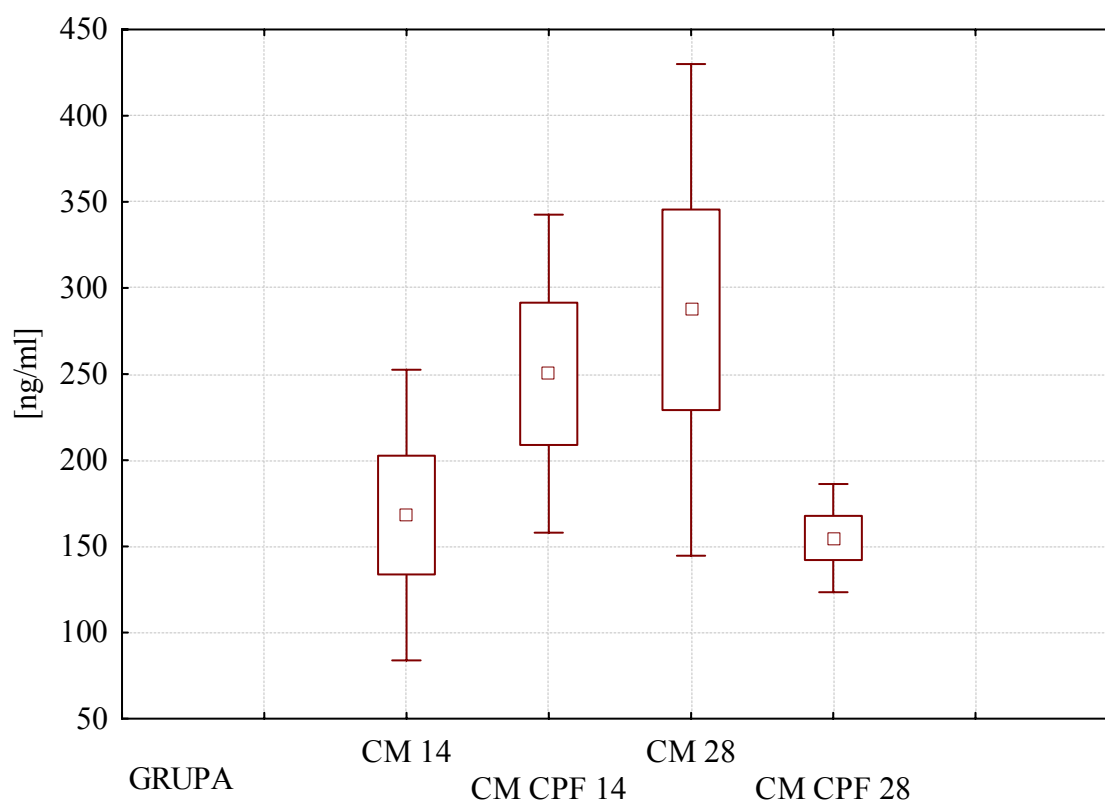
Grupa	Ilość dawek	Próbka moczu (h)	Wydalanie metabolitów (stężenie) i (całkowita ilość)				Ilość wydalonych metabolitów jako (%) podanej dawki związku macierzystego ^a	
			<i>4OH3PBA</i>		<i>TCP</i>		<i>CM</i> ^a	<i>CPF</i>
			($\mu\text{g/ml}$)	(μg)	($\mu\text{g/ml}$)	(μg)		
CM	1	0-12	31,94	187,22	-	-	24,39	-
		12-24	22,29	233,34	-	-	30,40	-
	13	0-24	28,09	416,57	-	-	46,52	-
	27	0-24	53,14	788,06	-	-	88,01	-
CPF	1	0-12	-	-	113,44	499,15	-	29,34
		12-24	-	-	59,88	467,09	-	27,46
	13	0-24	-	-	70,20	1041,07	-	52,45
	27	0-24	-	-	81,40	1207,16	-	60,82
CMCPF	1	0-12	2,20	9,85	36,17	161,70	1,28	19,00
		12-24	4,06	46,67	32,44	373,01	6,08	43,85
	13	0-24	5,00	74,15	27,60	409,31	8,28	41,25
	27	0-24	7,35	109,00	41,70	618,41	12,17	62,32

Wyniki przedstawiają wartości średnie z 3 pomiarów

^a – odzysk związków macierzystych obliczono na podstawie ilości wydalonych głównych metabolitów: 4OH3PBA i TCP

Tabela 7. Statystyczne porównanie zawartości CM we krwi.

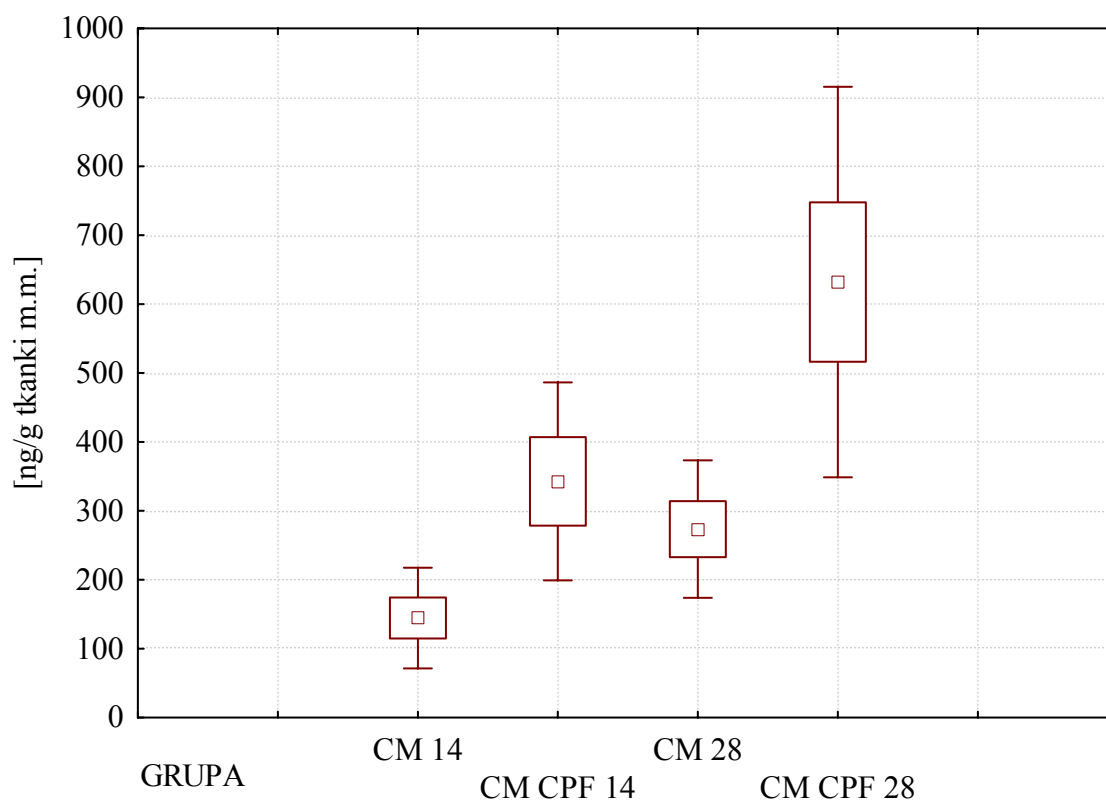
KREW stężenie ng/ml $\bar{X} \pm SD$	CM 14 168,2 ± 84,4	CMCPF 14 250,2 ± 92,3	CM 28 287,3 ± 142,6	CMCPF 28 154,9 ± 31,4
CM 14 168,2 ± 84,4	-----	n.s.	n.s.	n.s.
CMCPF 14 250,2 ± 92,3	n.s.	-----	n.s.	p < 0,05
CM 28 287,3 ± 142,6	n.s.	n.s.	-----	n.s.
CMCPF 28 154,9 ± 31,4	n.s.	p < 0,05	n.s.	-----



Ryc. 22. Zawartość CM we krwi.

Tabela 8. Statystyczne porównanie zawartości CM w wątrobie.

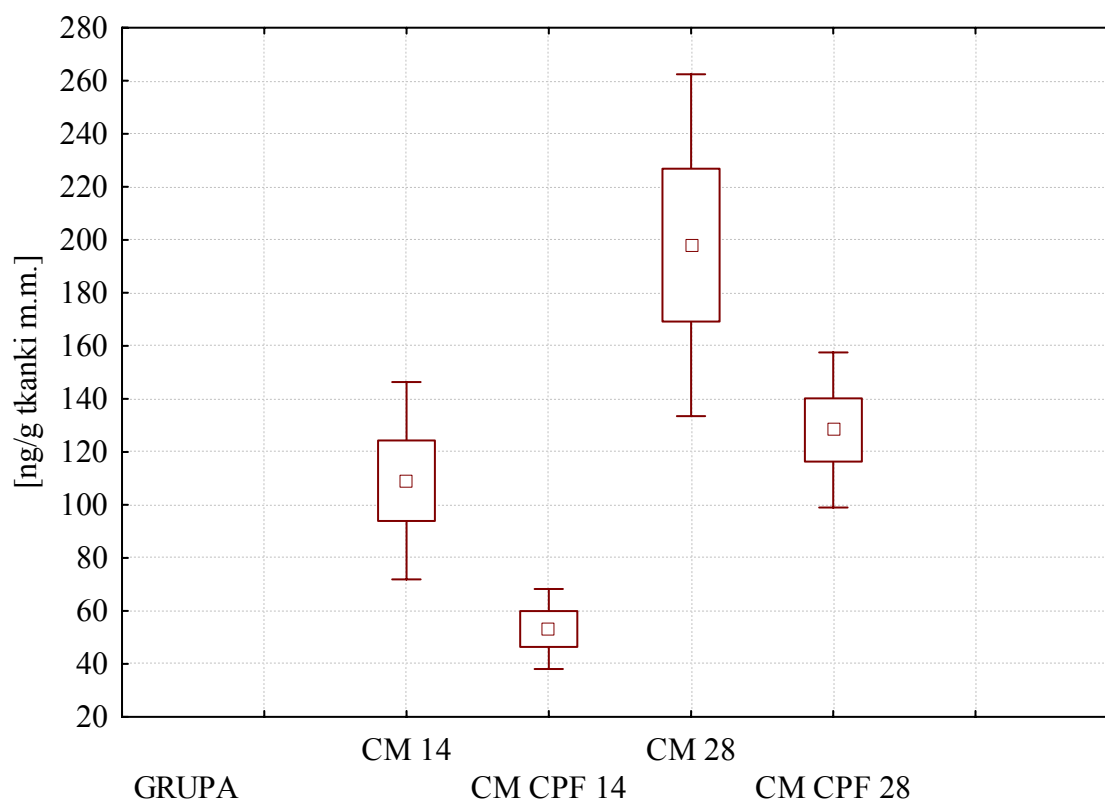
WĄTROBA stężenie ng/g m.m. $\bar{X} \pm SD$	CM 14 144,5 ± 73	CMCPF 14 342,8 ± 143,6	CM 28 273 ± 99,7	CMCPF 28 631,9 ± 283,3
CM 14 144,5 ± 73	-----	p < 0,02	p < 0,05	p < 0,01
CMCPF 14 342,8 ± 143,6	p < 0,02	-----	n.s.	p < 0,05
CM 28 273 ± 99,7	p < 0,05	n.s.	-----	p < 0,02
CMCPF 28 631,9 ± 283,3	p < 0,01	p < 0,05	p < 0,02	-----



Ryc. 23. Zawartość CM w wątrobie.

Tabela 9. Statystyczne porównanie zawartości CM w mózgu.

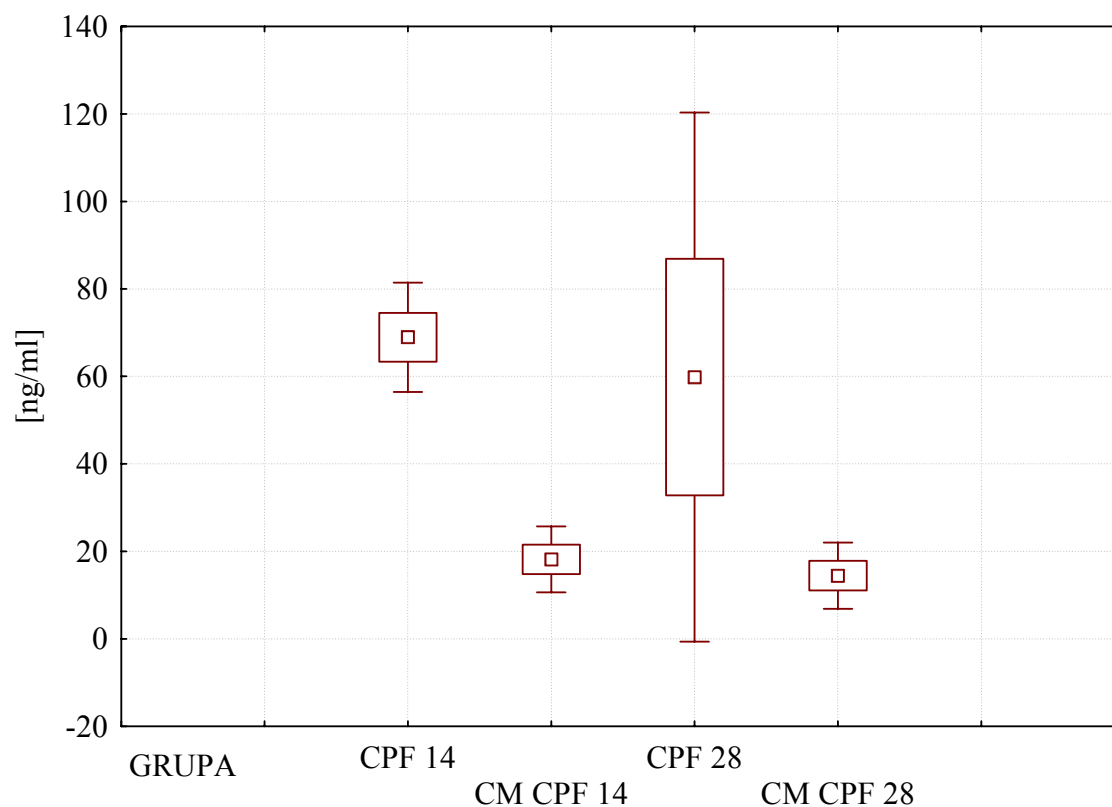
MÓZG stężenie ng/g m.m. $\bar{X} \pm SD$	CM 14 109,1 ± 37,2	CMCPF 14 53,2 ± 15,1	CM 28 198,0 ± 64,5	CMCPF 28 128,3 ± 29,2
CM 14 109,1 ± 37,2	-----	p < 0,01	p < 0,05	n.s.
CMCPF 14 53,2 ± 15,1	p < 0,01	-----	p < 0,001	p < 0,001
CM 28 198,0 ± 64,5	p < 0,05	p < 0,001	-----	p < 0,05
CMCPF 28 128,3 ± 29,2	n.s.	p < 0,001	p < 0,05	-----



Ryc. 24. Zawartość CM w mózgu.

Tabela 10. Statystyczne porównanie zawartości CPF we krwi.

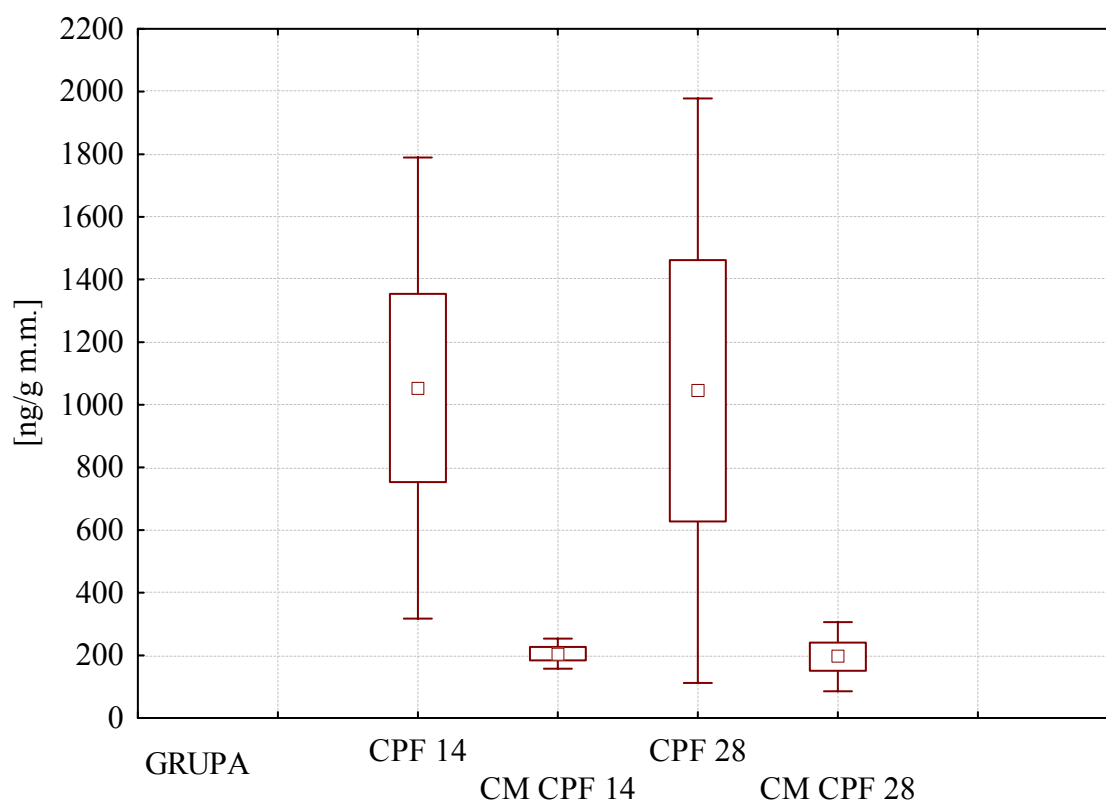
KREW stężenie ng/ml $\bar{X} \pm SD$	CPF 14 68,9 ± 12,5	CMCPF 14 18,2 ± 7,5	CPF 28 59,8 ± 60,5	CMCPF 28 14,4 ± 7,57
CPF 14 68,9 ± 12,5	-----	p < 0,001	n.s.	p < 0,001
CMCPF 14 18,2 ± 7,5	p < 0,001	-----	n.s.	n.s.
CPF 28 59,8 ± 60,5	n.s.	n.s.	-----	n.s.
CMCPF 28 14,4 ± 7,57	p < 0,001	n.s.	n.s.	-----



Ryc. 25. Zawartość CPF we krwi.

Tabela 11. Statystyczne porównanie zawartości CPF w wątrobie.

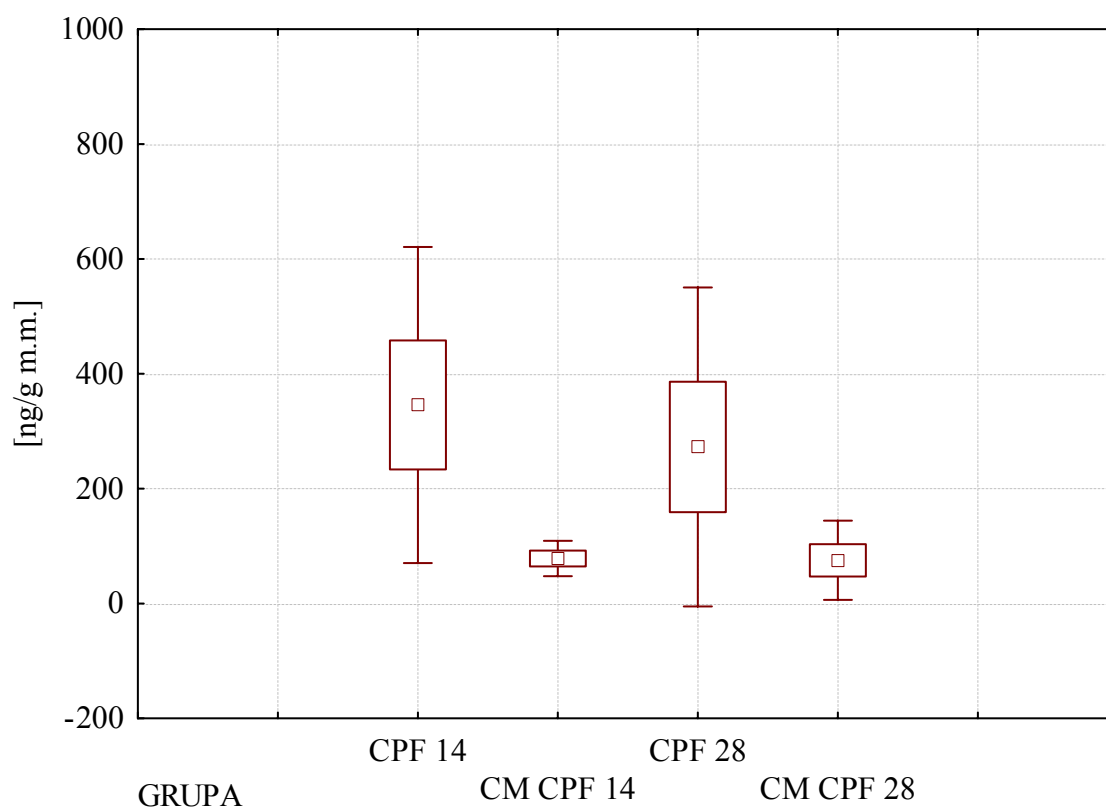
WĄTROBA stężenie ng/g m.m. $\bar{X} \pm SD$	CPF 14 1053,6 ± 736	CMCPF 14 250,2 ± 92,3	CPF 28 1044,8 ± 932,7	CMCPF 28 195,8 ± 110,3
CPF 14 1053,6 ± 736	-----	p < 0,05	n.s.	p < 0,02
CMCPF 14 250,2 ± 92,3	p < 0,05	-----	n.s.	n.s.
CPF 28 1044,8 ± 932,7	n.s.	n.s.	-----	n.s.
CMCPF 28 195,8 ± 110,3	p < 0,02	n.s.	n.s.	-----



Ryc. 26. Zawartość CPF w wątrobie.

Tabela 12. Statystyczne porównanie zawartości CPF w mózgu.

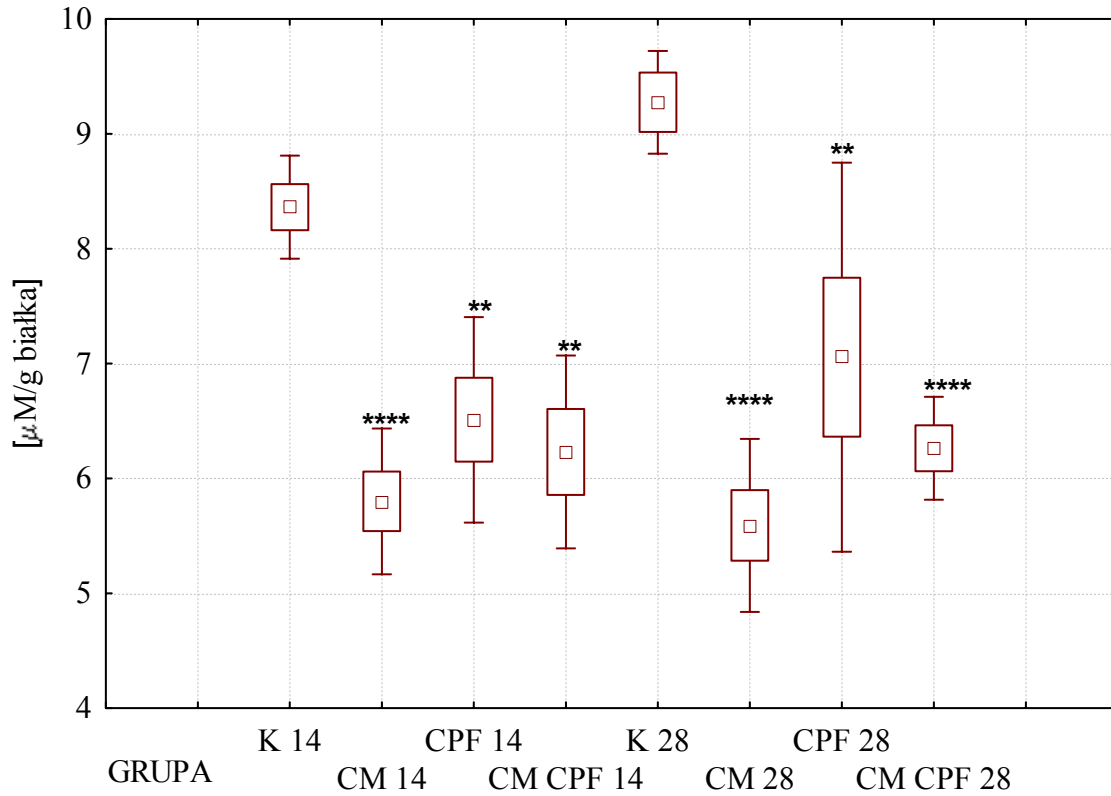
MÓZG stężenie ng/g m.m. $\bar{X} \pm SD$	CPF 14 345,7 ± 275,2	CMCPF 14 78,5 ± 30,7	CPF 28 272,6 ± 277,9	CMCPF 28 75,3 ± 69,0
CPF 14 345,7 ± 275,2	-----	p < 0,05	n.s.	p < 0,05
CMCPF 14 78,5 ± 30,7	p < 0,05	-----	n.s.	n.s.
CPF 28 272,6 ± 277,9	n.s.	n.s.	-----	n.s.
CMCPF 28 75,3 ± 69,0	p < 0,05	n.s.	n.s.	-----



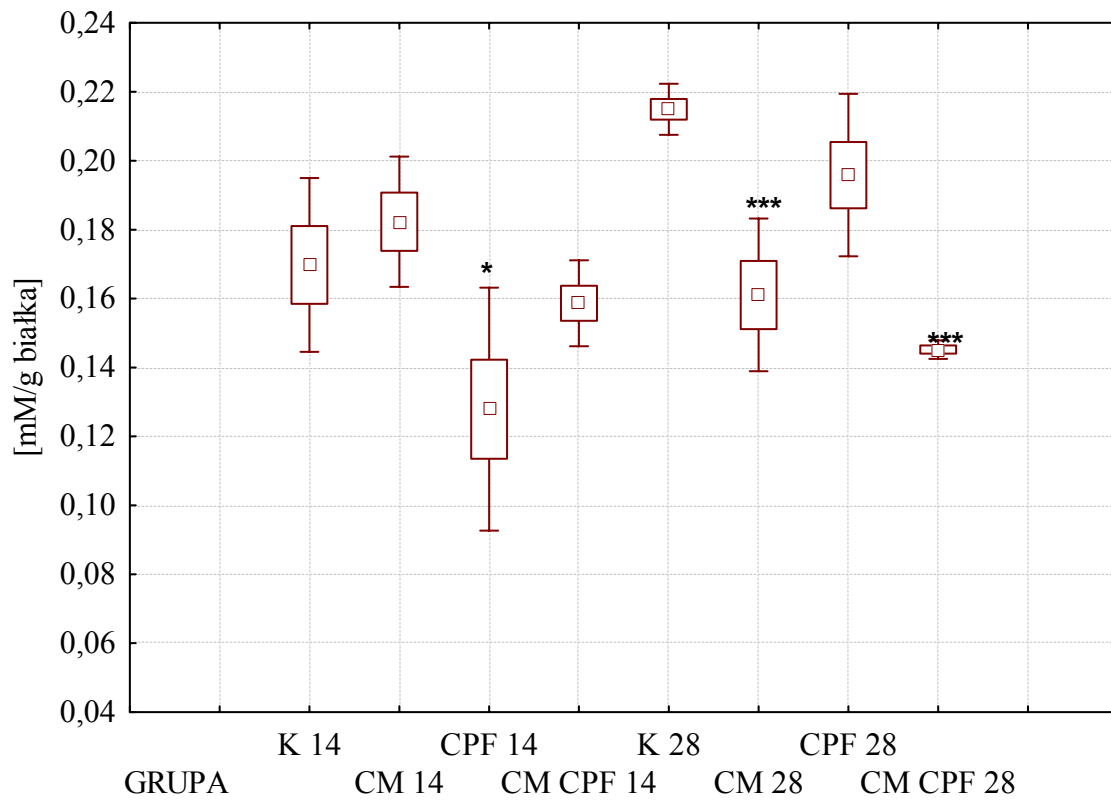
Ryc. 27. Zawartość CPF w mózgu.

Tabela 13. Stężenie grup tiolowych w badanych tkankach.

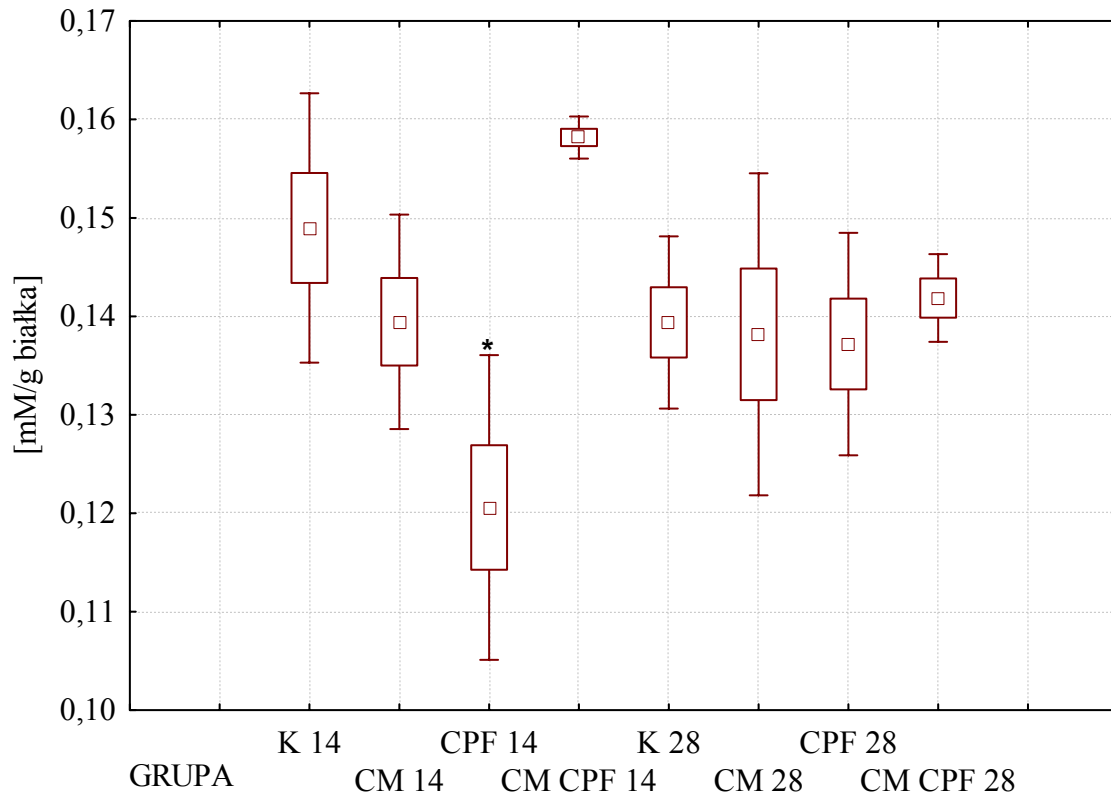
Tkanka	Grupa zwierząt	Czas ekspozycji (w dniach)		
		0	14	28
osocze [μM/g białka]	K	8,245 ± 0,288	8,362 ± 0,448	9,455 ± 0,400
	CM		5,801 ± 0,635 ****	5,591 ± 0,753 ****
	CPF		6,511 ± 0,894 ***	7,055 ± 1,694 **
	CMCPF		6,231 ± 0,839 ***	6,260 ± 0,450 ****
wątroba [mM/g białka]	K	0,149 ± 0,028	0,170 ± 0,025	0,216 ± 0,007
	CM		0,182 ± 0,018	0,161 ± 0,026 ***
	CPF		0,128 ± 0,035 *	0,191 ± 0,023
	CMCPF		0,159 ± 0,012	0,145 ± 0,003 ****
mózg [mM/g białka]	K	0,142 ± 0,015	0,149 ± 0,014	0,139 ± 0,009
	CM		0,139 ± 0,011	0,138 ± 0,016
	CPF		0,121 ± 0,015 ***	0,138 ± 0,011
	CMCPF		0,158 ± 0,002	0,142 ± 0,005



Ryc. 28. Stężenie grup tiolowych w osoczu.



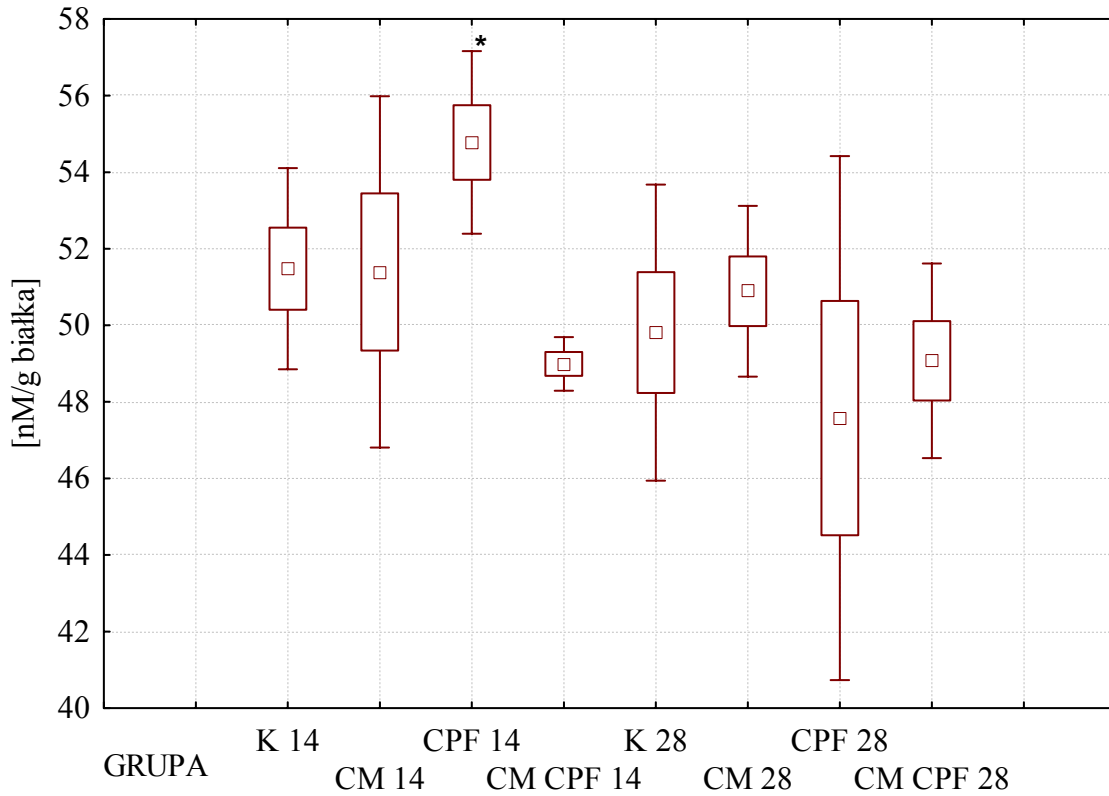
Ryc. 29. Stężenie grup tiolowych w wątrobie.



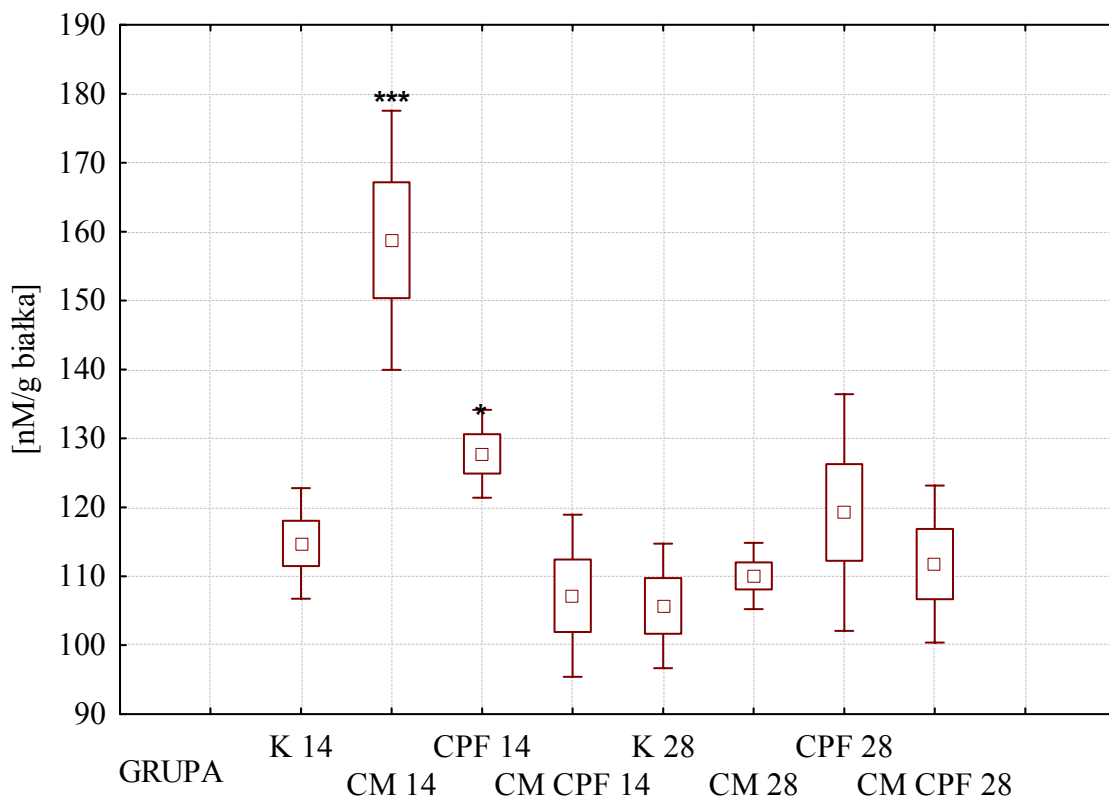
Ryc. 30. Stężenie grup tiolowych w mózgu.

Tabela 14. Stężenie TBARS w badanych tkankach.

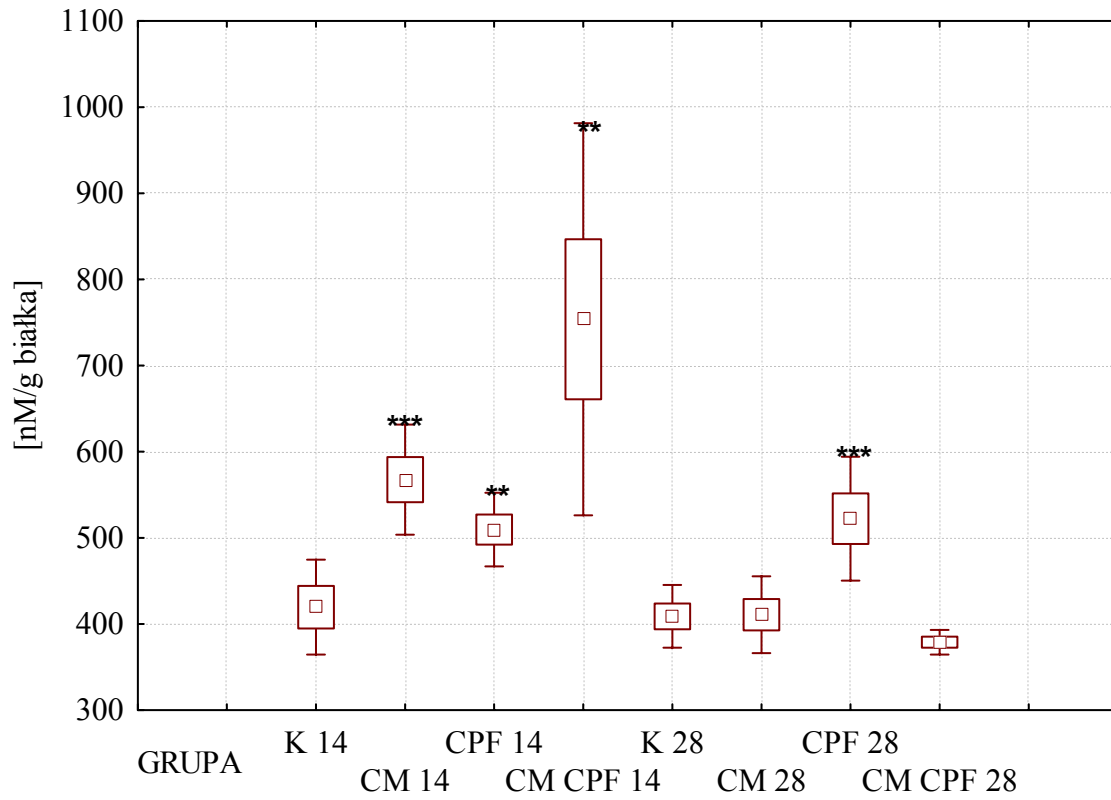
Tkanka	Grupa zwierząt	Czas ekspozycji (w dniach)	
		14	28
osocze [nM/g białka]	K	51,5 ± 2,6	49,0 ± 0,7
	CM	51,4 ± 4,6	50,9 ± 2,2
	CPF	54,8 ± 2,4 *	47,6 ± 6,8
	CMCPF	49,0 ± 0,7 (5)	49,1 ± 2,5
wątroba [nM/g białka]	K	114,8 ± 8,0	105,7 ± 9,0
	CM	158,8 ± 18,8 ***	110,1 ± 4,8
	CPF	127,8 ± 6,4 **	119,3 ± 17,2
	CMCPF	107,2 ± 11,8	111,8 ± 11,4
mózg [nM/g białka]	K	419,6 ± 55,1	408,9 ± 36,5
	CM	567,6 ± 63,9 ***	410,9 ± 44,6
	CPF	509,6 ± 42,7 **	522,2 ± 71,9 ***
	CMCPF	753,7 ± 227,6 **	378,9 ± 14,3



Ryc. 31. Stężenie TBARS w osoczu.



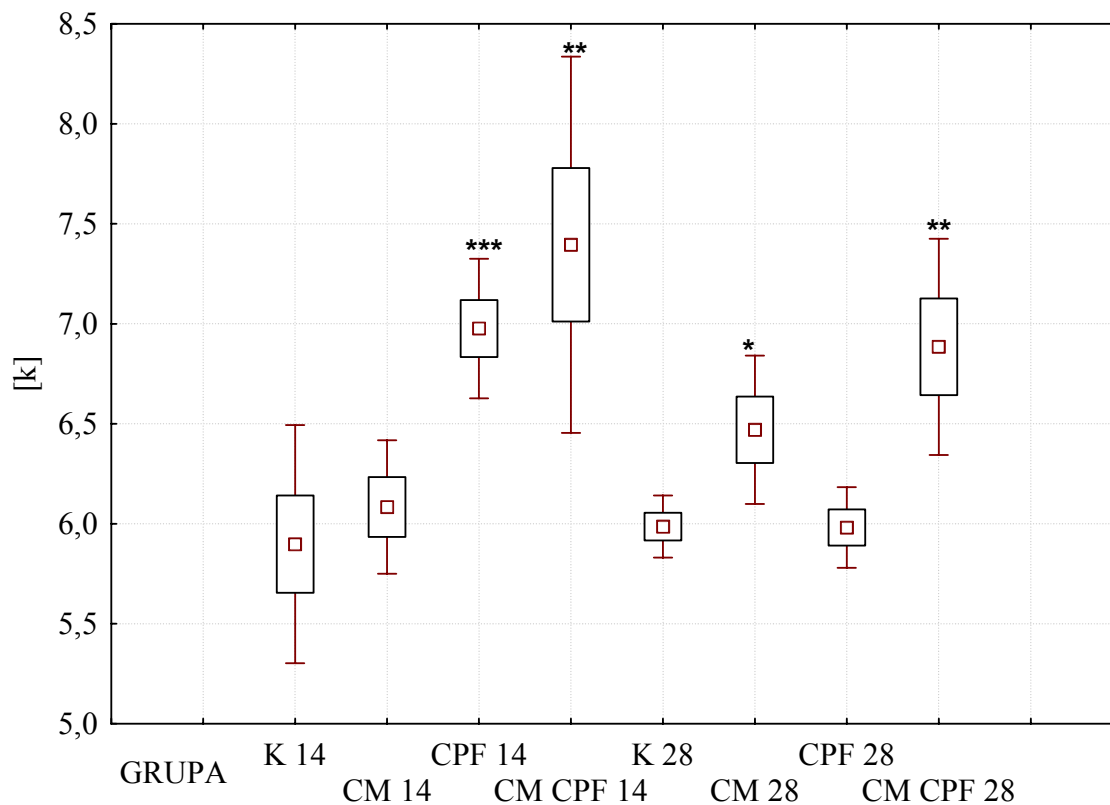
Ryc. 32. Stężenie TBARS w wątrobie.



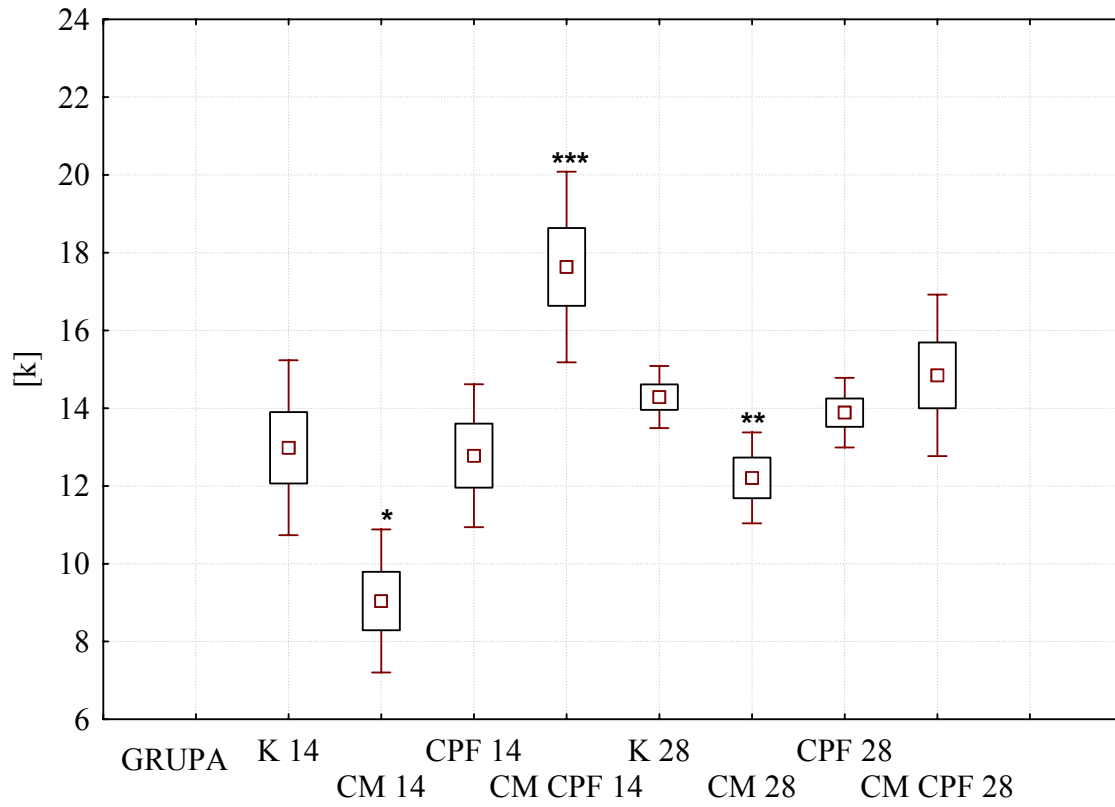
Ryc. 33. Stężenie TBARS w mózgu.

Tabela 15. Aktywność katalazy w badanych tkankach.

Tkanka	Grupa zwierząt	Czas ekspozycji (w dniach)		
		0	14	28
erytrocyty [k]	K	5,8 ± 0,4	5,9 ± 0,6	5,9 ± 0,2
	CM		6,1 ± 0,3	6,5 ± 0,4 * +
	CPF		6,9 ± 0,3 *** +	5,9 ± 0,2
	CMCPF		7,4 ± 0,9 ** +	6,9 ± 0,5 ** +
wątroba [k]	K	12,5 ± 0,8	12,9 ± 2,3	14,3 ± 0,8
	CM		9,0 ± 1,8 * -	12,2 ± 1,1 ** -
	CPF		12,8 ± 1,8	13,9 ± 0,9
	CMCPF		17,6 ± 2,5 *** +	14,8 ± 2,1



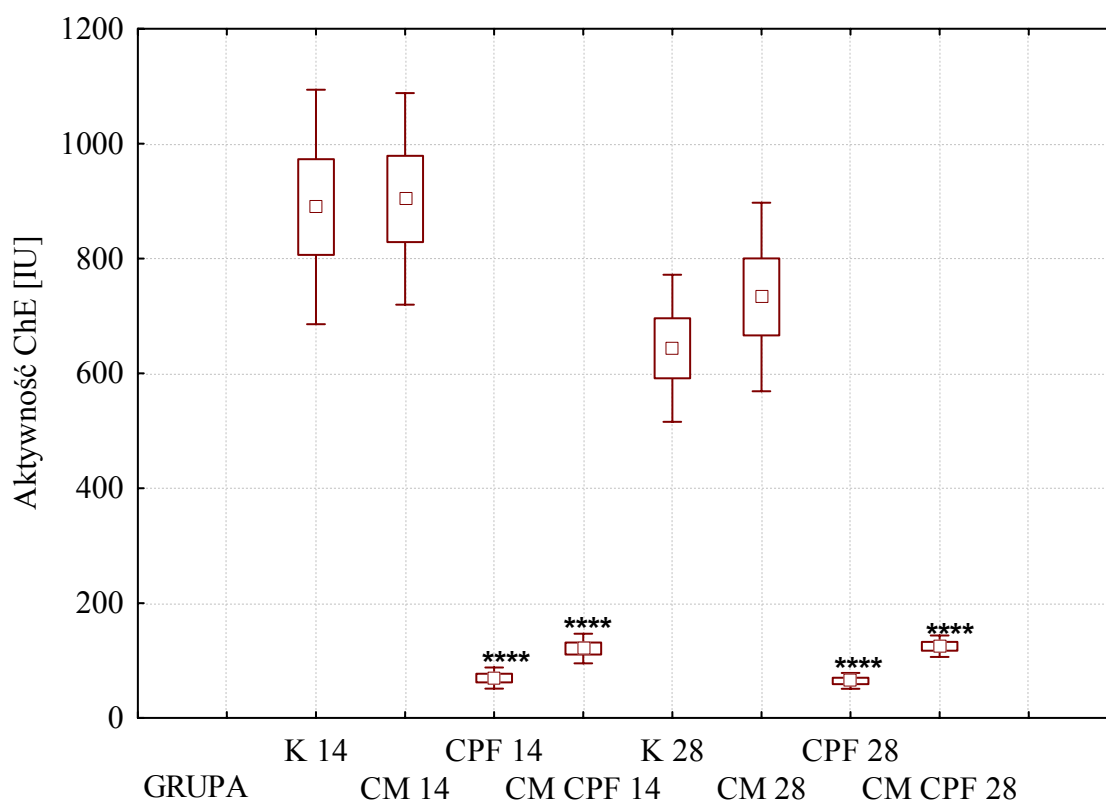
Ryc. 34. Aktywność katalazy w erytrocytach.



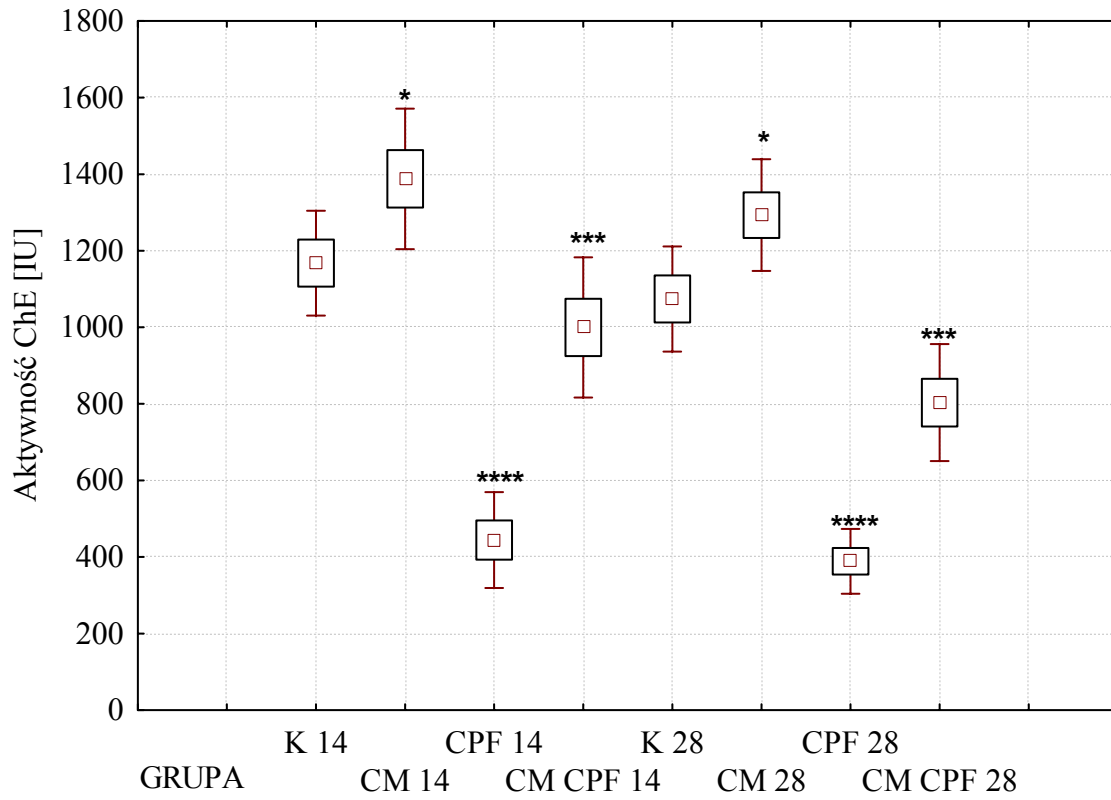
Ryc. 35. Aktywność katalazy w wątrobie.

Tabela 16. Aktywność cholinesterazy w badanych tkankach.

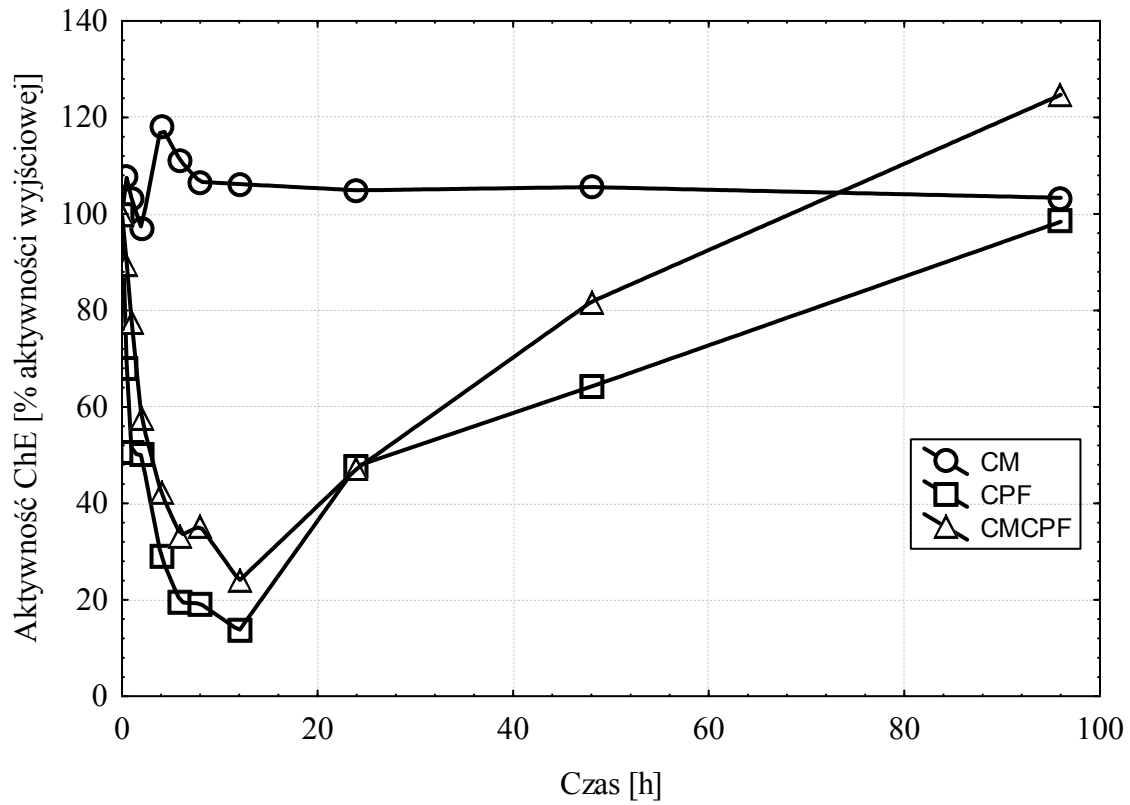
Tkanka	Grupa zwierząt	Czas ekspozycji (w dniach)		
		0	14	28
osocze [IU]	K	678,8 ± 105	837,4 ± 177,7	643,7 ± 128,0
	CM		903,8 ± 184,2	733,2 ± 164,2
	CPF		69,5 ± 18,4 ****	64,7 ± 13,7 ****
	CMCPF		122,0 ± 25,9 ****	125,0 ± 18,6 ****
mózg [kIU]	K	1,25 ± 0,13	1,17 ± 0,14	1,07 ± 0,14
	CM		1,39 ± 0,18 *	1,29 ± 0,15 *
	CPF		0,44 ± 0,13 ****	0,39 ± 0,08 ****
	CMCPF		0,94 ± 0,10 ***	0,80 ± 0,15 ***



Ryc. 36. Aktywność ChE w osoczu.



Ryc. 37. Aktywność ChE w mózgu.



Ryc. 38. Wykres zależności pomiędzy aktywnością ChE w osoczu szczurów a czasem po podaniu jednorazowej dożołądkowej dawki pestycydów.

6 OMÓWIENIE WYNIKÓW

6.1 Toksykokinetyka

Na podstawie uzyskanych wyników oznaczeń pestycydów we krwi po podaniu jednorazowej dawki wyznaczono podstawowe parametry kinetyczne, które przedstawiono w tabeli 4.

Po jednorazowej dawce pojedynczych związków (10 mg/kg m.c.), maksymalne stężenie we krwi obserwowano po odpowiednio 3 i 4 godzinach od podania CM i CPF (Ryc. 18 i 19). Wyższe stężenia osiągał CPF, co przekładało się bezpośrednio na zwiększenie wartości AUC. Po łącznym podaniu insektycydów zaobserwowano wydłużenie czasu po jakim występowało we krwi maksymalne stężenie niezmiennych związków. W obu przypadkach T_{max} wynosiło 6 godzin (Ryc. 20 i 21)

Mimo zmniejszonej dawki CM z 10 do 5 mg/kg m.c. (w łącznym podaniu), nie obserwowano spadku C_{max} . lecz jego niemal trzykrotny wzrost, jednocześnie wartość AUC wzrastała ponad dwukrotnie.

CPF z kolei przy zmniejszeniu dawki o połowę, osiągał C_{max} niemal 10-krotnie niższe i odpowiednio około 7-krotne obniżenie wartości AUC.

6.2 Stężenia CM i CPF w tkankach

6.2.1 α -Cypermetryna

Poziom CM w wątrobie wzrastał pomiędzy 14 a 28 dniem zarówno w grupie otrzymującej wyłącznie CM jak i mieszaninę CM CPF (Ryc. 23). W obu przypadkach zmiany te miały cechy istotności statystycznej. U zwierząt narażanych na mieszaninę związków obserwowano w wątrobie ponad dwukrotnie wyższe stężenia niezmiennego związku w porównaniu do zwierząt otrzymujących wyłącznie CM. Najwyższe stężenia CM w badanych tkankach występowały właśnie w wątrobie. Najniższe stężenia CM w badanych tkankach notowano w mózgu zarówno w przypadku ekspozycji na CM jak i jej mieszaniny z CPF. W mózgu zwierząt otrzymujących CM obserwowano niemal dwukrotnie wyższe stężenia CM niż u zwierząt z grupy CM CPF.

Statystycznie znamienne był wzrost stężenia CM w mózgu pomiędzy 14 a 28 dniem ekspozycji zarówno u zwierząt otrzymujących wyłącznie CM jak i mieszaninę CM i CPF (Ryc. 24).

6.2.2 Chlorpiryfos

Najwyższe stężenia CPF podobnie jak w przypadku cypermetryny znajdowano w wątrobie, zarówno w przypadku ekspozycji na CPF jak i mieszaninę CM i CPF (Ryc. 26), zaś najniższe we krwi.

W wątrobie, krwi oraz mózgu szczurów otrzymujących tylko CPF, jego stężenia były średnio 4-krotnie wyższe niż u zwierząt otrzymujących łącznie CM i CPF (Ryc. 25 i 26).

Nie stwierdzono istotnych statystycznie zmian zawartości CPF w badanych tkankach w czasie trwania doświadczenia.

6.3 Metabolity: TCP, 4OH3PBA w moczu

Wyniki oznaczeń metabolitów przedstawione są w tabeli 6.

Oznaczono całkowite stężenia metabolitów (suma wolnych i sprzęgniętych metabolitów) w moczu szczurów otrzymujących pojedyncze związki jak i ich mieszaninę. Po podaniu pierwszej dawki próbki moczu zebrano po 12 i 24 godzinach i analizowano je osobno. Po 13 i 27 dniach zebrano mocz dobowy.

Z oznaczeń wynika iż, w przypadku zwierząt otrzymujących CPF ilość wydalonego TCP w ciągu doby jest stała w ciągu trwania doświadczenia zarówno w grupie otrzymującej tylko CPF jak i jego mieszaninę z CM i wynosi ponad 50% podawej dziennej dawki. W przypadku jednorazowego podania CPF (10 mg/kg m.c.), ilości wydalonego TCP z moczem były podobne w próbkach 0-12 i 12-24 h. Po podaniu mieszaniny większa część dawki była wydalana między 12 a 24 godziną. Jednocześnie stwierdzić można zależność pomiędzy dawką CPF a stężeniem (ilością) TCP wydalonego z moczem niezależnie od współekspozycji z CM.

W przypadku łącznego podania insektycydów, ilość wydalonego 4OH3PBA w przedziale 12-24 h była niemal 5-krotnie wyższa niż w pierwszych 12 godzinach po podaniu. Ilość 4OH3PBA wydalonego z moczem w grupie szczurów otrzymujących wyłącznie CM wzrastała w czasie trwania doświadczenia. Stężenie 4OH3PBA po 27 dniach ekspozycji było 2-krotnie wyższe niż po 13 dniach.

Łączna ekspozycja na CM i CPF powodowała znaczne zmniejszenie wydalania 4OH3PBA, przy 2-krotnym obniżeniu dawki w grupie CMCPF obserwowano ponad 7-krotny spadek ilości wydalonego 4OH3PBA.

6.4 Grupy tiolowe

Wyniki oznaczeń przedstawiono w tabeli 13 oraz na ryc. 28, 29, 30.

W osoczu poziom wolnych grup tiolowych wzrastał w grupie kontrolnej między 14 a 28 dniem o 13,1 %, natomiast w wątrobie o 27,1 %, w mózgu nie obserwowano zmian.

Stężenie grup tiolowych w osoczu we wszystkich grupach eksponowanych zarówno po 14 jak i 28 dniach ekspozycji było niższe niż w grupach kontrolnych.

W grupie CPF po 14 dniach ekspozycji następował spadek stężenia grup tiolowych w wątrobie, natomiast w grupach CM oraz CMCPF po 28 dniach obserwowano z kolei spadki

stężeń grup tiolowych. W mózgu spadek stężenia grup tiolowych widoczny był wyłącznie po 14 dniach w grupie CPF.

6.5 TBARS

Wyniki przedstawiono w tabeli 14.

Stężenia TBARS w badanych tkankach w grupach kontrolnych nie ulegały zmianom w trakcie trwania doświadczenia.

Wzrost stężenia TBARS w osoczu obserwowany był wyłącznie w grupie otrzymującej CPF przez 14 dni.

W wątrobie wzrost stężenia TBARS był statystycznie istotny po 14 dniach w grupach otrzymujących tylko CM bądź CPF. Zmiany te po 28 dniach zanikały i wartości stężeń nie odbiegały od wartości w grupie kontrolnej.

W mózgu natomiast wzrost stężenia produktów peroksydacji lipidów był istotny statystycznie we wszystkich grupach po 14 dniach ekspozycji, natomiast utrzymywał się przez kolejne 14 dni tylko w grupie otrzymującej CPF, w pozostałych grupach wartości stężeń osiągały poziom grupy kontrolnej.

6.6 Katalaza

Wyniki oznaczeń przedstawiono w tabeli 15 oraz na ryc. 34 i 35.

Aktywność katalazy w grupach kontrolnych w krwinkach czerwonych nie ulegała zmianom w trakcie doświadczenia, natomiast w wątrobie obserwowano nieistotny wzrost aktywności enzymu po 28 dniach.

W krwinkach czerwonych zauważalny był wzrost aktywności katalazy u zwierząt zatrutowanych CPF i CPFCM po 14 dniach doświadczenia, natomiast w grupie CM nie obserwowano zmian. Po kolejnych 14 dniach ekspozycji wzrost aktywności utrzymywał się w grupie CPFCM natomiast u zwierząt otrzymujących wyłącznie CPF aktywność nie różniła się od grupy kontrolnej. Ponadto w grupie CM po 28 dniach zaobserwowano istotny statystycznie wzrost aktywności katalazy.

W wątrobie istotne obniżenie aktywności występowało tylko w grupie otrzymującej CM po 14 jak i 28 dniach, natomiast u zwierząt narażanych łącznie jedynie po 14 dniach ekspozycji zaobserwowano wzrost aktywności.

6.7 Cholinoesteraza

Wyniki przedstawione są w tabeli 16, a także na ryc. 38.

Aktywność ChE u zwierząt kontrolnych nie ulegała zmianom w trakcie trwania doświadczenia zarówno w osoczu jak i w mózgu.

U zwierząt otrzymujących wyłącznie CM obserwowano wzrost aktywności enzymu w osoczu i mózgu, jednak zmiany te miały cechy istotności statystycznej jedynie w mózgu po 28 dniach ekspozycji.

Statystycznie istotne były spadki aktywności enzymu w osoczu oraz mózgu zwierząt otrzymujących wyłącznie CPF w ciągu trwania doświadczenia. W osoczu zwierząt narażanych, aktywność ChE stanowiła 8,3 i 10,1 % aktywności mierzonej u szczurów kontrolnych po odpowiednio 14 i 28 dniach. W mózgu natomiast aktywności wynosiły 37,6 i 36,4 % odpowiednio po 14 i 28 dniach ekspozycji w stosunku do szczurów kontrolnych.

Także w przypadku łącznego podawania insektycydów obserwowano istotne spadki aktywności w osoczu i mózgu po 14 i 28 dniach. W osoczu średnia aktywność po 14 i 28 dniach stanowiła odpowiednio 14,6 i 19,4 % aktywności obserwowanej w grupach kontrolnych. W mózgu zwierząt narażanych aktywność ChE natomiast wynosiła 80,3 i 74,8 % aktywności w grupie kontrolnej odpowiednio po dwóch oraz 4 tygodniach ekspozycji.

7 DYSKUSJA WYNIKÓW

Badania nad losem insektycydów będących przedmiotem niniejszej rozprawy, były prowadzone na różnych gatunkach zwierząt a także z udziałem ludzi (Marei i in. 1982, Eadsforth i Baldwin 1983, Eadsforth i in. 1988, Wollen i in. 1992, Timchalk i in. 2005).

Do badań głównie wykorzystywano gryzonie, najczęściej szczury i myszy. Badane insektycydy zazwyczaj podawano drogą pokarmową jak i dermalną – gdyż z taką ekspozycją najczęściej mają do czynienia ludzie w przypadku zatruc (Crawford i in. 1981, Hutson i in. 1981). Substancje aplikowano doustnie zarówno w formie czystego preparatu technicznego oraz jako roztwory w oleju lub dimetylosulfotlenku.

Wielkość dawek α -cypermetryny i chloropiryfosu w niniejszej pracy dostosowano tak, aby nie powodowały wyraźnych efektów toksycznych. Doboru dokonano na podstawie danych literaturowych oraz wyników wstępnych doświadczeń. Dla chloropiryfosu, biorąc pod uwagę aktywność ChE w osoczu, NOAEL wynosi według różnych autorów około 1 mg/kg m.c./dzień, natomiast LOAEL w granicach 5-10 mg/kg m.c./dzień (Moser 1995). LOAEL dla cypermetryny kształtuje się na poziomie 15 mg/kg m.c. (Malaviya i in. 1993). W doświadczeniu wstępnym stwierdzono, że szczury dobrze znosiły dawki 15 mg/kg m.c. CPF i CM.

Zarówno CPF jak i CM należą do lipofilnych związków estrowych, dzięki tym właściwościom słabo wchłaniają się w postaci wodnych roztworów czy czystych substancji, natomiast łatwo ulegają absorpcji w przewodzie pokarmowym z roztworów olejowych. Ulegają szybkiej dystrybucji do wszystkich tkanek, zaś budowa estrowa determinuje ich szybką biotransformację przy udziale hydrolaz do produktów pozbawionych właściwości toksycznych związków macierzystych. Ostatnie badania sugerują jednak możliwość wywierania przez niektóre metabolity piretroidów wpływu na układ hormonalny poprzez oddziaływanie z ludzkim receptorem estrogenowym (McCarthy i in. 2006).

Znany jest synergizm działania owadobójczego mieszanin związków fosforoorganicznych i piretroidów (Martin i in. 2003). Insektocydy fosforoorganiczne jako nieodwracalne inhibitory esteraz, hamują też enzymy odpowiedzialne za hydrolizę piretroidów. Spowolnienie biotransformacji powoduje wzrost skuteczności biobójczej poprzez dłuższe utrzymywanie się efektywnych stężeń piretroidów. W dostępnej literaturze nie znaleziono jednak doniesień o interakcji chloropiryfos – cypermetryna w fazie toksykokinetycznej u szczurów.

W badaniach pojedynczych związków udowodniono brak tendencji do kumulacji materialnej w organizmie, ze względu na lipofilność, niezmienione związki mogą ulegać umiarkowanemu odkładaniu w tkance tłuszczowej, z której po zaprzestaniu ekspozycji były redystrybuowane i metabolizowane (Crawford i in. 1981). Zaznaczyć trzeba również, że tkanka tłuszczowa posiada niewielką aktywność esterazową.

Szybkość biotransformacji CPF i CM sprawia, że w tkankach zwierząt eksponowanych znajduje się relatywnie niskie stężenia niezmienionych związków, zaś polarne metabolity są łatwo wydalane z moczem. Zarówno w ocenie narażenia zwierząt laboratoryjnych jak i populacji generalnej ludzi stosuje się pomiar stężenia metabolitów w moczu (Kühn i in. 1996, 1999; Angerer i Ritter 1997). Ilość zaś wydalonych produktów biotransformacji CM i CPF jest miarą aktualnej ekspozycji.

W doświadczeniu zastosowano metodę GC-ECD do ilościowego oznaczania związków niezmienionych w tkankach, natomiast HPLC-DAD do oznaczeń metabolitów w moczu. Większość metod ilościowego oznaczania pestycydów w materiale biologicznym opiera się na chromatografii gazowej jako techniki oznaczenia końcowego. Lotność i trwałość termiczna większości pestycydów pozwala na ich separację i detekcję bez stosowania derywatywacji. Zastosowanie czułego detektora ECD umożliwia oznaczanie niskich stężeń badanych insektycydów – cypermetryna i chloropiryfos zawierają w swoich strukturach odpowiednio 2 i 3 atomy chloru. Różnica jednego atomu znajduje odbicie w granicy wykrywalności, która jest niższa dla CPF. Do ekstrakcji CM i CPF z krwi zastosowano n-heksan, natomiast z tkanek izolowano anality przy użyciu mieszaniny aceton - n-heksan (1:1, v/v). Ekstrakty uzyskane z krwi nadawały się bezpośrednio do oznaczeń bez konieczności oczyszczania, co znacznie skracało czas przygotowania próbki, a także ograniczyło zużycie rozpuszczalników. W przypadku tkanek konieczne było przeprowadzenie dwustopniowej procedury oczyszczania, wykonano dwukrotne płukanie ekstraktów wodą redestylowaną a następnie uzyskany wyciąg heksanowy po zagęszczeniu oczyszczano na kolumnach wypełnionych florisilem. Do kalibracji metody stosowano dwa wzorce wewnętrzne – chloropiryfos-metylowy dla chloropiryfosu oraz deltametrynę dla α -cypermetryny. Różnice w profilu elucji CPF i CM z florisilu powodowały, że konieczne było zastosowanie dwóch wzorców dla zwiększenia precyzji oznaczeń.

Zastosowano rozdział chromatograficzny w gradiencie temperatury, aby skrócić czas analizy i poprawić parametry pików (symetria, szerokość w połowie wysokości).

Opracowana metoda do łącznego oznaczania CPF i CM mimo praco- i czasochłonności, charakteryzowała się zadowalającą powtarzalnością i wykrywalnością dla oznaczanych analitów.

Metabolity w moczu oznaczano po hydrolizie i ekstrakcji do fazy stałej przy użyciu HPLC-DAD. Zastosowano elucję gradientową, gdyż próby izokratycznej separacji analitów nie przyniosły zadowalających rezultatów. W próbkach moczu pochodzących od zwierząt otrzymujących CM lub mieszaninę, tylko w niektórych próbkach wykrywano 3PBA. W czasie retencji zbliżonym do 3PBA pojawiał się również niezidentyfikowany pik, którego widmo UV sugerowało podobieństwo struktury chemicznej do kwasu 3-fenoksybenzoesowego. Można przypuszczać, że jest to kolejny, obok 3PBA i 4OH3PBA, metabolit cypermetryny. Nie we wszystkich próbkach obecny był 3PBA, w związku z czym zaniechano prób jego oznaczania. Do ekstrakcji metabolitów zastosowano złożę Bakerbond PolarPlus C₁₈, zalecane przez producenta do ekstrakcji fenoli. Po przepuszczeniu próbki hydrolizatu, złożę przemywano 20% roztworu acetonitrylu w wodzie o pH 3 co pozwalało wyeliminować interferencje, przy zachowaniu bardzo niskich strat analitów. Detekcję prowadzono z użyciem detektora wielodiodowego, dzięki czemu identyfikacji pików chromatograficznych dokonano również na podstawie uzyskanego widma UV-Vis.

Kalibracji metod oznaczania związków niezmiennych w tkankach oraz metabolitów w moczu dokonano poprzez wzbogacenie materiału pochodzącego od zwierząt kontrolnych (*matrix matched calibration*) w znane ilości substancji wzorcowych. Tak przygotowane próbki traktowano podobnie jak próbki badane pochodzące od zwierząt eksponowanych. W przypadku oznaczania CM i CPF w tkankach, do kontroli elucji z florisilu i wyznaczenia współczynników korekcyjnych, w każdej serii oznaczeń umieszczano próbki odczynnikowe, próbkę ślepą (tkanka od zwierząt kontrolnych) oraz próby fortyfikowane.

We wszystkich badanych tkankach pochodzących od zwierząt eksponowanych wykrywane były CM i CPF, a ich stężenia wzrastały w czasie trwania doświadczenia z wyjątkiem CPF w mózgu. **B a d a n i a t o k s y k o k i n e t y k i** pojedynczych związków oraz ich mieszaniny wykazały, że insektycydy te dobrze wchłaniają się z roztworów olejowych z przewodu pokarmowego osiągając najwyższe stężenia we krwi po 3-4 godzinach po podaniu a następnie szybko spadały, by po 24 godzinach zejść poniżej granicy oznaczalności. W przypadku łącznego podania maksymalne stężenie pestycydy osiągały po 6 godzinach od podania. Jednocześnie nastąpił nieproporcjonalny do wielkości dawki wzrost stężenia maksymalnego CM, przy 10-krotnym spadku stężenia CPF. Podobny efekt

obserwowali Timchalk i in. (2005) badając interakcję chloropiryfosu z diaziononem. Podając szczurom sam CPF w dawkach 15 i 60 mg/kg m.c., maksymalne stężenia we krwi w obu grupach zwierząt różniły się ponad 10-krotnie (100 ng/ml vs. 1140 ng/ml). Autorzy tłumaczą brak liniowej zależności dawka- C_{max} wysyceniem cytochromu P450, przy udziale którego CPF w wątrobie podlega aktywacji metabolicznej do oksonu. W wątrobie zachodzi też hydroliza, zarówno CPF jak i oksonu, gdyż w perfuzacji wątroby obecny jest tylko TCP (Sultatos i in. 1985). Na tej podstawie można przypuszczać, że istnieją inne, pozawątrobowe miejsca aktywacji CPF. CM z kolei ulega reakcjom utleniania i hydrolizy, katalizowanych przez zespół oksydaz i hydrolaz (niespecyficzne karboksyloesterazy) zlokalizowanych we frakcji mikrosomalnej. Zahamowanie aktywności esteraz przez związki fosforoorganiczne powoduje spowolnienie wielu ważnych procesów, m.in. biotransformacji leków. Obniżenie aktywności karboksyloesteraz skutkuje więc także zmniejszeniem efektywności hydrolizy CM. U szczurów otrzymujących CM łącznie z CPF obserwowano wzrost jej stężenia w wątrobie i krwi w stosunku do zwierząt otrzymujących wyłącznie CM.

Stężenia CPF w badanych tkankach po 14 i 28 dniach nie różniły się znacząco między sobą w żadnej z grup. Można przypuszczać, że u szczurów wytwarza się, już po kilku dawkach CPF, równowaga pomiędzy procesami: wchłaniania, dystrybucji, metabolizmu i wydalania. Dodatkowym argumentem, przemawiającym za takim stanem, jest utrzymujące się na stałym poziomie wydalanie głównego metabolitu chloropiryfosu – TCP z moczem. Dobowe wydalanie TCP stanowiło po przeliczeniu ok. 50-60% dziennej dawki CPF. Cypermetryna nie miała więc wpływu na wydalanie TCP.

Zaobserwowano słabą tendencję cypermetryny do kumulacji materialnej. Zarówno w grupie otrzymującej tylko CM jak i jej mieszninę z CPF, stężenia w tkankach wzrastały w czasie ekspozycji. Ponadto zwiększeniu ulegało także wydalanie głównego metabolitu (4OH3PBA) z moczem. Chloropiryfos hamował biotransformację cypermetryny, zwierzęta otrzymujące oba insektycydy wydalaly 7-krotnie mniej 4OH3PBA z moczem niż zwierzęta otrzymujące tylko CM. Zatem jednoczesna ekspozycja na inhibitory cholinoesteraz i syntetyczne piretroidy może powodować kumulację materialną, wskutek zmniejszenia intensywności przemian hydrolytycznych piretroidów.

Wpływ chloropiryfosu na **aktywność cholinoesterazy** był niejednokrotnie badany z udziałem ludzi a także różnych gatunków zwierząt (Nolan i in. 1984, Timchalk i in. 2005, Kousba i in. 2003). Stosowano różne drogi podania insektycydu, odmienne również były sposoby aplikacji (w postaci emulsji, roztworów olejowych, z paszą).

Niektóre doniesienia opisują wpływ chloropiryfosu na aktywność cholinesterazy w połączeniu z innymi pestycydami, np.: cypermetryną (Latuszyńska i in. 2001), parationem metylowym (Abou-Qare i in. 2001).

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy potwierdzają silny, inhibicyjny wpływ chloropiryfosu na aktywność esterazy cholinowej. Jednorazowa dawka 10 mg CPF/kg m.c. istotnie obniża aktywność osoczowej ChE do około 15%, a kolejne dawki pogłębiają tą tendencję. Wyniki sugerują zależny od dawki stopień zahamowania aktywności ChE. W 28-dniowym doświadczeniu Jacobsen i in. (2004), obserwowali niewielki, ale istotny spadek aktywności ChE w osoczu samców szczurów eksponowanych na dzienne dawki 0,15 i 0,30 mg/kg m.c., podczas gdy dawki 0,006 i 0,03 mg CPF/kg m.c. nie powodowały żadnych zmian aktywności enzymu. W tym samym doświadczeniu, u samic otrzymujących takie same dawki insektycydów nie obserwowano zmian aktywności ChE w żadnej z grup. W niniejszym doświadczeniu u zwierząt otrzymujących CPF wraz z CM, nie stwierdzono wpływu piretroidu na inhibicję ChE powodowaną przez CPF.

CM nie powodowała zahamowania ChE w osoczu po jednorazowym podaniu – podobne rezultaty uzyskali Krechniak i Łoboda-Pelplińska (1991). W 13-tygodniowym doświadczeniu na królikach, CM w dawce 24 mg/kg m.c. także nie wpływała na aktywność esterazy cholinowej zarówno w osoczu jak i mózgu (el-Demerdash i in. 2003). Kale i in. (1999) obserwowali z kolei długotrwały spadek aktywności ChE w erytrocytach i surowicy szczurów po podaniu cypermetryny jak i fenwaleratu. Wielokrotne dawki CM w bieżącym doświadczeniu powodowały nieistotny wzrost aktywności ChE w osoczu, natomiast w mózgu wzrost zyskiwał cechy istotności statystycznej po 28 dniach ekspozycji. Piretroidy mogą posiadać złożony mechanizm oddziaływania na ChE w mózgu. W przypadku cypermetryny obserwuje się indukcję aktywności enzymu w różnych częściach mózgu (Rao i Rao 1995).

W badaniach **stresu oksydacyjnego**, posługiwano się dotychczas pomiarami takich parametrów jak stężenia: substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS), glutationu zredukowanego i utlenionego (GSH i GSSG), tokoferolu i kwasu askorbinowego, a także aktywność enzymów: katalazy (CAT), dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), peroksydazy glutationowej (GPx), reduktazy glutationowej (GR) i transferazy glutationowej (GST).

Stężenie grup sulfhydrylowych jest często stosowane jako wskaźnik potencjału oksydoredukcyjnego w komórkach. Spadek stężenia świadczy o zmniejszeniu potencjału antyoksydacyjnego. W osoczu we wszystkich grupach doświadczalnych zarówno po 14 jak i

28 dniach, obserwowano znamienne spadki stężeń grup sulfhydrylowych wobec grup kontrolnych, przy czym największe obniżenie notowano w grupie otrzymującej wyłącznie CM. W wątrobie po 14 dniach spadek stężenia występował w grupie CPF, natomiast po 28 dniach w grupach otrzymujących CM lub jej mieszaninę z CPF. W mózgu spadek stężenia grup sulfhydrylowych obserwowano tylko w grupie otrzymującej CPF przez 14 dni, natomiast w innych grupach nie obserwowano zmian. Podobne wyniki uzyskano u zwierząt narażanych na cypermetrynę oraz inne piretroidy (Grajeda-Cota i in. 2004, Prakasam i in. 2001, Giray i in. 2001). Chloropiryfos i inne insektycydy również mają ujemny wpływ na stężenie grup tiolowych, w tym na stężenie glutationu zredukowanego (Goel i in. 2005, Seth i in. 2001), będącego głównym donorem grup –SH w komórkach.

Kale i in. (1999) stwierdzili natomiast wzrost stężenia GSH w erytrocytach szczurów otrzymujących cypermetrynę, który tłumaczono procesami adaptacyjnymi spowodowanymi stresem oksydacyjnym.

Oceny uszkodzeń wolnorodnikowych lipidów dokonywano na podstawie pomiaru stężeń **substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS)**. Ze względu na prostotę i łatwość wykonania oznaczeń w dowolnym materiale biologicznym, test ten mimo swoich ograniczeń (m.in. brak specyficzności) jest najczęściej stosowany w ocenie peroksydacji lipidów powodowanych przez reaktywne formy tlenu.

W bieżącym doświadczeniu wzmożoną peroksydację lipidów obserwowano głównie po 14 dniach ekspozycji. W grupie szczurów otrzymujących CPF wzrost stężenia TBARS w stosunku do zwierząt kontrolnych obserwowano po 14 dniach we wszystkich badanych tkankach, natomiast po kolejnych 14 dniach poziomy TBARS w osoczu i wątrobie powracały do stanu wyjściowego.

W grupach CM i CMCPF nasiloną peroksydację lipidów obserwowano tylko w wątrobie i mózgu po 14 dniach ekspozycji.

Rolą **katalazy** w komórce jest przede wszystkim rozkład nadtlenu wodoru, powstającego w trakcie przemian biochemicznych, ale także udział w metabolizmie niskocząsteczkowych alkoholi i aldehydów, np.: metanolu, etanolu, formaldehydu. Powstający w trakcie jednoelektronowej redukcji tlenu nadtlenek wodoru, jest substratem katalazy, a jej aktywność często stosowanym markerem stresu oksydacyjnego. W niniejszym doświadczeniu obserwowano odmienne zachowanie się aktywności katalazy w erytrocytach i wątrobie zwierząt eksponowanych na badane insektycydy. Cypermetryna podawana

indywidualnie powodowała spadek aktywności CAT w wątrobie, natomiast jej wzrost w erytrocytach. Łączne podanie chloropiryfosu i cypermetryny powodowało zarówno w erytrocytach jak i wątrobie wzrost aktywności enzymu, natomiast chloropiryfos podawany indywidualnie wpływał nieznacznie na badany parametr. Atessahin i in. (2005) oraz Manna i in. (2004) u zwierząt narażanych na CM notowali spadek aktywności katalazy w wątrobie. Natomiast w doświadczeniu Gultekina i in. (2000) aktywność katalazy pod wpływem niskich stężeń CPF nie ulegała zmianom.

W zatruciu pestycydami stres oksydacyjny może być poważną przyczyną uszkodzeń wewnątrzkomórkowych. Wątroba pełni nadrzędną rolę w procesach detoksykacji ksenobiotyków i ich metabolitów pośrednich, stąd jest jednym z najbardziej narażonych na uszkodzenia organów. Ostatnie badania podkreślają możliwość udziału reaktywnych form tlenu w mechanizmie działania toksycznego insektycydów fosforoorganicznych i piretroidów. Zaburzenia w stanie oksydoredukcyjnym komórek obserwowane są w testach biochemicznych jako wzrost stężenia TBARS, obniżenie stężenia grup tiolowych, czy zaburzenia aktywności katalazy.

Wyniki niniejszych doświadczeń dowodzą, że badane insektycydy mogą wywierać niekorzystne działanie na układy biologiczne poprzez zaburzenia układów oksydoredukcyjnych. Skomplikowane zależności wymagają jednak dalszych badań w celu pełniejszego zrozumienia zachodzących procesów.

8 WNIOSKI

1. Jednoczesna ekspozycja na α -cypermetrynę i chloropiryfos powoduje spadek intensywności przemian hydrolitycznych piretroidu. Obserwuje się zwiększoną retencję CM w badanych tkankach i zmniejszenie wydalania metabolitów CM z moczem.
2. α -Cypermetryna podawana zarówno indywidualnie jak i łącznie z chloropiryfosem wykazuje słabą tendencję do kumulacji.
3. Chloropiryfos nie wykazuje tendencji do kumulacji. Wydalanie TCP jest stałe w 28-dniowym doświadczeniu, a stężenia CPF w tkankach nie ulegały istotnym wzrostom.
4. Podprzewlekłe narażenie na badane insektycydy wpływa na oznaczane parametry stresu oksydacyjnego powodując wzrost stężenia produktów peroksydacji lipidów (TBARS), obniżenie stężenia wolnych grup tiolowych, a także złożone oddziaływanie na aktywność katalazy.
5. Chloropiryfos jako klasyczny inhibitor cholinoesterazy powoduje zależne od dawki zahamowanie aktywności enzymu. α -Cypermetryna nie wykazuje podobnych właściwości.

9 STRESZCZENIE

Chemizacja życia sprawia, że na codzień mamy kontakt z tysiącami substancji naturalnych i syntetycznych obecnych w powietrzu, żywności i wodzie. Wśród substancji budzących niepokój toksykologów znajdują się insektycydy, związki przeznaczone do zwalczania owadów. Cechą idealnego insektycydu jest selektywność wobec szkodników przy braku lub niskiej toksyczności wobec pożytecznych form życia, w tym człowieka. Jak dotąd nie udało się opracować syntetycznego związku o właściwościach owadobójczych, i całkowicie obojętnego wobec człowieka. Istotnym problemem, na który coraz częściej zwraca się uwagę jest współwystępowanie wielu trucizn jednocześnie. Wyróżnia się trzy podstawowe efekty działania łącznego: działanie podobne (każdy składnik działa według podobnego mechanizmu, lecz różni się jedynie siłą działania), działanie niepodobne (każdy składnik wykazuje inny mechanizm działania, lecz nie wływają wzajemnie na siebie), typowa interakcja (synergizm lub antagonizm).

W niniejszej pracy badaniu poddano 2 insektycydy powszechnie stosowane do zwalczania szkodników przede wszystkim w rolnictwie: chloropiryfos i α -cypermetrynę przedstawiciele odpowiednio insektycydów fosforoorganicznych i syntetycznych piretroidów. Doświadczenie przeprowadzono na szczurach, samcach szczepu Wistar, które podzielono na 4 grupy, otrzymujące 7 dni w tygodniu:

Kontrola – 0,5 ml oleju rzepakowego,

CM – w dawce 10 mg/kg m.c. w oleju rzepakowym,

CPF – w dawce 10 mg/kg m.c. w oleju rzepakowym,

CMCPF – w dawce po 5 mg/kg m.c. pojedynczych związków w oleju rzepakowym.

Po 14 i 28 dniach we krwi, wątrobie oraz mózgu oznaczano stężenia niezmiennych insektycydów metodą GC-ECD, w moczu z dobowej zbiórki moczu oznaczano stężenia głównych metabolitów metodą HPLC-DAD. Ponadto w osoczu (erytrocytach), wątrobie i mózgu oznaczano parametry biochemiczne: stężenia grup tiolowych metodą Sedlaka i Lindsaya, TBARS wg metody Rice-Evans a także aktywności: katalazy wg Aebi i cholinesterazy metodą Ellmana. Po jednorazowej dawce insektycydów i ich mieszaniny pobierano krew, w której oznaczono stężenia niezmiennych związków oraz aktywność ChE w osoczu. Na podstawie uzyskanych wyników obliczono podstawowe parametry kinetyczne: AUC, T_{max} i C_{max} , a także zmiany aktywności ChE w czasie 96 h po podaniu.

Wyniki oznaczeń insektycydów w tkankach oraz stężeń metabolitów w moczu wskazują, że CM i CPF są łatwo wchłaniane z roztworów olejowych w przewodzie

pokarmowym i ulegają szybkiej biotransformacji do produktów nieposiadających ich właściwości toksycznych. Większość wchłoniętej dawki wydalana się z moczem w postaci metabolitów w ciągu 24 godzin po ekspozycji. CM wykazuje słabą tendencję do kumulacji w wątrobie i mózgu. Współekspozycja na CM i CPF powodowała spadek efektywności przemian cypermetryny, co przejawiało się w obniżeniu prędkości wydalania 4OH3PBA oraz we wzroście stężeń CM we krwi i wątrobie w stosunku do zwierząt otrzymujących wyłącznie cypermetrynę.

CPF jest klasycznym inhibitorem esterazy cholinowej, u wszystkich zwierząt narażanych obserwowano spadek aktywności tego enzymu zarówno w osoczu jak i mózgu, przy czym silniejsze obniżenie występowało w osoczu. Stopień inhibicji był zależny od dawki. CM nie wykazywała działania hamującego na ChE, natomiast w niewielkim stopniu powodowała podwyższenie aktywności esterazy cholinowej w mózgu.

Ekspozycja na insektycydy wywierała złożony wpływ na oznaczane parametry stresu oksydacyjnego. Obserwowano spadek stężenia grup tiolowych we wszystkich tkankach (w różnym stopniu), nasilenie peroksydacji lipidów mierzone jako wzrost stężenia TBARS a także zaburzenia w aktywności katalazy w erytrocytach i wątrobie.

Wyniki tego eksperymentu świadczą o oddziaływaniu CM i CPF na wzajemny metabolizm u szczura. Cypermetryna wykazuje słabą tendencję do kumulacji, która może ulegać nasileniu przy jednoczesnym narażeniu na insektycydy fosforoorganiczne.

Badane insektycydy poza dotychczas poznanymi mechanizmami działania, mogą powodować zachwianie równowagi redoks w organizmie poprzez indukcję procesów wolnorodnikowych.

10 SUMMARY

Due to continuous technological progress, people are exposed daily to thousands of natural and synthetic substances occurring in water, food and air.

Among substances of great interest to toxicologists are insecticides which are widely used in pest control. The ideal insecticide should be selective to insects and take no negative effects to humans. Until now, no insecticide fully selective and neutral to humans was synthesized and introduced on the market.

Nowadays, more frequently, great attention is paid to coexposure to many poisons administered simultaneously. Three basic modes of joint action are identified: simple similar action (each chemical acts in the same way but they differ only in their potencies), simple dissimilar action (each chemical exerts its own action and does not modulate the effects of the other), true interaction (synergism or antagonism can occur).

In this work, two insecticides widely used in crop protection: α -cypermethrin and chlorpyrifos, representing synthetic pyrethroids and organophosphorous compounds respectively, were investigated. Experiment was carried out on male Wistar rats. The animals were divided into four groups and treated orally 7 days a week with:

Control – 0.5 ml of rape oil,

CM – α -cypermethrin in rape oil at a dose of 10 mg/kg b.w.,

CPF – chlorpyrifos at a dose of 10 mg/kg b.w.,

CMCPF – α -cypermethrin and chlorpyrifos at a combined dose of 5 mg/kg b.w. each.

After 14 and 28 days of exposure, unchanged pesticides were determined in blood, liver and brain by GC-ECD, additionally in 24h urine samples main metabolites were determined by HPLC-DAD. Moreover, in plasma, liver and brain homogenates selected biochemical parameters were evaluated. ChE activity was measured by Ellman method, CAT activity by the method of Aebi. Also, the concentrations of TBARS and total thiols were determined in investigated tissues by the methods of: Rice-Evans and Lindsay and Sedlak respectively. After single doses of insecticides or their mixture, the blood from tail vein was sampled in intervals and concentration of CM and CPF were determined as well as ChE activity. Basic toxicokinetic parameters were calculated: AUC, C_{max} and T_{max}.

Results of tissues insecticides concentrations indicate that CM and CPF are easily absorbed from oil solutions in gastrointestinal tract and undergo rapid metabolism to the non-active degradation products. Most of the given dose is excreted with urine during the first 24 hours.

CM but not CPF had a low tendency to cumulate in liver and blood during exposure. Coexposure to CM and CPF reduced the metabolism rate of CM. There was an evident increase of CM concentrations in blood and liver and a decrease in urinary excretion of 4OH3PBA in coexposed rats.

CPF is a classical organophosphorous ChE inhibitor; all the animals exposed to it had decreased plasma and brain enzyme activities. The strongest inhibitory effect was seen in plasma, and the inhibition was dose-dependent. CM slightly elevated ChE activity, especially in brain.

Exposure to insecticides produced complex outcome on evaluated oxidative stress parameters. Decrease in total thiols concentrations was observed at various extents in all tissues as well as elevated lipid peroxidation expressed as TBARS concentrations. Catalase activity was also affected in erythrocytes and liver.

The results of this study show that CM and CPF influenced their own metabolism in the rats. CM has low tendency to cumulate, which can arise when simultaneous exposure to ChE inhibitors exists.

Investigated insecticides, besides their known mechanisms of action, may evoke imbalance in redox status in the organism due to potential free radical mediated mechanisms.

11 PIŚMIENICTWO

Abbassy M.A., Eldefrawi M.E., Elderfrawi A.T.: Allethrin interactions with the nicotinic acetylcholine receptor channel. *Life Sci.* **1982**, 31, 1547-52.

Abbassy M.A., Eldefrawi M.E., Elderfrawi A.T.: Influence of the alcohol moiety of pyrethroids on their interactions with the nicotinic acetylcholine receptor. *J. Toxicol. Environ. Health* **1983 a**, 12, 575-90.

Abbassy M.A., Eldefrawi M.E., Elderfrawi A.T.: Pyrethroid action on the nicotinic acetylcholine receptor channel. *Pestic. Biochem. Physiol.* **1983 b**, 19, 299-308.

Abdel-Rahman A.A., Blumenthal G.M., Abou-Donia S.A., Fouad A.F.A., Abdel-Monem A.E., Abou-Donia M.B.: Pharmacokinetic profile and placental transfer of a single intravenous injection of [¹⁴C]chlorpyrifos in pregnant rats. *Arch. Toxicol.* **2002**, 76, 452-9.

Abdollahi M., Mostafalou S., Pournourmohammadi S., Shadnia S.: Oxidative stress and cholinesterase inhibition in saliva and plasma of rats following subchronic exposure to malathion. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* **2004**, 137, 29-34.

Abu-Qare A.W., Abdel-Rahman A., Brownie C., Kishk A.M., Abou-Donia M.B.: Inhibition of cholinesterase enzymes following a single dermal dose of chlorpyrifos and methyl parathion, alone and in combination, in pregnant rats. *J. Toxicol. Environ. Health A* **2001**, 63, 173-89.

Abu-Quare A.W., Abou-Donia M.B.: Quantification of nicotine, chlorpyrifos and their metabolites in rat plasma and urine using high-performance liquid chromatography. *J. Chromat. B* **2001**, 757, 295-300.

Aebi H.: Catalase in vitro. In: *Methods in Enzymology* **1984**, 105, 121-6.

Ahdaya S., Guthrie F.E.: Stomach absorption of intubated insecticides in fasted mice. *Toxicology* **1981-82**, 22, 311-7.

Andreescu S., Avramescu A., Bala C., Magearu V., Marty J.L.: Detection of organophosphorus insecticides with immobilized acetylcholinesterase - comparative study of two enzyme sensors. *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, 374, 39-45.

Angerer J., Ritter A.: Determination of metabolites of pyrethroids in human urine using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **1997**, 695, 217-26.

Apra C., Sciarra G., Sartorelli P., Desideri E., Amati R., Sartorelli E.: Biological monitoring of exposure to organophosphorus insecticides by assay of urinary alkylphosphates: influence of protective measures during manual operations with treated plants. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **1994**, 66, 333-8.

Atessahin A., Yilmaz S., Karahan I., Pirincci I., Tasdemir B.: The effect of vitamin E and selenium on cypermethrin – induced oxidative stress in rats. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* **2005**, 29, 385-91.

Baker S.E., Olsson A.O., Barr D.B.: Isotope dilution high-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry method for quantifying urinary metabolites of synthetic pyrethroid insecticides. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2004**, 46, 281-8.

Bakke J.E., Feil V.J., Price C.E.: Rat urinary metabolites from O,O-diethyl-O-(3,5,6-trichloro-2-pyridyl)phosphorothioate. *J. Environ. Sci. Health B* **1976**, 11, 225-30.

Ballantyne B., Marrs T.C.: Clinical and experimental toxicology of organophosphates and carbamates. Butterworth-Heinemann, Ltd., Lindacre House, **1992** Jordan Hill Oxford.

Bartels M.J., Kastl P.E.: Analysis of 3,5,6-trichloropyridinol in human urine using negative –ion chemical ionization gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromat.* **1992**, 575, 69-74.

Bartosz G.: Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa **2003**.

Bicker W., Lämmerhofer M., Genser D., Kiss H., Lindner W.: A case study of acute human chlorpyrifos poisoning: Novel aspects on metabolism and toxicokinetics derived from liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of urine samples. *Toxicol. Lett.* **2005**, 159, 235-51.

Biziuk M. (red.): Pestycydy, występowanie, oznaczanie i unieszkodliwianie. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa **2001**.

Bomser J.A., Casida J.E.: Diethylphosphorylation of rat cardiac M2 muscarinic receptor by chlorpyrifos oxon in vitro. *Toxicol. Lett.* **2001**, 119, 21-6.

Bradbury J.E., Forshaw P.J., Gray A.J., Ray D.E.: The action of mephenesin and other agents on the effects produced by two neurotoxic pyrethroids in the intact and spinal rats. *Neuropharmacology* **1983**, 22, 907-14.

Breslin W.J., Liberacki A.B., Dittenber D.A., Quast J.F.: Evaluation of the developmental and reproductive toxicity of chlorpyrifos in the rat. *Fundam. Appl. Toxicol.* **1996**, 29, 119-30.

Brzak K.A., Harms D.W., Bartels M.J., Nolan R.J.: Determination of chlorpyrifos, chlorpyrifos oxon, and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in rat and human blood. *J. Anal. Toxicol.* **1998**, 22, 203-10.

Bushnell P.J., Pope C.N., Padilla S.: Behavioral and neurochemical effects of acute chlorpyrifos in rats: tolerance to prolonged inhibition of cholinesterase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1993**, 266, 1007-17.

Capodicasa E., Scapellato M.L., Moretto A., Caroldi S., Lotti M.: Chlorpyrifos-induced delayed polyneuropathy. *Arch. Toxicol.* **1991**, 65, 150-5.

Catterall W.A.M.: Structure and function of voltage-sensitive sodium channels. *Science* **1988**, 242, 50-61.

Chalmers A.E., Osborne M.P.: The crayfish stretch receptor organ: A useful model system for investigating the effects of neuroactive substances. I. The effect of DDT and pyrethroids. *Pestic. Biochem. Physiol.* **1986**, 26, 128-38.

Chambers J.E., Chambers H.W.: Oxidative desulfuration of chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl, and leptophos by rat brain and liver. *J. Biochem. Toxicol.* **1989**, 4, 201-3.

Chambers J.E., Ma T., Boone J.S., Chambers H.W.: Role of detoxication pathways in acute toxicity levels of phosphorothionate insecticides in the rat. *Life Sci.* **1994**, 54, 1357-64.

Chang M.J.W., Lin C.Y., Lo L.W., Lin R.S.: Biological monitoring of exposure to chlorpyrifos by high performance liquid chromatography. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1996**, 56, 367-74.

Clark J.M., Brooks M.W.: Neurotoxicology of pyrethroids: Single or multiple mechanisms of action? *Environ. Toxicol. Chem.* **1989**, 8, 361-72.

Cocker J., Mason H.J., Garfitt S.J., Jones K.: Biological monitoring of exposure to organophosphate pesticides. *Toxicol Lett.* **2002**, 134, 97-103.

Columbe A., Cardenas S., Gallego M., Valcarcel M.: A solid phase extraction method for the screening and determination of pyrethroid metabolites and organochlorine pesticides in human urine. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2001**, 15, 2007-13.

Corley R.A., Calhoun L.L., Dittenber D.A., Lomax L.G., Landry T.D.: Chlorpyrifos: a 13-week nose-only vapor inhalation study in Fischer 344 rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* **1989**, 13, 616-8.

Corrion M.L., Ostrea E.M. Jr, Bielawski D.M., Posecion N.C. Jr, Seagraves J.J.: Detection of prenatal exposure to several classes of environmental toxicants and their metabolites by gas chromatography-mass spectrometry in maternal and umbilical cord blood. *J. Chromatogr. B* **2005**, 822, 221-9.

Cowan J., Sinton C.M., Varley A.W., Wians F.H., Haley R.W., Munford R.S.: Gene therapy to prevent organophosphate intoxication. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2001**, 173, 1-6.

Crawford M.J., Croucher A., Hutson D.H.: Metabolism of *cis*- and *trans*-cypermethrin in rats. Balance and tissue retention study. *J. Agric. Food Chem.* **1981**, 29, 130-5

Crayford J.V., Hutson D.H.: The metabolism of 3-phenoxybenzoic acid and its glucoside conjugate in rats. *Xenobiotica* **1980**, 10, 355-64.

Cui Y., Guo J., Xu B., Chen Z.: Binding of chlorpyrifos and cypermethrin to blood proteins. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2006**, 85, 110-4.

Dam K., Seidler F.J., Slotkin T.A.: Chlorpyrifos releases norepinephrine from adult and neonatal rat brain synaptosomes. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **1999**, 118, 129-33.

Dam K., Seidler F.J., Slotkin T.A.: Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: delayed targeting of DNA synthesis after repeated administration. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **1998**, 108, 39-45.

Decyzja NR 2455/2001/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 20 listopada 2001 r. ustanawiająca wykaz priorytetowych substancji w dziedzinie polityki wodnej oraz zmieniająca dyrektywę 2000/60/WE.

Ding Y., White C.A., Muralidhara S., Bruckner J.V., Bartlett M.G.: Determination of deltamethrin and its metabolite 3-phenoxybenzoic acid in male rat plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* **2004**, 810, 221-7.

Drevenkar V., Vasilic Ž., Štengl B., Fröbe Z., Rumenjak V.: Chlorpyrifos metabolites in serum and urine of poisoned persons. *Chem. Biol. Interactions* **1993**, 87, 315-22.

Dziennik Ustaw 2002, nr 217, poz. 1833. Rozporządzenie Ministra Pracy i Polityki Społecznej z dnia 29 listopada 2002 r. w sprawie najwyższych dopuszczalnych stężeń i natężeń czynników szkodliwych dla zdrowia w środowisku pracy.

Dziennik Ustaw 2005, nr 201, poz. 1647. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 28 września 2005 r. w sprawie wykazu substancji niebezpiecznych wraz z ich klasyfikacją i oznakowaniem.

Dziennik Ustaw 2005, nr 242, poz. 2047. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 29 listopada 2005 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie najwyższych dopuszczalnych poziomów pozostałości chemicznych środków ochrony roślin, które mogą znajdować się w środkach spożywczych lub na ich powierzchni.

Eadsforth C.V., Baldwin M.K.: Human dose-excretion studies with the pyrethroid insecticide, cypermethrin. *Xenobiotica* **1983**, 13, 67-72.

Eadsforth C.V., Bragt P.C., Sittert N.J.: Human dose-excretion study with pyrethroid insecticides cypermethrin and alphacypermethrin: relevance for biological monitoring. *Xenobiotica* **1988**, 18, 603-14.

el-Demerdash F.M., Yousef M.I., Al-Salhen K.S.: Protective effects of isoflavone on some biochemical parameters affected by cypermethrin in male rabbits. *J. Environ. Sci. Health B* **2003**, 38, 365-78.

Ellman G.L., Courtney D., Andres V., Featherstone R.M.: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, 7, 88-95.

Enan E.E., El-Sebae A.H., Enan O.H., El-Fiki S.: In-vivo interaction of some organophosphorus insecticides with different biochemical targets in white rats. *J. Environ. Sci. Health B.* **1982**, 17, 549-70.

Flannigan S.A., Tucker S.B.: Variation on cutaneous sensation between synthetic pyrethroid insecticides. *Contact Dermatitis* **1985**, 13, 140-7.

Forshaw P.J., Ray D.E.: A novel action of deltamethrin on membrane resistance in mammalian skeletal muscle and non-myelinated nerve fibers. *Neuropharmacology* **1990**, 29, 75-81.

Furlong C.E., Cole T.B., Jarvik G.P., Pettan-Brewer C., Geiss G.K., Richter R.J., Shih D.M., Tward A.D., Lusia A.J., Costa L.G.: Role of paraoxonase (PON1) status in pesticide sensitivity: genetic and temporal determinants. *Neurotoxicology* **2005**, 26, 651-9.

Gabbianelli R., Falcioni G., Nasuti C., Cantalamessa F.: Cypermethrin-induced plasma membrane perturbation on erythrocytes from rats: reduction of fluidity in the hydrophobic core and in glutathione peroxidative activity. *Toxicology* **2002**, 175, 91-101.

Gaberlein S, Knoll M, Spener F, Zaborosch C.: Disposable potentiometric enzyme sensor for direct determination of organophosphorus insecticides. *Analyst* **2000**, 125, 2274-9.

Gammon D.W., Sander G.: Two mechanisms of pyrethroid action: Electrophysiological and pharmacological evidence. *Neurotoxicology* **1985**, 6, 63-86.

Giray B., Gürbay A., Hincal F.: Cypermethrin-induced oxidative stress in rat brain and liver is prevented by vitamin E or allopurinol. *Toxicol. Lett.* **2001**, 118, 139-46.

Goel A., Dani V., Dhawan D.K.: Protective effects of zinc on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and hepatic histoarchitecture in chlorpyrifos-induced toxicity. *Chem. Biol. Interact.* **2005**, 156, 131-40.

Gordon C.J., Grantham T.A., Yang Y.: Hypothermia and delayed fever in the male and female rat exposed to chlorpyrifos. *Toxicology* **1997**, 118, 149-58.

Gordon C.J.: Behavioral thermoregulatory response to chlorpyrifos in the rat. *Toxicology* **1997**, 124, 165-71.

Grajeda-Cota P., Ramirez-Mares M.V., Gonzalez de Mejia E.: Vitamin C protects against in vitro cytotoxicity of cypermethrin in rat hepatocytes. *Toxicol. In Vitro* **2004**, 18, 13-9.

Gultekin F., Ozturk M., Akdogan M.: The effect of organophosphate insecticide chlorpyrifos-ethyl on lipid peroxidation and antioxidant enzymes (*in vitro*). *Arch. Toxicol.* **2000**, 74, 533-8.

Haley R.W., Marshall W.W., McDonald G.G., Daugherty M.A., Petty F., Fleckenstein J.L.: Brain abnormalities in Gulf War syndrome: evaluation with ¹H NMR spectroscopy. *Radiology*. **2000**, 215, 807-17.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C.: Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, Oxford, New York **1999**.

Hardt J, Angerer J.: Biological monitoring of workers after the application of insecticidal pyrethroids. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **2003**, 76, 492-8.

Harel M., Aharoni A., Gaidukov L., Brumshtein B., Khersonsky O., Meged R., Dvir H., Ravelli R.B.G., McCarthy A., Toker L., Silman I., Sussman J.L., Tawfik D.S.: Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, 11, 412-9.

Hayes W.J., Laws E.R. (red.): Handbook of Pesticide Toxicology. Academic Press, San Diego **1991**.

- Hernandez F., Sancho J.V., Pozo O.J.:** Direct determination of alkyl phosphates in human urine by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2002**, 16, 1766-73.
- Heudorf U., Angerer J., Drexler H.:** Current internal exposure to pesticides in children and adolescents in Germany: urinary levels of metabolites of pyrethroid and organophosphorus insecticides. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **2004**, 77, 67-72.
- Hinomori T., Narahashi T., Kawaguchi S., Sako H., Suzuki T., Miyamoto J.:** Therapeutic effects of methocarbamol on acute intoxication by pyrethroids in rats. *J. Pestic. Sci.* **1986**, 11, 9-14.
- Huckle K.R., Hutson D.H., Millburn P.:** Species differences in the metabolism of 3-phenoxybenzoic acid. *Drug Metab. Dispos.* **1981 a**, 9, 352-9.
- Huckle K.R., Chipman J.K., Hutson D.H., Millburn P.:** Metabolism of 3-phenoxybenzoic acid and the enterohepato-renal disposition of its metabolites in the rat. *Drug Metab. Dispos.* **1981 b**, 9, 360-8.
- Huff R.A., Abou-Donia M.B.:** In vitro effect of chlorpyrifos oxon on muscarinic receptors and adenylate cyclase. *Neurotoxicology* **1995**, 16, 281-90.
- Huff R.A., Corcoran J.J., Anderson J.K., Abou-Donia M.B.:** Chlorpyrifos oxon binds directly to muscarinic receptors and inhibits cAMP accumulation in rat striatum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1994**, 269, 329-35.
- Hunter D.L., Lassiter T.L., Padilla S.:** Gestational exposure to chlorpyrifos: comparative distribution of trichloropyridinol in the fetus and dam. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1999**, 158, 16-23.
- Hutson D.H., Casida J.E.:** Taurine conjugation in metabolism of 3-phenoxybenzoic acid and the pyrethroid insecticide cypermethrin in mouse. *Xenobiotica* **1978**, 8, 565-71.
- Hutson D.H., Logan C.J.:** The metabolic fate in rats of the pyrethroid insecticide WL85871, a mixture of two isomers of cypermethrin. *Pestic. Sci.* **1986**, 17, 548-58.
- Jacobsen H., Østergaard G., Lam H.R., Poulsen M.E., Frandsen H., Ladefoged O., Meyer O.:** Repeated dose 28-day oral toxicity study in Wistar rats with a mixture of five pesticides often found as residues in food: alphacypermethrin, bromopropylate, carbendazim, chlorpyrifos and mancozeb. *Food Chem. Toxicol.* **2004**, 42, 1269-77.
- Jitsunari F., Asakwa F., Nakajima T., Shimada J., Ogata M.:** Determination of 3,5,6-trichloro-2-pyridinol levels in the urine of termite control workers using chlorpyrifos. *Acta Med. Okayama* **1989**, 43, 299-306.
- Johnson D.E., Seidler F.J., Slotkin T.A.:** Early biochemical detection of delayed neurotoxicity resulting from developmental exposure to chlorpyrifos. *Brain Res. Bull.* **1998**, 45, 143-7.
- Kale M., Rathore N., John S., Bhatnagar D.:** Lipid peroxidative damage on pyrethroid exposure and alterations in antioxidant status in rat erythrocytes: a possible involvement of reactive oxygen species. *Toxicol. Lett.* **1999**, 105, 197-205.

Kaloyanova F.P., El Batawi M.A.: Human Toxicology of Pesticides. CRC Press, Boca Raton, 1991.

Karanth S., Pope C.: Carboxylesterase and A-esterase activities during maturation aging: relationship to the toxicity of chlorpyrifos and parathion in rats. *Toxicol. Sci.* **2000**, 58, 282-9.

Katz E.J., Cortes V.I., Eldefrawi M.E., Eldefrawi A.T.: Chlorpyrifos, parathion, and their oxons bind to and desensitize a nicotinic acetylcholine receptor: relevance to their toxicities. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1997**, 146, 227-36.

Khan S.M., Sobti R.C., Kataria L.: Pesticide-induced alteration in mice hepato-oxidative status and protective effects of black tea extract. *Clin. Chim. Acta* **2005**, 358, 131-8.

Kim K.B., Bartlett M.G., Anand S.S., Bruckner J.V., Kim H.J.: Rapid determination of the synthetic pyrethroid insecticide, deltamethrin, in rat plasma and tissues by HPLC. *J. Chromatogr. B* **2006**, 834, 141-8.

Koch H.M., Angerer J.: Analysis of 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in urine samples from the general population using gas chromatography – mass spectrometry after steam distillation and solid-phase extraction. *J. Chromatogr. B* **2001**, 759, 43-9.

Kousba A.A., Poet T.S., Timchalk C.: Characterization of the in vitro kinetic interaction of chlorpyrifos-oxon with rat salivary cholinesterase: A potential biomonitoring matrix. *Toxicology* **2003**, 188, 219-32.

Krechniak J., Łoboda-Pelplińska T.: Effect of selected pyrethroids on cholinesterase activity in rat. *Bromatol. Chem. Toksykol.* **1991**, 24, 205-9.

Kühn K.-H., Leng G., Bucholski K.A., Dunemann L., Idel H.: Determination of pyrethroid metabolites in human urine by capillary gas chromatography – mass spectrometry. *Chromatographia* **1996**, 43, 285-92.

Kühn K.-H., Wieseler B., Leng G., Idel H.: Toxicokinetics of pyrethroids in humans: consequences for biological monitoring. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1999**, 62, 101-8.

Kupfermann N., Schmoldt A., Steinhart H.: Rapid and sensitive quantitative analysis of alkyl phosphates in urine after organophosphate poisoning. *J. Anal. Toxicol.* **2004**, 28, 242-8.

Latuszyńska J., Luty S., Raszewski G., Tokarska-Rodak M., Przebirowska D., Przylepa E., Haratym-Maj A.: Neurotoxic effect of dermally – applied chlorpyrifos and cypermethrin in Wistar rats. *Ann. Agric. Environ. Med.* **2001**, 8, 163-70.

Lawrence L.J., Casida J.E.: Stereospecific action of pyrethroid insecticides on the γ -aminobutyric acid receptor-ionophore complex. *Science* **1983**, 221, 1399-401.

Lawrence L.J., Gee K.W., Yamamura H.I.: Interactions of pyrethroid insecticides with chloride ionophore-associated binding sites. *Neurotoxicology* **1985**, 6, 87-98.

Leng G., Gries W.: Simultaneous determination of pyrethroid and pyrethrin metabolites in human urine by gas chromatography-high resolution mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **2005**, 814, 285-94.

- Lodovici M., Casalini C., Briani C., Dolara P.:** Oxidative liver DNA damage in rats treated with pesticide mixtures. *Toxicology* **1997**, 117, 55-60.
- Lombet M.H., Mourre C., Lazdunski M.:** Interaction of insecticides of the pyrethroid family with specific binding sites on the voltage-dependent sodium channel from mammalian brain. *Brain Res.* **1988**, 459, 44-53.
- Loper B.L., Anderson K.A.:** Determination of pyrethrin and pyrethroid pesticides in urine and water matrixes by liquid chromatography with diode array detection. *J. AOAC Int.* **2003**, 86, 1236-40.
- Lotti M., Moretto A., Zoppellari R., Dainese R., Rizzuto N., Barusco G.:** Inhibition of lymphocytic neuropathy target esterase predicts the development of organophosphate-induced delayed polyneuropathy. *Arch. Toxicol.* **1986**, 59, 176-9.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.:** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, 193, 265-75.
- Lukowicz-Ratajczak J., Krechniak J.:** Effects of deltamethrin on the immune system in mice. *Environ. Res.* **1992**, 59, 467-75.
- Lund A.E., Narahashi T.:** Dose-dependent interaction of the pyrethroid isomers with sodium channels of squid axon membranes. *Neurotoxicology* **1982**, 3, 11-24.
- Lund A.E., Narahashi T.:** Kinetics of sodium channel modification by the insecticide tetramethrin squid axon membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1981**, 212, 287-93.
- Ma T., Chambers J.E.:** Kinetic parameters of desulfuration and dearylation of parathion and chlorpyrifos by rat liver microsomes. *Food Chem. Toxicol.* **1994**, 32, 763-7.
- Mackness B., Durrington P.N., Mackness M.I.:** Human serum paraoxonase. *Gen. Pharmacol.* **1998**, 31, 329-36.
- Malaviya M., Husain R., Seth P.K., Husain R.:** Perinatal effects of two pyrethroid insecticides on brain neurotransmitter function in the neonatal rat. *Vet. Hum. Toxicol.* **1993**, 35, 119-22.
- Manna S., Bhattacharyya D., Mandal T.K., Das S.:** Repeated dose toxicity of alfa-cypermethrin in rats. *J. Vet. Sci.* **2004**, 5, 241-5.
- Marei A.E.-S., Ruzo L.O., Casida J.E.:** Analysis and persistence of permethrin, cypermethrin, deltamethrin, and fenvalerate in the fat and brain of treated rats. *J. Agric. Food Chem.* **1982**, 30, 558-62.
- Martin T., Ochou O. G., Vaissayre M., Fournier D.:** Organophosphorus insecticides synergize pyrethroids in the resistant strain of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hubner) (*Lepidoptera: Noctuidae*) from West Africa. *J. Econ. Entomol.* **2003**, 96, 468-74.
- McCall P.J., Swann R.L., Laskowski D.A., Unger S.M., Vrona S.A., Dishburger H.J.:** Estimation of chemical mobility in soil from liquid chromatographic retention times. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1980**, 24, 190-5.

- McCarthy A.R., Thomson B.M., Shaw I.C., Abell A.D.:** Estrogenicity of pyrethroid insecticide metabolites. *J. Environ. Monit.* **2006**, 8, 197-202.
- Moffat A.C. (red.):** Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. Third Edition. Pharmaceutical Press **2004**.
- Mortensen S.R., Chanda S.M., Hooper M.J., Padilla S.:** Maturational differences in chlorpyrifos-oxonase activity may contribute to age-related sensitivity to chlorpyrifos. *J. Biochem. Toxicol.* **1996**, 11, 279-87.
- Moser V.C.:** Comparison of the acute effects of cholinesterase inhibitors using a neurobehavioral screening battery in rats. *Neurotoxicol. Teratol.* **1995**, 17, 617-25.
- Moser V.C., Chanda S.M., Mortensen S.R., Padilla S.:** Age- and gender-related differences in sensitivity to chlorpyrifos in the rat reflect developmental profiles of esterase activities. *Toxicol. Sci.* **1998**, 46, 211-22.
- Moser V.C., Padilla S.:** Age- and gender-related differences in the time course of behavioral and biochemical effects produced by oral chlorpyrifos in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1998**, 149, 107-19.
- Mostafa I.Y., Adam Y.M., Zayed S.M.:** Bioalkylation of nucleic acids in mice by insecticides. I. Alkylation of liver RNA and DNA by chlorpyrifos. *Z. Naturforsch [C]* **1983**, 38, 461-4.
- Musshoff F., Junker H., Madea B.:** Simple determination of 22 organophosphorous pesticides in human blood using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *J. Chrom. Sci.* **2002**, 40, 29-34.
- Mutch E., Williams F.M.:** Diazinon, chlorpyrifos and parathion are metabolised by multiple cytochromes P450 in human liver. *Toxicology* **2006** [w druku].
- Namba T., Nolte C.T., Jackrel J., Grob D.:** Poisoning due to organophosphate insecticides. Acute and chronic manifestations. *Amer. J. Med.* **1971**, 50, 475-92.
- Narahashi T.:** Mode of action of pyrethroids. *B. World Health Organ.* **1971**, 44, 337-45.
- Narahashi T.:** Nerve membrane Na⁺ channels as targets of insecticides. *Trends Pharmacol. Sci.* **1992**, 13, 236-41.
- Nasuti C., Cantalamessa F., Falcioni G., Gabbianelli R.:** Different effects of Type I and Type II pyrethroids on erythrocyte plasma membrane properties and enzymatic activity in rats. *Toxicology* **2003**, 191, 233-44.
- Nolan R.J., Rick D.L., Freshour N.L., Saunders J.H.:** Chlorpyrifos: pharmacokinetics in human volunteers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1984**, 73, 8-15.
- Nostrandt A.C., Padilla S., Moser V.C.:** The relationship of oral chlorpyrifos effects on behavior, cholinesterase inhibition, and muscarinic receptor density in rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1997**, 58, 15-23.

- Ogata N., Vogel S.M., Narahashi T.:** Lindane but not deltamethrin blocks a component of GABA-activated chloride channels. *FASEB J.* **1988**, 2, 2895-900.
- Oortgiesen M., van Kleef R.G.D.M., Vijverberg H.P.M.:** Effects of pyrethroids on neurotransmitter-operated ion channels in cultured mouse neuroblastoma cells. *Pestic. Biochem. Physiol.* **1989**, 34, 164-73.
- Orchard I.:** The effect of pyrethroids on the electrical activity of neurosecretory cells from the brain of *Rhodnius prolixus*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **1980**, 13, 220-6.
- Palmer J.S., Rowe L.D., Crookshank H.R.:** Effect of age on tolerance of calves to chlorpyrifos. *Am. J. Vet. Res.* **1981**, 41, 1323-5.
- Pond A.L., Chambers H.W., Chambers J.E.:** Organophosphate detoxication potential of various rat tissues via A-esterase and aliesterase activities. *Toxicol. Lett.* **1995**, 78, 245-52.
- Prakasam A., Sethupathy S., Lalitha S.:** Plasma and RBCs antioxidant status in occupational male pesticide sprayers. *Clin. Chim. Acta* **2001**, 310, 107-12.
- Quistad G.B., Liang S.N., Fisher K.J., Nomura D.K., Casida J.E.:** Each lipase has a unique sensitivity profile for organophosphorus inhibitors. *Toxicol. Sci.* **2006**, 91, 166-72.
- Ramadian A., Bacry N.M., Marei A.-S.M., Eldefrawi A.T., Eldefrawi M.E.:** Actions of pyrethroids on the peripheral benzodiazepine receptor. *Pestic. Biochem. Physiol.* **1988**, 32, 106-13.
- Ramesh A., Ravi P.E.:** Negative ion chemical ionization-gas chromatographic-mass spectrometric determination of residues of different pyrethroid insecticides in whole blood and serum. *J. Anal. Toxicol.* **2004**, 28, 660-6.
- Rao G.V., Rao K.S.:** Modulation in acetylcholinesterase of rat brain by pyrethroids in vivo and an in vitro kinetic study. *J. Neurochem.* **1995**, 65, 2259-66.
- Ray D.E., Cremer J.E.:** The action of decamethrin (a synthetic pyrethroid) in the rat. *Pestic. Biochem. Physiol.* **1979**, 10, 333-40.
- Reigat J.R., Roberts J.R.:** Recognition and management of pesticide poisonings. U.S. EPA, Fifth Edition **1999** (dostęp 31.05.2006)
<http://www.epa.gov/pesticides/safety/healthcare/handbook/handbook.pdf>.
- Rejestr środków ochrony roślin dopuszczonych do obrotu zezwoleniem Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi.** <http://www.bip.minrol.gov.pl/> (dostęp 31.05.2006).
- Rhodes C., Jones B.K., Croucher A., Hutson D.H., Logan C.J., Hopkins R., Hall B.E., Vickers J.A.:** The bioaccumulation and biotransformation of *cis,trans*-cypermethrin in the rat. *Pestic. Sci.* **1984**, 25, 471-80.
- Rice-Evans C.A., Diplock A.T., Symons M.C.R.:** Techniques in free radical research. Elsevier, Amsterdam **1991**.
- Richardson R.J., Moore T.B., Kayyali U.S., Fowke J.H., Randall J.C.:** Inhibition of hen acetylcholinesterase and neurotoxic esterase by chlorpyrifos in vivo and kinetics of inhibition

by chlorpyrifos oxon in vitro: application to assessment of neuropathic risk. *Fundam. Appl. Toxicol.* **1993**, 20, 273-9.

Rowsey P.J., Gordon C.J.: Tumor necrosis factor is involved in chlorpyrifos-induced changes in core temperature in the female rat. *Toxicol. Lett.* **1999**, 109, 51-9.

Schettgen T., Heudorf U., Drexler H., Angerer J.: Pyrethroid exposure of the general population-is this due to diet. *Toxicol. Lett.* **2002**, 134, 141-5.

Schettgen T., Koch H.M., Drexler H., Angerer J.: New gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of urinary pyrethroid metabolites in environmental medicine. *J. Chromatogr. B* **2002**, 778, 121-30.

Sedlak J., Lindsay R.H.: Estimation of total, protein-bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* **1968**, 25, 192-205.

Seńczuk W. (red.): Toksykologia współczesna. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa **2005**.

Seth V., Banerjee B.D., Bhattacharya A., Pasha S.T., Chakravorty A.K.: Pesticide induced alterations in acetylcholine esterase and gamma glutamyl transpeptidase activities and glutathione level in lymphocytes of human poisoning cases. **2001**, 34, 427-9.

Smith G.N., Watson B.S., Fischer F.S.: Investigations on dursban insecticide: Metabolism of [³⁶Cl] O,O-diethyl-O- 3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate in rats. *J. Agric. Food Chem.* **1967**, 15, 132-8.

Smith P.A., Thompson M.J., Edwards J.W.: Estimating occupational exposure to the pyrethroid termicide bifenthrin by measuring metabolites in urine. *J. Chromatogr. B* **2002**, 778, 113-20.

Soderlund D. M., Casida J.E.: Effects of pyrethroid structure on rates of hydrolysis and oxidation by mouse liver microsomal enzymes. *Pestic. Biochem. Physiol.* **1977**, 7, 391-401.

Sparks S.E., Quistad G.B., Casida J.E.: Organophosphorus pesticide-induced butyrylcholinesterase inhibition and potentiation of succinylcholine toxicity in mice. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **1999**, 13, 113-8.

Sultatos L.G., Basker K.M., Shao M., Murphy S.D.: The interaction of the phosphorothioate insecticides chlorpyrifos and parathion and their oxygen analogues with bovine serum albumin. *Mol. Pharmacol.* **1984**, 26, 99-104.

Sultatos L.G., Minor L.D., Murphy S.D.: Metabolic activation of phosphorothioate pesticides: role of the liver. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1985**, 232, 624-8.

Sultatos L.G., Murphy S.D.: Kinetic analyses of the microsomal biotransformation of the phosphorothioate insecticides chlorpyrifos and parathion. *Fundam. Appl. Toxicol.* **1983**, 3, 16-21.

Sultatos L.G.: Factors affecting the hepatic biotransformation of the phosphorothioate pesticide chlorpyrifos. *Toxicology* **1988**, 51, 191-200.

- Sultatos L.G.:** Metabolic activation of the organophosphorus insecticides chlorpyrifos and fenitrothion by perfused rat liver. *Toxicology* **1991**, 68, 1-9.
- Sunaga M., Yoshida M., Hara I.:** Metabolism and urinary excretion of chlorpyrifos in rats. *Nippon Eiseigaku Zasshi*. **1989**, 43, 1124-9.
- Takamiya K.:** Monitoring of urinary alkyl phosphates in pest control operators exposed to various organophosphorus insecticides. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1994**, 52, 190-5.
- Thiebalut J., Bost J., Foulhoux P.:** Experimental intoxication by deltamethrin in the dog and its treatment. *Collect. Med. Leg. Toxicol. Med.* **1985**, 131, 47-62.
- Timchalk C., Poet T.S., Hinman M.N., Busby A.L., Kousba A.A.:** Pharmacodynamic interaction for a binary mixture of chlorpyrifos and diazinon in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2005**, 205, 31-42.
- Tsoukali H., Theodoridis G., Raikos N., Grigoratou I.:** Solid phase microextraction gas chromatographic analysis of organophosphorus pesticides in biological samples. *J. Chromatogr. B* **2005**, 822, 194-200.
- Tucker S.B., Flannigan S.A., Ross C.E.:** Inhibition of cutaneous parasthesia resulting from synthetic pyrethroid exposure. *Int. J. Dermatol.* **1984**, 10, 686-9.
- Tush G.M., Anstead M.I.:** Pralidoxime continuous infusion in the treatment of organophosphate poisoning. *Ann. Pharmacother.* **1997**, 31, 441-4.
- Vasilić Ž., Drevenkar V., Štengl B., Fröbe Z., Rumenjak V.:** Diethylphosphorous metabolites in serum and urine of persons poisoned by phosalone. *Chem.-Biol. Interact.* **1993**, 87, 305-13.
- Verma R.S., Srivastava N.:** Chlorpyrifos induced alterations in levels of thiobarbituric acid reactive substances and glutathione in rat brain. *Indian J. Exp. Biol.* **2001**, 39, 174-7.
- Vivjerberg H.P.M., van den Bercken J.:** Neurotoxicological effects and the mode of action of pyrethroid insecticides. *Crit. Rev. Toxicol.* **1990**, 21, 105-26.
- Whitney K.D., Seidler F.J., Slotkin T.A.:** Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: cellular mechanisms. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1995**, 134, 53-62.
- Woollen B.H., Marsh J.R., Laird W.J.D., Lesser J.E.:** The metabolism of cypermethrin in man: differences in urinary metabolite profiles following oral and dermal administration. *Xenobiotica* **1992**, 22, 983-91.
- de Zwart L.L., Meerman J.H., Commandeur J.N., Vermeulen N.P.:** Biomarkers of free radical damage: Applications in experimental animals and in humans. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, 26, 202-26.

ZAŁĄCZNIK NR 1. WYKAZ ŚRODKÓW ZAWIERAJĄCYCH CHLOROPIRYFOS I
CYPERMETRYNĘ, DOPUSZCZONYCH DO OBROTU W POLSCE
Wg Rejestru MRiRW. Stan na dzień 31.05.2006

Nazwa preparatu	Skład	Producent	Klasa toksyczności dla ludzi	Termin ważności zezwolenia
Ant Stop AL.	0,4 % chloropiryfosu	Dow AgroSciences - USA	IV	26.02.2009
Chlormezyl 500 EC	278 g chloropiryfosu 222 g dimetoatu w 1 litrze środka	Chimac Agriphar S.A. - Belgia	szkodliwy	02.02.2008
Dursban 480 EC	480 g chloropiryfosu w 1 litrze środka	Dow AgroSciences Polska Sp. z o.o.	szkodliwy	27.05.2012
Kuspiryfos 480 EC	480 g chloropiryfosu w 1 litrze środka	Agrofarm Sp. z o.o. - Racibórz	III	26.07.2011
Nurelle D 550 EC	500 g chloropiryfosu 50 g cypermetryny w 1 litrze środka	Dow AgroSciences Polska Sp. z o.o.	III	17.02.2008
Pyrinex 480 EC	480 g chloropiryfosu w 1 litrze środka	Makhteshim- Agan - Izrael	III	17.07.2007
Brasikol 250 FS	200 g imidachlopyrydu 50 g alfa- cypermetryny w 1 litrze środka	Z.P.U.H. "Best- Pest" - Jaworzno	III	16.03.2011

Nazwa preparatu	Skład	Producent	Klasa toksyczności dla ludzi	Termin ważności zezwolenia
Insektum A 01 AL	0,01% alfa-cypermetryny	Przedsiębiorstwo Produkcyjno-Handlowe "Stanisław Dorociak" –	IV	03.01.2007
Sherpa 100 EC	100 g cypermetryny w 1 litrze środka	Aventis CropScience S.A. - Francja	IV	12.03.2012
Ammo 250 EC	250 g cypermetryny w 1 litrze środka	FMC Corporation - USA	III	28.07.2008
Ripcord Super 050 EC	50 g alfa-cypermetryny w 1 litrze środka	BASF - Niemcy	III	21.05.2009
Fury 100 EW	100 g zeta-cypermetryny w 1 litrze środka	FMC Corporation - USA	szkodliwy	29.03.2009
Fury 100 EC	100 g zeta-cypermetryny w 1 litrze środka	FMC Corporation - USA	III	05.06.2005
Cyperkill Super 25 EC	25% cypermetryny	Mitchell Cotts Chemicals Ltd - Wielka Brytania	III	28.05.2009
Ripcord Nowy 050 EC	50 g alfa-cypermetryny w 1 litrze środka	BASF - Niemcy	III	31.01.2009

ZAŁĄCZNIK NR 2. OPINIA LOKALNEJ KOMISJI ETYCZNEJ

BIURO LOKALNEJ KOMISJI ETYCZNEJ
do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach
AKADEMIA MEDYCZNA W GDANSKU
80-210 Gdańsk, ul. Marii Skłodowskiej-Curie 3 A
tel./fax (058) 349-15-10

Nr opinii	53/04
Data	06.12.2004
Nr wniosku	54/04
Data	29.11.2004

OPINIA LOKALNEJ KOMISJI ETYCZNEJ

(Kopia wniosku jest integralną częścią opinii)

Lokalna Komisja Etyczna w Gdańsku
rozpatrzyła na posiedzeniu w dniu 06.12.2004 r. wniosek o realizację projektu p.t.:
„Wpływ *Alfa*-cypemetryny i chloropiryfosu podawanych indywidualnie i łącznie na parametry
stresu oksydacyjnego u szczurów”

złożony przez : mgr Bartosza Wielgomasa

zatrudnioną/ego w : Katedrze i Zakładzie Toksykologii AMG

dopuszczalną (D)

niedopuszczalną (N)

Ustalono, że:

1. Doświadczenia należy zaliczyć do kategorii:

- badania na żywych kręgowcach
- testy na żywych kręgowcach
- doświadczenia na żywych kręgowcach dla celów dydaktycznych

2. Najwyższa wartość stopnia inwazyjności proponowanych procedur nie przekracza

2

3. Doświadczenia mogą być wykonywane na zwierzętach

Lp.	Gatunek	Liczba zwierząt
1)	Szczury	60
2)		
3)		

Szczegółowe uzasadnienie

Komisja wniosek uznała za prawidłowy pod względem merytorycznym i dobrze uzasadniony. Zaproponowana metodyka oraz stopień inwazyjności (2) doświadczeń są zgodne ze stosowanymi w tego typu badaniach. Również liczba zwierząt przewidywanych do doświadczeń nie budzi zastrzeżeń Komisji.

Odwolanie od niniejszej opinii do KKE w Warszawie przysługuje kierownikowi jednostki i wnioskodawcy. Odwołanie składa się za pośrednictwem lokalnej komisji, która wydała opinię, w terminie jednego miesiąca od dnia otrzymania opinii (Dz. U. Nr 38 poz. 361 art. 30 z dnia 21 kwietnia 1999r).

PRZEWODNICZĄCA
Lokalnej Komisji Etycznej
do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach

dr n. przyr. Joanna Starczak

Miejsce: Gdańsk
Data: 08.12.2004r.

Przewodniczący Lokalnej Komisji Etycznej
w Gdańsku