

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKЕ MEDICINE



Dejana Ćupić Miladinović

Doktor veterinarske medicine

**Ispitivanje antioksidativnog i
antiinflamatornog potencijala vitamina B1
kod japanskih prepelica (*Coturnix japonica*)
subakutno tretiranih hlорpirifosom**

Doktorska disertacija

Beograd, 2019.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE



Dejana Ćupić Miladinović

Doctor of veterinary medicine

**Assessment of the antioxidant and
anti-inflammatory potential of vitamin B1 in
Japanese quails (*Coturnix japonica*)
subacute treated with chlorpyrifos**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019.

MENTORI

Dr Sunčica Borožan, redovni profesor

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Dr Andreja Prevendar Crnić, redovni profesor

Veterinarski fakultet, Sveučilišta u Zagrebu

ČLANOVI KOMISIJE

Dr Saša Ivanović, docent

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Dr Sanja Dacić, docent

Biološki fakultet, Univerziteta u Beogradu

Dr Sanja Peković, naučni savetnik

Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković", Beograd

Datum odbrane:

.....

Rezultati istraživanja ove doktorske disertacije deo su istraživanja u okviru projekata — „Unapređenje i razvoj higijenskih i tehnoloških postupaka u proizvodnji namirnica životinjskog porekla u cilju dobijanja kvalitetnih i bezbednih proizvoda konkurentnih na svetskom tržištu“ (Ev. Br. III 46009 sa potprojektom „Hemijski kontaminanti hrane“ i projekta „Ćelijska i molekulska osnova neuroinflamacije: potencijalna ciljna mesta za translacionu medicinu i terapiju“ (Ev. Br. III 41014). Ove projekte finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Zahvalnica

Najveću zahvalnost dugujem mojoj mentorki, prof. dr Sunčici Borozan, na prenetom znanju, stručnom vođenju, svesrdnoj podršci, ukazanom poverenju i podsticanju u naučnoistraživačkom i eksperimentalnom radu, a posebno na prijateljstvu tokom svih godina zajedničkog rada.

Mentorki prof.dr Andreji Prevendar Crnić i članovima Komisije naučnom savetniku dr Sanji Peković, docentu dr Sanji Dacić i docentu dr Saši Ivanoviću zahvaljujem na značajnim komentarima i sugestijama, uloženom trudu i dragocenom vremenu koje su mi posvetili tokom izrade ove doktorske disertacije.

Želela bih da izrazim neizmernu zahvalnost na velikom razumevanju, bezrezervnoj pomoći i podršci tokom celog mog školovanja svojim roditeljima. Na kraju bih se zahvalila ćerki Lani koja je još pre svog rođenja, učestvovala, a kasnije i pomagala pri izradi ove doktorske disertacije. Njeno prisustvo i ljubav su mi dali posebnu snagu da prebrodim prepreke na koje sam nailazila, kao i volju da ovu disertaciju završim, tako da joj posvećujem naredne stranice.

ISPITIVANJE ANTIOKSIDATIVNOG I ANTIINFLAMATORNOG POTENCIJALA VITAMINA B1 KOD JAPANSKIH PREPELICA (*COTURNIX JAPONICA*) SUBAKUTNO TRETIRANIH HLORPIRIFOSOM

Rezime

Hlorpirifos (CPF) je hlorovani organofosfatni pesticid, odnosno insekticid, koji se pre svega koristi u poljoprivredi. Ovaj insekticid svoje delovanje kod sisara ostvaruje na najmanje tri načina: inhibicijom aktivnosti enzima acetilholinesteraze (AChE), izazivanjem oksidativnog stresa i izazivanjem funkcionalnog poremećaja endokrinih žlezda. Vitamin B1 (tiamin) spada u grupu hidrosolubilnih vitamina, koji se ne sintetiše u organizmu sisara, pa se mora unositi hranom. Tiamin preko acetil koenzima A (acetil-CoA) učestvuje u sintezi AChE i njegov nedostatak potencira delovanje organofostata. Postoji zajednička veza između deficita tiamina, neurodegenerativnih promena, oksidativnog stresa i apoptoze. Imajući u vidu da u dosadašnjoj literaturi nema podataka o ispitivanju protektivnog delovanja B1 vitamina nakon trovanja CPF-om kod ptica, postoji realna potreba da se ispita njegovo dejstvo u odgovarajućem modelu.

Cilj ovog istraživanja je bio da se ispita uticaj vitamina B1 u plazmi, jetri i mozgu kod Japanskih prepelica (*Coturnix japonica*) koje su bile tretirane različitim dozama CPF-a. Praćeni su sledeći parametri oksidativnog stresa: koncentracija malondialdehida (MDA), koncentracija nitrita (NO_2^-), koncentracija redukovano glutationa (GSH), aktivnost katalaze (CAT), superoksid dismutaze (SOD), glutation-S-transferaze (GST), mijeloperoksidaze (MPO), arilesteraze (ARE); ali i aktivnost acetil i butirilholinesteraze (AChE i BuChE), kao i aktivnost inducibilne azot-oksida sintaze (iNOS), ciklooksigenaze (COX), ekstracelularno regulisane kinaze (ERK) (regulatora apoptoze), c-jun regulisane kinaze (JNK), nivo B-ćelijskog limfoma (Bcl-2). Kod prepelica koje su bile tretirane CPF-om, ispitan je i uticaj vitamina B1 u plazmi i mozgu, na produkciju citokina – interleukina 1 (IL-1) i interleukina 6 (IL-6), kao i antioksidativni kapacitet samog vitamina B1.

Ispitivanje je rađeno na osamdeset Japanskih prepelica (2 kontrolne grupe i 6 eksperimentalnih, n=10/po grupi) muškog pola, starosti 3-4 nedelje. Jedna kontrolna

grupa je primala samo vitamin B1 dok je drugoj aplikovano kukuruzno ulje. Tokom tretmana koji je trajao 7 dana, pticama je jednom dnevno aplikovan, u kukuruznom ulju rastvoren CPF *per os* u dozama od 1,50 mg/kg tm; 3,00 mg/kg tm. i 6,00 mg/kg tm. Druge tri grupe su dobijale vitamin B1 u dozi od 10 mg/kg tm, pola sata nakon aplikacije CPF-a u prethodno navedenim dozama.

Rezultati dobijeni u ovom ispitivanju pokazuju da tiamin efikasno dovodi do oporavka aktivnosti BuChE u plazmi, jetri i mozgu koja je značajno inhibirana dejstvom CPF-a, dok je efekat odnosno poboljšanje aktivnosti AChE najbolje izraženo u mozgu. Tiamin pokazuje i antioksidativna svojstva, pošto smanjuje koncentraciju MDA, indikatora oksidativnog stresa, u plazmi, jetri i mozgu, čiji nivo raste posle dejstva CPF-a. Pored direktnog, tiamin deluje i indirektno antioksidativno, povećavajući antioksidativnu odbranu. Tiamin menja aktivnost antioksidativnih enzima mangan SOD i CAT, kao i aktivnost bakar, cink-SOD (SOD1), ARE i GST. Pored toga, tiamin povećava ukupnu koncentraciju GSH u mozgu, glavnog neenzimskog antioksidansa. Takođe, tiamin smanjenjem produkcije proinflamatornih medijatora IL-1 i IL-6, ostvaruje i antiinflamatorno dejstvo. Tiamin smanjuje oslobađanje NO_2^- u plazmi i mozgu, snižavajući i ekspresiju iNOS, dok u jetri povećava produkciju NO_2^- u odnosu na tretman sa CPF-om. Tiamin smanjuje aktivnost MPO u jetri i mozgu, dok u plazmi dolazi do veće aktivnosti u odnosu na dejstvo CPF-a. Tiamin takođe smanjuje ekspresiju COX-2 u jetri. Ispitivanjem signalnih mehanizama zaključeno je da tiamin ove efekte ostvaruje smanjujući aktivaciju ERK signalne kaskade u jetri i povećavajući ekspresiju Bcl-2 u mozgu.

Na osnovu rezultata prikazanih u ovoj doktorskoj disertaciji može da se zaključi da tiamin pokazuje antiinflamatorna i antioksidativna svojstva u mozgu, jetri i plazmi izazvanih CPF-om.

KLJUČNE REČI: hlorpirifos, tiamin, Japanske prepelice, inflamacija, oksidativni stres

NAUČNA OBLAST: Veterinarska medicina

UŽA NAUČNA OBLAST: Toksikologija

UDK BROJ: 615:577.164.1:598.241.4

ASSESSMENT OF THE ANTIOXIDANT AND ANTIINFLAMMATORY POTENTIAL OF VITAMIN B1 IN JAPANESE QUAILS (*COTURNIX JAPONICA*) SUBACUTE TREATED WITH CHLORPYRIFOS

Summary

Chlorpyrifos (CPF) is a chlorinated organophosphate pesticide, or insecticide, which is primarily used in agriculture. This insecticide achieves its function in the mammals in at least three ways: by inhibiting acetylcholinesterase (AChE), causing oxidative stress and functional disorder of the endocrine glands. Vitamin B1 (thiamine) belongs to a group of hydrosoluble vitamins, which is not synthesized in the mammalian organism, and must be taken with food. Thiamine, through acetyl Coenzyme A (acetyl-CoA), participates in the synthesis of AChE, and its deficiency potentiates the effects of organophosphates. There is a common link between thiamine deficiency, neurodegenerative changes, oxidative stress, and apoptosis. Bearing in mind that in the current literature there is no data on the testing of the protective activity of B1 vitamin after CPF poisoning in birds, there is an unmet need to examine its effects in the appropriate model.

The aim of this study was to investigate the influence of vitamin B1 on biochemical changes in the plasma, liver and brain of Japanese quail (*Coturnix japonica*) treated with different doses of chlorpyrifos. The following parameters of oxidative stress were examined: concentration of malondialdehyde (MDA), nitrite concentration (NO_2^-), concentration of reduced glutathione (GSH), activity of catalase (CAT), superoksid dismutase (SOD) glutathione-S-transferase (GST), myeloperoxidase (MPO), arylesterase (ARE). Cholinesterase activity (acetylcholinesterase – AChE and butyrylcholinesterase – BuChE), activity of inducible nitric oxide synthase (iNOS), and cyclooxygenase (COX2) and extracellular signal-regulated kinase (ERK) (apoptotic regulators), c-jun regulated kinase (JNK), and level of B-cell lymphoma (Bcl-2), were followed as well. In the plasma and brain of quails treated with CPF, we also studied the influence of vitamin B1 on the production of cytokines-interleukin 1 (IL-1) and interleukin 6 (IL-6), as well as the antioxidative capacity of vitamin B1.

The study was conducted on eighty male Japanese quails (2 control groups and 6 experimental groups, n = 10 per group), 3-4 weeks old. One control group was treated

only with vitamin B1, while the second one received pure corn oil. CPF dissolved in corn oil was administered to three groups of quails by gavage for 7 consecutive days at doses of 1,50 mg/kg BW; 3,00 mg/kg BW and 6,00 mg/kg BW. Another three groups were treated with 10 mg/kg BW of vitamin B1 i.m. 30 min after CPF administration (in above mentioned doses) for 7 consecutive days.

The results obtained in this dissertation showed that thiamine efficiently leads to the recovery of BuChE activity in the plasma, liver and brain that is significantly inhibited by CPF, while the effect or improvement of AChE activity is not pronounced. Thiamin also exhibits antioxidant properties, as it reduces the concentration of MDA in the liver and brain, an elevated oxidative stress indicator, the level of which increases after the treatment with the CPF. In plasma, thiamine slightly decreases MDA. In addition to direct antioxidant action, thiamine also acts indirectly, increasing antioxidant defense. Thiamin changes the activity of the following antioxidant enzymes: manganese SOD and CAT, as well as copper, zinc SOD, ARE and GST activity. In addition, thiamin increases the total concentration of GSH in the brain, the major non-enzymatic antioxidant. Thiamin achieves an anti-inflammatory effect by reducing the production of pro-inflammatory mediators, IL-1 and IL-6. Thiamine reduces the release of NO_2^- in plasma and brain by decreasing the expression of iNOS, while in the liver it increases the production of NO_2^- compared to the treatment with CPF. Thiamine reduces MPO activity in the liver and brain, while in plasma there is even greater activity than after the CPF treatment. Thiamine also reduces the expression of COX-2 in the liver. Investigation of signalling mechanisms led us to conclude that the thiamine achieved these effects by reducing the activation of the ERK signalling cascade in liver and increasing Bcl-2 in brain.

Based on the results presented in this dissertation, it can be concluded that thiamine exhibits anti-inflammatory and antioxidant properties in the brain, liver and plasma of CPF treated Japanese quails.

KEY WORDS: chlorpyrifos, thiamine, Japanese quails, inflammation, oxidative stress

FIELD OF SCIENCE: Veterinary medicine

SPECIFIC FIELD OF SCIENCE: Toxicology

UDK NUMBER: 615:577.164.1:598.241.4

SKRAĆENICE

Ac-CoA - Acetil koenzim A

AChE - acetilholinesteraza

ApoA - Apolipoprotein A

ApoB - Apolipoprotein B

ARE - arilesteraze

ATP - adenzin trifosfat

Bcl-2 - B-ćelijski limfom

BSA (*engl.* Bovine Serum Albumin) - goveđi serum albumin

BuChE - butirilholinesteraza

CAT – katalaza

CM - hilomikroni

CNS - centralni nervni sistem

CO - ugljen-monoksid

COX – ciklooksigenaza

CPF– hlörpirifos

Cu,Zn SOD, SOD1 - bakar cink superoksid dizmutaza

DFP-aza - diizopropilfluorofosfataza

eNOS - endotelne azotoksid-sintetaze

ERK (*engl.* extracellular signal-regulated kinase) - kinaza ćija je aktivnost regulisana vanćelijskim signalima

GABA - γ -aminobuterna kiselinu

GnRH - gonadotropni oslobađajući hormona iz hipotalamusa

GR - Glutation-reduktaza

GSH – redukovani glutation

GSH-Px - Glutation-peroksidaza

GST - Glutation-S-transferaza

H₂O₂ - vodonik peroksid

HDL (*engl.* high density lipoproteins) - lipoproteini velike gustine

HOCl - hipohlorasta kiselina

IDL (*engl.* intermediate density lipoproteins) - lipoproteini srednje gustine

IL-1 - interleukin-1
IL-6 - interleukin-6
iNOS - inducibilna azot-oksidi sintaza
JNK (*engl.* c-Jun N-terminal Kinase) - c-Jun N-terminalna kinaza
KaE - karboksilesteraza
KGDH - dehidrogenaza α -ketoglutaratne kiseline
KMB - krvno-moždana barijera
LCAT - lecitil-holesterol-acil-transferaza
LDL (*engl.* low density lipoproteins) - lipoproteini male gostine
LPO - lipidna peroksidacija
MAPK (*engl.* mitogen-activated protein kinases) - mitogenom aktivirane protein kinaze
MDA – malondialdehid
Mn SOD, SOD2 - mangan superoksid dismutaza
MPO - mijeloperoksidaze
NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NF- κ B (*engl.* nuclear factor- κ B) - jedarni faktor- κ B
nNOS - neuronalna azot-oksidi sintaza
NO – azot-oksidi
O₂^{•-} - super-oksidi anjon
•OH - hidroksilni radikal
¹O₂ - singletni kiseonik
ONOO⁻ - peroksinitrit
OFJ - organofosforna jedinjenja
PDH - dehidrogenaza pirogroždane kiseline
PI3K - fosfatidilinozitol 3-kinaza
RCS - reaktivne ugljenične vrste
RNK - ribonukleinska kiselina
RNS (*engl.* reactive nitrogen species) – reaktivne azotne vrste
ROS (*engl.* reactive oxygen species) - reaktivne kiseonične vrste
SOD - superoksid dismutaza
ROO[•] - peroksilni radikal
T4 - tiroksin

SADRŽAJ

UVOD	1
PREGLED LITERATURE	6
2.1. PESTICIDI – ISTORIJA	6
2.2. ORGANOFOSFORNA JEDINJENJA.....	8
2.2.1. Toksikokinetika i biotransformacija.....	8
2.2.2. Mehanizam delovanja organofosfata	9
2.2.3. Terapija trovanja	13
2.3. HLORPIRIFOS.....	13
2.3.1. Ograničenja primene	14
2.3.2. Toksikokinetika.....	15
2.3.3. Mehanizam toksičnog delovanja.....	16
2.3.4. Toksični efekti hlorpirifosa	18
2.3.5. Efekti na životnu sredinu.....	26
2.4. TOKSIČNI EFEKTI PESTICIDA NA PTICE.....	27
2.4.1. Dejstvo organofosfata na ptice.....	29
2.4.2. Dejstvo hlorpirifosa na ptice	31
2.5. VITAMIN B1.....	32
2.5.1. Farmakodinamika.....	32
2.5.2. Farmakokinetika.....	35
2.5.3. Nedostatak ili deficit vitamina B1.....	36
2.6. OKSIDATIVNI STRES	36
2.6.1. Slobodni radikali	38
2.6.2. Mehanizmi odbrane od oksidativnog stresa.....	48
2.7. ANTIOKSIDATIVNO DELOVANJE VITAMINA B1	54
CILJEVI I ZADACI	55
MATERIJAL I METODE	57
4.1. DIZAJN EKSPERIMENTA	57
4.2. METODE ISPITIVANJA	59
4.2.1. Uzorkovanje biološkog materijala	59
4.2.2. Određivanje ukupne koncentracije proteina u plazmi i homogenatima	60
tkiva spektrofotometrijskom metodom	60
4.2.3. Određivanje relativne koncentracije proteina u krvnoj plazmi nativnom.....	61
poliakrilamid gel elektroforezom (nativna pag elektroforeza).....	61
4.2.4. Određivanje koncentracije hemoglobina.....	61
4.2.5. Određivanje koncentracije lipoproteina spektrofotometrijskom metodom... 61	
4.2.6. Određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima	61
4.2.7. Određivanje koncentracije vodonik peroksida.....	63
4.2.8. Određivanje parametara oksidativnog oštećenja ćelije	63
4.2.9. Određivanje aktivnosti holinesteraza	65
4.2.10. Imunohemijsko određivanje ekspresije enzima	66
(Western blot metoda).....	66

4.2.11. Određivanje nivoa proinflamatornih citokina IL-1 i IL-6 pomoću ELISA testa	69
4.2.12. Određivanje antioksidativne aktivnosti vitamina B1	69
4.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	71
REZULTATI	73
5.1. ISPITIVANJA OKSIDO-REDUKCIONIH PARAMETARA.....	73
5.1.1. Analiza aktivnosti enzima superoksid dismutaze.....	73
5.1.2. Analiza aktivnosti enzima katalaze	79
5.1.3. Analiza aktivnosti enzima glutation-s-transferaze	84
5.1.4. Analiza koncentracija redukovanog glutationa	88
5.1.5. Analiza koncentracije nitrita	92
5.1.6. Analiza koncentracije malondialdehida	96
5.1.7. Analiza aktivnosti mijeloperoksidaze	99
5.2. ISPITIVANJE UTICAJA VITAMINA B1 NA AKTIVNOSTI HOLINESTERAZA.....	
KOD PREPELICA TRETIRANIH HLORPIRIFOSOM.....	103
5.2.1. Ispitivanja aktivnosti holinesteraza u krvi.....	103
5.2.2. Ispitivanja aktivnosti holinesteraza u jetri.....	106
5.2.3. Ispitivanja aktivnosti holinesteraza u mozgu	108
5.2.4. Analiza ekspresije enzima uključenih u sintezu.....	
proinflamatornih molekula (COX-2, iNOS)	111
5.3. ISPITIVANJE UTICAJA HLORPIRIFOSA I VITAMINA B1 NA SIGNALNE PUTEVE	116
5.3.1. Ekstracelularnim signalom regulasana kinaza	116
5.3.2. C-jun n-terminalne kinaze	119
5.4. ISPITIVANJE PARAMETARA APOPTOZE (B-ĆELIJSKOG LIMFOMA).....	120
5.5. ODREĐIVENJE DISTRIBUCIJE ENZIMA LAKTAT-DEHIDROGENAZE U PLAZMI	122
5.6. ANALIZE SINTEZE PROTEINA PLAZME KOD PREPELICA TRETIRANIH.....	
HLORPIRIFOSOM I VITAMINOM B1	123
5.6.1. Analize lipoproteina plazme kod prepelica tretiranih hlorpirifosom.....	
i vitaminom B1	125
5.6.2. Analize koncentracije Apo A i Apo B u plazmi prepelica	
tretiranih hlorpirifosom i vitaminom B1	126
5.7. AKTIVNOST ARILESTERAZA.....	130
5.8. ISPITIVANJA UTICAJA VITAMINA B1 NA SINTEZU CITOKINA.....	134
5.8.1. Ispitivanja koncentracije interleukina-1 i interleukina-6 u plazmi.....	134
5.8.2. Ispitivanja koncentracije interleukina-1 i interleukina 6 u mozgu	136
5.9. ISPITIVANJA ANTIOKSIDATIVNOG KAPACITETA VITAMINA B1	139
5.9.1. Sposobnost hvatanja DPPH radikala.....	139
5.9.2. Redukciona sposobnost	139
5.10. OSMOTSKA FRAGILNOST ERITROCITA	140
DISKUSIJA	142
6.1. UTICAJ CPF-A I VITAMINA B1 NA PROMENE OKSIDO-.....	143
REDUKCIONIH PARAMETARA	143
6.2. UTICAJ CPF-A I VITAMINA B1 NA AKTIVNOST HOLINESTERAZE.....	149

6.3. UTICAJ CPF-A I VITAMINA B1 NA EKSPRESIJU ENZIMA UKLJUČENIH U.....	
SINTEZU PROINFLAMATORNIH MOLEKULA	152
6.4. UTICAJ CPF-A I VITAMINA B1 NA SIGNALNE PUTEVE.....	155
6.5. UTICAJ CPF-A I VITAMINA B1 NA PARAMETRE APOPTOZE	157
6.6. UTICAJ CPF-A I VITAMINA B1 NA AKTIVNOST LAKTAT-DEHIDROGENAZE.....	157
6.7. UTICAJ CPF-A I VITAMINA B1 NA SINTEZU PROTEINA.....	158
6.8. UTICAJ CPF-A I VITAMINA B1 NA SINTEZU LIPOPROTEINA.....	159
6.9. UTICAJ CPF-A I VITAMINA B1 NA SINTEZU CITOKINA	163
6.10. ANTIOKSIDATIVNI KAPACITET VITAMINA B1	164
ZAKLJUČAK	167
LITERATURA	170



I

U V O D

Danas se u svetu svakodnevno koristi veliki broj hemijskih jedinjenja, među kojima značajan procenat čine pesticidi. Gotovo da nema grane ljudske delatnosti, gde ova sredstva nisu našla svoju primenu, a poljoprivredna proizvodnja postala je praktično nemoguća bez njihove primene. Određeni pesticidi (kao na primer insekticidi i rodenticidi) su se pokazali kao veoma korisni u zaštiti ljudi, a naročito domaćih životinja od brojnih štetočina.

Nažalost, u mnogim slučajevima, i to pre svega u poljoprivredi, ova sredstva se neracionalno koriste. Usled toga se automatski povećava i stepen rizika, da će određena hemikalija lakše i brže doći u kontakt sa ljudima i životinjama i kod njih izazvati trovanje (Andrews i Humphrey, 1982; Gupta, 2007). Po stepenu ugroženosti, na prvom mestu su svakako divlje životinje, od kojih posebno treba spomenuti sisare i ptice. Pesticidi imaju veoma izražene efekte na ptice, naročito na vrste mesojeda, koje se nalaze na višem nivou lanca ishrane, a to su orlovi, jastrebovi i sove. Ove retke i ugrožene ptice su često osetljive na rezidue pesticida kroz lanac ishrane. Opadanje brojnosti populacije ptica, koje se hrane insektima, kao što su jarebice, tetrebi i fazani, jednim delom je vezano i za gubitak ili smanjenje populacije insekata na poljoprivrednim kulturama, usled upotrebe insekticida.

Zbog velike efikasnosti, dugo vremena su organofosfatna jedinjenja, bila među najviše korišćenim insekticidima, a među njima svakako hlorspirifos. U poslednjih

nekoliko godina (zbog toksičnosti i sve većeg razvoja rezistencije) organofosfatni insekticidi se sve manje koriste (Aaron, 2001).

Hlorpirifos (CPF) je hlorovano organofosfatno jedinjenje i jedan je od najviše korišćenih insekticida danas u svetu. Iako je upotreba organofosfata u opadanju u nekim zemljama, treba istaći da samo u Kini postoji čak 1022 registrovana preparata, koji sadrže CPF. Kina je u 2011. godini izvezla CPF u vrednosti od 110 miliona dolara, a smatra se da će njegova proizvodnja do 2020 godine u ovoj zemlji dostići količinu od preko 200 000 tona godišnje (Watts, 2013).

CPF se primenjuje pre svega u poljoprivredi u zaštiti velikog broja poljoprivrednih kultura od brojnih štetnih insekata. Zbog svoje široke primene CPF je prisutan svuda u okolini. Iz tog razloga, životinje i ljudi su uveliko izloženi ovom pesticidu, bilo prilikom upotrebe, kontakta sa tretiranim površinama, akcidentalnim gutanjem ili udisanjem kontaminirane prašine, vazduha u blizini tretiranih polja, voćnjaka ili u tretiranim zgradama, ili pak kontaktom sa ogrlicama koje se koriste za kućne ljubimce, te mogućim ostacima (reziduama) u hrani i vodi za piće (Watts, 2013).

CPF na sisare deluje toksično na najmanje tri načina. On, kao i ostali organofosfati, *inhibira enzim acetilholinesterazu (AChE)*, i time izaziva preteranu stimulaciju parasimpatičkog ili holinergičkog nervnog sistema. Pored toga, *izaziva oksidativni stres* koji je uključen u nastajanje mnogih bolesti kod životinja i ljudi, kao što su karcinogeneza, Parkinsonova bolest, Alchajmerova bolest, dijabetes i zastoj rada srca. Treći način delovanja se odnosi na izazivanje *funkcionalnog poremećaja endokrinih žlezda* (Watts, 2013). CPF ima antiandrogeni i estrogeni efekat, te deluje na hormone štitne žlezde. On inhibira metabolizam testosterona i estradiola, kao i sintezu testosterona. Smanjuje količinu kortizola i tireoidnog hormona tiroksina (T4), te indukuje promene u tireoidnoj i nadbubrežnoj žlezdi, a različito deluje na tireoidno-stimulirajuće hormone kod ljudi, pre svega kod žena (US EPA. 2011).

Američka Agencija za zaštitu životne sredine (US EPA, 2011), navodi da CPF nije mutagen, ali da je genotoksičan. Brojne epidemiološke studije ukazuju da bi CPF mogao biti karcinogen za ljude, te da postoji jaka veza sa nastajanjem raka pluća i debelog creva. Pored toga, u *in vitro* uslovima, utvrđeno je da hlorpirifos uzrokuje i rak mlečne žlezde (Watts, 2013). Teratogeni efekti CPF-a utvrđeni su u studijama izvedenim na životinjama i ljudima (Frag i sar., 2010; Muto i sar., 1992; Sherman, 1996).

Akutno i hronično izlaganje CPF-u može izazvati oštećenje jetre i poremećaje u njenoj metaboličkoj funkciji. Pošto je CPF potentni inhibitor jetrinog enzima CYP450, javlja se inhibicija i svih supstancija koji se metabolišu pomoću ovog enzima, kako endogenog (uključujući testosteron i estrogene), tako i onih egzogenog porekla (drugi pesticidi i lekovi) (Hodgson i Rose, 2008; Elsharkawi i sar., 2013; Watts, 2013).

Već pri niskim koncentracijama (nižim od onih koje pokreću proces inhibicije fetalne acetilholinesteraze) CPF ima svojstva potentnog neurotoksina. Izlaganje *in utero* i u ranom detinjstvu može kasnije uzrokovati promene (anomalije) u ponašanju kod adolescenata i odraslih (Slotkin i sar., 2006; Watts, 2013).

CPF i njegov metabolit hlorspirifos-okson imaju veći negativan uticaj na proliferaciju nervnih ćelija i toksičniji je za mozak u razvoju, nego akutno toksičniji organofosfati, kao što su diazinon i paration. Nezreli organizmi su daleko osetljiviji na efekte CPF-a, u smislu akutne toksičnosti i razvojnih neurobihejvioralnih efekata, nego zrele životinje (Slotkin i sar., 2006; Watts, 2013).

Epidemiološke studije su pokazale da akutna i hronična izloženost hlorspirifosu dovodi do niza dugotrajnih neuropsiholoških efekata, uključujući perifernu i centralnu neuropatiju, afektivne poremećaje i neurokognitivne deficite. On može prouzrokovati organofosfatima-indukovanu odloženu polineuropatiju i organofosfatima-indukovanu hroničnu neuropatiju, uključujući degeneraciju perifernog i centralnog nervnog sistema (CNS), što može rezultirati slabošću, obamrlosti i parestezijom, pa čak i paralizom, opasnom po život. On takođe može da izazove hronične neuropsihološke efekte, kao što su anksioznost, depresija, suicidalne ideje (Whyatt i Barr, 2001; Berkowitz i sar., 2004; Watts, 2013).

Tokom brojnih laboratorijskih i epidemioloških studija dobijeni su rezultati koji ukazuju da CPF deluje i imunotoksično. Naime, utvrđeno je da deluje na limfocite, timocite, faktor nekroze tumora i na autoimunost (Thrasher i sar., 1993; Gotoh i sar., 2001; Watts, 2013).

CPF je veoma toksičan za sisare i ptice, a pokazao se i kao izuzetno otrovan za pčele i korisne insekte. Subletalni efekti kod ptica se manifestuju u obliku smanjene sposobnosti letenja. Bilo je i više prijavljenih slučajeva uginuća ptica (EC. 2005, US; EPA. 2009; NZ EPA. 2012; Watts, 2013).

Vitamin B1, tiamin hidrohlorid, aneurin spada u grupu hidrosolubilnih vitamina, koji se ne sintetiše u organizmu sisara pa se mora unositi hranom (Adams, 2001; Muminović i sar., 2006). Utvrđeno je da ovaj vitamin ima brojne metaboličke i farmakološke efekte u organizmu.

Aktivni oblik tiamina, tiamin-pirofosfat (TPP) deluje kao koenzim u nekoliko sistema dekarboksilacije, a najviše enzima karboksilaze, koji je potreban za oksidativnu dekarboksilaciju α -keto kiselina (Adams, 2001). Tiamin je zato neophodan za konverziju pirogroždane kiseline u acetil-koenzim A (Ac-CoA), za unošenje atoma ugljenika u ciklus trikarboksilnih kiselina i za dekarboksilaciju α -ketoglutarne kiseline u sukcinil-CoA. TPP takođe učestvuje kao koenzim kod transketolaza, enzima koji katalizuju reakciju oksidacije u pentozo-fosfatnom putu, gde se uz pomoć 2 atoma ugljenika, molekule ribulozo-5-fosfata transformišu u molekule ribozo-5-fosfata, nakon čega dolazi do stvaranja sedoheptuloza-7-fosfata i glicerolaldehid-3-fosfata. Ovo je veoma bitno za sintezu ribonukleotida i nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfata, kao i sintezu masnih kiselina i holesterola. Potrebe za tiaminom su povećane kod ishrane bogate ugljenim hidratima (Muminović i sar., 2006).

Tiamin je neophodan i za normalno funkcionisanje nervnog tkiva. Zahvaljujući svojoj ulozi kao koenzima kokarboksilaze on u procesima oksidativne dekarboksilacije stimuliše stvaranje velike količine energije iz supstrata u ovom metabolički izuzetno aktivnom tkivu.

Pored toga, tiamin učestvuje i u neurohumoralnoj transmisiji. Neophodan je za sintezu acetilholina i za pasivni transport natrijuma kroz ekscitirane ćelijske membrane. Isto tako, utvrđeno je (preko sinteze acetyl-CoA) da vitamin B1 igra ulogu i u sintezi acetilholinesteraze (AChE) enzima koji razlaže acetilholin, neurotransmitera holinergičkog nervnog sistema. Usled toga, nedostatak tiamina će imati za posledicu i smanjen nivo AChE, a kao rezultat toga, potenciranje delovanja organofosfata. Zajedno sa butirilholinesterazom (BuChE), AChE deluje sinergistički na funkciju i održavanje holinergičkog nervnog sistema (Jokanović, 2001). Inače, obe holinesteraze (osim u mozgu) postoje u polimorfnoj formi i u drugim organima u organizmu. Imaju ulogu u raznim fiziološkim funkcijama, kao što su: ćelijska deoba, interakcije između samih ćelija, te aktivnosti amino-aril-acilaminidaze (Sharma i Bist, 2014).

Zbog svog snažnog *antioksidativnog delovanja* tiamin spada u grupu „antistres vitamina“. Antioksidativno delovanje ostvaruje inhibicijom nastanka lipidne peroksidacije i slobodnih radikala, koji nastaju oksidacijom nezasićenih masnih kiselina ćelijskih membrana (Watts, 2013).

Ukoliko dođe do porasta broja slobodnih radikala, nastaju oštećenja ćelija i ova pojava se naziva *oksidativni stres*, koji se manifestuje peroksidacijom membranskih i unutarćelijskih lipida, oksidativnim oštećenjem membranskih i unutarćelijskih proteina kao i molekula nukleinskih kiselina. Sva pomenuta oštećenja, ponaosob i zajedno, narušavaju integritet ćelija, i kao takva su povezana sa razvojem nekih bolesti, ali i sa starenjem (Finkel, 2003; Stevanović i Borozan., 2012).

Funkciju uklanjanja i inaktiviranja slobodnih radikala u organizmu vrši sistem antioksidativne odbrane. Najvažniji enzimi ove odbrane su: superoksid-dismutaza (SOD), katalaza (CAT) i enzimi glutation redoks ciklusa.

O direktnom *antiinflamatornom delovanju* vitamina B1 nema podataka u literaturi. Međutim, imajući u vidu povezanost neuroinflamacije, i povećane produkcije azot monoksida i molekula kiseonika, te stvaranja veoma reaktivnih jedinjenja azota, za očekivati je da vitamin B1 ima izvesnu i antiinflamatornu aktivnost.

Do sada, u literaturi nema podataka o ispitivanju protektivnog (antioksidativnog i antiinflamatornog) delovanja vitamina B1 kod prepelica trovanih CPF-om. Međutim, postoje podaci o ispitivanju uticaja deficita vitamina B1 na aktivnost holinergičkog nervnog sistema i enzime oksidativnog stresa kod miševa. Navedeni rezultati ispitivanja su pokazali da je indukovani nedostatak vitamina B1 kod miševa izazvao promene u stvaranju slobodnih radikala, kao i značajno smanjenje nivoa glutaciona i aktivnosti enzima AChE, BuChE i katalaze (Sharma i Bist, 2014).

Pored toga, dokazano je da postoji povezanost između deficita tiamina, neurodegenerativnih promena, oksidativnog stresa i apoptoze (Hazell i sar., 2013).

Imajući u vidu prethodno navedene činjenice, cilj naših istraživanja je bio da se ispita, da li i u kolikom stepenu vitamin B1 poseduje antioksidativni i antiinflamatorni efekat kod prepelica subakutno tretiranih CPF-om.



II

PREGLJED LITERATURE

2.1. PESTICIDI – ISTORIJA

Pesticidi su biocidi, supstance ili smеше supstanci namenjene za sprečavanje, uništavanje i suzbijanje štetnih organizama. Postoje podaci da su još 2 500 godina pre naše ere u Mesopotamiji ljudi koristili sumpor kao repelent. Na papirusu je zapisano oko 800 recepata za otrove i pesticide koje su koristili Egipćani 1550 godina pre naše ere (Banaszkiewicz, 2010). Era sintetskih organohlorinih jedinjenja započela je 1939. godine, kada je Muller u Švajcarskoj otkrio insekticidna svojstva p, p'-dihlor-o-difenil-trihloretan (DDT-a). Za ovo otkriće 1948. godine dobio je Nobelovu nagradu (Axmon i Rignell-Hidbom, 2006). DDT je bio veoma efikasan protiv štetočina na poljoprivrednim kulturama, ali se koristio i za suzbijanje vašaka kod ljudi i za uništavanje komaraca koji prenose malariju. Ovaj pesticid je bio u upotrebi sve do 1972. godine kada ga EPA zabranjuje. Benzen-heksahlorid (BHC) i hlordan su uvedeni tokom Drugog svetskog rata, a potom i dva ciklodienska organohlorina jedinjenja, aldrin i dieldrin, a zatim endrin, endosulfan i izobenzon.

Vremenom se pažnja usmeravala prema manje toksičnim organofosforinim (OF) i karbamatnim pesticidima, čija upotreba počinje 1975. godine u Americi. Ovi insekticidi potiču od jedinjenja koja su se koristila kao nervni otrovi tokom Drugog svetskog rata.

Zbog svoje degradibilnosti većina OF je ispoljila niži intenzitet kontaminacije vode, vazduha i zemljišta, ali je zabeležena pojava negativnih efekata kod domaćih životinja i velikog broja trovanja kod divljači (Hill, 2003). Tako je usled nepravilnog rukovanja ovim pesticidima došlo do masovnog trovanje gusaka pedesetih godina 20. veka (Livingston, 1952). Prvi karbamatni insekticid, karbaril deluje na nervnu transmisiju kod insekata, inhibira aktivnost holinesteraze (ChE), slično kao i OF. Karbamati su (aldikarb, metiokarb, metomil, karbofuran, bendiokarb i oksamil) širokog spektra delovanja, sa umerenom toksičnošću i postojanošću, i retko se deponuju ili uzrokuju značajnije efekte na okolinu.

Šezdesetih godina prošlog veka, sprovedena su laboratorijska ispitivanja o deponovanju u tkivima i toksičnim efektima pesticida na reproduktivne organe kod divljih ptica i sisara (lisice). U skladu sa tim doneti su brojni zakoni o regulaciji upotrebe pesticida (Van Emden i Peakall, 1996). Godine 1962. u Velikoj Britaniji, uvedena su ograničenja za upotrebu ciklodienskih pesticida, aldrina i dieldrina (Nevton i sar., 1992).

U narednim decenijama, osim akutne i hronične toksičnosti, ispitivani su i drugi klinički efekti pesticida, kao što su: embriotoksičnost, teratogenost, reproduktivni efekti, imunotoksičnost, efekti na endokrine funkcije i enzimske sisteme, kao i pojava oksidativnog stresa (Valker, 2003). Brojnim ekotoksikološkim studijama u poslednjih 20-30 godina napredovalo je ispitivanje zagađenja životne sredine pesticidima. Pojedine toksikološke studije su se fokusirale upravo na neželjene efekte pesticida na pticama i divljim životinjama (Van Vijngaarden i sar., 2005).

Na osnovu analize obavljene nakon 2000-te, godišnje se u svetu koristilo oko 5 miliona tona pesticida, od čega se oko 70% koristi za poljoprivredu, a ostatak za javno zdravlje i ostale potrebe (Yadav, 2010). Troškovi usled štete po životnu sredinu i društvo, zbog upotrebe pesticida samo u SAD procenjuju se na oko 12 milijardi dolara godišnje. Veliki deo ovih troškova odnosi se na one, koji su posledica uginuća ptica, riba i drugih životinja, skoro 2 milijarde dolara (Pimentel, 2009).

2.2. ORGANOFOSFORNA JEDINJENJA

Organofosforna jedinjenja (OFJ) čine veliku grupu pesticida i najčešće su korišćeni širom sveta, pre svega zbog niskih bioakumulacijskih svojstava i manje postojanosti u odnosu na organohlorna jedinjenja. Koriste se kao insekticidi, herbicidi, akaricidi, fungicidi i defolijanti u poljoprivredi, i kao sredstva protiv ekto i endoparazita kod domaćih životinja. Pored toga u OFJ spadaju i nervni bojni otrovi (sarin, soman, tabun, Vx otrovi), koji su značajno toksičniji od pesticida. Preciznije rečeno oni su najtoksičniji predstavnici organofosfata, a među njima najveću toksičnost imaju Vx otrovi (Chen, 2012; Ćupić i Ivanović, 2017).

Bez obzira na njihovu efikasnost upotreba organofosfatnih pesticida je, zbog toksičnosti poslednjih godina smanjena. Ne koriste se više u komunalnoj higijeni i domaćinstvu, u veterinarskoj medicini je njihova primena smanjena, i danas se koriste uglavnom u poljoprivredi (Aron, 2001; Marsillach i sar., 2013; Eddleston i Chowdhury, 2015). Na osnovu akutne srednje letalne doze (LD_{50}), OFJ spadaju među najtoksičnije pesticide za ptice i sisare (Blasiak i sar., 1999; Paramveer i sar., 2010).

Iako se OFJ danas veoma malo ili retko koriste u domaćinstvu i javnoj higijeni, već samo na poljoprivrednim površinama, a to znači udaljeno od naseljenih mesta, oni su i dalje najčešći pesticidi koji uzrokuju trovanja kod ljudi i domaćih životinja. Danas se u svetu na godišnjem nivou akcidentalno otruje ovim jedinjenjima oko 1000 000 ljudi i značajan broj životinja. Ovom broju svakako treba dodati i veliki broj samoubilačkih trovanja kod ljudi. Inače, prema podacima Svetske zdravstvene organizacije (WHO) danas se u svetu na godišnjem nivou ukupno registruje oko 3000 000 trovanja, čiji su uzrok organofosforna jedinjenja. Smatra se da preko 300 000 otrovanih ljudi, završi letalno (WHO, 2002; WHO, 2007).

2.2.1. TOKSIKOKINETIKA I BIOTRANSFORMACIJA

Organofosforna jedinjenja se generalno dobro apsorbuju nakon oralnog unosa ili inhalacije, a znatno manje preko kože. Ipak, treba istaći da između predstavnika OF postoje razlike u stepenu apsorpcije, koje potiču od njihove liposolubilnosti. Iz digestivnog trakta ova jedinjenja se uglavnom apsorbuju prostom difuzijom. Sam proces

distribucije je veoma kompleksan i pretpostavlja se da se OFJ kao liposolubilna jedinjenja deponuju u masno tkivo, kao i druga tkiva bogata lipidima (Adams, 2001).

Zahvaljujući svojoj liposolubilnosti OFJ prolaze i u CNS. S druge strane, proces eliminacije zavisi od hidrosolubilnosti, pa se ova jedinjenja, preko raznih metaboličkih reakcija pretvaraju u manje liposolubilna jedinjenja. Međutim, u toku takvih reakcija, osim strukture, menja se i njegova stabilnost (Jokanović, 2001).

U procesu biotransformacije OFJ podležu reakcijama oksidacije, redukcije, hidrolize i konjugacije. Inače, ovi procesi biotransformacije, se mogu podeliti na *aktivacione* i *deaktivacione*. Međutim, u procesima oksidacije i redukcije mogu nastati i toksičnija jedinjenja. U svim ovim procesima učestvuje veliki broj enzima, koji se nalaze u jetri (Jokanović, 2001; Tanvir i sar., 2016). To su specifičnih enzimski sistemi jetre, lokalizovani na membrani endoplazmatičnog retikuluma (citohrom-P450 oksigenaze, flavin-monooksigenaze) (Pelkonen i sar., 2008; Ma i Lu, 2011; Singh, 2012).

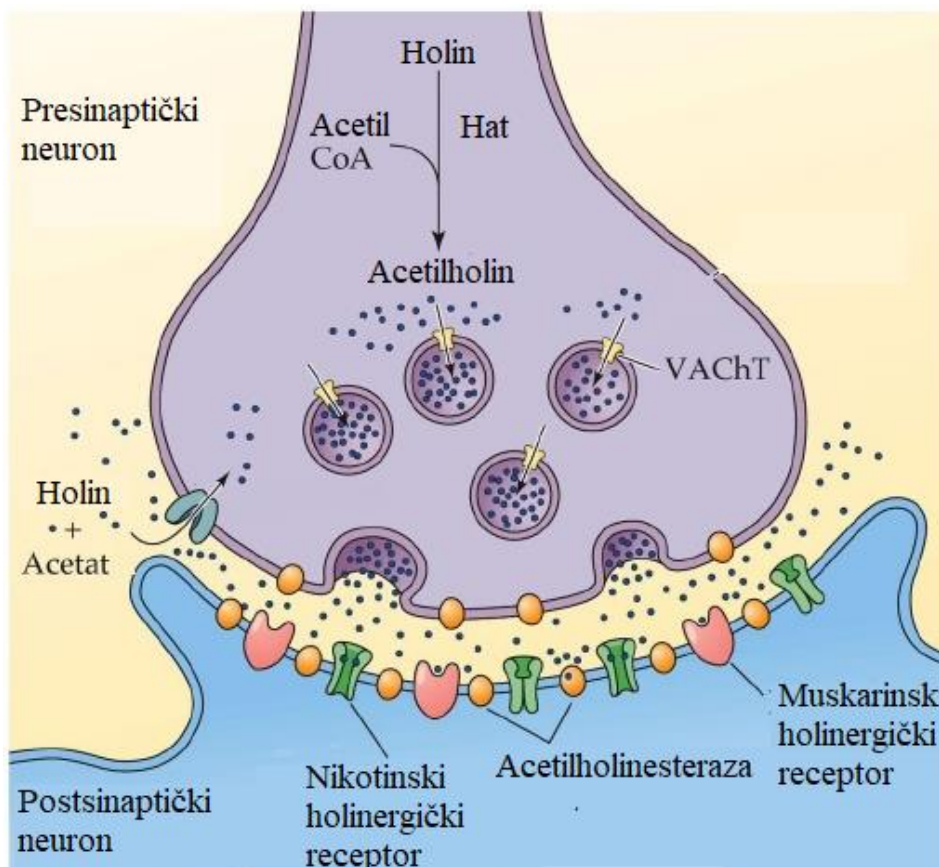
Zbog estarske strukture, u procesima biotransformacije OFJ učestvuju i enzimi iz grupe esteraza (Jokanović, 2001). Postoje dve grupe ovih enzima, sa različitim mehanizmima delovanja. Prvu grupu čine tzv. serin-esteraze, kojoj pripadaju dve holinesteraze: acetilholinesteraza (AChE) i butirilholinesteraza (BuChE), a pored njih još i neurotoksična esteraza (NTE) i karboksilesteraza (KaE). U drugoj grupi se nalaze esteraze fosfornih triestara: arildialkilfosfataza (paraoksonaza) i diizopropilfluorofosfataza (DFP-aza).

OFJ ireverzibilno inhibiraju serinske esteraze (AChE, BuChE, NTE, KaE), pa se zbog toga one koriste kao nedestruktivni biomarkeri za ekspoziciju antiholinesteraznim insekticidima. Za razliku od toga, esteraze fosfornih triestara hidrolizuju OFJ, a da pri tome ne dolazi do značajnije inhibicije njihove aktivnosti. Drugim rečima, ove esteraze se vrlo brzo defosforilišu i značajne su u detoksikaciji organizma sisara kod trovanja OFJ (Sogorb i Vilanova, 2002; Schenk, 2016; Hatfield i sar., 2016). Posle prve faze biotransformacije, sledi faza konjugacije u kojoj se OFJ pretvaraju u hidrosolubilna jedinjenja, koja se potom izlučuju iz organizma putem urina (Parkinson, 2001).

2.2.2. MEHANIZAM DELOVANJA ORGANOFOSFATA

Organofosfatna jedinjenja svoje efekte u organizmu uglavnom ostvaruju ireverzibilnom (kovalentnom) inhibicijom aktivnosti enzima holinesteraza. Ovaj efekat

neki organofosfati postižu, odmah po ulasku u organizam, pa se nazivaju *direktni inhibitori holinesteraze*. U ovu grupu spadaju dihlorvos, faksim i trihlorfon. Međutim, postoje i indirektni inhibitori, koji se najpre u organizmu metabolišu u toksične metabolite, a zatim inhibiraju holinesteraze. Na ovaj način deluju diazinon, dimetoat, malation, hlorpirifos, fention i fosfmet (Marrs, 2001).



Slika 1. *Sinteza ACh uz pomoć holinacetiltransferaze-Chat i razgradnja u sinapsi dejstvom AChE (adaptirano iz Meyers i sar. 2005).*

AChE i BuChE su hidrolitički enzimi, koji svoje efekte ostvaruju u polarnoj sredini. Iako su po hemijskoj strukturi veoma slični, razlikuju se po svojoj hidrolitičkoj aktivnosti.

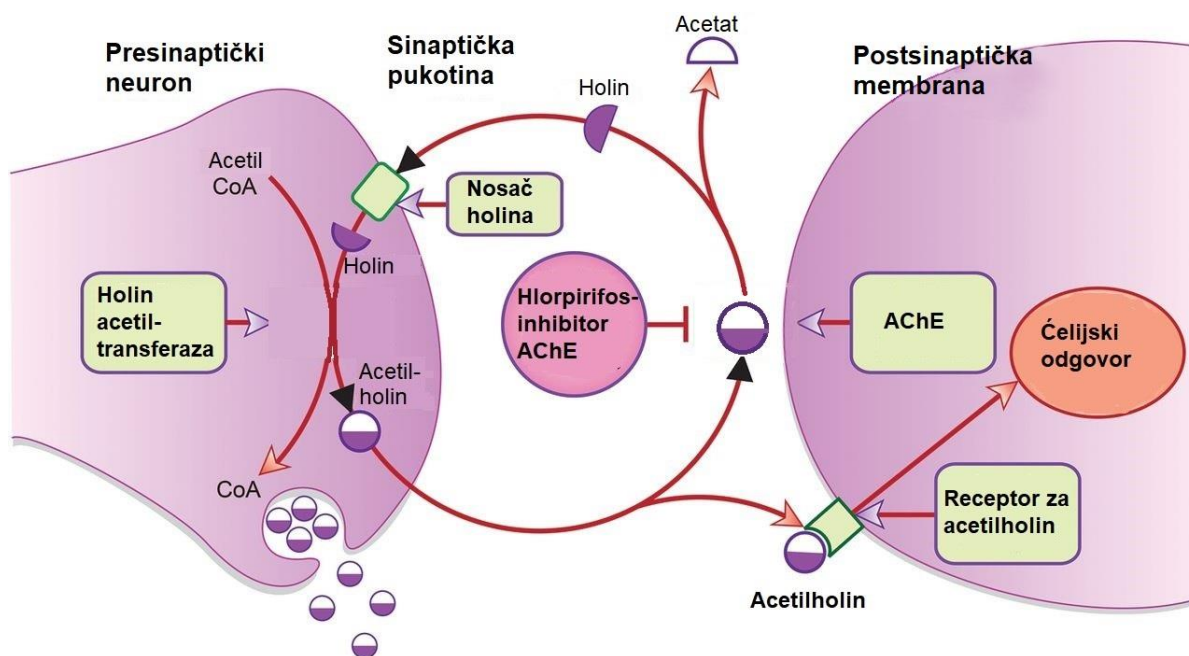
Acetilholinesteraza (AChE) hidrolizuje samo acetilholin, koji je neurotransmiter holinergičkog nervnog sistema i u organizmu se u presinaptičkim nervnim završecima sintetisuje iz holina i acetil-koenzima A (Ac-CoA). Pored toga, što se nalazi u sinapsama, AChE se nalazi i u membrani eritrocita, nervnom sistemu (siva masa mozga), amnijskoj tečnosti i placenti. Jedan molekul AChE u toku jednog minuta može da hidrolizuje 300 000 molekula acetilholina (Vojvodić, 1981; Jokanović, 2001). Razlaganjem acetilholina

uz pomoć AChE, prekida se prenos signala sa nervne na mišićnu ćeliju (Slika 1). Inače, acetilholin se oslobađa na svim preganglijskim nervnim vlaknima, bez obzira da li pripadaju holinergičkom ili adrenergičkom nervnom sistemu. Acetilholin svoje efekte u organizmu postiže delovanjem na dve vrste receptora, muskarinske i nikotinske (Verma i Srivastava, 2003).

Kada acetilholin ostvari svoj efekat, njega razlaže AChE, koja se sastoji iz dva dela: anjonskog i estarskog. Anjonski deo čini glutaminska kiselina sa svojom karboksilnom grupom, dok se estarski deo sastoji od tri aminokiseline (histidin, serin i tirozin). U ovom procesu anjonski deo enzima se vezuje za katjonski deo acetilholina, odnosno glutaminska kiselina iz enzima privlači trimetilamonijum radikal iz acetilholina, dok se estarska grupa acetilholina veže za estarski deo enzima tj. dolazi do reakcije između acetilne grupe acetilholina i hidroksilne grupe serina iz enzima. Kao posledica ovog vezivanja nastaje nestabilni kompleks enzim-acetilholin. Iz ovog kompleksa se hidrolizom odvaja bazni deo molekula acetilholina (holin), dok acetilni ostatak reaguje sa enzimom dajući acetilovani enzim. Nakon toga, acetilovani enzim se veoma brzo (za 150 mikrosekundi) hidrolizuje, te se na taj način ponovo regeneriše enzim (Varagić i Milošević, 2012). Katalizator u ovoj reakciji je hidroksilna grupa tirozina i imidazolijum jon histidina (Pohanka, 2011; Čolović i sar., 2013).

Kod trovanja pesticidima iz grupe OFJ i karbamata, u organizmu se određuje aktivnost AChE, odnosno stepen njene inhibicije. Inhibicija AChE se odigrava na taj način što se OFJ veže za aktivno mesto enzima i usled toga mu ne dozvoljava da razlaže acetilholin. Predajom fosfatne grupe enzimu dolazi do fosforilacije enzima i formiranja kovalentne veze između ostatka OFJ i OH-grupe serina (Marsillach i sar., 2013). Novonastali kompleks OFJ i enzima je stabilan i veoma sporo se spontano hidrolizuje. Pošto fosforilovani enzim ne može da razlaže acetilholin, isti se nakuplja i u većoj količini deluje na muskarinske i nikotinske receptore. Inhibirana AChE od strane OFJ, može da uspostavi svoju funkciju u prisustvu jedinjenja poznatih pod imenom oksimi. Ova jedinjenja vezuju za sebe deo organofosfata, odnosno fosfatnu grupu, nakon čega nastaje fosforilovani oksim, a AChE se ovim procesom reaktivira, da bi proces reaktivacije enzima bio što efikasniji, neophodno je da se oksimi primene što pre, u protivnom može nastati tzv. starenje fosforilisanog enzima. Naime, pokazalo se da inhibirani enzim vremenom gubi jedan alkil radikal, koji je vezan za fosfor, pa se novonastali oblik

inhibiranog enzima ne može više reaktivirati. Tada, ponovo uspostavljanje razgradnje acetilholina zavisi samo od „*de novo*“ sinteze AChE, za šta je potreban određeni vremenski period (Tougu, 2001; Eddleston i sar., 2002; Eddleston i Clark, 2011).



Slika 2. Efekat CPF-a na aktivnost AChE

Butirilholinestaraza (BuChE) ili serumska, odnosno pseudoholinesteraza, takođe hidrolizuje acetilholin, ali i druge biološki važne molekule, odnosno estre, kao što su: butirilholin, propionilholin, benzoilholin i γ -aminobutirilholin. U poređenju sa AChE, znatno slabije razlaže acetilholin (oko 60 000 molekula/minutu). Ovaj enzim se sintetise u jetri, i putem krvi, odlazi u gotovo sva tkiva u organizmu. Ipak, u većoj količini se nalazi u plazmi, cerebrospinalnoj tečnosti i glijalnim ćelijama. Poluživot BuChE u serumu je relativno kratak i iznosi oko 10 dana (Darvesh i sar., 2003; Pohanka, 2011; Marsillach i sar., 2013). Eksperimenti izvedeni na životinjama, kod kojih nedostaje AChE, pokazali su da taj enzim može delimično zameniti aktivnost BuChE (Adler i sar., 2004). Zapravo, fiziološka uloga BuChE nije u potpunosti razjašnjena. Poznato je da kod određenih patoloških stanja (oboljenje jetre, akutne infekcije, karcinomi, hronična anemija) postoji snižena aktivnost ovog enzima (Santarpia i sar., 2013). Trovanje uzrokovano organofosfatima, takođe, uzrokuje smanjenje aktivnosti BuChE, kao i određeni lekovi (cimetidin, androgeni, estrogeni, kontraceptivi) (Soliday i Conley, 2010).

Kod trovanja uzrokovanih OF, pored aktivnosti AChE, veoma je važno odrediti i aktivnost BuChE iz više razloga. Prvi razlog je što BuChE vrši neku vrstu protekcije AChE, jer ima veći afinitet prema najvećem broju OF, a drugi razlog je što služi kao veoma osetljiv marker za ekspoziciju OF (Thiermann i sar., 2007; Marsillach i sar., 2013). Pored toga, treba napomenuti i to da BuChE ima u organizmu 10 puta više, nego AChE (Masson, 2011, Marsillach i sar., 2013).

2.2.3. TERAPIJA TROVANJA

Pored simptomatske i potporne terapije, kod životinja otrovanih OF, primenjuje se i specifična ili kauzalna terapija koju čine: atropin, reaktivatori AChE (oksimi) i antikonvulzivi (npr. diazepam).

2.3. HLORPIRIFOS

Hlorpirifos (CPF) je hlorovano organofosfatno jedinjenje i jedan je od najviše korišćenih insekticida danas u svetu. Hlorpirifos je prvi put registrovan 1965. godine u SAD (Cal EPA 2010).

Hlorpirifos je jedan od glavnih insekticida u zemljama, kao što su Tajland (Panuwet i sar., 2009), Filipini (Lu, 2010), Vijetnam (Phung i sar., 2012) i Argentina (Jergentz i sar., 2005). U Brazilu se godišnje potroši 1,8 kilotona CPF-a (Meire i sar., 2012). Bio je jedan od najčešće korišćenih OF insekticida u SAD i Čileu u 2007. godini (Alavanja i sar., 2003), pre svega zbog jeftine proizvodnje (Munoz-Kuezada i sar., 2012).

Hlorpirifos se koristi kao insekticid, akaricid, i nematocid za kontrolu Coleoptera, Diptera, Homoptera i Lepidoptera u zemljištu, na lišću, i na životinjama (WHO, 2009a). Uništavanjem larvi i adultnih oblika komaraca, koristi se za kontrolu vektorskih bolesti, zatim za uništavanje kućnih insekata (parazita), mrava, vaški kod ovaca, te na golf terenima i travnatim površinama, zatim kao sredstvo protiv plesni za konzerviranje drva, stubova za ogradu, železničkih vagona. Može se naći i na ušnim markicama goveda, koje mogu (pored CPF-a) da sadrže i druge insekticide kao što su diazinon, cipermetrin ili permetrin. U poljoprivredi se CPF najčešće koristi kao folijarni sprej. Nanosi se

prskanjem (sa zemlje ili vazduha) direktno na zemljište pre sađenja kultura, ili se njime tretira kora ili seme biljaka (US EPA, 2009a).

Iako se OF, zbog toksičnosti i sve većeg razvoja rezistencije poslednjih godina sve manje koriste, treba istaći da samo u Kini postoji čak 1 022 registrovana preparata, koji sadrže CPF (ICAMA, 2012). Kina je u 2011. godini izvezla CPF u vrednosti od 110 miliona dolara, čime se svrstala među 6 najvećih izvoznika ovog pesticida. Smatra se da trenutna proizvodnja ovog pesticida u Kini prelazi 200 000 tona godišnje (AgroNews, 2013).

2.3.1. OGRANIČENJA PRIMENE

Ovaj insekticid u poslednje vreme privlači sve veću pažnju, s obzirom da utiče na zdravlje ljudi, a posebno na zdravlje dece. Naime, utvrđeno je da kod dece izložene većim dozama CPF-a od one koja ne izaziva vidljiv neželjeni efekat (NOAEL- *No observed adverse effect level*) postoji mogućnost deponovanja ove supstance u organizmu. Kao potvrda ovoj konstataciji jeste činjenica da su u urinu dece nađene duplo veće koncentracije primarnog metabolita CPF-a u odnosu na odrasle ljude. Otežano učenje, smanjena fizička kondicija, problemi u ponašanju dece dovedeni su u vezu sa delovanjem ovog insekticida. Kod odraslih je povećan rizik od Alchajmerove bolesti.

Bez obzira na potencijalnu toksičnost, CPF se i dalje koristi u većini zemalja i to ne samo na poljima, već i u kućama i vrtovima. Ipak, pojedine zemlje, (kao što su Južna Afrika i Sjedinjene Američke Države - SAD) prestale su da koriste ili su smanjile upotrebu ovog insekticida u navedene svrhe (Venerosi i sar., 2009).

U SAD je zbog mogućeg rizika po decu, 2001. godine zabranjena upotreba CPF-a u zatvorenom prostoru, pre svega u stambenim objektima, ali i u školama, na dečjim igralištima i parkovima. Dok je primena CPF-a protiv termita zabranjena 2005. godine, kao i njegova primena za zaštitu paradajza (US EPA, 2006).

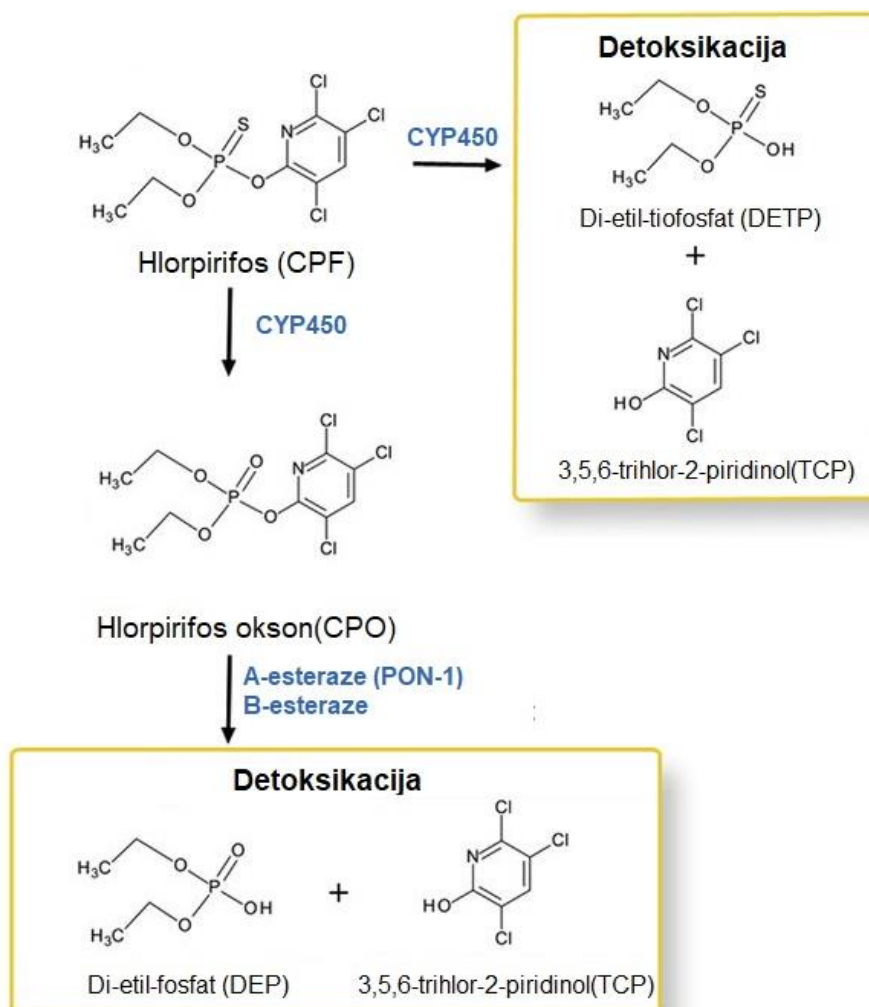
U Evropskoj uniji (EU), upotreba CPF je odobrena do 30. januara 2020. godine, a samim tim i u svim zemljama članicama, izuzev Danske, Finske, Latvije, Litvanije i Švedske (IUPAC, 2012).

U Republici Srbiji je njegova primena isto odobrena do 30. januara 2020 godine, usklađivanjem sa zakonima EU, i verovatno će prilikom reevaluacije (koja se vrši jednom godišnje) odobrenje biti produženo.

Razlog za navedena ograničenja i stalnu reevaluaciju je svakako sve veća zabrinutost od mogućeg toksičnog dejstva na decu, kućne ljubimace, divljač i druge organizme u životnoj sredini. Zato pojedini proizvođači pesticida sve više razmišljaju o drugim, savremenijim i manje štetnim proizvodima.

2.3.2. TOKSIKOKINETIKA

CPF-a je umereno rastvorljiv u mastima, pa se dobro i brzo apsorbuje posle ingestije i inhalacije, dok se preko kože slabo apsorbuje (oko 2% kod ljudi) (Reigart i Roberts 1999; NRA 2000). Studije izvedene na pacovima, kunićima, kokoškama, kozama, svinjama, kravama i ljudima su pokazale da se CPF, posle ulaska u cirkulaciju, odnosno apsorpcije distribuira po celom organizmu (NRA 2000; EC, 2005).



Slika 3. Biotransformacija hlorpirifosa

CPF se u potpunosti metaboliše u njegov metabolit hlorspirifos-okson, a potom u 3,5,6-trihloro-2-piridinol (TCP) u jetri, pomoću enzimskog sistema citohroma (CYP-450) (Hodgson i Rose, 2008). U procesu oksidativne desulfuracije, CYP-450 zamenjuje sumpor kiseonikom, nakon čega se formira metabolit hlorspirifos-okson (Flaskos, 2012). Utvrđeno je da ovaj metabolit snažnije inhibira AChE od samog CPF-a (Verma i sar., 2009). Preko 80% CPF-a se izlučuje urinom kod pacova u toku 48 sati (EC, 2005), kao i kod drugih vrsta životinja, tako da nakon nekoliko dana, samo male količina ovog insekticida ostaju u tkivima, kao što je masno tkivo, pluća, jetra i mozak (NRA 2000).

Postoji velika varijacija u stepenu detoksikacije CPF-a kod ljudi i životinja. Smatra se da enzim paraoksonaza (PON1) ima važnu ulogu u tome. PON1 se aktivira kalcijumom i njegova koncentracija varira u različitim tkivima, kao što su jetra, mozak i krv. Pre nego što počne da deluje na enzim AChE, okson se hidrolizuje (US EPA, 2011).

Promene u polimorfizmu (varijacije) gena ovog enzima (PON1) utiču i na nivo ekspresije enzima i njegove katalitičke sposobnosti, te se tako određuje stepen detoksikacije ovog pesticida (Cal EPA, 2008).

2.3.3. MEHANIZAM TOKSIČNOG DELOVANJA

CPF na sisare deluje posredstvom najmanje tri načina. Pre svega *inhibira enzim AChE*, i time izaziva preteranu stimulaciju holinergičkog nervnog sistema. Pored toga, izaziva i *oksidativni stres*, tj. proces koji je uključen u nastajanje mnogih bolesti kod životinja i ljudi, kao što su: karcinom, Parkinsonova bolest, Alchajmerova bolest, dijabetes i zastoj rada srca. Treći način delovanja se odnosi na izazivanje *funkcionalnog poremećaja endokrinih žlezda* (Meeker i sar., 2008; Verma i sar., 2009; Viswanath i sar., 2010).

2.3.3.1. INHIBICIJA ACETILHOLINESTERAZE

Jedan od najvažnijih načina delovanja CPF-a kod životinja, ljudi i insekata je da *inhibira aktivnost enzima AChE*. Acetilholin deluje stimulatивно na holinergičke neurone, nervne ćelije koje kontrolišu signale u perifernom nervnom sistemu, mozgu, i kičmenoj moždini. Ako se acetilholin ne hidrolizuje, već se nakupi u sinapsi, neuroni postaju preterano stimulirani usled čega nastaje povećano lučenje pljuvačke, sluzi, i drugih sekreta, te nastaju poremećaji senzornih i bihevioralnih funkcija, nekoordiniranost,

depresija motornih funkcija, i respiratornog sistema, tremor, konvulzije i smrt (Colborn, 1996; Reigart i Roberts 1999; Zhao i sar., 2006). Oporavak zavisi od naknadne produkcije AChE u višku. Smatra se da je ovaj efekat blokade enzima posledica pre svega delovanja metabolita hlörpirifos-oksona, a ne izvornog jedinjenja CPF-a (Slotkin, 2004). Dostupni podaci ukazuju da je AChE kod ljudi osetljivija, nego kod životinja, bez obzira na način izlaganja CPF-u (oralni, dermalni) (US EPA, 2011).

2.3.3.2. OKSIDATIVNI STRES

Oksidativni stres nastaje kada produkcija "reaktivnih vrsta kiseonika" (ROS), kao što su slobodni radikali i vodonik peroksid, prevazilazi sposobnost (kapacitet) organizma da ih neutrališe i eliminiše, tj. kada isti prevaziđu antioksidativni sistem odbrane organizma. Ovo za posledicu ima, oštećenje dezoksiribonuleinske kiseline (DNK), odnosno dovodi do smrti ćelija i tkiva. Oksidativni stres je umešan u nastajanje mnogih bolesti kod ljudi i životinja, uključujući rak, dijabetes, kardiovaskularni, respiratorni i neurološki poremećaji, kao i ubrzano starenje (Verma i sar., 2009). Promene u komponentama antioksidativnog sistema mogu se koristiti kao biomarkeri za utvrđivanje stepena trovanja pesticidima (Mehta i sar., 2009; Kalender i sar., 2012).

Oksidativni stres (pored inhibicije AChE), takođe doprinosi razvoju neurotoksičnosti uzrokovane CPF-om (Slotkin i Seidler, 2009). Pored toga, CPF (preko efekata oksidativnog stresa na mitohondrije) uzrokuje oštećenje dopaminergičkih neurona, usled čega može nastati neurodegenerativna bolest, kao što je Parkinsonova bolest (Lee i sar., 2012).

2.3.3.3. ENDOKRINI POREMEĆAJI

Hlorpirifos spada u grupu jedinjenja koja izazivaju poremećaj funkcije endokrinih žlezda. Ima *antiandrogeni i estrogeni efekat*, te deluje na *hormone štitne žlezde*. On inhibira metabolizam testosterona i estradiola (Usmani i sar., 2003, 2006; Meeker i sar., 2008) kao i sintezu testosterona (Hodgson i Rose, 2008; Viswanath i sar., 2010). Hormoni *štitne žlezde* su takođe osetljivi na delovanje CPF-a. Inače poremećaj rada ove žlezde, a samim tim i poremećaj stvaranja hormona ove žlezde može imati negativan uticaj na razvoj mozga fetusa (Ghisari i Bonefeld-Jorgensen 2005). Dokazano je da CPF smanjuje količinu kortizola i tireoidnog hormona tiroksina (T4), te indukuje promene u tireoidnoj

i nadbubrežnoj žlezdi (Jeong i sar., 2006), a različito deluje na tireoidno-stimulirajuće hormone kod muškaraca, odnosno žena. Pored toga, uzrokuje rak mlečne žlezde (Ventura i sar., 2012). Kao takav, ovaj insekticid se nalazi na konačnoj listi supstancija, koje izazivaju endokrine poremećaje (US EPA, 2011). CPF značajno povećava nivo gonadotropno oslobađajućeg hormona iz hipotalamusa (GnRH) i ispoljava dugotrajni toksični efekat na plodnost (Miller i sar., 2004).

U studiji izvedenoj u Argentini (provincija Rio Negro), utvrđeno je da izlaganje trudnih žena CPF-u, tokom perioda prskanja na poljoprivrednim dobrima, veoma značajno (za 55%) povećava nivo kortizola u prvom trimestru trudnoće, te da to povećanje može dovesti do narušavanja rasta fetusa i postnatalnog razvoja (Cecchi i sar., 2012).

2.3.4. TOKSIČNI EFEKTI HLORPIRIFOSA

Hlorpirifos je od strane Svetske zdravstvene organizacije (WHO, 2009b) i Američke agencije za zaštitu životne sredine (US EPA, 2006), prema stepenu tokisčnosti, svrstan u II klasu supstancija sa umereno toksičnim dejstvom.

CPF je umereno toksičan za gliste, veoma toksičan za sisare i ptice, i izuzetno toksičan za pčele i druge korisne insekte. Efekti subletalnih doza CPF-a kod ptica se manifestuju u obliku smanjene sposobnosti letenja. Bilo je više prijavljenih slučajeva uginuća ptica. CPF je veoma toksičan za kokoške sa LD₅₀ 32-35 mg/kg t.m. (ATSDR, 1997) ili 32 - 102 mg/kg t.m. (Kamrin, 1997; Tomlin, 2006).

Kod hronično otrovanih životinja i ljudi, ovaj insekticid može izazvati čitav niz poremećaja u organizmu, kao što su *metabolički efekti, toksično delovanje na jetru, bubrege, zatim kancerogenost, genotoksičnost i mutagenost, endokrine poremećaje, uticaj na reprodukciju i razvoj, nervni sistem i ponašanje, imuni sistem i druge efekte*. Pored toga, utvrđeno je da CPF *inhibira aktivnost AChE u plazmi, eritrocitima i mozgu, povećava masu jetre, smanjuje telesnu masu, deluje na oči (keratitis) i nadbubrežnu žlezdu* (US EPA, 2009b).

2.3.4.1. UTICAJ HLORPIRIFOSA NA JETRU

Akutno i hronično izlaganje CPF-u može izazvati oštećenje jetre i poremećaje u njenoj metaboličkoj funkciji. Naime, poznato je da je CPF potentni inhibitor jetrinog

enzima CYP450, a time i metabolizma svih supstancija, kako endogenog (uključujući testosteron i estrogene), tako i onih egzogenog porekla, kao što su drugi pesticidi ili lekovi, koji se metabolišu pomoću ovog enzima. Za hlörpirifos-okson je poznato da inhibira metabolizam permetrina (Hodgson i Rose 2008). Akutna izloženost, takođe može izazvati oštećenje jetre (Elsharkawi i sar., 2013; Uzun i Kalender 2013).

2.3.4.2. UTICAJ HLORPIRIFOSA NA NERVNI SISTEM - RAZVOJ I PONAŠANJE

Već pri niskim koncentracijama (nižim od onih koje pokreću proces inhibicije fetalne AChE) CPF ima svojstva potentnog neurotoksina. Ovo je dokazano u brojnim epidemiološkim studijama. Izlaganje *in utero* i u ranom detinjstvu može kasnije uzrokovati određene promene (anomalije) u ponašanju kod adolescenata i odraslih (Watts, 2013).

Epidemiološke studije su pokazale da akutna i hronična izloženost CPF-u dovodi do niza dugotrajnih neuropsiholoških efekata, uključujući odloženi kognitivni i psihomotorni razvoj, smanjeni IQ, slabije pamćenje i poremećaj pažnje/hiperaktivnosti (Middlemore-Risher i sar., 2010; Yan i sar., 2012). Može imati dugoročne posledice na socijalno prilagođavanje i intelektualna postignuća (Moser i sar., 2005). Neki naučnici smatraju da su učinci CPF-a, uporedivi sa onima, koji nastaju pri izlaganju drugim neurotoksikantima, kao što su olovo i duvanski dim (Watts, 2013). CPF može prouzrokovati organofosfatima-indukovanu odloženu polineuropatiju i organofosfatima-indukovanu hroničnu neuropatiju (US EPA, 2009b), uključujući degeneraciju perifernog i CNS-a, što rezultira slabošću, obamrlost i parestezijom, pa čak i paralizom, opasnom po život. Takođe izaziva hronične neuropsihološke efekte, kao što su anksioznost (Sanchez-Amate i sar., 2001), depresija, kao i pojavu želje za suicidom.

Rezultati dobijeni tokom laboratorijskih i epidemioloških studija, ukazuju da postoji povezanost trovanja CPF-om sa pojavom Parkinsonove bolesti kod ljudi.

CPF ima veći negativan uticaj na proliferaciju nervnih ćelija i toksičniji je za mozak u razvoju, u poređenju sa akutno toksičniji OF, kao što su diazinon i paration. Deluje toksično na mlade životinje i decu u dozama, koje nisu toksične za odrasle. Iz tog razloga, testovi izvedeni na odraslim životinjama ne mogu poslužiti tj. na osnovu njih se ne mogu predvideti dugotrajni odloženi efekti toksičnosti CPF-a na potomstvo (Colborn, 1996; Watts, 2013).

Laboratorijske studije u ranim 1990-im pokazale su da su nezreli organizmi daleko osjetljiviji na toksične efekte CPF-a, i to kako akutne toksičnosti, tako i razvojne neurobihejvioralne efekte, u odnosu na zrele životinje (Slotkin, 2004). U početku se pretpostavljalo da je efekt CPF-a na razvoj mozga rezultat istog mehanizma, koji leži u osnovi opšte toksičnosti, tj. inhibicije holinesteraze (Slotkin i sar., 2006). Međutim, kasnije je utvrđeno da sam CPF, kao i njegov metabolit hlorspirifos-okson, deluju na mozak i razvoj nervnog sistema drugim mehanizmima, te da deluju na brojna mesta u isto vreme, čineći pesticid mnogo toksičnijim (Slotkin i sar., 2006; Flaskos 2012). Rad autora Lopez-Granero i saradnika (2013) izveden na pacovima ukazuje da oksidativni stres može biti drugi mehanizam koji je uključen u štetne efekte CPF-a na moždane ćelije, uzrokujući kognitivne i emocionalne deficite.

Razvojna neurotoksičnost može rezultirati smrću embriona, fetusa ili mladunaca ili može izazvati teške i trajne neurološke defekte (Flaskos, 2012). CPF u koncentraciji od 2 mg/kg t.m.inhibira fetalnu AChE (Qiao i sar., 2002). Međutim, u nizu studija sa početka devedesetih godina prošlog veka, pokazano je da izlaganje i nižim koncentracijama CPF-a (npr.1 mg/kg t.m.) u toku intrauterinog razvića, kao i u ranom detinjstvu ometa razvoj mozga i nervnog sistema sisara. Ovi efekti mogu biti vidljivi kod adolescenata i u odraslom dobu (Qiao i sar., 2003). Ove studije su pokazale da su direktna ciljna mesta CPF-a, ćelijski procesi koji učestvuju u razvoju nervnog sistema, odnosno utiču na proliferaciju nervnih ćelija, kao i diferencijaciju i sazrevanje, formiranje i aktivnost sinapsi, kao i proliferaciju i diferencijaciju ćelija glija (Whitney i sar., 1995; Slotkin i sar., 2006; Flaskos, 2012).

U početku, CPF napada neurone koji se formiraju u najranijim fazama razvoja mozga i CNS, smanjujući replikaciju i diferencijaciju ćelija (umanjujući transkripciju DNK), i smanjujući rast nervnih ćelija, uključujući holinergičke signale (Song i sar., 1998; Dam i sar., 1999; Das i Barone, 1999; Slotkin i sar., 2001; Qiao i sar., 2002, 2003; Howard i sar., 2005). Ovo dovodi do smanjenja sinapsi i sposobnosti ćelijskog prenosa signala (Aldridge i sar., 2003, 2005; Slotkin, 2004; Jameson i sar., 2006). Usled toga, smanjuje se holinergička sinaptička aktivnost i na kraju nastaju poremećaji u ponašanju, kako kod adolescenata, tako i kod odraslih (Slotkin, 1999, 2004; Dam i sar., 2000; Levin i sar., 2001; Slotkin i sar., 2001, 2006; Aldridge i sar., 2004).

CPF prvenstveno deluje na glijalne ćelije, koje se razvijaju kasnije od neurona, pa su osetljivije (Qiao i sar., 2002; Garcia i sar., 2002; Slotkin, 2004). Glijalne ćelije su bitne za normalan razvoj, formirajući "skalu" za migraciju ćelija tokom izgradnje tkiva (Colborn, 1996). Druge funkcije uključuju obezbeđivanje ishrane neurona, formiranje mijelinske ovojnice, homeostazu mozga i povezivanje sa imunološkim sistemom (Colborn, 1996; Munoz i sar., 2010). Glijalne ćelije nastavljaju da se razvijaju tokom detinjstva, tako da izlaganje ovom pesticidu tokom ovog perioda, može takođe izazvati razvojnu neurotoksičnost (Slotkin, 2004). U stvari, efekti na prednji mozak (prosencephalon) pacova, koji je bogat holinergičkim vlaknima i čiji razvoj dostiže vrhunac u materici, nisu tako teški, kao efekti na malom mozgu (cerebellum), koji dostiže svoj vrhunac u razvoju nakon 2 nedelje od rođenja i nije holinergičnog tipa (Campbell i sar., 1997; Crumpton i sar., 2000). To znači da mozak u postnatalnom razvojnom periodu, može biti još osetljiviji na efekte CPF-a, nego u prenatalnom (Qiao i sar., 2002). Neonatalno (1-4 dana) izlaganje pacova CPF-u u dozama, koje izazivaju sistemsku toksičnost (5 mg/kg t.m.), takođe uzrokuju ozbiljan gubitak nervnih ćelija u moždanom stablu kod preživelih jedinki. Izlaganje CPF-u u kasnijem periodu (11.-14. dan), uzrokuje toksične efekte koji zahvataju prednji mozak (Campbell i sar., 1997).

U studijama, u kojima je izolovani tubulin iz mozga tretiran CPF-om u koncentracijama od 0,005 do 0,1 mM pokazano je da se hlorpirifos-okson veže za dimere tubulina mozga, ometajući polimerizaciju tubulina. Tubulin formira mikrotubule, citoskeletne elemente koji održavaju strukturu ćelije i učestvuju u prenosu vezikula i organela, kao što su mitohondrije, u različite delove nervne ćelije. Poremećaj tubulina je umešan u nastajanje neurodegenerativnih bolesti, kao što je Alchajmerova bolest (Grigorian i Lockridge, 2009).

Kako životinje sazrevaju, oštećenja su očiglednija u raznim delovima mozga, od kojih je najosetljiviji hipokampus, usled čijeg oštećenja dolazi do abnormalnog ponašanja (Colborn, 1996).

Na osnovu svega navedenog Američka Agencija za zaštitu životne sredine, odeljenje u Kaliforniji, (Cal EPA, 2010) zaključuje da CPF: utiče na razvoj mozga tokom deljenja ćelija, ometa sintezu ribonukleinske kiseline (RNK) tokom diferencijacije, prekida prenos signala između ćelija, ometa važne faktore transkripcije energije, koji su uključeni u diferencijaciju ćelija, zatim oštećuje holinergičnu sinaptičku funkciju tokom

razvoja, utiče na sistem kateholamina u mozgu u razvoju, izaziva oksidativni stres u mozgu u razvoju, ometa gliogenezu i aksonogenezu, menja nivoe neurotropina u mozgu u razvoju i izaziva abnormalnosti u ponašanju.

2.3.4.3. UTICAJ HLORPIRIFOSA NA IMUNI SISTEM

Tokom brojnih laboratorijskih i epidemioloških studija dobijeni su rezultati, koji ukazuju da CPF deluje imunotoksično. Naime, utvrđeno je da deluje na limfocite, timocite, T- ćelije, faktor nekroze tumora i autoimunost, kako kod ljudi (Thrasher i sar., 1993; Gotoh i sar., 2001) tako i kod pacova (Blakeli i sar., 1999; Navarro i sar., 2001; Galloway i Handy, 2003).

U studiji Navarro i sar. objavljenoj 2001. godine, pokazalo se da izloženost CPF-u u toku razvoja organizma, rezultira dugotrajnim deficitom u imunološkoj kompetenciji. Izlaganje novorođenih pacova CPF-u u dozi od 1 mg/kg t.m. u postnatalnim danima (1-4) ne izaziva odmah efekt na T-ćelijski odgovor stimulisan mitogenima. Međutim, kod životinja u odraslom dobu, T-ćelijski odgovori su bili značajno oslabljeni. Tretman tokom kasnijeg neonatalnog perioda (11-14 dana) izazvao je sličan deficit u odraslom dobu (Blakely i sar., 1999).

U ogledu izvedenom na pacovima, izloženim CPF-u, zapažena je hipotermija i groznica koje su bile posledica dejstva CPF-a na produkciju citokina i faktor nekroze tumora. Li i saradnici (2009) su otkrili da CPF (primenjen u veoma malim dozama (0-100 ppm), indukuje apoptozu u humanim T ćelijama, na dozno-zavisian način.

2.3.4.4. CITOKINI

Citokini predstavljaju grupu malih polipeptida koji modulišu različite ćelijske aktivnosti, kao što su rast, diferencijacija i preživljavanje. U fiziološkim uslovima citokini učestvuju u sinaptičkoj plastičnosti, neurogenezi i pamćenju (Morris i sar., 2013), dok tokom infekcije sprečavaju degeneraciju tkiva iniciranjem, propagacijom i regulacijom inflamatornog odgovora. U toku odgovora na patološke uslove dolazi do povećane genske ekspresije citokina i njihovog povećanog oslobađanja u veoma kratkom vremenskom periodu. Citokini se dele na proinflamatorne (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ) i antiinflamatorne (IL-10), mada jedan citokin obavlja obe ulogu, u zavisnosti od stanja u kome se tkivo nalazi. U CNS-u u najvećoj meri citokine sintetišu mikroglijske ćelije, ali

mogu da ih produkuju i astrociti, oligodendrociti, neuroni, endotelne i druge ćelije (Smith i sar., 2012).

Inteleukin-1

Familija IL-1 se sastoji od 11 članova, od kojih su 4 glavna: IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, IL-18. IL-1 β aktivira imuni sistem, u toku akutne faze inflamacije delujući na makrofage i T limfocite. Na ovaj način dovodi do produkcije drugih citokina, što ima za posledicu pojavu povišene temperature, zbog čega je i dobio ime "endogeni pirogen". Vezivanjem IL-1 β za receptore dolazi do transdukcije signala, preko hidrolize GTP-a i aktivacije mitogenom aktivirane protein kinaze (*eng.* mitogen-activated protein kinases, MAPK), koja je uključena u preživljavanje i odgovor na stres (Wingley i Kaiser, 2003).

Interleukin-6

IL-6 stimuliše sazrevanje B ćelija u ćelije koje proizvode antitela (Wingley i Kaiser, 2003). U proteklih trideset godina otkrivene su brojne funkcije ovog citokina u organizmu. Iako se prevashodno posmatra kao proinflamatorni citokin, IL-6 u CNS-u ima i neuroprotektivna i antiinflamatorna svojstva (Eskes i sar., 2002). IL-6 utiče na preživljavanje, diferencijaciju, proliferaciju i regeneraciju neurona, kao i na oslobađanje neurotransmitera, aktivnost neurona i sudbinu neuronalnih progenitorskih i stem ćelija. Takođe ima i druge fiziološke uloge, kao što su regulacija hepatocita, hematopoetskih progenitorskih ćelija, utiču i na placentu, kardiovaskularni i endokrini sistem (Kishimoto i sar., 1995). Pored toga što pokreće MAPK, deluje i na fosfatidilinozitol 3-kinazni (PI3K)/Akt signalni put (Spooren i sar., 2011).

2.3.4.5. UTICAJ HLORPIRIFOSA NA METABOLIZAM LIPIDA

Na osnovu podataka dobijenih u ogledima na životinjama i ljudima sve više se uočava moguća povezanost "široke izloženosti populacije CPF-u i procenta gojaznosti u Sjedinjenim Američkim Državama" (Cal EPA, 2010). Izlaganje CPF-u, naročito u ranijem životnom dobu, može predisponirati povećanje količine holesterola (Elsharkawy i sar., 2013), pojavu gojaznosti, (Lassiter i Brimijoin, 2008), dijabetesa (Slotkin i sar., 2005), ateroskleroze i kardiovaskularnih poremećaja u kasnijem periodu života (Acker i Nogueira, 2012).

Lipoproteini

Lipoproteini čine kompleks lipida i proteina, koji ima ulogu u transportu lipida i lipofilnih molekula u plazmi i CNS-u. Klasifikacija lipoproteina je izvršena na osnovu gustine čestice, na lipoproteine velike gustine (*eng.* high density lipoproteins-HDL), male gustine (*eng.* low density lipoproteins-LDL), srednje gustine (*eng.* intermediate density lipoproteins-IDL), jako male gustine (*eng.* very low density lipoproteins-VLDL) i hilomikrone (CM). Moguće je napraviti i podelu na osnovu pokretljivosti na agaroznom gelu, tokom elektroforeze, na α -, pre- β - i β -lipoproteine, koji odgovaraju HDL, VLDL i LDL frakcijama (Jairami sar., 2012). Veći lipoproteini (CM, VLDL i IDL) su obogaćeni trigliceridima, dok se holesterol i estri holesterola nalaze u manjim lipoproteinima (LDL i HDL).

Apolipoprotein A

Apolipoprotein A (ApoA) je vezan za HDL česticu. ApoA-I pomaže u transportu holesterola i fosfolipida iz perifernog tkiva nazad u jetru u procesu koji se zove reverzni transport holesterola. Holesterol ne može da se metaboliše i koristi kao izvor energije u organizmu, te je izlučivanje preko žuči jedini način da se eliminiše iz organizma (Rahim i sar., 2016). ApoA je povezan sa dva antioksidativna enzima- paraoksonazom i faktorom aktiviranja trombocita acetilhidrolazom (ili plazma lipoprotein fosfolipaza A2, Lp-PLA2), koji sprečavaju nastanak LDL-a.

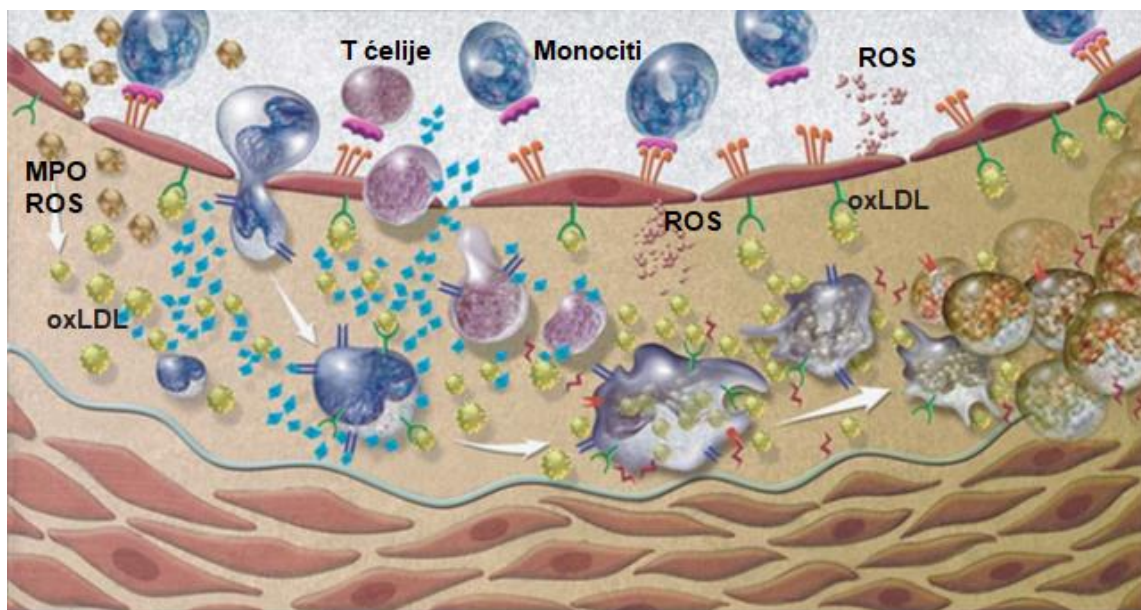
HDL čestice imaju antiinflamatornu i anti-apoptotsku ulogu (sprečavaju aktivaciju kaspaza) u endotelnim ćelijama. Značajnu ulogu imaju i u aktiviranju endotelne azotoksid-sintetaze (eNOS), oslobađanju NO, usled čega dolazi do vazorelaksacije (Marín-García, 2007). ApoA-I je meta za oksidaciju HDL-a, posredovanu mijeloperoksidazom (MPO), menjajući tirozinske rezidue, čime se smanjuje sposobnost oksidovane HDL čestice da učestvuje u razgradnji holesterola od strane makrofaga (Sikorski, 2007).

Koristeći ApoA-I kao kofaktor, aktivira se enzim lecitil-holesterol-acil-transferaza (LCAT) koji esterifikuje holesterol. Ovako razdvojene estre holesterola sada jetra može lakše da preuzme, zajedno sa HDL česticama. U CNS-u neuroni konvertuju holesterol u 24S-hidroksiholesterol (cerebrosterol). Ova transformacija holesterola, olakšava njegovo kretanje van CNS-a, pošto u nepromenjenom obliku ne može da prođe

krvno-moždanu barijeru (KMB) (Jairami sar., 2012). ApoA-1 ima još puno značajnih funkcija kod različitih bolesti, uključujući i Alchajmerovu bolest i amiloidozu (Rahim i sar., 2016).

Apolipoprotein B

Apolipoprotein-B (ApoB) je vezan za LDL i CM. Na površini CM se nalazi na ApoB-48, koji nastaje u crevima, dok se na površini LDL nalazi ApoB-100 iz jetre. Ovaj lipoprotein ima ulogu u transportu triglicerida ka perifernim tkivima. MPO dovodi do nastanka RNS-a i hipohloraste kiseline (HOCl), koji deluju na ApoB-100, pri čemu dolazi do formiranja hlortirozinskih i nitrotirozinskih derivata. MPO značajno menja ravnotežu između LDL-posredovanog unosa holesterola i HDL-posredovane razgradnje u makrofagima, i usled toga ima ključnu ulogu u procesu akumulacije i razgradnje lipida (Sikorski, 2007).



Slika 4. Ilustrovani model ateroskleroze kao zapaljenske bolesti. MPO i ROS (crveni krugovi), oksiduju LDL koji potom aktivira endotelne ćelije da ekspimiraju molekule ćelijske adhezije i regrutuju monocyte i T ćelije. Oksidovani LDL (oxLDL) indukuje ekspresiju citokina i hemokina (plavi dijamanti) da uvećaju upalni odgovor, dovodeći do aktivacije makrofaga i još veće proizvodnje ROS-a. Aktivirani makrofagi izlučuju i druge upalne posrednike, nakupljaju dodatni lipid i razvijaju se u "penaste" ćelije (Slika je preuzeta i modifikovana iz Sikorski, 2007).

Tokom ateroskleroze aktivirane endotelne ćelije (Slika 4) stvaraju citokine koji u toku inflamacije aktiviraju T limfocite. Diferenciranjem nastaju Th1 efektorske ćelije

koje stvaraju interferon-g (IFN-g), aktivator makrofaga koji povećava sintezu proinflamatornih citokina: TNF-a, IL-1 i IL-6 (Sikorski, 2007).

2.3.4.6. REZIDUE HLORPIRIFOSA U PODZEMNIM VODAMA

Brojne studije su pokazale da je postojanost hlorpirifosa prilično duga u vodi, te da pod prirodnim uslovima prevazilazi kriterijume Stokholmske konvencije o postojanosti, koja iznosi 2 meseca za vodu, a 6 meseci za sediment.

U Pakistanu je u 58,3% uzoraka podzemnih voda, uzetih iz oblasti uzgoja duvana utvrđeno prisustvo CPF-a u koncentraciji do 0,03 µg/L (Tariq i sar., 2007). Merenjem izvedenim u Kaliforniji, tokom perioda od 5 godina (2006-2010), utvrđen je CPF u 17,7% uzoraka vode, a u 9,9% uzoraka vode koncentracije su prelazile dozvoljene granice na osnovu kriterijuma kvaliteta vode, pri čemu je najviši nivo iznosio 3,7 µg/L. O postojanosti CPF-a govori i činjenica da je njegovo prisustvo detektovano i u 79% uzoraka kišnice u Kaliforniji (NMFS, 2008), u uzorcima snega u Nacionalnom parku Rainer u Vašingtonu, kao i u uzorcima magle u Kaliforniji (McConnell i sar., 1998).

Bioakumulacija

U studijama u kojima je ispitivana bioakumulacija CPF-a, utvrđeno je da se isti akumulira u ribama, odnosno ribljem tkivu (US EPA, 2006). Pored toga, prema podacima US EPA (2006) "pri maksimalnoj primeni, CPF se biokoncentriše u tkivima riba i vodenih beskičmenjaka, do nivoa koji prelaze vrednosti za akutnu LC₅₀ za osjetljive vrste ptica i malih vrsta sisara". Biokoncentracija CPF-a u ribnjacima, može predstavljati akutne i/ili reproduktivne rizike za vodene ptice i sisare, koji se hrane u blizini tretiranih površina.

2.3.5. EFEKTI NA ŽIVOTNU SREDINU

2.3.5.1. VODENI ORGANIZMI

Hlorpirifos uzrokuje značajne štetne efekte kod vodenih organizma sa dugotrajnim posledicama, vrlo je toksičan za ribe, a umereno do vrlo toksičan za vodozemce i vodene beskičmenjake. Zato se ne sme prosipati u vodenu sredinu bogatu životinjskim i biljnim svetom (US EPA, 2006; WHO, 2009a; NZ EPA, 2012).

Ostaci ili rezidue CPF-a su pronađene i u drugim organizmima, koje žive u prirodi, kao što su: vidre, žabe, ribe i školjke (kamenice). CPF predstavlja dugotrajnu opasnost za

vodene ekosisteme jer uzrokuje poremećaje endokrinog sistema kod riba, žaba i dagnji. Kod riba CPF smanjuje aktivnost AChE (Assis i sar., 2012; Oruc, 2012), smanjuje brzinu plivanja i povećava anksioznost (Richendrfer i sar., 2012), te može delovati mutageno i izazvati deformitete kičme (Holcombe i sar., 1982). Između 1974. i 2005. godine, CPF je bio uzročnik 108 slučajeva trovanja, tj. pomora riba (US EPA, 2009a; WHO, 2009a). Sve je veća zabrinutost da će kontaminacija pesticidima, uzrokovati izumiranje populacije žaba u SAD, gde je utvrđeno značajno opadanje njihovog broja (Sparling i sar., 2001).

Rezidue CPF-a kod riba su nađene u brojnim zemljama širom sveta. Zabeležena koncentracija CPF-a u ribama je npr. 21,4 µg/kg u Kini (Wang i sar., 2012c), Egiptu 9,38 µg/kg (Malhat i Nasr, 2011), SAD 3,1 µg/kg (Sapozhnikova i sar., 2004), Tajvanu 64 µg/kg kod divlje ribe, a čak 463 µg/kg kod veštački gajene ribe (Sun i Chen 2008), Indiji 88, 6 mg/kg (Amaraneni i Pillala, 2001), Gani 0,3 µg/kg (Essumang i sar., 2009), Etiopiji 1,12 µg/kg (Deribe i sar., 2011).

2.3.5.2. SISARI

Hlorpirifos je veoma ekotoksičan za kopnene kičmenjake (NZ EPA, 2012). Njegova LD₅₀ posle peroralne primene iznosi 64 mg/kg za miševе (EC, 2005), 1000-2000 mg/kg za kuniće 500 mg/kg za zamorčice i 800 mg/kg za ovce (NPIC, 2009). Kućni ljubimci tretirani preparatima koji sadrže CPF mogu imati teške posledice. Ovaj pesticid, prisutan u preperatima koji se koriste protiv buva, može kod kućnih ljubimaca izazvati smanjenje aktivnosti ChE, koje perzistira čak i nakon 3 nedelje od tretmana (Boone i sar., 2001).

2.4. TOKSIČNI EFEKTI PESTICIDA NA PTICE

Kao što je poznato, ptice zauzimaju jedinstveno mesto u ekosistemu. One čine jednu od najraznovrsnijih i evolutivno najuspešnijih grupa životinja i uglavnom su nastanjene u toplijim predelima. Nažalost, postoje brojni faktori i pretnje, koji svakodnevno ugrožavaju život ptica na Zemlji, a ne retko dovode i do smanjenja njihovog broja. Od brojnih faktora, posebno treba istaći pesticide, za koje se smatra da spadaju među najčešće uzročnike trovanja i uginuća ptica. Preko 87% ptica, danas je na globalnom nivou ugroženo od raznih pesticida (BLI, 2008). Zahvaljujući naporima

ornitologa, ali i brojnih zaljubljenika, posmatrača ptica, danas su dostupne skoro sve informacije o pticama, njihovom kretanju, pa čak i izumiranju. Poznato je da su ptice veoma značajan indikator promena u životnoj sredini. Zdrave populacije ptica su indikatori ekološkog integriteta, dok pad u brojnosti ovih životinja, ukazuje na poremećaj ekosistema (US FWS, 2002). Populacije ptica imaju centralnu ulogu u funkcionisanju ekosistema, u raznošenju semena, oprašivanju, rekolonizaciji i obnovi ekosistema (Sekercioglu i sar., 2004), kontroli brojnosti insekata i drugih štetočina. Zato, opadanje populacije ptica u mnogim delovima sveta izaziva ozbiljnu zabrinutost.

Međutim, ponekad je prilično teško precizno utvrditi da je uginuće ptica uzrokovano pesticidima. Razlog je što ptice mogu uginuti daleko od mesta trovanja, zatim što se njihovi leševi brzo razgrađuju ili služe kao hrana u lancu ishrane. Danas u svetu, skoro da nema zemlje gde određena vrsta ptica nije ugrožena. Najveći pad u brojnosti se odnosi na livadske i močvarne ptice (Rich i sar., 2004). Poznato je da je čak 41% od 1138 populacija vodenih ptica u opadanju, a da je povećanje broja jedinki utvrđeno samo kod 19% populacije ptica (Delany i Scott, 2002). U proseku, brojnost populacija svih šumskih ptica je opala za oko 10% u Evropi u periodu od 1980. do 2006. godine, a kod populacija ptica na farmama, ovaj procenat iznosi i do 48% (EBCC, 2008). Smatra se da opstanak 187 globalno ugroženih ptičjih vrsta, primarno zavisi od hemijskog zagađenja, uključujući pesticide. U SAD je dokazano da oko 50 pesticida utiče na smrtnost ptica (BLI, 2004). Jedna gruba procena sugerise da 672 miliona ptica u SAD svake godine biva direktno izloženo pesticidima na poljoprivrednom zemljištu, a od toga (zbog akutne izloženosti) uginu 10% ptica (Williams, 1997).

Perzistentni organski zagađivači, mogu se prenositi daleko od mesta primene i imaju tendenciju deponovanja u masnom tkivu u organizmu, i na taj način se povećava njihova koncentracija, u lancu ishrane. U SAD, ptice grabljivice, kao što su orlovi i kormorani koji nastanjuju zagađeno područje Velikih jezera, pretrpeli su mnoge štete zbog organskih zagađivača. Efekti organskih zagađivača vide se u poremećaju reprodukcije, istanjivanju ljuske jajeta, metaboličkim promenama, deformitetima i urođenim defektima, razvoju neoplazmi (rak), promenama u ponašanju, poremećaju funkcije tireoidne žlezde i drugih endokrinih žlezda, imunosupresiji, feminizaciji mužjaka i maskulinizaciji ženki (Orris i sar., 2000). Akutna i hronična izloženost

pesticidima povećava mortalitet, dok subletalna izloženost negativno utiče na populaciju ptica. Najčešće se koriste pesticidi iz grupa organofosfata i karbamata.

2.4.1. DEJSTVO ORGANOFOSFATA NA PTICE

Širom sveta, dokumentovano je uginjavanje ptica trovanih OF. Nacionalni centar za zdravstvenu zaštitu SAD-a je saopštio da je oko 50% slučajeva smrtonosnog trovanja ptica uzrokovano OF (Madison, 1993). Mogući put izlaganja ovim pesticidima je konzumiranje semena ili insekata kontaminiranih letalnim količinama insekticida (Prosser i Hart, 2005). U SAD je između 1980. i 2000. godine registrovano oko 335 slučajeva mortaliteta kod ptica u 42 države, usled trovanja OF. U okviru navedenih slučajeva trovanja, smrtno je stradalo 8 877 ptica (Fleischli i sar., 2004). Takođe, i primena diazinona, drugog po redu, široko korišćenog organofosfatnog pesticida u SAD, imala je za posledicu na hiljade uginulih ptica (Tattersall, 1991). Diazinon pretežno toksično deluje na plovke, kao što su patke i guske. U Kaliforniji je karbamatni pesticid karbofuran odgovoran za većinu uginulih ptica, a nakon njega i diazinon (US EPA; 1999). Analiza aktivnosti AChE u mozgu ukazala je da su se mnoge ptice oporavile od trovanja, nakon subletalnog izlaganja insekticidima (Grue i sar., 1991). Postoje i radovi koji opisuju kratkotrajne promene u ponašanju ptica, posle subletalnog izlaganja (Grue i sar., 1997), dok ima veoma malo onih koji opisuju dugotrajne promene u ponašanju ptica (Grue et al., 1997).

Dugoročni efekti vrlo malih količina OF utiču na apetit i uzgoj crvenokrlnog kosa (Nicolaus i Lee, 1999). Nakon subletalne izloženosti navedenim pesticidima, zabeleženo je smanjenje telesne mase sa prosečnim gubitkom mase 14%. Takav gubitak telesne mase je u korelaciji sa procentom (55-77%) inhibirane AChE kod ptica čvoraka, što je utvrđeno nakon primene jedne doze dikrotofosa (Grue i Shipley, 1984). Lezije u lateralnom hipotalamusu usled izlaganja pesticidima, dovode do izbegavanja hrane, usled čega se naglo smanjuje telesna masa ptica (Kuenzel, 1994).

Promene u ponašanju za vreme reprodukcije i razvoja gonada kod ptica (Kuenzel, 1994) zapažene su posle izlaganja subletalnim koncentracijama OF i karbamata. Ove promene su posledica ventromedijalnih lezija na hipotalamusu. Odloženi razvoj i degeneracija spermatogenih ćelija nastaju kada se domaće i poludomaće ptice izlože OF.

Nakon izlaganja metilparationu, utvrđen je smanjen nivo aktivnosti ChE u testisima i mozgu, ali i povećanje broja abnormalnih ćelija u tubulima u testisima mužjaka ptica vrste *Lonchura malabarica* (Maitra i Sarkar, 1996). Najveći uznemirujući subletalni efekat, koji se može povezati sa OF i karbamatima je njihov uticaj na endokrini sistem, koji se ogleda u poremećaju reprodukcije i razvoja kod mladunaca. Organofosforni insekticidi umanjuju reproduktivnu funkciju, usled moguće promene u sekreciji luteinizirajućeg hormona i progesterona (Rattner i sar., 1984).

Promene u reprodukciji, posle ingestije veoma niskih koncentracija OF mogu biti endokrinog ili farmakološkog porekla. Studije ukazuju da OF mogu uticati na reproduktivne funkcije kod različitih kičmenjaka, tako što smanjuju aktivnost AChE u mozgu, i koncentraciju monoamina i time narušavaju regulacionu aktivnost hipotalamusa ili hipofize na reprodukciju (Muller i sar., 1977). Nakon kratkotrajne ingestije parationa, kod ženki prepelica, zabeleženo je značajno smanjenje nivoa luteinizirajućeg hormona, progesterona i kortikosterona (Rattner i sar., 1982; Stoker i sar., 1993).

Promene u migracionom ponašanju (Vyas i sar., 1995), kao i ponašanju pre i za vreme parenja (Hart, 1993), veličini legla (Bennett i sar., 1991) i roditeljskoj brizi (Grue, 1982), uglavnom nastaju zbog smanjenog nivoa hormona, bitnih za reprodukciju, nastalog usled izlaganja pesticidima. Takođe, zapaženo je da ptice slabije pevaju i manje se pojavljuju (čvorak) (Hart, 1993). Pored toga, povećava se agresivnost kod jedinki oba pola (Grue i sar., 1991), što je apsolutno povezano sa inhibicijom AChE u mozgu. Kod divljih pataka izloženih OF, uspeh izleganja je smanjen za 43% u odnosu na kontrolne jedinke, zbog abnormalnog ponašanja majki za vreme ležanja na jajima (često napuštanje gnezda) (Bennett i sar., 1991). Uz to, smanjuje se i broj snesenih jaja.

Nakon akutnog i subletalnog izlaganja OF, kod ptica može nastati kratkotrajna hipotermija (Grue i sar., 1991). Indukovano smanjenje telesne temperature je vezano za smanjenje aktivnosti AChE za više od 50% (Clement, 1991).

Izlaganje visokim dozama OF može prouzrokovati direktno oštećenje ćelija i organa imunog sistema i na taj način smanjiti funkciju ovog sistema. Nakon izlaganja OF dokumentovane se histopatološke promene u tkivima i organima imunog sistema, patološke promene u ćelijama, promenjeno sazrevanje, promene u limfocitima i funkcionalne promene kod imunokompetentnih ćelija (Voccia i sar., 1999; Ambali i sar.,

2010). Ostali efekti uključuju direktno oštećenje proteina i DNK (Videira i sar., 2001). Organofosfati utiču na odgovor imunog sistema kod životinja, pre svega preko antiholinergičkih i neholinergičkih puteva (Vial i sar., 1996; Chen, 2012).

2.4.2. DEJSTVO HLORPIRIFOSA NA PTICE

Hlorpirifos je veoma toksičan za neke vrste ptica, kao što su fazani, golubovi, vrapci, pilići, a umereno toksičan za patke (NPIC, 2009). Njegova LD₅₀ iznosi 13,3-17,8 mg/kg t.m. za prepelicu (Gunther, 1974; EC, 2005), 10 mg/kg za vrapca (US EPA, 2006) i 8,41 mg/kg za fazane (EC, 2005). Kada se CPF primenjuje u hrani, LD₅₀ iznosi 136-203 ppm-a za patke (EC, 2005; US EPA, 2006).

Postoji opravdana zabrinutost da bi kontinuirano subletalno izlaganje CPF-u moglo smanjiti brojnost ptica, usled negativnog uticaja na fiziološke procese, ali i na ponašanje ptica. Suprimirajuće delovanje na letenje, moglo bi uticati na mogućnost migracije ptica. Tako je na primer izlaganje golubova (*Columba livia*) CPF-u u “ekološki relevantnim koncentracijama” (3 mg/kg t.m.), prouzrokovalo značajno produžavanje vremena leta ovih životinja, što ukazuje na smanjenu sposobnost letenja (Moye i Pritsos, 2010).

Godina 1995. će ostati upamćena po velikom pomoru ptica u Australiji. Naime, smatra se da je upravo CPF odgovoran za “veliki incident” vezan za pomor ptica vrste Ibis (uginuli ptići u 400-500 gnezda) u močvarama Australije. Do ovakvog zaključka se došlo na osnovu pronalaska CPF-a u jetri (0,026 mg/kg t.m.) i crevima (0,167 mg/kg t.m.) ovih ptica. Pretpostavlja se da su ptice unele CPF u organizam hraneći se tretiranim skakavcima (NRA. 2000b).

Između 1974. i 2005. godine, CPF je takođe “okrivljen” kao verovatni uzročnik 79 akcidentalnih trovanja, koja su za posledicu imala uginuća uglavnom ptica i pčela (US EPA, 2009a). U SAD je objavljeno da od CPF-a najčešće strada ptica drozd (*Turdus migratorius*) (NPIC, 2009).

U literaturi nema mnogo podataka o ispitivanju toksičnosti CPF-a kod prepelica. U jednoj studiji je ispitivano delovanje CPF-a na aktivnost enzima AChE u mozgu prepelica. Prepelice stare dve nedelje bile su akutno izložene CPF-u, a potom eutanazirane u određenim vremenskim intervalima (od 1 do 120 h kasnije). Utvrđeno je

da je za detekciju značajne inhibicije enzima bilo neophodno da prođe 2 - 4 h posle izlaganja CPF-u. Najniža doza koja je izazvala značajnu inhibiciju AChE iznosila je između 30 i 50 mg/kg t.m., sa pratećim mortalitetom određenog broja jedinki. Supresija aktivnosti enzima trajala je najmanje 24 h (Cairns i sar., 1991).

Narvaez i saradnici (2016) su ispitivali uticaj CPF-a na potrošnju energije i kapacitet detoksikacije ovog pesticida kod mladih japanskih prepelica. U tu svrhu jedinkama, starim 15 dana, davane su subletalne doze CPF-a (10 i 20 mg/kg hrane) tokom četiri nedelje. Aktivnost, BuChE i AChE je merena u više tkiva. Pored toga, praćen je i metabolizam kod tretiranih jedinki, a na kraju oglada u ptičjim ekskretima je merena i koncentracija glukuronske kiseline. Dok je aktivnost BuChE bila inhibirana CPF-om u svim tkivima tokom treće i četvrte nedelje nakon tretmana, aktivnost AChE nije bila promenjena. Step en izlučivanja glukuronske kiseline bio je do 2 puta veći kod jedinki tretiranih CPF-om u dozi od 20 mg/kg t.m., u poređenju sa kontrolnim kao i tretiranim jedinkama sa 10 mg/kg t.m CPF-a. Inhibicija aktivnosti BuChE potvrdila je da ovi enzimi ispunjavaju svoju ulogu tzv. „bio-hvatača“ OF pesticida, i smanjujući njegovu koncentraciju štite aktivnost AChE od inhibicije uzrokovane CPF-om (Narvaez i sar., 2016).

2.5. VITAMIN B1

Vitamin B1(tiamin hidrohlorid ili aneurin) spada u grupu hidrosolubilnih vitamina, koji se ne sintetiše u organizmu sisara i isti ga moraju unositi hranom (Adams, 2001; Muminović i sar., 2006). Vitamin B1 je prvi identifikovani B vitamin i utvrđeno ja da ima brojne metaboličke i farmakološke efekte u organizmu.

2.5.1. FARMAKODINAMIKA

Svi živi organizmi poseduju enzimske sisteme za formiranje različitih derivata tiamina: tiamin-monofosfat (TMP), tiamin-difosfat (TDP), tiamin-trifosfat (TTP), adenzin-tiamin-trifosfat i adenzin-tiamin-difosfat. Međutim, do danas su raznovrsne biološke uloge otkrivene uglavnom za TDP, difosforilisani oblik tiamina, koji funkcioniše kao kofaktor enzima uključenih u centralni energetska metabolizam (Frank i sar., 2007). Ovi enzimi, citosolna transketolaza (TK), dehidrogenaza pirogroždane kiseline (PDH) i

dehidrogenaza α -ketoglutaratne kiseline (KGDH), učestvuju u dva osnovna procesa dobijanja energije iz ugljenih hidrata: glikoliza šećera i rezervni pentozo-fosfatni put. Naime, PDH katalizuje dekarboksilaciju pirogroždane kiseline u Ac-CoA koji ulazi u Krebsov ciklus, KGDH katalizuje dekarboksilaciju α -ketoglutarata u CoA ćilibarne kiseline, a TK učestvuju u pentozo-fosfatnom putu - alternativnom putu oksidacije glukoze (Bunik i sar., 2013). Dakle, tiamin je neophodan za konverziju pirogroždane kiseline u Ac-CoA, za unošenje atoma ugljenika u ciklus trikarboksilnih kiselina i za dekarboksilaciju α -ketoglutarne kiseline u CoA ćilibarne kiseline jer prethodno pomenuti enzimi pokazuju smanjenu aktivnost pri nedostatku tiamina (Butterworth i sar., 1993; Bubber i sar., 2004). Enzim TK, katalizuje reakcije oksidacije u pentozo-fosfatnom putu. Najvažniji metabolički produkti ovog puta su: riboza-5-fosfat koja dalje ulazi u procese sinteze nukleotida, nukleinskih kiselina, koenzima i polisaharida i redukovani koenzim NADPH (nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat) koji ulazi u različite procese biosinteze npr. masnih kiselina i holesterola (Horecker, 2002) ali i uklanjanje kiseoničnih radikala. TK su tako odgovorne za održavanje redoks stanja ćelije (Slekar i sar., 1996), a nedostatak tiamina povećava oksidativni stres (Calingasan i sar., 1999) i dovodi do poremećaja sinteze ribonukleinskih kiselina (RNK) (Boros i sar., 2003).

Takođe, Ac-CoA se koristi za sintezu acetilholina, dok 2-oksoglutarat dehidrogenaza oksiduje glutamatni prekursor 2-oksoglutarat. Kao rezultat toga, inhibicija PDH smanjila je sintezu acetilholina u sinaptozomima mozga pacova (Parkhomenko i sar., 1991), dok je inhibicija 2-oksoglutarat dehidrogenaze promenila nivo glutamata i GABA u različitim sistemima, uključujući kultivisane primarne neurone i mozak pacova (Trofimova i sar., 2012). Pored energetske deficita nedostatak tiamina dovodi do poremećaja metabolizma glavnih neurotransmitera, acetilholina i glutamata (Bunik i sar., 2013).

Tiamin je neophodan i za normalno funkcionisanje nervnog tkiva. Zahvaljujući svojoj ulozi kao koenzima kokarboksilaze on u procesima oksidativne dekarboksilacije stimuliše stvaranje velike količine energije iz supstrata u ovom metabolički izuzetno aktivnom tkivu. S druge strane, preko uloge kao koenzima enzima TK neophodan je za normalnu sintezu lipida i holesterola, a usled toga i očuvanja integriteta ćelijske membrane. Pored toga, tiamin učestvuje i u neurohumoralnoj transmisiji (Frank i sar., 2015). Neophodan je za sintezu AChE i za pasivni transport natrijuma kroz ekscitirane

ćelijske membrane. Preko sinteze CoA učestvuje u sintezi AChE. Usled toga, nedostatak tiamina ima za posledicu smanjenu sintezu AChE, a kao rezultat toga, potenciranje negativnog delovanja OF. Zajedno sa BuChE, AChE deluje sinergistički na funkciju i održavanje holinergičkog nervnog sistema (Jankowska-Kulawy i sar., 2010; Sharma i Bist, 2014). Pored toga, izmena nivoa AChE utiče na nivo BuChE. Inače, obe holinesteraze (osim u mozgu) postoje u polimorfnoj formi i u drugim organima u organizmu. Oni imaju ulogu u raznim fiziološkim funkcijama, kao što su: ćelijska deoba, interakcije između samih ćelija, aktivnosti amino-aril-acilaminidaze (Adams, 2001).

Tiamin ima važnu ulogu u energetsom metabolizmu mozga. Nedostatak tiamina dovodi do patoloških promena u nervnom tkivu, kao što su atrofija mozga, krvarenje, oštećenja bele mase (Langlais i Zhang, 1997), gliozna i značajan gubitak neurona (Mulholland, 2006; Edwards i sar., 2017). Za stvaranje energije mozak, koristi glukozu koja difuzijom prolazi krv-mozak barijeru (KMB) (Rao i sar., 2006). Budući da oko 30% glukoze u mozgu biva u potpunosti oksidovano kroz Krebsov ciklus (Siebert i sar., 1986) prethodno navedena tri enzima čija aktivnost zavisi od tiamina su od vitalne važnosti za metabolizam glukoze u mozgu (Mulholland, 2006). Oni koriste TDF kao kofaktor i preuzimaju oko 80% od ukupne količine tiamina u nervnom sistemu (Frank i sar., 2015). Smanjenje aktivnosti PDH i KGDH doprinosi smanjenju sinteze ATP i vodi ka smrti ćelije (Aikawa i sar., 1984). Smanjenje nivoa pirogroždane kiseline koja ulazi u Krebsov ciklus povećava koncentraciju mlečne kiseline u mozgu i dovodi do acidoze (Hakim, 1984).

Gubitak aktivnosti KGDH odgovoran je za promene koncentracije nekih neurotransmitera uključujući γ -aminobuternu kiselinu (GABA), glutamat i aspartat (Hazell i sar., 1993; Langlais i Zhang, 1993). TK učestvuje u pentoznom-ciklusu u kom nastaje redukovani NADPH koji je dalje uključen u razne ćelijske reakcije, kao što je sintezu lipida i uklanjanje kiseoničnih radikala. TK su tako odgovorne za održavanje redoks stanja ćelije (Slekar i sar., 1996), a njegov nedostatak povećava oksidativni stres (Calingasan i sar., 1999). Smanjenje tiamina dovodi do poremećaja sinteze ribonukleinskih kiselina (RNK) (Boros i sar., 2003).

Pored uloge koenzima u metaboličkim procesima, tiamin ima i strukturnu ulogu (Edwards i sar., 2017). Neke studije su pokazale da je tiamin aktivna komponenta aksoleme, mitohondrijske (Frank i sar., 2015) i sinaptosomalne membrane (Matsuda i

Cooper, 1981), utiče na sinaptičku transmisiju i modifikuje aktivnost membranskih jonskih kanala (Tallaksen i Tauboll, 2000). Tokom embriogeneze tiamin stabilizuje membrane novonastalih nervnih ćelija i usporava pojavu apoptoze tokom razvića (Mulholland, 2006).

Potrebe za tiaminom su povećane kod ishrane bogate ugljenim hidratima (Muminović i sar., 2006; Frank i sar., 2015). Kod nedostatka tiamina povećan je nivo glukoze u krvi i količina glikogena u jetri, a u pankreasu su povećana i Langerhansova ostrvca. Dodavanjem ugljenih hidrata u hranu ptica sa deficitom tiamina deluje toksično. Inače tiamin pojačava hipoglikemično dejstvo adrenalina, ali ne i amfetamina (Adams, 2001). Utvrđeno je da je tiamin neophodan za normalnu raspodelu lipida (Adams, 2001), kao i njihovu sintezu iz ugljenih hidrata (Muminović i sar., 2006). Smatra se da je tiamin utiče i na elektrolite (Adams, 2001).

2.5.2. FARMAKOKINETIKA

Posle *per oralne* (*p.o.*) aplikacije tiamin se procesima pasivne difuzije i aktivnim transportom uglavnom sporo apsorbuje u tankom crevu. Zbog toga se znatan deo date doze razgradi ili pasira kroz creva i biva izlučen fecesom. Da bi se povećao stepen apsorpcije, tiamin se daje u nekoliko pojedinačnih doza hranom. Najveći efekt tiamin daje nakon *intramuskularnog* (*i.m.*) ili *intravenskog* (*i.v.*) aplikovanja (Minson, 1990; Swetman, 2009).

Apsorbovani tiamin se transportuje uglavnom u neizmenjenom obliku. Neravnomerno se raspoređuje po organizmu: 30% u jetri, a 50% u mišićima. Nakon parenteralne aplikacije akumulira se uglavnom u jetri (Adams, 2001). Kapacitet deponovanja je ograničen, tako da se posle davanja u visokim dozama uglavnom i izlučuje velika količina ovog vitamina. Kada se prekine unošenje tiamina simptomi deficita se javljaju za 1 nedelju kod golubova, za 10 dana kod pacova, a za 3 do 4 nedelje kod pasa. Jetra gubi 4/5 deponovanog tiamina za nedelju dana, a zatim se ovaj proces usporava. U mozgu se nalazi relativno mala količina tiamina, ali je postojaniji nego u drugim organima (Muminović, 2006; Swetman, 2009).

Vitamin B1 se delom biotransformiše u pirimidin. Pored toga, u svim ćelijama koje imaju jedro fosforiliše se u TPP i u tom obliku deponuje u ograničenoj koncentraciji.

Kapacitet biotransformacije je mali i farmakološke doze se metabolišu u malom procentu (Brent i Bartley, 1984).

Vitamin B1 se obično izlučuje u neizmenjenom obliku, izuzev u nekim patološkim stanjima, kao što su nefritis i pneumonija. Preko fecesa se malo izlučuje u normalnim uslovima, a sa povećanjem oralne doze, izlučivanje vitamina B1 preko fecesa ide i do 50% pa i više. Znojenjem se gubi 5% unetog vitamina B1 (Muminović, 2006).

2.5.3. NEDOSTATAK ILI DEFICIT VITAMINA B1

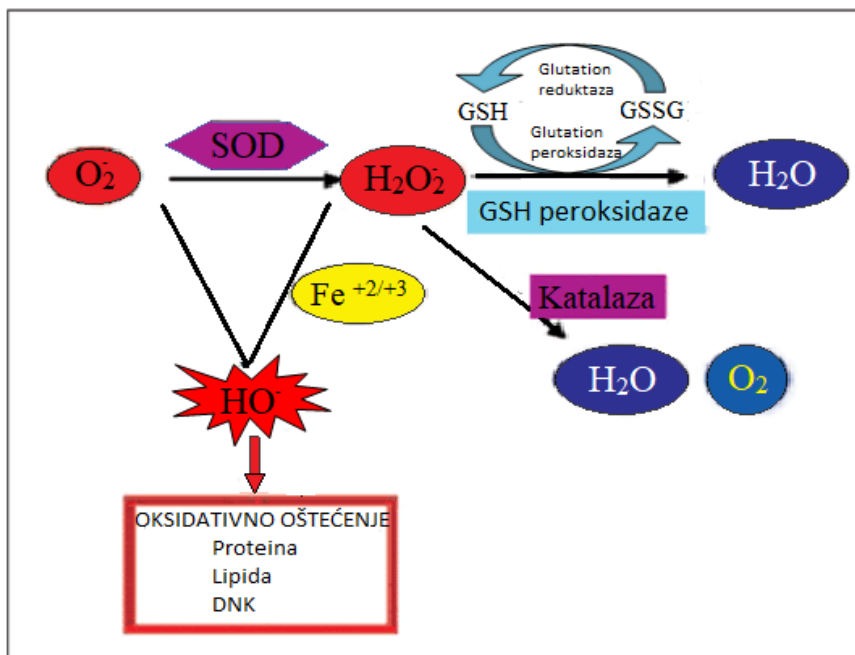
Deficit vitamina B1 kod životinja uglavnom nastaje kao posledica postojanja antagonista tiamina ili tiaminaza, enzima koji razlaže tiamin, a ove promene većinom nastaju usled ishrane karnivora organima sirove ribe, trovanja nepreživara papratima, promenom ishrane kod preživara ili predoziranja kokcidiostatika kod goveda i živine.

Kod preživara, svinja (Blair i Newsome, 1985), konja (Cunha, 1991), pasa (Read i Harrington, 1982) nedostatak vitamina B1 se karakteriše slabošću i inapetencom, ataksijom, parezom, dijarejom, kardijalnim aritmijama. Sve ovo je praćeno simptomima karakterističnim za polioencefalomalaciju, uključujući slepilo, pritisak u glavi, konvulzije, paralizu, opistotonus i tortikolis (Edwin i sar. 1982).

Kod živine dominiraju neuromuskularni simptomi uključujući anoreksiju, opistotonus, konvulzije i simptome polineuritisa (Gries i Scott, 1972).

2.6. OKSIDATIVNI STRES

Poznato je da se tokom aerobnog metabolizma u organizmu sisara neprestano stvaraju slobodni radikali i neki neradikalni agensi kao što su: azot-oksidi (NO), superoksid anjon-radikal ($O_2^{\cdot-}$), hidroksilni radikal ($\cdot OH$), peroksilni radikal ($ROO\cdot$), singletni kiseonik (1O_2), peroksinitrit ($ONOO^-$), vodonik-peroksid (H_2O_2), hipohlorasta kiselina (HClO) i dr. Iako imaju brojne korisne uloge u organizmu, prisutni u većim količinama, onim koje prevazilaze antioksidativni kapacitet organizma mogu delovati štetno. Dakle, da bi se očuvala ravnoteža u organizmu, i time predupredila moguća pojava neželjenih efekata, slobodni radikali se moraju stalno uklanjati.



Slika 5. Poremećena ravnoteža između antioksidanata i produkcije prooksidanata dovodi do povećanog stvaranja slobodnih radikala što može dovesti do ozbiljnih ćelijskih oštećenja (adaptirano iz Wakamatsu i sar., 2008).

Funkciju uklanjanja i inaktiviranja slobodnih radikala u organizmu vrši sistem antioksidativne odbrane, koji pretvara molekul aktivnog kiseonika u netoksična jedinjenja (Maity i sar., 2016). U okviru ovog sistema učestvuju enzimi (superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT) i enzimi glutation redoks ciklusa) i neenzimske supstance (glutation (GSH), vitamin C, vitamin E) (Slika 5).

Kao posledica ovog neuravnoteženog stanja dolazi do oštećenja strukture i funkcije važnih ćelijskih biomolekula (polinezasićenih lipida, ugljenih hidrata, nukleinskih kiselina i proteina), i smanjenog stepena preživljavanja ćelija (Sies, 1997) (Slika 6).

Tokom fizioloških procesa, svi aerobni organizmi koriste kiseonik i stvaraju potencijalno štetne reaktivne kiseonične vrste (ROS) (Sohal i Weindruch, 1996), koje se uključuju u normalne biološke procese, ali isto tako u nekontrolisanim uslovima mogu predstavljati uzrok oksidativnog oštećenja ćelija (Valko, 2007). Prema tome, slobodni radikali mogu imati pored fiziološke i patološku ulogu u organizmu.

Oksidativni stres je u poslednjih 40 godina prepoznat kao učesnik u patogenezi nastanka brojnih patofizioloških poremećaja, poput kardiovaskularnih bolesti, HIV infekcije, autoimunih oboljenja, karcinoma (Halliwell i Gutteridge, 2007), dijabetes

melitusa, neurodegenerativnih bolesti, fibroze, hemolize, kao i procesa starenja (Gómez, 2012).



Slika 6. Prikaz disbalansa tokom stalne „borbe“ antioksidanasa i prooksidanasa u organizmu

2.6.1. SLOBODNI RADIKALI

Oksidansi su jedinjenja koja mogu da vrše oksidaciju ciljanih molekula oduzimanjem vodonikovog atoma, oduzimanjem elektrona ili dodavanjem kiseonika. Prema hemijskoj strukturi i reaktivnosti, oni mogu biti slobodni radikali ili ne, u zavisnosti od toga da li sadrže nesporeni elektron.

Nastali slobodni radikali mogu da izazovu niz reakcija (propagacija), reagujući sa radikalima i drugim, manje reaktivnim vrstama. Interakcijom slobodnih radikala sa neradikalima ili sa bilo kojim prostorno bliskim molekulom proteina, lipida, ugljenih hidrata ili nukleinskih kiselina, mogu nastati novi tzv. sekundarni slobodni radikali, pri čemu otpočinje lanac radikalskih reakcija. Jednom pokrenut ovaj lanac ima osobinu prostornog i vremenskog širenja uz pojačavanje efekta (Di Meo i sar., 2016) i zato se često kaže da radikali rađaju radikale.

Slobodni radikali se dele u zavisnosti od aktivnog centra na reaktivne vrste sa kiseonikom (ROS), azotom (RNS), ugljenikom (RCS) i sumporom (RSS). Biološki su najznačajniji slobodni kiseonični radikali (ROS) i reaktivna azotova jedinjenja (RNS) (Tabela 1.).

Tabela 1. *Reaktivne kiseonične i azotove vrste*

Slobodni radikali		Jedinjenja koja nisu radikali	
ROS	RNS	ROS	RNS
Superoksid anjon, (O ₂ ^{·-})	azot dioksid radikal, (NO [·])	vodonik-peroksid, (H ₂ O ₂)	azot trioksid, (N ₂ O ₃)
hidroksilni radikal, (·OH)	azot(IV)-oksid radikal, (NO ₂ [·])	hipohlorasta kiselina, (HClO)	azotasta kiselina, (HNO ₂)
peroksil radikal, (ROO [·])		ozon, (O ₃)	peroksinitrit anjon, (ONOO ⁻)
alkoksil radikal, (RO [·])		singlet kiseonik, (¹ O ₂)	alkil peroksinitrit, (ROONO)
hidroperoksilni radikal, (HO ₂ ^{·-})		hidroperoksid, (ROOH)	nitroksil anjon, (NO [·])
			nitrozil katjon, (NO ⁺)

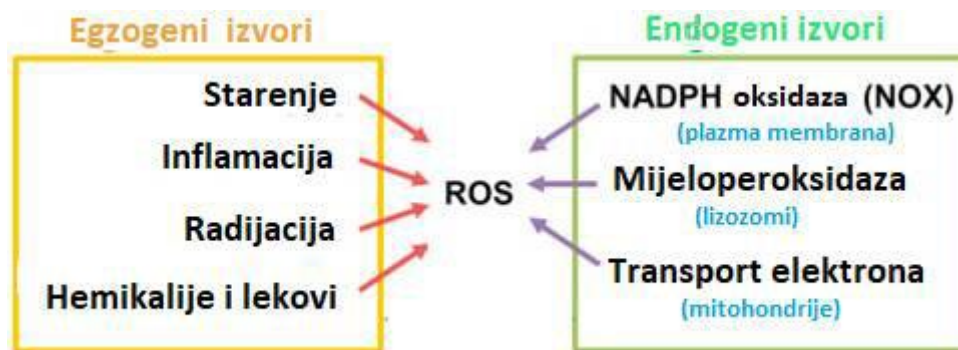
2.6.1.1. IZVORI I STVARANJE SLOBODNIH RADIKALA

Sve ćelije u aerobnim uslovima sredine su konstantno izložene velikom broju endogenih i egzogenih oksidanasa (Slika 7) (Halliwell i Gutteridge, 2007).

Kada se govori o endogenim izvorima slobodnih radikala, misli se na proces prenosa elektrona na respiratornom lancu u mitohondrijama, stvaranje ROS-a pomoću citohroma, dejstvom enzima, preko fagocitne aktivnosti na mestu oštećenja tkiva, tokom metabolizma arahidonske kiseline, prilikom oslobađanja hem-proteina, razgradnju kateholamina, peroksidaciju nezasićenih masnih kiselina i reakcije oksido-redukcije u prisustvu metala s promenljivom valencijom (Cu, Fe), tzv. Fentonovu hemijsku reakciju (Di Meo i sar., 2016).

Mitohondrije se smatraju jednim od najznačajnijih izvora ROS-a, jer se u njima odvija proces ćelijskog disanja tj. oksidativne fosforilacije. Od ukupno unetog molekuskog kiseonika (O₂), 90% dospeva u mitohondrije, gde se tokom ćelijskog disanja redukuje u H₂O, a oslobođena energija se koristi za sintezu adenozin-trifosfata (ATP). Oko 2% kiseonika u respiratornom lancu učestvuje u stvaranju ROS. Tokom nepotpune redukcije kiseonika, usled slabih veza između elektrona i enzima koji učestvuju u njihovom prenosu, dolazi do “curenja” molekula kiseonika i stvaranja ROS (Bondy i

sar.,1994). O intenzitetu proizvodnje slobodnih radikala, najbolje govori podatak da od 250 g kiseonika, koje ljudski organizam dnevno potroši, oko 2-5% se prevodi u $O_2^{\cdot-}$ (Stevanović i Borozan, 2012).



Slika 7. Egzogeni i endogeni izvori u procesu stvaranja slobodnih radikala

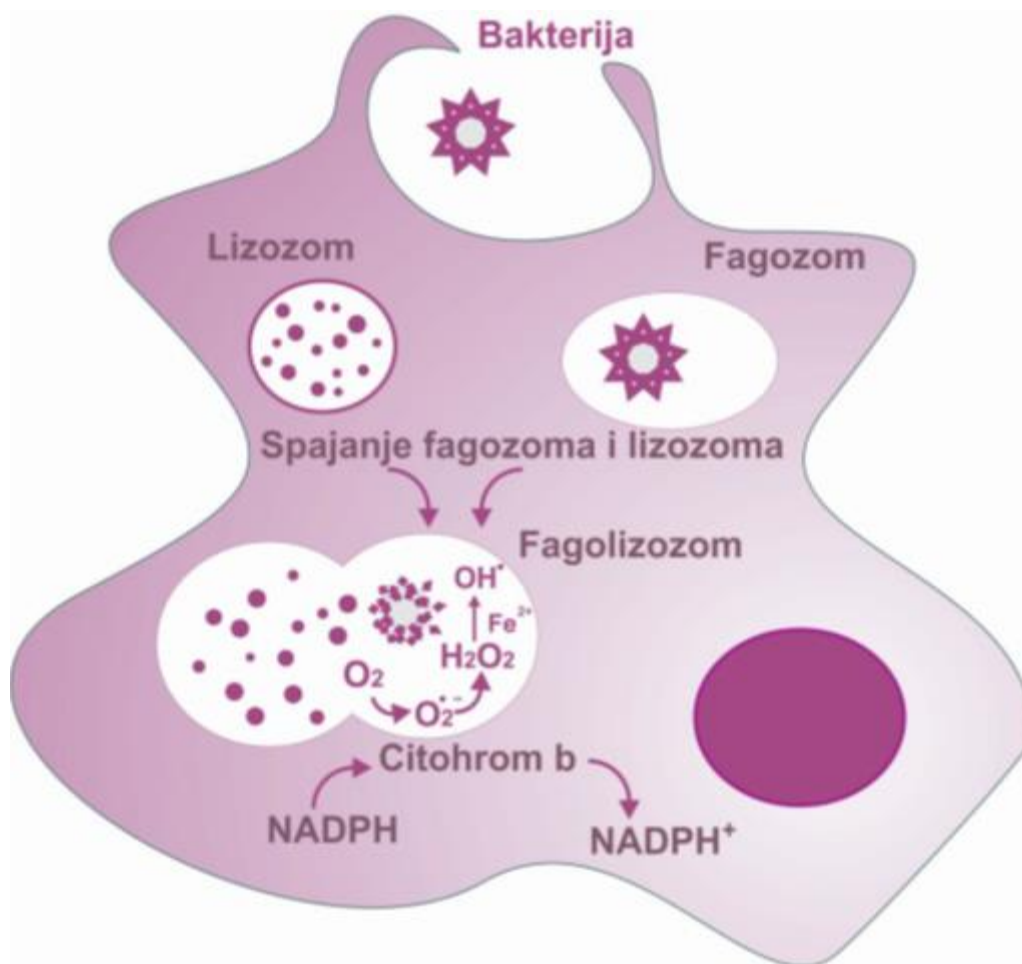
U egzogene izvore spadaju jonizujuće, elektromagnetno zračenje, radijacija, zagađenje vazduha (smog), ozon, metaboliti raznih lekova i ksenobiotika, pesticidi, hemikalije (uključujući dezinfekcione supstance) (Halliwell i Gutteridge, 2007). Indirektno do oksidativnog stresa može dovesti i neadekvatna ishrana sa neadekvatnom količinom esencijalnih hranljivih materija i vitamina.

2.6.1.2. FIZIOLOŠKA ULOGA SLOBODNIH RADIKALA

Slobodni radikali se tokom metaboličkih procesa u organizmu konstantno, u umerenim koncentracijama stvaraju i ostvaruju značajnu fiziološku ulogu. Ova uloga se ogleda u regulaciji signalnih puteva unutar ćelije i među ćelijama, aktivaciji leukocita, fagocitozi, u sintezi esencijalnih bioloških jedinjenja i proizvodnji energije, doprinose vaskularizaciji tkiva, ćelijskom rastu i oporavku od oštećenja, kao i programiranoj ćelijskoj smrti-apoptozi (Di Meo i sar., 2016).

Slobodni kiseonični radikali predstavljaju prvu liniju odbrane od infektivnih agenasa. Pri kontaktu s patogenima, u fagocitima se odvija tzv. respiratorni prasak (*eng.* respiratory burst), kojeg karakteriše povećana potrošnja kiseonika, pojačana aktivnost heksozo-monofosfatnog puta i stvaranje ROS-a, za koje je direktno odgovoran membranski vezani sistem NADPH-oksidade (van Eeden i sar., 1999). Tokom inflamacije, ali i u procesu apoptoze, pod dejstvom NADPH-oksidade i uz podsticaj

citokina – interleukina 1 i TNF (*eng.* tumor necrosis factor) u fagocitima, dolazi do povećanog stvaranja slobodnih radikala i nekih neradikalnih vrsta ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\cdot OH$, 1O_2 , $HClO$). U reakciji dismutacije $O_2^{\cdot-}$ sa SOD nastaju H_2O_2 i 1O_2 .



Slika 8. Proces fagocitoze. Mikroorganizmi se u fagolizozomu neutrališu slobodnim radikalima.

Glavno mesto stvaranja H_2O_2 u ćelijama su peroksizomi, u kojima se nalazi i enzim CAT, koja ga neutrališe i time sprečava njegovu akumulaciju. Vodonik-peroksid je najstabilniji intermedijerni produkt redukcije kiseonika iako ne predstavlja pravi slobodni radikal, jer nema nesporeni elektron. H_2O_2 ima brojne toksične efekte, i dovodi do oksidacije sulfhidrilnih grupa proteina i do inicijacije procesa lipidne peroksidacije. Dejstvom mijeloperoksidaze (MPO) iz lizozoma H_2O_2 se prevodi u baktericidne materije $HClO$ i hipohalogeni radikal, u prisustvu unutar ćelijskih jona halogena. Neutrofilni granulociti mogu da proizvode H_2O_2 i do 3 sata nakon aktiviranja (Stevanović i Borožan, 2012).

Hidroksil radikal ($\cdot\text{OH}$) nastaje reakcijom H_2O_2 i veće koncentracije $\text{O}_2^{\cdot-}$ u prisustvu jona Fe ili Cu. Kao neutralni oblik $\cdot\text{OH}$ predstavlja najreaktivniji intermedijerni produkt parcijalne redukcije kiseonika i ima veoma kratak poluživot, svega 10^{-9}s (Pastor i sar., 2000). Ovi radikali mogu da difunduju daleko od mesta nastanka, zato što lako prolaze kroz ćelijsku membranu, dok hidrosolubilni $\text{O}_2^{\cdot-}$ deluju samo na mestu nastanka (Stevanović i Borožan, 2012).

Najjednostavniji iz grupe peroksil-radikala ($\text{ROO}\cdot$) je protonovana forma $\text{O}_2^{\cdot-}$ koji se naziva hidroperoksil radikal ili perhidroksil radikal ($\text{HOO}\cdot$). Hidroperoksil radikal vrši peroksidaciju polinezasićenih masnih kiselina posredstvom ksantin-oksidadze.

Superoksid radikal u fagocitima uništava fagocitovane čestice putem peroksidacije membranskih lipida, inaktivacije unutar ćelijskih proteina (enzima i receptora), fragmentacije DNK i RNK. Tako liza fagocitovane bakterijske ćelije nastaje za 30 do 60 min, a da bi došlo do njenog potpunog uništavanja neophodno je prisustvo proteaza (Babior i sar., 2002).

Signalna transdukcija predstavlja proces transmisije signala i prenosa informacija sa ćelijske površine, kroz ćeliju do ciljnih molekula. Slobodni radikali zauzimaju značajno mesto kao pokretači, prenosioci i/ili modifikatori ćelijskog odgovora (Đukić, 2008), usled njihove sposobnosti da inicijalni signal transformišu u biohemijski odgovor ćelije.

Slobodni radikali i njihovi metaboliti u regulaciji signalnih puteva funkcionišu kao sekundarni glasnici i mogu učestvovati i u prevođenju sekundarnih u tercijerne glasnike ili pokretanju ili finalizovanju procesa signalne transdukcije. Signalni putevi se najčešće pokreću aktivacijom receptora. Superoksid radikal se može uzeti kao primer, koji oksidacijom rianodinskih receptora dovodi do oslobađanja Ca^{2+} iz depoa skeletnomišićnih ćelija i time modulira snagu mišićnih kontrakcija (Stevanović i Borožan, 2012). Smatra se da su ROS idealni unutarćelijski glasnici jer su veoma mali, visoko reaktivni i difuzibilni molekuli.

Apoptoza je oblik programirane ćelijske smrti čiji cilj je razgradnja i fagocitoza suvišnih ili oštećenih ćelija bez pokretanja zapaljenskog odgovora. To je jedan fiziološki, genski kontrolisan mehanizam uklanjanja neželjenih i nepotrebnih ćelija iz organizma (Kamm i Ferch, 2000; Zhivotovsky, 2004).

U procesu apoptoze nastaju određene promene u strukturi i morfologiji ćelija. Pored kondenzacije citoplazme, intracelularnih organela i hromatina, ćelijskoj smrti prethodi deljenje jedra i pojava tzv. apoptotskih tela (Guimaraes i Linden, 2004). Tako izmenjene, procesom apoptoze zahvaćene ćelije postaju plen fagocita, odnosno makrofaga. Ukoliko dođe do poremećaja u razvoju apoptoze (usled supresije gena koji kontrolišu ovaj proces ili oštećenja istih mutacijom) mogu nastati razne bolesti (Maianski i sar., 2004; Kamm i French, 2000). Dakle, apoptoza kao genetski kontrolisan oblik ćelijske smrti, ima veoma značajnu ulogu u održavanju ravnoteže i homeostaze tkiva u organizmu (Green i Reed, 1998; Hengartner, 2000), a smatra se da povoljno deluje i u procesu inflamacije.

Utvrđeno je da na proces apoptoze i posledično time na ćelijsku smrt mogu delovati razni stimuli, kako u ćeliji, tako i van ćelije. Sam proces apoptoze protiče u dve faze, *prva ili inicijalna* i *završna ili izvršna faza*. Za prvu je karakteristično da duže traje, i zavisi od vrste ćelija i signala, koji je stimulišu. Druga faza kraće traje i ona je ista u svim ćelijama. Karakteriše se dehidratacijom, povećanjem koncentracije kalcijumovih jona, kontrakcijom citoskeleta, kao i aktivacijom velikog broja enzima i enzimskih sistema. Posebno treba istaći cistein-proteaze ili kaspaze, transglutaminaze i endonukleaze. Upravo, zahvaljujući delovanju ovih enzimskih sistema, u ćelijama nastaju već prethodno navedene morfološke promene, koje dovode do smrti ćelija (Green i Reed, 1998; Čolić, 2004; Mainski i sar., 2004).

Primeri fiziološke apoptoze su: uklanjanje nepotrebnih ćelija u toku organogeneze, neutrofila i limfocita koji su obavili svoju ulogu, uklanjanje ćelija inficiranih virusima kao i oštećenih ćelija čija je reparacija nemoguća. Poznati induktori programirane ćelijske smrti su fiziološki aktivatori (TNF, transformišući faktor rasta- β , neurotransmiteri, kalcijum, nedostatak faktora rasta, gubitak matriksnih veza, glukokortikoidi), aktivatori nastali usled oštećenja (virusna infekcija, bakterijski toksini, slobodni radikali, tumorski supresori, nedostatak nutritivnih materija), terapijski agensi (hemioterapeutici, γ - i UV-zračenje) i toksična jedinjenja (etanol i β -amiloid peptid) (Đukić, 2008). Programirana ćelijska smrt može biti aktivirana preko receptora, i brojnim stimulusima, kao što su oksidativni stres, porast NO, koji dovode do disfunkcije mitohondrija i oslobađanja proapoptotičnih faktora. Postoje spoljašnji i unutrašnji signalni putevi nastanka apoptoze. Ligandi koji se vezuju za membranske receptore

pokreću spoljašnji put, a faktori koji dovode do disfunkcije mitohondrija ili do stresa endoplazmatskog retikuluma aktiviraju unutrašnji put (Di Meo i sar., 2016).

Azot monoksid može i da izazove i da spreči apoptozu u zavisnosti od tipa ćelije, nivoa stresa, redoks stanja i hemijske forme samog NO, kao i od sposobnosti ćelije da neutrališe stvorene slobodne radikale. NO sprečava ćelijsku smrt kada deluje preko sistema cikličnog guanozin-monofosfata (cGMP). Takođe, može da deaktivira kaspaze i potentne apoptotične proteine (Curtin, 2002). U fiziološkim uslovima NO ima važnu ulogu u funkcionisanju vaskularnog sistema regulisanjem tonusa krvnih sudova. NO je neurotransmiter, a u imunom sistemu modulira citotoksičnost makrofaga. Pored toga smanjuje adheziju i agregaciju trombocita, reguliše tonus glatkih i poprečno-prugastih mišića, učestvuje u neuroendokrinoj regulaciji; reguliše glad, bol i san (Jelenković i sar., 2005). Azot monoksid postoji u nekoliko hemijskih formi, od kojih NO^+ i NO^- pokazuju zaštitna svojstva, za razliku od NO.

Ako stepen oksidativnog oštećenja premaši kapacitet mehanizma za popravku i uklanjanje slobodnih radikala, može doći do ćelijske smrti ili apoptoze. Brojni vanćelijski i unutarćelijski signali mogu indukovati proces apoptoze (induktori apoptoze), u čijoj izvršnoj fazi dolazi do aktivacije kaspaza (efektori apoptoze).

Ekspresija **inducibilne azot-oksida sintaze (iNOS)** se povećava u mikrogliji i astrocitima pod uticajem brojnih faktora, kao što su bakterijski i virusni produkti, proinflamatorni citokini ($\text{IL-1}\beta$, $\text{IFN-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$), neurodegenerativni toksini, usled međućelijskog kontakta, ishemijskog šoka i povreda. Tokom neuroinflamacije, aktivacija iNOS-a dovodi do prekomerne produkcije NO, koji u visokim koncentracijama dovodi do smrti neurona. NO je veoma reaktivan molekul koji direktno oštećuje proteine i druge ćelijske elemente, a između ostalog, može da pokrene i apoptozu i nekrozu neurona. Pored toga, NO reaguje sa O_2^- i formira ONOO^- , jako oksidujuće sredstvo i ujedno veoma reaktivan molekul u živim sistemima. Destruktivan efekat RNS na ćelijske komponente izaziva nitrozativni stres (Di Meo i sar., 2016).

Tokom inflamacije u mikrogliji dolazi do aktivacije više različitih signalnih puteva, kao što su NF- κ B, ERK, JNK, p38, Bcl-2 i povećane su aktivnosti inducibilne forme enzima COX-2, na koje takođe utiče koncentracija NO. Povećana koncentracija NO aktivira ERK i p38 signalne puteve koji dovode do transkripcije i aktivacije COX-2, a NO je neophodan i za dugotrajnu ekspresiju COX-2 (Madrigal i sar., 2003).

Ciklooksigenaze (COX) su enzimi koji katalizuje konverziju arahidonske kiseline u prostanoide, familiju lipidnih metabolita koja uključuje prostaglandine, prostacikline i tromboksane. Aktivnost iNOS i COX-2 enzima je blisko povezana (Madriral i sar., 2003).

B-ćelijski limfom 2 (Bcl-2) je prvootkriveni član familije proteinskih regulatora apoptoze. Ovaj antiapoptozni protoonkogen je lokalizovan u membranama mitohondrija, endoplazmatskog retikuluma i u spoljašnjoj membrani jedarne ovojnice. Može da inaktivira apoptozu, sprečavanjem aktivacije kaspaze ili stabilizacijom mitohondrijske membrane, čime se sprečava otpuštanje citohroma (Di Meo i sar., 2016).

2.6.1.3. TOKSIČNI EFEKTI SLOBODNIH RADIKALA

U situaciji povećanog stvaranja i/ili neadekvatnog uklanjanja slobodnih radikala dolazi do narušavanja redoks homeostaze i indukcije oksidativnog oštećenja ćelijskih makromolekula, kao što su lipidi, proteini i DNK (Trachootham i sar., 2008). Ovako stvoreni “višak” slobodnih radikala dovodi do lipidne peroksidacije ćelijskih membrana i njihovog progresivnog oštećenja, što za rezultat ima gubitak selektivne propustljivosti i poremećaje u signalnoj transdukciji. Oksidativno oštećenje proteina ima za posledicu gubitak njihove biohemijske funkcije (inaktivacije enzima), dok usled oštećenja DNK može doći do nastanka mutacija, grešaka prilikom replikacije, nestabilnosti genoma, ekspresije gena, i sve to na kraju može dovesti do ćelijske smrti (Klaunig i sar., 2010).

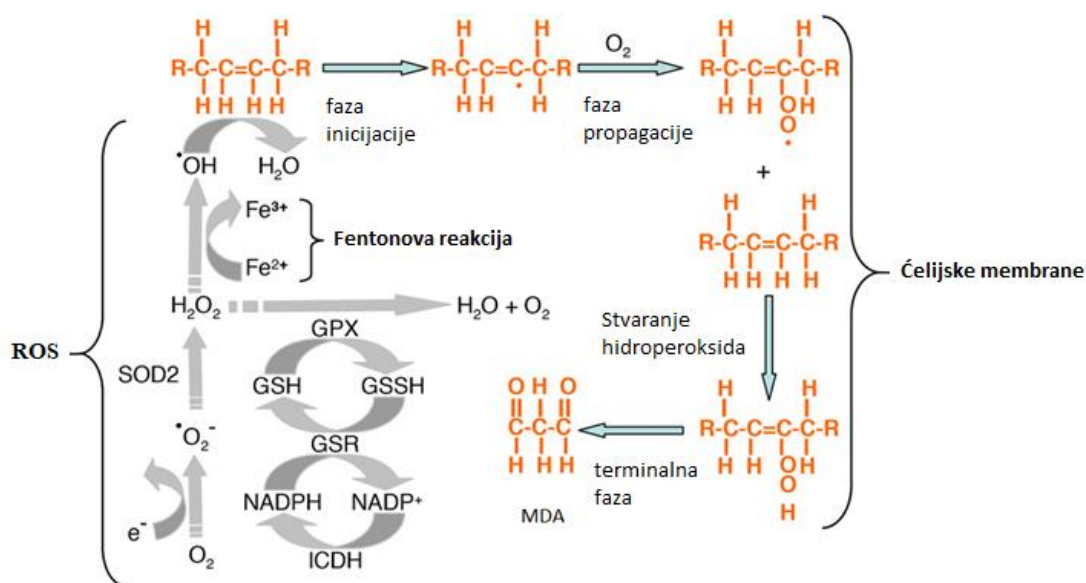
Lipidna peroksidacija

Lipidna peroksidacija (LPO) predstavlja oksidativno oštećenje lipida, lipoproteina i drugih molekula, koji sadrže lipide (Stevanović i Borozan, 2012), a posebno su osetljive polinezasićene masne kiseline fosfolipida ćelijske membrane.

Usled oštećenja lipida ćelijske membrane dolazi do smanjene fluidnosti, povećane propustljivosti za jedno- i dvovalentne jone, inaktivacije membranskih enzima i gubitka integriteta membrane, čime je narušena zaštitna i transportna funkcija ćelijske membrane kao i ćelijska signalizacija (Denisov i Afanasev, 2005).

U ovakvim uslovima dolazi do stvaranja i propagacije lipidnih radikala, pri čemu se oštećuju ćelijske membrane, dolazi do smrti ćelije ili nakupljanja peroksidnih lipida u

postupku starenja, kao i stvaranja reaktivnih metabolita (malondialdehida (MDA), 4-hidroksinonenala (HNE), izoprostana) i drugih toksičnih produkata lipidne peroksidacije, kao što su alkoholi, ketoni, alkani i etri (Dianzani i Barrera, 2008).



Slika 9. Proces lipidne peroksidacije ćelijske membrane (modifikovano prema Al-Gubory, 2012)

Peroksidacija polinezasićenih masnih kiselina (PNMK) se odvija kroz tri faze: fazu inicijacije, propagacije i terminacije (Slika 9). Proces inicijacije podrazumeva da visoko reaktivni $\cdot\text{OH}$ oduzimaju vodonik od metilenskih grupa lipida, pri čemu se stvaraju slobodni radikali lipida ($\text{R}\cdot$ - alkil radikal), što dovodi do premeštanja dvostrukih veza i građenja konjugovanih diena. U fazi propagacije $\text{R}\cdot$ reaguje sa O_2 , formirajući različite radikalske vrste, uključujući i $\text{ROO}\cdot$. Peroksil radikal je nosilac dalje propagacije LPO, usled sposobnosti da brzo i lako oksiduje susjedni lipidni molekul i time amplificira oksidativno oštećenje lipida. Oduzimanjem atoma vodonika, $\text{ROO}\cdot$ se stabilizuje i nastaje lipidni hidroperoksid (ROOH). U fazi terminacije učestvuju $\text{ROO}\cdot$ i ROOH . Reakcijom ciklizacije od $\text{ROO}\cdot$ nastaju endoperoksidi. Kao krajnji proizvod u fazi terminacije se oslobađaju niskomolekulski aldehidi, najčešće MDA i 4-HNE, isparljivi ugljovodoni (etan, pentan, ketoni), (Laguerra i sar., 2007).

Merenje koncentracije MDA je validan marker za procenu intenziteta LP (Del Rio, 2005). Ovaj terminalni produkt oksidativnog oštećenja PNMK, se preko Schiff-ovih baza unakrsno vezuje za proteine i fosfolipide membrane, čime se inaktiviraju enzimi i drugi transportni proteini ćelijske membrane (Stevanović i Borozan, 2012).

Usled obilja PNMK u plazma membranama CNS i eritrocita, ova tkiva su posebno osetljiva na delovanje slobodnih radikala. Osetljivosti eritrocita doprinosi i visoka koncentracija potencijalno snažnih pokretača oksidativnih procesa, kao što su kiseonik i hemoglobin (Stevanović i Borozan, 2012).

Modifikacija DNK

Oksidativna modifikacija DNK dovodi do promene strukture DNK, koja potom dovodi do genetskih oštećenja, grešaka pri translaciji, inhibicije sinteze proteina, mutacije i na kraju do kancerogeneze. Oksidativna modifikacija je najizraženija u prisustvu metala sa promenljivom valencom (Fe, Cu), jer tada kao produkt reakcije oksidacije nastaje najpotentniji $\cdot\text{OH}$, koji u reakciji sa H^+ iz dezoksiriboze DNK molekula dovodi do raskidanja jednostrukih veza i oksidacije purinskih i pirimidinskih baza. Adicijom $\cdot\text{OH}$ na guanin nastaje 8-hidroksideoksiguanozin (8-OH-dG) koji se smatra indikatorom oksidativnog oštećenja DNK (Đukić, 2008.). Peroksinitrit radikal može dovesti do fragmentacije DNK, dok peroksinitritna kiselina uzrokuje raskidanje lanaca, nitrovanje i dezaminaciju nukleinskih baza. Posledice dejstva slobodnih radikala na DNK se ispoljavaju trenutno ili odloženo. Permanentno oksidativno oštećenje DNK predstavlja prvi korak ka mutagenezi, karcinogenezi i starenju (Valko i sar., 2007).

Oksidacija proteina

Oksidacija proteina smanjuje efikasnost i preciznost vitalnih biohemijskih procesa što rezultira ćelijskom degeneracijom i smrću. Veliki broj mehanizama oksidacije dovodi do stvaranja karbonilnih grupa, pa se one najčešće koriste kao marker oksidativnog oštećenja proteina (Stadtman i Berlett, 1997). Do razvoja karbonilnog stresa odnosno nastanka karbonil derivata dolazi: direktnom oksidacijom aminokiselinskih ostataka lizina, arginina, treonina i prolina, direktnom oksidacijom bočnog lanca glutaminske kiseline, sekundarnom oksidacijom lizina oksidovanim produktima šećera, sekundarnom oksidacijom dejstvom MDA i sličnih produkata LPO na proteine. Dakle, slobodni radikali mogu delovati direktno na proteine, ali do oksidacije proteina može doći tokom oksidacije drugih vrsta molekula (procesu LPO, glikozilovanje) (Beal, 2002).

2.6.2. MEHANIZMI ODBRANE OD OKSIDATIVNOG STRESA

Tokom procesa evolucije aerobni organizmi su, usled konstantne borbe sa toksičnim dejstvom ROS, stvorili sistem antioksidativne zaštite. Značaj antioksidativne zaštite postaje jasan kad se sagleda podatak da se dnevno po ćeliji stvori između 1 i 3 milijarde reaktivnih vrsta (Stevanović i Borozan, 2012).

Odbrambeni mehanizmi se mogu podeliti na najmanje tri nivoa zaštite: *prevencija oksidativnih oštećenja, neutralizacija oksidativnog oštećenja i popravka ili inkapsulacija nepopravljivih oštećenja.*

Primarna antioksidativna zaštita podrazumeva antioksidanse koji sprečavaju inicijaciju i propagaciju slobodnih radikala, odnosno sprečavanje nastanka ROS-a. U ovu grupu antioksidanasa ubrajaju se i helatne materije, koje imaju sposobnost vezivanja jona prelaznih metala. To su serumski metaloproteini, kao što su transferin, feritin, ceruloplazmin. Njihova uloga ogleda se u prevenciji oksidacije DNK-a i lipida, obzirom da $\cdot\text{OH}$ deluje lokalno i može da dovede do oštećenja ovih struktura (Stevanović i Borozan, 2012). Najčešći molekularni mehanizmi dejstva su hvatanje slobodnih radikala (*eng.* scavenging), odnosno doniranje protona i neutralisanje radikala ili vezivanje prelaznih metala u neaktivnu formu (heliranje). U primarnu antioksidativnu zaštitu spadaju: antioksidansi poreklom iz hrane (npr. vitamin C, vitamin E, polifenoli), endogeni antioksidansi (tioli, N-acetil-cistein, NADPH i NADH, ubihinon) i enzimi (SOD, CAT, enzimi glutationskog redoks ciklusa), kao i metalvezujućii proteini, koji heliraju slobodne jone gvožđa i bakra.

Antioksidansi su sposobni da daju elektrone oksidansima, na taj način ponište njihovu reaktivnost pod kontrolisanim uslovima, i učine ih bezopasnim za ćelijske makromolekule. Antioksidansi time postaju radikali, ali oni su daleko stabilniji i nisu u stanju da izazovu ćelijsko oštećenje. Oksidovani antioksidansi se naknadno vraćaju u njihovo aktivno, redukovano stanje nekim od brojnih, efikasnih ćelijskih mehanizama uz potrošnju ćelijske energije. Ova mogućnost recikliranja, odnosno povratka antioksidanasa u redukovano stanje, predstavlja najznačajniju kariku u funkcionisanju antioksidativne mreže (Lykkesfeldt i Svendsen, 2007).

Sekundarni (drugi) nivo antioksidativne zaštite ima za cilj da neutrališe slobodne radikale, pre nego što oštete biomolekule. Antioksidansi sekundarne antioksidativne

zaštite obuhvataju enzime koji razgrađuju ili repariraju već nastale oksidovane produkte u ćelijama (Halliwell i Gutteridge, 1999; 2007). Antioksidatni ove grupe se mogu podeliti na enzimске i neenzimске (Stevanović i Borozan, 2012).

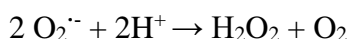
2.6.2.1. ENZIMSKI MEHANIZMI ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE

Karakteristično za ove enzimске komponente je da za svoju aktivnost zahtevaju prisustvo metala, a često im se aktivnosti i preklapaju i dopunjuju. Uglavnom su specijalizovani, za nekog pripadnika ROS i RNS i time blokiraju početak lančane reakcije koju izazivaju slobodni radikali.

Najzastupljeniji enzimski antioksidanti su:

1. *Superoksid-dismutaza (SOD)*
2. *Katalaza (CAT)*
3. *Glutation-peroksidaza (GSH-Px)*
4. *Glutation-reduktaza (GR)*
5. *Glutation-S-transferaza (GST)*

Superoksid-dismutaza (SOD) je metaloenzim, prvi put izolovan još davne 1938. godine (Mann i Keilin, 1938) iz krvi govečeta (hemokuprein), dok su 1969. godine McCord i Fridovich dokazali njenu enzimsku aktivnost i nazvali je superoksid-dismutaza (Slika 10). Predstavlja prvu liniju odbrane ćelija protiv oksidativnog stresa, pošto ima ključnu ulogu u razgradnji $O_2^{\cdot-}$ (Fukai i Ushio-Fukai, 2011), a dalju razgradnju H_2O_2 nastavljaju CAT i GSH-Px. Na aktivnost SOD-a jedino utiče NO.

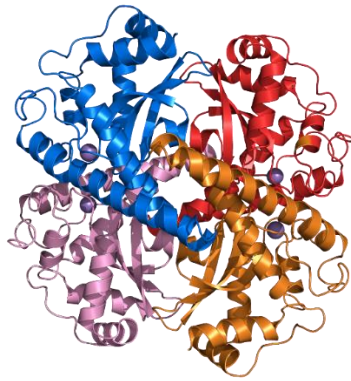


Postoje tri vste SOD, koje se razlikuju po strukturi (po vrsti metalnog jona u aktivnom centru), svojstvima, lokaciji unutar ćelije, mestu dejstva:

Bakar, cink – superoksidna-dismutaza, SOD1 (Cu,Zn-SOD1) citosolna-SOD

Mangan – superoksidna-dismutaza, SOD 2 (Mn-SOD2) mitohondrijalna

Bakar, cink – superoksidna-dismutaza, SOD3 (Cu,Zn-SOD3) ekstracelularna



Slika 10. *Struktura superoksid dismutaze, SOD2*

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/13/Superoxide_dismutase_2_PDB_1VAR.png

Prisutna je u telesnim tečnostima (krvna plazma) i u svim tkivima (mozak, jetra, srce, bubrezi i adrenalnim žlezdama) (Ighodaro i Akinloye, 2018).

SOD1 se nalazi u svim ćelijama organizma i čini 50-80% ukupne aktivnosti sve tri izoforme SOD-a (Fukai i Ushio-Fukai, 2011). Homodimer je i svaka subjedinica se sastoji iz dve tiolne grupe, atoma bakra i cinka. Aktivno mesto se nalazi u šupljini dve petlje (Stevanović i Borozan, 2012). Koncentracija SOD1 raste sa godinama i veća je kod osoba ženskog pola (Younus, 2018).

SOD2 sadrži Mn kao kofaktor i prisutna je u mitohondrijama i peroksizomima i smatra se glavnim „čistačem“ $O_2^{\cdot-}$. Za razliku od drugih izoformi SOD-a, aktivnost SOD2 se značajno povećava sa povećanjem nivoa oksidativnog stresa. Ovaj enzim štiti ćelije intracelularno i ekstracelularno (spoljašnje ćelijske membrane od LPO). Usled smanjenja aktivnosti SOD2 dolazi do porasta koncentracije H_2O_2 i povećanja smrtnosti ćelija (Fukai i Ushio-Fukai, 2011).

SOD3 je prvo detektovana u humanoj plazmi, limfi i cerebrospinalnoj tečnosti (Stevanović i Borozan, 2012). Ovaj tetramer ima po jedan atomom Cu, Zn i GSH u katalitičkom centru i veliki afinitet za heparin. SOD3 se povećava u regijama poremećenog toka krvi i ima ulogu u sprečavanju vazokonstrikcije i inflamacije (Younus, 2018).

Katalaza (CAT) je antioksidativni enzim koja je široko rasprostranjena u svim tkivima, a najveću aktivnost ispoljava u jetri i eritrocitima (Halliwell i Gutteridge, 1989). Ključna uloga CAT je razgradnja H_2O_2 na vodu (H_2O) i kiseonik (O_2), tako tokom jednog

minuta konvertuje nekoliko miliona molekula H_2O_2 (Townsend i sar., 2011). CAT efikasno uklanjanja H_2O_2 kad se on nalazi u velikim koncentracijama, dok uklanjanje malih količina H_2O_2 obavlja GSH-Px. Promene u aktivnosti CAT utiču na stvaranje slobodnih radikala, odnosno oksidativnog stresa (Paliwal i sar., 2011). Katalaza sprečava oštećenja u fagocitima, odnosno na mestima nastanka H_2O_2 , kao i tokom oksidacije masnih kiselina. To je tetramerni protein, koji sadrži NADPH, a u čijem aktivnom centru se nalazi atom gvožđa, odnosno hem-grupa (hem- Fe^{3+} protoporfirin).

Glutation-S-transferaze (GST) su enzimi glutacion redoks ciklusa. U ovu familiju enzima spadaju četiri tipa peroksidaza (glutacion-peroksidaza (GSH-Px), glutacion-reduktaza (GSH-Red), fosfolipid-hidroksiperoksidne glutacion-peroksidaze (PH-GSHPx) i GST). GST predstavlja veliku grupu detoksikacionih enzima, koji se nalaze u citosolu i mitohondrijama. GST modulišu ćelijski odgovor na endogene ili egzogene elektrofile, inflamaciju, oksidativni stres, odgovor na veliki broj ksenobiotika, i ćelijski ciklus u uslovima povišenog oksidativnog stresa. Ovaj enzim katališe konjugaciju redukovano glutaciona (GSH) u fazi II biotransformacije, a može inhibirati c-Jun N-terminalnu kinazu (JNK). Formiranjem konjugata nastaju hidrofilni metaboliti koji se mogu izlučiti iz organizma (Fukai i Ushio-Fukai, 2011). Nivo ekspresije GST je bitan faktor koji određuje osetljivost ćelije na toksične agense. *In vivo*, nivo aktivnosti GST regulisan je i stvaranjem ROS, i upravo slobodni radikali nastali u redoks ciklusu su jedan od najjačih induktora ovog enzima (Stevanović i Borozan, 2012).

Glutacion peroksidaza (GSH-Px) je jedini antioksidantni enzim koji u sebi ne sadrži jon metala i koristeći glutacion kao supstrat, jedan je od esencijalnih zaštitnika organizma od oksidativnog stresa. Ovaj enzim sadrži selen, koji zamenjuje sumpor u cisteinu, i time postiže veću efikasnost kao katalizator. Može da neutrališe lipidne i druge perokside do odgovarajućih hidroksi-masnih kiselina, a zatim se regeneriše u svoju nativnu formu pomoću GSH. GSH-Px ima značajnu ulogu u inhibiciji inicijalnog stadijuma peroksidacije lipida ćelijskih membrana, pokrenutog difuzibilnim H_2O_2 .

Glutacion je najzastupljeniji neenzimski antioksidans u jetri. On služi kao supstrat za GSH-Px i GST i njegova funkcija je uglavnom usmerena na uklanjanje slobodnih radikala, kao što su H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$, RO^{\cdot} , održavanje tiola membranskih proteina (Jozefczak i sar., 2012).

Glutation reduktaza (GR) koristi energiju iz pentoza fosfatnog puta (NADPH) za očuvanje rezervi redukovanog glutaciona u ćeliji. Ovaj enzim je efikasan čak i u uslovima visokih koncentracija H₂O₂. On katalizuje reakciju redukcije oksidativnog glutaciona (GSSG) u redukovanog glutation (GSH) uz učešće NADPH (Stadtman i Barlett, 1997). Unutar ćelijski odnos oksidovanog i redukovanog glutaciona (GSSG/GSH) je odraz oksidativnog stanja ćelije i pokazatelj detoksikacionih kapaciteta ćelije. U ćelijama sisara nalazi se u citosolu i mitohondrijama (Ighodaro i Akinloye, 2018).



2.6.2.2. NEENZIMSKI MEHANIZMI ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE

Neenzimski antioksidansi su prikazani u Tabeli 2 (Stevanović i Borozan, 2012).

Redukovani glutation (GSH) ima posebnu ulogu u kontroli ROS-a (Foyer i Noctor, 2005). GSH kao donor elektrona u askorbat-glutation-ciklusu regeneriše askorbat iz njegove oksidovane forme u dehidroaskorbat, dok on sam prelazi u oksidovanu formu glutacion-disulfid (GSSG).

Askorbinska kiselina ili vitamin C sprečava i svodi na minimum oštećenja izazvana ROS-om u ćelijama (Athar i sar., 2008). Ovaj najzastupljeniji antioksidant ima sposobnosti da donira elektrone u različitim enzimskim i neenzimskim reakcijama (Gill i Tuteja, 2010).

Tercijarni (treći) nivo antioksidativne zaštite predstavlja *popravke i de novo sinteze* oksidovanih molekula, odnosno povratak izgubljenih funkcija i uklanjanje nastalih štetnih molekula. Enzimski antioksidansi koji učestvuju u reparaciji su: klasična i fosfolipid-zavisna glutacion peroksidaza, fosfolipaza A₂, različiti proteolitički enzimi, endo- i egzokleaze, DNK-ligaze i DNK-polimeraze, specifične oksidoreduktaze (tiol-transferaza, protein-ADP-ribozil-transferaza i ATP i Ca²⁺-nezavisna transferaza) (Stevanović i Borozan, 2012).

Ukoliko stepen oksidativnog oštećenja prelazi kapacitet popravke i uklanjanja oštećenja, nastupa i poslednji mehanizam odbrane, a to je kontrolisana ćelijska smrt ili apoptoza (Payne i sar., 1995). Sposobnost indukcije programirane ćelijske smrti je od velikog značaja u različitim telesnim funkcijama, uključujući i kontrolu rasta tkiva, i pod

kontrolom je nekoliko signalnih puteva, a jedan od tih puteva aktivira upravo povećanje oksidativnog stresa (Payne i sar., 1995).

Tabela 2. *Neenzimski antioksidansi i njihova uloga*

NEENZIMSKI ANTIOKSIDANSI	ULOGA
Redukovani glutation (GSH)	-zaštita od H ₂ O ₂ -zaštita od hipohlorita -zaštita od hidroksil radikala -zaštita od organskih radikala -zaštita od peroksil radikala -učestvovanje u regeneraciji vitamina E
Vitamin C	-prekida lančane reakcije radikala -sakuplja hidrofilne peroksil radikale -sprečava peroksidaciju lipida -regeneriše vitamin E -održava integritet LDL
Vitamin A	-hvatač singlet kiseonika -sprečava lančane reakcije radikala -inhibira lipooksigenazne aktivnosti
Vitamin E	-uklanja slobodne radikale -prekida lančane reakcije peroksidacije
Koenzim Q	-sprečava peroksidaciju lipida -uklanja superoksid anjon radikal
Albumini	-vezuje Cu ²⁺ i hem -uklanja hipohlorastu kiselinu
Ceruloplazmin	-vezuje Cu ²⁺ , hem, Fe ³⁺ -uklanja hipohlorastu kiselinu -reaguje sa O ₂ ^{•-} i H ₂ O ₂
Transferin i laktoferin	-direktno vezuje slobodno Fe
Haptoglobin	-vezuje slobodni hemoglobin
Hemopeksin	-vezuje slobodni hem
Mokraćna kiselina	-uklanja slobodne radikale
β-karoten	-inhibira peroksidaciju lipida
Bilirubin	- inhibira peroksidaciju lipida

2.7. ANTIOKSIDATIVNO DELOVANJE VITAMINA B1

Zbog svog snažnog antioksidativnog delovanja tiamin, spada u grupu „antistres vitamina“. Antioksidativno delovanje ostvaruje inhibicijom nastanka LPO i oksidacije slobodnih radikala, koji nastaju oksidacijom PNMK (oleinska kiselina) ćelijskih membrana. S druge strane pokazalo se da nedostatak ovog vitamina ima za posledicu pojačanu LP u ćelijama jetre pacova (Lukienko i sar., 2000).

Usled svega navedenog, tiamin ima značajnu ulogu u sprečavanju nastajanja raznih stanja i bolesti u kojima oksidativni stres kao uzrok dominira (umor, mišićna slabost, Vernikova encefalopatija i neurodegeneracija) (Song i Singleton, 2002; Page i sar., 2011; Sriram i sar., 2012).

Uprkos velikom broju podataka koji ukazuju na antioksidativna svojstva tiamina, njegov uticaj na LPO u ćelijama nije u potpunosti razjašnjen. Tiamin deluje antioksidativno na aldehide, polifenole i askorbinsku kiselinu (Ball i sar., 1998; Nandi i sar., 2005) i slično askorbinskoj kiselini i u cisteinu sprečava oksidaciju SH-grupa u ćelijama (Jones i Anderson, 1983). Kompleks tiamin-askorbinska kiselina inhibira oksidaciju dopamina slobodnim radikalima (Florence i Stanber, 1989). Visoki nivoi slobodnih radikala u mozgu (Langlais i sar., 1997) i produkata LP u jetri (Sushko i Lukienko, 1981) nađeni su kod pacova sa deficitom tiamina. U isto vreme, tiamin se brzo oksiduje u medijumu koji sadrži bakar (Cu^{2+}) i askorbinsku kiselinu (Stepuro i sar., 1997), kao i u reakcijama peroksidacije lipida (Melnichenko i sar., 1999).



III

CILJEVI I ZADACI

Svedoci smo sve veće i neracionalne upotrebe pesticida, a posebno onih organofosfatne strukture, koji mogu da se akumuliraju u organizmu i izazivaju dugotrajna oštećenja kod ljudi i životinja. U ovoj doktorskoj disertaciji ispitivani su mehanizmi toksičnog dejstva hlorovanog organofosfatnog pesticida hlorpirifosa (CPF) na Japanske prepelice (*Coturnix japonica*), za koje se zna da su osetljive na CPF. Ovaj organofosfat svoje dejstvo ostvaruje inhibicijom aktivnosti enzima acetilholinesteraze (AChE) i izazivanjem oksidativnog stresa. Vitamin B1 (tiamin) poznat je kao snažan antioksidant, a preko acetil koenzima A učestvuje u sintezi acetilholinesteraze, zbog čega bi mogao da deluje protektivno nakon izlaganja CPF-u. Imajući u vidu da u dosadašnjoj literaturi nema podataka o delovanju B1 vitamina nakon trovanja CPF-om kod ptica, glavni cilj ove disertacije bio je da se ispita mehanizam toksičnosti CPF-a, kod subakutno tretiranih japanskih prepelica, nakon primene subletalnih doza, kao i potencijalno zaštitni efekat vitamina B1, primenjenog neposredno nakon davanja CPF-a, postavljeni su sledeći zadaci:

1. Ispitati promene oksido-redukcionih parametara u plazmi, tkivu jetre i mozga prepelica
2. Na osnovu dobijenih rezultata proceniti ulogu slobodnih radikala u mehanizmu toksičnog delovanja CPF-a.

3. Ispitati aktivnost enzima acetilholinesteraze i butirilholinesteraze u eritrocitima, odnosno plazmi, tkivu jetre i mozga prepelica nakon tretmana različitim dozama CPF-a.
4. Ispitati ukupnu proteinsku raspodelu u krvi sa posebnim osvrtom na lipoproteine ApoA i ApoB nakon tretmana različitim dozama CPF-a i proceniti njihovu povezanost sa arilesterazama.
5. Ispitati ekspresiju *inducibilne* azot-oksida sintaze (*i*NOS) i *c*-Jun N- terminalne kinaze (JNK), ciklooksigenaze (COX-2), kinaze čija je aktivnost regulisana vanćelijskim signalima (ERK1,2), kao i Bcl-2 u mozgu i time proceniti uticaj CPF-a na uvođenje ćelija u apoptozu.
6. Ispitati i analizirati antioksidativni, antiapoptotski i potencijalno protektivni efekat vitamina B1 nakon tretmana različitim dozama CPF-a na osnovu:
 - biohemijskih parametara izazvanih oksidativnim stresom,
 - aktivnosti enzima AChE i BuChE u plazmi, tkivu jetre i mozga prepelica,
 - parametara uključenih u apoptozu,
 - totalnog oksidativnog kapaciteta vitamina B1.



IV

MATERIJAL I METODE

4.1. DIZAJN EKSPERIMENTA

Ispitivanja su izvedena na 80 japanskih prepelica (*Coturnix japonica*), muškog pola, starosti 3-4 nedelje i telesne mase od 200 ± 30 g.. Za vreme oglada životinje su držane u kavezima (po 10 jedinki) dimenzija 100x138x180 cm (Slika 7). Tokom oglada životinje su hranu i vodu dobijale *ad libitum* (proizvođač hrane Veterinarski Zavod „Subotica“ iz Subotice). Aklimatizacija ptica je trajala sedam dana pre početka eksperimenta. U oglednoj prostoriji temperatura je iznosila 22 ± 2 °C. Za izvođenje ove doktorske disertacije obezbeđeno je mišljenje Etičke komisije Instituta za virusologiju, vakcine i serume „TORLAK“ u Beogradu, na osnovu kojeg je dobijeno rešenje Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede-Uprava za veterinu br. 323-07-06596/2018-05.

Japanske prepelice su odabrane zbog svoje dokazane osetljivosti prema CPF-u i prema preporuci Organizacije za ekonomsku saradnju i razvoj (OECD, *engl. Organisation for Economic Co-operation and Development*), koja ih predlaže kao eksperimentalni model (OECD 205, OECD 223). Na osnovu literaturnih podataka za kokoške ($LD_{50} = 32,00$ mg/kg per oralno (*p.o.*)) (W, G), japanske prepelice kao i na osnovu LD_{50} koje smo dobili u našim preliminarnim ispitivanjima ($LD_{50} = 27,36$ mg/kg *p.o.*)

(Litchield i Wilcoxon, 1949), odlučili smo se za sledeće doze CPF-a 1,50; 3,00 i 6,00 mg/kg telesne mase (tm).



Slika 11. Izgled kaveza u kojem su držane prepelice za vreme ispitivanja.

Prepelice su bile podeljene u osam grupa, po 10 životinja. Jedinke prve grupe (kontrolna - c) dobijale su *p.o.* samo rastvarač kukuruzno ulje, koje se koristi kao rastvarač CPF-a. Prepelice druge, treće i četvrte grupe tretirane su *p.o.* CPF-om (Sigma-Aldrich, Chemie GmbH Germany), sa tri različite doze (1,5, 3 i 6 mg/kg t.m.), dok su jedinke sledeće tri grupe (V, VI, VII) dobijale *p.o.* CPF i intramuskularno (*i.m.*) vitamin B1 (Alkaloid, Skoplje). Prepelice preostale VIII (kontrolne) grupe tretirane su samo vitaminom B1. Aplikacija vitamina B1 je sledila 30 minuta nakon tretiranja jedinke CPF-om u dozi od 10 mg/kg *i.m.* Jedinke su tretirane jednom dnevno sedam dana (Tabela 3). Tokom eksperimenta nije bilo uginuća.

Tabela 3. Prikaz dizajna eksperimenta

GRUPE		TRETMAN
Kontrolna	I	Kukuruzno ulje 0,1 ml/kg t.m., <i>p.o.</i>
Eksperimentalne	II	1,50 mg/kg t.m, CPF, <i>p.o.</i>
	III	3,00 mg/kg t.m. CPF, <i>p.o.</i>
	IV	6,00 mg/kg t.m. CPF, <i>p.o.</i>
	V	1,50 mg/kg t.m. CPF, <i>p.o.</i> + 10 mg/kg t.m. B1, <i>i.m.</i>
	VI	3,00 mg/kg t.m. CPF, <i>p.o.</i> + 10 mg/kg t.m. B1, <i>i.m.</i>
	VII	6,00 mg/kg t.m. CPF, <i>p.o.</i> + 10 mg/kg t.m. B1, <i>i.m.</i>
Kontrolna	VIII	Vitamin B1 10 mg/kg t.m, <i>i.m.</i>

4.2. METODE ISPITIVANJA

4.2.1. UZORKOVANJE BIOLOŠKOG MATERIJALA

Sve životinje su žrtvovane osmog dana metodom dekapitacije i uzeti su uzorci pune krvi u epruvete koje su prethodno obložene sa Na-heparinom kao antikoagulansom. Takođe su uzeti i organi: jetra i mozak.

Neposredno po egzenteraciji, merena je masa svakog organa. Uzorci su propisno pakovani, obeležavani i odlagani u tečni azot, da bi nakon toga bili zamrznuti na temperaturi od -80 °C i čuvani na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu do analize. Uzorci su transportovani u ručnom frižideru do mesta obrade, u Laboratoriji za oksidativni stres, na Katedri za opšteobrazovne predmete-Hemija, Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu Centrifugiranjem na

3000 rpm odvojena je krvna plazma od ćelijskih elemenata. Nakon odvajanja leukocita i trombocita, eritrociti su isprani tri puta fiziološkim rastvorom, a svako ispiranje je praćeno centrifugiranjem na 3000 rpm u trajanju od 10 minuta. Tkiva jetre i mozga su pripremana za analize tako što su prethodno homogenizovana homogenizerom Ultra Turrax (Janke and Kunkel IKA Works GmbH & Co.KG Staufen) na 17 000 rpm na ledu u puferu koji sadrži: 50 mM Tris HCl pH 7,4; 1M NaCl, 20 mM EDTA i 1% Triton-X100 (Krumer i sar. 2002). Odnos pufera i tkiva je bio 1:5 (w/v). Homogenizovano tkivo je zatim centrifugirano na 10 000 rpm, 10 min na +4 °C, nakon čega je uzet supernatant, koji se koristio za dalje analize.

4.2.2. ODREĐIVANJE UKUPNE KONCENTRACIJE PROTEINA U PLAZMI I HOMOGENATIMA TKIVA SPEKTROFOTOMETRIJSKOM METODOM

Koncentracija ukupnih proteina određivana je po Lowry-ju i saradnicima (1951). Ova metoda se zasniva na biuretskoj reakciji kupri (Cu^{2+}) jona sa peptidnim vezama proteina pri čemu dolazi do redukcije Cu^{2+} u kupro (Cu^+) jon. Nakon toga je u reakcionu smešu dodat fosfomolibdenski-fosfovolframski reagens (Folin-Ciocalteu-ov reagens) koji reaguje sa Cu^+ -protein kompleksom kao i sa bočnim lancima aromatičnih aminokiselina tirozinom, triptofanom, i cisteinom, stvarajući kompleks plave boje. Koncentracije proteina određene su na osnovu standardne prave koja je konstruisana sa proteinom poznate koncentracije. Kao standard koristio se goveđi serum albumin (*eng.* Bovine Serum Albumin – BSA). Intenzitet nagrađenog kompleksa meren je na talasnoj dužini od 600 nm na spektrofotometru marke CECIL CE 2021UV/VIS, UK.



Slika 12. Aparatura za izvođenje Native PAGE

4.2.3. ODREĐIVANJE RELATIVNE KONCENTRACIJE PROTEINA U KRVNOJ PLAZMI NATIVNOM POLIAKRILAMID GEL ELEKTROFOREZOM (NATIVNA PAGE ELEKTROFOREZA)

Nedenaturišuća ili nativna poliakrilamid gel elektroforeza (*eng.* Native PAGE) je tehnika za razdvajanje proteina prema njihovom naelektrisanju, obliku i veličini čestice. Proteini plazme razdvojeni su na 8% gelu u prisusuvu Tris-glicinskog pufera, korišćenjem MINI VE HOEFFER (LKB 2117, Bromma, Uppsala, Sweden) aparature, na +4 °C (Slika 12). Gelovi su bojeni Coomassie Brilliant blue R-250 (CBB) i Amido black bojama. Kao standard za molekulske mase proteina korišćena je komercijalno dostupna smeša proteina poznatih molekulskih masa (Thermo Scientific) od 10-270 kDa. Intenzitet dobijenih traka meren je korišćenjem softvera TotalLab TL 120.

4.2.4. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE HEMOGLOBINA

U hemolizatima eritrocita određen je sadržaj hemoglobina, sa cijanmethemoglobinskim reagensom (Salvati and Tentori, 1981). Metoda se zasniva na oksidaciji hemoglobina uz pomoć kalijum-fericijanida $K_3[Fe(CN)_6]$, koji u naknadnoj reakciji sa kalijum-cijanidom (KCN) daje stabilan crveno obojen kompleks cijanmethemoglobin. Intenzitet kompleksa je meren spektrofotometrijski na 540 nm.

4.2.5. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE LIPOPROTEINA SPEKTROFOTOMETRIJSKOM METODOM

Koncentracija ApoA i ApoB proteina je određena spektrofotometrijski korišćenjem gotovih test paketa (Rosch Diagnostic, Deuchland) u zatvorenom sistemu Cobas integra 400 plus (Rosch, Deuchland).

4.2.6. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ANTIOKSIDATIVNIH ENZIMA

U cilju određivanja stepena oksidativnog stresa u uzorcima eritrocita, homogenatima jetre i mozga, ispitivana je aktivnost sledećih antioksidativnih enzima: katalaze (CAT), ukupne superoksid dismutaze (SOD), bakar,cink-superoksid dismutaze (Cu,Zn-SOD, SOD1), mangan-superoksid dismutaze (Mn-SOD, SOD2), glutation-S-

transferaze (GST) i koncentracije redukovanog glutationa (GSH). Sva merenja su rađena na spektrofotometru CECIL CE 2021 UV/VIS.

4.2.6.1. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ENZIMA KATALAZE

Određivanje aktivnosti katalaze (CAT), jednog od ključnih enzima u antioksidativnoj zaštiti zasniva se na UV-kinetičkom praćenju razgradnje vodonik-peroksida pod dejstvom enzima (Aebi, 1984). Smanjenje koncentracije vodonik-peroksida je praćeno merenjem promene apsorbancije na talasnoj dužini od 240 nm. Rezultati su izraženi u U/g hemoglobina ili mg tkiva.

4.2.6.2. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI SUPEROKSID-DISMUTAZE NATIVNOM POLIAKRILAMID GEL ELEKTROFOREZOM (NATIVNA PAG ELEKTROFOREZA)

Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze (SOD) kao i njena dva izoenzimiska oblika, Cu,Zn-SOD (SOD₁) i Mn-SOD (SOD₂) određena je vertikalnom elektroforezom na 10% PAGE, oksidacijom nitro-tetrazolijumskog plavog (NBT) korišćenjem MINI VE HOEFFER (LKB 2117, Bromma, Uppsala, Sweden). Princip metode (Beauchamp i Fridovich, 1971) zasnovan je na redukciji tetrazolijumovih soli u prisustvu O₂^{•-} do formazana, koji ostaje nerastvorljiv u gelu i boji ga u plavo. Kao izvor O₂^{•-} koristio se riboflavin, koji se fotohemijski redukuje u prisustvu lako oksidujuće supstance N,N,N',N' tetrametiletilendiamina (TEMED). Intenzitet dobijenih traka je meren korišćenjem softvera TotalLab TL 120 i izražen u jedinicama U/g Hb ili mg tkiva.

4.2.6.3. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI GLUTATION-S-TRANSFERAZE

Aktivnost glutacion-S-transferaze (GST) se određuje u prisustvu supstrata 1-hloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) metodom po Habig-u i saradnicima (1974). Vezivanjem tiolnih grupa glutaciona sa supstratom formira se konjugat GSH-CDNB čiji se intenzitet prati spektrofotometrijski na 340 nm.

4.2.6.4. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE REDUKOVANOG GLUTATIONA

Koncentracija redukovanog glutationa (GSH) određena je metodom po Beuthler-u (1973) sa Elmanovim reagensom [5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoeva kiselina)– DTNB]. Nakon taloženja proteina sa 5% sulfosalicilnom kiselinom, slobodne neproteinske sulfhidrilne grupe (–SH) reaguju sa DTNB-om. Intenzitet nastalog žuto obojenog produkta (2-nitro-5-tiobenzoeve kiseline (TNB)) se meri promenom apsorbance na 412 nm i proporcionalan je koncentraciji ukupnog glutationa.

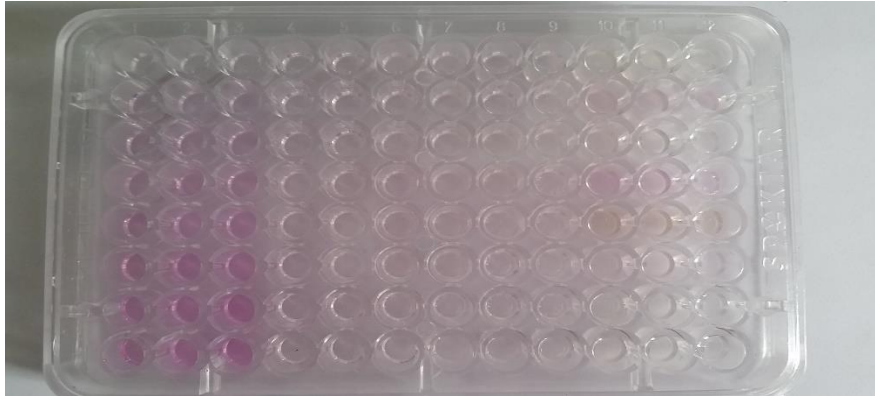
4.2.7. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE VODONIK PEROKSIDA

Koncentracija vodonik peroksida (H_2O_2) određivana je oksidacijom fenol-crvenog pomoću vodonik peroksida, u prisustvu enzima peroksidaze iz rena (*Horse Radish Peroxidase* – HRPO) (Pick i Keisari, 1980). U 0,2 ml homogenata mozga dodat je 10 mM fosfatni pufer koji sadrži 140 mM NaCl, 5,5 mM glukoze i 0,28 mM fenol crvenog, pH 7. U reakcionu smešu dodata je peroksidaza (8,5 U/ml). Nakon 10 minuta reakcija je zaustavljena dodatkom 1M NaOH. Promena apsorbance je praćena na 610 nm. Koncentracija H_2O_2 je izračunata iz standardne krive za H_2O_2 ($y = 0,21558 + 0,00765x$).

4.2.8. ODREĐIVANJE PARAMETARA OKSIDATIVNOG OŠTEĆENJA ĆELIJE

4.2.8.1. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE NITRITA (NO_2^-) KAO INDIKATORA OKSIDACIJE PROTEINA

Koncentracija nitrita je određena korišćenjem Griess-ovog (0,346 M sulfanilne kiseline i N-(naftil)-etilenediamin dihidrohlorid) reagensa po metodi Guevara i saradnika (1998). Griess-ov reagens sa nitritima formira diazonijum soli, dok N-(naftil)-etilenediamin dihidrohlorid sa ovim solima daje hromogen roze boje. Apsorbanca nastalog azo-jedinjenja se meri na 540 nm korišćenjem čitača (Plate reader Mod. A1, Nubenco Enterprises Inc, Paramus, NJ, USA). Koncentracija nitrita je izračunata iz jednačine prave korišćenjem natrijum-nitrita ($NaNO_2$) kao standarda. Rezultati su izraženi u μM produkovanih nitrita. Sva merenja su rađena u triplikatu u mikrotitarskim pločama sa 96 bunarčića (Slika 13).



Slika 13. Hromogen nastao pri određivanju koncentracije NO_2^- Griess-ovim reagensom

4.2.8.2. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE MALONDIALDEHIDA (MDA)- PRODUKTA LIPIDNE PEROKSIDACIJE

Malondialdehid (MDA) je krajnji produkt oksidacije nezasićenih masnih kiselina i oslikava nivo lipidne peroksidacije. Njegova koncentracija se određuje pomoću tiobarbituratnog testa koji se zasniva na reakciji tiobarbiturne kiseline (*eng.* thiobarbituric acid, TBA) i MDA (Stock and Dormondy, 1971). U uslovima visoke temperature i u kiseloj sredini MDA učestvuje u reakciji nukleofilne adicije sa TBA, pri čemu nastaje konjugat ružičaste boje (Slika 14) koji ima maksimum apsorpcije na talasnoj dužini od 535 nm. Apsorpcija je merena na spektrofotometru (CECIL CE 2021 UV/VIS), a vrednosti reaktivnih vrsta tiobarbiturne kiseline (*eng.* thiobarbituric acid reactive substances, TBARS) su prikazane u nmol MDA po gramu hemoglobina ili gramu tkiva.



Slika 14. Hromogen TBA i MDA

4.2.9. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI HOLINESTERAZA

4.2.9.1. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ACETILHOLINESTERAZE

Acetilholinesteraza (AChE) je karakteristična po tome što u aktivnom centru ima dva mesta, anjonsko koje reaguje sa pozitivno naelektrisanom kvaternernom azotnom grupom supstrata i estarsko mesto koje učestvuje u razgradnji kovalentne veze supstrata i enzima. Aktivnost AChE se određuje pomoću modifikovane Elmanove metode (1961). Hidrolizom supstrata (acetiltioholin jodida) katalitičkim dejstvom enzima nastaju sirćetna kiselina i tioholin. Zatim tioholin sa Elmanovim reagensom (5,5-ditiobis(2-nitrobenzoeva kiselina)-DTNB) gradi 5-tio-2-nitrobenzoat (TNB) žute boje koji se prati spektrofotometrijski na 412 nm.

4.2.9.2. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI BUTIRILHOLINESTERAZE

Zasniva se na praćenju aktivnosti butirilholinesteraze (BChE) na osnovu modifikovane Elmanove metode (1961), u prisustvu butiriltioholin jodida kao supstrata, spektrofotometrijski na 410 nm.

4.2.9.3. ODREĐIVANJE REALATIVNE AKTIVNOSTI LAKTAT- DEHIDROGENAZE NATIVNOM POLIAKRILAMID GEL ELEKTROFOREZOM (NATIVNA PAG-ELEKTROFOREZA)

Laktat dehidrogenaza (LDH) nalazi se u ćelijama i citoplazmi. Usled oštećenja ćelije, enzim veoma lako prelazi u ekstracelularni prostor, zbog čega se povećava aktivnost ovog enzima u plazmi. Postoji pet izoenzimskih formi LDH (LDH1, LDH2, LDH3, LDH4 i LDH5) čija je distribucija tkivno specifična, pa je dijagnostički mnogo značajnije i specifičnije analiziranje izoenzima, nego merenje ukupne aktivnosti LDH. Visoka specifična aktivnost LDH karakteristična je za jetru, srčani mišić, skeletne mišiće, pankreas, slezinu, bubreg, pluća. Kako se izoenzimi razlikuju po svojim katalitičkim i fizičkim osobinama, elektroforeza je najčešće korišćena tehnika za razdvajanje izoenzima. Izoenzim LDH1 putuje najbrže i najbliži je anodi, dok je izoenzim LDH5 najsporiji. Izoenzimski oblici LDH su određivani po metodi Yoshida i Takakuwa (1997). Za određivanje izoenzimske raspodele LDH korišćena je vertikalna elektroforeza, na 8% nedenaturišućem gelu, uz primenu TRIS-glicinskog pufera (HOEFFER MINI VE, Amersham, LKB, Bromma, Upsala, Sweden). Kod Nativne PAG elektroforeze koristi se

nitro-tetrazolijumsko plavo (NBT). Princip metode zasniva se na redukciji tetrazolijumovih soli u prisustvu Na-laktata. Intenzitet traka je meren denzitometrijski korišćenjem TotalLab TL120 softvera. Rezultati su izraženi kao gustina traka po mg proteina.

4.2.9.4. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ARILESTERAZA

Aktivnost arilesteraza (ARE) je praćena modifikovanom metodom po Eckersonu i saradnicima (1983), koristeći fenilacetat kao supstrat. Povećanje koncentracije p-fenola je detektovano merenjem apsorbance na 270 nm.

4.2.9.5. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI MIJELOPEROKSIDAZE

Peroksidazna aktivnost ovog enzima određena je spektrofotometrijski, praćenjem koncentracije nastalog oksidovanog oblika o-dianizidina u reakciji sa vodonik-peroksidom. Koncentracija oksidovanog oblika o-dianizidina je detektovana na talasnoj dužini od 460 nm.

4.2.10. IMUNOHEMIJSKO ODREĐIVANJE EKSPRESIJE ENZIMA (WESTERN BLOT METODA)

Imunohemijskom metodom određena je ekspresija enzima inducibilne azotoksid sintaze (iNOS), c-jun N-terminalne kinaze (JNK), vanćelijskim signalima regulisane kinaze (*eng.* extracellular signal-regulated kinases - ERK), ciklooksigenaze (COX), katalaze (CAT), B-ćelijskog limfoma (Bcl-2).

4.2.10.1. ELEKTROFORETSKO RAZDVAJANJE PROTEINA U DENATURISUĆIM USLOVIMA (SDS-PAGE)

Za analizu ekspresije proteina od interesa u ovoj studiji, pripremljeni uzorci su elektroforetski razdvojeni, a potom detektovani imunoblot metodom. Elektroforeza je rađena na poliakrilamidnim gelovima sa natrijum-dodecilsulfatom (*eng.* sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), čime su proteini razdvojeni po molekulskoj masi (Laemmli, 1970) na 12% poliakrilamidnom gelu. Uzorci pomešani sa

puferom za uzorke su zagrejani 5 minuta na 95 °C radi denaturacije proteina, a zatim su jednake količine proteina nanete na gel. Kao standard molekulske mase proteina korišćena je komercijalno dostupna smesa proteina (Thermo Scientific) od 10-270 kDa. Proteini su razdvojeni vertikalnom elektroforezom (MINI VE HOEFFER; LKB 2117, Bromma, Uppsala, Sweden), u puferu za elektroforezu, pod konstantnom jačinom struje (40 mA) i naponom (200 V), na sobnoj temperaturi.

4.2.10.2. PRENOS PROTEINA NA POLIVINILIDEN-FLUORIDNU MEMBRANU I IMUNOBLOT ANALIZA

Po završetku elektroforeze proteini sa SDS-poliakrilamidnog gela su kratko inkubirani u puferu za transfer. Pre prenošenja na poliviniliden-difluoridnu membranu (PVDF) veličine pora 0,45 μm, membrana je aktivirana potapanjem u 100% metanol 30 s i na kraju najmanje 5 min ekvilibrisana u puferu za transfer.

Transfer proteina sa gela na membranu (Slika 15) je izvršen pomoću aparata za transfer (Semi-Dry Electroblotters, PerfectBlue™ Sedec™, PEQLAB VWR, UK) pri jačini struje od 55 mA i naponu od 6 V (Towbin i sar., 1979). U procesu transfera negativno naelektrisani proteini se kreću ka pozitivnoj anodi.

PVDF membrane su potom bojene Ponceau S bojom koja se vezuje za proteine. Na ovaj način je provereno da li je prenos bio dobro obavljen. Membrane su isprane destilovanom vodom i dalje korišćene za imunoblot analizu.



Slika 15. Aparatura za transfer proteina

Posle prenosa, proteini su blokirani u 5% rastvoru odmašćenog mleka u prahu (non-fat milk), u trajanju od jednog sata. Zatim su membrane inkubirane sa odgovarajućim primarnim antitelima preko noći na +4 °C. Po završenoj inkubaciji, membrane su ispirane u puferu za ispiranje - TBST (Tris buffered saline + Tween-20), 3 puta u trajanju od 10 min, kako bi se uklonio višak nevezanog primarnog antitela. Potom su inkubirane sa odgovarajućim sekundarnim antitelom, koje je konjugovano sa peroksidazom izolovanom iz rena (HRP), 1 sat na sobnoj temperaturi. Membrane su zatim ponovo isprane 3 puta po 5 min u TBST, a nakon toga inkubirane 3 min sa hemiluminiscentnim reagensom za HRP (ECL, *eng.* enhanced chemiluminescence). ECL se dobija mešanjem rastvora koji sadrži luminol (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg GE) i rastvora koji sadrži vodonik peroksid. . Peroksidaza rena katalizuje oksidaciju luminola pri čemu se emituje svetlosni signal koji je zabeležen na radiografskom filmu (ORTO CP-G-PLUS, AGFA), gde je jačina signala proporcionalna količini vezanog antitela. Filmovi su skenirani radi dalje analize dobijenih signala. Intenzitet dobijenih traka meren je denzitometrijski pomoću softvera TotalLab TL120. Količine proteina su normalizovane u odnosu na količinu β -aktina ili β -tubulina, proteina čija se ekspresija ne menja pod dejstvom tretmana. Antitela koja su korišćena prikazana su u Tabeli 4. i 5.

Tabela 4. Primarna antitela korišćena za imunofluorescencu (IF) i vestern blot (*engl.* western blot, WB)

Specifičnost	Poreklo	Razblaženje	Proizvođač
iNOS	zec, poliklonsko	1:100 IF 1:500 WB	Abcam
JNK	zec, poliklonsko		Becton Dickinson
p44/42 MAPK (ERK)	zec, monoklonsko	1:1000 WB	Santa Cruz
Bcl-2	zec		Santa Cruz
COX-2	zec, poliklonsko	1:1000 WB	Santa Cruz
β -tubulin	koza, poliklonsko	1:2000 WB	Santa Cruz
β -aktin	miš, monoklonsko	1:5000 WB	Sigma

Tabela 5. Sekundarna antitela korišćena za imunofluorescencu (IF) i vestern blot (WB)

Usmereno	Konjugovano sa	Poreklo	Razblaženje	Proizvođač
protiv zeca	Alexa Fluor 555	magarac	1:250 IF	Invitrogen
protiv zeca	peroksidazom rena (HRP)	magarac	1:5000 WB	Santa Cruz

4.2.11. ODREĐIVANJE NIVOVA PROINFLAMATORNIH CITOKINA IL-1 I IL-6 POMOĆU ELISA TESTA

Koncentracija IL-1 i IL-6 u plazmi određivana je komercijalnim ELISA testom (*eng.* Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Upotrebljen je Rat IL-1 beta Tissue Culture Uncoated ELISA i Human IL-6 Uncoated ELISA Invitrogen kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Osetljivost ovog kita je 39 pg/mL i 2 pg/mL. Uzorci su rađeni u duplikatu, zajedno sa slepom probom i serijom standarda. Vrednosti su očitane na ELISA čitaču (NUMBENCO Diagnostics, USA, MPR model A1). Pomoću poznatih koncentracija standarda, konstruisana je kalibraciona kriva ($y = 0,17874 + 0,00092x$ (IL-1); $y = 0,20154 + 0,00603x$ (IL-6)) sa koje su određivane koncentracije uzoraka na 450 i 570 nm.

4.2.12. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI VITAMINA B1

Za određivanje antioksidativnog kapaciteta tiamina korišćene su sledeće metode: DPPH-test, redukciona sposobnost gvožđa i osmotska fragilnost eritrocita.

4.2.12.1. ODREĐIVANJE SPOSOBNOSTI HVATANJA SLOBODNIH RADIKALA (DPPH-TEST)

DPPH-test je najčešće korišćena *in vitro* metoda za efikasno određivanje antioksidativne aktivnosti. Spektrofotometrijska metoda po Sanchez-Moreno (2002) se zasniva na redukciji i promeni boje rastvora 2,2-difenil-1-pikril-hidrazila (DPPH) nekim redukcionim sredstvom. Slobodni radikal DPPH[•] sa nesparenim elektronom ima maksimum apsorpcije na talasnoj dužini od 515 nm (ljubičasta boja). U prisustvu

vodonika kao donora elektrona, antioksidans reaguje sa DPPH radikalom, koji se redukuje u DPPHH i pritom dolazi do obezbojavanja (žuta boja) rastvora, što uzrokuje opadanje apsorbancije. Od koncentrovanog rastvora DPPH-a u metanolu, potrebno je napraviti razblaženja rastvora DPPH, čija je vrednost apsorbance od 0,6 do 0,7. Napravljena je serija razblaženja vitamina B1 od osnovnog rastvora 100 mg/ml (od 0,006-100 mg/ml). U 25 µl uzorka dodat je razblaženi rastvor DPPH, a potom stavljen u mrak 1 sat, nakon čega je očitana apsorbance na 515 nm. Evaluacija antioksidativne aktivnosti je izvršena konstruisanjem kalibracione krive i izražavanjem rezultata kao procenat inhibicije, izračunate iz sledeće formule:

$$\% \text{ inhibicije} = (\Delta A_{515} \text{ kontrole} - \Delta A_{515} \text{ uzorka}) / \Delta A_{515} \text{ kontrole} \times 100$$

Kao standard je korišćen trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina) u istom rasponu koncentracija kao i vitamin B1. Za ispitivane uzorake (B1 i troloxa) određena je EC₅₀ vrednost (koncentracija potrebna za neutralisanje 50% početne koncentracije DPPH radikala). Sva merenja su rađena u triplikatu.

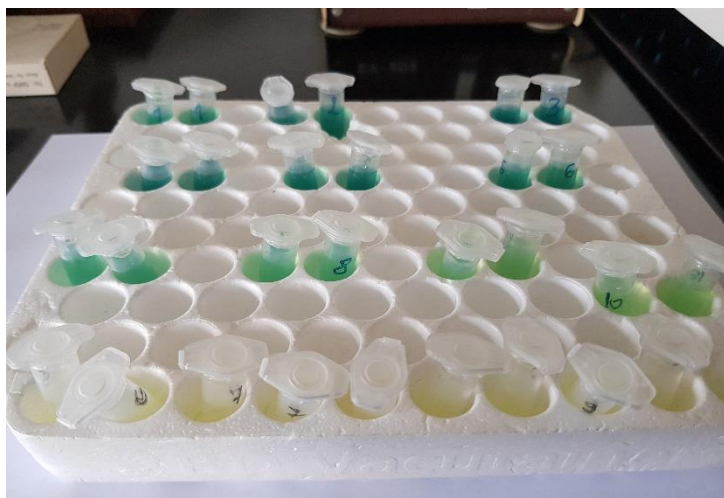
4.2.12.2. ODREĐIVANJE UKUPNE REDUKCIONE SPOSOBNOSTI PRIMENOM FRAP METODE

FRAP (*eng.* Ferric Reducing Ability of Plasma ili Ferric Reducing Antioxidant Power) test ukupne redukcione moći je sproveden metodom koja je opisana u radu Oyaizu (1986).

Od osnovnog rastvora vitamina B1, napravljena je serija razblaženja vitamina B1 u intervalu od 0,006-100 mg/ml. U 50 µl svakog razblaženja, dodat je 0,02M fosfatni pufer pH 6,6 i 1% rastvor kalijum-heksacijanoferata (III). Reakciona smeša je inkubirana na 50 °C u trajanju od 20 minuta. U svaki uzorak je dodata 10% trihlorsirćetna kiselina, nakon čega je smeša centrifugirana na 10 000 rpm u trajanju od 10 min. U razblaženi supernatant sa destilovanom vodom (1:1/v:v), dodat je 0,1% feri-hlorid i merena je apsorbance na 700 nm. Sva merenja su rađena u triplikatu.

Antioksidativni kapacitet uzorka je određen na osnovu sposobnosti vitamina B1 da redukuje feri- (Fe³⁺) do fero-jona (Fe²⁺), pri čemu dolazi do promene boje rastvora, od blede žute do zelene (Slika 16). Absorbance rastvora na 700 nm je direktno

proporcionalna stepenu redukcije. Redukciona sposobnost je upoređena sa troloksom, kao standardom.



Slika 16. Promena boje rastvora kod FRAP metode

4.2.12.3. OSMOTSKA FRAGILNOST ERITROCITA

Određivanje osmotske fragilnosti eritrocita je rađeno metodom po Beutler-u (1983). Princip ovog testa zasniva se na činjenici da resuspendovani eritrociti u hipotoničnom rastvoru natrijum hlorida (NaCl) bubre usled ulaska vode, postaju sferični i na kraju prskaju. Po 10 μ l ispranih eritrocita se dodaje u 5 ml rastvora NaCl različitih koncentracija, počevši od kontrolne epruvete sa 0,9% NaCl do epruvete u kojoj se ne nalazi NaCl. Stepem hemolize svakog uzorka je meren na 540 nm i izražavan kao procenat apsorbancije hemoglobina. Kriva kumulativne osmotske fragilnosti (Luzzatto i Roper, 1995) je iscrtana na osnovu vrednosti stepena hemolize uzoraka u serijskim razblaženjima NaCl, pomoću programa Origin 6.0 38 Professional.

4.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Kao osnovne statističke metode u statističkoj obradi dobijenih rezultata izvedenog eksperimenta, korišćeni su deskriptivni statistički parametri (aritmetička sredina, standardna devijacija, standardna greška, minimalna, maksimalna vrednost i koeficijent varijacije). Za testiranje i utvrđivanje statistički značajnih razlika između ispitivanih grupa korišćena je jednofaktorijalna analiza varijanse (one way ANOVA test), a zatim su

pojedinačnim Tukey post-hoc testom ispitane statistički značajne razlike između tretmana. Signifikantnost razlika utvrđena je na nivoima značajnosti od $p < 0,05$; $p < 0,01$ i $p < 0,001$; $p < 0,0001$. Svi dobijeni rezultati su prikazani tabelarno i grafički. Statistička analiza dobijenih rezultata izvršena je korišćenjem statističkog paketa GraphPad Prism 7.00 (San Diego, CA, USA).



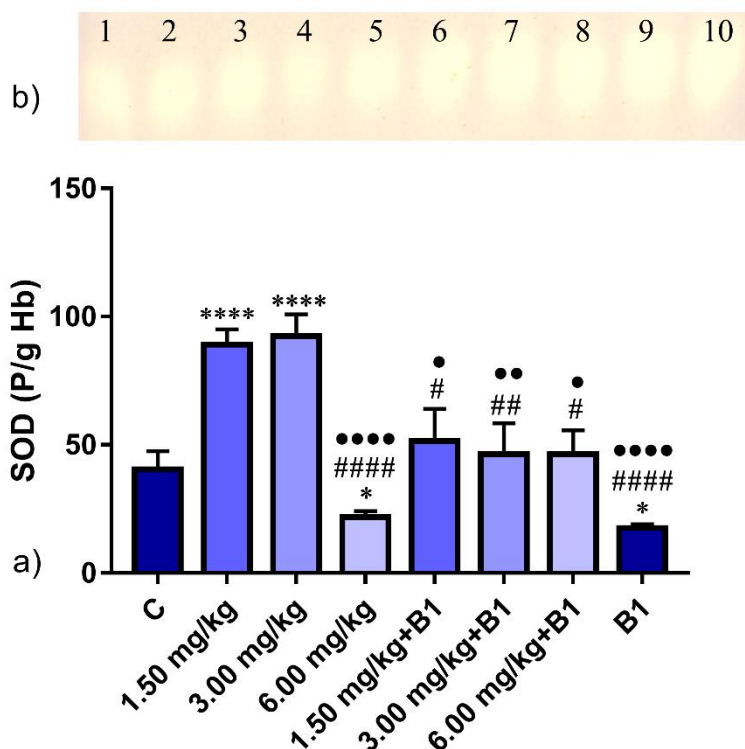
V

REZULTATI

5.1. ISPITIVANJA OKSIDO-REDUKCIONIH PARAMETARA

5.1.1. ANALIZA AKTIVNOSTI ENZIMA SUPEROKSID DISMUTAZE

Na grafikonu 1 i u tabeli 6 su prikazani rezultati aktivnosti superoksid dismutaze (SOD1) u eritrocitima. Statistički značajno ($p < 0,0001$) povećanje od 2,20 i 2,28 puta, dokazano je kod tretmana sa 1,50 mg/kg CPF i 3,00 mg/kg CPF, dok je kod grupe tretirane sa 6 mg/kg CPF zabeležen pad aktivnosti za 1,86 puta ($p < 0,05$), u odnosu na C. Kod grupe tretirane samo vitaminom B1, aktivnost enzima je smanjena 2,30 puta u odnosu na C. Tretman vitaminom B1 nakon CPF-a doveo je do pada aktivnosti SOD1 u odnosu na grupe ptica koje su tretirane samo CPF-om, te je statistički značajna razlika dokazana kod sledećih doza: 1,50 mg/kg CPF i 1,50 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,05$); 3,00 mg/kg CPF i 3,00 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,01$).



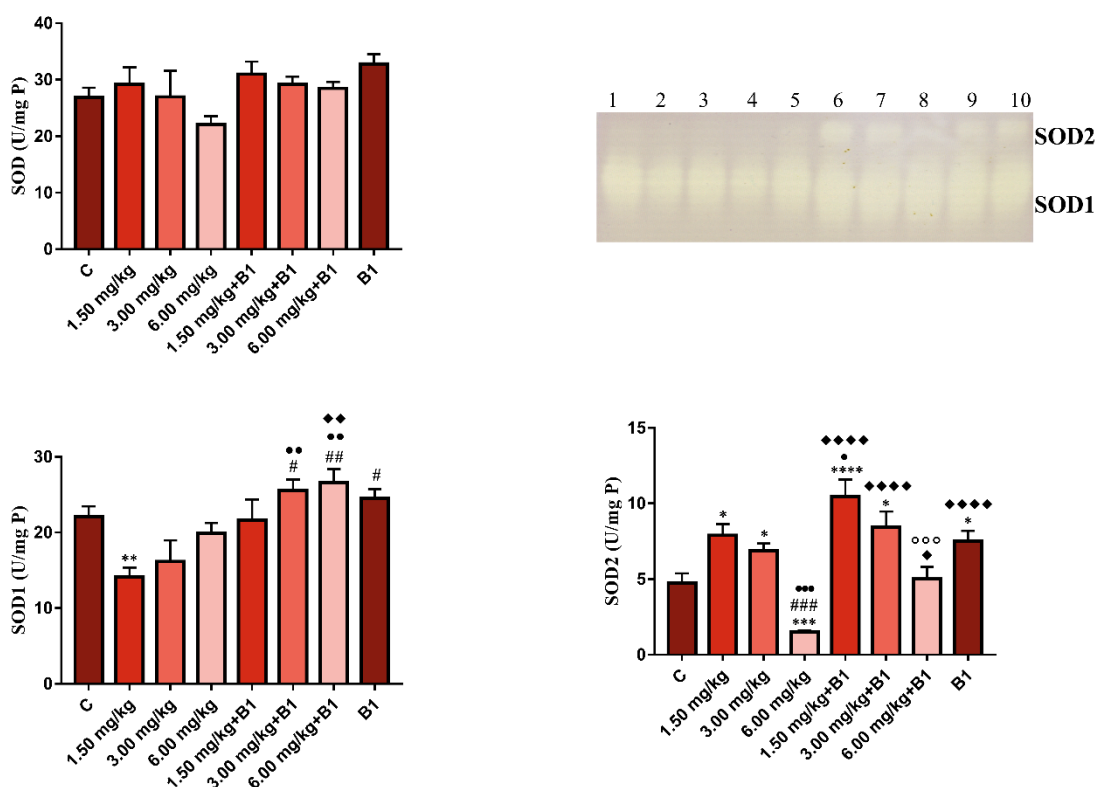
Grafikon 1. a) Aktivnost enzima superoksid dismutaze (SOD1) u eritrocitima japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1). b) SOD1 elektroforegram na poliakrilamidnom gelu. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,0001$ (****), $p < 0,05$ (*): značajna razlika u odnosu na kontrolu; $p < 0,0001$ (#####), $p < 0,01$ (##), $p < 0,05$ (#): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF; $p < 0,0001$ (****), $p < 0,01$ (**), $p < 0,05$ (•): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF.

Tabela 6. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti SOD1 u eritrocitima japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1).

Naziv grupe	\bar{X}	SD	SE	CV(%)	Min	Max	Mediana
Kontrola (C)	40,46	23,65	7,13	58,45	18,45	89,12	31,41
1,50 mg/kg CPF	89,03	18,9	5,97	21,23	62,13	133,7	88,74
3,00 mg/kg CPF	92,48	25,2	8,40	27,25	34,35	116,20	102,50
6,00 mg/kg CPF	21,80	6,72	2,37	30,83	14,40	35,73	20,28
1,50 mg/kg CPF +B1	51,42	28,33	12,67	55,09	18,40	89,98	42,59
3,00 mg/kg CPF +B1	46,32	27,23	12,18	58,79	25,16	93,16	34,47
6,00mg/kg CPF +B1	46,33	18,76	9,38	40,50	25,84	71,35	44,07
B1	17,60	3,67	1,50	20,90	12,45	23,10	17,50

Rezultati ukupne aktivnosti enzima SOD, SOD1 i SOD2 u jetri su prikazani na grafikonu 2 i u tabelama 7, 8 i 9. Primena pesticida kao i naknadna aplikacija vitamina B1 nije dovela do statistički značajnih promena ukupne aktivnosti enzima, u odnosu na kontrolnu grupu, kao ni između grupa tretiranih istom dozom pesticida. Prilikom

određivanja aktivnosti SOD1 primećeno je da CPF izaziva inhibiciju ovog enzima u odnosu na kontrolnu grupu, koja je najveća pri dozi od 1,50 mg/kg CPF (36,05%, $p < 0,01$). Vitamin B1 aktivira SOD1, ali bez statističke značajnosti u odnosu na kontrolnu grupu. Značajna razlika između aktivnosti SOD1 ustanovljena je između grupa 1,50 mg/kg CPF i 1,50 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,05$), 3,00 mg/kg CPF i 3,00 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,01$). Aktivnost enzima SOD2 je povećana u grupama 1,50 mg/kg CPF, 3,00 mg/kg CPF, 1,50 mg/kg CPF+B1, 3,00 mg/kg CPF+B1, 6,00 mg/kg CPF+B1 za 1,67 ($p < 0,05$), 1,45 ($p < 0,05$), 2,21 ($p < 0,0001$), 1,78 ($p < 0,05$), 1,59 ($p < 0,05$) puta. Jedino je kod doze od 6,00 mg/kg CPF uočen pad aktivnosti SOD2 za 68,29% ($p < 0,001$). Statistički značajna razlika u aktivnosti SOD2 je dokazana između tretmana sa dozom od 6,00 mg/kg CPF ($p < 0,05$), gde je primećen i porast aktivnosti posle aplikacije tiamina.



Grafikon 2. Ukupna aktivnost enzima superoksid dismutaze (SOD), SOD1, SOD2 u jetri japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1) sa elektroforegramom (1-5: 6 mg/kg CPF, 6-10: 6 mg/kg CPF+B1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,01$ (**): značajna razlika u odnosu na kontrolu; $p < 0,01$ (##): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF; $p < 0,01$ (**): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF; $p < 0,01$ (◆◆), $p < 0,0001$ (◆◆◆◆): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF, $p < 0,05$ (○): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF+B1.

Tabela 7. Deskriptivni statistički parametri ukupne aktivnosti SOD u jetri japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1).

Naziv grupe	\bar{X}	SD	SE	CV(%)	Min	Max	Mediana
Kontrola (C)	26,83	4,63	1,75	17,26	22,09	35,13	25,77
1,50 mg/kg CPF	29,26	7,71	2,92	26,37	21,98	44,98	26,57
3,00 mg/kg CPF	26,95	12,25	4,63	29,47	16,44	44,65	21,07
6,00 mg/kg CPF	22,09	3,60	1,47	16,31	18,09	27,27	22,28
1,50 mg/kg CPF +B1	30,97	6,70	2,23	21,65	21,42	43,71	32,21
3,00 mg/kg CPF +B1	29,15	3,41	1,39	11,69	25,62	33,42	27,99
6,00 mg/kg CPF +B1	28,49	2,97	1,12	10,42	25,03	34,15	28,18
B1	32,80	5,19	1,73	15,84	27,56	40,47	31,34

Tabela 8. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti SOD1 u jetri japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1).

Naziv grupe	\bar{X}	SD	SE	CV(%)	Min	Max	Mediana
Kontrola (C)	22,11	3,55	1,34	16,08	17,45	27,12	21,87
1,50 mg/kg CPF	14,14	2,47	1,23	17,45	11,23	17,22	14,05
3,00 mg/kg CPF	16,17	7,43	2,81	25,95	10,80	27,00	12,23
6,00 mg/kg CPF	19,87	3,69	1,39	18,57	16,11	25,81	20,00
1,50 mg/kg CPF +B1	21,66	8,14	2,71	23,59	13,39	37,16	20,05
3,00 mg/kg CPF +B1	25,59	4,44	1,40	17,37	20,20	31,86	26,12
6,00 mg/kg CPF +B1	26,58	5,63	1,78	21,18	19,20	39,01	25,80
B1	24,51	3,66	1,22	14,92	20,04	30,40	24,36

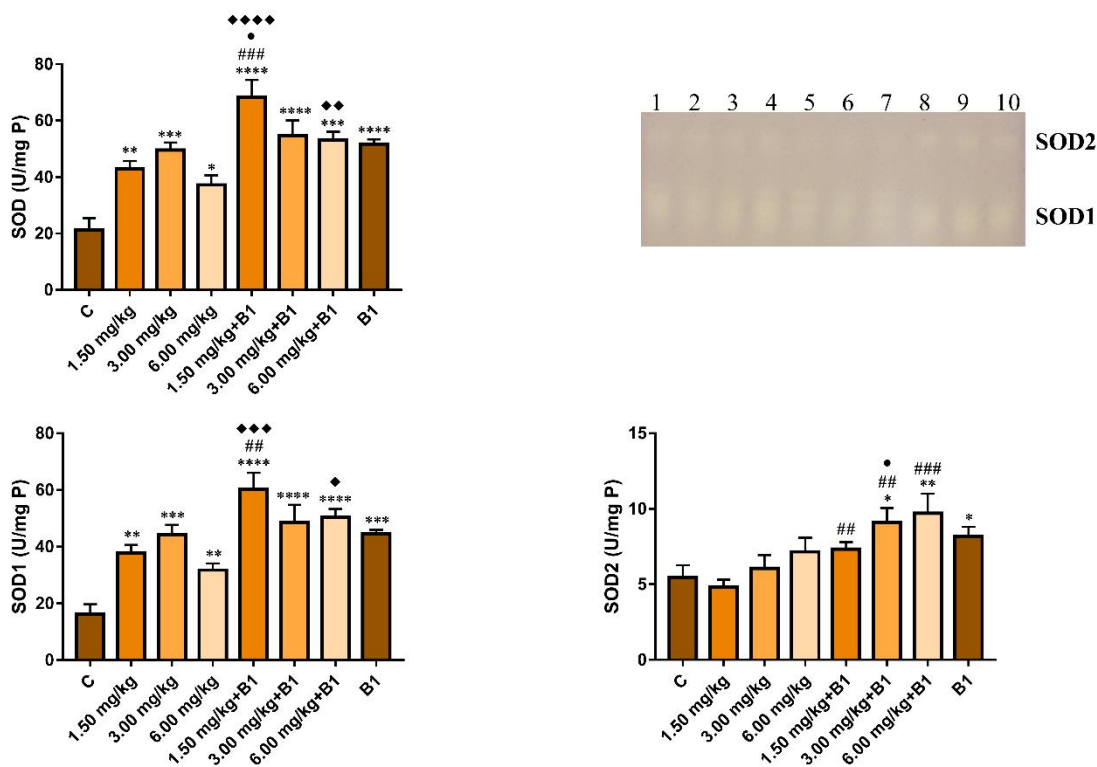
Tabela 9. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti SOD2 u jetri japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1).

Naziv grupe	\bar{X}	SD	SE	CV(%)	Min	Max	Mediana
Kontrola (C)	4,73	1,71	0,65	26,24	3,02	7,99	4,56
1,50 mg/kg CPF	7,89	1,47	0,73	18,59	6,48	9,60	7,75
3,00 mg/kg CPF	6,88	1,24	0,47	18,01	4,74	8,48	6,98
6,00 mg/kg CPF	1,50	0,24	0,09	15,93	1,15	1,73	1,60
1,50 mg/kg CPF +B1	10,47	3,15	1,11	28,12	6,52	17,12	10,19
3,00 mg/kg CPF +B1	8,41	2,59	1,06	29,77	5,35	12,21	8,10
6,00 mg/kg CPF +B1	5,00	2,11	0,79	19,21	3,00	8,56	4,04
B1	7,51	2,03	0,68	17,08	4,61	10,93	7,54

U tkivu mozga aktivnost SOD-a, kao i njegovih izoformi-SOD1 i SOD2, je povećana kod primene CPF-a, kao i kod kombinovanog dejstva pesticida i tiamina (grafikon 3 i tabele 10,11,12). Aktivnost ukupnog SOD-a je povećana za 2,01(1,50

mg/kgCPF, $p < 0,01$), 2,33 (3,00 mg/kgCPF, $p < 0,001$), 3,21 (1,50 mg/kgCPF+B1, $p < 0,0001$), 2,57 (3,00 mg/kgCPF+B1, $p < 0,0001$), 2,49 (6,00 mg/kgCPF+B1, $p < 0,001$), 2,43 (B1, $p < 0,0001$), u odnosu na kontrolnu grupu. Značajna razlika je uočena između grupa 1,50 mg/kgCPF i 1,50 mg/kgCPF+B1 ($p < 0,001$), 6,00 mg/kgCPF i 6,00 mg/kgCPF+B1 ($p < 0,01$).

Usled dejstva CPF-a aktivnost SOD1 je statistički značajno povećana u odnosu na kontrolnu grupu, kod doza 1,50 mg/kg (2,34 puta, $p < 0,01$) i 3,00 mg/kg (2,73puta, $p < 0,001$). Nakon aplikovanja vitamina B1 aktivnost ovog enzima je i dalje bila u porastu, sa tendencijom pada sa povećanjem doze. Tako je zabeleženo povećanje od 3,72 (1,50 mg/kg CPF+B1, $p < 0,0001$), 3,00 (3,00 mg/kg CPF+B1, $p < 0,0001$), 3,12 (6,00 mg/kg CPF+B1, $p < 0,0001$) i 2,75 (B1, $p < 0,001$) puta, u odnosu na kontrolnu grupu. Statistički značajna razlika dokazana je između tretmana sa dozama od 1,50 mg/kg ($p < 0,01$) i 6,00 mg/kg ($p < 0,05$).



Grafikon 3. Ukupna aktivnost enzima superoksid dismutaze (SOD), SOD1 i SOD2 u mozgu japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1) sa elektroforegramom (1-4: kontrole, 5-7: 6,00 mg/kg CPF, 8-10: 6 mg/kg CPF+B1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****): značajna razlika u odnosu na kontrolu; $p < 0,01$ (##), $p < 0,001$ (###): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF; $p < 0,05$ (•): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF; $p < 0,05$ (♦), $p < 0,001$ (♦♦♦), $p < 0,0001$ (♦♦♦♦): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF.

Tabela 10. Deskriptivni statistički parametri ukupne aktivnosti SOD u mozgu japanskih prepelica CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1).

Naziv grupe	\bar{X}	SD	SE	CV(%)	Min	Max	Mediana
Kontrola (C)	21,26	9,51	4,25	29,76	12,96	35,38	16,41
1,50 mg/kg CPF	42,87	9,06	2,86	21,14	26,57	56,83	44,37
3,00 mg/kg CPF	49,57	6,51	2,66	13,13	39,30	56,94	51,79
6,00 mg/kg CPF	37,21	8,36	3,41	22,46	24,83	48,44	37,25
1,50 mg/kg CPF +B1	68,34	18,27	6,09	26,74	43,44	94,69	64,17
3,00 mg/kg CPF +B1	54,70	14,26	5,39	26,07	31,04	73,90	51,55
6,00 mg/kg CPF +B1	53,11	7,33	2,99	13,81	44,03	61,97	53,46
B1	51,70	4,69	1,66	9,09	43,94	55,92	53,12

Tabela 11. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti SOD1 u mozgu japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1).

Naziv grupe	\bar{X}	SD	SE	CV(%)	Min	Max	Mediana
Kontrola	16,19	7,82	3,49	28,31	9,93	28,36	11,65
1,50 mg/kg CPF	37,83	8,89	2,81	23,49	23,74	52,07	36,88
3,00 mg/kg CPF	44,14	8,78	3,58	19,89	31,12	52,84	48,1
6,00 mg/kg CPF	31,79	5,74	2,34	18,07	23,22	41,03	31,42
1,50 mg/kg CPF +B1	60,33	17,33	5,77	28,73	36,39	84,82	55,23
3,00 mg/kg CPF +B1	48,62	17,45	6,17	25,88	25,12	78,85	47,11
6,00 mg/kg CPF +B1	50,50	8,90	2,81	17,62	39,27	65,28	51,17
B1	44,50	4,29	1,43	9,65	36,65	48,41	46,70

Tabela 12. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti SOD2 u mozgu japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1).

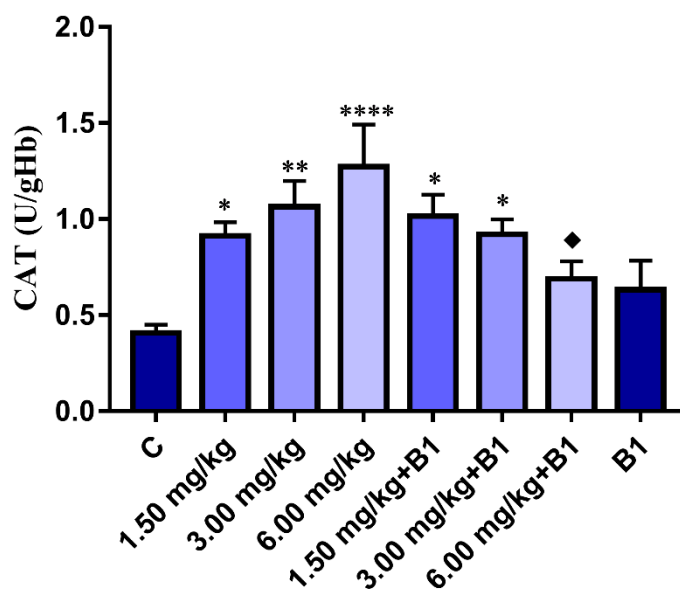
Naziv grupe	\bar{X}	SD	SE	CV(%)	Min	Max	Mediana
Kontrola (C)	5,45	1,99	0,81	26,50	3,02	7,59	6,00
1,50 mg/kg CPF	4,81	1,59	0,50	23,04	2,98	8,81	4,51
3,00 mg/kg CPF	6,05	2,18	0,89	26,04	3,26	9,08	5,40
6,00 mg/kg CPF	7,15	2,08	0,93	29,05	5,00	9,15	7,49
1,50 mg/kg CPF +B1	7,32	1,32	0,46	18,07	5,96	9,88	7,01
3,00 mg/kg CPF +B1	9,09	2,38	0,97	26,17	5,91	12,11	9,51
6,00 mg/kg CPF +B1	9,71	4,10	1,29	29,29	5,45	18,05	8,91
B1	8,19	1,87	0,62	22,89	5,57	10,77	7,93

Enzim SOD2 u mozgu pokazuje značajno povećanje za 78,16%, u odnosu na kontrolnu grupu, samo u grupi 6,00 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,01$). Statistički značajna razlika

zabeležena je između sledećih grupa: 1,50 mg/kg CPF i 1,50 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,01$), 3,00 mg/kg CPF i 3,00 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,05$).

5.1.2. ANALIZA AKTIVNOSTI ENZIMA KATALAZE

Rezultati aktivnosti enzima CAT u eritrocitima prikazani su na grafikonu 4 i u tabeli 13. Sa porastom doze CPF-a jasno je uočljiv i porast aktivnosti enzima CAT u svim ispitivanim grupama u odnosu na C. Zabeleženo je povećanje za 123,53% pri dozi od 1,50 mg/kg CPF ($p < 0,05$), 160,54% pri dozi od 3,00 mg/kg CPF ($p < 0,01$) i 211,76% pri dozi od 6,00 mg/kg CPF ($p < 0,0001$). Kod ispitivanih grupa kojima je nakon pesticida aplikovan i vitamin B1 dokazana je veća aktivnost ovog enzima (149,02%-1,50 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,05$); 125,83%-3,00 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,05$)) u odnosu na kontrolu ali sa tendencijom smanjenja aktivnosti CAT ka fiziološkom nivou sa povećanjem primenjene doze CPF. Shodno tome statistički značajne razlike između C i grupe od 6,00 mg/kg CPF+B1 nisu dokazane. Takođe je primećeno da vitamin B1 statistički značajno ($p < 0,05$) smanjuje aktivnost CAT u eritrocitima kod najviše doze CPF-a u odnosu na grupu od 6,00 mg/kg CPF. Razlika između kontrolnih grupa (C i B1) nije statistički značajna.

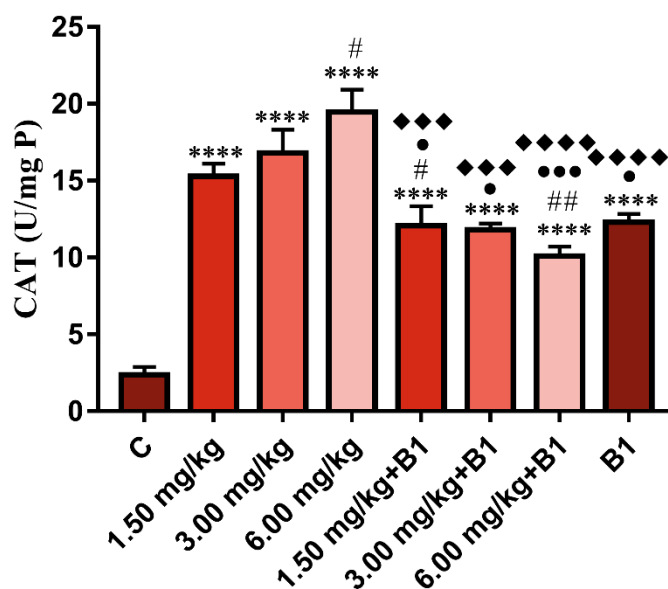


Grafikon 4. Aktivnost enzima katalaze (CAT) u eritrocitima japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,0001$ (****): značajna razlika u odnosu na C, $p < 0,05$ (♦): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF.

Tabela 13. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti CAT u eritrocitima japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1).

Naziv grupe	\bar{X}	SD	SE	CV(%)	Min	Max	Mediana
Kontrola (C)	0,41	0,10	0,04	15,32	0,22	0,53	0,41
1,50 mg/kg CPF	0,91	0,20	0,07	19,30	0,7	1,31	0,90
3,00 mg/kg CPF	1,06	0,36	0,14	26,82	0,65	1,61	1,09
6,00 mg/kg CPF	1,27	0,58	0,22	29,87	0,90	2,54	1,05
1,50 mg/kg CPF +B1	1,02	0,27	0,11	24,80	0,67	1,45	1,03
3,00 mg/kg CPF +B1	0,92	0,20	0,07	22,18	0,58	1,23	0,97
6,00mg/kg CPF +B1	0,69	0,26	0,09	25,99	0,47	1,12	0,54
B1	0,63	0,26	0,15	28,18	0,41	0,92	0,57

Rezultati aktivnosti enzima CAT u jetri japanskih prepelica prikazani su na grafikonu 5 i u tabeli 14. Dokazan je porast aktivnosti enzima CAT kod svih tretiranih grupa sa statističkom značajnošću u odnosu na C grupu ($p < 0,0001$), s tim da je kod grupa koje su tretirane samo CPF-om utvrđeno veće povećanje (6,47 puta-1,50 mg/kg CPF; 7,11 puta-3,00 mg/kg CPF; 8,24 puta- 6,00 mg/kg CPF) aktivnosti enzima u odnosu na grupe koje su primile pesticid i vitamin B1 (5,12puta-1,50 mg/kg CPF+B1, 5 puta-3,00 mg/kg CPF+B1, 4,28 puta-6,00 mg/kg CPF+B1).



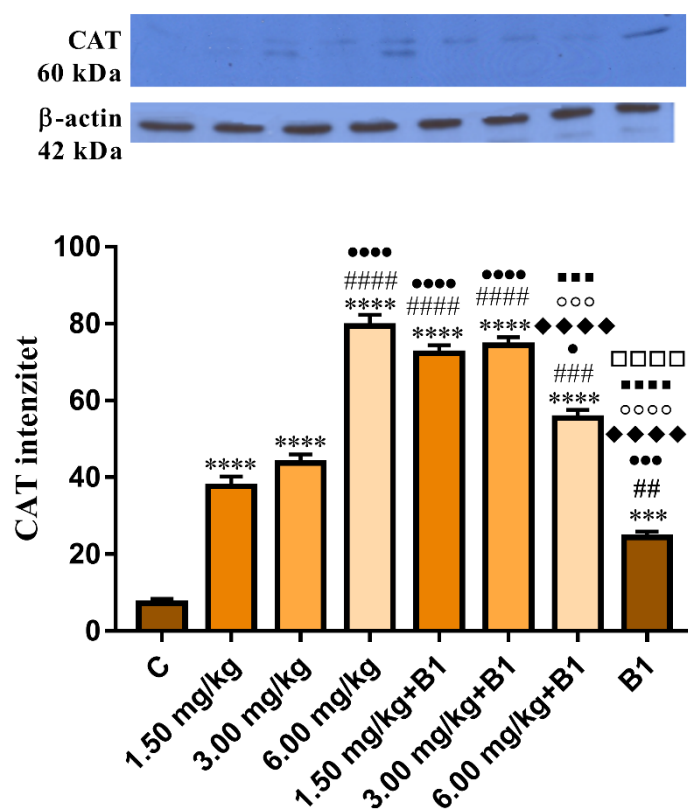
Grafikon 5. Aktivnost enzima katalaze (CAT) u jetri japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,0001$ (****): značajna razlika u odnosu na C, $p < 0,05$ (#), $p < 0,01$ (##): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF; $p < 0,05$ (•), $p < 0,001$ (••): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF; $p < 0,001$ (◆◆), $p < 0,0001$ (◆◆◆): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF.

Tabela 14. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti CAT u jetri japanskih prepelica tretiranih tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1).

Naziv grupe	\bar{X}	SD	SE	CV(%)	Min	Max	Mediana
Kontrola (C)	2,36	1,31	0,53	15,64	0,90	4,57	1,93
1,50 mg/kg CPF	15,28	2,49	0,83	16,35	12,31	19,44	14,20
3,00 mg/kg CPF	16,79	4,07	1,54	25,21	12,25	23,10	16,03
6,00 mg/kg CPF	19,46	4,16	1,47	27,37	13,14	24,42	20,52
1,50 mg/kg CPF +B1	12,08	3,10	1,27	24,70	8,68	16,12	11,87
3,00 mg/kg CPF +B1	11,80	0,91	0,41	7,70	10,85	13,05	11,39
6,00mg/kg CPF +B1	10,10	1,75	0,62	17,30	7,99	12,40	10,33
B1	12,31	1,72	0,54	13,95	9,68	15,53	12,12

Zabeleženo je povećanje aktivnosti ovog enzima od 5,22 puta i kod kontrolne grupe sa vitaminom B1, u odnosu na C. Statistička značajnost je dokazana i između sledećih grupa: 1,50 mg/kg CPF i 1,50 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,05$), 3,00 mg/kg CPF i 3,00 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,05$), 6,00 mg/kg CPF i 6,00 mg/kg CPF+B1! ($p < 0,0001$). Tretman jedinki sa vitaminom B1 nakon CPF-a je doveo do smanjenja aktivnosti CAT u odnosu na grupe koje su tretirane navedenim dozama CPF-a.

Rezultati aktivnosti enzima CAT u mozgu prikazani su na grafikonu 6 i tabeli 15. Uočava se da su i aplikacija pesticida, kao i samog B1 imali uticaj na aktivnost CAT, i doveli do njenog povećanja u tkivu mozga. Porast ($p < 0,0001$) aktivnosti CAT je dokazan kod CPF-a i to za 5,22 puta kod 1,50 mg/kg CPF; 6,06 puta kod 3,00 mg/kg CPF i 11,02 puta kod 6,00 mg/kg CPF. Tretman sa vitaminom B1 nije doveo do smanjenja aktivnosti praćenog enzima u tkivu mozga, već su vrednosti za aktivnost enzima i dalje ostale visoke, odnosno 10,04 (1,50 mg/kg CPF+B1); 10,33 (3,00 mg/kg CPF+B1) i 7,69 (6,00 mg/kg CPF+B1) puta veće u odnosu na C ($p < 0,0001$). Grupa tretirana samo sa vitaminom B1 je takođe pokazala značajno ($p < 0,001$) povećanje aktivnosti enzima za 3,38 puta u poređenju sa C. Statistička značajna razlika je utvrđena i između grupa tretiranih istom dozom CPF-a i CPF i vitamina B1(1,50 mg/kg CPF i 1,50 mg/kg CPF+B1($p < 0,0001$), 3,00 mg/kg CPF i 3,00 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,0001$), 6,00 mg/kg CPF i 6,00 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,0001$).

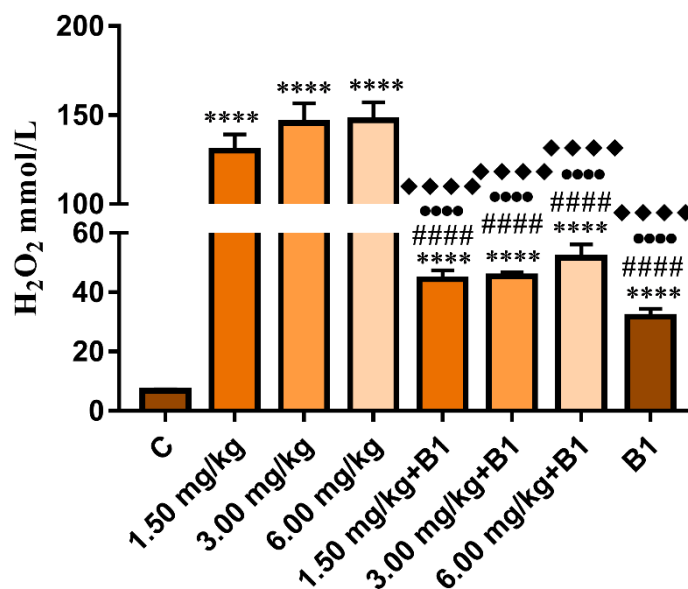


Grafikon 6. Ekspresija enzima katalaze (CAT) u mozgu japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,001$ (***) , $p < 0,0001$ (****): značajna razlika u odnosu na C; $p < 0,05$ (#), $p < 0,001$ (###), $p < 0,0001$ (####), $p < 0,0001$ (#####): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF; $p < 0,05$ (•), $p < 0,001$ (••), $p < 0,0001$ (•••): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF; $p < 0,0001$ (♦♦♦♦): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF; $p < 0,001$ (○○○), $p < 0,0001$ (○○○○): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF+B1; $p < 0,001$ (■■■), $p < 0,0001$ (■■■■): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF+B1; $p < 0,0001$ (□□□□): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF+B1.

Tabela 15. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti CAT u mozgu kod japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1).

Naziv grupe	\bar{X}	SD	SE	CV(%)	Min	Max	Mediana
Kontrola (C)	7,20	2,00	1,15	27,78	5,20	9,20	7,20
1,50 mg/kg CPF	37,61	4,47	2,58	11,88	33,00	41,92	37,92
3,00 mg/kg CPF	43,69	4,00	2,31	9,16	39,69	47,69	43,69
6,00 mg/kg CPF	79,37	5,00	2,89	6,30	74,37	84,37	79,37
1,50 mg/kg CPF +B1	72,32	3,59	2,07	4,97	68,87	76,04	72,04
3,00 mg/kg CPF +B1	74,39	3,55	2,05	4,78	71,00	78,09	74,09
6,00mg/kg CPF +B1	55,39	3,71	2,14	6,70	51,59	59,00	55,59
B1	24,33	2,61	1,51	10,72	22,40	27,30	23,30

S obzirom da je ekspresija CAT bila povećana u grupama tretiranim sa CPF-om i B1, a i na njenu veoma nisku aktivnost u fiziološkim uslovima u mozgu, određivali smo koncentraciju H₂O₂ u ovom tkivu. Rezultati analize prikazani su na grafikonu 7 i tabeli 16.



Grafikon 7. Koncentracija vodikovog peroksida (H₂O₂) u mozgu japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM. p< 0,0001 (****): značajna razlika u odnosu na kontrolu; p< 0,0001 (####): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF; p< 0,0001 (****): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF; p< 0,0001 (◆◆◆◆): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF.

Tabela 16. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti H₂O₂ u mozgu japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1).

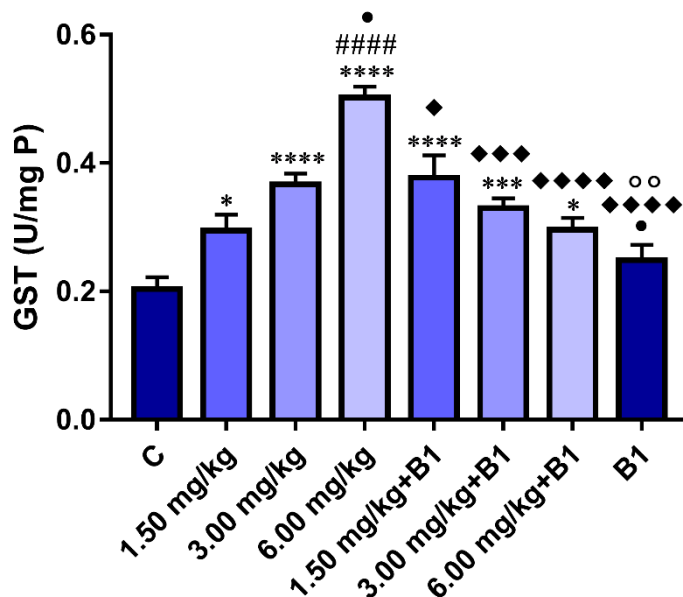
Naziv grupe	\bar{X}	SD	SE	CV(%)	Min	Max	Mediana
Kontrola (C)	6,77	1,08	0,48	15,99	5,38	8,25	6,49
1,50 mg/kg CPF	130,10	22,47	9,17	17,27	102,70	160,20	130,70
3,00 mg/kg CPF	145,40	29,76	11,25	20,46	101,70	184,30	147,70
6,00 mg/kg CPF	147,10	24,72	10,09	16,81	108,50	173,80	150,50
1,50 mg/kg CPF +B1	44,39	6,77	3,03	15,25	34,09	51,12	46,53
3,00 mg/kg CPF +B1	45,33	3,16	1,41	6,97	41,73	50,01	44,25
6,00mg/kg CPF +B1	51,64	11,13	4,54	21,56	37,22	64,16	55,40
B1	31,77	6,58	2,68	20,71	23,16	40,26	33,92

Koncentracija H₂O₂ u tkivu mozga je značajno (p< 0,0001) povećana kod svih ispitivanih grupa u odnosu na C. Najmanje povećanje je dokazano kod grupe tretirane samo sa B1 (4,69 puta), kao i kod grupa koje su pored CPF-a primale i B1 (6,55 puta-

1,50 mg/kg CPF+B1; 6,69 puta-3,00 mg/kg CPF+B1; 7,63 puta-6,00 mg/kg CPF+B1). Kod grupe 1,50 mg/kg CPF zabeleženo je povećanje od 19,22 puta i zatim je koncentracija H₂O₂ nastavila da raste u ostalim grupama (21,48 puta-3,00 mg/kg CPF; 21,73 puta-6,00 mg/kg CPF). Statistički značajna razlika (p< 0,0001) utvrđena je između grupa tretiranih različitim dozama CPF-a i odgovarajućih grupa tretiranih CPF-om i B1. Iako je primena samo vitamina B1 povećala koncentraciju H₂O₂ u tkivu mozga u odnosu na C, koncentracija je bila značajno manja u poređenju sa vrednostima u CPF i CPF+B1 grupama.

5.1.3. ANALIZA AKTIVNOSTI ENZIMA GLUTATION-S-TRANSFERAZE

Da bi utvrdili da li CPF utiče na glutationski ciklus, ispitivali smo aktivnost enzima glutation-S-transferaze (GST). Na grafikonu 8 i u tabeli 17 se može uočiti porast aktivnosti GST usled dejstva CPF-a i vitamina B1 u plazmi. Sa porastom doze CPF-a (1,50; 3,00; 6,00 mg/kg) aktivnost enzima se statistički značajno povećala za 45% (p< 0,05), 85% (p< 0,0001), 150% (p< 0,0001) u odnosu na C..



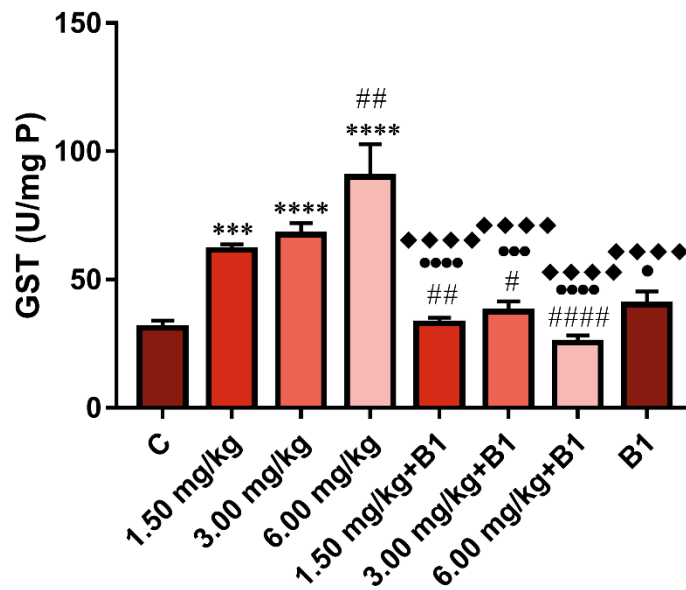
Grafikon 8. Aktivnost enzima glutation-S-transferaze (GST) u plazmi japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM. p< 0,05 (*), p< 0,001 (**), p< 0,0001 (****): značajna razlika u odnosu na kontrolu; p< 0,0001 (####): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF; p< 0,05 (•): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF; p< 0,05 (♦), p< 0,001 (♦♦♦), p< 0,0001 (♦♦♦♦): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF; p< 0,01 (◊◊): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF+B1.

Tabela 17. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti GST u plazmi kod japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1).

Naziv grupe	\bar{X}	SD	SE	CV(%)	Min	Max	Mediana
Kontrola (C)	0,20	0,05	0,02	25,56	0,14	0,28	0,20
1,50 mg/kg CPF	0,29	0,06	0,02	22,58	0,20	0,38	0,32
3,00 mg/kg CPF	0,37	0,04	0,02	11,53	0,31	0,41	0,38
6,00 mg/kg CPF	0,50	0,03	0,01	6,58	0,47	0,54	0,50
1,50 mg/kg CPF +B1	0,38	0,09	0,03	24,72	0,25	0,49	0,40
3,00 mg/kg CPF +B1	0,33	0,04	0,01	13,26	0,25	0,38	0,32
6,00mg/kg CPF +B1	0,29	0,05	0,02	17,49	0,21	0,35	0,31
B1	0,25	0,06	0,02	25,59	0,18	0,34	0,23

Aktivnost GST-a u plazmi je povećana za 90% kod doze od 1,50 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,0001$), 65% kod 3,00 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,001$), do 45% kod 6,00 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,05$), u odnosu na C. Sam B1 ne menja značajno aktivnost enzima. Međutim, primenom vitamina B1 nakon CPF-a, značajno smanjuje CPF-om povećanu aktivnost ovog enzima. Najbolji efekat vitamina B1 se primećuje između grupa u dozi od 6,00 mg/kg, gde je dokazan statistički značajan smanjenje aktivnosti enzima ($p < 0,0001$), nakon aplikovanja vitamina

Rezultati aktivnosti enzima GST u jetri prikazani su na grafikonu 9 i u tabeli 18. Dokazan je porast aktivnosti GST usled dejstva CPF-a za 1,98 puta (1,50 mg/kg CPF; $p < 0,001$), 2,17 puta (3,00 mg/kg CPF; $p < 0,0001$) i 2,89 puta (6,00 mg/kg CPF; $p < 0,0001$). Dodatni tretman vitaminom B1 doveo je do pada aktivnosti ovog antioksidativnog enzima, koje su bile u granicama fizioloških vrednosti. Statističke značajnosti u odnosu na C, nije bilo kod grupa koje su primile CPF+B1, kao ni kod kontrolne grupe sa vitaminom B1. Statistička značajnost uočena je između grupa: 1,50 mg/kg CPF i 1,50 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,01$), 3,00 mg/kg CPF i 3,00 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,001$), 6,00 mg/kg CPF i 6,00 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,001$).



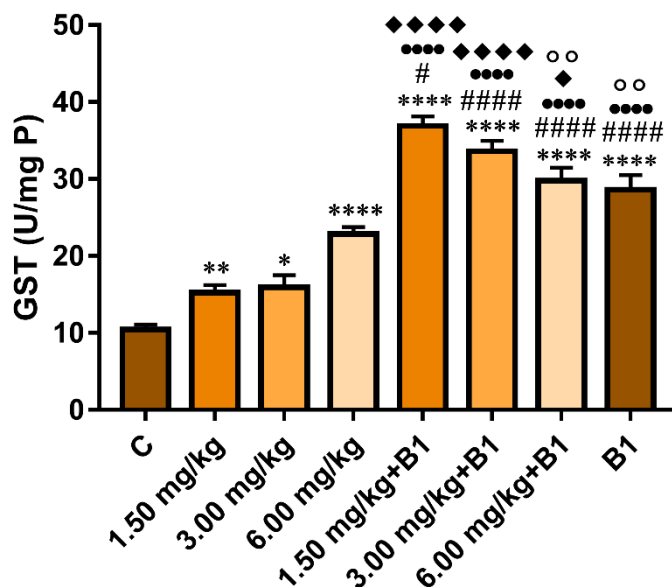
Grafikon 9. Aktivnost enzima glutation-S-transferaze (GST) u jetri japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****): značajna razlika u odnosu na kontrolu; $p < 0,05$ (#), $p < 0,01$ (##), $p < 0,0001$ (####): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF; $p < 0,05$ (•), $p < 0,001$ (●●), $p < 0,0001$ (●●●): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF; $p < 0,0001$ (◆◆◆◆): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF.

Tabela 18. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti GST u jetri kod japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1).

Naziv grupe	\bar{X}	SD	SE	CV(%)	Min	Max	Mediana
Kontrola (C)	31,14	8,44	2,98	27,10	13,26	36,88	34,95
1,50 mg/kg CPF	61,58	6,02	2,28	9,78	50,79	70,29	62,63
3,00 mg/kg CPF	67,56	11,82	4,47	17,50	50,10	82,21	64,74
6,00 mg/kg CPF	90,06	31,33	12,79	29,79	62,47	144,10	79,45
1,50 mg/kg CPF +B1	32,93	6,80	2,27	20,66	21,75	45,89	33,56
3,00 mg/kg CPF +B1	32,93	12,39	3,92	22,93	14,85	49,13	40,11
6,00 mg/kg CPF +B1	25,43	9,05	2,86	15,60	12,74	43,82	25,12
B1	40,31	12,46	5,08	20,90	27,75	59,83	38,36

Tretman pesticidom u mozgu prepelica (grafikon 10 i tabela 19) je doveo do statistički značajnog povećanja aktivnosti GST-a u dozi 1,50 mg/kg CPF (46,02%, $p < 0,01$), 3,00 mg/kg CPF (52,83%, $p < 0,05$); 6,00 mg/kg CPF (119,08%, $p < 0,0001$). Tretman vitaminom B1 pri svim ispitivanim dozama CPF-a je doveo do povećanje od 3,54; 3,22 i 2,85 puta sa istom statističkom značajnošću ($p < 0,0001$), kao i kod kontrolne grupe samo vitaminom B1 (2,7 puta, $p < 0,0001$) u odnosu na C. Statistička značajnost

($p < 0,0001$) je dokazana između grupa 1,50 mg/kg CPF i 1,50 mg/kg CPF+B1; 3,00 mg/kg CPF i 3,00 mg/kg CPF+B1; dok je nivo statističke značajnosti između 6,00 mg/kg CPF i 6,00 mg/kg CPF+B1 iznosio $p < 0,05$.



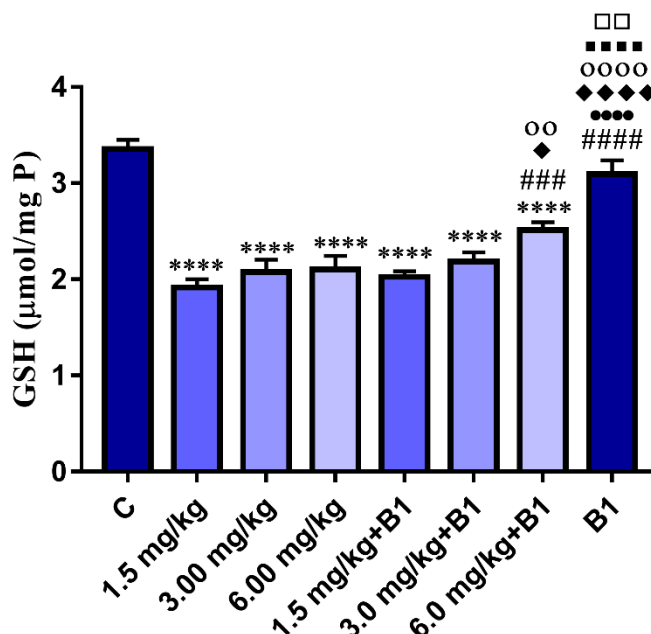
Grafikon 10. Aktivnost enzima glutation-S-transferaze (GST) u mozgu japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,0001$ (****): značajna razlika u odnosu na kontrolu; $p < 0,05$ (#), $p < 0,0001$ (#####): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF; $p < 0,0001$ (♦♦♦♦): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF; $p < 0,05$ (♦), $p < 0,0001$ (♦♦♦♦): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF; $p < 0,01$ (○○): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF+B1.

Tabela 19. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti GST u mozgu japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1).

Naziv grupe	\bar{X}	SD	SE	CV(%)	Min	Max	Mediana
Kontrola (C)	10,43	1,45	0,65	13,96	9,46	12,90	9,66
1,50 mg/kg CPF	15,23	2,48	1,01	16,29	12,56	18,65	14,27
3,00 mg/kg CPF	15,94	3,56	1,59	22,32	11,38	20,09	14,71
6,00 mg/kg CPF	22,85	2,24	0,91	9,79	20,30	25,76	22,15
1,50 mg/kg CPF +B1	36,91	3,45	1,22	9,34	33,04	43,78	36,18
3,00 mg/kg CPF +B1	33,61	4,15	1,38	12,34	28,79	41,87	34,38
6,00mg/kg CPF +B1	29,78	5,05	1,68	16,97	22,50	37,95	28,65
B1	28,62	5,01	1,89	17,49	19,79	34,50	28,84

5.1.4. ANALIZA KONCENTRACIJA REDUKOVANOG GLUTATIONA

Promene koncentracije GSH u plazmi prikazane su na grafikonu 11 i tabela 20. CPF je doveo do značajnog pada ($p < 0,0001$) nivoa GSH u plazmi u odnosu na C grupu i to za 42,87% (1,50 mg/kg CPF); 38,105 (3,00 mg/kg CPF); 37,30% (6,00 mg/kg CPF).



Grafikon 11. Koncentracija redukovanog glutation (GSH) u plazmi japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,0001$ (****): značajna razlika u odnosu na kontrolu; $p < 0,001$ (###), $p < 0,0001$ (####): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF; $p < 0,0001$ (****): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF; $p < 0,0001$ (****): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF; $p < 0,01$ (oo), $p < 0,0001$ (oooo): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF+B; $p < 0,0001$ (■■■■): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF+B1; $p < 0,0001$ (□□□□): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF+B1.

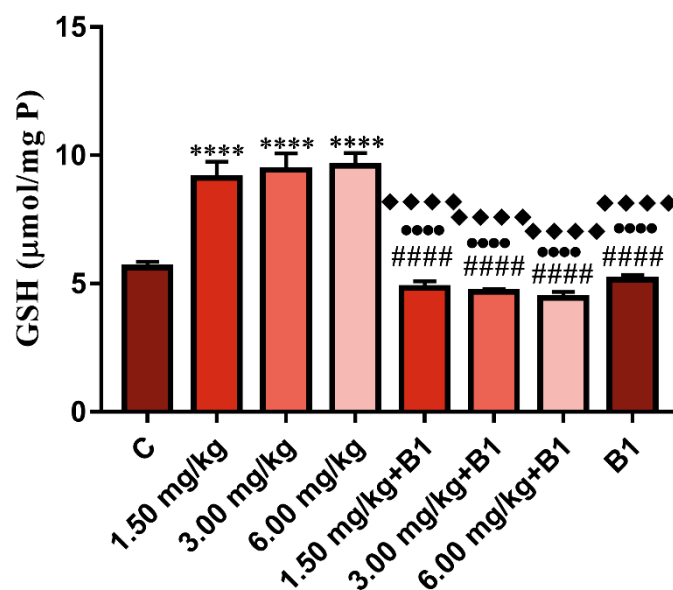
Tabela 20. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti GSH u plazmi japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1).

Naziv grupe	\bar{X}	SD	SE	CV(%)	Min	Max	Mediana
Kontrola (C)	3,35	0,26	0,09	7,67	3,01	3,85	3,27
1,50 mg/kg CPF	1,92	0,23	0,08	12,06	1,62	2,25	1,90
3,00 mg/kg CPF	2,07	0,29	0,13	13,78	1,70	2,43	2,02
6,00 mg/kg CPF	2,10	0,25	0,14	11,69	1,82	2,26	2,23
1,50 mg/kg CPF +B1	2,02	0,19	0,06	9,23	1,76	2,31	2,07
3,00 mg/kg CPF +B1	2,18	0,29	0,09	13,17	1,79	2,64	2,13
6,00mg/kg CPF +B1	2,51	0,26	0,08	10,55	2,17	2,97	2,53
B1	3,09	0,32	0,14	10,36	2,81	3,61	3,03

Kod grupa, kojima je posle pesticida aplikovan vitamin B1 je manjena koncentracija GSH u odnosu na C za 39,59% (1,50 mg/kg CPF+B1); 34,80% (3,00 mg/kg CPF+B1) i 25,16% (6,00 mg/kg CPF+B1). Između kontrolnih grupa nije bilo statistički značajne razlike u koncentraciji GSH. Statistički značajano smanjenje GSH je dokazano kod svih grupa u odnosu na grupu koja je primala samo vitamin B1 ($p < 0,0001$), osim u grupi tretiranoj sa CPF-om i B1 u dozi od 6,00 mg/kg ($p < 0,01$). Između grupa tretiranih sa najvišom dozom CPF-a sa i bez vitaminom B1 dokazan je značajan porast GSH ($p < 0,05$).

Na grafikonu 12 i u tabeli 21 je prikazana koncentracija GSH u jetri tretiranih jedinki. Uočen je porast koncentracije GSH ($p < 0,0001$) kod grupa koje su primile CPF za 67,72% (1,50 mg/kg CPF); 73,57% (3,00 mg/kg CPF); 76,35% (6,00 mg/kg CPF). Sam vitamin B1 ne menja koncentraciju GSH u odnosu na C, dok aplikovan posle CPF-a (sve tri ispitivane doze) vraća koncentraciju posmatranog tripeptida na fiziološki nivo (C grupa). Statistički značajna razlika $p < 0,0001$ je utvrđena i između grupa koje su bile tretirane pesticidom i grupa koje su u istim dozama CPF-a naknadno primile B1, kao i u odnosu na kontrolu samo vitaminom B1.

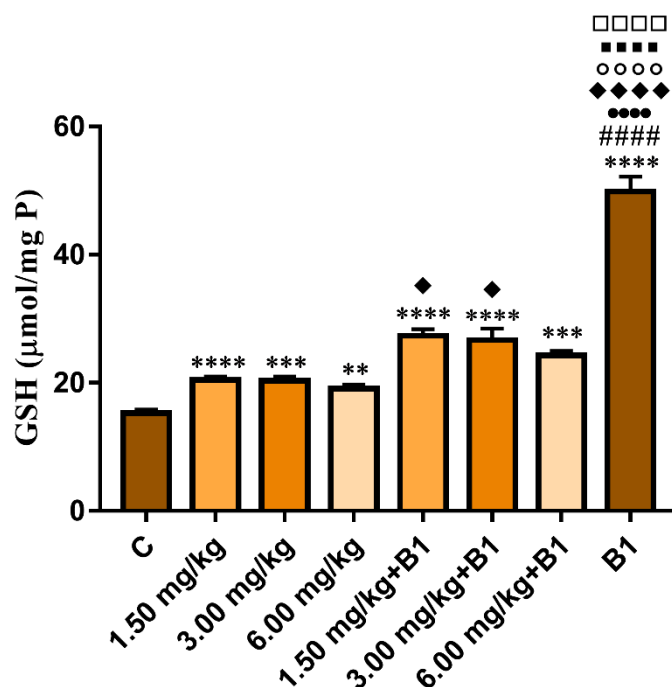
U tkivu mozga (grafikon 13 i tabela 22) je dokazana povećana koncentracija GSH u svim grupama u odnosu na C. Statistička značajnost dokazana je kod tretmana sa CPF-om sa povećanjem od 34,01% (1,50 mg/kg CPF, $p < 0,0001$); 33,09% (3,00 mg/kg CPF, $p < 0,001$); 25,03% (6,00 mg/kg CPF, $p < 0,01$); ali i kod doza 1,50 mg/kg CPF+B1 (79,42%, $p < 0,0001$); 3,00 mg/kg CPF+B1 (74,77%; $p < 0,0001$); 6,00 mg/kg CPF+B1 (59,04%, $p < 0,001$). Kod kontrolne grupe samo vitaminom B1 3,27 puta ($p < 0,0001$) je je povećana GSH u odnosu na C. Isti nivo statističke značajnosti je i između kontrolne grupe samo vitaminom B1 u odnosu na sve tretirane grupe.



Grafikon 12. Koncentracija redukovanog glutation (GSH) u jetri japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,0001$ (****): značajna razlika u odnosu na kontrolu; $p < 0,0001$ (####): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF; $p < 0,0001$ (***): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF; $p < 0,0001$ (◆◆◆): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF.

Tabela 21. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti GSH u jetri japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1).

Naziv grupe	\bar{X}	SD	SE	CV(%)	Min	Max	Mediana
Kontrola (C)	5,63	0,55	0,22	9,76	5,09	6,43	5,47
1,50 mg/kg CPF	9,12	1,81	0,64	19,80	7,31	13,09	8,81
3,00 mg/kg CPF	9,44	1,94	0,65	20,59	7,21	12,00	9,59
6,00 mg/kg CPF	9,59	1,42	0,50	14,78	7,20	11,15	9,82
1,50 mg/kg CPF +B1	4,83	0,73	0,26	15,17	3,80	5,69	5,11
3,00 mg/kg CPF +B1	4,68	0,35	0,11	7,51	4,01	5,06	4,74
6,00mg/kg CPF +B1	4,44	0,74	0,23	16,72	3,38	5,76	4,46
B1	5,15	0,55	0,19	10,71	4,70	6,09	4,92



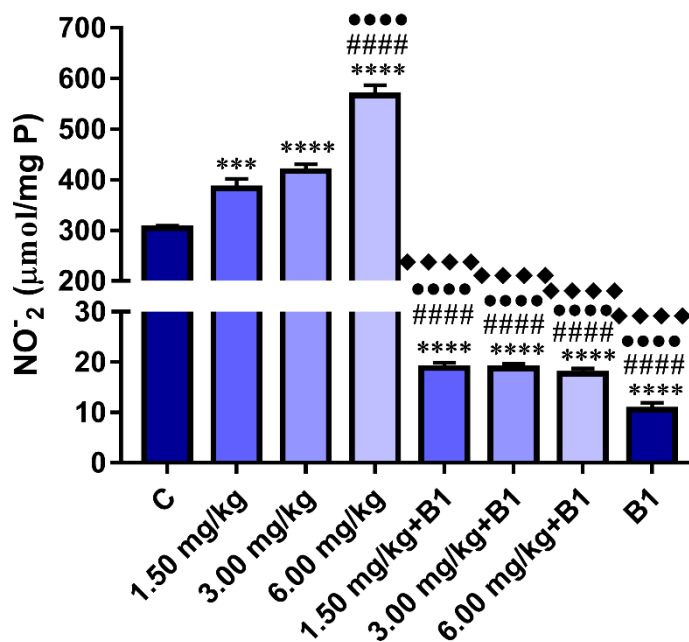
Grafikon 13. Koncentracija redukovanog glutationa (GSH) u mozgu japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****): značajna razlika u odnosu na kontrolu; $p < 0,0001$ (#####): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF; $p < 0,0001$ (***): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF; $p < 0,05$ (♦), $p < 0,0001$ (♦♦♦♦): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF, ; $p < 0,0001$ (○○○○): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF+B1; $p < 0,0001$ (■■■■): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF+B1; $p < 0,0001$ (□□□□): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF+B1.

Tabela 22. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti GSH u mozgu japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1).

Naziv grupe	\bar{X}	SD	SE	CV(%)	Min	Max	Mediana
Kontrola (C)	15,26	1,51	0,57	9,92	13,31	17,96	15,47
1,50 mg/kg CPF	20,45	1,26	0,51	6,16	18,98	22,25	20,27
3,00 mg/kg CPF	20,31	1,48	0,66	7,31	17,79	21,64	20,81
6,00 mg/kg CPF	19,08	1,47	0,65	7,71	16,60	20,29	19,48
1,50 mg/kg CPF +B1	27,38	2,60	0,98	9,50	24,53	32,39	27,25
3,00 mg/kg CPF +B1	26,67	5,72	1,81	21,44	20,24	36,31	26,53
6,00mg/kg CPF +B1	24,27	2,11	0,70	8,69	21,52	27,84	23,79
B1	49,88	6,90	2,30	13,84	37,05	60,08	50,95

5.1.5. ANALIZA KONCENTRACIJE NITRITA

Da bi utvrdili da li CPF dovodi do stvaranja azotovih radikala ispitivali smo koncentraciju NO_2^- . Rezultati analize uticaja CPF-a i vitamina B1 na koncentraciju NO_2^- u plazmi prikazani su na grafikonu 14 i u tabeli 23



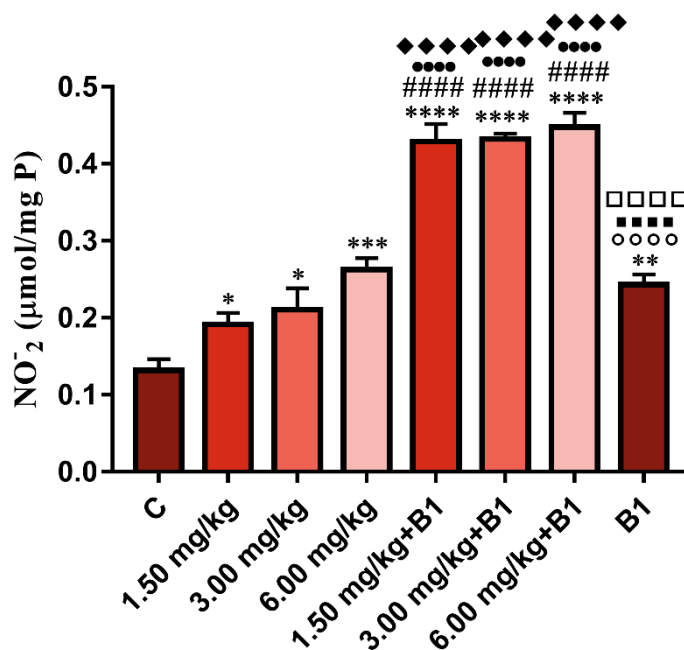
Grafikon 14. Koncentracija nitrita (NO_2^-) u plazmi japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,001$ (**), $p < 0,0001$ (****): značajna razlika u odnosu na kontrolu; $p < 0,0001$ (####): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF; $p < 0,0001$ (***): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF; $p < 0,0001$ (◆◆◆): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF.

Tabela 23. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti NO_2^- u plazmi japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1).

Naziv grupe	\bar{X}	SD	SE	CV(%)	Min	Max	Mediana
Kontrola (C)	304,00	11,22	5,02	7,67	290,30	316,10	308,10
1,50 mg/kg CPF	382,80	56,98	18,99	12,06	319,40	480,30	365,10
3,00 mg/kg CPF	417,20	43,86	13,87	13,78	364,40	496,20	409,10
6,00 mg/kg CPF	566,30	55,01	20,79	11,69	498,90	670,40	550,50
1,50 mg/kg CPF +B1	18,84	3,27	1,04	9,23	15,28	27,30	18,10
3,00 mg/kg CPF +B1	18,73	3,09	0,98	13,17	13,80	24,23	18,84
6,00mg/kg CPF +B1	17,65	3,58	1,13	10,55	10,74	22,39	18,13
B1	10,53	3,72	1,40	10,36	4,99	17,28	10,16

. Kod grupa koje su primile samo CPF javilo se očekivano povećanje koncentracije NO_2^- za 25,92% (1,50 mg/kg CPF, $p < 0,001$); 37,24% (3,00 mg/kg CPF, $p < 0,0001$) i 86,28% (6,00 mg/kg CPF, $p < 0,0001$) u poređenju sa C. Kod grupa koje su pored pesticida primile i vitamin B1, kao i kod same kontrolne grupe sa vitaminom B1, dokazano je smanjenje koncentracije NO_2^- u odnosu na C za 93,80% (1,50 mg/kg CPF+B1, $p < 0,0001$); 93,84% (3,00 mg/kg CPF+B1, $p < 0,0001$); 96,54% (6,00 mg/kg CPF+B1, $p < 0,0001$) i 96,54% (B1, $p < 0,0001$). Statistički značajna razlika ($p < 0,0001$) u koncentraciji NO_2^- je utvrđena i između sledećih grupa: 1,50 mg/kg CPF i 1,50 mg/kg CPF+B1, 3,00 mg/kg CPF i 3,00 mg/kg CPF+B1; 6,00 mg/kg CPF i 6,00 mg/kg CPF+B1, kao i 6,00 mg/kg CPF i B1.

U tkivu jetre je dokazano povećanje koncentracije NO_2^- u odnosu na C grupu kod svi tretiranih grupa, uključujući i kontrolu sa vitaminom B1 (grafikon 15 i tabela 24). Kod grupa tretiranih sledećim dozama: 1,50 mg/kg CPF; 3,00 mg/kg CPF i 6,00 mg/kg CPF, dokazano je povećanje koncentracije NO_2^- za 44,92% ($p < 0,05$); 59,54% ($p < 0,05$) i 99% ($p < 0,001$), u odnosu na C.



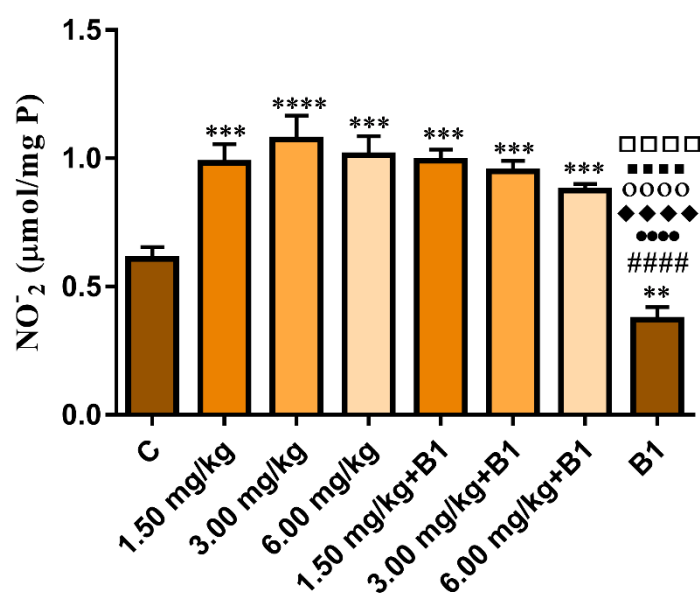
Grafikon 15. Koncentracija nitrita (NO_2^-) u jetri japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,001$ (***) , $p < 0,0001$ (****): značajna razlika u odnosu na kontrolu; $p < 0,0001$ (####): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF; $p < 0,0001$ (♦♦♦♦): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF; $p < 0,0001$ (◆◆◆◆): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF; $p < 0,0001$ (○○○○): značajna razlika u odnosu na grupu. 1,50 mg/kg CPF+B1; $p < 0,0001$ (■■■■): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF+B1; $p < 0,0001$ (□□□□): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF+B1.

Tabela 24. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti NO₂ u jetri japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1).

Naziv grupe	\bar{X}	SD	SE	CV(%)	Min	Max	Mediana
Kontrola (C)	0,13	0,03	0,01	27,18	0,091	0,17	0,12
1,50 mg/kg CPF	0,19	0,04	0,01	23,50	0,115	0,27	0,19
3,00 mg/kg CPF	0,21	0,07	0,03	29,20	0,123	0,30	0,23
6,00 mg/kg CPF	0,26	0,04	0,01	14,76	0,198	0,31	0,27
1,50 mg/kg CPF +B1	0,43	0,06	0,02	15,39	0,36	0,52	0,42
3,00 mg/kg CPF +B1	0,43	0,02	0,01	4,42	0,41	0,46	0,43
6,00mg/kg CPF +B1	0,45	0,05	0,02	11,87	0,40	0,56	0,43
B1	0,24	0,03	0,01	13,42	0,21	0,30	0,23

Kod grupa koje su pored CPF-a primale i B1 povećanje je bilo mnogo veće u odnosu na C ($p < 0,0001$). Tako je u grupi od 1,50 mg/kg CPF+B1 povećanje bilo 3,25 puta, zatim sa 3,00 mg/kg CPF+B1 3,27 puta i 3,39 puta u grupi od 6,00 mg/kg CPF+B1. Kod kontrolne grupe sa vitaminom B1 utvrđeno je povećanje od 84,31% ($p < 0,01$), dok je nivo statističke značajnosti $p < 0,0001$ dokazan u odnosu na 1,50 mg/kg CPF+B1, 3,00 mg/kg CPF+B1, 6,00 mg/kg CPF+B1. Statistički značajna razlika ($p < 0,0001$) je utvrđena i između grupa kojima je aplikovan i tiamin u odnosu na grupe koje su primile samo CPF.

U tkivu mozga je zabeleženo povećanje koncentracija NO₂ (grafikon 16 i tabela 25) u odnosu na C za 61,39% (1,50 mg/kg CPF, $p < 0,001$); 76,31% (3,00 mg/kg CPF, $p < 0,0001$); 66,28% (6,00 mg/kg CPF, $p < 0,001$); 53,22% (1,50 mg/kg CPF+B1, $p < 0,001$); 55,90% (3,00 mg/kg CPF+B1, $p < 0,001$); 56,10% (6,00 mg/kg CPF+B1, $p < 0,001$). Samo je u kontrolnoj grupi sa vitaminom B1 dokazan pad koncentracija NO₂ za 39,20% ($p < 0,01$) u odnosu na kontrolu. Statistički značajna razlika ($p < 0,0001$) koncentracije NO₂ je utvrđena kod kontrolne grupe sa B1 u odnosu na sve tretirane grupe.



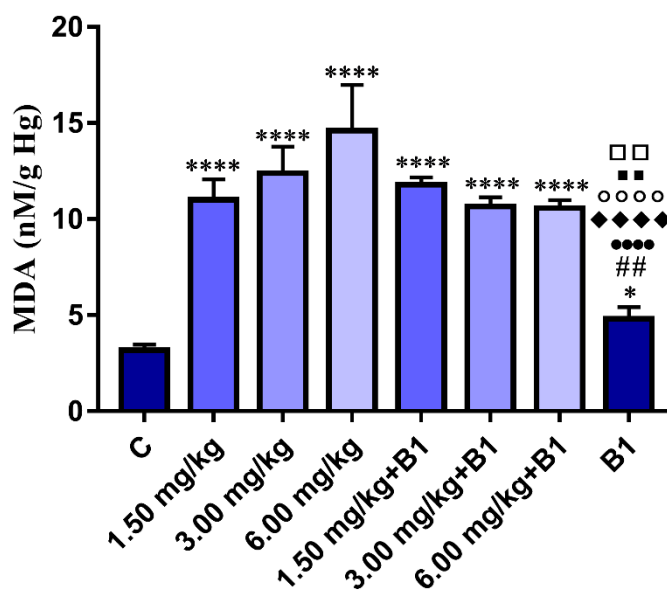
Grafikon 16. Koncentracija nitrita (NO_2^-) u mozgu japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****): značajna razlika u odnosu na kontrolu; $p < 0,0001$ (#####): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF; $p < 0,0001$ (●●●): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF; $p < 0,0001$ (◆◆◆): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF; $p < 0,0001$ (○○○): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF+B1; $p < 0,0001$ (■■■): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF+B1; $p < 0,0001$ (□□□): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF+B1.

Tabela 25. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti NO_2^- u jetri japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1).

Naziv grupe	\bar{X}	SD	SE	CV(%)	Min	Max	Mediana
Kontrola (C)	0,61	0,12	0,05	19,82	0,44	0,72	0,68
1,50 mg/kg CPF	0,98	0,22	0,07	22,50	0,69	1,28	0,89
3,00 mg/kg CPF	1,07	0,25	0,09	23,18	0,75	1,37	1,09
6,00 mg/kg CPF	1,01	0,18	0,07	18,27	0,85	1,33	0,94
1,50 mg/kg CPF +B1	0,99	0,12	0,04	12,50	0,82	1,20	0,98
3,00 mg/kg CPF +B1	0,95	0,12	0,04	12,67	0,77	1,12	0,93
6,00mg/kg CPF +B1	0,87	0,07	0,02	7,81	0,79	0,95	0,87
B1	0,37	0,11	0,05	30,64	0,21	0,50	0,39

5.1.6. ANALIZA KONCENTRACIJE MALONDIALDEHIDA

Dejstvo pesticida u eritrocitima prepelica je dovelo do povećanja koncentracije MDA (grafikon 17 i tabela 26). Ovaj parametar oštećenja ćelijske membrane je statistički značajno ($p < 0,0001$) povećan za 3,56 puta (1,50 mg/kg CPF), 3,90 puta (3,00 mg/kg CPF); 4,60 puta (6,00 mg/kg CPF).



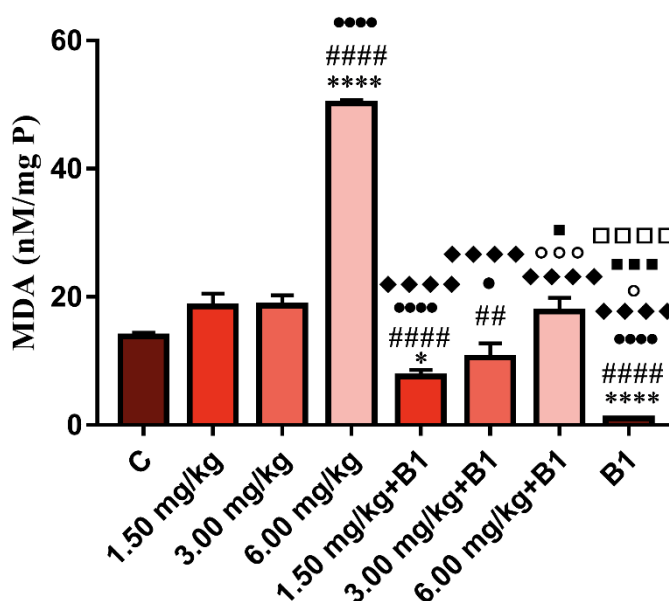
Grafikon 17. Koncentracija malondialdehida (MDA) u eritrocitima japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,05$ (*), $p < 0,0001$ (****): značajna razlika u odnosu na kontrolu; $p < 0,01$ (##): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF; $p < 0,0001$ (***): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF; $p < 0,0001$ (****): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF; $p < 0,0001$ (****): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF+B1; $p < 0,01$ (■): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF+B1; $p < 0,01$ (□): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF+B1.

Tabela 26. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti MDA u eritrocitima japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1).

Naziv grupe	\bar{X}	SD	SE	CV(%)	Min	Max	Mediana
Kontrola (C)	3,17	0,92	0,31	18,88	2,01	4,44	3,25
1,50 mg/kg CPF	11,01	2,82	1,07	25,64	7,47	15,03	10,23
3,00 mg/kg CPF	12,40	3,39	1,38	27,35	9,48	18,36	10,99
6,00 mg/kg CPF	14,60	5,86	2,39	30,13	10,31	26,14	12,72
1,50 mg/kg CPF +B1	11,79	1,19	0,37	10,10	10,46	14,07	11,72
3,00 mg/kg CPF +B1	10,67	1,28	0,48	11,99	9,02	12,62	10,46
6,00mg/kg CPF +B1	10,58	1,26	0,42	11,93	8,29	12,26	10,82
B1	4,80	1,51	0,62	21,46	3,30	7,54	4,71

Dok je tretman vitaminom B1 doveo do pada koncentracije MDA, ali su vrednosti i dalje bile povećane u odnosu na kontrolnu grupu i to za 3,71 puta (1,50 mg/kg CPF+B1); 3,36 puta (3,00 mg/kg CPF+B1), i 3,33 puta (6,00 mg/kg CPF+B1). Kontrolna grupa samo vitaminom B1 je pokazala porast koncentracije MDA u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$). Ipak, to povećanje je značajno manje u odnosu na tretirane grupe ($p < 0,01$ za grupe 1,50 mg/kg CPF; 3,00 mg/kg CPF+B1, i 6,00 mg/kg CPF+B1; $p < 0,0001$ grupe 3,00 mg/kg CPF; 6,00 mg/kg CPF; 1,50 mg/kg CPF+B1).

Rezultati analize koncentracije MDA u jetri prikazani su na grafikonu 18 i u tabeli 27. Upotreba pesticida je dovela do porasta koncentracije MDA u odnosu na C, ali se statistički značajno povećanje može uočiti samo kod grupe 6,00 mg/kg CPF (3,63 puta, $p < 0,0001$). Kod jedinki koje su posle CPF-a primile B1 zabeležen je pad koncentracije MDA u odnosu na C (za 54,7%, pri dozi 1,50 mg/kg CP+B1, $p < 0,05$), ali i u poređenju sa CPF grupama.



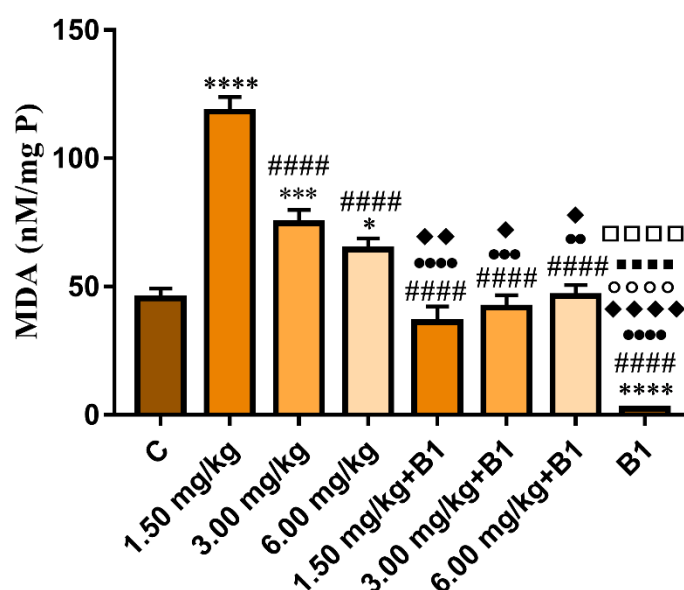
Grafikon 18. Koncentracija malondialdehida (MDA) u jetri japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,05$ (*), $p < 0,0001$ (****): značajna razlika u odnosu na kontrolu; $p < 0,01$ (##), $p < 0,0001$ (#####): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF; $p < 0,05$ (●), $p < 0,0001$ (●●●●): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF; $p < 0,0001$ (◆◆◆◆): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF; $p < 0,05$ (○), $p < 0,001$ (○○○): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF+B1; $p < 0,05$ (■), $p < 0,001$ (■■■): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF+B1; $p < 0,0001$ (□□□□): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF+B1.

Tabela 27. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti MDA u jetri japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1).

Naziv grupe	\bar{X}	SD	SE	CV(%)	Min	Max	Mediana
Kontrola (C)	13,82	1,69	0,60	12,28	10,92	15,74	14,12
1,50 mg/kg CPF	18,53	5,71	2,02	25,83	11,64	27,96	16,43
3,00 mg/kg CPF	18,64	4,29	1,62	23,04	12,62	24,75	18,75
6,00 mg/kg CPF	50,18	0,77	0,54	1,54	49,63	50,72	50,18
1,50 mg/kg CPF +B1	7,56	2,78	1,05	26,82	4,25	11,95	7,05
3,00 mg/kg CPF +B1	10,51	5,57	2,27	29,03	3,38	19,99	10,59
6,00mg/kg CPF +B1	17,71	5,32	2,17	27,07	10,96	24,66	16,97
B1	1,03	0,32	0,10	20,55	0,60	1,53	1,04

Statistički značajne promene su dokazane kod sledećih grupa: 1,50 mg/kg CPF i 1,50 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,0001$), 3,00 mg/kg CPF i 3,00 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,05$), 6,00 mg/kg CPF i 6,00 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,0001$). Kod kontrolne grupe samo vitaminom B1 uočeno je značajno ($p < 0,0001$) smanjenje MDA za 13,43 puta u odnosu na C grupu..

Primena CPF-a je izazvala povećanje koncentracije MDA u tkivu mozga (grafikon 19 i tabela 28) za 2,60 puta (1,50 mg/kg CPF- $p < 0,0001$), 1,64 puta (3,00 mg/kg CPF - $p < 0,001$), (6,00 mg/kg CPF - $p < 0,05$) u odnosu na C. Tretman vitaminom B1 u sve tri doze je vratio vrednosti MDA na fiziološki nivo, tako da nije bilo statistički značajne razlike u odnosu na C. Statistički značajna razlika je uočena kod sledećih grupa: 1,50 mg/kg CPF i 1,50 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,0001$), 3,00 mg/kg CPF i 3,00 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,001$), 6,00 mg/kg CPF i 6,00 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,05$). Kod kontrolne grupe sa vitaminom B1 uočeno je smanjenje koncentracije MDA za 18,56 puta ($p < 0,0001$) u odnosu na kontrolnu grupu, a i u odnosu na ostale tretirane grupe dokazan je nivo statističke značajnosti $p < 0,0001$



Grafikon 19. Koncentracija malondialdehida (MDA) u mozgu japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,05$ (*), $p < 0,001$ (***) , $p < 0,0001$ (****): značajna razlika u odnosu na kontrolu; $p < 0,0001$ (#####): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF; $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) , $p < 0,0001$ (****): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF; $p < 0,05$ (♦), $p < 0,01$ (♦♦), $p < 0,0001$ (♦♦♦♦): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF; $p < 0,0001$ (○○○○): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF+B1; $p < 0,0001$ (■■■■): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF+B1; $p < 0,0001$ (□□□□): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF+B1.

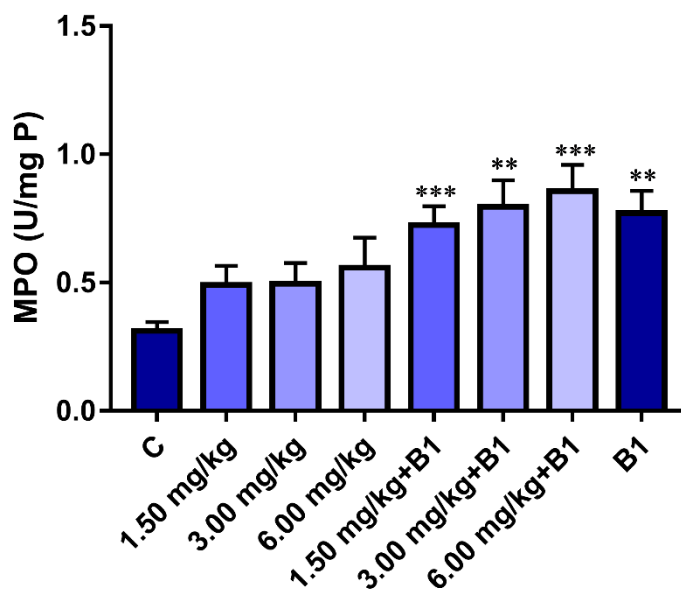
Tabela 28. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti MDA u mozgu japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1).

Naziv grupe	\bar{X}	SD	SE	CV(%)	Min	Max	Mediana
Kontrola (C)	45,47	10,73	3,79	13,60	36,05	64,37	40,88
1,50 mg/kg CPF	118,20	16,44	5,81	18,92	94,02	151,00	116,80
3,00 mg/kg CPF	74,68	14,05	5,31	15,82	61,09	99,79	76,06
6,00 mg/kg CPF	64,40	11,75	4,44	18,25	53,89	81,46	57,84
1,50 mg/kg CPF +B1	36,14	15,07	6,15	29,71	21,35	57,29	31,75
3,00 mg/kg CPF +B1	41,78	13,13	4,96	21,42	14,85	55,83	43,24
6,00mg/kg CPF +B1	46,33	9,88	4,42	21,34	36,82	62,56	44,95
B1	2,45	0,50	0,19	20,60	1,99	3,43	2,27

5.1.7. ANALIZA AKTIVNOSTI MIJELOPEROKSIDAZE

Rezultati aktivnosti MPO u plazmi su prikazani na grafikonu 20 i u tabeli 29. Pod uticajem dejstva samog CPF-a, kao i u kombinaciji sa B1 povećana je aktivnost enzima MPO u plazmi u odnosu na C grupu. Statistički značajno povećanje aktivnosti od 2,32; 2,55 i 2,75 puta zabeleženo je pri dozama od 1,50 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,001$); 3,00 mg/kg

CPF+B1 ($p < 0,01$) i 6,00 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,001$). Aktivnost MPO kontrolne grupa samo B1 je povećana 2,42 puta ($p < 0,01$), u odnosu na C.

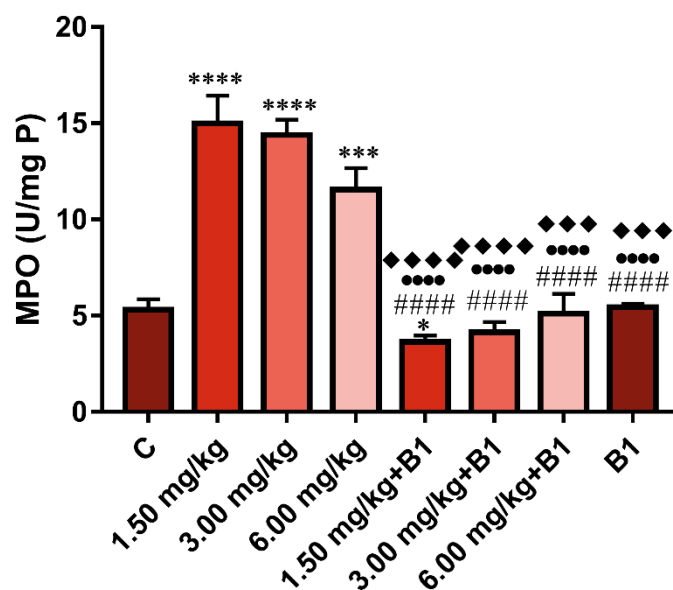


Grafikon 20. Aktivnost enzima mijeloperoksidaze (MPO) u plazmi japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***): značajna razlika u odnosu na kontrolu.

Tabela 29. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti MPO u plazmi japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1).

Naziv grupe	\bar{X}	SD	SE	CV(%)	Min	Max	Mediana
Kontrola (C)	0,31	0,09	0,03	18,00	0,18	0,41	0,31
1,50 mg/kg CPF	0,49	0,18	0,07	27,59	0,18	0,69	0,49
3,00 mg/kg CPF	0,49	0,18	0,08	26,53	0,30	0,77	0,49
6,00 mg/kg CPF	0,56	0,26	0,12	27,13	0,27	0,90	0,56
1,50 mg/kg CPF +B1	0,72	0,19	0,07	26,90	0,40	0,96	0,72
3,00 mg/kg CPF +B1	0,80	0,27	0,10	24,33	0,20	1,02	0,79
6,00mg/kg CPF +B1	0,86	0,27	0,10	21,56	0,53	1,31	0,81
B1	0,77	0,21	0,08	24,65	0,48	1,03	0,71

Rezultati aktivnosti MPO u jetri prepelica usled dejstva CPF-a i vitamina B1 prikazani su na grafikonu 21 i u tabeli 30. U odnosu na C, aktivnost enzima je statistički značajno povećana kod sve tri doze CPF i to 2,83 puta ($p < 0,0001$) za grupu 1,50 mg/kg CPF; 2,72 puta ($p < 0,0001$) za 3,00 mg/kg CPF i 2,18 puta ($p < 0,001$) za 6,00 mg/kg CPF. Primena B1 smanjuje CPF-om povećanu aktivnost na fiziološki nivo samo je kod doze 1,50 mg/kg CPF+B1 utvrđen pad aktivnosti za 31, 26% ($p < 0,05$) u odnosu na C.

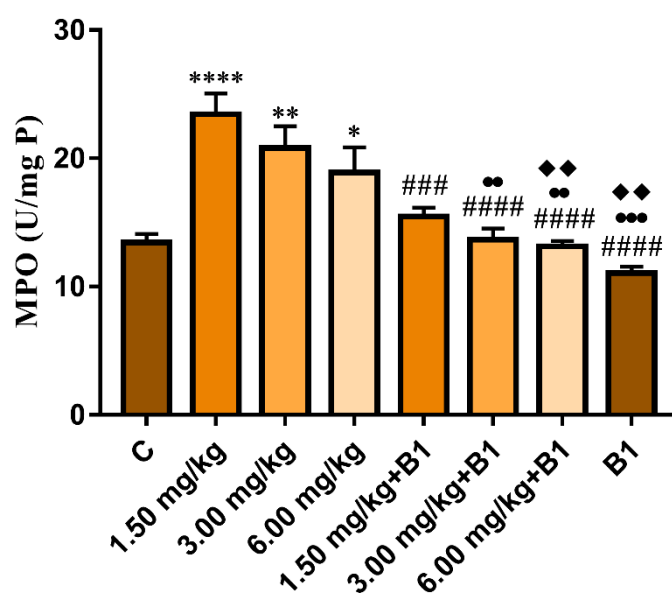


Grafikon 21. Aktivnost enzima mijeloperoksidaze (MPO) u jetri japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,05$ (*), $p < 0,001$ (**), $p < 0,0001$ (****): značajna razlika u odnosu na kontrolu; $p < 0,0001$ (#####): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF; $p < 0,0001$ (***): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF; $p < 0,001$ (◆◆), $p < 0,0001$ (◆◆◆): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF.

Tabela 30. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti MPO u jetri japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1).

Naziv grupe	\bar{X}	SD	SE	CV(%)	Min	Max	Mediana
Kontrola (C)	5,30	1,35	0,55	25,47	3,70	7,15	5,31
1,50 mg/kg CPF	14,99	4,09	1,45	27,30	10,39	22,66	14,68
3,00 mg/kg CPF	14,40	2,11	0,79	14,68	11,75	17,84	13,80
6,00 mg/kg CPF	11,56	2,98	1,13	25,80	9,02	16,77	10,37
1,50 mg/kg CPF +B1	3,64	0,82	0,33	22,42	2,19	4,54	3,62
3,00 mg/kg CPF +B1	4,15	1,58	0,53	28,03	2,37	5,89	4,77
6,00mg/kg CPF +B1	5,11	2,51	1,02	29,18	1,65	7,81	5,87
B1	5,44	0,47	0,19	8,68	4,91	6,20	5,41

Statistički značajne razlike su dokazane između sledećih grupa: 1,50 mg/kg CPF i 1,50 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,0001$); 3,00 mg/kg CPF i 3,00 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,0001$); 6,00 mg/kg CPF i 6,00 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,01$). Vrednosti aktivnosti MPO kontrolne grupe sa vitaminom B1 nije pokazala razliku u odnosu na kontrolu.



Grafikon 22. Aktivnost enzima mijeloperoksidaze (MPO) u mozgu japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,0001$ (****): značajna razlika u odnosu na kontrolu; $p < 0,001$ (###), $p < 0,0001$ (####): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF; $p < 0,01$ (••), $p < 0,001$ (•••): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF; $p < 0,05$ (♦): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF.

Tabela 31. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti MPO u jetri japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1).

Naziv grupe	\bar{X}	SD	SE	CV(%)	Min	Max	Mediana
Kontrola (C)	13,43	1,78	0,67	13,18	11,94	16,48	12,24
1,50 mg/kg CPF	23,43	5,17	1,64	22,08	16,13	32,34	22,43
3,00 mg/kg CPF	20,82	5,35	1,69	25,70	12,76	28,90	19,18
6,00 mg/kg CPF	18,88	5,22	1,97	27,64	9,83	24,70	19,62
1,50 mg/kg CPF +B1	15,45	2,01	0,71	13,04	13,68	18,03	14,41
3,00 mg/kg CPF +B1	13,65	2,48	0,87	18,19	8,61	15,99	14,33
6,00mg/kg CPF +B1	13,15	1,19	0,42	9,12	11,12	14,54	13,43
B1	11,07	1,07	0,48	9,70	9,36	12,28	11,14

Na grafikonu 22 i u tabeli 31 se može videti da je tretman CPF-om doveo do povećanja MPO u tkivu mozga. Sve primenjene doze CPF-a su dovele do značajnog povećanja od 74,46% (1,50 mg/kg CPF, $p < 0,0001$); 55,02% (3,00 mg/kg CPF, $p < 0,01$), i 40,58% (6,00 mg/kg CPF, $p < 0,05$) u odnosu na C grupu. Tretman vitaminom B1, kao i kontrola samo sa B1 je izazvao značajno smanjenje aktivnosti MPO, pa statistički značajne razlike u odnosu na C grupu nije bilo. Statistički značajna razlika dokazana je

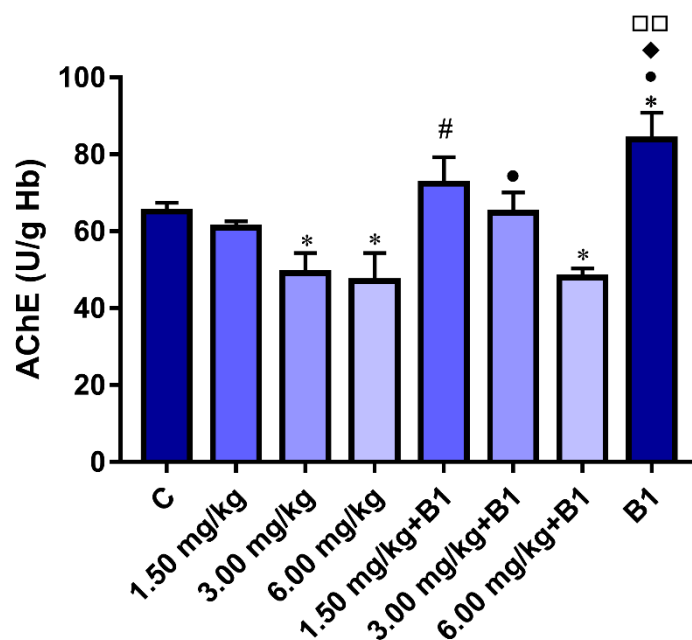
između grupa 1,50 mg/kg CPF i 1,50 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,0001$), 3,00 mg/kg CPF i 3,00 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,01$), 6,00 mg/kg CPF i 6,00 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,01$).

5.2. ISPITIVANJE UTICAJA VITAMINA B1 NA AKTIVNOSTI HOLINESTERAZA KOD PREPELICA TRETIRANIH HLORPIRIFOSOM

5.2.1. ISPITIVANJA AKTIVNOSTI HOLINESTERAZA U KRVI

5.2.1.1. ISPITIVANJE AKTIVNOSTI ACETILHOLINESTERAZE U ERITROCITIMA

Aktivnost enzima acetilholinesteraze (AChE) u eritrocitima je prikazana na grafikonu 23 i u tabeli 32. Inhibicija aktivnosti ovog enzima uočljiva je kod grupa koje su tretirane CPF-om kao i kod grupe tretirane sa najvećom dozom CPF-a koja je naknadno primila vitamin B1. Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu, može se uočiti kod doze od 3,00 mg/kg CPF ($p < 0,05$), 6,00 mg/kg CPF, 6,00 mg/kg CPF sa vitaminom B1 sa dokazanom inhibicijom od 24,50%; 25,50% i 26,34%. Značajna razlika je utvrđena kod doza od 3,00 mg/kg CPF ($p < 0,05$), 6,00 mg/kg CPF ($p < 0,05$), 6,00 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,01$) u odnosu na kontrolnu grupu koja je primila samo vitamin B1. Naknadni tretman vitaminom B1 je doveo do vidnog oporavka i povećanja ovog enzima kod prve dve doze CPF-a $p < 0,05$. Primitan je porast aktivnost enzima AChE kod kontrolne grupe sa vitaminom B1 u odnosu na C na nivou statističke značajnosti $p < 0,05$.



Grafikon 23. Aktivnost enzima acetilholinesteraze (AChE) u eritrocitima japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,05$ (*): značajna razlika u odnosu na kontrol; $p < 0,05$ (•): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF; $p < 0,05$ (♦): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF; $p < 0,01$ (□□): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF+B1.

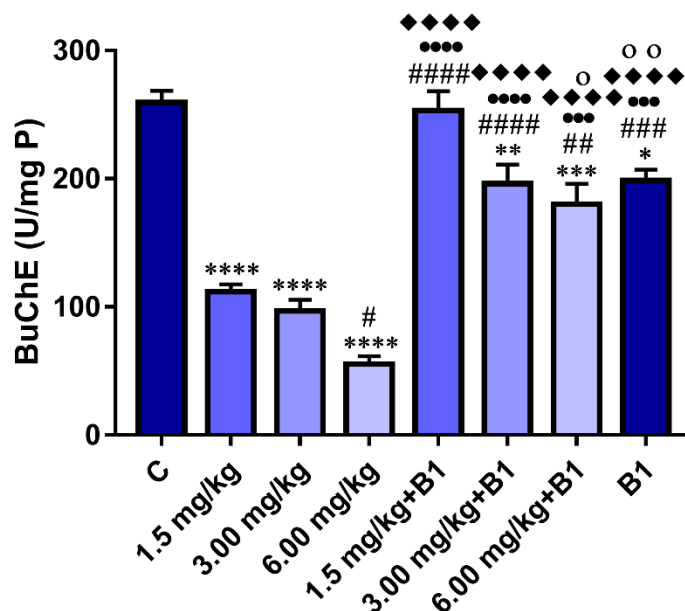
Tabela 32. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti AChE u eritrocitima japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1).

Naziv grupe	\bar{X}	SD	SE	CV(%)	Min	Max	Mediana
Kontrola (C)	65,11	6,28	2,37	9,65	58,67	73,40	63,70
1,50 mg/kg CPF	60,99	4,79	1,59	7,85	51,01	66,24	62,34
3,00 mg/kg CPF	49,16	14,66	5,18	26,82	17,00	62,34	52,45
6,00 mg/kg CPF	47,08	19,32	7,30	29,20	18,12	62,34	56,50
1,50 mg/kg CPF +B1	72,40	16,82	6,86	23,23	53,00	99,18	72,46
3,00 mg/kg CPF +B1	64,81	13,12	5,35	20,24	53,78	87,28	58,6
6,00mg/kg CPF +B1	47,96	5,96	2,43	12,42	41,56	58,44	46,73
B1	83,86	15,66	7,00	18,67	70,54	110,30	78,67

5.2.1.2. ISPITIVANJE AKTIVNOSTI BUTIRILHOLINESTERAZE U PLAZMI

Enzim butirilholinesteraza (BuChE) se pokazao kao najbolji parametar dejstva CPF-a, što se može uočiti na grafikonu 24 i u tabeli 33. Dokazana je inhibicija ovog enzima kod grupa koje su tretirane pesticidom, dok je kod grupa koje su primile i B1

došlo do vidnog oporavka i povećanja aktivnosti ovog enzima. Inhibicija BuChE je iznosila 56,86% kod grupe sa 1,50 mg/kg CPF ($p < 0,0001$); 62,68% sa 3,00 mg/kg CPF ($p < 0,0001$), i 78,66% sa 6,00 mg/kg CPF ($p < 0,0001$) u odnosu na C.



Grafikon 24. Aktivnost enzima butirilholinesteraze (BuChE) u plazmi japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****): značajna razlika u odnosu na kontrolu; $p < 0,05$ (#), $p < 0,01$ (##), $p < 0,001$ (###), $p < 0,0001$ (####): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CP; $p < 0,001$ (●●●), $p < 0,0001$ (●●●●): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF; $p < 0,0001$ (◆◆◆◆): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF; $p < 0,05$ (○), $p < 0,01$ (○○): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF+B1.

Tabela 33. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti BuChE u plazmi japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1).

Naziv grupe	\bar{X}	SD	SE	CV(%)	Min	Max	Mediana
Kontrola (C)	259,40	24,39	9,22	9,41	226,70	292,60	266,80
1,50 mg/kg CPF	111,90	18,34	5,80	16,39	81,05	130,70	116,10
3,00 mg/kg CPF	96,81	23,43	8,86	24,20	63,10	127,00	98,61
6,00 mg/kg CPF	55,36	16,77	6,34	30,29	38,13	81,71	49,35
1,50 mg/kg CPF +B1	253,10	40,36	15,25	15,95	212,40	326,10	249,20
3,00 mg/kg CPF +B1	196,10	47,63	15,06	24,29	105,20	259,50	202,20
6,00mg/kg CPF +B1	180,10	50,45	15,95	28,01	90,66	271,00	176,30
B1	198,50	19,37	8,66	9,76	181,70	225,10	189,10

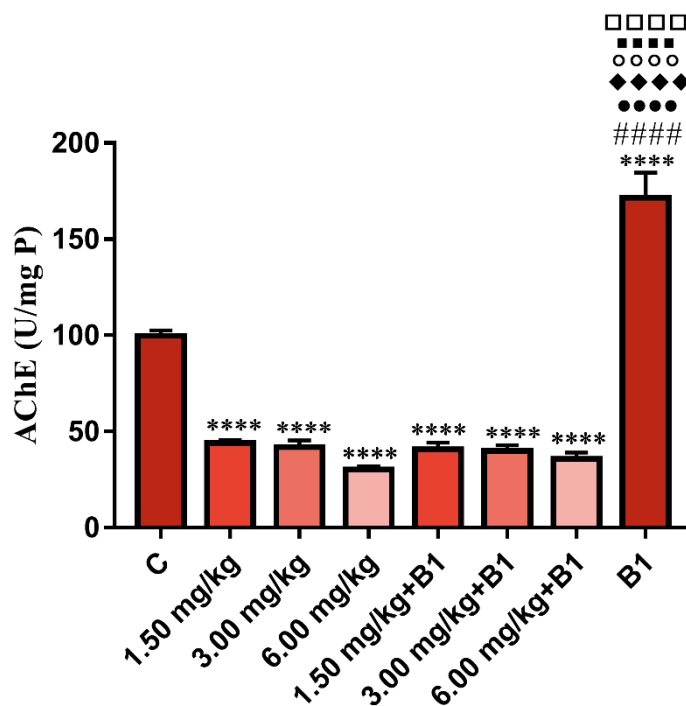
Nakon tretmana sa B1 primećen je manji stepen inhibicije i to za 24,4% kod grupe sa 3,00 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,01$) i 30,57% sa 6,00 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,001$) u odnosu na C. Dok je B1 kod kontrolne grupe sa najmanjom dozom CPF-a vratio vrednosti BuChE

na fiziološki nivo, sam B1 je smanjio aktivnost enzima za 23,48% u odnosu na C ($p < 0,05$). Statistički značajne razlike ($p < 0,0001$) su primećene između sledećih grupa: 1,50 mg/kg CPF i 1,50 mg/kg CPF+B1; 3,00 mg/kg CPF i 3,00 mg/kg CPF+B1; 6,00 mg/kg CPF i 6,00 mg/kg CPF+B1. Važno je napomenuti da je između grupa kojima je nakon CPF-a aplikovan vitamin B1 i onih koje su tretirane samo pesticidom utvrđena statistička značajnost od $p < 0,0001$, kao i porast aktivnosti BuChE za 55,79%; 50,63% i 69,26%.

5.2.2. ISPITIVANJA AKTIVNOSTI HOLINESTERAZA U JETRI

5.2.2.1. ISPITIVANJE AKTIVNOSTI ACETILHOLINESTERAZE

Primena CPF-a samog ili u kombinaciji sa B1, inhibirala je enzim AChE u jetri kod svih ispitivanih grupa (grafikon 25 i tabela 34) u odnosu na C ($p < 0,0001$). Statistički značajne razlike u aktivnosti ovog enzima između grupa nije bilo.



Grafikon 25. Aktivnost enzima acetilholin esteraze (AChE) japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,0001$ (****): značajna razlika u odnosu na kontrolu, $p < 0,0001$ (#####): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF, $p < 0,0001$ (***): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF, $p < 0,0001$ (◆◆◆): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF, $p < 0,0001$ (○○○○): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF+B1; $p < 0,0001$ (■■■■): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF+B1; $p < 0,0001$ (□□□□): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF+B1.

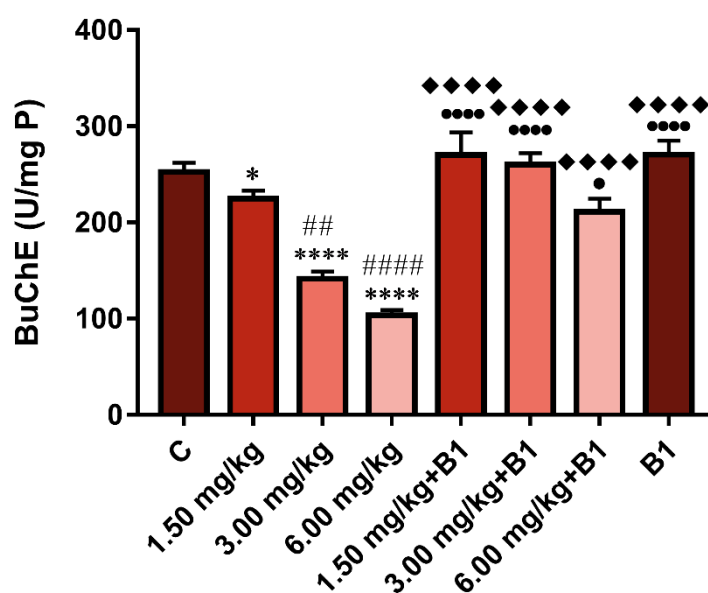
Tabela 34. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti BChE u jetri japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1).

Naziv grupe	\bar{X}	SD	SE	CV(%)	Min	Max	Mediana
Kontrola (C)	99,78	6,40	2,86	6,42	90,80	107,50	100,40
1,50 mg/kg CPF	44,12	3,39	1,39	7,70	38,07	47,60	44,49
3,00 mg/kg CPF	41,84	8,97	3,66	21,43	23,81	47,84	45,27
6,00 mg/kg CPF	30,24	3,59	1,61	11,88	27,51	35,68	28,16
1,50 mg/kg CPF +B1	40,72	8,63	3,52	21,19	32,06	54,25	40,29
3,00 mg/kg CPF +B1	40,00	8,45	2,99	21,14	29,47	53,05	39,67
6,00mg/kg CPF +B1	35,74	8,26	3,37	23,11	26,30	51,06	34,09
B1	171,50	34,59	13,07	20,16	128,70	217,20	167,90

Procenat inhibicije u odnosu na C je bio nešto veći kod grupa koje su pored pesticida tretirane i sa vitaminom B1 (59,19%-1,50 mg/kg CPF+B1; 59,91%-3,00 mg/kg CPF+B1) u odnosu na grupe koje su primale samo CPF (55,78%- 1,50 mg/kg CPF, 58,07%-3,00 mg/kg CPF). Jedino je kod grupe od 6,00 mg/kg CPF+B1 (64,18%) dokazana manja inhibicija u odnosu na dozu 6,00 mg/kg CPF (69,69%). Kod kontrolnu grupe koja je tretirana sa vitaminom B1 uočen je porast aktivnosti ovog enzima (71,88%) u odnosu na C ($p < 0,0001$), ali je statistički značajna razlika utvrđena i u odnosu na grupe koje su bile tretirane CPF-om kao i CPF-om i B1 ($p < 0,0001$).

5.2.2.2. ISPITIVANJE AKTIVNOSTI BUTIRILHOLINESTERAZE

Na grafikonu 26 i u tabeli 35 je prikazana aktivnost BuChE u jetri. Dokazana je statistički značajna inhibicija ($p < 0,0001$) aktivnosti od 43,92% u odnosu na C pri dozi od 3,00 mg/kg CPF i 58,93% pri dozi od 6,00 mg/kg CPF. Tretman sa B1 nakon CPF-a vraća aktivnost na kontrolni nivo. Posebno treba istaći razliku između grupa 3,00 mg/kg CPF i 3,00 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,0001$); 6,00 mg/kg CPF i 6,00 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,0001$); gde je uočen porast aktivnosti enzima za 45,58% i 50,92% nakon tretmana sa B1. Sam B1 povećava aktivnost enzima u odnosu na C, ali ta promena nije stastički značajna.



Grafikon 26. Aktivnost enzima butirilholin esteraze (BuChE) japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,05$ (*), $p < 0,0001$ (****): značajna razlika u odnosu na kontrolu; $p < 0,01$ (##), $p < 0,0001$ (####): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CP; $p < 0,05$ (•), $p < 0,0001$ (***): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF; $p < 0,0001$ (◆◆◆): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF.

Tabela 35. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti BuChE u jetri japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1).

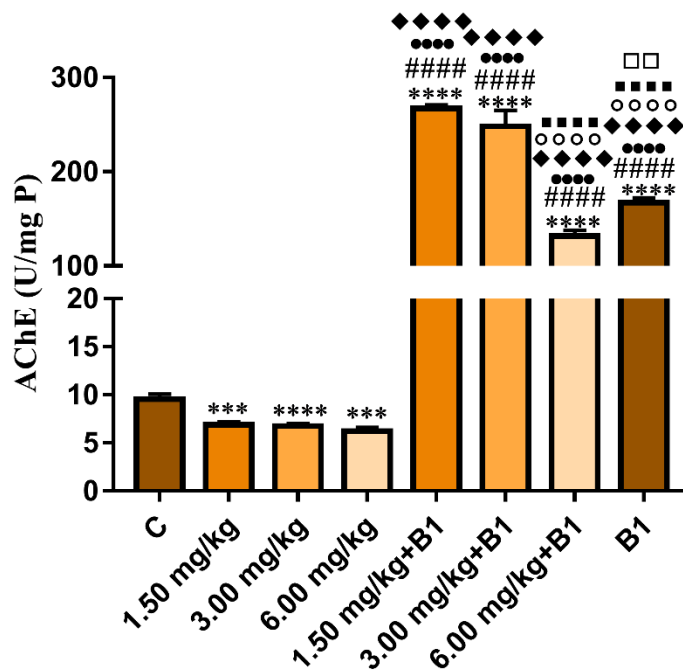
Naziv grupe	\bar{X}	SD	SE	CV(%)	Min	Max	Mediana
Kontrola (C)	252,50	25,05	9,47	9,92	228,40	301,10	247,50
1,50 mg/kg CPF	224,80	26,59	8,41	11,83	201,30	279,80	215,00
3,00 mg/kg CPF	141,60	21,52	7,61	15,20	102,20	169,30	142,90
6,00 mg/kg CPF	103,70	13,36	5,45	12,89	81,19	120,20	104,60
1,50 mg/kg CPF +B1	270,10	70,95	23,65	26,27	150,60	375,90	266,60
3,00 mg/kg CPF +B1	260,20	38,02	12,02	14,61	199,80	337,10	262,60
6,00mg/kg CPF +B1	211,30	40,73	13,58	19,27	151,40	271,90	219,70
B1	270,60	44,11	14,70	16,30	193,00	336,70	280,00

5.2.3. ISPITIVANJA AKTIVNOSTI HOLINESTERAZA U MOZGU

5.2.3.1. ISPITIVANJE AKTIVNOSTI ACETILHOLINESTERAZE

Na grafikonu 27 i u tabeli 36 se može uočiti da je aktivnost AChE u tkivu mozga značajno ($p < 0,0001$) smanjena tretmanom sa CPF-om, a tome u prilog govori i podatak da je zabeleženo 28,03% inhibicije pri dozi od 1,50 mg/kg CPF, 29,39% pri dozi 3,00

mg/kg CPF i 34,98% pri dozi od 6,00 mg/kg CPF, u odnosu na aktivnost enzima u C. U tkivu mozga prepelica koje su primile B1 nakon CPF-a primećena je reaktivacija enzima 27,94; 25,96; 13,77 puta pri dozama od 1,50 mg/kg CPF+B, 3,00 mg/kg CPF+B1, 6,00 mg/kg CPF+B1 u odnosu na C.



Grafikon 27. Aktivnost enzima acetilholinesteraze (AChE) u mozgu japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****): značajna razlika u odnosu na kontrolu; $p < 0,0001$ (#####): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF; $p < 0,0001$ (●●●●): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF; $p < 0,0001$ (◆◆◆◆): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF, $p < 0,0001$ (○○○○): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF+B1; $p < 0,0001$ (■■■■): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF+B1; $p < 0,01$ (□□): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF+B1.

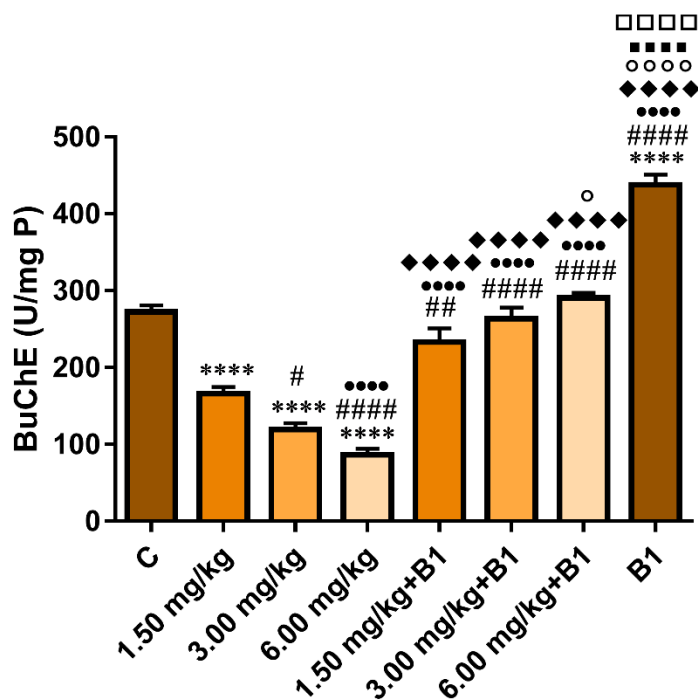
Tabela 36. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti AChE u mozgu japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1).

Naziv grupe	\bar{X}	SD	SE	CV(%)	Min	Max	Mediana
Kontrola (C)	9,56	1,39	0,53	14,61	7,16	11,19	9,57
1,50 mg/kg CPF	6,88	0,79	0,28	11,53	5,85	8,09	6,97
3,00 mg/kg CPF	6,75	0,82	0,25	12,12	4,65	7,55	6,98
6,00 mg/kg CPF	6,22	1,04	0,39	16,71	4,93	7,85	6,12
1,50 mg/kg CPF +B1	267,10	9,01	3,67	3,37	255,70	276,90	269,00
3,00 mg/kg CPF +B1	248,20	41,28	16,85	16,64	188,40	300,60	241,40
6,00 mg/kg CPF +B1	131,70	17,40	6,15	13,21	108,60	159,20	136,50
B1	167,10	12,87	5,25	7,70	151,80	182,70	165,90

Statistički značajna ($p < 0,0001$) je bila razlika u aktivnosti AChE između grupa 1,50 mg/kg CPF i 1,50 mg/kg CPF+B1; 3,00 mg/kg CPF i 3,00 mg/kg CPF+B1; 6,00 mg/kg CPF i 6,00 mg/kg CPF+B1. Kontrolna grupa samo B1 je pokazala 17,48 puta ($p < 0,0001$) veću aktivnost enzima nego kod C, koja je dokazana i u odnosu na ostale tretirane grupe.

5.2.3.2. ISPITIVANJE AKTIVNOSTI BUTIRILHOLINESTERAZE

Na grafikonu 28 i tabeli 37 uočava se inhibicija aktivnosti BuChE u mozgu Japanskih prepelica pod dejstvom CPF-a u odnosu na C grupu. Statistički značajna inhibicija enzima je dokazana kod grupe 1,50 mg/kg CPF ($p < 0,0001$) i to za 39,07%; kod 3,00 mg/kg CPF ($p < 0,0001$) za 56,22%; kod 6,00 mg/kg CPF ($p < 0,0001$) za 68,24%.



Grafikon 28. Aktivnost enzima butirilholinesteraze (BuChE) u mozgu japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,0001$ (****): značajna razlika u odnosu na kontrolu; $p < 0,05$ (#), $p < 0,01$ (##), $p < 0,0001$ (#####): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF; $p < 0,0001$ (●●●●): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF; $p < 0,0001$ (◆◆◆◆): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF, $p < 0,05$ (○), $p < 0,0001$ (○○○○): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF+B1; $p < 0,0001$ (■●●●): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF+B1; $p < 0,0001$ (□□□□): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF+B1.

Tabela 37. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti BuChE u mozgu japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1).

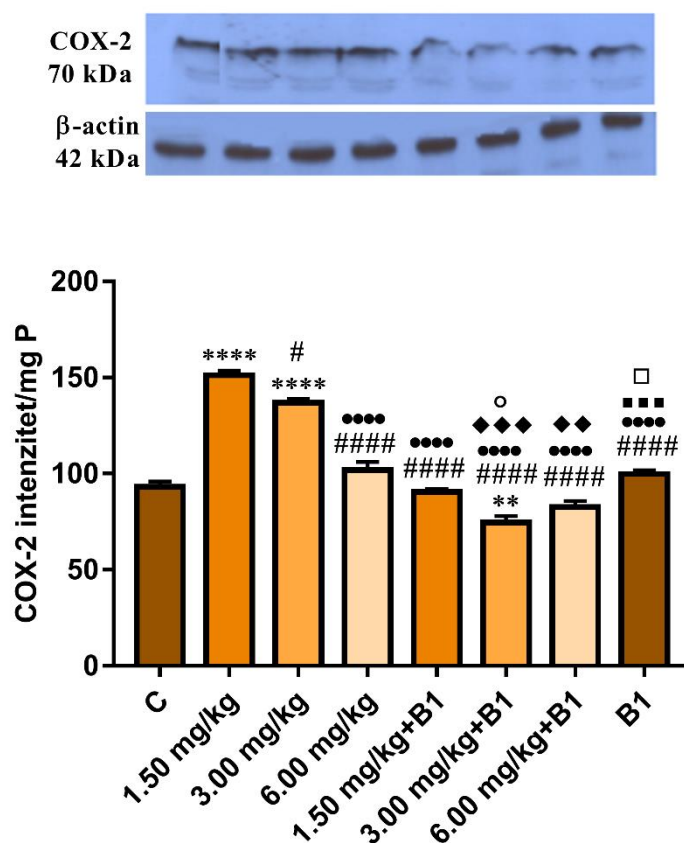
Naziv grupe	\bar{X}	SD	SE	CV(%)	Min	Max	Mediana
Kontrola (C)	272,30	22,86	8,64	8,40	238,80	300,60	279,70
1,50 mg/kg CPF	165,90	27,58	8,72	16,62	129,20	198,40	160,80
3,00 mg/kg CPF	119,20	27,51	8,69	23,08	74,76	160,30	120,20
6,00 mg/kg CPF	86,47	22,42	7,92	25,93	53,98	109,20	97,10
1,50 mg/kg CPF +B1	233,20	47,62	18,00	20,42	136,50	283,50	238,80
3,00 mg/kg CPF +B1	263,70	43,73	14,58	16,58	198,00	325,70	259,50
6,00 mg/kg CPF +B1	290,60	21,39	6,76	7,36	255,10	319,10	295,20
B1	437,60	37,54	13,27	8,58	380,00	489,90	431,80

Primenom B1 nakon tretmana sa CPF-om utvrđen je porast aktivnosti BuChE od 40,56% kod 1,50 mg/kg CPF+B1 u odnosu na 1,50 mg/kg CPF ($p < 0,01$), 121,22% kod 3,00 mg/kg CPF+B1 u odnosu na 3,00 mg/kg CPF ($p < 0,0001$); i čak 236,07% kod doze od 6,00 mg/kg CPF+B1 u odnosu na 6,00 mg/kg CPF ($p < 0,0001$). Kontrolna grupa sa vitaminom B1 je pokazala značajno povećanje aktivnosti enzima od 60%, u odnosu na C ($p < 0,0001$). Ista značajnost je takođe, dokazana u odnosu na sve ostale ispitivane grupe.

5.2.4. ANALIZA EKSPRESIJE ENZIMA UKLJUČENIH U SINTEZU PROINFLAMATORNIH MOLEKULA (COX-2, iNOS)

5.2.4.1. ISPITIVANJE EKSPRESIJE CIKLOOKSIGENAZA

Ciklooksigenaza (COX-2) kao enzim koji nastaje u aktiviranim makrofagima i na mestima inflamacije, je kod dejstva pesticida u tkivu mozga (grafikon 29 i tabela 38) povećana u odnosu na C za 62,4% (1,50 mg/kg CPF, $p < 0,0001$) i 46,83% (3,00 mg/kg CPF, $p < 0,0001$). Kod jedinki koje su primile B1 posle CPF-a došlo je do smanjene ekspresije COX-2 za 19,96% ($p < 0,01$) samo u grupi 3,00 mg/kg CPF+B1 u odnosu na C i grupe koje su bile tretirane samo pesticidom ($p < 0,0001$). Između kontrolnih grupa nije bilo statističke značajnosti. Statistička značajnost ($p < 0,0001$) je dokazana između 1,50 mg/kg CPF i 1,50 mg/kg CPF+B1; 3,00 mg/kg CPF i 3,00 mg/kg CPF+B1; dok je kod grupa 6,00 mg/kg CPF i 6,00 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,01$).

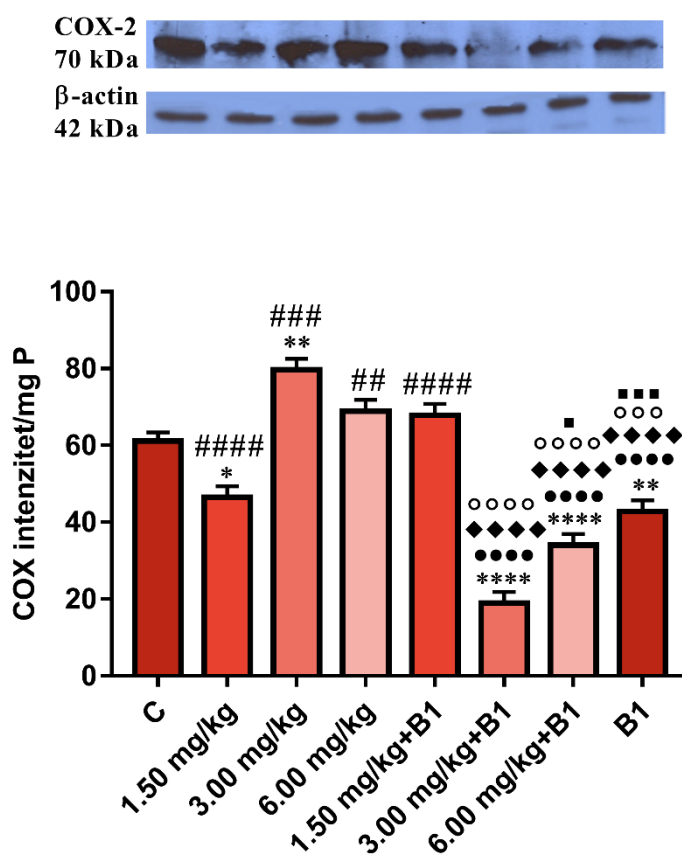


Grafikon 29. Ekspresija enzima ciklooksigenaze (COX-2) u mozgu japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1) i reprezentativni imunoblotovi. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,01$ (**), $p < 0,0001$ (****): značajna razlika u odnosu na kontrolu; $p < 0,05$ (#), $p < 0,0001$ (####): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF; $p < 0,0001$ (••••): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF; $p < 0,01$ (♦♦♦♦), $p < 0,001$ (♦♦♦): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF; $p < 0,05$ (○): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF+B1; $p < 0,001$ (■■■): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF+B1; $p < 0,05$ (□): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF+B1.

Tabela 38. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti COX-2 u mozgu japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1).

Naziv grupe	\bar{X}	SD	SE	CV(%)	Min	Max	Mediana
Kontrola (C)	93,10	4,92	2,84	5,29	88,15	98,00	93,15
1,50 mg/kg CPF	151,20	4,12	2,38	2,73	148,80	156,00	149,00
3,00 mg/kg CPF	136,70	3,78	2,18	2,76	133,20	140,70	136,20
6,00 mg/kg CPF	101,70	7,64	4,41	7,51	95,00	110,00	100,00
1,50 mg/kg CPF +B1	90,45	2,74	1,58	3,03	87,80	93,27	90,27
3,00 mg/kg CPF +B1	74,52	5,80	3,35	7,79	68,80	80,40	74,36
6,00 mg/kg CPF +B1	82,62	5,30	3,06	6,41	77,30	87,90	82,67
B1	99,67	3,51	2,02	3,52	96,00	103,00	100,00

U tkivu jetre je zabeleženo smanjenje ekspresije COX-2 (grafikon 30 i tabela 39) u odnosu na C za 23,95% (1,50 mg/kg CPF, $p < 0,05$); 68,98% (3,00 mg/kg CPF+B1, $p < 0,0001$); 44,21,28% (6,00 mg/kg CPF+B1, $p < 0,0001$); 29,97% (B1, $p < 0,01$). Samo je u grupi 3,00 mg/kg CPF dokazan porast ekspresije COX-2 za 30,43% ($p < 0,01$) u odnosu na C. Statistički značajna razlika ($p < 0,0001$) je utvrđena između grupa 1,50 mg/kg CPF i 1,50 mg/kg CPF+B1; 3,00 mg/kg CPF i 3,00 mg/kg CPF+B1; 6,00 mg/kg CPF i 6,00 mg/kg CPF+B1. Primenom B1 nakon tretmana CPF-om utvrđena je smanjena ekspresija COX-2 u grupama 3,00 mg/kg CPF+B1 i 6,00 mg/kg CPF+B1, kao i u grupi tretiranoj samo sa vitaminom B1, u odnosu na C.



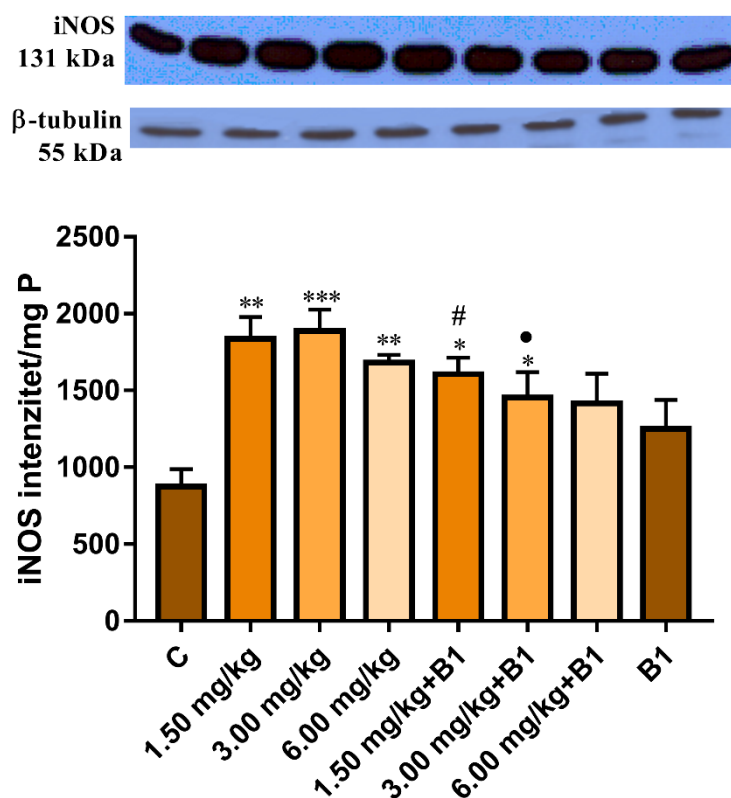
Grafikon 30. Ekspresijata enzima ciklooksigenaze (COX-2) u jetri japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,0001$ (****): značajna razlika u odnosu na kontrolu; $p < 0,01$ (##), $p < 0,001$ (###) $p < 0,0001$ (#####): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF; $p < 0,0001$ (●●●): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF; $p < 0,0001$ (◆◆◆◆): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF; $p < 0,0001$ (○○○○): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF+B1; $p < 0,05$ (■), $p < 0,001$ (■■■■): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF+B1.

Tabela 39. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti COX-2 u jetri japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1).

Naziv grupe	\bar{X}	SD	SE	CV(%)	Min	Max	Mediana
Kontrola (C)	61,09	4	2,31	6,55	57,09	65,09	61,09
1,50 mg/kg CPF	46,46	5	2,87	10,76	41,46	51,46	46,46
3,00 mg/kg CPF	79,68	5	2,88	6,28	74,68	84,68	79,68
6,00 mg/kg CPF	68,98	4	1,61	7,25	63,98	73,98	68,98
1,50 mg/kg CPF +B1	67,89	5	2,87	7,36	62,89	72,89	67,89
3,00 mg/kg CPF +B1	18,95	5	2,88	26,39	13,95	23,95	18,95
6,00mg/kg CPF +B1	34,08	5	2,87	14,67	29,08	39,08	34,08
B1	42,78	6	3,37	11,69	37,78	47,78	42,78

5.2.4.2. REZULTATI ISPITIVANJA EKSPRESIJE INDUCIBILNE AZOT-OKSID SINTAZE

Na grafikonu 31 i u tabeli 40 je dokazano povećanje ekspresije *i*NOS u tkivu mozga kod grupa 1,50 mg/kg CPF za 2,10 puta ($p < 0,01$); 3,00 mg/kg CPF za 2,16 puta ($p < 0,001$); 6,00 mg/kg CPF za 1,93 puta ($p < 0,01$). Kod jedinki koje su posle CPF-a primile B1 zabeležen je pad nivoa *i*NOS-a u odnosu na grupe koje su bile tretirane samo sa CPF-om (kod prve dve doze, $p < 0,05$), ali u odnosu na C i dalje su povećane vrednosti za 1,84 puta pri dozi 1,50 mg/kg CP+B1 ($p < 0,05$), i 1,62 puta 3,00 mg/kg CP+B1 ($p < 0,05$). Između kontrolnih grupa C i B1, nije bilo statističke značajne razlike u ekspresiji ovog enzima.



Grafikon 31. Aktivnost enzima inducibilne oksigenaze (*i*NOS) japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,01$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) : značajna razlika u odnosu na kontrolu.

Tabela 40. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti *i*NOS u mozgu japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1).

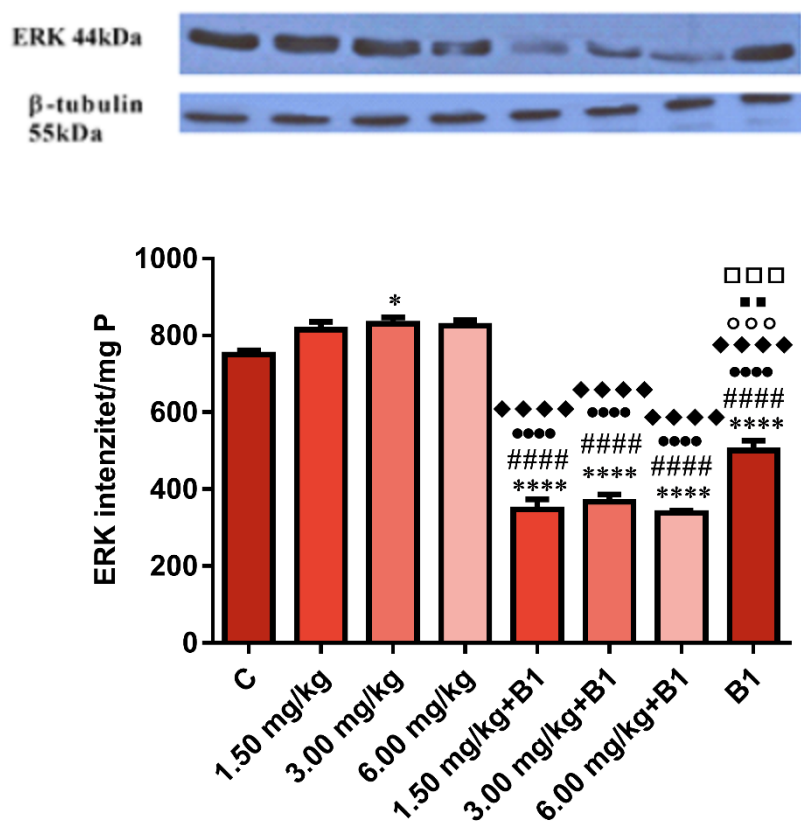
Naziv grupe	\bar{X}	SD	SE	CV(%)	Min	Max	Mediana
Kontrola (C)	873	200	115,5	22,91	673	1073	873
1,50 mg/kg CPF	1836	245,6	141,8	13,38	1578	2067	1863
3,00 mg/kg CPF	1888	236,9	136,8	12,55	1678	2145	1842
6,00 mg/kg CPF	1683	84,51	48,79	5,02	1598	1767	1685
1,50 mg/kg CPF +B1	1608	183,7	106,1	11,43	1434	1800	1589
3,00 mg/kg CPF +B1	1608	290,8	167,9	20,02	1190	1765	1402
6,00mg/kg CPF +B1	1416	334,6	193,2	23,63	1098	1765	1385
B1	1250	326,3	188,4	26,11	900	1546	1303

5.3. ISPITIVANJE UTICAJA HLORPIRIFOSA I VITAMINA B1 NA SIGNALNE PUTEVE

5.3.1. EKSTRACELULARNIM SIGNALOM REGULISANA KINAZA

Na grafikonu 32 i u tabeli 41 se može uočiti da je u tkivu jetre ekspresija ekstracelularnim signalom regulasane kinaze (ERK) povećana pri dozi od 3,00 mg/kg CPF za 8,67% ($p < 0,05$) u odnosu na C. Aplikovanje B1 vitamina je dovelo do značajnog pada ($p < 0,0001$) ekspresija ERK-a za 53,73% (1,50 mg/kg CPF+B1); 51,07% (3,00 mg/kg CPF+B1), i 54,93% (6,00 mg/kg CPF+B1). Statistička značajnost $p < 0,0001$ je dokazana između grupa sa CPF-om u odnosu na grupe jedinki koje su dobijale i vitamin B1 pored pesticida. Kod kontrolne grupe sa vitaminom B1 je dokazana manja ekspresija enzima u odnosu na C za 33,33 % ($p < 0,0001$). Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu sa vitaminom B1 je dokazana kod svih doza sa CPF-om ($p < 0,0001$), kao i kod grupa koje su dobijale pored CPF-a i vitamin B1 (1,50 mg/kg CPF+B1, $p < 0,001$; 3,00 mg/kg CPF+B1, $p < 0,01$; 6,00 mg/kg CPF+B1, $p < 0,001$).

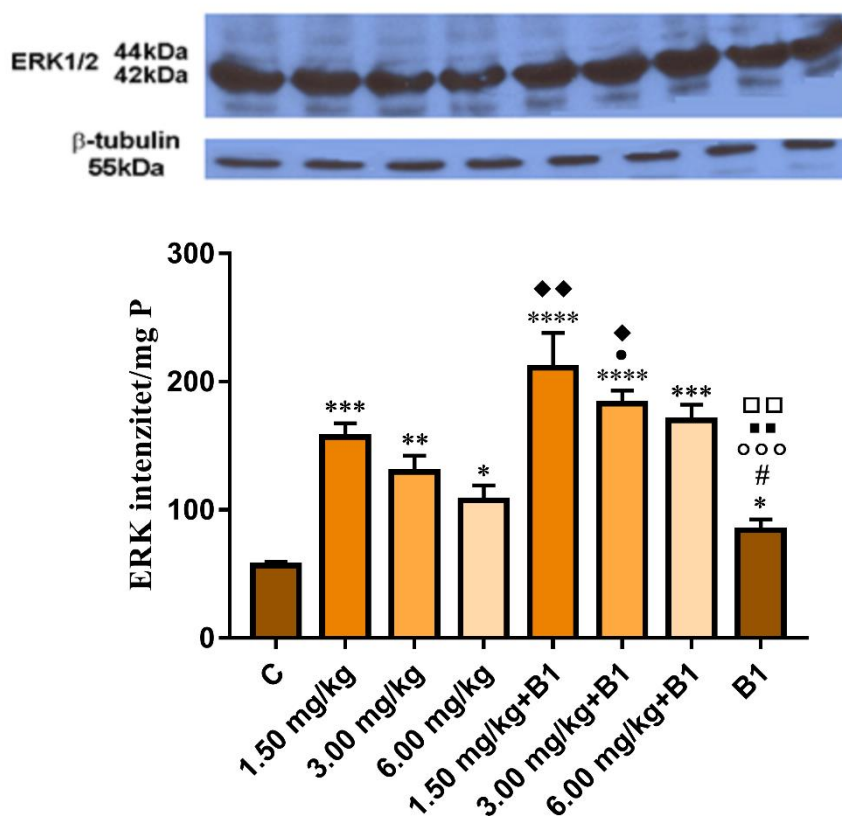
U tkivu mozga je dokazano povećanje ekspresije ERK-a i posle tretmana sa CPF-om i kod aplikacije CPF-a sa vitaminom B1 (grafikon 33 i tabela 42). Značajno povećanje nivoa ekspresije od 2,77; 2,29 i 1,90 puta, u odnosu na C je zabeleženo kod doza 1,50 mg/kg CPF ($p < 0,001$), 3,00 mg/kg CPF ($p < 0,01$), 6,00 mg/kg CPF ($p < 0,05$). Kod kontrole sa vitaminom B1 je dokazan porast od 49,03% ($p < 0,05$) u odnosu na C, dok je posle aplikacije vitamina B1 kod jedinki koje su bile tretirane CPF-om zabeležen još značajniji porast ekspresije ERK-a za 3,73 (1,50 mg/kg CPF+B1; $p < 0,0001$); 3,23 (3,00 mg/kg CPF+B1, $p < 0,0001$), i 3,01 puta (6,00 mg/kg CPF+B1, $p < 0,001$). Statistički značajna razlika ustanovljena je još između sledećih grupa: 3,00 mg/kg CPF i 3,00 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,05$).



Grafikon 32. Ekspresija ekstracelularnim signalom regulasane kinaze (ERK) u jetri japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,05$ (*), $p < 0,0001$ (****): značajna razlika u odnosu na kontrolu; $p < 0,0001$ (#####): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF; $p < 0,0001$ (***): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF; $p < 0,0001$ (◆◆◆): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF; $p < 0,001$ (○○○): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF+B1; $p < 0,01$ (■): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF+B1; $p < 0,001$ (□□□): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF+B1.

Tabela 41. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti ERK u mozgu japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1).

Naziv grupe	\bar{X}	SD	SE	CV(%)	Min	Max	Mediana
Kontrola (C)	61,09	4	2,31	6,55	57,09	65,09	61,09
1,50 mg/kg CPF	46,46	5	2,87	10,76	41,46	51,46	46,46
3,00 mg/kg CPF	79,68	5	2,88	6,28	74,68	84,68	79,68
6,00 mg/kg CPF	68,98	4	1,61	7,25	63,98	73,98	68,98
1,50 mg/kg CPF +B1	67,89	5	2,87	7,36	62,89	72,89	67,89
3,00 mg/kg CPF +B1	18,95	5	2,88	26,39	13,95	23,95	18,95
6,00mg/kg CPF +B1	34,08	5	2,87	14,67	29,08	39,08	34,08
B1	42,78	6	3,37	11,69	37,78	47,78	42,78



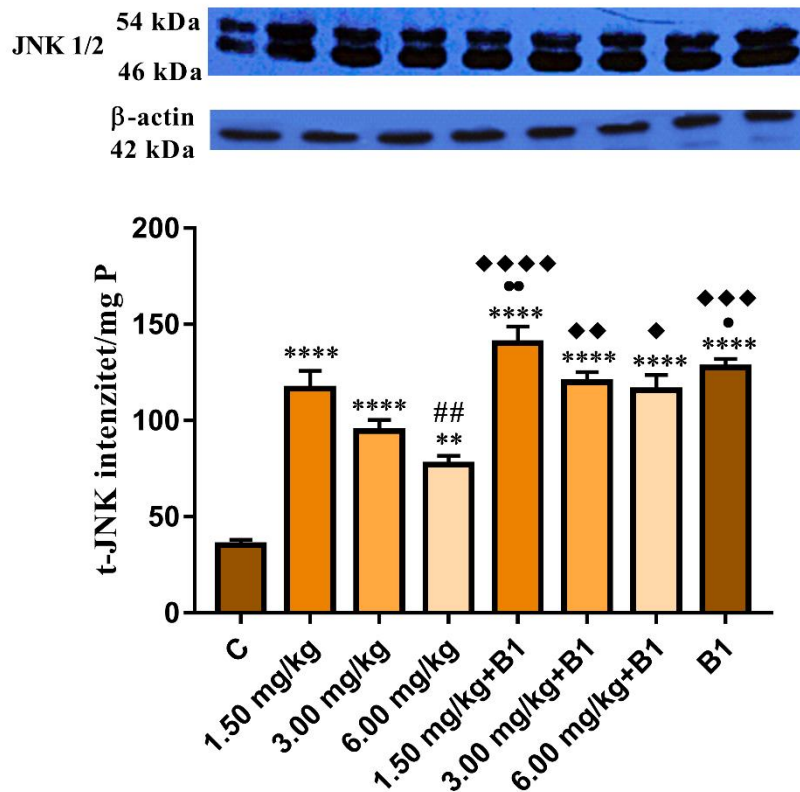
Grafikon 33. Ekspesija ekstracelularnim signalom regulasane kinaze (ERK) u mozgu japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****): značajna razlika u odnosu na kontrolu; $p < 0,05$ (#): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF; $p < 0,05$ (•): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF; $p < 0,05$ (♦), $p < 0,01$ (♦♦): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF; $p < 0,001$ (○○○): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF+B1; $p < 0,01$ (■): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF+B1; $p < 0,01$ (□□): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF+B1.

Tabela 42. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti ERK u mozgu japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1).

Naziv grupe	\bar{X}	SD	SE	CV(%)	Min	Max	Mediana
Kontrola (C)	56,52	5,16	2,98	9,14	51,60	61,90	56,06
1,50 mg/kg CPF	156,80	18,82	10,87	12,00	136,90	174,30	159,30
3,00 mg/kg CPF	129,60	22,31	12,88	17,22	113,10	155,00	120,70
6,00 mg/kg CPF	107,50	20,05	11,57	18,65	87,45	127,50	107,50
1,50 mg/kg CPF +B1	211,00	46,99	27,13	22,27	165,20	259,10	208,70
3,00 mg/kg CPF +B1	182,90	17,77	10,26	9,71	165,20	200,80	182,70
6,00mg/kg CPF +B1	170,00	20,94	12,09	12,32	151,10	192,50	166,40
B1	84,23	14,50	8,37	17,21	71,90	100,20	80,60

5.3.2. C-JUN N-TERMINALNE KINAZE

U mozgu je ekspresije c-jun N-terminalne kinaze (JNK) značajno povećana usled dejstva CPF-a za 3,31 (1,50 mg/kg CPF, $p < 0,0001$); 2,69 (3,00 mg/kg CPF, $p < 0,0001$), i 2,19 puta (6,00 mg/kg CPF, $p < 0,01$); u odnosu na C. Povećanje ekspresije ($p < 0,0001$) ove kinaze je zabeleženo i nakon aplikacije B1 i to za 3,98 (1,50 mg/kg CPF+B1); 3,41 (3,00 mg/kg CPF+B1); 3,29 puta (6,00 mg/kg CPF+B1). Kontrola sa B1 je pokazala 3,62 puta veću ekspresiju u odnosu na C ($p < 0,0001$), a statistički značajna razlika se uočava i između sledećih grupa: 6,00 mg/kg CPF i 6,00 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,05$). Ovi rezultati su prikazani na grafikonu 34 i u tabeli 43.



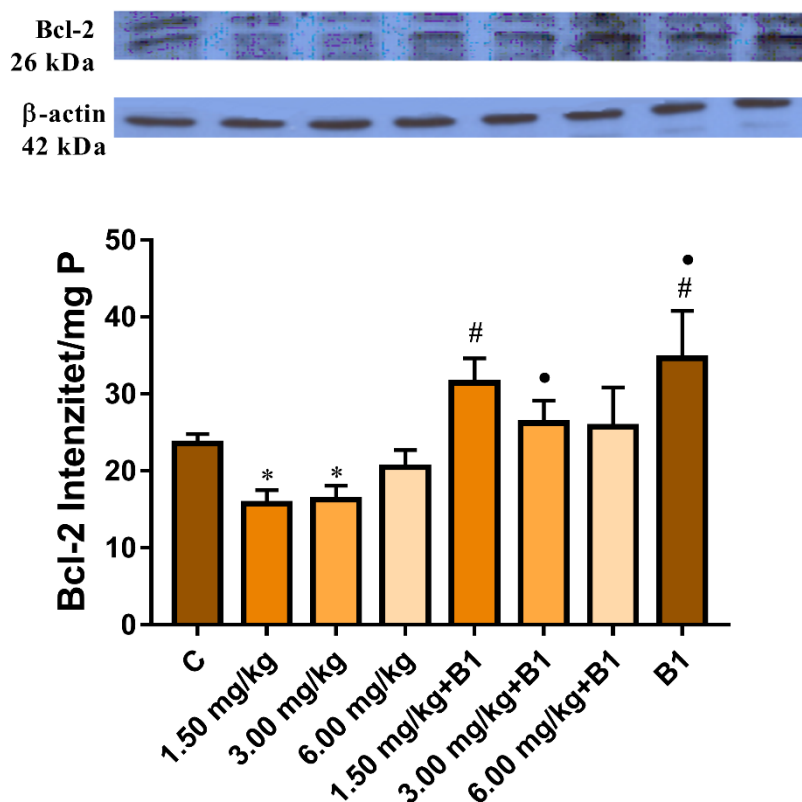
Grafikon 34. Ekspesija enzima c-jun N-terminalne kinaze (JNK) u mozgu japanskih prepelica tretiranih tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,01$ (**), $p < 0,0001$ (****): značajna razlika u odnosu na kontrolu; $p < 0,01$ (##): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF; $p < 0,05$ (*), $p < 0,05$ ($p < 0,01$ (♦♦): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF; $p < 0,05$ (♦), $p < 0,01$ (♦♦), $p < 0,001$ (♦♦♦), $p < 0,0001$ (♦♦♦♦): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF.

Tabela 43. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti JNK u mozgu japanskih prepelica tretiranih tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1).

Naziv grupe	\bar{X}	SD	SE	CV(%)	Min	Max	Mediana
Kontrola (C)	35,19	5,00	2,88	14,21	30,19	40,19	35,19
1,50 mg/kg CPF	116,60	16,00	9,24	13,72	100,60	132,60	116,60
3,00 mg/kg CPF	94,56	10,00	5,77	10,58	84,56	104,60	94,56
6,00 mg/kg CPF	77,06	7,99	4,61	10,37	69,07	85,05	77,06
1,50 mg/kg CPF +B1	140,20	14,90	8,60	10,62	125,30	155,10	140,20
3,00 mg/kg CPF +B1	119,90	9,050	5,22	7,55	110,90	129,00	120,00
6,00mg/kg CPF +B1	115,70	14,00	8,08	12,10	101,70	129,70	115,70
B1	127,50	7,90	4,56	6,20	119,60	135,40	127,50

5.4. ISPITIVANJE PARAMETARA APOPTOZE (B-ĆELIJSKOG LIMFOMA)

CPF je doveo do pada ekspresija Bcl-2 u mozgu (grafikon 35 i tabela 44) u odnosu na C sa statističkom značajnošću pri dozama od 1,50 mg/kg (33,26%, $p < 0,05$) CPF i 3,00 mg/kg CPF (31,05%, $p < 0,05$). Kod grupa koje su posle pesticida primile vitamin B1 došlo je do porasta ekspresije u odnosu na C ali bez statističkog značaja. Značajna razlika u porastu ekspresije se može uočiti između grupa 1,50 mg/kg CPF i 1,50 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,05$); 3,00 mg/kg CPF i 3,00 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,05$).



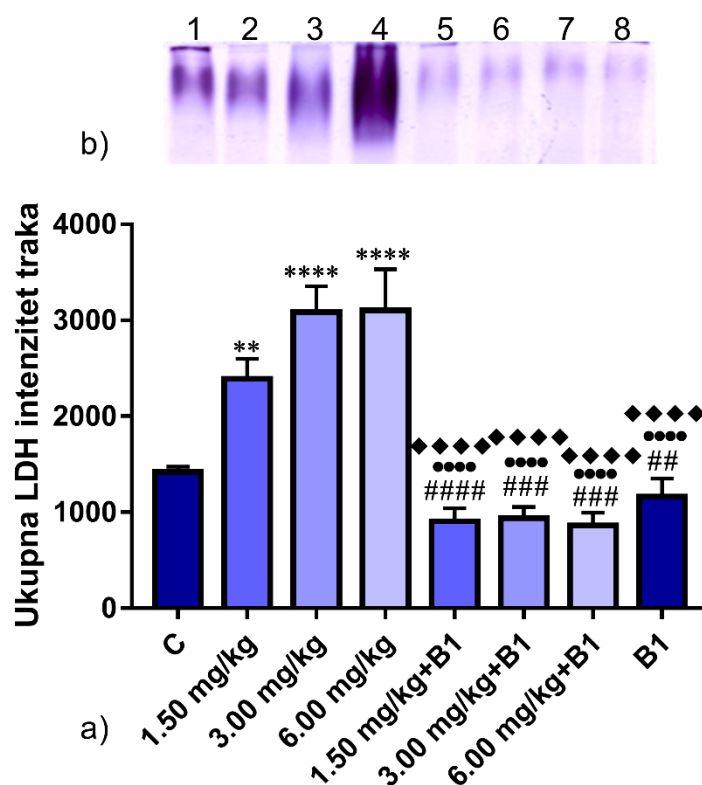
Grafikon 35. Nivo B-ćelijskog limfoma (Bcl-2) u mozgu japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**): značajna razlika u odnosu na kontrolu; $p < 0,05$ (#): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF; $p < 0,05$ (•): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF.

Tabela 44. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti Bcl-2 u mozgu japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1).

Naziv grupe	\bar{X}	SD	SE	CV(%)	Min	Max	Mediana
Kontrola (C)	23,57	2,15	1,242	9,12	21,40	25,70	23,62
1,50 mg/kg CPF	15,73	3,06	1,77	19,49	12,50	18,60	16,10
3,00 mg/kg CPF	16,25	3,19	1,84	19,65	12,80	19,10	16,86
6,00 mg/kg CPF	20,46	3,92	2,26	19,17	16,80	24,60	19,98
1,50 mg/kg CPF +B1	31,45	5,56	3,21	17,68	25,70	36,80	31,85
3,00 mg/kg CPF +B1	26,24	5,03	2,90	19,19	20,90	30,90	26,91
6,00mg/kg CPF +B1	25,73	8,85	5,11	34,40	16,90	34,60	25,69
B1	34,64	10,67	6,16	30,81	23,60	44,90	35,41

5.5. ODREĐIVENJE DISTRIBUCIJE ENZIMA LAKTAT-DEHIDROGENAZE U PLAZMI

Laktat-dehidrogenaza (LDH) predstavlja nespecifični marker oštećenja tkiva, pošto se oslobađa u krv nakon oštećenja ćelije. Kod ptica postoji samo jedna izoforma ovog enzima, dok kod sisara postoje pet. Na grafikonu 36 i u tabeli 45 se može primetiti da CPF dovodi do povećanja aktivnosti LDH u plazmi, dok vitamin B1 izaziva inhibiciju. Povećanje aktivnosti enzima od 1,68 ($p < 0,01$), 2,17 ($p < 0,0001$) i 2,19 puta ($p < 0,0001$) u odnosu na kontrolnu grupu, je dokazano kod doza 1,50 mg/kg CPF, 3,00 mg/kg CPF i 6,00 mg/kg CPF. Statistički značajna razlika ($p < 0,0001$) je dokazana nakon tretmana sa vitaminom B1, u sve tri ispitivane doze.



Grafikon 36. Relativna aktivnost laktat dehidrogenaze (LDH) u plazmi (a) japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1) sa elektroforegramom (b). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,01$ (**), $p < 0,0001$ (****): značajna razlika u odnosu na kontrolu; $p < 0,01$ (##), $p < 0,001$ (###), $p < 0,0001$ (####): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF; $p < 0,0001$ (◆◆◆): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF; $p < 0,0001$ (◆◆◆◆): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF.

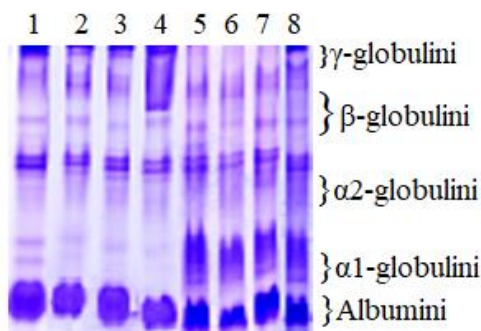
Tabela 45. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti LDH u plazmi japanskih prepelica tretiranih tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1).

Naziv grupe	\bar{X}	SD	SE	CV(%)	Min	Max	Mediana
Kontrola (C)	1420	136	55,5	9,58	1173	1529	1464
1,50 mg/kg CPF	2392	410,2	205,1	17,15	2022	2885	2330
3,00 mg/kg CPF	3083	467,7	270	25,17	2608	3543	3099
6,00 mg/kg CPF	3106	852,6	426,3	28,45	2360	4288	2888
1,50 mg/kg CPF +B1	904,5	433,5	137,1	19,93	461	1571	718,5
3,00 mg/kg CPF +B1	936,8	264,5	118,3	18,24	552	1254	1002
6,00mg/kg CPF +B1	860,2	304,9	136,3	15,44	568	1339	829
B1	1163	424,4	189,8	16,50	837	1884	1021

5.6. ANALIZE SINTEZE PROTEINA PLAZME KOD PREPELICA TRETIRANIH HLORPIRIFOSOM I VITAMINOM B1

Rezultati elektroforetske raspodele proteina plazme su prikazani na slici 17 i u tabeli 46. Može se primetiti da tretman sa CPF-om kao i kombinovano dejstvo CPF-a i tiamina dovode do pada koncentracije albumina. Statistički značajano smanjenje koncentracije albumina u odnosu na kontrolnu grupu, utvrđeno je kod 3,00 mg/kg CPF (14,52%, $p < 0,05$) i 6,00 mg/kg CPF (15,02%, $p < 0,05$), 1,50 mg/kg CPF+B1 (19,68%, $p < 0,05$), 3,00 mg/kg CPF+B1 (21,57%, $p < 0,05$) i 6,00 mg/kg CPF+B1 (25,86%, $p < 0,01$). Smanjenje koncentracije frakcije α 1- globulina (α 1-antitripsin) usled dejstva CPF-a je bez statističkog značaja, dok je naknadni tretman sa vitaminom B1 doveo do značajnog porasta ove frakcije. Statistički značajano povećanje od 3,34 ($p < 0,001$), 3,22 ($p < 0,001$), 3,37 ($p < 0,001$), 2,52 puta ($p < 0,001$), u odnosu na kontrolnu grupu, dokazano je kod doza 1,50 mg/kg CPF+B1, 3,00 mg/kg CPF+B1, 6,00 mg/kg CPF+B1 i kontrole sa vitaminom B1. Statistički značajnih promena u koncentraciji frakcije α 2- globulina (haptoglobin, ceruloplazmin, α 2- makroglobulin), u odnosu na kontrolnu grupu, nije bilo. Kod β – globulinske frakcije (transferin, hemopeksin, β – lipoproteini, fibrinogen, C3, β 2 - makroglobulin) jedina statistički značajna promena je ustanovljena kod doze od 6,00 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,05$), sa povećanjem koncentracije ovih proteina za 61,15%, u odnosu na kontrolnu grupu. γ - Globulinska frakcija se statistički značajano povećala samo

u prisustvu najveće doze CPF-a ($p < 0,05$). Kombinovani tretman CPF i B1 je doveo do smanjenja koncentracije γ - globulina za 41,99% (1,50 mg/kg CPF+B1, $p < 0,0001$), 41,25% (3,00 mg/kg CPF+B1, $p < 0,001$), 35,95% (6,00 mg/kg CPF+B1, $p < 0,01$), i 39,65% (B1, $p < 0,01$), u odnosu na kontrolnu grupu. Statistički značajno smanjenje odnosa A/G, u odnosu na kontrolnu grupu, dokazano je kod doza 1,50 mg/kg CPF+B1 (29,88%, $p < 0,05$), 3,00 mg/kg CPF+B1 (33,33%, $p < 0,05$) i 6,00 mg/kg CPF+B1 (39,08%, $p < 0,01$).



Slika 17. Nativna PAGE ukupnih proteina plazme (1- C grupa, 2-1,50 mg/kg CPF, 3-3,00 mg/kg CPF, 4-6,00 mg/kg CPF, 5- 1,50 mg/kg CPF+B1, 6- 3,00 mg/kg CPF+B1, 7- 6,00 mg/kg CPF+B1, 8-kontrola sa B1).

Tabela 46. Elektroforetska raspodela ukupnih proteina plazme

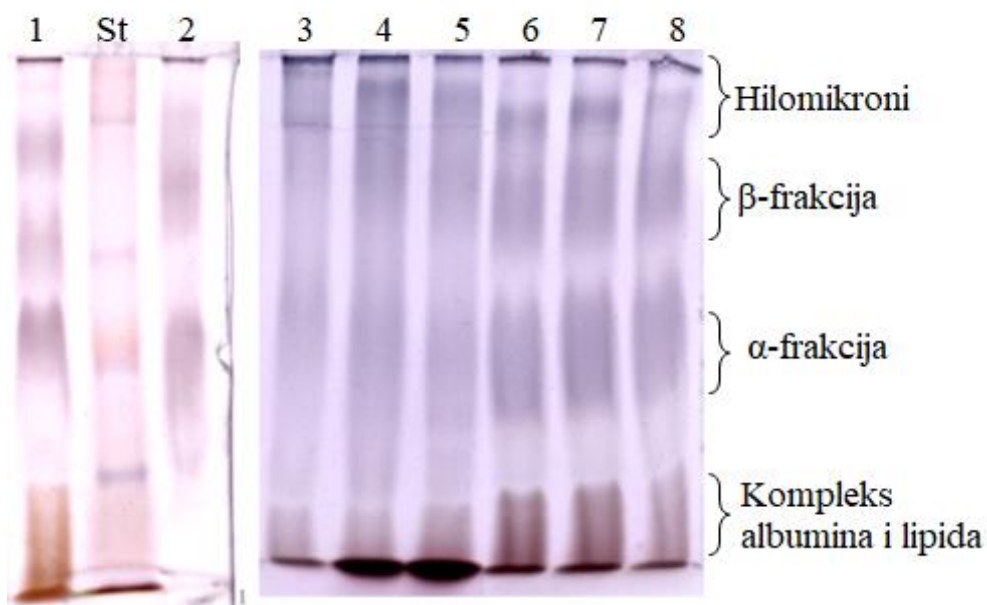
Grupe (mg/kg)	Albumin (%)	α 1- globulini (%)	α 2-globulini (%)	β – globulini (%)	γ - globulini (%)	Odnos A/G*
Kontrola (C)	46,55 \pm 4,36	8,45 \pm 7,44	0,88 \pm 0,13	11,66 \pm 4,92	32,46 \pm 9,72	0,87 \pm 0,15
1,50 CPF	43,83 \pm 4,19	3,17 \pm 1,72	2,08 \pm 1,25	14,05 \pm 3,60	36,87 \pm 4,35	0,78 \pm 0,17
3,00 CPF	40,65 \pm 6,33*	2,86 \pm 2,47	3,65 \pm 4,70	14,03 \pm 6,57	38,81 \pm 11,14	0,68 \pm 0,22
6,00 CPF	40,47 \pm 9,76*	1,41 \pm 0,60	2,32 \pm 1,80	14,04 \pm 0,88	41,77 \pm 3,43*	0,68 \pm 0,20
1,50 CPF+B1	37,39 \pm 2,14 *	28,21 \pm 4,31 *** #####	1,33	14,76 \pm 2,08	18,83 \pm 4,94 **** #####	0,61 \pm 0,28*
3,00 CPF+B1	36,51 \pm 0,37 *	27,22 \pm 3,94 *** #####	2,02 \pm 1,15	16,61 \pm 4,95	19,07 \pm 2,61 *** #####	0,58 \pm 0,15*
6,00 CPF+B1	34,51 \pm 1,06**	28,45 \pm 3,24 *** #####	4,97 \pm 0,48	18,79 \pm 3,63*	20,79 \pm 3,79 ** #####	0,53 \pm 0,21 **
B1	46,69 \pm 4,67	21,28 \pm 5,63 ***	3,32 \pm 6,14	10,13 \pm 4,69	19,59 \pm 3,45 **	0,88 \pm 0,15

*odnos albuminske i globulinske frakcije.

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****); značajna razlika u odnosu na kontrolu; $p < 0,0001$ (#####): značajna razlika između grupe tretirane CPF-om u odnosu na grupu tretiranu CPF+B1 u istoj dozi.

5.6.1. ANALIZE LIPOPROTEINA PLAZME KOD PREPELICA TRETIRANIH HLORPIRIFOSOM I VITAMINOM B1

Na slici 18 i u tabeli 47 prikazani su rezultati analize elektroforetske raspodele lipoproteina plazme. Tretman sa CPF-om kao i kombinovano dejstvo CPF-a i B1 dovode do porasta koncentracije kompleksa albumina sa lipidima. Statistički značajano povećanje koncentracije kompleksa albumina sa lipidima, utvrđeno je kod 1,50 mg/kgCPF (1,98 puta, $p < 0,001$), 3,00 mg/kgCPF (2,63 puta, $p < 0,0001$), 6,00 mg/kgCPF (1,62 puta, $p < 0,05$), 1,50 mg/kgCPF+B1 (1,66 puta, $p < 0,05$), 3,00 mg/kgCPF+B1 (1,62 puta, $p < 0,05$), 6,00 mg/kgCPF+B1 (1,59 puta, $p < 0,05$) u odnosu na C. Tretman samo vitaminom B1 je uzrokovao povećanje ovog kompleksa, od 1,74 puta ($p < 0,001$) u odnosu na C. CPF je doveo do smanjenje koncentracije α - frakcije sa statističkim značajem u dozama 3,00 mg/kg CPF (10,81 puta; $p < 0,01$) i 6,00 mg/kg CPF (2,25 puta; $p < 0,05$). Statistički značajano povećanje koncentracije β -frakcije je dokazano kod doze 1,50 mg/kg CPF; od 1,71 ($p < 0,05$), u odnosu na C, dok je kod doza 1,50 mg/kg CPF+B1 zabeleženo smanjenje, od 2,69 puta ($p < 0,05$), u odnosu na C. Koncentracija hilomikrona nije se statistički značajno menjala u svim ispitivanim grupama.



Slika 18. Nativna PAGE lipoproteina bojenih Sudan-Black-om (1-kontrola sa B1, St- standard proteina, 2-C grupa, 3-1,50 mg/kg CPF, 4-3,00 mg/kg CPF, 5- 6,00 mg/kg CPF, 6- 1,50 mg/kg CPF+B1, 7- 3,00 mg/kg CPF+B1, 8- 6,00 mg/kg CPF+B1).

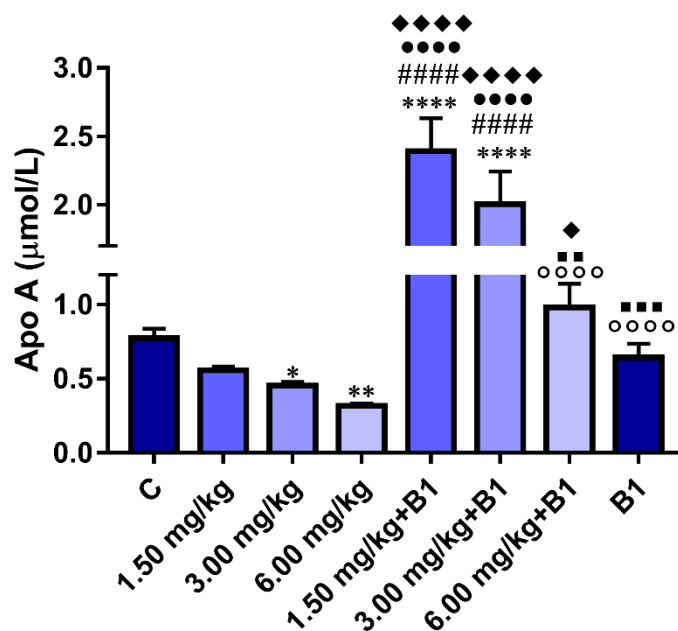
Tabela 47. Elektroforetska raspodela lipoproteina

Grupe (mg/kg)	Kompleks albumina i lipida (%)	α -frakcija (%)	β -frakcija (%)	Hilomikroni (%)
Kontrola (C)	27,33 \pm 12,84	30,50 \pm 6,32	14,93 \pm 1,68	14,69 \pm 6,87
1,50 mg/kg CPF	54,1 \pm 8,85 ***	11,64 \pm 4,58	25,59 \pm 3,21 *	6,98 \pm 3,92
3,00 mg/kg CPF	71,99 \pm 10,6 ****	2,82 \pm 1,90 **	20,3 \pm 3,44	10,95 \pm 5,56
6,00 mg/kg CPF	44,17 \pm 6,16 *	13,53 \pm 5,88 *	16,84 \pm 2,26	15,33 \pm 2,93
1,50 mg/kg CPF+B1	45,52 \pm 2,91 *	20,45 \pm 1,92	5,55 \pm 1,24 * #####	7,99 \pm 2,15
3,00 mg/kg CPF+B1	44,3 \pm 5,05 * ###	21,34 \pm 4,54 ####	7,19 \pm 1,84 ##	5,87 \pm 3,19
6,00 mg/kg CPF+B1	43,6 \pm 4,15 *	29,89 \pm 5,11 ##	18,28 \pm 5,03	8,07 \pm 3,06
B1	47,68 \pm 8,88 ***	26,40 \pm 5,14	18,63 \pm 4,89	7,27 \pm 1,96

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****); značajna razlika u odnosu na kontrolu; $p < 0,01$ (##), $p < 0,0001$ (#####): značajna razlika između grupe tretirane CPF-om u odnosu na grupu tretiranu CPF+B1 u istoj dozi.

5.6.2. ANALIZE KONCENTRACIJE APO A I APO B U PLAZMI PREPELICA TRETIRANIH HLORPIRIFOSOM I VITAMINOM B1

S obzirom da CPF menja koncentraciju α - i β -lipoproteinske frakcije, analizirali smo koncentraciju apolipoproteina A (Apo A) i apolipoproteina B (Apo B) lipoproteina, kao glavnih proteina HDL i LDL čestice. Na grafikonu 37 i u tabeli 48 prikazani su rezultati koncentracije Apo A u plazmi, Primena pesticida je uzrokovala značajano smanjenje koncentracije Apo A za 41,56% (3,00 mg/kg CPF; $p < 0,05$) i 58,44% (6,00 mg/kg CPF; $p < 0,01$), u odnosu na C, dok je primena B1 nakon tretmana CPF-om, dovela da povećanja koncentracije Apo A. Značajno povećanje u odnosu na C je dokazano kod 1,50 mg/kg CPF+B1 (3,1 puta; $p < 0,0001$) i kod 3,00 mg/kg CPF+B1 (2,61 puta; $p < 0,0001$). Statistički značajno povećanje koncentracije Apo A je dokazano i između 1,50 mg/kg CPF i 1,50 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,0001$); 3,00 mg/kg CPF i 3,00 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,0001$); 6,00 mg/kg CPF i 6,00 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,05$),



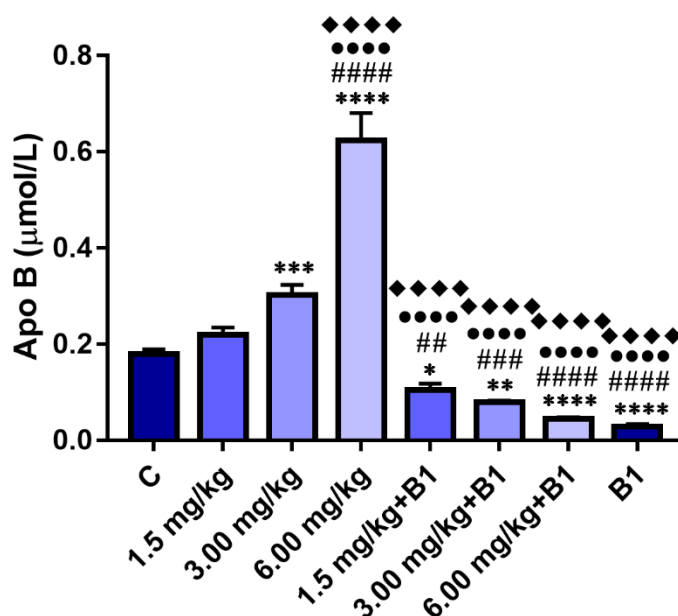
Grafikon 37, Koncentracija apolipoproteina A (Apo A) u plazmi japanskih prepelica tretiranih tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM, $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,0001$ (****): značajna razlika u odnosu na kontrolu; $p < 0,0001$ (#####): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF; $p < 0,0001$ (♦♦♦♦): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF; $p < 0,05$ (♦), $p < 0,0001$ (♦♦♦♦): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF; $p < 0,0001$ (○○○○): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF+B1; $p < 0,01$ (■), ; $p < 0,001$ (■■■): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF+B1.

Tabela 48, Deskriptivni statistički parametri aktivnosti Apo A u plazmi kod japanskih prepelica tretiranih tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1).

Naziv grupe	\bar{X}	SD	SE	CV(%)	Min	Max	Mediana
Kontrola (C)	0,77	0,17	0,06	22,41	0,61	1,06	0,67
1,50 mg/kg CPF	0,56	0,045	0,02	8,10	0,51	0,60	0,56
3,00 mg/kg CPF	0,45	0,04	0,02	9,95	0,41	0,50	0,45
6,00 mg/kg CPF	0,32	0,03	0,01	9,65	0,29	0,35	0,31
1,50 mg/kg CPF +B1	2,39	0,54	0,24	22,47	1,76	3,25	2,34
3,00 mg/kg CPF +B1	2,01	0,53	0,24	26,52	1,22	2,72	2,01
6,00mg/kg CPF +B1	0,98	0,36	0,16	28,56	0,66	1,56	0,92
B1	0,64	0,16	0,09	24,98	0,46	0,76	0,71

Uticaj dejstva CPF-a i vitamina B1 na koncentraciju apolipoproteina B (Apo B) u plazmi je prikazan na grafikonu 38 i u tabeli 49. Tretman CPF-om je doveo do značajnog povećanja koncentracije Apo B pri dozama od 3,00 mg/kg CPF ($p < 0,001$) i 6,00 mg/kg CPF ($p < 0,0001$) za 1,67 i 3,44 puta, u odnosu na C. Pozitivno dejstvo vitamina B1 je dokazano značajnim smanjenjem koncentracije Apo B za 38,89% (1,50 mg/kgCPF+B1;

p< 0,05); 55,55% (3,00 mg/kg CPF+B1; p< 0,01); 77,78% (6,00 mg/kg CPF, p< 0,0001) u odnosu na C. Grupa koja je primila samo vitamin B1 je pokazala značajno nižu (83,30%, p< 0,0001) koncentraciju ovog apolipoproteina u odnosu na C. Statistička značajnost od p< 0,0001 je dokazana između sve tri doze tretirane sa CPF-om i vitaminom B1.

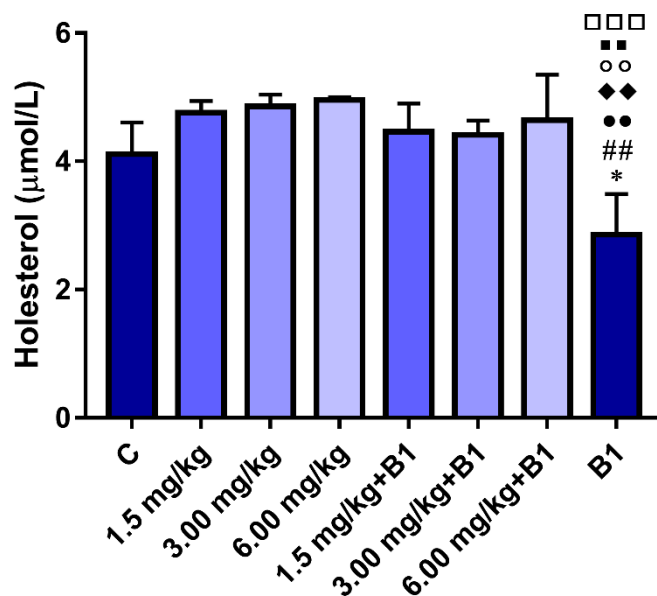


Grafikon 38. Koncentracija apolipoproteina B (Apo B) u plazmi japanskih prepelica tretiranih tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM, p< 0,05 (*), p< 0,01 (**), p< 0,001 (***), p< 0,0001 (****): značajna razlika u odnosu na kontrolu; p< 0,01 (##), p< 0,001 (###), ; p< 0,0001 (####): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF; p< 0,0001 (◆◆◆): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF; p< 0,0001 (◆◆◆◆): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF.

Tabela 49. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti Apo B u plazmi japanskih prepelica tretiranih tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1).

Naziv grupe	\bar{X}	SD	SE	CV(%)	Min	Max	Mediana
Kontrola (C)	0,18	0,02	0,01	11,11	0,15	0,19	0,19
1,50 mg/kg CPF	0,22	0,02	0,01	12,03	0,20	0,25	0,21
3,00 mg/kg CPF	0,30	0,03	0,02	11,58	0,27	0,34	0,30
6,00 mg/kg CPF	0,62	0,10	0,06	16,07	0,51	0,70	0,66
1,50 mg/kg CPF +B1	0,11	0,02	0,01	25,20	0,08	0,14	0,10
3,00 mg/kg CPF +B1	0,08	0,007	0,003	8,84	0,07	0,09	0,08
6,00 mg/kg CPF +B1	0,04	0,008	0,003	18,59	0,04	0,06	0,04
B1	0,03	0,008	0,004	27,22	0,02	0,04	0,03

Da bi utvrdili da li CPF utiče na lipidni status, analizirali smo koncentraciju ukupnog holesterola. Rezultati ove analize su prikazani na grafikonu 39 i u tabeli 50. Postoji trend rasta koncentracije holesterola usled dejstva CPF-a i smanjenja usled dejstva vitamina B1, bez statističke značajnosti. U grupi tretiranoj samo vitaminom B1, dokazan je značajan ($p < 0,05$) pad koncentracije holesterola od 30,41%, u odnosu na C.



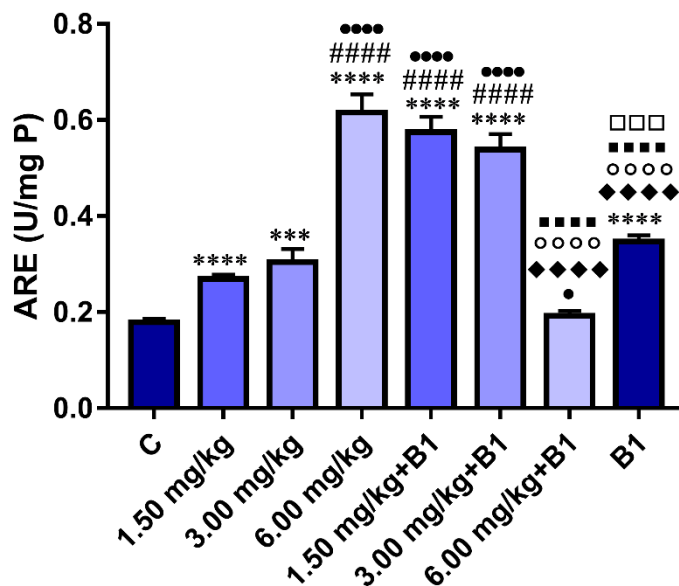
Grafikon 39. Koncentracija holesterola u plazmi japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM, $p < 0,05$ (*): značajna razlika u odnosu na kontrolu; $p < 0,01$ (##): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF; $p < 0,01$ (**): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF; $p < 0,01$ (◆◆): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF; $p < 0,01$ (○○): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF+B1; $p < 0,01$ (■): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF+B1; $p < 0,001$ (□□□): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF+B1,

Tabela 50. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti ukupnog holesterola u plazmi japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1).

Naziv grupe	\bar{X}	SD	SE	CV(%)	Min	Max	Mediana
Kontrola (C)	4,11	0,99	0,49	24,12	3,41	5,57	3,73
1,50 mg/kg CPF	4,76	0,07	0,04	1,59	4,67	4,81	4,79
3,00 mg/kg CPF	4,85	0,08	0,04	1,56	4,77	4,91	4,89
6,00 mg/kg CPF	4,96	0,07	0,04	1,53	4,87	5,01	4,99
1,50 mg/kg CPF +B1	4,46	0,42	0,17	9,44	3,78	4,9	4,55
3,00 mg/kg CPF +B1	4,41	0,22	0,08	4,96	4,05	4,69	4,41
6,00 mg/kg CPF +B1	4,64	0,84	0,29	18,16	3,62	5,92	4,56
B1	2,86	0,40	0,20	14,00	2,41	3,29	2,86

5.7. AKTIVNOST ARILESTERAZA

Porast aktivnosti enzima arilesteraze (ARE) u plazmi usled tretmana CPF-om i vitaminom B1 je prikazana na grafikonu 40 i u tabeli 51.



Grafikon 40. Aktivnost enzima arilesteraze (ARE) u plazmi japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****): značajna razlika u odnosu na kontrolu; $p < 0,0001$ (####): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF; $p < 0,05$ (*), $p < 0,0001$ (****): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF; $p < 0,0001$ (◆◆◆◆): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF; $p < 0,0001$ (○○○○): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF+B1; $p < 0,0001$ (■■■■): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF+B1; $p < 0,001$ (□□□□): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF+B1.

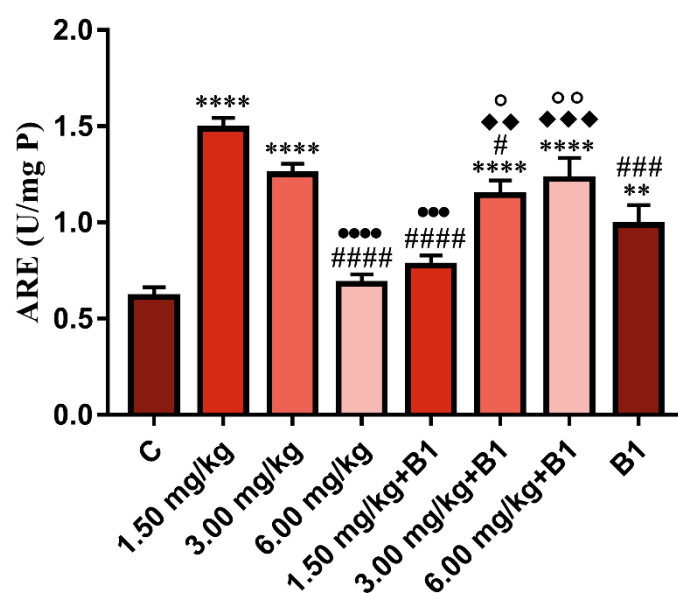
Tabela 51. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti ARE u plazmi japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1).

Naziv grupe	\bar{X}	SD	SE	CV(%)	Min	Max	Mediana
Kontrola (C)	0,18	0,02	0,007	12,12	0,15	0,20	0,19
1,50 mg/kg CPF	0,27	0,03	0,009	10,75	0,21	0,32	0,27
3,00 mg/kg CPF	0,30	0,07	0,027	23,54	0,23	0,41	0,28
6,00 mg/kg CPF	0,62	0,08	0,037	13,61	0,54	0,71	0,59
1,50 mg/kg CPF +B1	0,57	0,09	0,032	15,75	0,50	0,78	0,55
3,00 mg/kg CPF +B1	0,54	0,08	0,032	16,06	0,44	0,65	0,55
6,00mg/kg CPF +B1	0,19	0,03	0,010	16,81	0,12	0,23	0,20
B1	0,35	0,03	0,013	10,08	0,29	0,39	0,36

Kod jedinki koje su dobile pesticid porast aktivnosti ARE je zabeležen kod 1,50 mg/kg CPF za 50,40% ($p < 0,0001$), 3,00 mg/kg CPF za 70,19% ($p < 0,001$) i kod 6,00 mg/kg CPF za 3,44 puta ($p < 0,0001$) u odnosu na C. Kada je nakon CPF-a aplikovan B1 značajno povećanje ($p < 0,0001$) u odnosu na C je dokazano kod 1,50 mg/kg CPF+B1 (3,22 puta) i 3,00 mg/kg CPF+B1 (3,01 puta). Interesantno je da je sam vitamin B1 povećao 1,94 puta aktivnost ARE u odnosu na C, ali je primenjen nakon 6,00 mg/kg CPF vratio vrednosti na fiziološki nivo izmeren u C grupi. Statistički značajne razlike ($p < 0,0001$) su utvrđene između sledećih grupa: 1,50 mg/kg CPF i 1,50 mg/kg CPF+B1; 3,00 mg/kg CPF i 3,00 mg/kg CPF+B1; 6,00 mg/kg CPF i 6,00 mg/kg CPF+B1.

CPF je doveo do značajnog porasta ($p < 0,0001$) aktivnosti ARE u jetri (grafikon 41 i tabela 52) u odnosu na C grupu i to za 2,43 puta (1,50 mg/kg CPF), 2,04 puta (3,00 mg/kg CPF). Kod grupa koje su posle pesticida primile vitamin B1 bio je primetan značajan porast ($p < 0,0001$) aktivnosti ARE u odnosu na C za 1,86 puta (3,00 mg/kg CPF+B1), i 1,99 puta (6,00 mg/kg CPF+B1). Između kontrolnih grupa C i B1 je primećena statistički značajno r ($p < 0,01$) povećanje od 1,79 puta. Značajna razlika se može uočiti između grupa 1,50 mg/kg CPF i 1,50 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,0001$); 6,00 mg/kg CPF i 6,00 mg/kg CPF i B1 ($p < 0,001$).

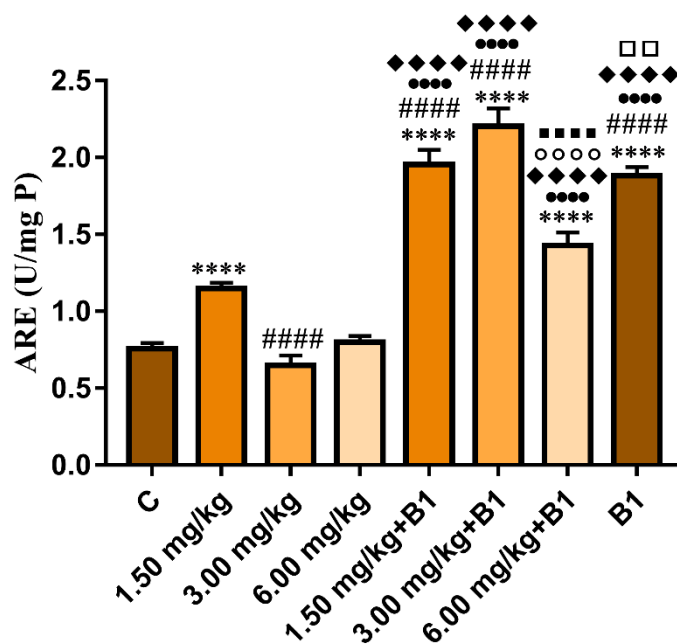
U tkivu mozga je zabeleženo značajno povećanje ($p < 0,0001$) aktivnosti enzima ARE (grafikon 42 i tabela 53) za 51,63% u odnosu na C grupu (1,50 mg/kg CPF),. Vitamin B1 povećava aktivnost ARE ($p < 0,0001$) u poređenju sa C i to 2,48 puta primenjen sam ili, 2,58 puta (1,50 mg/kg CPF+B1); 2,91 puta (3,00 mg/kg CPF+B); 1,89 puta (6,00 mg/kg CPF+B1), aplikovan nakon CPF. Statistički značajna je utvrđena kod sledećih grupa: 1,50 mg/kg CPF i 1,50 mg/kg CPF+B1; 3,00 mg/kg CPF i 3,00 mg/kg CPF i B1; 6,00 mg/kg CPF i 6,00 mg/kg CPF+ B1.



Grafikon 41. Aktivnost enzima arilesteraze (ARE) u jetri japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****): značajna razlika u odnosu na kontrolu; $p < 0,05$ (#), $p < 0,001$ (###), $p < 0,0001$ (####): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF; $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF; ; $p < 0,01$ (♦♦), $p < 0,001$ (♦♦♦): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF; $p < 0,05$ (○), $p < 0,01$ (○○): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF+B1.

Tabela 52. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti ARE u jetri japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1).

Naziv grupe	\bar{X}	SD	SE	CV(%)	Min	Max	Mediana
Kontrola (C)	0,61	0,13	0,05	21,91	0,35	0,78	0,62
1,50 mg/kg CPF	1,49	0,16	0,05	10,90	1,30	1,72	1,49
3,00 mg/kg CPF	1,25	0,16	0,05	13,09	0,95	1,47	1,27
6,00 mg/kg CPF	0,68	0,13	0,05	19,29	0,50	0,87	0,64
1,50 mg/kg CPF +B1	0,77	0,14	0,05	18,38	0,57	0,95	0,78
3,00 mg/kg CPF +B1	1,14	0,20	0,07	17,63	0,85	1,45	1,09
6,00mg/kg CPF +B1	1,22	0,31	0,11	25,61	0,69	1,54	1,22
B1	0,99	0,29	0,10	29,76	0,49	1,31	1,01



Grafikon 42. Aktivnost enzima arilesteraze (ARE) u mozgu japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,0001$ (****): značajna razlika u odnosu na kontrolu; $p < 0,0001$ (#####): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF; $p < 0,0001$ (****): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF; $p < 0,0001$ (◆◆◆◆): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF; $p < 0,0001$ (○○○○): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF+B1; $p < 0,0001$ (■■■■): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF+B1; $p < 0,01$ (□□): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF+B1.

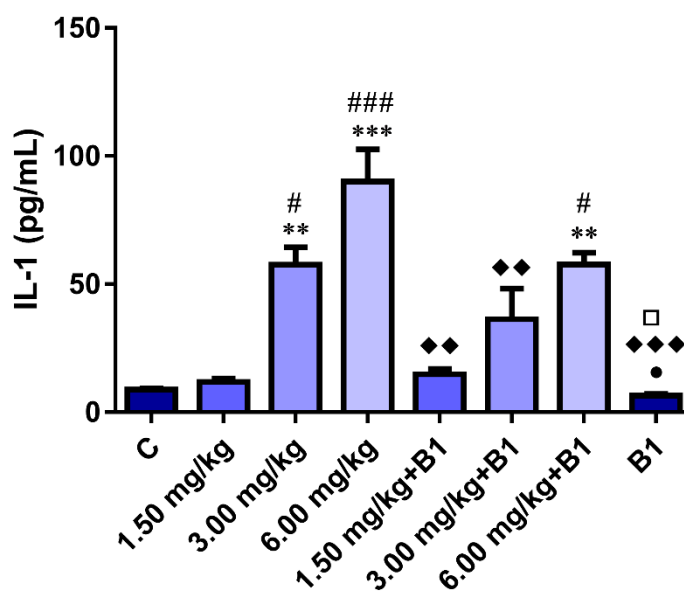
Tabela 53. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti ARE u mozgu japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1).

Naziv grupe	\bar{X}	SD	SE	CV(%)	Min	Max	Mediana
Kontrola (C)	0,76	0,10	0,03	13,78	0,57	0,91	0,74
1,50 mg/kg CPF	1,15	0,09	0,04	8,69	0,96	1,23	1,19
3,00 mg/kg CPF	0,65	0,19	0,06	29,47	0,38	0,88	0,66
6,00 mg/kg CPF	0,79	0,09	0,04	11,93	0,67	0,91	0,83
1,50 mg/kg CPF +B1	1,95	0,23	0,09	11,94	1,54	2,18	2,00
3,00 mg/kg CPF +B1	2,20	0,30	0,11	13,84	1,77	2,54	2,28
6,00mg/kg CPF +B1	1,43	0,26	0,08	18,51	0,91	1,81	1,43
B1	1,88	0,13	0,05	6,86	1,77	2,09	1,85

5.8. ISPITIVANJA UTICAJA VITAMINA B1 NA SINTEZU CITOKINA

5.8.1. ISPITIVANJA KONCENTRACIJE INTERLEUKINA-1 I INTERLEUKINA-6 U PLAZMI

S obzirom da citokini igraju centralnu ulogu u pokretanju i održavanju inflamatornog stanja, ispitivali smo uticaj vitamina B1 na sintezu proinflamatornih citokina interleukina 1 (IL-1) i interleukina 6 (IL-6). CPF je očekivano izazvao povećanu produkciju IL-1 u plazmi (grafikon 43 i tabela 55) u odnosu na C sa statističkom značajnošću pri dozama od 3,00 mg/kg CPF (6,52 puta; $p < 0,01$) i 6,00 mg/kg CPF (10,19 puta; $p < 0,001$). Kod grupa koje su posle CPF-a tretirane vitaminom B1 došlo je takođe do porasta IL-1 ali vidno manjeg u odnosu na grupe sa CPF-om. Tome u prilog ide i podatak da je statistički značajno povećanje u odnosu na C, dokazana samo pri dozi od 6,00 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,01$) i to za 6,53 puta.

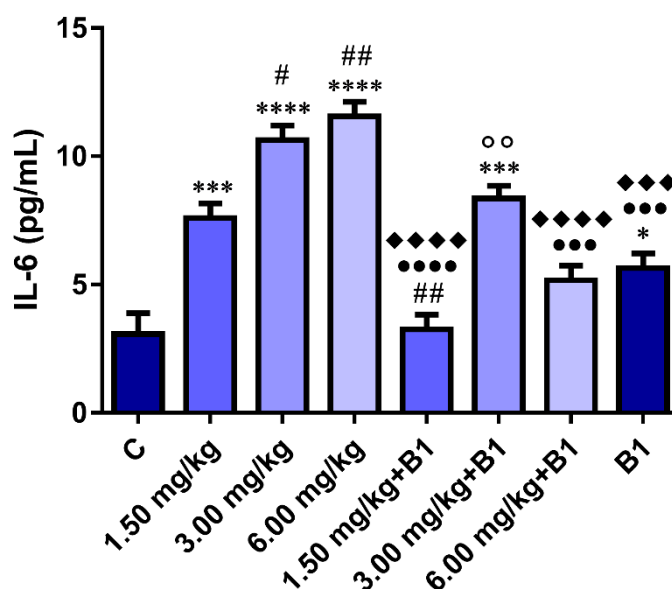


Grafikon 43. Koncentracija interleukina 1 (IL-1) u plazmi japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***): značajna razlika u odnosu na kontrolu; $p < 0,05$ (#), $p < 0,001$ (###): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF; $p < 0,05$ (♦): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF; $p < 0,01$ (♦♦), $p < 0,001$ (♦♦♦): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF; $p < 0,05$ (□): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF+B1.

Tabela 54. Deskriptivni statistički parametri koncentracija IL-1 u plazmi japanskih prepelica tretiranih tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1).

Naziv grupe	\bar{X}	SD	SE	CV(%)	Min	Max	Mediana
Kontrola (C)	8,84	0,77	0,44	8,74	8,00	9,52	9,00
1,50 mg/kg CPF	11,81	2,00	1,41	16,95	10,39	13,22	11,81
3,00 mg/kg CPF	57,62	9,59	6,78	16,65	50,83	64,40	57,62
6,00 mg/kg CPF	90,06	17,83	12,61	19,80	77,45	102,70	90,06
1,50 mg/kg CPF +B1	14,83	3,05	2,15	20,56	12,67	16,98	14,83
3,00 mg/kg CPF +B1	36,33	20,65	11,92	29,85	15,50	56,80	36,69
6,00 mg/kg CPF +B1	57,71	6,49	4,59	11,26	53,11	62,30	57,71
B1	6,47	1,07	0,75	16,49	5,72	7,23	6,47

Na grafikonu 44 i tabeli 55 može se uočiti porast koncentracije IL-6 u plazmi dejstvom CPF-a, kao i CPF-a u kombinaciji sa vitaminom B1. Statistički značajno povećanje koncentracije zabeleženo je pri dozama od 1,50 mg/kg CPF (2,49 puta; $p < 0,001$); 3,00 mg/kg CPF (3,45 puta; $p < 0,0001$); 6,00 mg/kg CPF (3,71 puta; $p < 0,0001$); 3,00 mg/kg CPF+B1 (2,69 puta; $p < 0,001$) u odnosu na C.



Grafikon 44. Koncentracija interleukina 6 (IL-6) u plazmi japanskih prepelica tretiranih tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,05$ (*), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****): značajna razlika u odnosu na kontrolu; $p < 0,05$ (#), $p < 0,01$ (##): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF; $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF; $p < 0,001$ (###), $p < 0,0001$ (####): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF; $p < 0,01$ (○○): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF+B1.

Tabela 55. Deskriptivni statistički parametri koncentracija IL-6 u plazmi japanskih prepelica tretiranih tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1).

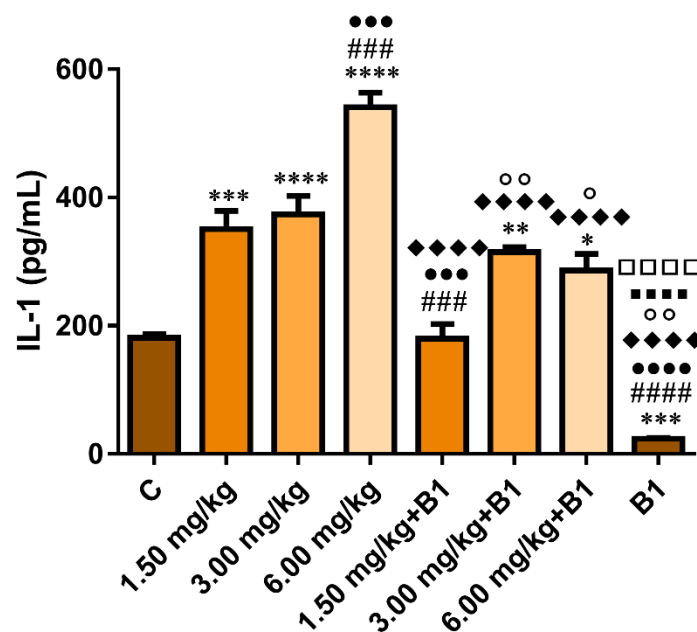
Naziv grupe	\bar{X}	SD	SE	CV(%)	Min	Max	Mediana
Kontrola (C)	3,07	1,42	0,82	29,42	1,46	4,17	3,58
1,50 mg/kg CPF	7,67	1,22	0,70	15,95	6,51	8,95	7,56
3,00 mg/kg CPF	10,60	1,22	0,70	11,52	9,36	11,80	10,63
6,00 mg/kg CPF	11,39	0,75	0,43	6,56	10,58	12,05	11,55
1,50 mg/kg CPF +B1	3,40	0,98	0,57	26,89	2,33	4,26	3,62
3,00 mg/kg CPF +B1	8,27	0,83	0,59	10,09	7,68	8,86	8,27
6,00 mg/kg CPF +B1	5,46	0,73	0,42	13,38	4,71	6,17	5,51
B1	5,65	1,21	0,70	21,50	4,44	6,87	5,64

Tretman samo vitaminom B1 je doveo do blagog povećanja od 1,84 puta ($p < 0,05$) u odnosu na C. Značajna razlika u smanjenju IL-6 se može uočiti između grupa 1,50 mg/kg CPF i 1,50 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,01$); 6,00 mg/kg CPF i 6,00 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,0001$).

5.8.2. ISPITIVANJA KONCENTRACIJE INTERLEUKINA-1 I

INTERLEUKINA 6 U MOZGU

Primena CPF-a samog ili u kombinaciji sa B1, dovela je do povećanja produkcije IL-1 u mozgu (grafikon 45 i tabela 56). Statistički značajne razlike odnosu na C je bilo kod sledećih grupa: 1,50 mg/kg CPF (1,93 puta; $p < 0,001$); 3,00 mg/kg CPF (2,06 puta; $p < 0,0001$); 6,00 mg/kg CPF (2,98 puta; $p < 0,0001$); 3,00 mg/kg CPF+B1 (1,73 puta; $p < 0,01$); 6,00 mg/kg CPF+B1 (1,57 puta; $p < 0,001$). Kod grupe koja je tretirana samo vitaminom B1 uočeno je značajno ($p < 0,001$) smanjenje IL-1 (7,72 puta) u odnosu na C, ali je statistički značajna razlika utvrđena i u odnosu na grupe koje su bile tretirane CPF-om kao i CPF-om i B1 ($p < 0,0001$).



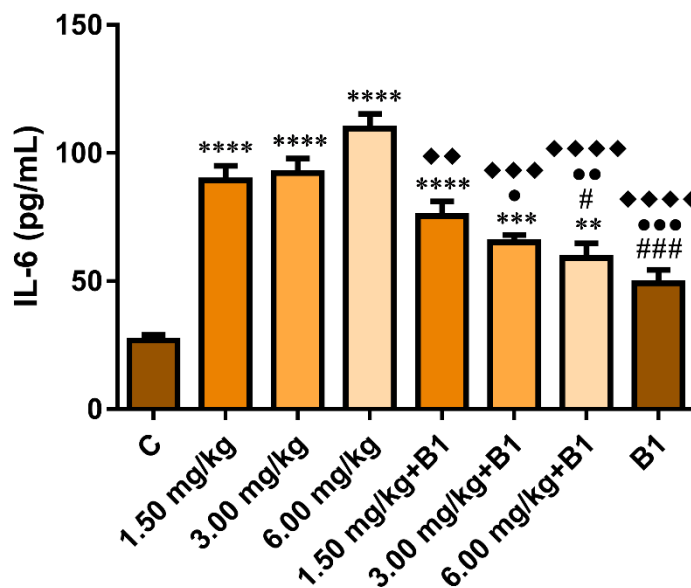
Grafikon 45. Koncentracija interleukina 1 (IL-1) u mozgu japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****): značajna razlika u odnosu na kontrolu; $p < 0,001$ (###), $p < 0,0001$ (####): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF; $p < 0,001$ (●●●), $p < 0,0001$ (●●●●): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF; $p < 0,0001$ (◆◆◆): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF; $p < 0,05$ (○), $p < 0,01$ (○○): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF+B1; $p < 0,0001$ (■ ■ ■ ■): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF+B1; $p < 0,0001$ (□ □ □ □): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF+B1.

Tabela 56. Deskriptivni statistički parametri koncentracija IL-1 u mozgu japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1).

Naziv grupe	\bar{X}	SD	SE	CV(%)	Min	Max	Mediana
Kontrola (C)	181,40	10,09	5,83	5,56	171,30	191,40	181,60
1,50 mg/kg CPF	350,40	50,08	28,91	14,29	300,20	400,30	350,60
3,00 mg/kg CPF	373,70	49,94	28,83	13,37	323,70	423,60	373,80
6,00 mg/kg CPF	540,40	40,05	23,12	7,41	500,30	580,40	540,50
1,50 mg/kg CPF +B1	179,50	39,91	23,04	22,24	139,60	219,50	179,40
3,00 mg/kg CPF +B1	314,60	14,04	8,10	4,46	300,50	328,60	314,70
6,00mg/kg CPF +B1	286,00	45,14	26,06	15,78	239,30	329,30	289,50
B1	23,50	2,83	1,63	12,03	20,27	25,52	24,72

Rezultati koncentracije IL-6 u mozgu prepelica usled dejstva CPF-a i vitamina B1 prikazani su na grafikonu 46 i u tabeli 57. U odnosu na C, sinteza IL-6 je statistički značajno ($p < 0,0001$) povećana kod sve tri doze CPF i to 3,37 puta za grupu 1,50 mg/kg CPF; 3,48 puta za 3,00 mg/kg CPF i 4,14 puta za 6,00 mg/kg CPF. Primena B1 smanjuje

CPF-om povećan nivo IL-6, tako da je kod doze 1,50 mg/kg CPF+B1 utvrđen porast za 2,85 puta ($p < 0,0001$); 2,46 puta kod 3,00 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,001$), i 2,23 puta kod 6,00 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,01$) u odnosu na C. Statistički značajne razlike su dokazane između sledećih grupa: 3,00 mg/kg CPF i 3,00 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,05$); 6,00 mg/kg CPF i 6,00 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,0001$). Koncentracija IL-6 kod grupe samo sa vitaminom B1 nije se statistički značajno razlikovala u odnosu na C.



Grafikon 46. Koncentracija interleukina 6 (IL-6) u mozgu japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****): značajna razlika u odnosu na kontrolu; $p < 0,05$ (#): značajna razlika u odnosu na grupu 1,50 mg/kg CPF; $p < 0,05$ (•), $p < 0,01$ (••), $p < 0,001$ (•••): značajna razlika u odnosu na grupu 3,00 mg/kg CPF; $p < 0,01$ (◆◆), $p < 0,001$ (◆◆◆), $p < 0,0001$ (◆◆◆◆): značajna razlika u odnosu na grupu 6,00 mg/kg CPF.

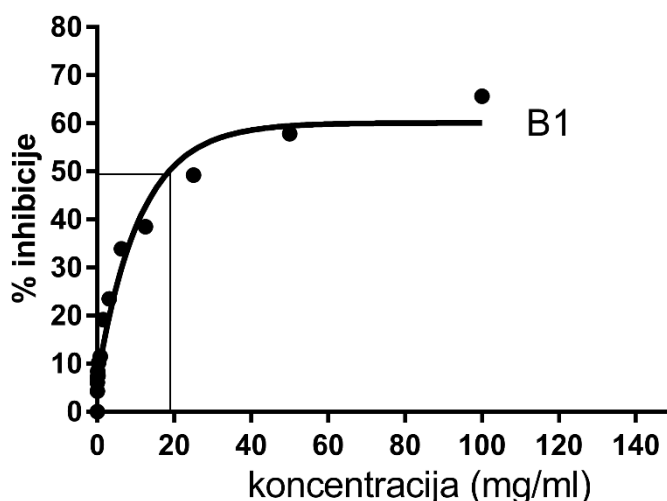
Tabela 57. Deskriptivni statistički parametri koncentracija IL-6 u mozgu japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1).

Naziv grupe	\bar{X}	SD	SE	CV(%)	Min	Max	Mediana
Kontrola (C)	26,47	4,12	2,38	15,56	22,56	30,77	26,07
1,50 mg/kg CPF	89,33	10,11	5,84	11,32	79,22	99,44	89,34
3,00 mg/kg CPF	92,31	10,17	5,87	11,01	82,22	102,60	92,15
6,00 mg/kg CPF	109,70	9,87	5,70	9,00	99,88	119,60	109,60
1,50 mg/kg CPF +B1	75,54	9,94	5,74	13,16	65,64	85,52	75,46
3,00 mg/kg CPF +B1	65,08	5,02	2,90	7,72	60,03	70,08	65,13
6,00mg/kg CPF +B1	59,10	10,06	5,81	17,02	49,09	69,21	59,01
B1	49,53	8,90	5,14	17,97	40,81	58,60	49,18

5.9. ISPITIVANJA ANTIOKSIDATIVNOG KAPACITETA VITAMINA B1

5.9.1. SPOSOBNOST HVATANJA DPPH RADIKALA

Sposobnost hvatanja DPPH radikala raste sa porastom koncentracije vitamina B1 od 0,06-30,00 mg/ml i dostiže svoj maksimum od 58,8%. Sa porastom koncentracije vitamina B1 višim od 30,00 mg/ml nije došlo do smanjenja nastanka redukovanog, neutralnog DPPH-H oblika. Rezultati ove analize su prikazani na Slici 13. Procenat inhibicije je proporcionalan antioksidativnoj aktivnosti vitamina B1. Procenat inhibicije od 50% je dobijen sa koncentracijom vitamina B1 od 18 mg/ml. Dobijene vrednosti za efikasnu koncentraciju (50% inhibicije) ukazuju na dobru antioksidativnu sposobnost ovog vitamina.

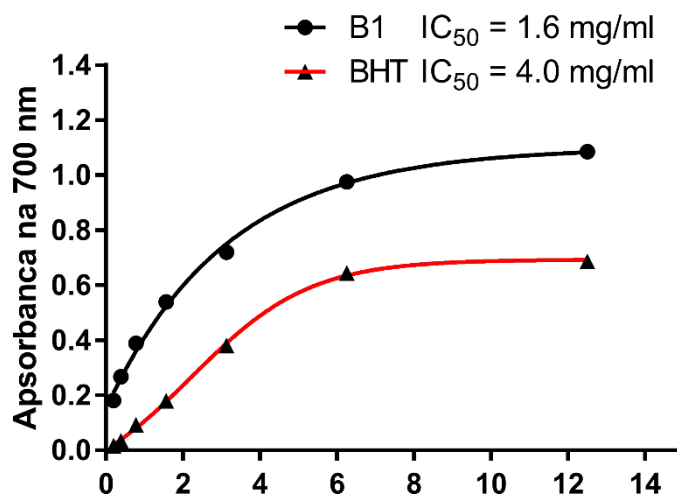


Slika 19. Sposobnost hvatanja DPPH radikala vodenog rastvora vitamina B1. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM (n=3).

5.9.2. REDUKCIONA SPOSOBNOST

Vitamin B1 je pokazao visok potencijal donora elektrona neophodnih za redukciju Fe^{3+} /fericijanidnog kompleksa u fero (Fe^{2+}) oblik. Sa povećanjem koncentracije vitamina B1 od 0,06 do 8,00 mg/ml konstantno je ispoljena sposobnost redukcije, sa povećanjem

apsorbance na 700 nm od 0,2-0,9. Moć redukcije vitamina B1 iznosila je $1,6 \text{ mg/ml} \pm 0,2$ i znatno je veća u odnosu na redukcionu sposobnost BHT-a koja je $4,0 \text{ mg/ml} \pm 0,4$.

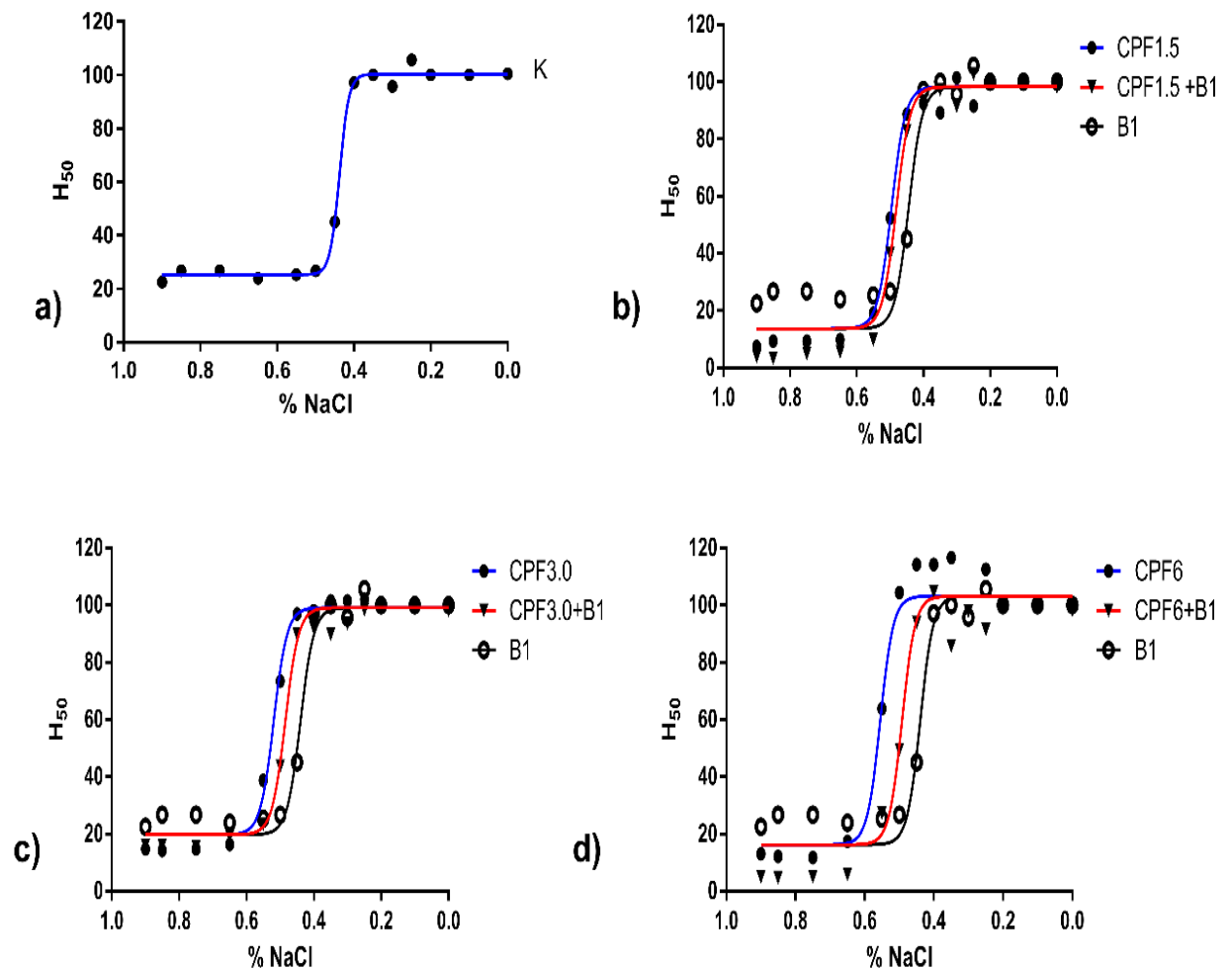


Slika 20. Sposobnost redukcije vitamina B1 i butilovanog-hidroksi-toluena (BHT). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM (n=3).

5.10. OSMOTSKA FRAGILNOST ERITROCITA

Rezultati analize osmotske fragilnosti eritrocita japanskih prepelica tretiranih različitim dozama CPF-a, kao i CPF-om i vitaminom B1 prikazani su na Slici 15. Stepem hemolize (H_{50}) eritrocita kontrolne grupe iznosio je $0,3914 \pm 0,022$ (Slici 15.a). Kod grupe koja je tretirana CPF-om u dozi od $1,50 \text{ mg/kg}$ H_{50} iznosio je $0,4506 \pm 0,018$, dok je tretman CPF-om i vitaminom B1 u istoj dozi izazvao smanjenje H_{50} i iznosio je $0,4383 \pm 0,013$ (Slici 15.b). Smanjenje H_{50} sa vitaminom B1 iznosilo je 2,73%. Kod grupe koja je tretirana CPF-om u dozi od $3,00 \text{ mg/kg}$ H_{50} iznosio je $0,4728 \pm 0,011$, dok je tretman CPF-om i vitaminom B1 (Slici 15.c) u istoj dozi izazvao smanjenje H_{50} ($0,4383 \pm 0,017$). Ovo smanjenje H_{50} u prisustvu B1 je iznosilo 7,30%. Kod grupe koja je tretirana najvećom dozom CPF-a (Slici 15.d) od $6,00 \text{ mg/kg}$ H_{50} iznosio je $0,5013 \pm 0,031$ dok je tretman CPF-om i vitaminom B1 u istoj dozi izazvao smanjenje H_{50} ($0,4554 \pm 0,027$). Vitamin B1 je doveo do smanjenja H_{50} za 9,16% u odnosu na grupu koja je tretirana samo CPF-om u ovoj dozi. H_{50} u grupi tretiranoj samo vitaminom B1 je najniži

u odnosu na sve ispitivane grupe i iznosio je $0,3879 \pm 0,024$. Eritrocitna membrana u ovoj grupi pokazala je najveću osmotsku stabilnost izazvanu različitim koncentracijama NaCl.



Slika 21. Osmotska fragilnost eritrocita japanskih prepelica tretiranih CPF, CPF i nakon 30 min vitaminom B1 (10 mg/kg), kao i kontrolnih grupa (C i B1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM (n=3). a- kontrolna grupa, b-1,50 CPF i 1,50 CPF+B1, B1,c- 1,50 CPF i 1,50 CPF+B1, d- 1,50 CPF i 1,50 CPF+B1.



VI

DISKUSIJA

Primena pesticida u zaštiti poljoprivrednih kultura od brojnih štetočina, kao i u komunalnoj higijeni u kontroli vektorski prenosivih bolesti, veoma mnogo je porasla. Pored brojnih upozorenja i dalje je prisutna velika i neracionalna potrošnja pesticida. Veoma često ova jedinjenja, a naročito ona organofosfatne strukture, dovode do trovanja životinja, a ne retko i njihovog uginuća. U Indiji 2016. godine, organofosfatima je otrovano nekoliko stotina ptica. Prema podacima USEPA-e u Australiji je 2014. godine uginulo oko 700 ptica, dok je u poslednjoj deceniji prošlog veka usled neracionalne upotrebe pesticida u Argentini stradalo oko 35 000 sokolova. Kod nas je najveći problem u Vojvodini. Prema podacima ornitologa iz Pokrajinskog zavoda za zaštitu prirode od 2009. do 2016. godine otrovano je 60 orlova belorepana, koji spadaju u zaštićenu vrstu. Sve ovo ukazuju koliko su ova jedinjenja toksična, naročito ukoliko se njima nepravilno rukuje, odnosno kada se primenjuju u većim koncentracijama, od onih koje su preporučene. Usled toga javlja se potreba za njihovim daljim ispitivanjem i pronalaženjem supstanci, koje bi umanjile njihov toksični efekat.

6.1. UTICAJ CPF-A I VITAMINA B1 NA PROMENE OKSIDO- REDUKCIONIH PARAMETARA

U fiziološkim uslovima antioksidativni sistem ćelije, koga čini grupa enzima i neenzimskih komponenti, efikasno snižava nivo reaktivnih vrsta kiseonika na fiziološki nivo, koji ne ugrožava funkciju i opstanak ćelije.

SOD je esencijalni antioksidativni enzim koji štiti ćelije od oštećenja i pomaže u antiinflamatornoj odbrani, sprečavajući stvaranje ONOO⁻ i ·OH. Dokazano je da je aktivnost SOD1 u eritrocitima povećana sa prve dve doze CPF-a, dok je u dozi od 6 mg/kg CPF zabeležen pad u aktivnosti enzima. Vitamin B1 je doveo do smanjenja aktivnosti ovog enzima u sve tri doze, vraćajući ih na kontrolni nivo. U jetri, primena CPF-a kao i naknadna aplikacija vitamina B1, nije dovela do statistički značajnih promena ukupne aktivnosti SOD-a. Dokazali smo da CPF inhibira SOD1 dok B1 vraća aktivnost enzima na kontrolni nivo. Aktivnost enzima SOD2 je povećana nakon tretmana CPF-om, a dodatno povećanje je uzrokovano tretmanom vitaminom B1. Primetan je značajni pad aktivnosti SOD2 nakon tretmana sa najvišom dozom CPF-a od 6 mg/kg. U mozgu, ukupna aktivnost SOD i SOD1 je značajno povećana kod prepelica koje su tretirane CPF-om, ali i kod prepelica koje su nakon CPF-a dobile vitamin B1. Naši rezultati su u saglasnosti sa rezultatima koje su dobili Tuzmen i saradnici (2007), Lukaszewicz-Hussain (2011), Singh i Panwar (2014) Abolaji i saradnici (2017) u tkivu mozga pacova usled dejstva CPF-a. Takođe u ogledu Alvarez i saradnici (2008) zabeleženo je povećanje aktivnosti SOD u jetri, bubrezima i plazmi kod pacova. Ovakav nalaz su potvrdili i Kopjar i saradnici (2018), povećanjem aktivnosti SOD u eritrocitima i plazmi pacova. Postoje istraživanja sa CPF-om na jetri i mozgu pacovima gde je došlo do pada aktivnosti SOD-a (Verma i Srivastava, 2003; Uchendu i sar., 2015; Saoudi i sar., 2017). Pretpostavlja se da je ova inhibicija enzima posledica oštećenja koje izazivaju ROS nastali usled dejstva pesticida. Iako je jetra centralni detoksikacioni organ, ona često usled hronične izloženosti ksenobioticima, podleže oksidativnim oštećenjima (Khan i Kour, 2007). Izloženost koncentracijama od 5, 10 i 15 ppb CPF-a je povećalo aktivnost SOD kod riba (*Oreochromis niloticus*) (Oruc, 2012), dok su Kavitha i Rao (2008) i Xing i saradnici (2012) dokazali smanjenje aktivnosti. Povećana aktivnost SOD-a ukazuje na povećanu produkciju slobodnih radikala. Cink, bakar i magnezijum su esencijalne komponente

oksidativnog sistema (Sohail i sar., 2011). SOD je antioksidativni enzim, skupljač superoksid anjona ($O_2^{\cdot-}$), koji ima sposobnost da katalizuje dismutaciju $O_2^{\cdot-}$ na O_2 i H_2O_2 koristeći NADPH ili NADH (Fukai i Ushio-Fukai, 2011). Inače mehanizam dismutacije SOD-a se zove i "ping-pong" mehanizam, s obzirom da uključuje sekvencijalnu redukciju i oksidaciju metala (kao što su Fe^{2+} , Cu^+ , Mn^{2+}) koji se nalaze u aktivnom centru enzima. U prisustvu redukovanog jona metala, u Fentonovoj reakciji, SOD ima sposobnost da konvertuje H_2O_2 na hidroksilni jon (OH^-) i hidroksidni radikal ($\cdot OH$). $\cdot OH$ deaktivira SOD1 napadajući bakar, vezujuće histidine u aktivnom centru, što rezultira gubitkom bakra. Izgleda da SOD pored dismutazne funkcije ima i peroksidazni mehanizam dejstva, a što zavisi od prekomerne produkcije $O_2^{\cdot-}$ ili H_2O_2 (Abreu i Cabelli, 2010). Prevelika produkcija NO može inaktivirati SOD2. U prisustvu $O_2^{\cdot-}$, NO stvara jak oksidant peroksinitrit ($ONOO^-$), koji izaziva nitrovanje tirozinskih ostataka u SOD2 i time dovodi do totalne inaktivacije ovog enzima (Macmillan-Crow i Cruthirds, 2001). Na aktivnost enzima SOD2 bitno utiče i HOCl, koja dovodi do 50% inhibicije ovog enzima (Macmillan-Crow and Cruthirds, 2001). Upravo zbog mogućnosti da prevelika produkcija H_2O_2 inaktivira SOD1, time možemo da objasnimo pad aktivnosti SOD kod doze od 6 mg/kg CPF. Kod iste doze CPF-a nije bilo pada aktivnost za SOD2, zato što ova forma enzima sadrži Mn u aktivnom centru koji ne podleže uticaju H_2O_2 , i ne inhibira enzim (Fukai i Ushio-Fukai, 2011). Takođe je dokazano da povećan nivo SOD2 smanjuje LPO ćelijske membrane (Macmillan-Crow i Cruthirds, 2001).

Dokazano je da je aktivnost SOD-a mnogo veća u mozgu nego CAT, i zato je mozak osetljiviji na oksidativni stres (Casetta i sar., 2005). Povećanje SOD aktivnosti može biti posledica intenzivne proizvodnje $O_2^{\cdot-}$ u mitohondrijama u respiratornom lancu pod uticajem OF (Lahouel i sar., 2015), da bi se ubrzala dismutacija toksičnih oksida. Paralelno povećanje enzima antioksidativne zaštite i nivoa MDA, ukazuje na nastanak velikog broja ROS. Organizam čak i sa povećanom aktivnošću enzima nije bio u stanju da spreči LPO.

CAT je antioksidativni enzim, koji zajedno sa SOD i GST, ima važnu ulogu u zaštiti organizma putem eliminacije ROS-a. Ovaj enzim razgrađuje H_2O_2 koji je nastao prilikom dismutacije $O_2^{\cdot-}$ pomoću SOD-a ili u reakcijama koje katalizuje ksantin-oksida. Dokazan je porast aktivnosti ovog enzima usled dejstva CPF-a u plazmi, jetri i mozgu prepelica. Tretman vitaminom B1 je smanjio aktivnost CAT u odnosu na tretman

sa CPF-om ali su vrednosti bile povećane u odnosu na kontrolu. Održavanje visoke aktivnosti CAT dovodi do smanjenje proizvodnje H_2O_2 u ćelijama i sprečava pojavu oksidativnih oštećenja ćelija. Podaci u literaturi su dvosmisleni i nejasni. U skladu sa našim rezultatima su ispitivanja Khalil-a (2015) na puževima, Narra i saradnici (2017) na ribama, Alvarez i saradnici (2008) u jetri pacova i Łukaszewicz-Hussain-a (2011) koji su posle 14 dana tretmana sa CPF-om dokazali porast CAT u mozgu pacova. Kopjar i sar., 2018 su dokazali da je CAT u plazmi pacova tretiranih sa 0,010 mg/kg t.m. i 0,015 mg/kg t.m. CPF-a je porasla dok CAT u tkivu mozga nije bila značajno promenjena, verovatno usled malih doza nije došlo do stvaranja visokog nivoa H_2O_2 u mozgu. Jedan broj autora je u ekperimentima na pacovima (Verma i Srivastava, 2003; Heikal, 2014; Abolaji i sar., 2017; 2017; Saoudi i sar., 2017) i ribama (Kavitha i Rao, 2008; Oruc, 2012; Xing i sar., 2012) dokazao da smanjenje aktivnosti CAT nastaje usled dejstva CPF-a, dok su Sharma i Bist (2014) dokazali da do pada aktivnosti CAT dolazi usled deficita tiamina u jetri miševa.

S obzirom da je ekspresija CAT bila povećana u grupama tretiranim sa CPF-om i vitaminom B1, određivali smo koncentraciju H_2O_2 u tkivu mozga. H_2O_2 ima ulogu u vanćelijskoj i unutarćelijskoj toksičnosti neutrališući fagocitovane patogene ili ekstracelularno druge ćelije (Halliwell i Aruoma, 1991; Desagher i sar., 1997). U našim istraživanjima dokazano je da aplikacija CPF-a dovodi do povećanja koncentracije H_2O_2 , dok je posle tretmana sa vitaminom B1 došlo do značajnog pada. Slične rezultate, odnosno povećanje koncentracije H_2O_2 u tkivu mozga su dobili Mehta i saradnici (2009) aplikovanjem CPF-a pacovima tokom tri dana u dozama od 20, 50 i 100 mg/kg t.m. Povećano stvaranje ROS-a uz veoma nisku antioksidativnu sposobnost mozga je odgovorno za čestu pojavu oksidativnog stresa u neuronima. Raibeemol i Chitra (2018) su dokazali da CPF u jetri, bubrezima i slezini riba povećava stvaranje H_2O_2 i time izaziva promene u lipidnoj strukturi i utiče direktno na propustljivost ćelijske membrane.

Pored enzima antioksidativne zaštite, antioksidativnom kapacitetu ćelija doprinose i neenzimske komponente u koje spadaju i tiolna jedinjenja. Ona imaju brojne funkcije u ćelijama pored važnog učešća u redoks sistemima. U ovu grupu spadaju sva jedinjenja koja poseduju -SH grupu vezanu za ugljenik. U uslovima povišenog oksidativnog stresa, tiolna jedinjenja su među prvim komponentama u ćeliji koja podležu

oksidaciji, štiteći druge molekule i funkcionalne grupe proteina od oksidativne modifikacije.

GSH je ubikvitarni tiolni tripeptid, sastavljen od cisteina, glicina i glutaminske kiseline. Glutation-sintetaza i γ -glutamilcistein sintetaza (γ -GCS) su odgovorni za njegovu sintezu u ćeliji (Zitka i sar., 2012). U mozgu se većinom nalazi u glija ćelijama (Schulz i sar., 2000). GSH je esencijalna supstanca za detoksifikaciju pošto eliminiše metabolite OF iz organizma preko urina (Abel i sar., 2004) i kao antioksidans ima ulogu u očuvanju redoks potencijala u ćeliji (Verma i Srivastava, 2001).

Lipidna peroksidacija je jedna od najčešćih posledica oksidativnog stresa u ćelijama. Oštećenje lipidnog dvosloja u ćelijama dovodi do gubitka integriteta ćelijske membrane, inaktivacije proteina u membrani, gubitka membranskog potencijala, i izmenjene funkcije važnih signalnih puteva koji su u vezi sa ćelijskom membranom (Valko i sar., 2007). Stepem lipidne peroksidacije kod prepelica je praćen preko koncentracije MDA, jednog od krajnjih produkata ciklične reakcije lipidne peroksidacije i pokazatelja oksidativnog oštećenja u ćelijama. MDA je naročito važan produkt, jer je pokazano mutageno dejstvo u ćelijama sisara i kancerogeni efekat kod glodara (Valko i sar., 2007).

Organofosfati izazivaju lipidnu peroksidaciju ćelijske membrane, pri čemu dolazi do oštećenja membrane i gubitka ćelijske homeostaze, a MDA je značajan indikator ovog procesa (Trachootham i sar., 2009). U ovom radu određivali smo koncentracije GSH i MDA da bi procenili ulogu CPF-a u nastanku oksidativnog stresa, kao što su i Sharma, i sar., (2005) koristili u ispitivanju sa OF. Slične rezultate su dobili i Gabrowni i saradnici (2007), koji su dokazali da usled tretmana CPF-om dolazi do povećanja nivoa ovih parametara u plazmi i u tkivu mozga kod pacova. Slično tome, ovo ispitivanje je pokazalo značajno povećanje MDA u eritrocitima prepelica usled dejstva CPF-a, dok je tretman vitaminom B1 doveo do pada koncentracije MDA. U jetri je CPF doveo do povećanja MDA. Najbolji efekat naknadnog aplikovanja vitamina B1 je postignut u jetri, gde je smanjenje koncentracije MDA pri najvećoj dozi CPF-a bilo 2,83 puta, dok je kod grupe tretirane samo vitaminom B1 zabeležena 13,4 puta niža koncentracija MDA u odnosu na kontrolu. Tretman CPF-om u mozgu je izazivao povećanje MDA ali je nakon aplikovanja vitamina B1 zabeleženo smanjenje MDA u odnosu na kontrolnu grupu. Sam vitamin B1

je 18,56 puta smanjio vrednost MDA u odnosu na C. Neočekivan pad nivoa MDA pri dozama 3,00 i 6,00 mg/kg CPF se verovatno javlja usled povećanja aktivnosti SOD2 pri ovim dozama, koji može da redukuje lipidnu peroksidaciju (Macmillan-Crow i Cruthirds, 2001). Povećanje koncentracije MDA usled oštećenja ćelijske membrane dejstvom CPF-a dokazano je i kod riba (Oruc i sar., 2012), MDA u tkivu testisa tretiranih pacova (Kalender i sar., 2012), kao i u mozgu pacova (Hussein i sar., 2018). Povećanje nivoa LPO u jetri, bubrezima i mozgu pacova pod uticajem CPF-a su dokazali Mongi i saradnici (2018). Povećanje nivoa MDA u mozgu pacova, usled dejstva CPF-a, su dokazali Łukaszewicz-Hussain (2011), Ahmed i Zaki (2009), Verma i sar. (2009). Yonar (2018) je takođe potvrdio da CPF dovodi do povećanja MDA u tkivu jetre, mozga i škrge riba. Ki i saradnici (2013) su dokazali značajno povećanje koncentracije MDA kod humanih SH-SY5Y ćelija neuroblastoma usled dejstva CPF-a.

U našim ispitivanjima koncentracija GSH u plazmi je pod dejstvom CPF-a smanjena. Naknadno aplikovan vitamin B je povećao nivo GSH, ali su vrednosti i dalje bile ispod fizioloških vrednosti dokazanih u kontrolnoj grupi. U jetri je CPF doveo do povećanja GSH, dok je tretman sa B1 vratio koncentraciju na fiziološki nivo. Do sličnih rezultata došli su i drugi autori, koji su nakon 3, 6, 9, 12 i 15 dana tretmana sa CPF-om (Narra i sar., 2017) dokazali povećan nivo GSH i LPO u jetri riba. Sharma i Bist-a (2014) su ogledom na miševima sa deficitom vitamina B1 dobili smanjenje nivoa GSH u jetri. U našim istraživanjima u mozgu je nivo GSH povećan posle tretmana CPF-om u svim ispitivanim dozama, ali je još značajnije povećanje usledilo nakon aplikacije vitamina B1. Kontrola koja je tretirana samo sa vitaminom B1 i u plazmi i u jetri je imala vrednosti kao u kontroli, dok je u mozgu dokazana 3,27 puta veća koncentracija u odnosu na kontrolu. Naši podaci su u saglasnosti sa literaturnim podacima koji ukazuju da vitamin B1 smanjuje LPO i povećava nivo GSH (Gibson i Zhang, 2002). Povećan nivo MDA i GSH u mozgu i škragama je dokazan kod ribe *Poecila reticulate* posle tretmana sa CPF-om (Deb and Das, 2013). Smanjenje nivoa GSH u krvi pacova su dokazali i Beba i Panemanogalore (2003) u mozgu pacova Ahmed i Zaki (2009) i Verma i saradnici (2009). Chabab i sar. (2017) su dokazali da 6,75 mg/kg t.m. CPF dovodi do oštećenja jajnika kod pacova, što su potvrdili povećanjem nivoa MDA i smanjenjem GSH.

Povećanje nivoa GSH u mozgu nakon tretmana sa CPF-om se može objasniti povećanjem aktivnosti γ -glutamyltranspeptidaze (γ -GT). γ -GT je membranski

astroglijalni ektoenzim koji katalizuje vanćelijski GSH, kada nastaje dipeptid cisteinil-glicin, koji potom hidrolizuje na cistein i glicin. Neuron koristi cistein i glicin za sintezu GSH, jer ne mogu da unesu direktno tripeptid, GSH. Usled povećanja aktivnosti γ -GT, kompenzatorno se stvara više dipeptidnih prekursora koje neuron koristi za stvaranje GSH (Schulz i sar., 2000). Yilmaz i saradnici (2015) su tokom ispitivanja hepatotoksičnosti etanola kod pacova dokazali pad koncentracije GSH kod tretmana vitaminom B1.

GST je multifunkcionalni enzim koji ima glavnu ulogu u detoksifikaciji ćelija od ksenobiotika i pesticida (Ezeji i sar., 2012). Ovaj enzim konjuguje jedinjenja koja imaju elektrofilni centar sa glutationom a potom se ovi konjugati GSH metabolišu u merkapturnu kiselinu koja se izlučuje urinom. Ezeji i saradnici (2012) su dokazali da kod ptica u serumu i jetri dolazi do pada aktivnosti GST usled dejstva pesticida. Povećanje aktivnosti GST se objašnjava rezistencijom koja se javila na češće korišćene insekticide (Ranson i Hemingway, 2005). U našem radu je dokazano da je CPF u plazmi, jetri i mozgu kod prepelica izazvao porast aktivnosti GST-a. Povećanje aktivnosti je bilo najveće u jetri, verovatno zato što se tu odvijaju glavni procesi detoksikacije. Primenom vitamina B1 značajno smanjena aktivnost ovog enzima u jetri, a u plazmi i mozgu je došlo do porasta aktivnosti GST-a.

Jeon i saradnici (2014) su dokazali povećanje GST-a u jetri riba *Oryzias latipes* koje su tretirane CPF-om, kao potvrdu da do povećanja aktivnosti ovog enzima dolazi usled njegove uloge u eliminisanju CPF-a iz organizma, odnosno pretvaranju ovog lipofilnog pesticida u hidrofilno jedinjenje. Ove rezultate na ribama su potvrdili Xing i saradnici (2012), Wang i saradnici (2012) koji su zabeležili značajno povećanje GST u jetri dok je u mozgu, škragama i bubrezima uočen pad aktivnosti. Podaci u literaturi nisu konzistentni i dokazuju da je jetra glavni organ za detoksikaciju, pa ne čudi i često korišćenje aktivnosti GST u jetri kao biomarkera stepene oštećenja (Wang i sar., 2012). Ispitivanjem na skakavcima *Locusta migratoria*, Quin i saradnici (2014) su takođe utvrdili pad aktivnosti GST-a usled dejstva CPF-a, kao i Heikal i saradnici (2014) u testisima pacova. Abolaji i saradnici (2017) su dokazali da se pad aktivnosti GST-a u mozgu, jajnicima i materici pacova javlja usled prevelikog stvaranja MDA, nedovoljne koncentracije GSH, kao i inhibicijom GST-a metabolitima CPF-a. Yonar i saradnici

(2018) su dokazali povećanje GST u škragama, jetri i bubrezima kod riba, dok su Narra i saradnici (2017) to povećane pokazali u jetri, a Sanchez-Hernandez (2014) su povećanje GST-a dokazali kod kišne gliste.

GST (pre svega izoenzimi GSTM1-1, GSTP1-1 i GSTA1-1) učestvuje u kontroli ćelijske proliferacije i u regulaciji apoptoze preko MAPK signalnih puteva, odnosno inhibicijom JNK-signalnog puta. GSTP se vezuje za JNK, inaktivira ga i ova veza je stabilna u fiziološkim uslovima (Boušova i Skalova, 2012). U slučaju pojave oksidativnog stresa dolazi do raskidanja ovog kompleksa i aktivacije oba proteina. GSTP se oligomerizuje, modifikacijom Cys₄₇ i Cys₁₀₁ rezidua pomoću S-glutationizacije (Townsend i sar., 2009). U istraživanju Harisa (2013) je dokazano da benfotiamin dovodi do povećanja aktivnosti GST u tkivu bubrega pacova.

6.2. UTICAJ CPF-A I VITAMINA B1 NA AKTIVNOST HOLINESTERAZE

Dokazano je da OF izazivaju neurotoksičnost inhibirajući AChE, koja je jedan od ključnih enzima nervnog sistema. Različiti faktori mogu uticati na neurotoksičnost OF, kao što su afinitet između AChE i oksona OF, kapacitet paraoksonaze da katalizuje okson (Pond i sar., 1998) ili sposobnosti CYP450 monooksigenaze da biotransformiše OF u odgovarajući okson. Interesantno je istaći da su zreli neuroni manje osetljivi na toksično delovanje CPF-a od nezrelih, čak i u slučaju veće inhibicije AChE. Nezreli neuroni imaju manju sposobnost da konvertuju CPF u okson, usled manje aktivnih CYP450 enzima (Amani i sar., 2016). AChE je jedan od prvih biomarkera koji se koristi kod trovanja OF (Thompson i sar., 1988). Upotreba AChE kao indikatora se značajno razvijala poslednje dve decenije, a posebna je njena uloga u mozgu kao indikatora neuroloških efekata OF. Istraživanja Shimshoni i saradnika, (2012) ukazuju da se fiziološka vrednost za aktivnost AChE u mozgu ptica kreće u intervalu od 7,4 to 19,8 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ tkiva, što je u skladu sa rezultatima naših istraživanja.

Postoje dve klase holinesteraza. Prva ili prava AChE (Layer, 1991) koja se može naći u mozgu, mišićima i membrani eritrocita, dok je druga BuChE ili pseudoholinesteraza, koja se sintetiše u jetri, gde je i ima najviše, ali se još može naći u mozgu, plućima, bubrezima i u većoj količini u plazmi (Cokugras, 2003). Interesovanje

za BuChE kao enzim koji učestvuje u detoksikaciji, je značajno poraslo u poslednjih nekoliko godina. BuChE može da hidrolizuje nekoliko holinskih estara (acetilholin, butirilholin, propionilholin i benzoilholin), dok je za AChE supstrat samo acetilholin (Layer, 1991). Toksikološki značaj BuChE se ogleda u njenoj sposobnosti da sakuplja OF i druge inhibitore pre nego što dođu do AChE, dok u odsustvu AChE reguliše holinergičku transmisiju (Cokugras, 2003).

Analiza aktivnosti holinesteraze u mozgu se uglavnom koristi kod ptica za dijagnostikovanje izloženosti OF. Ako je procenat inhibicije AChE veći od 50%, trovanje OF se dijagnostikuje kao uzrok uginuća (Shimshoni i sar., 2012). Ptice su osetljivije na akutnu izloženost antiholinesteraznim pesticidima zbog smanjenog nivoa enzima potrebnih za detoksikaciju inhibirane AChE (Parker i Goldstein, 2000). Zbog visoke aktivnosti AChE u mozgu ptica (Westlake i sar., 1983), brzina vezivanja za organofosfate je veća, nego kod ostalih kičmenjaka (Hill, 1992).

U našem ispitivanju aktivnost AChE i BuChE posle tretmana CPF-om (sve primenjene doze) značajno je opala u eritrocitima/plazmi, i u tkivu jetre i mozga. U eritrocitima je zabeležena inhibicija AChE usled dejstva CPF-a, i kod najveće doze je iznosila 25,50%. Naknadni tretman vitaminom B1 je doveo do vidnog oporavka i povećanja aktivnosti ovog enzima samo kod prve dve doze CPF-a. Kod kontrolne grupe, koja je tretirana samo vitaminom B1 dokazana je veća aktivnost u odnosu na kontrolu. Inhibicija BuChE u plazmi se povećavala sa porastom doze CPF-a i iznosila je čak 78,66% u najvećoj dozi. Između grupa kojima je nakon CPF-a aplikovan vitamin B1 i onih koje su tretirane samo pesticidom utvrđen je značajan porast aktivnosti BuChE u svim dozama ($p < 0,0001$). Tretman vitaminom B1 kod grupe sa najmanjom dozom CPF-a je vratio BuChE na nivo fiziološke aktivnosti, dok su aktivnosti kod druge dve doze CPF-a, povećane za 2-3 puta. AChE u jetri je inhibirana kod svih ispitivanih grupa, sa najvećim procentom inhibicije kod najveće doze CPF-a. Samo je u ovoj dozi nakon tretmana vitaminom B1 dokazano povećanje aktivnosti AChE za 18,19%. Kontrolna grupa tretirana samo vitaminom B1 pokazala je porast aktivnosti u odnosu na kontrolu. Aktivnost BuChE u jetri je inhibirana dejstvom CPF-a, dok tretman vitaminom B1 nakon CPF-a vraća aktivnost na kontrolni nivo. Kod doza od 3,00 mg/kg i 6,00 mg/kg zabeležen je porast aktivnosti enzima za 45,58% i 50,92% nakon tretmana sa B1. Sam vitamin B1 je pokazao veću aktivnost u odnosu na kontrolu. U mozgu je aktivnost AChE dejstvom

CPF-a značajno inhibirana u svim dozama CPF-a. Tretman vitaminom B1 doveo je do povećanja aktivnosti enzima u svim dozama i to sa vrednostima koje su bile veće nego u kontrolnoj grupi. Aktivnost BuChE u mozgu se, nakon inhibicije CPF-om, uspešno oporavila nakon aplikacije vitamina B1. Povećanje aktivnosti enzima je bilo primetno u svim dozama, dok je kontrola sa B1 aktivirala enzim za 60% u odnosu na C. Možemo reći da je tretman vitaminom B1 uticao na aktivnost AChE i BuChE i najbolje efekte pokazao je u mozgu, gde je povećanje iznosilo i do 38,82 puta za AChE, odnosno 3,36 puta za BuChE.

Podaci iz literature pokazuju da je aktivnost AChE značajno inhibirana dejstvom CPF-a u eritrocitima i mozgu pacova (Mansour i Mossa, 2009; Singh i sar., 2013; Kopjar i sar., 2018), mozgu miševa (Ma i sar., 2013), jetri, slezini i bubrezima pacova (Verma i Srivastava, 2003). Pored toga, utvrđeno je da izlaganje CPF-u smanjuje aktivnost AChE u mozgu, mišićima i škragama kod riba (Colombo i sar., 2005; Kavitha i Rao, 2008; Wang i sar., 2009; Narra i sar., 2017; Tiwari i sar., 2017), puževa (Khalil, 2015) i kišnih glista (Sanchez-Hernandez i sar., 2014). Kod pilića, koji su dobijali CPF tokom 7 dana, pri većim dozama je uočena značajna inhibicija AChE kao kod prepelica (Al-Badrany i Mohammad, 2007). Analizom rezultata periodičnih medicinskih pregleda 64 operatera, koji su primenjivali CPF za kontrolu termita, otkriveni su abnormalni leukociti, kao i značajno smanjena aktivnost serumske BuChE, i eritrocitne AChE (Gotoh i sar., 2001). Gabrowni i saradnici (2007) su takođe dokazali smanjenje aktivnosti AChE kod pacova usled dejstva CPF-a u plazmi posle 7 dana, a u mozgu i jetri na kraju oglada, odnosno posle 28 dana. Picco i saradnici (2008) su dokazali inhibiciju AChE u eritrocitima i BuChE u plazmi kod bikova nakon dermalne aplikacije CPF-a. Cairns i saradnici (1991) su pratili aktivnost AChE u mozgu prepelica 24 sata nakon aplikacije CPF-a. Došli su do saznanja da tek doze iznad 1,50 mg/ptici dovode do značajne inhibicije enzima već 2 sata posle aplikacije. U ogledu Sharma i Bist-a (2014) ispitivan je uticaj nedostatka tiamina na aktivnost enzima AChE i BuChE. Aktivnost oba enzima, AChE ($p < 0,001$) i BuChE ($p < 0,05$) značajno je bila smanjena kod miševa, kojima je bio uskraćen tiamin (8 ili 10 dana) u poređenju sa kontrolom.

Kod ptica BuChE u plazmi se brže i u većoj meri inhibira nego AChE u mozgu pri izloženosti OF i zbog toga se BuChE može koristiti kao biomarker u trovanju OF (Vaughan-Higgins i sar., 2016), što je u saglasnosti sa našim nalazima. U humanoj

medicini, odnosno kao marker kod profesionalne izloženosti i kod procene efikasnosti terapije oksimima, koristi se BuChE zato što je dokazano da je BuChE u plazmi osetljivija na dejstvo OF od AChE u eritrocitima (Farahat i sar., 2011). Kod egipatskih radnika na poljima pamuka je dokazana veza između koncentracije trihlor-2-piridinola (TCP), metabolita CPF-a u urinu, i aktivnosti BuChE u plazmi i AChE u eritrocitima (Farahat i sar., 2011).

6.3. UTICAJ CPF-A I VITAMINA B1 NA EKSPRESIJU ENZIMA UKLJUČENIH U SINTEZU PROINFLAMATORNIH MOLEKULA

Azot-oksidi sintaza stvara NO iz L-arginina. Krajnji proizvod reakcije NO sa kiseoničnim vrstama i biološkim molekulima su nitriti (NO_2^-), nitrati (NO_3^-) i S-nitrozotoli (RSNO). NO ima različite uloge u zavisnosti od NOS izoforme koja ga stvara. Postoje tri forme azot oksid sintaze: nervna NOS (*n*NOS), endotelijalna NOS (*e*NOS) i inducibilna NOS (*i*NOS). Za aktivaciju prve dve je neophodno prisustvo Ca^{2+} i kalmodulina, dok se *i*NOS aktivira pod uticajem citokina na mestima inflamacije, infekcije ili traume (Di Meo i sar., 2016). *i*NOS stvara NO i citrulin iz aminokiseline L-arginina u prisustvu O_2 , NADPH i tetrahidrobiopterina (H_4B) kao kofaktora. Pod uticajem *n*NOS-a u nervima NO pomaže u komunikaciji između nervnih ćelija, dok pod uticajem *i*NOS-a u makrofagima nastaju ROS koji pospešuju fagocitozu. Uloga NO nastalog dejstvom *e*NOS-a u endotelu, mozgu i srcu je u vazodilataciji i regulaciji krvnog pritiska. Usled prevelikog nakupljanja u mozgu, NO-derivati deluju kao neurotoksini i zapažena je njihova uloga u neurodegenerativnim bolestima (Di Meo i sar., 2016).

Naše ispitivanje je dokazalo da CPF dovodi do značajnog povećanja koncentracije NO_2^- u plazmi, jetri i mozgu. Kod prepelica kojima je pored CPF-a aplikovan i vitamin B1 u mozgu je došlo do smanjenja koncentracije NO_2^- odnosu na grupe koje su tretirane CPF-om, ali su koncentracije i dalje bile veće u odnosu na kontrolu. U jetri je kombinovano delovanje CPF-a i vitamina B1 dovelo do povećanja NO_2^- u odnosu na grupe koje su primile samo CPF, ali i u odnosu na kontrolu. Ovo se može objasniti malim nivoom GSH-a, koji nije bio dovoljan da ukloni nastalu preveliku koncentraciju NO. Nakon tretmana vitaminom B1 dobijene su u plazmi značajno niže vrednosti NO_2^- u odnosu na grupe koje su primile samo CPF, ali i u odnosu na kontrolu. Mehta i saradnici

(2009) su dokazali da akutni tretman CPF-om dovodi do povećanja nivoa nitrita u svim delovima mozga pacova. Abolaja i saradnici (2017) su potvrdili da pod uticajem CPF-a dolazi do povećanja koncentracije NO_2^- u mozgu, jajnicima i uterusu pacova. Alvarez i saradnici (2008) su dokazali povećanje nitrita u plazmi i jetri posle 3 i 14 dana, nakon tretmana CPF. Povećanje koncentracije nitrita u jetri pacova, tretmanom od 28 dana CPF su dokazali Albasher i saradnici (2019), dok su Owumi i saradnici (2019) u jetri i bubrezima pacova nakon 14 dana dokazali povećanje ove reaktivne azotove vrste. Raibeemol i Chitra (2018) su dokazali da CPF u jetri, bubrezima i slezini riba povećava stvaranje NO. Uysal i saradnici (2016) su dokazali da usled dejstva vitamina B1 dolazi do pada nivoa NO u jetri pacova prilikom tretmana sa paracetamolom, dok su su Božić i saradnici (2015a, b) u BV2 kulturi ćelija mikroglije utvrdili da sintetički analog B1 vitamina, benfotiamin, redukuje produkciju NO, kao i gensku i proteinsku ekspresiju iNOS u uslovima inflamacije. Sa druge strane, Calingasan i saradnici (1998) su u mozgu pacova dokazali porast nivoa NO, usled deficita vitamina B1.

Tokom inflamatornog odgovora, aktivirane ćelije imunskog sistema proizvode povišene količine H_2O_2 , koji ukoliko se ne razgradi dejstvom katalaze, oksiduje enzim mijeloperoksidaza (MPO) do višeg oksidacionog stanja, a koja dalje u ćeliji sa određenim molekulima gradi specifične adukte. U reakciji sa Cl^- proizvodi HClO koja je izuzetno reaktivna sa tiolnim grupama, kao primarnim metama (Winterbourn i sar., 2000). U prisustvu nitrita i H_2O_2 mijeloperoksidaza je takođe u stanju da formira reaktivne azotove vrste, koje mogu dovesti do nitrotirozinskih derivata proteina (Eiserich i sar., 1998).

U našoj studiji smo takođe ispitivali uticaj CPF-a i vitamina B1 na aktivnost enzima MPO. Ovaj rani marker inflamacije konvertuje H_2O_2 i hloridne jone u hipohlorastu kiselinu i time učestvuje u odbrani organizma. MPO može *in vitro* da oksiduje CPF do odgovarajućeg oksona. Naši rezultati pokazuju da je aktivnost MPO u plazmi, jetri i mozgu povećana kod prepelica koje su bile tretirane CPF-om. U plazmi je aplikacija vitamina B1 održavala inflamatorni odgovor, ali bez statistički značajne razlike u odnosu na tretman samo pesticidom. U jetri i mozgu smo mogli da primetimo da je vitamin B1 smanjio inflamatorni odgovor indukovani prisustvom toksične supstance, te doveo do smanjenja aktivnosti MPO u odnosu na grupe sa CPF-om i vratio vrednosti ovog enzima na kontrolni nivo. Smanjenje aktivnosti MPO pri većim dozama CPF-a u mozgu i jetri je verovatno posledica većih koncentracija H_2O_2 , koje mogu inhibirati ovaj

enzim (Kettle i Winterbourn, 1989). Ovu pretpostavku možemo da potvrdimo našim rezultatima, s obzirom da povećanje doze CPF-a dovodi do akumulacije H₂O₂ sa porastom doze u mozgu. Dokazano je, da značajno povećanje MPO u mozgu je povezano sa demijelinizacijom i neurodegeneracijom (Forghani i sar., 2012). MPO poseduje dve vrste aktivnosti, peroksidaznu ili oksidišuću, kad dolazi do produkcije ROS i hlorinišuću čiji je produkt HOCl (Mirić i sar., 2015). U literaturi postoje podaci da CPF povećava samo peroksidaznu aktivnost MPO, dok nema nikakav uticaj na hlorinirajuću ulogu ovog enzima (Lazarević-Pašti i sar., 2013). Ovo je bitno saznanje zato što je upravo hlorinišuća uloga, vezana za baktericidno dejstvo fagocita, fiziološka funkcija MPO-a. U skladu sa našim rezultatima je i ispitivanje Abolaji i saradnika (2017), koji su kod pacova dokazali da CPF dovodi do porasta MPO u mozgu. Owumi i saradnici (2019) su ustanovili povećanje MPO u jetri i bubrezima pacova posle primene CPF-a.

MPO stimuliše proinflamatorni odgovor otpuštanjem citokina kao što su IL-1, IL-6 (Ray i sar., 2016). Smatra se da proizvodi MPO-a i NOS-a, NO i HOCl, međusobno utiču jedni na druge. MPO može da oksiduje NO i aktivira iNOS, a prevelika koncentracija NO reverzibilno inhibira MPO (Galijašević i sar., 2013), dok HOCl inhibira iNOS, a time i produkciju NO (Ray i sar., 2016).

Interesantan je uticaj MPO-a na ovaj enzim, pri čemu HOCl može da reaguje sa L-argininom te nastaju hlorinirani proizvodi koji inhibiraju NOS i sintezu NO (Galijašević i sar., 2013). Takođe MPO, odnosno HOCl može da inaktivira i eNOS, razdvajanjem njegovih dimera usled čega nastaju superoksidi. Dokazali smo da je usled dejstva CPF-a u mozgu prepelica došlo do značajnog porasta iNOS-a. Kod jedinki koje su posle CPF-a primile vitamin B1 zabeležen je pad nivoa iNOS-a u odnosu na grupe koje su bile tretirane samo sa CPF-om, ali su u odnosu na kontrolu i dalje povećane vrednosti. Zhang i saradnici (2019) su dokazali da tretman CPF-om dovodi do porasta iNOS-a u tkivu bubrega pacova, dok su Albasher i saradnici (2019) dokazali da izaziva porast u jetri pacova.

Usled deficita vitamina B1, pored pojave oksidativnog stresa uočeno je i da dolazi do povećanja aktivnosti iNOS-a i eNOS-a (Gibson i Zhang, 2002). Kruse i saradnici (2003) su dokazali da je na deficit vitamina B1 u mozgu pacova osetljiva eNOS, koja je postigla značajan porast aktivnosti. Calingasan i saradnici (1998) u mozgu pacova su dokazali da je aktivacija NOS-a ključna kod deficita vitamina B1, usled imunoreaktivnosti

nitrotirozina, koji je produkt nitrovanja peroksinitrita, čija koncentracija raste u pogođenim aksonima.

6.4. UTICAJ CPF-A I VITAMINA B1 NA SIGNALNE PUTEVE

Mitogen-aktivirane-protein kinaze (MAPKs) su serin-treonin kinaze koje učestvuju u ćelijskoj proliferaciji, diferencijaciji kao i opstanaku i smrti ćelije. Ovi signalni putevi su uključeni i u regulaciju apoptoze nervnih ćelija i aktiviraju se kroz niz sekvencionalnih fosforilacija koje uvećavaju i prenose signal kroz ćeliju, od membrane do jedra. MAPK familija se sastoji od ekstracelularno signal-regulisane kinaze (ERK), p38 MAPK i c-jun NH₂-terminalne kinaze (JNK).

ERK1,2 aktiviraju faktori rasta, citokini, virusne infekcije i karcinogeni, dok su JNK i p38 stimulirani dejstvom oksidativnog stresa i toksičnih supstanci (Raszewski i sar., 2015). Aktivacija JNK i p38 MAP kinaza indukuju apoptozu dok ERK 1,2 štite od apoptoze (Caughlan i sar., 2004). Primećena je dvojna uloga ERK 1,2 u apoptozi nervnih ćelija. Iako u literaturi ima više podataka o anti-apoptotskoj ulozi, dokazano je da može imati i pro-apoptotsku ulogu (Li i sar., 2014). Kada je uz ERK aktiviran i JNK, sigurno dolazi do apoptoze u nervnim ćelijama, što znači da JNK potencira pro-apoptotsku ulogu ERK-a (Li i sar., 2014).

U našem ispitivanju dokazali smo da CPF dovodi do povećanja ERK 1,2 u jetri i mozgu, dok tretman vitaminom B1 u jetri smanjuje ekspresiju ovog enzima, u mozgu pak dolazi do značajnog povećanja. Ispitivanjem ekspresije JNK u tkivu mozga došli smo do saznanja da CPF dovodi do povećanja ekspresije, dok naknadna aplikacija vitamina B1 je još dodatno povećava. Raszewski i saradnici (2015) su koristili CPF kao model za ispitivanje uticaja pesticida na ćelijsku smrt neurona i dokazali da CPF aktivira ERK1/2 i JNK signalne puteve. Blokiranjem ERK1,2 ili JNK signalnih puteva inhibirana je apoptoza koja je nastala usled dejstva CPF-a, što znači da ERK1,2 i JNK deluju pro-apoptotski. (Caughlan i sar., 2004). Ki i saradnici (2013) su dokazali da je CPF neurotoksičan i da dovodi do apoptoze usled povećanja ERK i JNK na SH-SY5Y ćelijskim linijama. Lee i saradnici (2012) su dokazali da CPF dovodi do apoptoze dopaminskih komponenti na PC12 ćelijskim linijama, povećanjem ekspresije ERK-a i JNK-a.

Autogafija se može pokrenuti dejstvom ROS-a ili JNK-a. JNK, pokrenut dejstvom slobodnih radikala, dovodi do fosforilacije Bcl-2 usled čega se raskida Beclin 1-Bcl-2 kompleks i započinje proces autogafije (Zhu i sar., 2017), što se u našem ispitivanju verovatno i desilo.

Ciklooksigenaze (COX) su enzimi koji se javljaju na mestu inflamacije i prevode arahidonsku kiselinu u lipidne medijatore-prostaglandine i tromboksane. Postoje dve izoforme COX enzima- ciklooksigenaze -1 (COX-1) i ciklooksigenaze -2 (COX-2). COX-1 je konstantno prisutan u svim tkivima organizma i ima ulogu u homeostazi, dok je uloga COX-2 u regulaciji inflamacije i oštećenja mozga. Zabeleženo je povećanje COX-2 kod mnogih neuroloških poremećaja, kao što su Alchajmerova bolest ili cerebralna ishemija (Gu i sar., 2008). U mozgu COX-2 je odgovoran za reakciju neurona na oksidativni stres. Članovi porodice MAPK utiču i na regulaciju ekspresije ciklooksigenaze COX-2. Ona predstavlja ključni enzim u odgovoru na inflamaciju i povezana je sa dopaminskom smrću ćelija. Supstance koje inhibiraju MAPK su efikasna antiinflamatorna jedinjenja zato što blokiraju proinflamatorne citokine i redukuju sintezu inflamatornih medijatora. Ki i saradnici (2013) su dejstvo CPF-a ispitivali na SH-SY5Y ćelijskoj liniji i dokazali da inhibitori JNK dovode do povećanja COX-2, kao i da CPF deluje neurotoksično. Naime, CPF aktivira apoptozu nastalu dejstvom ROS-a i dovodi do povećanja COX-2 u SH-SY5Y ćelijskim linijama. U našem ispitivanju COX-2 u mozgu i jetri je povećan usled dejstva CPF-a dok pod uticajem vitamina B1 dolazi do pada u ekspresiji ovog enzima. Da vitamin B1 ima antiinflamatornu ulogu dokazali su i drugi autori. Božić i saradnici (2015b) su tako u BV2 kulturi ćelija mikroglije pokazali da tretman benfotiaminom (sintetički B1 vitamin) značajno snižava ekspresiju COX-2 u uslovima inflamacije. Spinis i saradnici (2015) su primetili da deficit vitamina B1 dovodi do pojačane ekspresije COX-2. Gu i saradnici (2008) su dokazali da deficit vitamina B1 u mozgu dovodi do ozbiljnih poremećaja u funkciji mitohondrija, povećanja COX-2 i na kraju do smrti neurona.

6.5. UTICAJ CPF-A I VITAMINA B1 NA PARAMETRE APOPTOZE

Proces apoptoze kontrolišu proteini iz Bcl-2 porodice, u koje spadaju proapoptotski (Bax, Bak, Bad) i protiv-apoptotski molekuli (Bcl-2, Bcl-x). Bcl-2 i Bcl-x sprečavaju apoptozu blokiranjem mitohondrijskog puta, sprečavanjem aktivacije kaspaza ili otpuštanje citohroma c. Bcl-2 inhibira depolarizaciju mitohondrija i stvaranje ROS-a. U našem eksperimentu na prepelicama smo dokazali da CPF izaziva smanjenje ekspresije Bcl-2 u tkivu mozga i time podstiče nastanak apoptoze. Naknadni tretman vitaminom B1 je doveo do povećanja ekspresije ili je održavao na kontrolnom nivou. U skladu sa našim rezultatima su i ispitivanja na jetri (Albasher i sar., 2019) i bubrezima pacova (Zhang i sar., 2019), kao i na nervnim ćelijskim linijama (hNPCs) (Lee i sar., 2014) koja su takođe dokazali smanjenje Bcl-2-a usled dejstva CPF-a. Yadav i saradnici (2010) su ispitivanjem uticaja benfotiamina (liposolubilni derivat vitamina B1) na mišijoj ćelijskoj liniji RAW264.7, potvrdili povećavanje ekspresije Bcl-2.

6.6. UTICAJ CPF-A I VITAMINA B1 NA AKTIVNOST LAKTAT DEHIDROGENAZE

Laktat dehidrogenaza (LDH) je bitan enzim za energiju u metaboličkim procesima. LDH je tetramer, koji se sastoji iz dva polipeptidna lanca (H i M). Ove subjedinice svojim rekombinacijama formiraju 5 izoformi: LDH₁ (H₄), LDH₂ (H₃M), LDH₃ (H₂M₂), LDH₄ (HM₃), LDH₅ (M₄). H lanac je odgovoran za konverziju laktata u piruvat i zastupljen je pre svega u srcu, bubrezima i slezini, dok se M lanac nalazi uglavnom u mišićima i jetri i ima ulogu da prevodi piruvat u laktat. Kod ptica je uglavnom zastupljen u jetri i mišićima. LDH se često koristi u toksikološkim ispitivanjima, da bi bolje razumeli uticaj raznih hemikalija iz životne sredine na ptičiji organizam. U literaturi postoje podaci da su elektroforetskim razdvajanjem LDH u tkivu mozga kod prepelica i kokošaka nađene 4 izoforme, s tim da je LDH₄ (75.6%) izoforma bila dominantna (Singh i sar., 2012), dok je u semenju plazmi i srcu nađena samo jedna izoforma (Sing i sar., 2011). Za elektroforetsko razdvajanje izoformi LDH kod sisara se koristi pufer pH 8,6-8,8, ali novija istraživanja su pokazala da je kod ptica neophodan gradijent pH od 3 do 9

zbog njene drugačije izoelektrične tačke. Smatra se da je za drugačiju pokretljivost ovog enzima kod ptica odgovoran histidin, odnosno njegovo veće prisustvo kod ptica. Usled toga se traka na elektroforegramu kod ptica uočava na mestu gde se kod sisara nalazi LDH₅ izoforma (Heinova i sar., 2016).

Ukupna aktivnost LDH predstavlja nespecifični marker oštećenja pojedinih tkiva i organa. Određivanjem izoenzimskih formi LDH sa sigurnošću se može utvrditi oštećenje ćelija tkiva. U našim ispitivanjima pokazano je povećanje samo jedne izoforme koja po pokretljivosti odgovara LDH₅ izoformi, koja nedvosmisleno ukazuje na oštećenje hepatocita i curenja ovog enzima u plazmu. Relativna aktivnost LDH₅ je u direktnoj vezi sa koncentracijom CPF-a. Primena vitamina B1 ima protektivno dejstvo na hepatocite i sprečava izlazak ovog enzima u cirkulaciju. Sam vitamin B1 ne izaziva povećanje aktivnosti LDH₅.

6.7. UTICAJ CPF-A I VITAMINA B1 NA SINTEZU PROTEINA

Humani organizam sadrži od 30000 – 50000 strukturnih gena odgovornih za sintezu proteina. Korišćenjem savremenih biohemijskih metoda i tehnika moguće je analizirati više od 300 proteina. Proteini se mogu određivati u krvi, urinu, cerebrospinalnoj tečnosti, amnijskoj tečnosti, salivi, fecesu, pleuralnoj i perikardijalnoj tečnosti. U toku akutne inflamacije proteini imaju značajnu ulogu u kompleksnom procesu odbrane organizma. To su proteini akutne faze (*eng.* acute phase proteins–APP) i postoje dve grupe-pozitivni i negativni APP (Gruys i sar., 2005). Usled inflamacije povećava se sinteza pozitivnih APP (C-reaktivni protein, serum amiloid A, ceruloplazmin, α -kiselni glikoprotein, fibrinogen, haptoglobin), dok se smanjuje sinteza negativnih APP (prealbumin, transferin, albumin, globulini). Transferin ipak kod kokošaka spada u grupu pozitivnih APP (Murata i sar., 2004). Cilj APP je da povrate homeostazu. Proinflamatorni citokini i prisustvo APP u krvi se koriste u dijagnostici za praćenje promena zdravstvenog stanja. APP su pouzdaniji parametar, zato što citokini nestaju iz cirkulacije posle nekoliko sati, a APP ostaju ne promenjeni duže od 48 sati (Zulkifli i sar., 2014). Na elektroforegramu kod ptica može se uočiti 5 zona: albuminska (prealbumin, albumin), α 1-globulini (α 1-antitripsin), α 2-globulini (haptoglobin,

ceruloplazmin, makroglobulin), β - globulini (fibrinogen, transferin, komplement, β – lipoproteini), γ - globulini (imunoglobulini) (Cray i Tatum, 1998).

Od svih serumskih proteina albumin je prisutan u najvišoj koncentraciji tako da sniženje njegove koncentracije može da dovede do hipoproteinemije. U našem ispitivanju tretman sa CPF-om kao i kombinovano dejstvo CPF-a i vitamina B1 dovode do pada koncentracije albumina. Smanjenje albumina nastaje usled smanjene sinteze u jetri ili usled smanjenog unosa proteina. Smatra se da je smanjenje albumina kod dejstva OF posledica oštećenja jetre (Murata i sar., 2004).

Smanjenje koncentracije frakcije α 1- globulina usled dejstva CPF-a je bez statističkog značaja, dok je naknadni tretman sa vitaminom B1 doveo do značajnog porasta ove frakcije. Tretman sa CPF-om kao i kombinovano dejstvo CPF-a i tiamina dovelo je do povećanja frakcija α 2- i statistički značajnog povećanja β –globulina. Globulinska frakcija se statistički značajano povećala samo u prisustvu najveće doze CPF-a, a kombinovani tretman CPF i B1 je uslovio smanjenje koncentracije γ - globulina.

Značajna je antioksidativna uloga haptoglobina (Radaković i sar., 2018). On vezuje hemoglobin, koji je slobodan u cirkulaciji i time inhibira nastanak hemoglobinskih radikala i sprečava LPO koju izaziva hemoglobin. Ovu antioksidativnu funkciju nemaju albumin i transferin (Jia i Alayash, 2013). Ceruloplazmin inhibira enzim MPO i njegovu baktericidnu aktivnost, a dokazano je da može i da redukuje proizvodnju H_2O_2 iz neutrofila (Panassenko i sar., 2016). Sa sigurnošću se može reći da merenje koncentracije proteina akutne faze može poslužiti kao jedna od metoda praćenja uticaja CPF-a na zdravstveno stanje životinja.

6.8. UTICAJ CPF-A I VITAMINA B1 NA SINTEZU LIPOPROTEINA

Lipoproteini se sastoje od hidrofobnog jezgra i hidrofilnog omotača. Fosfolipidi, neesterifikovani holesterol i apolipoproteini se nalaze u omotaču, dok su u jezgru smešteni trigliceridi i estri holesterola. Na osnovu veličine, molekulske mase i gustine lipoproteinske čestice su podeljene na: hilomikrone, lipoproteine vrlo male gustine (VLDL), lipoproteine intermedijarne gustine (IDL), lipoproteine male gustine (LDL) i lipoproteine velike gustine (HDL) (Marin-Garsia, 2007). Na osnovu naelektrisanja su

podeljeni na: beta frakciju (β čestice, LDL lipoproteinske čestice), pre-beta frakciju (pre- β čestice, VLDL lipoproteinske čestice), alfa frakciju (α čestice, HDL lipoproteinske čestice). U uslovima povećanog oksidativnog stresa i stanjima inflamacije LDL čestice, podležu oksidativnim modifikacijama (Witztum i Steinberg, 2001, Gaut i Heinecke, 2001) zbog smanjenog antioksidativnog potencijala HDL čestica (Feretti i sar., 2006,). Pretpostavlja se da oksidacija LDL-a započinje fazom u kojoj se najpre troše endogeni antioksidansi, zatim se nezasićene masne kiseline oksiduju do lipidnih hidroperoksida da bi u poslednjoj fazi došlo do razlaganja peroksidnih jedinjenja u reaktivni aldehid kao što je MDA. Interakcija ovog aldehida sa ϵ -amino grupama lizinskih ostataka proteina LDL čestica povećava stepen negativnog naelektrisanja pri čemu se smanjuje i njihov afinitet za LDL receptore. Oksidativno modifikovane LDL čestice dalje indukuju inflamatorno stanje delujući kao aktivatori određenih proteina kao što su monocit-hemoatraktant protein 1 faktor stimulacije kolonija makrofaga, IL-8, i druge (Navab i sar., 2001) i tako dodatno pogoršavaju postojeću inflamaciju. HDL čestice učestvuju u procesu reverznog transporta holesterola i prenose ga iz perifernih tkiva u jetru (Calabresi i sar., 2010). HDL čestice mogu imati antiinflamatornu, antioksidativnu, antiaterogenu ulogu zahvaljujući različitim enzimima i apolipoproteinima koji su prisutni na površini čestice.

Postoje tri vrste apolipoproteina A: ApoA-I, apoA-II i apoA-IV i nalaze se prevashodno na HDL česticama. Osnovna uloga HDL-a je uklanjanje holesterola iz ćelija perifernog tkiva procesom koji se zove reverzni transport holesterola. Dok se ApoA-I i apoA-II sintetšu u tankom crevu i hepatocitima, ApoA-IV se stvara u crevima. Apolipoproteini B se javljaju u dva oblika: ApoB-100 i ApoB-48. ApoB-100 se sintetše u jetri i glavni je apolipoprotein VLDL, IDL i LDL. ApoB-48 je neophodan za sintezu hilomikrona (Sikorski, 2007). Dokazano je da PON1 može da inhibira oksidaciju LDL čestica in vitro kao i da smanji osetljivost HDL čestice na procese glikozilovanja. PON1 inhibira biosintezu holesterola u makrofagama i stimuliše njegov efluks iz ovih ćelija (Rozenberg i sar., 2003). Enzim se vezuje preko N-terminalnog kraja za fosfolipide HDL, što doprinosi većoj interakciji sa supstratima i ispoljavanju antioksidantne aktivnosti. Za stabilizaciju PON1, utvrđena je neophodnost ApoA-I, a da gubitak ApoA-I ima za posledicu oslabljeno vezivanje PON1 za HDL i smanjenu enzimsku aktivnost (Sorenson et al., 1999).

U našim ispitivanjima dokazali smo da je usled dejstva CPF-a povećana koncentracija ukupnog holesterola, koja se smanjuje nakon tretmana vitaminom B1. CPF je izazvao porast ApoB i smanjenje ApoA frakcije. Pozitivan efekat vitamina B1 na lipidni status prepelica se mogao uočiti usled povećanja ApoA i smanjenja ApoB frakcije. Promene u lipidnom statusu usled dejstva CPF-a, koje su u saglasnosti sa našim ispitivanjem, dokazali su Tanvir i saradnici (2016). Kod pacova tretiranih CPF-om došlo je do povećanja ukupnog holesterola u plazmi. Ovo povećanje može biti posledica oštećenja ćelijskih membrana, povećane sinteze u jetri ili je usled neprohodnosti žučnih puteva sprečena sekrecija holesterola u duodenum. Zabeleženo je povećanje VLDL i LDL čestica kao i smanjenje HDL. Sve ovo ukazuje na povećani rizik od pojave arteroskleroze. Niska koncentracija HDL-a može biti posledica oštećenja jetre i sinteze lipoproteina. Na osnovu svega ovoga se može zaključiti da duža izloženost dejstvu CPF-a može dovesti do kardiotoksičnosti. Slotkin i saradnici (2005) su utvrdili da CPF (primenjen u dozi od 1 mg/kg t.m. u postnatalnom periodu od prvog do četvrtog dana) izaziva i polno-zavisno povećanje koncentracije holesterola i triglicerida u plazmi kod odraslih pacova. Efekt je bio ograničen na jedinke muškog pola.

MPO dejstvom RNS-a može da modifikuje LDL česticu, čime se olakšava unos LDL-a u endotelne ćelije, akumulacija holesterola i nastanak arteroskleroze. Modifikovani LDL može i da aktivira neutrofile i pokrene stvaranje ROS-a (Alique i sar., 2015). PON1 štiti HDL i LDL čestice od oksidativnog stresa, stimulišući razgradnju lipidnih peroksida u estrima holesterola i fosfolipida i na ovaj način smanjuje i produkciju proinflamatornih medijatora. Tokom akutne faze imunog odgovora organizma, HDL čestice gube ApoA, dolazi do esterifikacije holesterola i gubitka PON1, koji se zamenjuje serum amiloidom A (Tvarijonaviciute i sar., 2012).

Paraoksonaze su C-zavisni enzimi, koji su u plazmi vezani za HDL čestice i sprečavaju oksidaciju LDL-a. PON1 ima ulogu u hidrolizi toksičnih metabolita OF, paraoksona, po kome su i dobile naziv (Medina-Diaz i sar., 2016). Smatra se da PON1 ima nekoliko enzimskih funkcija: paraoksonaznu (hidrolizuje OF), laktonaznu (hidrolizuje laktone) i arilesteraznu ili ARE (hidrolizuje aromatične estre karboksilnih kiselina). Neki autori tvrde da su PON i ARE isti enzim, jer imaju dosta zajedničkih karakteristika (Karanth and Pope, 2000; Berkowitz i sar., 2004). Drugi autori, pak tvrde da su u pitanju dva različita enzima, koji imaju različite inhibitore i supstrate (Gan i sar.,

1991). Oba enzima su Ca-zavisni i vezani za HDL čestice. Dok ARE koriste fenil-acetat kao supstrat, PON1 hidrolizuje paraokson. NaCl ima uticaja samo na aktivnost PON1. Ptice imaju jako malo ili nemaju uopšte PON1, što je i u našim ispitivanjima dokazano. Ispitujući uticaj CPF-a na ARE kod prepelica dokazali smo porast aktivnosti u plazmi i jetri sa porastom doze CPF izuzev najveće doze u jetri. U mozgu je dokazano povećanje aktivnosti sa 1,50 mg/kg, dok ostale dve doze dovode do smanjenja aktivnosti bez statističke značajnosti. Tretman vitaminom B1 je doveo do značajnog povećanja ARE u plazmi (pri dozama 1,50 mg/kg i 3,00 mg/kg), jetri (pri dozi od 6 mg/kg) i mozgu .

Smanjena aktivnost ARE može biti rezultat povećane peroksidacije lipida, pošto ARE hidrolizuje lipidne perokside koji se formiraju na lipoproteinima LDL i HDL, što na kraju rezultira inaktivacijom enzima (Aviram i sar., 1999). Nekoliko studija na životinjama i ljudima povezuje odnos između smanjene aktivnosti PON1 sa upalom (Novak i sur. 2010; Kulka 2016), razmatrajući mogućnost da PON1 može biti jedna od negativnih proteina akutne faze (APP).

Medina-Diaz i saradnici (2016) su dokazali da supstance sa antioksidativnim dejstvom povećavaju aktivnost PON1, štiteći enzim od inhibicije uzrokovane oksidativnim stresom. Proinflamatorni citokini IL-1 i IL-6 smanjuju aktivnost ovog enzima (Tvarijonavičute i sar., 2012). U literaturi ima podataka da PON1 štiti BuChE od oksidativnog stresa (Tvarijonavičute i sar., 2012).

Pretpostavka je da ukoliko PON1 i GST/GSH sistem, tokom trovanja OF, ne uspeju da se izbore sa nastalim promenama, dolazi do povećane LPO i proizvodnje ROS-a. Najzastupljeniji su PON1 i ARE u jetri, zatim u plazmi i najmanje u mozgu. Gabrowny i saradnici (2007), u skladu sa tim, su zaključili da je dejstvom CPF-a, najviše bila pogođena PON1 i ARE u jetri. Isti autori su dokazali da je usled dejstva CPF-a porastao je nivo HDL čestica i triglicerida, a smanjio se sadržaj holesterola. Smatra se da je upravo ova veza sa HDL česticom ključna za antioksidativno svojstvo enzima, pošto sam enzim nije ispoljio isto dejstvo. Zato se pretpostavlja da je upravo smanjenje aktivnosti PON1 usled dejstva CPF-a, izazvao poremećaj u lipidnom statusu.

6.9. UTICAJ CPF-A I VITAMINA B1 NA SINTEZU CITOKINA

Citokini su proteini koji imaju važnu ulogu tokom imunog odgovora u aktivaciji i regulaciji drugih ćelija i tkiva. Uloga citokina je do skoro bila slabo ispitana kod ptica, ali uz sve veću komercijalnu upotrebu živine dobila je na značaju. Proinflamatorni citokini pokreću sistemsku inflamatornu kaskadu koja je posredovana hemikinima, vazoaktivnim aminima, sistemom komplementa, ROS-om i proteinima akutne faze. IL-1 i IL-6 su proinflamatorni citokini koji učestvuju u toku inflamacije, povrede ili bolesti. U poslednje vreme citokini se koriste i kao adjuvansi za vakcine i podstiču bolji odgovor imunog sistema. IL-1 β se formira od prekursora, aktivacijom IL-1 α konvertujućeg enzima (ICE ili kaspaza 1). Ovaj enzim učestvuje i u nastanku apoptoze (Wigley i Kaiser, 2003). Vezivanjem IL-1 β za receptore (IL-1RI i IL-1RII) mogu se aktivirati i MAP kinaze. IL-1 β učestvuje u akutnoj fazi imunog odgovora, aktivirajući makrofage i neutrofile i time dovodi do produkcije drugih citokina. IL-1 β nastaju uglavnom u monocitima i tkivnim makrofagima (Bird i sar., 2002). IL-6 je poznat i kao marker inflamacije. On učestvuje u akutnom odgovoru, dovodeći do sinteze proteina akutne faze-serum amiloid A, C-reaktivnog proteina i antitripsina (Zulkifli i sar., 2014; Jin i sar., 2015). IL-6 pored aktivacije B i T limfocita, ima važnu ulogu i u hematopoezi (Wigley i Kaiser, 2003). U našem ispitivanju smo dokazali da CPF u plazmi i mozgu kod prepelica podstiče rad imunog sistema i dolazi do pojačanog lučenja IL-1 i IL-6. U skladu sa našim rezultatima, u ogleđima na ribama (Chen i sar., 2014; Jin i sar., 2015) i pacovima (Albasher i sar., 2019) su dokazali povećanje IL-1 i IL-6. Tretman vitaminom B1 je doveo do smanjenja prisutnih citokina u odnosu na grupu koja je bila tretirana samo sa CPF-om, ali je ipak primećena reakcija organizma u odnosu na kontrolu. Povećanu koncentraciju citokina pri aplikaciji vitamina B1 možemo objasniti povećanom aktivnošću AChE. Primećeno je da se tokom inflamacije smanjuje AChE te dolazi do porasta ACh koji inhibitorno deluje na makrofage i sintezu proinflamatornih citokina i na taj način ograničava inflamatorni odgovor (Tvarijonavičute i sar., 2012). Redukciju proinflamatornih citokina TNF- α i IL-6 nakon tretmana benfotiaminom u uslovima inflamacije zapazili su i Božić i saradnici (2015b) u BV2 kulturi ćelija mikroglije.

6.10. ANTIOKSIDATIVNI KAPACITET VITAMINA B1

Dokazano je da vitamin B1 ima zaštitnu ulogu u jetri pacova (Wang i sar., 2007), tako što štiti ćelijske membrane od LPO, a time i od oksidativnog stresa (Sharma i Bist, 2014). Deficit vitamina B1 uzrokuje oštećenja i smrt neurona, koja su nastala kao posledica prevelike produkcije ROS u mozgu. Na osnovu ovoga možemo zaključiti da vitamin B1 ima antioksidativnu ulogu ali sam mehanizam njegove antioksidativne zaštite nije poznat. Pretpostavlja se da je antioksidativni efekat tiamina verovatno vezan za sukcesivni transfer $2H^+$ iz NH_2 -grupe pirimidinskog prstena i H^+ iz tiazolovog prstena (nakon njegovog otvaranja) do reaktivnih supstrata (Lukienko i sar., 2000). Antioksidansi se definišu kao supstance koje, u malim koncentracijama, imaju sposobnost da mehanizmom kompeticije odlože ili spreče oksidaciju supstrata (Stevanović i Borozan, 2012).

Od brojnih metoda koje postoje za merenje antioksidativne sposobnosti i procenu efikasnosti neutralizacije slobodnih radikala, mi smo koristili DPPH metodu i ispitivali redukcionu sposobnost vitamin B1. Ove metode su brze i jednostavne, visoke osetljivosti i reproducibilnosti. DPPH se uglavnom koristi kao supstrat pri proceni antioksidativnog kapaciteta. Ova metoda se zasniva na redukciji rastvora DPPH-a u metanolu, sa formiranjem ne radikala DPPH-H. Određivanjem DPPH sposobnosti hvatanja slobodnih radikala, boja rastvora se menja tokom reakcije od ljubičaste do žute.

Ispitivanjem sposobnosti hvatanja radikala DPPH testom, pokazano je da efikasnost vitamina B1 zavisi od primenjene koncentracije. Procenat inhibicije od 50% je dobijen u DPPH testu sa koncentracijom vitamina B1 od $18 \pm 0,2$ mg/mL. Dobijene vrednosti za efikasnu koncentraciju (50% inhibicije) ukazuju na dobru antioksidativnu sposobnost ovog vitamina.

Redukciona sposobnost vitamina B1 je iznosila $1,6 \pm 0,02$ mg/mL, što je znatno veće u odnosu na redukcionu sposobnost BHT-a kao standard, sa izrazito velikim redukcionim potencijalom, od $4,0$ mg/ml \pm 0,4. Swiglo (2006) je ispitivanjem antioksidativne aktivnosti familije B vitamina, dokazala da su posebno tiamin i folna kiselina jaki antioksidansi, iako je ABTS test pokazao da imaju sporiju sposobnost uklanjanja radikala.

Već više od decenije se zna da pesticidi izazivaju oksidativni stres kao jedan od mehanizama toksičnosti. Upravo pojava LPO membrane je jedna od posledica oksidativnog stresa. Funkcija eritrocita zavisi od integriteta njihove membrane, koja je u fiziološkim uslovima veoma postojana. Test osmotske fragilnosti eritrocita je važan hematološki parametar koji daje informacije o metabolizmu eritrocita i stabilnosti membrane (Armstrong, 2010). Membrane eritrocita su visoko osetljive na peroksidaciju lipida zbog velikog prisustva PUFA, a takođe i visoke koncentracije hem-proteina (citohroma i hemoglobina), kao i visokog sadržaja prelaznih elemenata (Cu^{2+} , Fe^{2+}) (Rai i sar., 2009), koji deluju kao prooksidanti. Oni povećavaju osetljivost eritrocita na oksidativni stres, pojačavajući tako napad slobodnih radikala na membrane, što rezultira njihovim razaranjem.

Na osnovu naših rezultata možemo zaključiti da CPF indukuje hemolizu eritrocita u svim dozama, dok vitamin B1 značajno povećava stabilnost membrane. Naše istraživanje je jasno pokazalo da izloženost CPF-u povećava nestabilnost eritrocita zbog povećanog peroksidativnog oštećenja lipida membrane eritrocita prepelica, što je zapaženo sa povećanjem koncentracije MDA u eritrocitima. Povećani MDA u eritrocitima u ovom istraživanju ukazuje da CPF podstiče peroksidaciju lipidnih membrana eritrocita. Membranski lipidi su od vitalnog značaja za održavanje i opstanak ćelijskog integriteta (Mansour i Moussa 2009). Iako eritrociti poseduju nekoliko bioloških mehanizama za odbranu od unutarćelijskog oksidativnog stresa (Urano 1993), oni se mogu oksidativno oštetiti usled prisustva toksičnih supstanci i/ili zagađivača životne sredine. MDA je glavni oksidativni proizvod peroksidacije polinezasićenih masnih kiselina (PUFA), a povišena koncentracija MDA je pokazatelj lipidne peroksidacije (LPO) (Cupic Miladinovic i sar., 2018) Kale i saradnici (1999), Nishi i Hundal (2013) su pokazali da pesticidi putem LPO mogu da poremete biohemijske i fiziološke funkcije eritrocita. Rezultati naših istraživanja su u skladu sa izveštajima da OP, CPF (Ambali i sar., 2007; Mansour i Moussa 2009; Demir i sar., 2011) indukuje porast koncentracije MDA eritrocita kod izloženih pacova. Promena lipidne peroksidacije u strukturnim i funkcionalnim komponentama eritrocitne membrane može uzrokovati poremećaje integriteta membrane što rezultira povećanom nestabilnošću eritrocita što je zabeleženo u grupi tretiranoj sa najvećom koncentracijom CPF u ovoj studiji. Povećani stepen hemolize ukazuje na sposobnost CPF da narušava integritet eritrocitne membrane

očigledno od povećanog oksidativnog oštećenja eritrocitne membrane (Bautista i sar., 2003), što rezultira anemijom, jer je anemija zabeležena kod radnika nakon intoksikacije pesticidima (Ambali i sar., 2010). Povećana osmotska fragilnost zabeležena u našoj studiji u skladu je sa studijama izvedenim na pacovima tretiranim CPF-om (Uchendu i sar., 2014). Lipofilna priroda CPF-a povećava peroksidaciju lipida direktnom interakcijom sa ćelijskom membranom. Slobodni radikali generisani hemoglobinom u eritrocitu, koji je glavni izvor radikala u interakciji sa pesticidom, takođe su mogli dovesti do povećanja LPO membrane eritrocita i hemolize (Cupic Miladinovic i sar., 2018).



VII

ZAKLJUČAK

U skladu sa postavljenim ciljevima ove doktorske disertacije i na osnovu analize dobijenih rezultata izvedeni su sledeći zaključci:

1. Subakutna primena tri subletalne doze CPF-a (1,50; 3,00 i 6,00 mg/kg t.m.) kod japanskih prepelica dovodi do promene oksido-redukcionih parametara u plazmi, tkivu jetre i mozga. Tretman CPF-om, u sve tri korišćene doze utiče na indikatore oksidativnog stresa tako što menja aktivnost enzima SOD1, SOD2, CAT, GST i povećava koncentraciju GSH i NO_2^- .
2. Statistički značajna povećanja vrednosti parametara oksidativnog stresa dovode do promene osmotske fragilnosti ćelija, oštećenja lipida, hepatocelularnog oštećenja i potvrđuju ulogu oksidativnog stresa kod izloženosti CPF-u.
3. Vitamin B1 (10 mg/kg t.m.) aplikovan 30 minuta nakon tretmana CPF-om pokazuje antioksidativna svojstva direktno preko enzima antioksidativne odbrane (SOD1, SOD2, CAT, GST) i očuvanjem redoks potencijala. B1 vitamin, primenjen pojedinačno ili nakon CPF-a, povećava ukupnu koncentraciju redukovano glutationa u mozgu. Primena B1 vitamina nakon CPF-a smanjuje stepen lipidne peroksidacije u plazmi, tkivu jetre i mozga.
4. Upotreba AChE kao indikatora stepena oštećenja izazvanih primenom CPF-a je potvrđena, a posebno njena uloga u mozgu kao indikatora neuroloških efekata CPF-

- a. Stepen inhibicije AChE u mozgu prati stepen inhibicije u eritrocitima, dok je najveća inhibicija zabeležena u jetri i do 64,18%.
5. Protektivna uloga vitamina B1 ogleda se u povećanoj aktivnosti AChE nakon inhibitornog dejstva CPF-a pri čemu se najizraženiji efekat zapaža u mozgu. Sam vitamin B1 takođe povećava aktivnost AChE u tkivu jetre i mozga sa najvećim efektom u mozgu, gde je ovo povećanje i do 17,48 puta u odnosu na kontrolnu grupu.
 6. CPF inhibira BuChE u plazmi, tkivu jetre i mozga sa maksimalnim stepenom inhibicije u plazmi (78,66%). BuChE u plazmi je u većoj meri inhibirana nego AChE u eritrocitima nakon tretmana CPF-om i zbog toga se BuChE može koristiti kao biomarker izloženosti dejstvu CPF-a.
 7. Tretman vitaminom B1 je povećao aktivnost BuChE, nakon inhibicije CPF-om, na nivo fiziološke aktivnosti u plazmi, tkivu jetre i mozga. Efekat tretmana samo B1 vitaminom je tkivno specifičan, u plazmi smanjuje aktivnost ovog enzima, dok je u mozgu značajno (za 60%) povećava.
 8. CPF utiče na sintezu proteina i menja njihovu zastupljenost. Tretman CPF-om dovodi do pada koncentracije albumina i α 1- globulina, kao i do povećanja α 2- , β i γ - globulina. Povećanje globulinske frakcije je statistički značajano samo u prisustvu najveće doze CPF-a. CPF je izazvao promenu u zastupljenosti lipoproteina - porast ApoB i smanjenje ApoA frakcije, kao i povećanje aktivnosti arilesteraza.
 9. Pozitivni efekat primene vitamina B1 nakon tretmana CPF-om na lipidni status u plazmi prepelica ogleda se u povećanju koncentracije Apo A i smanjenju koncentracije ApoB frakcije. B1 vitamin sam po sebi, kao i u kombinaciji sa CPF-om povećava aktivnost arilesteraza i njihovu protektivnu ulogu od oksidativnog stresa.
 10. CPF uvodi ćeliju u apoptozu tako što povećava ekspresija *inducibilne* azot-oksida sintaze (*i*NOS) i *c*-Jun N- terminalne kinaze (JNK), ciklooksigenaze 2 (COX-2), kao i kinaze čija je aktivnost regulisana ekstracelularnim signalima (ERK1,2), ali smanjuje nivo Bcl-2 u mozgu.
 11. Tretman B1 vitaminom redukuje produkciju proinflamatornog citokina, interleukina 6, snižava i ekspresiju inducibilne azot oksid sintaze, kao i ekspresiju ciklooksigenaze-2 u jetri i mozgu. Ispitivanjem signalnih mehanizama zaključeno je da tiamin ove efekte ostvaruje smanjujući aktivaciju ERK signalne kaskade u jetri.

- 12.** CPF značajno povećava produkciju proinflammatoryh citokina IL-1 i IL-6 u plazmi i mozgu. Vitamin B1 ispoljava antiinflammatoryno delovanje pošto smanjuje produkciju ovih citokina u svim ispitivanim tkivima i pri svim dozama CPF-a. Tretman vitaminom B1 smanjuje CPF-om izazvano povećanje aktivnosti mijeloperoksidaza u jetri i mozgu i smanjuje oslobađanje nitrita u plazmi i mozgu.
- 13.** Vodeni rastvor vitamina B1 je ispoljio značajne antioksidativne sposobnosti u svim ispitivanim koncentracijama (0,06-30,00 mg/mL), i izrazitu moć redukcije 1,6 mg/mL ukazujući na njegovu dobru antioksidativnu sposobnost.

Sumiranjem ključnih nalaza ove studije može se istaći da su najznačajniji ishodi kombinovane primene CPF-a i vitamina B1, snižavanje stepena ćelijskog oštećenja nastalog pod dejstvom slobodnih radikala i efikasna redukcija inflamacije. Primena vitamina B1 zaslužuje dalja istraživanja kao potencijalnog dodatnog terapeutika u prevenciji i ublažavanju štetnih dejstava organofosfatnih jedinjenja.



VIII

L I T E R A T U R A

Aaron S., 2001, Organophosphates and Carbamates. In: Clinical Toxicology/Marsha, D. Ford, W.B. Saunders Company (Phil): 819-34.

Abel E. L., Bammler T. K., and Eaton D. L., 2004, Biotransformation of methyl parathion by glutathione S-transferases, *Toxicol. Sci.* 79:224–32.

Abolaji A., Mercy O., Afolabi T.T., Arowoogun M.D., Nwawolor V, and Farombi E.O., 2017, Protective properties of 6-gingerol-rich fraction from *Zingiber officinal* (Ginger) on chlorpyrifos-induced oxidative damage and inflammation in the brain, ovary and uterus of rat, *Chem. Biol. Interact.* 270:15–23.

Abreu I.A., and Cabelli D.E., 2010, Superoxide dismutases-a review of the metal-associated mechanistic variations, *Biochim. Biophys. Acta* 1804:263–274.

Acker C.I., Nogueira C.W., 2012, Chlorpyrifos acute exposure induces hyperglycemia and hyperlipidemia in rats, *Chemosphere.* 89(5):602-8.

Adams H.R., 2001, *Drugs Acting on Blood and Blood Elements*, Veterinary Pharmacology and Therapeutics. Iowa state University Press/Ames.

Adler M., Manley H.A., Purcell A.L., Deshpande S.S., Hamilton T.A., Kan R.K., Oyler G., Lockridge O., Duysen E.G., Sheriden R.E., 2004, Reduced acetylcholine receptor density, morphological remodeling, and butyrylcholinesterase activity can sustain muscle function in acetylcholinesterase knockout mice, *Muscle Nerve.* 33:317-327.

Aebi H., 1984, *Methods in Enzymology*, Academic Press. Orlando, 121.

AgroNews, 2013, China's major pesticides varieties tracking – chlorpyrifos, Agropages.com. <http://news.agropages.com/News/NewsDetail---8993.htm>.

Ahmad M.Z., Khan A., Javed M.T., Hussain I., 2015, Impact of chlorpyrifos on health biomarkers of broiler chicks, *Pesticide Biochemistry and Physiology.* doi: 10.1016/j.pestbp.2014.12.024.

Ahmed M.M., Zaki N.I., 2009, Assessment the Ameliorative Effect of Pomegranate and Rutin on Chlorpyrifos-ethyl-Induced Oxidative Stress in Rats, *Nature and Science*. 7: 49-61.

Aikawa H., Watanabe I.S., Furuse T., Iwasaki Y., Satoyoshi E., Sumi T., Moroji T., 1984, Low energy levels in thiamine-deficient encephalopathy, *J Neuropathol Exp Neurol*. 43(3):276-87.

Al-Abbasi F.A., Sadath S., Mushtaq G. and Anwar F., 2019, Vitamin B combination reduces fluconazole toxicity in Wistar rats, *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s40199-019-00252-9>.

Alavanja M.C., Samanic C., Dosemeci M., Lubin J., Tarone R., Lynch C.F., Knott C., Thomas K., Hoppin J.A., Barker J., Coble J., Sandler D.P., Blair A., 2003, Use of agricultural pesticides and prostate cancer risk in the Agricultural Health Study cohort, *Am J Epidemiol*. 157(9):800-14.

Al-Badrany Y.M.A., and Mohammad F.K., 2007, Effects of acute and repeated oral exposure to the organophosphate insecticide chlorpyrifos on open-field activity in chicks, *Toxicol. Lett*. 174:110–116.

Albasher G., Almeer R., Al-Otibi F.O., Al-Kubaisi N., Mahmoud A.M., 2019, Ameliorative Effect of Beta vulgaris Root Extract on Chlorpyrifos-Induced Oxidative Stress, Inflammation and Liver Injury in Rats, *Biomolecules*. 9, 261, doi:10.3390/biom907026.

Aldridge J.E., Levin E.D., Seidler F.J., Slotkin T.A., 2005, Developmental exposure of rats to chlorpyrifos leads to behavioral alterations in adulthood, involving serotonergic mechanisms and resembling animal models of depression, *Environ Health Perspect*. 113(5):527-31.

Aldridge J.E., Seidler F.J., Meyer A., Thillai I., Slotkin T.A., 2003, Serotonergic systems targeted by developmental exposure to chlorpyrifos: effects during different critical periods, *Environ Health Perspect*. 111(14):1736-43.

Aldridge J.E., Seidler F.J., Slotkin T.A., 2004, Developmental exposure to chlorpyrifos elicits sex-selective alterations of serotonergic synaptic function in adulthood: critical periods and regional selectivity for effects on the serotonin transporter, receptor subtypes, and cell signaling, *Environ Health Perspect*. 112(2):148-55.

Al-Gubory K.H., 2012, Mitochondria: Omega-3 in the route of mitochondrial reactive oxygen species, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 44, 1569– 1573

Alique M., Luna C., Carracedo J. and Ramirez R., 2015, LDL biochemical modifications: a link between atherosclerosis and aging, *Food Nutr Res*. 59: 29240.

Alvarez A.A., Ramírez-San Juan E., Canizales-Román A., 2008, Chlorpyrifos induces oxidative stress in rats, *Toxicological & Environmental Chemistry*. 90:5, 1019-1025.

Amani N., Soodi M., Daraei B., and Dashti A., 2016. Chlorpyrifos toxicity in mouse cultured cerebellar granule neurons at different stages of development: additive effect on glutamate-induced excitotoxicity, *Cell J*. 18:464–472.

Amaraneni S.R., Pillala R.R., 2001, Concentrations of pesticide residues in tissues of fish from Kolleru Lake in India, *Environ Toxicol*. 6(6):550-6.

Ambali S., Akanbi D., Igbokwe N., Shittu M., Kawu M., Ayo J., 2007, Evaluation of subchronic chlorpyrifos poisoning on hematological and serum biochemical changes in mice and protective effect of vitamin C, *J Toxicol Sci*. 32: 111–120.

- Ambali S.F., Abubakar A.T., Shittu M., Yaqub L.S., Anafi S.B., and Abdullahi A., 2010, Chlorpyrifos-induced alteration of hematological parameters in wistar rats: Ameliorative effect of zinc, *Res J Environ Toxicol.* 4: 55-66.
- Ambali S.F., Ayoa J.O., Ojo S.A., Esievoc K.A.N., 2010, Vitamin E protects Wistar rats from chlorpyrifos-induced increase in erythrocyte osmotic fragility, *Food Chem Toxicol.* 48(12):3477-80.
- Andrews A.H., and Humphrey D.J., 1982, *Poisoning in Veterinary Practice*, National Office of Animal Health, Enfield, Middlesex, England.
- Armstrong D., 2010, *Advanced Protocols in Oxidative Stress II, Methods in Molecular Biology.*
- Assis C.R., Linhares A.G., Oliveira V.M., França R.C., Carvalho E.V., Bezerra R.S., de Carvalho L.B.Jr., 2012, Comparative effect of pesticides on brain acetylcholinesterase in tropical fish, *Sci Total Environ.* 441:141-50.
- Athar H.R., Khan A., Ashraf M., 2008, Exogenously applied ascorbic acid alleviates salt-induced oxidative stress in wheat, *Env Exp Bot* 63: 224-231.
- ATSDR, 1997, *Toxicological Profile for Chlorpyrifos*, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, United States Department of Health and Human Services, Atlanta.
- Aviram M., Rosenblat M., Billecke S., Erogul J., Sorenson R., Bisgaier C.L., Newton R.S., La Du B., 1999, Human serum paraoxonase (PON1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants, *Free. Rad. Biol. Med.* 26, 892-904.
- Axmon A., and Rignell-Hydbom A., 2006, Estimates of past male and female serum concentration of biomarkers of persistent organochlorine pollutants and their impact on fecundability estimates, *Environ. Res.* 101: 387-394.
- Babior B.M., Lamberth J.D., Nauseef W., 2002, The neutrophil NADPH oxidase, *Arch Biochem Biophys.* 397:342-4.
- Ball G.F.M., 1998, Thiamin (vitamin B1). Bioavailability and Analysis of Vitamins in Foods, 267–292. doi:10.1007/978-1-4899-3414-7_7
- Banaszkiewicz T., 2010, Evolution in pesticide use, In: Skibniewska, K.A. (Ed.), *Contemporary Problems of Management and Environmental Protection vol. 5, Influence of the Pesticide Dump on the Environment.* Department of Land Reclamation Environmental Management, University of Warmia and Mazury, pp: 7-18.
- Bautista M., Altaf W., Lall R., and Wapnir R., 2003, Cord blood red cell osmotic fragility: A comparison between preterm and full-term newborn infants, *Early Hum Dev.* 72:37–46.
- Beal M.F., 2002, Oxidatively modified proteins in aging and disease, *Free Radical Bio Med.* 32:797–803.
- Beauchamp C., Fridovich I., 1971, Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels, *Analytical Biochemistry.* 44:276–287.
- Bebe F.N., Panemanogalore M., 2003, Exposure of low doses of endosulfan and chlorpyrifos modifies endogenous antioxidants in tissues of rats, *J Env Sci Health.* 38: 349-363.
- Begum S.A., Upadhyaya T.N., Baruah G.K., Rahman T., Pathak D.C., and Goswami S., 2015, Pathological changes of chlorpyrifos induced chronic toxicity in indigenous chicken, *International Journal of Information Research and Review Vol. 2,* 5:682-686.

Bennett R.S., Williams B.A., Schmedding D.W., and Bennett J.K., 1991, Effects of dietary exposure to methyl parathion on egg laying and incubation in mallards, *Environ Toxicol Chem.* 10:501-507.

Berkowitz G.S., Wetmur J.G., Birman-Deych E., Obel J., Lapinski R.H., Godbold J.H., Holzman I.R., Wolff M.S., 2004, In utero pesticide exposure, maternal paraoxonase activity, and head circumference, *Environ Health Perspect.* 112(3):388-91.

Beutler E., 1983, Osmotic fragility. In: Williams W.J., Beutler E., Erslev A.J., Lichtman M.A. (Eds.), *Hematology*, McGraw-Hill Book Co, New York, 1626–1627.

Beutler, E., 1973, Glutathione Reductase, Glutathione, *Proceedings of the 16 Conference of the German Society of Biological Chemistry*, Tubingen, 109-113.

Bird S., Jun Zoua J., Wang T., Munday B., Cunningham C., Secombes C.J., 2002, Evolution of interleukin-1, *Cytokine & Growth Factor Reviews.* 13: 483–502.

Blair R., Newsome F., 1985, Involvement of water-soluble vitamins in diseases of swine, *J Anim Sci.* 60:1508-1517.

Blakely B.R., Yole M.J., Brousseau P., Boermans H., Fournier M., 1999, Effect of chlorpyrifos on immune function in rats, *Vet Hum Toxicol.* 41(3):140-4.

Blasiak J., Jalszynski P., Trzeciak A., Szyfter K., 1999, In vitro studies on the genotoxicity of the organophosphorus insecticide malathion and its two analogues, *Mutat Res.* 445(2):275-283.

BLI, 2004, State of the world's birds. BirdLife International.

BLI, 2008, State of the World's Birds: Indicators for Our Changing World. BirdLife International, Cambridge, UK.

Bondy S.C., Nadery S., 1994, Contribution of hepatic cytochrome P-450 systems to the generation of reactive oxygen species, *Biochem Pharmacol.* 48:155-9.

Boone J.S., Tyler J.W., 2001, Chambers J.E., Transferable residues from dog fur and plasma cholinesterase inhibition in dogs treated with a flea control dip containing chlorpyrifos, *Environ Health Perspect.* 109(11):1109-14.

Boros L.G., Steinkamp M.P., Fleming J.C., Lee W.N., Cascante M., Neufeld E.J., 2003, Defective RNA ribose synthesis in fibroblasts from patients with thiamine-responsive megaloblastic anemia (TRMA), *Blood.* 102(10):3556-61.

Bozic I., Savic D., Stevanovic I., Pekovic S., Nedeljkovic N., Lavrnja I., 2015, Benfotiamine upregulates antioxidative system in activated BV-2 microglia cells, *Front Cell Neurosci.* 9:351. doi: 10.3389/fncel.2015.00351.

Bozic I., Savic D., Laketa D., Bjelobaba I., Milenkovic I., Pekovic S., Nedeljkovic N., Lavrnja I., 2015, Benfotiamine attenuates inflammatory response in LPS stimulated BV-2 microglia, *PLoS One.* 10(2):e0118372. doi:10.1371/journal.pone.0118372.

Boušova I., and Skalova L., 2012, Inhibition and induction of glutathione S-transferases by flavonoids: possible pharmacological and toxicological consequences, *Drug Metabolism Reviews.* 44(4): 267–286.

Brent B.E., Bartley E.E., 1984, Thiamin and niacin in the rumen, *J Anim Sci.* 59, 813-822.

Bubber P., Ke Z.J., Gibson G.E., 2004, Tricarboxylic acid cycle enzymes following thiamine deficiency, *Neurochem Int.* 45(7):1021-8.

Bunik V.I., Tylicki A., Lukashov N.V., 2013, Thiamin diphosphate-dependent enzymes: from enzymology to metabolic regulation, drug design and disease models, *FEBS J.* 280(24):6412-42. doi: 10.1111

Cairns M.A., Williams B., Maguire C.C., Bennett J., 1991, Brain cholinesterase activity of bobwhite acutely exposed to chlorpyrifos, *Environmental Toxicology and Chemistry*.10(5):657-664.

Cal EPA, 2008, Evidence on the Developmental and Reproductive Toxicity of Chlorpyrifos. Reproductive and Cancer Hazard Assessment Branch, Office of Environmental Health Hazard Assessment, California Environmental Protection Agency.

Cal EPA, 2010, Development of Health Criteria for School Site Risk Assessment Pursuant to Health and Safety Code Section 901 (g): Child-Specific Reference Dose (chRD) for School Site Risk Assessment – Chlorpyrifos, Integrated Risk Assessment Branch, Office of Environmental Health Hazard Assessment, California Environmental Protection Agency.

Calabresi L., Franceschini G., Jonas A., 2010, Lecithin:cholesterol acyltransferase, high-density lipoproteins and atheroprotection in humans, *Trends Cardiovasc Med*. 20: 50-53.

Calingasan N.Y., Chun W.J., Park L.C., Uchida K., Gibson G.E., 1999, Oxidative stress is associated with region-specific neuronal death during thiamine deficiency, *J Neuropathol Exp Neurol*. 58(9):946-58.

Calingasan N.Y., Park L.C.H., Calo L.L., Trifiletti R.R., Gandy S.E. and Gibson G.E., 1998, Induction of Nitric Oxide Synthase and Microglial Responses Precede Selective Cell Death Induced by Chronic Impairment of Oxidative Metabolism, *American Journal of Pathology*. 153 (2):599-610.

Campbell C.G., Seidler F.J., Slotkin T.A., 1997, Chlorpyrifos interferes with cell development in rat brain regions, *Brain Res Bull*. 43(2):179-89.

Casetta I., Govoni V., Granieri E., 2005, Oxidative stress, antioxidants and neurodegenerative diseases. *Curr Pharm*. 11:52–2033.

Caughlan A., Newhouse K., Namgung U., and Xia Z., 2004, Chlorpyrifos Induces Apoptosis in Rat Cortical Neurons that is Regulated by a Balance Between p38 and ERK/JNK MAP Kinases, *Toxicological sciences*. 78:125–134.

Cecchi A., Rovedatti M.G., Sabino G., Magnarelli G.G., 2012, Environmental exposure to organophosphate pesticides: assessment of endocrine disruption and hepatotoxicity in pregnant women, *Ecotoxicol Environ Saf*. 80:280-7.

Chebab S., Mekircha F., Leghouchi E., 2017, Potential protective effect of Pistacia lentiscus oil against chlorpyrifos-induced hormonal changes and oxidative damage in ovaries and thyroid of female rats, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.11.081>.

Chen D., Zhang Z., Yao H., Cao Y., Xing H., Xu S., 2014, Pro- and anti-inflammatory cytokine expression in immune organs of the common carp exposed to atrazine and chlorpyrifos, *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 114:8–15.

Chen Y., 2012, Organophosphate-induced brain damage: Mechanisms, neuropsychiatric and neurological consequences, and potential therapeutic strategies, *NeuroToxicology*. 33: 391-400.

Clement J.G., 1991, Effect of a single dose of an acetylcholinesterase inhibitor on oxotremorine- and nicotine-induced hypothermia in mice, *Pharmacol Biochem Behav*. 39:929-934.

Cokugras A.N., 2003, Butyrylcholinesterase structure and physiological importance, *Turk J Biochem*. 28:54-61.

Colborn T., Dumanoski D., and Myers J.P., 1996, *Our Stolen Future: Are We Threatening Our Fertility, Intelligence and Survival A Scientific Detective Story*, Dutton Books, New York.

Čolić M., 2004, Apoptoza neutrofilnih granulocita i njen značaj za regulaciju inflamacije, In: Kovačević Z.L., Apoptoza – eksperimentalna i klinička iskustva, Zbornik radova, Novi Sad: Srpska akademija nauka i umetnosti. 69-80.

Colombo A., Orsi F., Bonfanti P., 2005, Exposure to the organophosphorus pesticide chlorpyrifos inhibits acetylcholinesterase activity and affects muscular integrity in *Xenopus laevis* larvae, *Chemosphere*. 61(11):1665-71.

Čolović M., Krstić D., Lazarević-Pašti T., 2013, Bondžić A., Vasić V., Acetylcholinesterase inhibitors: Pharmacology and Toxicology *Curr Neuropharmacol*. 11(3):315-335.

Cray C., and Tatum L.M., 1998, Applications of Protein Electrophoresis in Avian Diagnostics, *Journal of Avian Medicine and Surgery*. 12 (1):4-10

Crumpton T.L., Seidler F.J., Slotkin T.A., 2000, Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos in vivo and in vitro: effects on nuclear transcription factors involved in cell replication and differentiation, *Brain Res*. 857(1-2):87–98.

Cunha T.J., 1991, In *Horse Feeding and Nutrition*. 2nd Ed. New York: Academic Press.

Čupić Miladinović D., Borozan S., Ivanović S., 2018, Involvement of cholinesterases in oxidative stress induced by chlorpyrifos in brain of Japanese quails, *Poultry science*. 97:1564–1571.

Čupić V., Ivanović S., 2018, *Bojni otrovi*. Naučna KMD, Beograd.

Curtin J.F., 2002, Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J Immunol Methods* 265:49-72.

Dam K., Garcia S.J., Seidler F.J., Slotkin T.A., 1999, Neonatal chlorpyrifos exposure alters synaptic development and neuronal activity in cholinergic and catecholaminergic pathways, *Brain Res Dev Brain Res*. 116(1):9-20.

Dam K., Seidler F.J., Slotkin T.A., 2000, Chlorpyrifos exposure during a critical neonatal period elicits gender-selective deficits in the development of coordination skills and locomotor activity, *Brain Res Dev Brain Res*. 121(2):179-87.

Darvesh S., Hopkins D.A., Geula C., 2003, Neurobiology of butyrylcholinesterase, *Nat Rev Neurosci*. 4:131-8.

Das K.P., Barone S.Jr., 1999, Neuronal differentiation in PC12 cells is inhibited by chlorpyrifos and its metabolites: is acetylcholinesterase inhibition the site of action? *Toxicol Appl Pharmacol*. 160(3):217-30.

Deb N., and Das S., 2013, Chlorpyrifos Toxicity in Fish: A review, *Curr World Environ* 8:77–84.

Del Rio D., Stewart A., Pellegrini N., 2005, A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress, *Nutr Metab Cardiovasc*. 15:316-28.

Delany S., and Scott D.A., 2002, *Waterbird Population Estimates*. 3rd Edn., Wetland International, Wageningen, Netherlands.

Demir F., Uzun F.G., Durak D., Kalender Y., 2011, Subacute chlorpyrifos-induced oxidative stress in rat erythrocytes and the protective effects of catechin and quercetin, *Pestic Biochem Physiol*. 99:77–81.

Deng Y., Zhang Y., Lu Y., Zhao Y., Ren H., 2016, Hepatotoxicity and nephrotoxicity induced by the chlorpyrifos and chlorpyrifos-methyl metabolite, 3,5,6-

trichloro-2-pyridinol, in orally exposed mice, *Science of the Total Environment*. 544:507–514.

Denisov E.T., Afanasev I.B., 2005, *Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology*, Boca Raton, London, New York, Singapore: Taylor & Francis group.

Deribe E., Rosseland B.O., Borgstrøm R., Salbu B., Gebremariam Z., Dadebo E., Norli H.R., Eklo O.M., 2011, Bioaccumulation of persistent organic pollutants (POPs) in fish species from Lake Koka, Ethiopia: the influence of lipid content and trophic position, *Sci Total Environ*. 410-411:136-45.

Desagher S., Glowinski J., and Premont J., 1997, Pyruvate protects neurons against hydrogen peroxide-induced toxicity, *J Neurosci*. 17:9060–9067.

Di Meo S., Reed T.T., Venditti P., Victor V.M., 2016, Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions, *Oxid Med Cell Longev*. Volume 2016, Article ID 12450, 44 pages.

Dianzani M., Barrera G., 2008, Pathology and physiology of lipid peroxidation and its carbonyl products, In: Alvarez S., Evelson P., (Eds.), *Free Radical Pathophysiology*. Transworld Research Network, Kerala, India, 19-38.

Đukić M., 2008, Oksidativni stres - Kliničko dijagnostički značaj, Beograd, *Mono i Manjana*.

EBCC, 2008. European wild bird indicators. European Bird Census Council.

EC, 2005, Review report for the active substance chlorpyrifos. SANCO/3059/99 - rev.1.5. Health and Consumer Protection Directorate-General, European Commission. Eckerson H.W., Wyte C.M., and La Du B.N., 1983, The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am J Hum Genet*. 35(6):1126–1138.

Eddleston M., and Chowdhury F.R., 2016, Pharmacological treatment of organophosphorus insecticide poisoning: the old and the (possible) new, *Br J Clin Pharmacol*. 81(3):462-70.

Eddleston M., Szimicz L., Eyer P., and Buckley N., 2002, Oximes in acute organophosphorus pesticide poisoning: a systemic review of clinical trials, *Qjm*. 95(5):275-283.

Eddleston M., Clark R.F., 2011, Insecticides: organic phosphorus compounds and carbamates. In: Goldfrank's Toxicologic Emergences. McGraw Hill Medica. London, 1450-1466.

Edwards K.A., Tu-Maung N., Cheng K., Wang B., Baeumner A.J., and Kraft C.E., 2017, Thiamine Assays—Advances, Challenges, and Caveats, *ChemistryOpen*. 6:178 – 191.

Edwin EE., Markson, L.M., Jackman R., 1982, The aetiology of cerebrocortical necrosis: the role of thiamine deficiency and of deltapyrrolinium, *Brit Vet J*. 138:337-349.

Eiserich J.P., Hristova M., Cross C.E., Jones A.D., Freeman B.A., Halliwell B., van der Vliet A., 1998, Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils, *Nature*. 391:393-397.

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

Elsharkawy E.E., Yahia D., El-Nisr N.A., 2013, Sub-chronic exposure to chlorpyrifos induces haematological, metabolic disorders, and oxidative stress in rat: attenuation by glutathione, *Environ Toxicol Pharmacol*. 35(2):218-27.

Eskes C., Honegger P., Juillerat-Jeanneret L., Monnet-Tschudi F., 2002, Microglial reaction induced by noncytotoxic methylmercury treatment leads to neuroprotection via interactions with astrocytes and IL-6 release, *Glia*. 37(1):43–52.

Essumang D.K., Togoh G.K., Chokky L., 2009, Pesticide residues in the water and fish (lagoon tilapia) samples from lagoons in Ghana, *Bull Chem Soc Ethiop*. 23(1):19-27.

Ezeji E.U., Anyalogbu E.A., Ezejiofor T.N., Udensi U.J., 2012, Determination of reduced glutathione and glutathione S-transferase of poultry birds exposed to permethrin insecticide, *American Journal of Biochemistry*. 2(3):21-24.

Farag A.T., Radwan A.H., Sorour F., El Okazy A., El-Agamy E.S., El-Sebae A.E-K., 2010, Chlorpyrifos induced reproductive toxicity in male mice, *Reprod Toxicol*. 29(1):80-5.

Farahat M.F., Ellison C.A., Bonner M.R., McGarrigle B.P., Crane A.L., Fenske R.A., Lasarev M.R., Rohlman D.S., Kent Anger W.K., Lein P.J., James R., and Olson J.R., 2011, Biomarkers of Chlorpyrifos Exposure and Effect in Egyptian Cotton Field Workers, *Environmental Health Perspectives*. 119(6):801-6.

Feretti G., Bacchetti T., Negre-Salvayre A., Salvayre R., Dousset N., Curatola G., 2006, Structural modifications of HDL and functional consequences, *Atherosclerosis*. 184:1-7.

Finkel T., 2003, Oxidant signals and oxidative stress, *Current Opinion in Cell Biology*. 15(2):247-254.

Flaskos J., 2012, The developmental neurotoxicity of organophosphorus insecticides: A direct role for the oxon metabolites, *Toxicol Lett*. 209(1):86-93.

Fleischli M.A., Franson J.C., Thomas N.J., Finley D.L. and Riley W., 2004, Avian mortality events in the United States caused by anticholinesterase pesticides: A retrospective summary of national wildlife health center records from 1980 to 2000, *Arch Environ Contam Toxicol*. 46:542-550.

Florence T.M., and Stanber J.L., *Sci Total Environ*. 1989; 78: 233-240.

Forghani R., Wojtkiewicz G.R., Zhang Y., Seeburg D., Bautz B.R., Pulli B., Milewski A.R., Atkinson W.L., Iwamoto Y., Zhang E.R., Etzrodt M., Rodriguez E., Robbins C.S., Swirski F.K., Weissleder R., Chen J.W., 2012, Demyelinating diseases: myeloperoxidase as an imaging biomarker and therapeutic target, *Radiology*. 263(2):451-460.

Foyer C.H., Noctor G., 2005, Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context, *Plant Cell Environ*. 28:1056–1071.

Frank R.A., Leeper F.J., Luisi B.F., 2007, Structure, mechanism and catalytic duality of thiamine-dependent enzymes, *Cell Mol Life Sci*. 64(7-8):892-905. Review.

Frank L.L., 2015, Thiamin in Clinical Practice, *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. 39(5):503–520.doi:10.1177/0148607114565245.

Fukai T., and Ushio-Fukai M., 2011, Superoxide dismutases: Role in redox signaling, vascular function, and diseases, *Antioxid Redox Sign*. 15:1583–1606.

Furlong C.E., Cole T.B., Jarvik G.P., Pettan-Brewer C., Geiss G.K., Richter R.J., Shih D.M., Tward A.D., Lusi A.J., Costa L.G., 2005, Role of paraoxonase (PON1) status in pesticide sensitivity: genetic and temporal determinants, *Neurotoxicology*. 26(4):651-9.

- Gabrowny K., Farag E.M., and Sallam A.A.A., 2007, Involvement of paraoxonase (PON) in oxidative stress induced by chlorpyrifos in albino rats, *J Egypt Soc Toxicol.* 37:71–86.
- Galijašević S., 2013, Myeloperoxidase Interactions with Nitric Oxide: A Review of Mechanistic Pathways, *Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina.* 40:1-8.
- Galloway T., Handy R., 2003, Immunotoxicity of organophosphorous pesticides, *Ecotoxicology.* 12(1-4):345-63.
- Gan K.N., Smolen A., Eckerson H.W., and La Du B.N., 1991, Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities, *Drug Metab Dispos* 19:100–106.
- Garcia S.J., Seidler F.J., Qiao D., Slotkin T.A., 2002, Chlorpyrifos targets developing glia: effects on glial fibrillary acidic protein, *Brain Res Dev Brain Res.* 133(2):151-61.
- Gaut J.P., Heinecke J.W., 2001, Mechanisms for oxidizing low-densitylipoprotein: insights from patterns of oxidation products in the artery walland from mouse models of atherosclerosis, *Trends Cardiovasc Med.* 11:103–112.
- Ghisari M., Bonefeld-Jorgensen E.C., 2005, Impact of environmental chemicals on the thyroid hormone function in pituitary rat GH3 cells, *Mol Cell Endocrinol.* 244(1-2):31-41.
- Gibson G.E., Zhang H., 2002, Interactions of oxidative stress with thiamine homeostasis promote neurodegeneration, *Neurochemistry International.* 40:493–504.
- Gill S.S., Tuteja N., 2010, Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants, *Plant Physiol Biochem.* 48:909-930.
- Gómez L.A., Hagen T.M., 2012, Age-related decline in mitochondrial bioenergetics: Does supercomplex destabilization determine lower oxidative capacity and higher superoxide production? *Semin Cell Dev Biol.* 23:758-67.
- Gotoh M., Saito I., Huang J., Fukaya Y., Matsumoto T., Hisanaga N., Shibata E., Ichihara G., Kamijima M., Takeuchi Y., 2001, Changes in cholinesterase activity, nerve conduction velocity, and clinical signs and symptoms in termite control operators exposed to chlorpyrifos, *J Occup Health.* 43(3):157-64.
- Green D.R., Reed J.C., 1998, Mitochondria and Apoptosis, *Science,* 281(5381):1309-1312. doi: 10.1126/science.281.5381.1309.
- Gries C.L., Scott M.L., 1972, The pathology of thiamin, riboflavin, panthotenic acid, and niacin deficiencis in the chick, *J Nutr.* 102:1269-1285.
- Grigoryan H., Lockridge O., 2009, Nanoimages show disruption of tubulin polymerization by chlorpyrifos oxon: Implications for neurotoxicity, *Toxicol Appl Pharmacol.* 240(2):143-8.
- Grue C.E., Gibert P.L., and Seeley M.E., 1997, Neurophysiological and behavioral changes in non-target wildlife exposed to organophosphate and carbamate pesticides: Thermoregulation, food consumption and reproduction, *Am Zool.* 37:369-388.
- Grue C.E., Hart A.D.M., and Mineau P., 1991, Biological Consequences of Depressed Brain Cholinesterase Activity in Wildlife, In: *Cholinesterase Inhibiting Insecticides*, Mineau, P. (Ed.). Elsevier Science, Netherland, 151-209.
- Grue C.E., and Shipley B.K., 1984, Sensitivity of nestling and adult starlings to dicrotophos, An organophosphate pesticide, *Environ Res.* 35:454-465.

Grue C.E., 1982, Response of common grackles to dietary concentrations of four organophosphate pesticides, *Arch Environ Contam Toxicol.* 11:617-626.

Gruys E., Toussaint M.J.M., Niewold T.A., Koopmans S.J., 2005, Acute phase reaction and acute phase proteins, *J Zhejiang Univ Sci.* 6b(11):1045-1056.

Gu B., Desjardins P., and Butterworth R.F., 2008, Selective increase of neuronal cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in vulnerable brain regions of rats with experimental Wernicke's encephalopathy: effect of nimesulide, *Metabolic Brain Disease.* 23(2):175-187.

Guevara I., Iwanejko J., Dembinska-Kiec A., Pankiewicz J., Wanat A., Anna P., Golabek I., Bartus S., Malczewska-Malec M., Szczudlik A., 1998, Determination of nitrite/ nitrate in human biological material by the simple Griess reaction, *Clin Chim Acta.* 274(2):177-188.

Guimaraes C.A., and Linden R., 2004, Programmed cell death. Apoptosis and alternative deathstyles, *Eur J Biochem.* 271:1638-1650.

Gunther F.A.(Ed.), 1974, *Residue Reviews*, Springer-Verlag, New York Inc. doi:10.1007/978-1-4615-8501-5.

Gupta R.C., 2009, *Veterinary Toxicology. Basic and Clinical Principles.* Elseviere.

Habig W.H., Cabot M.J., Jarkoby W.B., 1974, Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation, *J Biol Chem.* 249:7130-7139.

Hakim A.M., 1984, The induction and reversibility of cerebral acidosis in thiamine deficiency, *Ann Neurol.* 16(6):673-9.

Halliwell B., Gutteridge J.M., 1999, *Free Radicals in Biology and Medicine.* 3rd ed. New York: Oxford University Press, Oxford, 140-84.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C., 2007, *Free Radical Biology and Medicine.* 4 izdanje. Oxford Univ. Press, London.

Halliwell B., and Aruoma. O.I., 1991, DNA damage by oxygen-derived species: its mechanism and measurement in mammalian systems, *FEBS Lett.* 281:9-19.

Harisa G.I., 2013, Benfotiamine Enhances Antioxidant Defenses and Protects against Cisplatin-Induced DNA Damage in Nephrotoxic Rats, *J Biochem Mol Toxicol* 27:398-405.

Hart A.D.M., 1993, Relationships between behavior and the inhibition of acetylcholinesterase in birds exposed to organophosphorus pesticides, *Environ Toxicol Chem.* 12:321-336.

Hatfield M.J., Umans R.A., Hyatt J.L., Edwards C.E., Wierdl M., Tsurkan L. Taylor M.R., Potter P.M., 2016, Carboxylesterases. General detoxifying enzymes, *Chem Biol Interact.* 259:327-331.

Hazzell A.S., Faim S., Wertheimer G., Silva V.R., Marques C.S., 2013, The impact of oxidative stress in thiamine deficiency: a multifactorial targeting issue, *Neurochem Int.* 62(5):796-802.

Heikal T.M., Mossa A.H., Ibrahim A.W., Abdel-Hamid H.F., 2014, Oxidative damage and reproductive toxicity associated with cyromazine and chlorpyrifos in male rats: the protective effects of green tea extract, *Research Journal of Environmental Toxicology.* 8(2):53-67.

Heinova D., Kostecka Z., Csank T., 2016, Separation of turkey lactate dehydrogenase isoenzymes using isoelectric focusing technique, *Electrophoresis.* 37:335-338.

Hengartner M.O., 2000, The biochemistry of apoptosis, *Nature.* 407:770-776.

Hill E.F., 1992, Avian Toxicology of Anticholinesterases. In: Clinical and Experimental Toxicology of Organophosphates and Carbamates, Ballantyne B., and Marrs T.C. (Eds.), Butterworth Heinemann Ltd., Oxford, 272-294.

Hill E.F., 2003, Wildlife Toxicology of Organophosphorous and Carbamate Pesticides. In: Handbook of Ecotoxicology, Hoffman, D.J., Rattner B.A., Burton G.A. Jr. and Cairns J. (Eds.). 2nd Edn., Lewis Publishing Co., Boca Raton, FL., 281-312.

Hodgson E., Rose R.L., 2008, Metabolic interactions of agrochemicals in humans, *Pest Manag Sci.* 64(6):617-21.

Holcombe G.W., Phipps G.L., Tanner D.K., 1982, The acute toxicity of kelthane, dursban, disulfoton, pydrin, and permethrin to fathead minnows *Pimephales promelas* and rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Environ Pollut.* 29(3):167-78.

Horecker B.L., 2002, The pentose phosphate pathway, *J Biol Chem.* 277(50):47965-71.

Howard A.S., Bucelli R., Jett D.A., Bruun D., Yang D.R., Lein P.J.. Chlorpyrifos exerts opposing effects on axonal and dendritic growth in primary neuronal cultures. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005; 207(2):112-24.

Husseina R.M., Mohamedb W.R., Omara H.A., 2018, A neuroprotective role of kaempferol against chlorpyrifos-induced oxidative stress and memory deficits in rats via GSK3 β -Nrf2 signaling pathway, <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.08.008>.

ICAMA, 2012, China Pesticide Information Network, Institute for the Control of Agrochemicals, Ministry of Agriculture, P.R. China.

Ighodato O.M., Akinloye O.A., 2018, First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid, *Alexandria Journal of Medicine.* 54(4):287-293.

IUPAC, 2012, Pesticide Properties Database. International Union of Pure and Applied Chemistry.

Jairami V., Uchida K., and Narayanaswami V., 2012, Pathophysiology of Lipoprotein Oxidation, *Lipoproteins - Role in Health and Diseases*, Frank S., and Kostner G., IntechOpen, DOI: 10.5772/50622. Available from: <https://www.intechopen.com/books/>.

Jameson R.R., Seidler F.J., Qiao D., Slotkin T.A., 2006, Chlorpyrifos affects phenotypic outcomes in a model of mammalian neurodevelopment: critical stages targeting differentiation in PC12 cells, *Environ Health Perspect.* 114(5):667-72.

Jankowska-Kulawy A., Bielarczyk H., Pawełczyk T., Wróblewska M., Szutowicz A., 2010, Acetyl-CoA and acetylcholine metabolism in nerve terminal compartment of thiamine deficient rat brain, *Journal of Neurochemistry.* 115(2):333-342. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06919.x

Jelenković A., Jovanović M., Ninković M., Maksimović M., Bošković B., 2005, Total anaesthesia, rats, brain surgery, nitric oxide (NO) and free radicals, *Acta Vet. Beograd,* 55:375-83.

Jeon H., Lee Y., Mo H., Kim M., Al-Wabel M.I., Kim Y., Cho K., Kim T., Sik Ok Y., Lee S., 2014, Chlorpyrifos-induced biomarkers in Japanese medaka (*Oryzias latipes*), *Environ Sci Pollut Res.* DOI 10.1007/s11356-015-4598-0.

Jeong S.H., Kim B.Y., Kang H.G., Ku H.O., Cho J.H., 2006, Effect of chlorpyrifos-methyl on steroid and thyroid hormones in rat F0- and F1-generations, *Toxicology.* 220(2-3):189-202.

Jergentz S., Mugni H., Bonetto C., Schulz R., 2005, Assessment of insecticide contamination in runoff and stream water of small agricultural streams in the main soybean area of Argentina, *Chemosphere*. 61(6):817-26.

Jia Y., and Alayash A.I., 2013, Molecular Basis of Haptoglobin and Hemoglobin Complex Formation and Protection against Oxidative Stress and Damage, *Selected Topics in Nanomedicine*. 149-168.

Jin Y., Liu Z., Peng T., Fu Z., 2015, The toxicity of chlorpyrifos on the early life stage of zebrafish: A survey on the endpoints at development, locomotor behavior, oxidative stress and immunotoxicity, *Fish & Shellfish Immunology*. 43(2):405–414. doi:10.1016/j.fsi.2015.01.010

Jokanović M., 2001, Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicol*. 166:139-60.

Jones P.T., and Anderson R., 1983, *Int J Immunopharmacol*. 5(5):377-389.

Jozefczak M., Remans T., Vangronsveld J., and Cuypers A., 2012, Glutathione is a key player in metal-induced oxidative stress defenses. *Int J Mol Sci*. 2012(13):3145-75.

Kale M., Rathore N., John S., Bhatnagar D., 1999, Lipid peroxidative damage on pyrethroid exposure and alterations in antioxidant status in rat erythrocytes: a possible involvement of reactive oxygen species. *Toxicol Lett*. 105:197–205.

Kalender Y., Kaya S., Durak D., Uzun F.G., Demir F., 2012, Protective effects of catechin and quercetin on antioxidant status, lipid peroxidation and testis-histoarchitecture induced by chlorpyrifos in male rats, *Environ Toxicol Pharmacol*. 33(2):141-8.

Kamm P.C.A., and Ferch N.I., 2000, Apoptosis: mechanisms and clinical implications, *Anaesthesia*. 55:1081-1093.

Kamrin M.A., 1997, *Pesticide Profiles Toxicity. Environmental Impact and Fate*, Lewis Publishers: Boca Raton FL. 147-152.

Karanth S., Pope C., 2000, Carboxylesterase and A-esterase activities during maturation and aging: relationship to the toxicity of chlorpyrifos and parathion in rats, *Toxicological sciences* 58:282-289.

Kavitha P., and Rao J.V., 2008, Toxic effects of chlorpyrifos on antioxidant enzymes and target enzyme acetylcholinesterase interaction in mosquito fish, *Gambusia affinis*, *Environ Toxicol Pharmacol*. 26:192–198.

Kettle A.J., and Winterbourn C.C., 1989, Influence of superoxide on myeloperoxidase kinetics measured with a hydrogen peroxide electrode, *Biochem J*. 263: 823–828.

Khalil A.M., 2015, Toxicological effects and oxidative stress responses in fresh water snail, *Lanistes carinatus*, following exposure to chlorpyrifos, *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 116:137–142.

Khan S.M., and Kour G., 2007, Subacute oral toxicity of chlorpyrifos and the protective effect of green tea extract, *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 89:118–123.

Ki Y., Parka J.H., Lee J.E., Shina I.C., Koh H.C., 2013, JNK and p38 MAPK regulate oxidative stress and the inflammatory response in chlorpyrifos-induced apoptosis, *Toxicol Lett*. 218:235– 245.

Kishimoto T., Akira S., Narazaki M., Taga T., 1995, Interleukin-6 family of cytokines and gp130, *Blood*. 86:1243-54.

Klaunig J.E., Kamendulis L.M., Hoyer B.A., 2010, Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis, *Toxicologic Pathology*. 38:96–109.

Kopjar N., Žunec S., Mendaš G., Micek V., Kašuba V., Mikolić A., Lovaković B. T., Milić M., Pavičić I., Marjanović Čermak A. M., Pizent A., Lucić Vrdoljak A., Želježić D., 2018, Evaluation of chlorpyrifos toxicity through a 28-day study: Cholinesterase activity, oxidative stress responses, parent compound/metabolite levels, and primary DNA damage in blood and brain tissue of adult male Wistar rats, *Chemico-Biological Interactions*. 279:51–63.

Krummer S., Thiermann H., Worek F., Eyer P., 2002, Equipotent cholinesterase reactivation in vitro by the nerve agent antidotes HI 6 dichloride and HI 6 dimethanesulfonate, *Arch Toxicol*. 76:589–595.

Kruse M., 2004, Increased brain endothelial nitric oxide synthase expression in thiamine deficiency: relationship to selective vulnerability, *Neurochemistry International*. 45(1):49–56. doi:10.1016/j.neuint.2003.12.007

Kuenzel W.J., 1994, Central neuroanatomical systems involved in the regulation of food intake in birds and mammals, *J Nutr*. 124:1355S-1370S.

Kulka M., 2016, A review of paraoxonase 1 properties and diagnostic applications, *Pol J Vet Sci*. 19:225-32.

Laemmli U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*. 227:680-685.

Laguerre M., Lecomte J., Villeneuve P., 2007, Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Prog Lipid Res*. 46(5):244-282.

Lahouel A., Kebieche M., Lakroun Z., Rouabhi R., Fetoui H., Chtourou Y., Djamila Z., Soulimani R., 2015, Neurobehavioral deficits and brain oxidative stress induced by chronic low dose exposure of persistent organic pollutants mixture in adult female rat, *Environ Sci Pollut Res*. DOI 10.1007/s11356-016-6913-9.

Langlais P.J., Anderson G., Guo S.X., and Bondy S.C., 1997, Increased Cerebral Free Radical Production During Thiamine Deficiency, *Metab Brain Dis*. 12(2):137-143.

Langlais, P.J., and Zhang, S.X., 1997, Cortical and Subcortical White Matter Damage without Wernicke's Encephalopathy after Recovery from Thiamine Deficiency in the Rat, *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 21(3):434–443.

Lassiter TL, Brimijoin S., 2008, Rats gain excess weight after developmental exposure to the organophosphorothionate pesticide, chlorpyrifos, *Neurotoxicol Teratol*. 30(2):125-30.

Layer P.G., 1991, Cholinesterases during development of the avian nervous system, *Cell Mol Neurobiol*. 11:7–33.

Lazarević-Pašti T., Momić T., Radojević M.M., and Vasić V., 2013, Influence of organophosphorus pesticides on peroxidase and chlorination activity of human myeloperoxidase, *Pestic Biochem Physiol*. 107:55–60.

Lee J.E., Park J.H., Shin I.C., Koh H.C., 2012, Reactive oxygen species regulated mitochondria-mediated apoptosis in PC12 cells exposed to chlorpyrifos, *Toxicol Appl Pharmacol*. 263(2):148-62.

Levin E.D., Addy N., Nakajima A., Christopher N.C., Seidler F.J., Slotkin T.A., 2001, Persistent behavioral consequences of neonatal chlorpyrifos exposure in rats, *Brain Res Dev Brain Res*. 130(1):83-9.

Li Q., Chen M., Liu H., Yang L., Yang T., Yang G., He G., 2014, The dual role of ERK signaling in the apoptosis of neurons, *Front Biosci*. 19:1411-1417.

Li Q., Kobayashi M., Kawada T., 2009, Chlorpyrifos induces apoptosis in human T cells. *Toxicology*. 255(1-2):53-7.

- Litchfield J.T., and Wilcoxon F., 1949, A simplified method of evaluating dose-effect experiments, *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 96(2):99-113.
- Livingston M.L., 1952, Parathion poisoning in geese. *J Am Vet Med Assoc.* 120: 27-28.
- López-Granero C., Cañadas F., Cardona D., Yu Y., Giménez E., Lozano R., Avila D.S., Aschner M., and Sánchez-Santed F., 2013, Chlorpyrifos-, Diisopropylphosphorofluoridate-, and Parathion-Induced Behavioral and Oxidative Stress Effects: Are They Mediated by Analogous Mechanisms of Action? *Toxicol sci.* 131(1):206–216.
- Lowry O.H., Roseberg N.J., Farr A.L., Randell R.J., 1951, Protein measurement with Folin phenol reagent, *J Biol Chem.* 193:265-75.
- Lu J.L., 2010, Multipesticide residue assessment of agricultural soil and water in major farming areas in Benguet, Philippines. *Arch Environ Contam Toxicol.* 59(2):175-81.
- Łukaszewicz-Hussain A., 2011, Activities of brain antioxidant enzymes, lipid and protein peroxidation, *Cent Eur J Med.* 6:588–594.
- Lukienko P.I., Melnichenko N.G., Zverinskii I.V., and Zabrodskaya S.V., 2000, Antioxidant properties of thiamine, *Bulletin Exp Biol Med.* 130(9):874-876.
- Luzzatto L., Roper D., 1995, Investigation of the hereditary haemolytic anaemias: membrane and enzyme abnormalities, In: Dacie J.V., Lewis J.M. (Eds.), *Practical Haematology*, 6th Ed. Churchill Livingstone, London, 215–247.
- Lykkesfeldt J., and Svendsen O., 2007, Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals, *Vet J.* 173(3):502–511.
- Ma Q., and Lu A.Y., 2011, Pharmacogenetics, Pharmacogenomics and Individualized Medicine, *Pharmacol Rev.* 63:437-459.
- Ma P., Wu Y., Zeng Q., Gan Y., Chen J., Ye X., and Yang X., 2013, Oxidative damage induced by chlorpyrifos in the hepatic and renal tissue of Kunming mice and the antioxidant role of vitamin E, *Food Chem Toxicol.* 58:177–183.
- Macmillan-Crow L.E., and Cruthirds D.L., 2001, Manganese superoxide dismutase in disease, *Free Radic Res.* 34:325-336.
- Madison W.I., 1993, A decade (1980-1990) of organophosphorous and carbamate related mortality in migratory birds, U.S. Fish and Wildlife Services, National Wildlife Health Research Center.
- Madrigal J.L.M., Garcia-Bueno B., Moro M.A., Lizasoain I., Lorenzo P., Leza J.C., 2013, Relationship between cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase-2 in rat cortex after stress, *European Journal of Neuroscience.* 18(6):1701–1705.
- Maianski N.A., Maianski A.N., Kuijpers T.W., Roos D., 2004, Apoptosis of neutrophils, *Acta Haematol.* 11:56-66.
- Maitra S.K., and Sarkar R., 1996, Influence of methyl parathion on gametogenic and acetylcholinesterase activity in the testis of whitethroated munia (*Lonchura malabarica*), *Arch Environ Contam Toxicol.* 30:384-389.
- Maity S., Rajkumar A., Matai L., Bhat A., Ghosh A., Agam G., Kaur S., Bhatt N.R., Mukhopadhyay A., Sengupta S., Chakraborty K., 2016, Oxidative Homeostasis regulates the Response to Reductive Endoplasmatic Reticulum Stress through Translation Control, *Cell Rep.* 16(3):851-865.
- Malhat F., Nasr I., 2011, Organophosphorus pesticides residues in fish samples from the River Nile tributaries in Egypt, *Bull Environ Contam Toxicol.* 87(6):689-92.

Mann T., and Keilin D., 1938, Haemocuprein and hepatocuprein, copper-protein compounds and liver in mammals, Proceeding of royal society of London series B, Biological Sci. 126:303-315.

Mansour S.A., Mossa A.T.H., 2009, Lipid peroxidation and oxidative stress in rat erythrocytes induced by chlorpyrifos and the protective effect of zinc. *Pestic Biochem Physiol.* 93(1):34-9.

Marín-García J., 2007, chapter 8-Molecular Basis of Lipoprotein Disorders, Atherogenesis, and Thrombosis, *Post-Genomic Cardiology*. Pages 211-260.

Marrs T.C., 2001, Organophosphates: History, Chemistry, Pharmacology. In: *Organophosphates and health*. Imperial College Press, London, 1-36.

Marsillach J., Costa L.G., Furlong C.E., 2013, Protein adducts as biomarkers of exposure to organophosphorus compounds, *Toxicology.* 307:46–54.

Masson P., 2011, Evolution of and perspectives on therapeutic approaches to nerve agent poisoning, *Toxicol Lett.* 206:5-13.

Matsuda T., and Cooper J.R., 1981, Thiamine As An Integral Component Of Brain Synaptosomal Membranes, *Proc Natl Acad Sci. USA.* 78(9):5886-5889.

McConnell L.L., LeNoir J.S., Datta S., Seiber J.N., 1998, Wet deposition of current-use pesticides in the Sierra Nevada mountain range, California, USA, *Environ Toxicol Chem.* 17(10):1908-16.

McCord J.M., and Fridovich I., 1969, Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocuprein (Hemocuprein), *J Biol Chem.* 244:6049-6055.

Medina-Diaz I.M., Ponce-Ruiz N., Ramirez-Chavez B., Rojas-Garcia A.E., Barron-Vivanco B.S., Elizondo G., Bernal-Hernandez Y.Y., 2017, Downregulation of Human Paraoxonase 1 (PON1) by Organophosphate Pesticides in HepG2 Cells, *Environ Toxicol.* 32:490–500.

Meeker J.D., Ravi S.R., Barr D.B., Hauser R., 2008, Circulating estradiol in men is inversely related to urinary metabolites of nonpersistent insecticides, *Reprod Toxicol.* 25(2):184-91.

Mehta A., Verma S.R., and Srivastava N., 2009, Chlorpyrifos induced alterations in the levels of hydrogen peroxide, nitrate and nitrite in rat brain and liver, *Pestic. Biochem Physiol.* 94:55–59.

Meire R.O., Lee S.C., Yao Y., Targino A.C., Torres J.P.M., Harner T., 2012, Seasonal and altitudinal variations of legacy and current-use pesticides in the Brazilian tropical and subtropical mountains, *Atmos Environ.* 59:108-16.

Melnichenko N.G., Zverinsky I.V., Artsukevich I.M., and Lukienko P.I., 1999, Participation of peroxidase reaction in thiamin catabolism, *Exp Toxicol Pathol.* 51:389-391.

Meyers J.S., Quenzer L.F., 2005, *Psychopharmacology: Drugs, The Brain, and Behavior*, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, USA.

Middlemore-Risher M.L., Buccafusco J.J., Terry A.V. Jr., 2010, Repeated exposures to low-level chlorpyrifos results in impairments in sustained attention and increased impulsivity in rats, *Neurotoxicol Teratol.* 32(4):415-24.

Miller K.P., Borgeest C., Greenfeld C., Tomic D., Flaws J.A., 2004, In utero effects of chemicals on reproductive tissues in females. *Toxicol Appl Pharmacol.* 198(2):111-31.

Minson D.J., 1990, *In Forage in Ruminant Nutrition*. Academic Press. Inc., San Diego.

Mirić M., Dragojević I., Kisić B., Biševac B., Filipović S., Marjanović J., Dejanović M., 2015, Hlorinišuća aktivnost serumske mijeloperoksidaze u akutnom ishemičnom moždanom udaru, *Praxis medica*. 44 (1):1-6.

Mongi S., Hmida I.B., Kammoun W., Rebah F.B., Jamoussi K., El Feki A., 2018, Protective effects of fish oil of *Sardinella pilchardis* against subacute chlorpyrifos induced oxidative stress in female rats, *Arch Environ Occup Health*, 73(2):128-135.

Morris G.P., Clark I.A., Zinn R., Vissel B., 2013, Microglia: a new frontier for synaptic plasticity, learning and memory, and neurodegenerative disease research, *Neurobiol Learn Mem*. 105:40-53.

Moser V.C., Phillips P.M., McDaniel K.L., Marshall R.S., Hunter D.L., Padilla S., 2005, Neurobehavioural effects of chronic dietary and repeated high-level spike exposure to chlorpyrifos in rats, *Toxicol Sci*. 86(2):375-86.

Moye J.K., Pritsos C.A., 2010, Effects of chlorpyrifos and aldicarb on flight activity and related cholinesterase inhibition in homing pigeons, *Columba livia*: potential for migration effects, *Bull Environ Contam Toxicol*. 84(6):677-681.

Mulholland P.J., 2006, Susceptibility of the cerebellum to thiamine deficiency. *Cerebellum*. 5(1):55-63.

Muller E.E., Nistico G., and Scapagnini V., 1977, Neurotransmitters and Anterior Pituitary Function. Academic Press, New York, 277-278.

Muminović M., Alibegović-Zečić F., Mujezinović I., Smajlović A., Crnkić Ć., Ajanović A., 2006, Nutriciona farmakologija domaćih životinja, Veterinarski fakultet, Univerziteteta u Sarajevu.

Muñoz D., Bonner P.L., Hargreaves A.J., 2010, Effects of chlorpyrifos on transglutaminase activity in differentiating rat C6 glioma cells. *Toxicol in Vitro*. 24(8):2104-7.

Muñoz-Quezada M.T., Iglesias V., Lucero B., Steenland K., Barr D.B., Levy K., Ryan P.B., Alvarado S., Concha C., 2012, Predictors of exposure to organophosphate pesticides in schoolchildren in the Province of Talca, Chile. *Environ Int*. 47:28-36.

Murata H., Shimada N. and Yoshioka M., 2004, Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: An overview, *Vet J*. 168:28-40.

Muto M.A., Lobelle F. Jr., Bidanset J.H., Wurlpel J.N., 1992, Embryotoxicity and neurotoxicity in rats associated with prenatal exposure to dursban. *Vet Hum Toxicol*. 34(6):498-501.

Nandi D., Patra R.C., Swarup D., 2005, Effect of cysteine, methionine, ascorbic acid and thiamine on arsenic-induced oxidative stress and biochemical alterations in rats, *Toxicology*. 211(1-2):26-35.

Narra M.R., Rajender K., Reddy R.R., Murty U.S., and Begum G., 2017, Insecticides induced stress response and recuperation in fish: Biomarkers in blood and tissues related to oxidative damage, *Chemosphere*. 168:350-357.

Narvaez C., Rios J.M., Piriz G., Sanchez-Hernandez J.C., Sabat P., 2016, Subchronic exposure to chlorpyrifos affects energy expenditure and detoxification capacity in juvenile Japanese quails, *Chemosphere*. 144:775-784.

Navab M., Berliner J.A., Subbanagounder G., Hama S., Lusic A.J., Castellani L.W., Reddy S., Shih D., Shi W., Watson A.D., Van Lenten B.J., Vora D., Fogelman A.M., 2001, HDL and the inflammatory response induced by LDL-derived oxidized phospholipids, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 21:481-488.

Navarro H.A., Basta P.V., Seidler F.J., Slotkin T.A., 2001, Neonatal chlorpyrifos administration elicits deficits in immune function in adulthood: a neural effect? *Brain Res Dev Brain Res.* 130(2):249-52.

Newton I., and Wyllie I., 1992, Recovery of a sparrowhawk population in relation to declining pesticide contamination, *J Applied Ecol.* 29:476-784.

Nicolaus L.K., and Lee H., 1999, Low acute exposure to organophosphate produces long-term changes in bird feeding behaviour, *Ecol Appl.* 9:1039-1049.

Nishi K., Hundal S.S., 2013, Chlorpyrifos induced toxicity in reproductive organs of female Wistar rats, *Food Chem Toxicol.* 62:732-738.

NMFS (National Marine Fisheries service), 2008, Endangered species act section 7 consultation. Biological opinion. Environmental protection agency registration of pesticides containing chlorpyrifos, diazinon and malathion. National Marine Fisheries service, Silver Spring.

Novak F., Vavrova L., Kodydkova J., Novak F.S., Hynkova M., Zak A., Novakova O., 2010, Decreased paraoxonase activity in critically ill patients with sepsis, *Clin Exp Med.* 10:21-25.

NPIC, 2009, Chlorpyrifos. Chlorpyrifos Technical Factsheet. National Pesticide Information Center, Oregon State University, Corvallis. Technical Fact Sheet.

NRA 2000, Chlorpyrifos. NRA Review Series 00.5. Canberra. Australia.

NRA, 2000b. Section 6. Environmental Assessment. National Registration Authority for Agricultural and Veterinary Chemicals, Canberra.

NZ EPA. 2012, Chlorpyrifos. Classification. New Zealand Environmental Protection Authority, Wellington.

Orris P., Chary L.K., Perry K., and Asbury J., 2000, Persistent organic pollutants (POPs) and human health, A Publication of the World Federation of Public Health Association's Persistent Organic Pollutant Project, WFPHA. Washington, DC. 1-46.

Oruc E., 2012, Oxidative stress responses and recovery patterns in the liver of *Oreochromis niloticus* exposed to chlorpyrifos-ethyl, *Bull Environ Contam Toxicol.* 88(5):678-84.

Owumi S.E., Dim U.J., 2019, Manganese suppresses oxidative stress, inflammation and caspase-3 activation in rats exposed to chlorpyrifos, *Toxicol Rep* 6:202–209.

Oyaizu M., 1986, Studies on Products of Browning Reaction, Antioxidative Activities of Products of Browning Reaction Prepared from Glucosamine, *Jpn. J. Nutr.* 44 (6):307-315.

Page G.L.J., Laight D., and Cummings M.H., 2011, Thiamine deficiency in diabetes mellitus and the impact of thiamine replacement on glucose metabolism and vascular disease. *Int J Clin Pract.* 65(6):684-690.

Paliwal R., Sharma V., and Sharma S.H., 2011, Hepatoprotective and antioxidant potential of moringa oleifera pods against DMBA-induced Hepatocarcinogenesis in male mice. *Int J Drug Dev Res.* 3(2):128-38.

Panasenko O.M., Mikhilchik E.V., Gorudko I.V., Grigorieva D.V., Sokolov A.V., Kostevich V.A., Panuwet P., Prapamontol T., Chantara S., Barr D.B., 2009, Urinary pesticide metabolites in school students from northern Thailand. *Int J Hyg Environ Health.* 212(3):288-97.

Paramveer D.S., Chanchal M.K., Paresh M., Ran A., Shrivastava B., and Nema R.K., 2010, Effective alternative methods of LD₅₀ help to save number of experimental animals, *J Chem Pharm Res.* 2(6):450-453.

Parker M.L., and Goldstein M.I., 2000, Differential toxicities of organophosphate and carbamate insecticides in the nestling European starling (*Sturnus vulgaris*), *Arch Environ Contam Toxicol.* 39:233-342.

Parkhomenko Y.M., Protasova Z.G., Chernysh I.Y., Pkhakadze E.G., 1991, Modulation of acetylcholine synthesis in rat brain synaptosomes by thiamine and its relation to the regulation of the pyruvate dehydrogenase complex activity, In: *Biochemistry and Physiology of thiamindiphosphate enzymes* (H.Bisswanger and J Ullrich, eds), VCN, Weinheim, Germany, 375-381.

Parkinson A., Ogilvie B.W., Buckley D.B., Kazmi F., Czerwinski M., Parkinson O., 2001, Biotransformation of xenobiotics. In: *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*. McGraw-Hill Ed. USA.

Pastor N., Weinstein H., Jamison E., Brenowitz M., 2000, A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP–DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence specific binding, *J Mol Cell Biol.* 304:55–68.

Payne C.M., Bernstein C., and Bernstein H., 1995, Apoptosis Overview Emphasizing the Role of Oxidative Stress, DNA Damage and Signal-Transduction Pathways, *Leuk Lymphoma.* 19(1-2):43-93.

Pekovich S.R., Martin P.R., Singleton C.K., 1998, Thiamine deficiency decreases steady-state transketolase and pyruvate dehydrogenase but not alpha-ketoglutarate dehydrogenase mRNA levels in three human cell types, *J Nutr.* 128:683– 687.

Pelkonen O., Turpeinen M., Hakkola J., Honkakoski P., Hukkanen J., and Raunio H., 2008, Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status, *Arch Toxicol.* 82:667-715.

Phung D.T., Connell D., Miller G., Chu C., 2012, Probabilistic assessment of chlorpyrifos exposure to rice farmers in Viet Nam. *J Expo Sci Environ Epidemiol.* 22(4):417-23.

Picco E.J., Fernández H.R., Díaz David D.C., San Andrés M.I., Boggio J.C., Rodríguez C., 2008, Use of cholinesterase activity in monitoring chlorpyrifos exposure of steer cattle after topical administration, *Journal of Environmental Science and Health, Part B.* 43(5):405–409.

Pick E., Keisari Y., 1980, A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture, *J Immunol Methods.* 38:161-70.

Pimentel D., 2009, Environmental and Economic Costs of the Application of Pesticides Primarily in the United States. In: *Integrated Pest Management: Innovation-Development Process*, Peshin, R. and A.K. Dhawan (Eds.). Springer, Berlin, New York, 13:89-110.

Pohanka M., 2011, Cholinesterases a Target of pharmacology and toxicology, *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 155(3):219-230.

Pond A.L., Chambers H.W., Coyne C.P., and Chambers J.E., 1998, Purification of two rat hepatic proteins with A-esterase activity toward chlorpyrifos-oxon and paraoxon, *J Pharmacol Exp Therap.* 286:1404–1411.

Prosser D., and Hart A.D., 2005, Assessing potential exposure of birds to pesticide-treated seeds, *Ecotoxicology.* 14(7):679-691.

Qiao D., Seidler F.J., Padilla S., Slotkin T.A., 2002, Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: what is the vulnerable period? *Environ Health Perspect.* 110(11):1097-103.

Qiao D., Seidler F.J., Tate C.A., Cousins M.M., Slotkin T.A., 2003, Fetal chlorpyrifos exposure: adverse effects on brain cell development and cholinergic

biomarkers emerge postnatally and continue into adolescence and adulthood, *Environ Health Perspect.* 111(4):536-44.

Qin G., Liu T., Guo Y., Zhang X., Ma E., Zhang J., 2014, Effects of chlorpyrifos on glutathione-S-transferase in migratory locust, *Locusta migratoria*, *Pestic Biochem Physiol.* 109:1–5.

Radaković M., Borozan S., Djelić N., Ivanović S., Čupić Miladinović D., Ristanić M., Spremo-Potparević B., Stanimirović Z., 2018, Nitroso-oxidative stress, acute phase response, and cytogenetic damage in wistar rats treated with adrenaline, *Oxid. Med. Cell. Longev.* <https://doi.org/10.1155/2018/1805354>.

Rahim S., Abdullah H.A., Ali Y., 2016, Serum Apo A-1 and Its Role as a Biomarker of Coronary Artery Disease. *Cureus* 8(12): e941. DOI 10.7759/cureus.941

Rai D.K., Rai P.K., Rizvi S., Watal G., Sharma B., 2009, Carbofuran-induced toxicity in rats: protective role of vitamin C, *Exp Toxicol Pathol.* 61:531–535.

Raibeemol K.P., Chitra K.C., 2018, Effects of Chlorpyrifos as Inducer for Oxidative Stress in Liver, Kidney and Spleen of Freshwater Fish, *Pseudotroplus maculatus* (Bloch, 1795), *Research & Reviews: A Journal of Toxicology.* 8(1): 20-29.

Ranson H., Hemingway J., 2005, Mosquito glutathione transferase, *Methods Enzymol.* 401:226-241.

Rao J., Oz G., Seaquist E.R., 2006, Regulation of cerebral glucose metabolism, *Minerva Endocrinol.* 31(2):149-58.

Raszewski G., Lemieszek M.K., Łukawski K., Juszczak M., and Rzeski W., 2015, Chlorpyrifos and Cypermethrin Induce Apoptosis in Human Neuroblastoma Cell Line SH-SY5Y, *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 116:158–167.

Rattner B.A., Eroschenko V.P., Fox G.A., Fry D.M., and Gorsline J., 1984, Avian endocrine responses to environmental pollutants, *J Exp Zool.* 232:683-689.

Rattner B.A., Sileo L., and Scanes C.G., 1982, Oviposition and the plasma concentrations of LH, progesterone and corticosterone in bobwhite quail (*Colinus virginianus*) fed parathion, *J Reprod Fertil.* 66(1):147-155.

Ray R.S., Katyal A., 2016, Myeloperoxidase: Bridging the gap in Neurodegeneration, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.06.031>

Read D.H., Harrington D.D., 1982, Experimentally induced thiamine deficiency in beagle dog clinical observations, *Am J Vet Res.* 42:984-991.

Reigart J.R., Roberts J.R., 1999, *Recognition and Management of Pesticide Poisoning.* Fifth Edition. U.S. Environmental Protection Agency, Washington.

Rich T.D., Beardmore C.J., Berlanga H., Blancher P.J., and Bradstreet M.S.W., 2004, *Partners in Flight North American Landbird Conservation Plan.* Cornell Lab of Ornithology, Ithaca, New York.

Richendrerfer H., Pelkowski S.D., Colwill R.M., Créton R., 2012, Developmental sub-chronic exposure to chlorpyrifos reduces anxiety-related behaviour in zebrafish larvae, *Neurotoxicol Teratol.* 34(4):458-65.

Rozenberg O., Shih D.M., Aviram M., 2003, Human serum paraoxonase 1 decreases macrophage cholesterol biosynthesis: possible role for its phospholipase-A2-like activity and lysophosphatidylcholine formation, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23:461-467.

Salvati A.M., Tentori L., 1981. Hemoglobinometry in human blood, *Methods in Enzymology*, 76:707-715.

Sánchez-Amate M.C., Flores P., Sánchez-Santed F., 2001, Effects of chlorpyrifos in the plus-maze model of anxiety, *Behav Pharmacol.* 12(4):285-92.

Sanchez-Hernandez J.C., Narvaez C., Sabat P., Martínez Mocillo S., 2014, Integrated biomarker analysis of chlorpyrifos metabolism and toxicity in the earthworm *Aporrectodea caliginosa*, *Sci Total Environ.* 490:445–455.

Sanchez-Moreno C., 2002, Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems, *Food Sci Technol Int.* 8:121-137.

Santarpia L., Grandone I., Contaldo F., Pasanisi F., 2013, Butyrylcholinesterase as a prognostic marker: a review of the literature, *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 4(1): 31-39.

Saoudi M., Hmida I.B., Kammoun W., Rebah F.B., Jamoussi K., and Feki A.E., 2017, Protective effects of oil of *Sardinella pilchardis* against subacute chlorpyrifos-induced oxidative stress in female rats, *Arch Environ Occup Health.* 73(2):128-135.

Sapozhnikova Y., Bawardi O., Schlenk D., 2004, Pesticides and PCBs in sediments and fish from the Salton Sea, California, US., *Chemosphere.* 55(6):797-809.

Schenk G., 2016, Organophosphate-degrading metallohydrolases: Structure and function of potent catalysts for applications in bioremediation, *Coordination Chemistry Reviews.* 317:122-131.

Schulz J.B., Lindenau J., Seyfried J., and Dichgans J., 2000, Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem.* 267(16):4904–4911.

Sekercioglu C.H., Daily G.C., and Ehrlich P.R., 2004, Ecosystem consequences of bird declines, *Proc Natl Acad Sci. USA.* 101(52):18042-18047.

Sharma A., Bist R., 2014, Thiamine deprivation disturbs cholinergic system and oxidative stress in liver of *Mus musculus*, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* 6(5):139-143.

Sharma Y., Bashir S., Irshad M., Nag T.C., and Dogra T.D., 2005, Dimethoate-induced effects on antioxidant status of liver and brain of rats following subchronic exposure, *Toxicology.* 215(3):173–81.

Shimshoni J.A., Evgeny E., Lublin A., Cuneah O., King R., Horowitz I., and Shlosberg A., 2012, Determination of brain cholinesterase activity in normal and pesticides exposed wild birds in Israel, *Isr J Vet Med.* 67:214–219.

Siebert G., Gessner B., Klasser M., 1986, Energy supply of the central nervous system, *Bibl Nutr Dieta.* (38):1-26.

Sies H., 1997, Oxidative stress: oxidants and antioxidants, *Exp Physiol.* 82(2):291-295.

Sikorski J.A., 2007, Atherosclerosis/Lipoprotein/Cholesterol Metabolism, *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, 459–494, Elsevier, USA.

Singh DK., 2012, *Pesticide Chemistry and Toxicology.* Bentham Science Publishers.

Singh R.P., Sastrya K.V.H., Pandeya N.K., Shita N., Agrawala R., Singhb K.B., Mohana J., Saxenac V.K., Moudgal R.P., 2011, Characterization of lactate dehydrogenase enzyme in seminal plasma of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*), *Theriogenology.* 75(3):555–562.

Singh V., Panwar R., 2014, In vivo antioxidative and neuroprotective effect of 4-Allyl-2-methoxyphenol against chlorpyrifos-induced neurotoxicity in rat brain, *Mol. Cell Biochem.* 388(1–2):61–74.

Singh, S., Kaur S., and Budhiraja R.D., 2013. Chlorpyrifos-induced oxidative stress in rat's brain and protective effect of grape seed extract, *The Journal of Phytopharmacology*. 2(3):26–33.

Slekar K.H., Kosman D.J., Culotta V.C., 1996, The yeast copper/zinc superoxide dismutase and the pentose phosphate pathway play overlapping roles in oxidative stress protection, *J Biol Chem*. 271(46):28831-6.

Slotkin T.A., Brown K.K., Seidler F.J., 2005, Developmental exposure of rats to chlorpyrifos elicits sex-selective hyperlipidemia and hyperinsulinemia in adulthood. *Environ Health Perspect*. 113(10):1291-4.

Slotkin T.A., Cousins M.M., Tate C.A., Seidler F.J., 2001, Persistent cholinergic presynaptic deficits after neonatal chlorpyrifos exposure, *Brain Res*. 902(2):229-43.

Slotkin T.A., Levin E.D., Seidler F.J., 2006, Comparative developmental neurotoxicity of organophosphate insecticides: effects on brain development are separable from systemic toxicity, *Environ Health Perspect*. 114(5):746-51.

Slotkin T.A., Seidler F.J., 2009, Oxidative and excitatory mechanisms of developmental neurotoxicity: transcriptional profiles for chlorpyrifos, diazinon, dieldrin, and divalent nickel in PC12 cells. *Environ Health Perspect*. 117(4):587-96.

Slotkin T.A., 1999, Developmental cholinotoxicants: nicotine and chlorpyrifos. *Environ Health Perspect*. 107(Suppl 1):71-80.

Slotkin T.A., 2004, Guidelines for developmental neurotoxicity and their impact on organophosphate pesticides: a personal view from an academic perspective, *Neurotoxicology*. 25(4):631-40.

Smith J.A., Das A., Ray S.K., Banik N.L., 2012, Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases, *Brain Res Bull*. 87(1):10–20.

Sogorb M.A., and Vilanova E., 2002, Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis, *Toxicol Lett*. 128(1-3):215-228.

Sohail M.U., Rahman Z.U., Ijaz A., Yousaf M.S., Ashraf K., Yaqub T., Zaneb H., Anwar H., and Rehman H., 2011, Single or combined effects of mannan-oligosaccharides and probiotic supplements on the total oxidants, total antioxidants, enzymatic antioxidants, liver enzymes, and serum trace minerals in cyclic heat-stressed broilers, *Poult Sci*. 90(11):2573–2577.

Sohal R.S., Weindruch R., 1996, Oxidative stress, caloric restriction, and ageing, *Science*. 273(5271):59–63.

Soliday F.K., Conley Y.P., and Henker R., 2010, Pseudocholinesterase Deficiency: A Comprehensive Review of Genetic, Acquired and Drug Influences, *AANA Journal*. 78(4):313-320.

Song Q., and Singleton C.K., 2002, Mitochondria from cultured cells derived from normal and thiamine-responsive megaloblastic anemia individuals efficiently import thiamine diphosphate, *BMC Biochem*. 3:8.

Song X., Violin J.D., Seidler F.J., Slotkin T.A., 1998, Modeling the developmental neurotoxicity of chlorpyrifos in vitro: macromolecule synthesis in PC12 cell., *Toxicol Appl Pharmacol*. 151(1):182-91.

Sorenson R.C., Bisgaier C.L., Aviram M., Hsu C., Billecke S., La Du B.N., 1999, Human serum paraoxonase/arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids: apolipoprotein A-I stabilizes activity, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 19:2214-2225.

- Sparling D.W., Fellers G.M., McConnell L.L., 2001, Pesticides and amphibian population declines in California, USA, *Environ Toxicol Chem.* 20(7):1591-5.
- Spinas E., Saggini A., Kristas S.K., Cerulli G., Caraffa A., Antinolfi P., Pantalone A., Feydas A., Tei M., Speziali A., Saggini R., Pandolfi F., and Conti P., 2015, Crosstalk Between Vitamin B and Immunity, *J Biol Regul Homeost Agents.* 29(2):283-288.
- Spooren A., Kolmus K., Laureys G., Clinckers R., De Keyser J., Haegeman G., Gerlo S., 2011, Interleukin-6, a mental cytokine. *Brain Res. Rev.* 67(1-2):157-183.
- Sriram K., Manzanares W., and Joseph K., 2012, Thiamine in nutrition therapy, *Nutr Clin Pract.* 27(1):41-50.
- Stadtman E.R., Berlett S.B., 1997, Free-Radical-Mediated Modification of Proteins. In: *Free radical Toxicology*, Ed. Wallace KB, Taylor&Francis, NY.
- Stepuro I.I., Piletskaya T.P., Stepuro V.I., and Maskevich S.A., 1997, Thiamine oxidative transformation catalyzed by copper ions and ascorbic acid. *Biochemistry.* 62(12):1409-14
- Stevanović J., Borozan S., Božić T., Jović S., Đekić T., Dimitrijević B., 2012, Oksidativni stres, *Veterinarski glasnik.* 66(3-4):273 – 283.
- Stevanović J., Borozan S., 2012, Značaj slobodnih radikala u veterinarskoj medicini. *Naučna KMD.*
- Stock J., Dormandy T.L., 1971, The autoxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide, *Br J Haematol.* 20(1):95-111.
- Stoker T.E., Goldman J.M. and Cooper R.L., 1993, The dithiocarbamate fungicide thiram disrupts the hormonal control of ovulation in the female rat, *Reprod Toxicol.* 7:211-218.
- Sun F., Chen H.S., 2008, Monitoring of pesticide chlorpyrifos residue in farmed fish: investigation of possible sources, *Chemosphere.* 71(10):1866-9.
- Sushko L.I., and Lukienko P.I., 1981, Effect of vitamin B1 deficiency on xenobiotic hydroxylation and lipid peroxidation in rat liver microsomes, *Farmakol Toksikol.* 2:102-104.
- Sweetman S.C., 2009, Vitamin B1, *Martindale: The Complete Drug Reference*, Thirty-sixth edition. Pharmaceutical Press, London, UK.
- Swiżło A.G., 2006, Antioxidant activity of water soluble vitamins in the TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) and the FRAP (ferric reducing antioxidant power) assays, *Food Chemistry.* 96:131-136.
- Tallaksen C.M., Tauboll E., 2000, Excitatory effect of thiamin on CA1 pyramidal neurones in rat hippocampal slices in vitro, *Eur J Neurol.* 7(6):693-8.
- Tanvir E.M., Afroz R., Chowdhury M.A.Z., Gan S.H., Karim N., Islam M.N., and Khalil M.I., 2016, A model of chlorpyrifos distribution and its biochemical effects on the liver and kidneys of rats, *Hum Exp Toxicol.* 35(9):991-1004.
- Tariq M.I., Afzal S., Hussain I., Sultana N., 2007, Pesticides exposures in Pakistan: a review, *Environ Int.* 33(8):1107-22.
- Tattersall A., 1991, How many dead birds are enough: Cancellation of diazinon's uses in Golf courses, *J Pesticide Reform.* 11:15-16.
- Thiermann H., Kehe K., Steinritz D., Mikler J., Hill I., Zilker T., Eyer P., Worek F., 2007, Red blood acetylcholinesterase and plasma butyrylcholinesterase status: important indicators for the treatment of patients poisoned by organophosphorus compounds, *Arh Hig Rada Toksikol.* 58(3):359-366.

Thompson H.M., Walker C.H., and Hardy A., 1988, Avian esterases as indicators of exposure to insecticides – the factor of diurnal variation, *Bull Environ Contam Toxicol.* 41:4–11.

Thrasher J.D., Madison R., Broughton A., 1993, Immunologic abnormalities in humans exposed to chlorpyrifos: preliminary observations, *Arch Environ Health.* 48(2):89-93.

Tiwari R.K., Singh S., Pandey R.S., 2017, Assessment of the acute toxicity of chlorpyrifos and cypermethrin to *Heteropneustes fossilis* and their impact on acetylcholinesterase activity, *Drug Chem Toxicol.* 42(5):463-470.

Tomlin C.D.S., 2006, *The Pesticide Manual. A world Compendium.* 14th ed., British Crop Protection Council: Alton Hampshire, UK. 186-187.

Tougu V., 2001, Acetylcholinesterase: mechanism of catalysis and inhibition. *Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents.* 1(2):155-170.

Towbin H., Staehelin T., and Gordon J., 1979, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc Natl Acad Sci. USA.* 76(9):4350–4354.

Townsend D., DeLeon R.C., Lester C.E., White L.M., Maitin V., Cisneros I., Richardson C.R., and Vattem D.A., 2011, Evaluation of Potential Redox Modulatory and Chemotherapeutic Effects of a Proprietary Bioactive Silicate Alka-Vita/Alka-V6/Alkahydroxy (AVAH), *Int J App Res Nat Prod.* 3(4):5-18.

Townsend D.M., Manevich Y., He L., Hutchens S., Pazoles C.J., Tew K.D., 2009, Novel role for glutathione S-transferase pi. Regulator of protein S-glutathionylation following oxidative and nitrosative stress, *J Biol Chem.* 284:436–445.

Trachootham D., Alexandre J., and Huang P., 2009, Targeting cancer cells by ROS mediate mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov.* 8(7):579–591.

Trachootham D., Lu W., Ogasawara M.A., Nilsa R.D., Huan, P., 2008, Redox regulation of cell survival. *Antioxidants & Redox Signaling,* 10(8):1343–1374.

Trofimova L.K., Araújo W.L., Strokina A.A., Fernie A.R., Bettendorff L., Bunik V.I., 2012, Consequences of the α -ketoglutarate dehydrogenase inhibition for neuronal metabolism and survival: implications for neurodegenerative diseases, *Curr Med Chem.* 19(34):5895-906.

Tuzmen M.N., Candan N., and Kaya E., 2007, The Evaluation of altered antioxidative defense mechanism and acetylcholinesterase activity in rat brain exposed to chlorpyrifos, deltamethrin, and their combination, *Toxicol Mech Methods.* 17:535–540.

Tvarijonaviciute A., Kocaturk M., Cansev M., Tecles F., Ceron J.J., Yilmaz Z., 2012, Serum butyrylcholinesterase and paraoxonase 1 in a canine model of endotoxemia: Effects of choline administration, *Res Vet Sci.* 93(2):668–674.

Uchendu C., Ambali S.F., Ayo J.O., and Esievo K.A.N., 2015, The protective role of alpha-lipoic acid on long-term exposure of rats to the combination of chlorpyrifos and deltamethrin pesticides, *Toxicol Ind Health* 1–12, DOI: 10.1177/0748233715616553.

Uchendu C., Ambali S., Ayo J., Esievo K., and Umosen A., 2014, Erythrocyte osmotic fragility and lipid peroxidation following chronic co-exposure of rats to chlorpyrifos and deltamethrin, and the beneficial effect of alpha-lipoic acid, *Toxicol Rep.* 1:373–378.

Urano S., 1993, The role of vitamin E in blood and cellular ageing. In: Lester P, Fuch J (eds.) *Vitamin E in health and disease.* New York, NY: Marcel Decker.

US EPA, 1999, United States Environmental Protection Agency, Sethoxydim: Pesticide tolerance. Federal Register Environmental Documents. 32189-32196.

US EPA. 2006, Reregistration Eligibility Decision for Chlorpyrifos. United States Environmental Protection Agency, Washington, D.C.

US EPA. 2009a, Chlorpyrifos Summary Document Registration Review: Initial Docket March 2009. Docket Number: EPA-HQOPP-2008-0850. Case #0100. United States Environmental Protection Agency, Washington, D.C.

US EPA. 2009b. Memorandum. Chlorpyrifos. Revised Human Health Assessment Scoping Document in Support of Registration Review. February 9. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency, Washington, D.C.

US EPA. 2011, Memorandum. Chlorpyrifos: Preliminary Human Health Risk Assessment for Registration Review. DP No. D388070. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency, Washington, D.C.

US FWS, Birds of Conservation Concern 2002. U.S. Fish and Wildlife Service Division of Migratory Bird Management Arlington, Virginia, DIANE Publishing, Darby, PA., USA.

Usmani K.A., Cho T.M., Rose R.L., Hodgson E., 2006, Inhibition of the human liver microsomal and human cytochrome P450 1A2 and 3A4 metabolism of estradiol by deployment-related and other chemicals, *Drug Metab Dispos.* 34(9):1606-14.

Usmani K.A., Rose R.L., Hodgson E., 2003, Inhibition and activation of the human liver microsomal and human cytochrome P450 3A4 metabolism of testosterone by deployment-related chemicals. *Drug Metab Dispos.* 31(4):384-91.

Uysal H.B., Daglı B., Yılmaz M., Kahyaoglu F., Gokcimen A., Omurlu I.K. and Demirci B., 2016, Biochemical and Histological Effects of Thiamine Pyrophosphate against Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity, *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 118(1):70-6.

Uzun F.G., Kalender Y., 2013, Chlorpyrifos induced hepatotoxic and hematologic changes in rats: the role of quercetin and catechin, *Food Chem Toxicol.* 55:549-56.

Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M., Telser J., 2007, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 39(1):44-84.

Van Eeden S.F., Klut M.E., Walker B.A., Hogg J.C., 1999, The use of flow cytometry to measure neutrophil function, *J Immunol Methods.* 232(1-2):23-43.

Van Emden H.F., and Peakall D.B., 1996, *Beyond Silent Spring: Integrated Pest Management and Chemical Safety.* Chapman and Hall, London.

Van Wijngaarden R.P., Brock T.C., Douglas M.T., 2005, Effects of chlorpyrifos in freshwater model ecosystems: the influence of experimental conditions on ecotoxicological thresholds, *Pest Manag Sci.* 61(10):923-35.

Varagić V.M., Milošević M., 2012, *Farmakologija.* Dvadeset treće izdanje. Elit Medica. Beograd.

Vaughan-Higgins R., Vitali S., Reiss A., Besier S., Hollingsworth T., and Smith G., 2016, Development of reference ranges for plasma total cholinesterase and brain acetylcholinesterase activity in free-ranging carnaby's black-cockatoos (*calyptorhynchus latirostris*), *Journal of Wildlife Diseases.* 52(3): 592–598.

Venerosi A., Ricceri L., Scattoni M.L., Calamandrei G., 2009, Prenatal chlorpyrifos exposure alters motor behaviour and ultrasonic vocalization in CD-1 mouse pups, *Environ Health.* 8:12.

Ventura C., Nunez M., Miret N., Lamas D.M., Randi A., Venturino A., Rivera E., Cocca C., 2012, Differential mechanisms of action are involved in chlorpyrifos effects in estrogen-dependent or -independent breast cancer cells exposed to low or high concentrations of the pesticide. *Toxicol Lett.* 213(2):184-93.

Verma R.S., Mehta A., Srivastava N., 2009, Comparative studies on chlorpyrifos and methyl parathion induced oxidative stress in different parts of rat brain: Attenuation by antioxidant vitamins. *Pestic Biochem Physiol.* 95(3):152-8.

Verma R.S., and Srivastava N., 2003, Effect of chlorpyrifos on thiobarbituric acid reactive substances, scavenging enzymes and glutathione in rat tissues, *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics.* 40:423-428.

Verma R.S., and Srivastava N., 2001. Chlorpyrifos induced alterations in levels of thiobarbituric acid reactive substances and glutathione in rat brain, *Indian J Exp Biol.* 39:174 –177.

Vial T., Nicolas B., and Descotes J., 1996, Clinical immunotoxicity of pesticides, *J Toxicol Environ Health.* 48:215-229.

Videira R.A., Antunes-Madeira M.C., Lopes V.I.C.F., and Madeira V.M.C., 2001, Changes induced by malathion, methylparathion and parathion on membrane lipid physicochemical properties correlate with their toxicity, *Biochem Biophys Acta-Biomembranes.* 1511:360-368.

Viswanath G., Chatterjee S., Dabral S., Nanguneri S.R., Divya G., Roy P., 2010, Anti-androgenic endocrine disrupting activities of chlorpyrifos and piperophos, *J Steroid Biochem Mol Biol.* 120(1):22-9.

Voccia I., Blakley B., Brousseau P., and Fournier M., 1999, Immunotoxicity of pesticides: A review, *Toxicol Ind Health.* 15:119-132.

Vojvodić V., 1981, *Toksikologija bojnih otrova.* Vojnoizdavački zavod, Beograd.

Vyas N.B., Hill E.F., Sauer J.R., and Kuenzel W.J., 1995, Acephate affects migratory orientation of the white-throated sparrow (*Zonotrichia albicollis*), *Environ Toxicol Chem.* 11:1961-1965.

Wakamatsu T.H., Dogru M., Tsubota K., 2008, Tearful relations: oxidative stress, inflammation and eye diseases, *Arq Bras Oftalmol.* 71:72-79.

Walker C.H., 2003, Neurotoxic pesticides and behavioural effects upon birds, *Ecotoxicology.* 12:307-316.

Wang C., Liang J., Zhang C., Bi Y., Shi X., and Shi Q., 2007, Effect of Ascorbic Acid and Thiamine Supplementation at Different Concentrations on Lead Toxicity in Liver, *Ann Occup Hyg.* 51(6):563-569.

Wang C., Lu G., Cui J., 2012, Responses of AChE and GST Activities to Insecticide Coexposure in *Carassius auratus*, *Environ Toxicol.* 27(1):50-7.

Wang N., Yi L., Shi L., Kong D., Cai D., Wang D., 2012, Shan Z., Pollution level and human health risk assessment of some pesticides and polychlorinated biphenyls in Nantong of Southeast China, *J Environ Sci.* 24(10):1854-60.

Wang Z., Zhao J., Li F., Gao D., Xing B., 2009, Adsorption and inhibition of acetylcholinesterase by different nanoparticles, *Chemosphere.* 77(1):67-73.

Watts M., 2013, Chlorpyrifos. Pesticide action network Asia and the Pacific (PAN AP).

Westlake G.E., Martin A.D., Stanley P.I., and Walker C.H., 1983, Control enzyme levels in the plasma, brain and liver from wild birds and mammals in Britain, *Comp Biochem Physiol. C: Comp. Pharmacol.* 76:15-24.

Whitney K.D., Seidler F.J., Slotkin T.A., 1995, Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: cellular mechanisms. *Toxicol Appl Pharmacol.* 134(1):53-62.

WHO, 2002, The world Health Report. Reducing risks., risks, promoting healthy life, Geneva.

WHO, 2007, Public Health Impact of Pesticides used in Agriculture, Geneva.

WHO, 2009a, WHO Specifications and Evaluations for Public Health Pesticides. Chlorpyrifos O,O-diethyl O-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate. World Health Organization, Geneva..

WHO, 2009b, The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification: 2009. World Health Organization, Geneva.

Whyatt R.M., Barr D.B., 2001, Measurement of organophosphate metabolites in postpartum meconium as a potential biomarker of prenatal exposure: a validation study, *Environ Health Perspect.* 109(4):417-20.

Wigley P., Kaiser P., 2003, Avian cytokines in health and disease. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 5(1):1-14.

Williams T., 1997, Silent scourge. *Audubon*, 99:28-35.

Winterbourn C.H., Vissers M., Kettle A., 2000, Myeloperoxidase, *Curr Opin Hematol.* 7:53-58.

Witztum J.L., Steinberg D., 2001, The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans? *Trends Cardiovasc Med.* 11:93–102.

Xing H., Li S., Wang Z., Gao X., Xu S., Wang X., 2012, Oxidative stress response and histopathological changes due to atrazine and chlorpyrifos exposure in common carp, *Pestic Biochem Physiol.* 103(1):74-80.

Yadav S.K., 2010, Pesticide applications-threat to ecosystems, *J Hum Ecol.* 32: 37-45.

Yan C., Jiao L., Zhao J., Yang H., Peng S., 2012, Repeated exposures to chlorpyrifos lead to spatial memory retrieval impairment and motor activity alteration. *Neurotoxicol Teratol.* 34(4):442-9.

Yilmaz I., Demiryilmaz I., Turan M.I., Çetin N., Gul M.A., Süleyman H., 2015, The effects of thiamine and thiamine pyrophosphate on alcohol-induced hepatic damage biomarkers in rats, *European Review for Medical and Pharmacological Sciences.* 19:664-670.

Yoshida M., Takakuwa Y., 1997, Method for the simultaneous assay of initial velocities of lactate dehydrogenase isoenzymes following gel electrophoresis, *J Biochem Biophys Methods.* 34(3):167-175.

Zhang Q., Zheng S., Wang S., Wang W., Xing H., Xu S., 2019, Chlorpyrifos induced oxidative stress to promote apoptosis and autophagy through the regulation of miR-19a-AMPK axis in common carp, *Fish and Shellfish Immunology.* doi: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.07.022>.

Zhao Q., Dourson M., Gadagbui B., 2006, A review of the reference dose for chlorpyrifos. *Regul Toxicol Pharmacol.* 44(2):111-124.

Zhivotovsky B., 2004, Apoptosis, necrosis and betwee,. *Cell cycle.* 3(1):64-6.

Zhu J., Yu W., Liu B., Wang Y., Shao J., Wang J., Xia K., Liang C., Fang W., Zhou C., 2017, Escin induces caspase-dependent apoptosis and autophagy through the ROS/p38 MAPK signalling pathway in human osteosarcoma cells in vitro and in vivo. *Cell Death Dis.* 8(10):e3113.

Zitka, O., Skalickova S., Gumulec J., Masarik M., Adam V., Hubalek J., Trnkova L., Kruseova J., Eckschlager T., and Kizek R., 2012, Redox status expressed as

GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients, *Oncol. Lett.* 4:1247-1253.

Zulkifli I., Najafi P., Nurfarahin A.J., Soleimani A.F., Kumari S., Aryani A.A., O'Reilly E.L., and Eckersall P.D., 2014, Acute phase proteins, interleukin 6, and heat shock protein 70 in broiler chickens administered with corticosterone, *Poult Sci.* 93(12):3112-8.

BIOGRAFIJA

Dejana Ćupić Miladinović je rođena 30.12.1983. godine u Beogradu. Po završetku Zemunske gimnazije upisala je Fakultet Veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, na kom je diplomirala 2012. godine, sa prosečnom ocenom 8,64. Školske 2012/2013. godine upisala je Doktorske akademske studije, na istom fakultetu. Položila je sve ispite predviđene studijskim programom sa prosečnom ocenom 9,81. Od decembra 2012. učesnik je na Republičkom projektu: „Unapređenje i razvoj higijenskih i tehnoloških postupaka u proizvodnji namirnica životinjskog porekla u cilju dobijanja kvalitetnih i bezbednih proizvoda konkurentnih na svetskom tržištu" - tehnološki razvoj br. 46009, TR; potprojekat „Hemijski kontaminanti hrane“. Završila je specijalizaciju Toksikološka procena rizika od zagađivača životne sredine na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2014. godine. Školske 2014/2015, 2015/2016. i 2018/2019. je bila student demonstrator i učestvovala je u organizaciji i izvođenju nastave na Katedri za anatomiju na Fakultetu veterinarske medicine u Beogradu.

Učestvovala je na brojnim simpozijumima i kongresima, kao i toksikološkim kursovima u zemlji i inostranstvu. Kao autor ili koautor do sada je objavila više od 30 naučnih i stručnih radova u časopisima od nacionalnog i međunarodnog značaja i na naučnim skupovima nacionalnog i međunarodnog značaja. Od tog broja, četiri rada su publikovana u časopisima sa SCI liste (1 rad u kategoriji M21a, 2 rada u kategoriji M21 i 1 rad u kategoriji M23).

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisana: Dejana Čupić Miladainović

Broj upisa: 16/17

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

„Ispitivanje antioksidativnog i antiinflamatornog potencijala vitamina B1 kod japanskih prepelica (*Coturnix japonica*) subakutno tretiranih hlorspirifosom “

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 25.09.2019. godine

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Dejana Čupić Miladinović

Broj upisa: 16/17

Studijski program: Doktorske akademske studije

Naslov rada: „Ispitivanje antioksidativnog i antiinflamatornog potencijala vitamina B1 kod japanskih prepelica (*Coturnix japonica*) subakutno tretiranih hlorspirifosom“

Mentor 1: Prof. dr Sunčica Borozan

Mentor 2: Prof. dr Andreja Prevendar Crnić

Potpisani Dejana Čupić Miladinović

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 25.09.2019. godine

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„Ispitivanje antioksidativnog i antiinflamatornog potencijala vitamina B1 kod japanskih prepelica (*Coturnix japonica*) subakutno tretiranih hlorspirifosom“

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u **Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu** mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 25.09.2019. godine

1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.