



# Metode za mjerenje, procjenu, praćenje i predviđanje efekta ksenobiotika na biološke sisteme:

---

od molekula do  
ekosistema



Neki od ciljeva ekotoksikologije:

- Proučavanje mehanizma toksičnog dejstva ksenobiotika (MoA)
- Ispitivanje efekta supstanci za koje sumnjamo da mogu biti toksikanti
- Karakterizacija kompleksnih uzoraka iz životne sredine
- Praćenje odgovora ekosistema na kontaminaciju
- Regulatorne namjene



# 01

## Biomarkeri

---

Pojam **biomarker** koristi se za definisanje različitih parametara koji odražavaju interakcije između biološkog sistema i potencijalnih štetnih elemenata koji mogu biti hemijske, fizičke ili biološke prirode.

—WHO, 1993

---

**Biomarkeri** su promjene u biološkom odgovoru (od promjena na molekularnom nivou do promjena na nivou ćelije, zatim fiziološkog odgovora pa do promjena u ponašanju).

—Peakall, 1994.

---

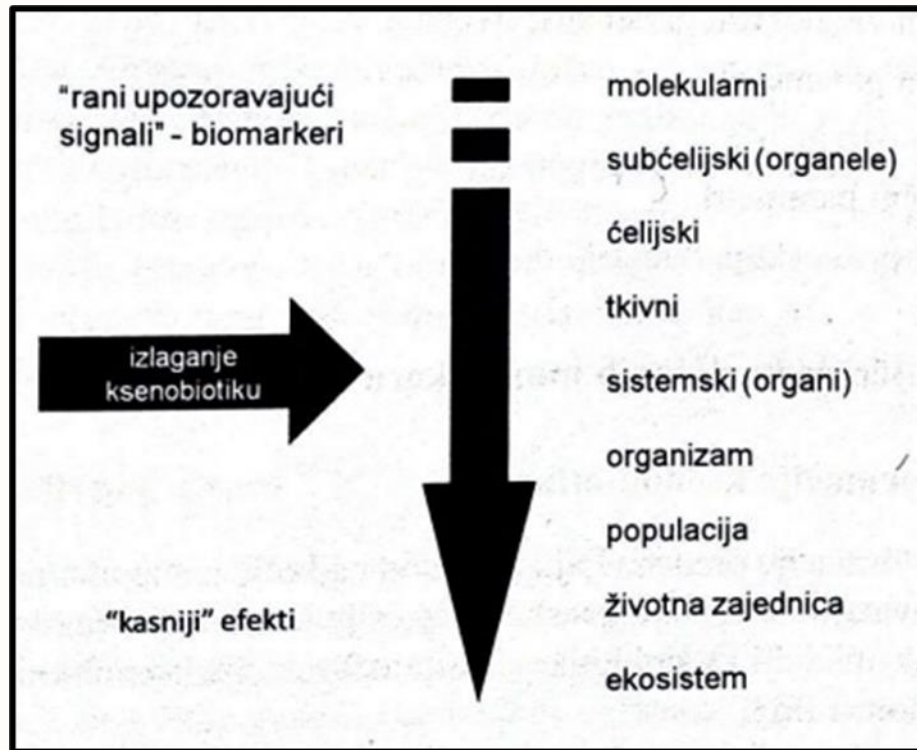
Biomarkeri predstavljaju biološki odgovor na različite hemijske stresore iz životne sredine na subindividualnom nivou, mjeren unutar samog organizma ili u njegovim produktima (feces, urin, dlaka, perje itd.), a koji ukazuje na odstupanje od normalnog stanja organizma.

—Gestel and Brummelen, 1996

---

# Rani osjetljivi indikatori

Promjene na nivou  
biohemijskih odgovora su brži i  
osjetljiviji indikatori nego  
promjene na višim nivoima  
biološke organizacije.



# Biomarkeri

---



Izlaganje organizma ksenobiotcima pokreće niz bioloških odgovora od kojih bi svaki, teoretski posmatrano, mogao poslužiti kao **BIOMARKER**.



Nepravilna primjena biomarkera može da dovede do pogrešnih zaključaka vezanih za odgovor na prisustvo ksenobiotika ili kvalitet životne sredine.



Vrlo često, biohemijski odgovori na prisustvo ksenobiotika mogu biti veoma slični čak i kod različitih organizama.



# Podjela biomarkera

Na osnovu tipa mjerenih parametara:

---

- Enzimi biotransformacije ksenobiotika
- Produkti biotransformacije ksenobiotika
- Parametri oksidativnog stresa
- Proteini stresa
- Metalotioneini
- Imunološki parametri
- Reproductivni i endokrini parametri
- Neurotoksični parametri
- Genotoksični parametri
- Hematotoksični parametri
- Fiziološki i morfološki parametri

## BIOTRANSFORMACIJA

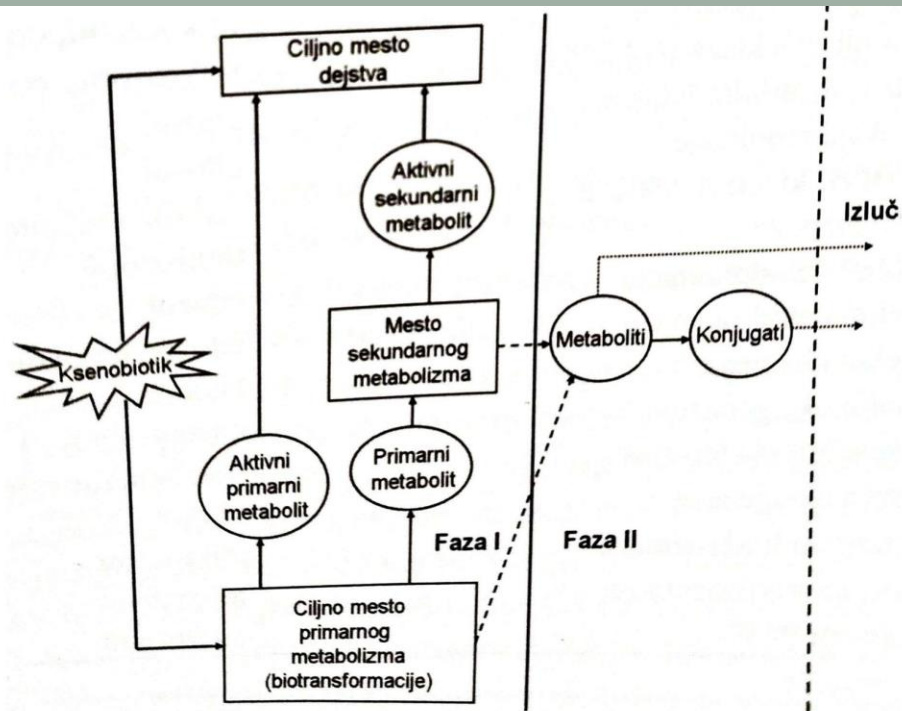


Procesima biotransformacije dolazi do hemijskim promjena ksenobiotika, što dovodi do promjena u ispoljavanju efekta na biološke sisteme.

- Enzimi
- Lipofilna jedinjenja se prevode u hidrofilne forme
- Koža, crevna sluzokoža, krvna plazma, bubrezi
- Glavni organ biotransformacije: **JETRA**

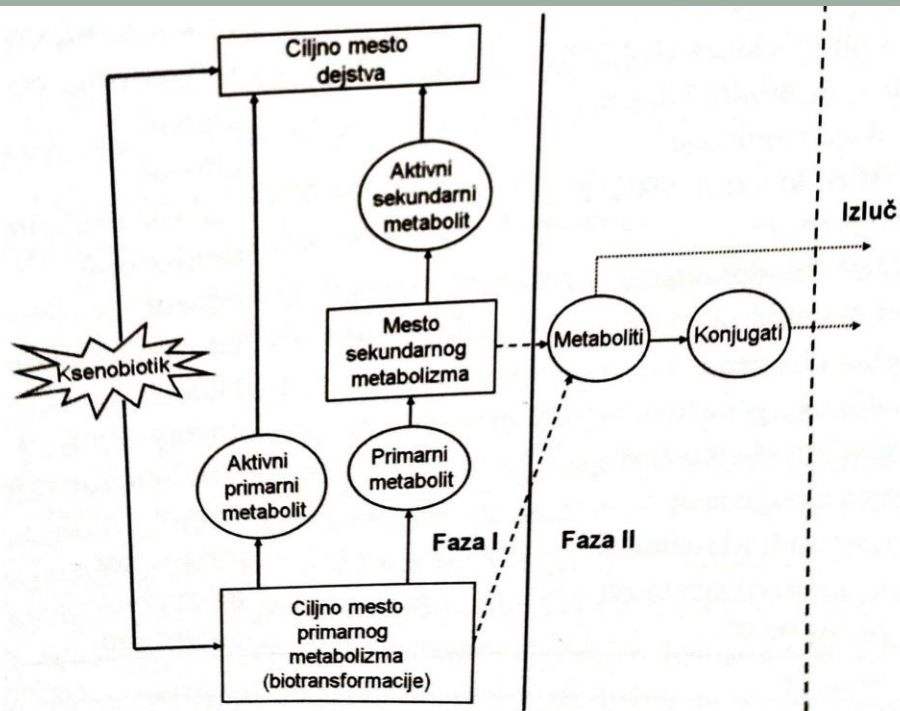
## Enzimi biotransformacije ksenobiotika

Najbolje izučena i nejosjetljivija grupa biomarkera, obuhvata povećanje genetske ekspresije i aktivnosti enzima koji učestvuju u metabolizmu i detoksifikaciji ksenobiotika.



## Enzimi biotransformacije ksenobiotika

Najbolje izučena i nejosjetljivija grupa biomarkera, obuhvata povećanje genetske ekspresije i aktivnosti enzima koji učestvuju u metabolizmu i detoksifikaciji ksenobiotika.

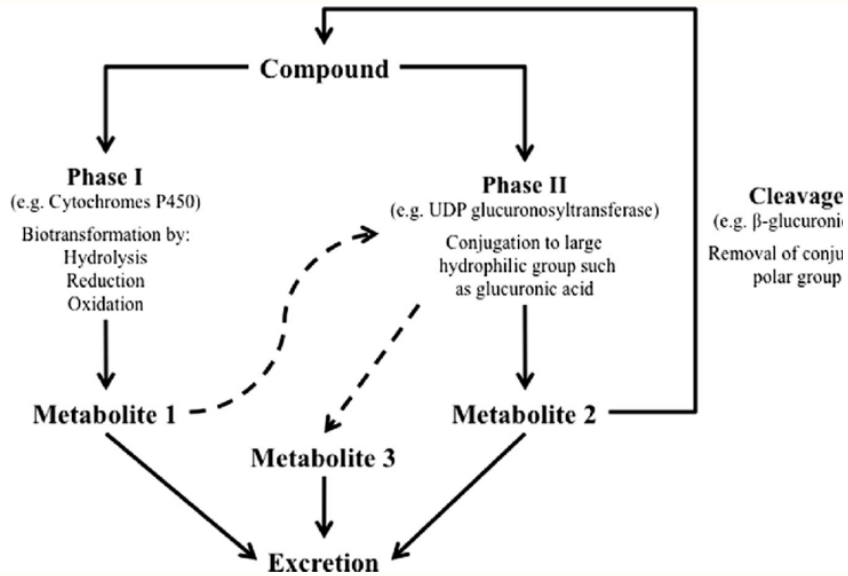


## Enzimi biotransformacije ksenobiotika

PRVA FAZA (HIDROLIZA, REDUKCIJA, OKSIDACIJA)

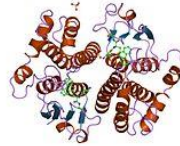
DRUGA FAZA (STVARANJE GLUKURONIDA, SULFATNA KONJUGACIJA, KONJUGACIJA SA GLUTATIONOM I TD.)

# Putevi biotransformacije



## I faza

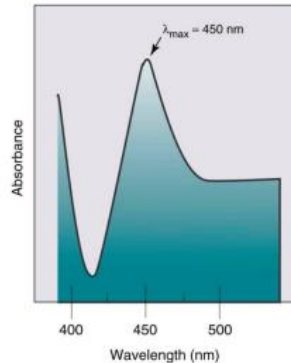
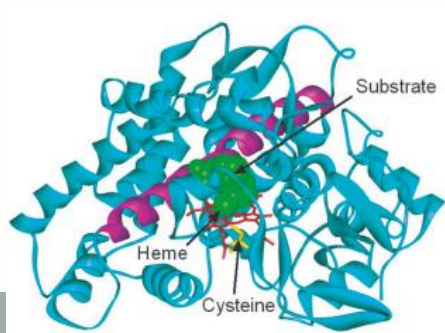
Katalizovane su citohrom P450 (CYP) enzimima iz grupe mikrozomalnih monooksigenaza.



## II faza

Najznačajniji enzimi su: GST, UDPGT, NADPH menadion oksidoreduktaza i aldehid dehidrogenaza.

# Enzimi faze I biotransformacije ksenobiotika (CYP enzimi)



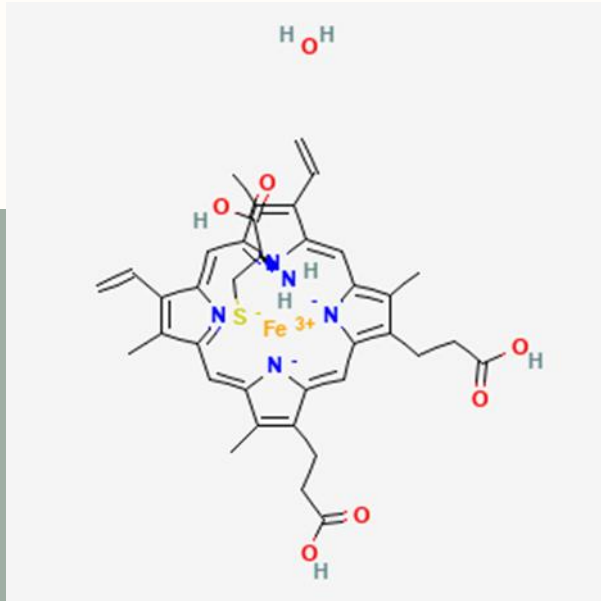
Integralni membranski protein lokalizovani u ćelijama različitih tkiva. U zavisnosti od funkcije koju obavljaju u ćelijama mogu biti vezani za membranu endoplazmatskog retikuluma ili mitohondrija.

- po hemijskoj strukturi su Hem proteini
- preko 300 različitih formi
- klasifikuju se u 50 familija i 82 subfamilije

Mogu da katalizuju oksidativnu biotransformaciju velikog broja ksenobiotika : PAH, rastvarači, lijekovi, boje, naftni derivati, pesticidi i dr.

# Enzimi faze I biotransformacije ksenobiotika (CYP enzimi)

---

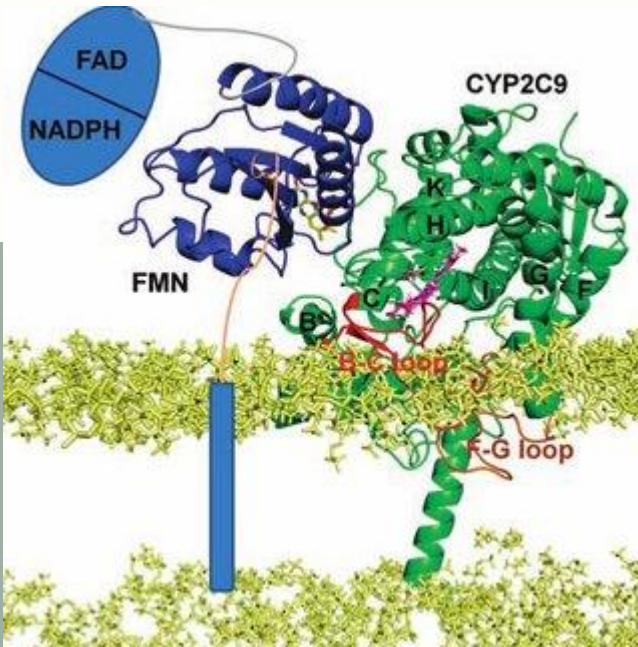


Integralni membranski protein lokalizovani u ćelijama različitih tkiva. U zavisnosti od funkcije koju obavljaju u ćelijama mogu biti vezani za membranu endoplazmatskog retikuluma ili mitohondrija.

- po hemijskoj strukturi su Hem proteini
- preko 300 različitih formi
- klasifikuju se u 50 familija i 82 subfamilije

Mogu da katalizuju oksidativnu biotransformaciju velikog broja ksenobiotika : PAH, rastvarači, lijekovi, boje, naftni derivati, pesticidi i dr.

# Enzimi faze I biotransformacije ksenobiotika (CYP enzimi)

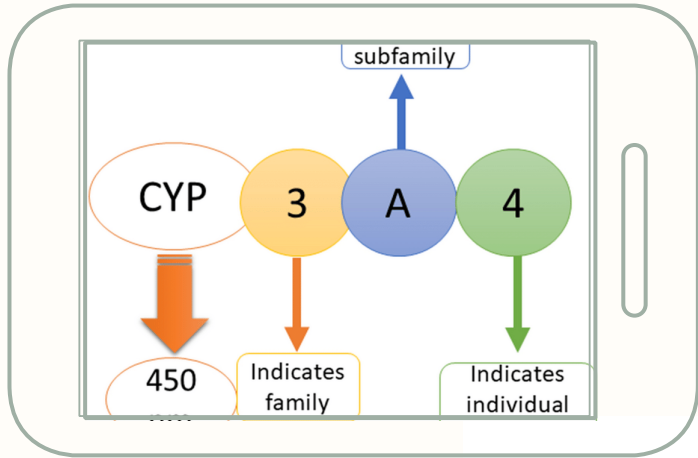


Integralni membranski protein lokalizovani u ćelijama različitih tkiva. U zavisnosti od funkcije koju obavljaju u ćelijama mogu biti vezani za membranu endoplazmatičnog retikuluma ili mitohondrija.

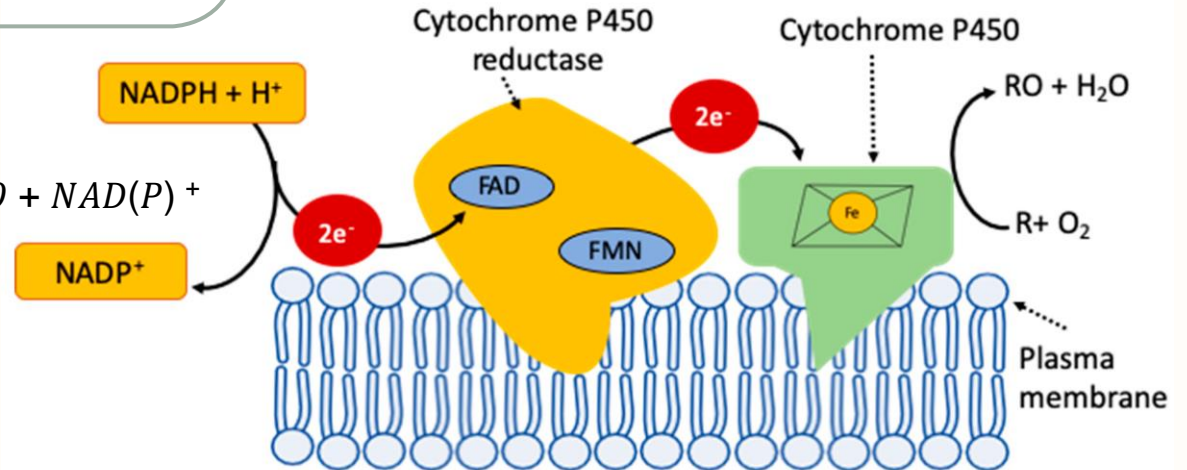
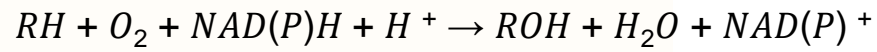
- po hemijskoj strukturi su Hem proteini
- preko 300 različitih formi
- klasifikuju se u 50 familija i 82 subfamilije

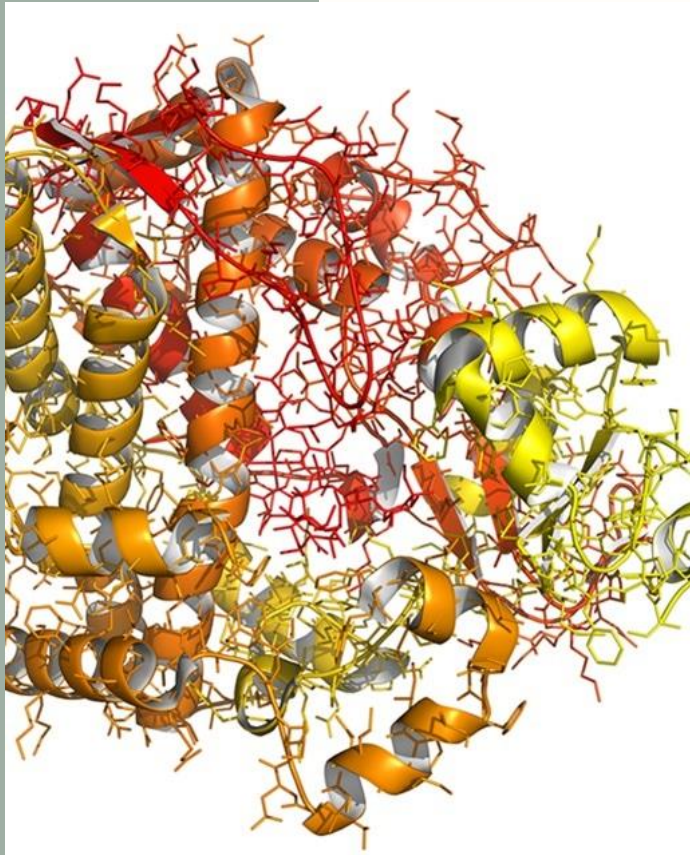
Mogu da katalizuju oksidativnu biotransformaciju velikog broja ksenobiotika : PAH, rastvarači, lijekovi, boje, naftni derivati, pesticidi i dr.





## 17 CYP familija kod sisara



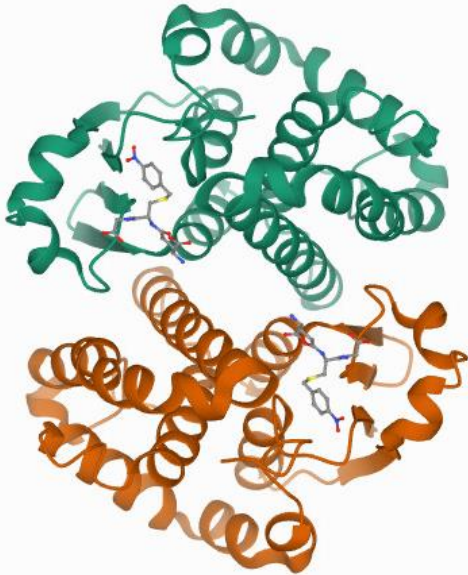


## CYP enzimi

Najznačajnija uloga u prevođenju lipofilnih jedinjenja u hidrofилne, samim tim u olakšavanju ekskrecije ksenobiotika.

# Enzimi faze II biotransformacije ksenobiotika (GST, UDPGT)

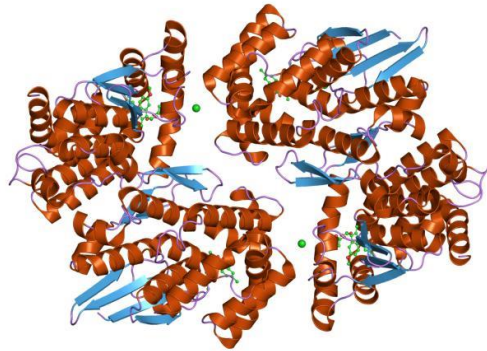
---



Tokom II faze dolazi do konjugacije ksenobiotika sa endogenim ligandima:

- glicin
- cistein
- glutation
- glukuronska kiselina
- sulfati

Građenjem konjugata se olakšava ekskrecija ksenobiotika.

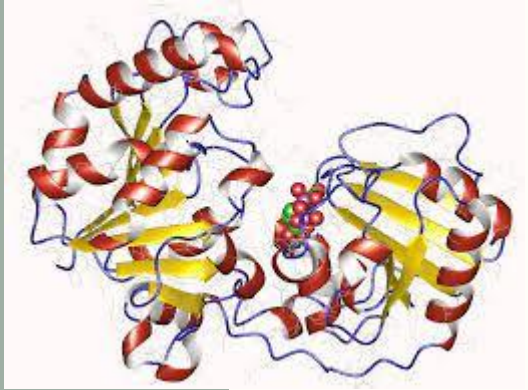


## GST enzimi

---

Katalizuju konjugaciju metabolita sa glutationom.

Aktivnost GST enzim jetre se povećava usled izlaganja PCB, PAH, PCDs, organohlornim pesticidima i dr.



## UDP-glukuronil transferaza (UDPGT)

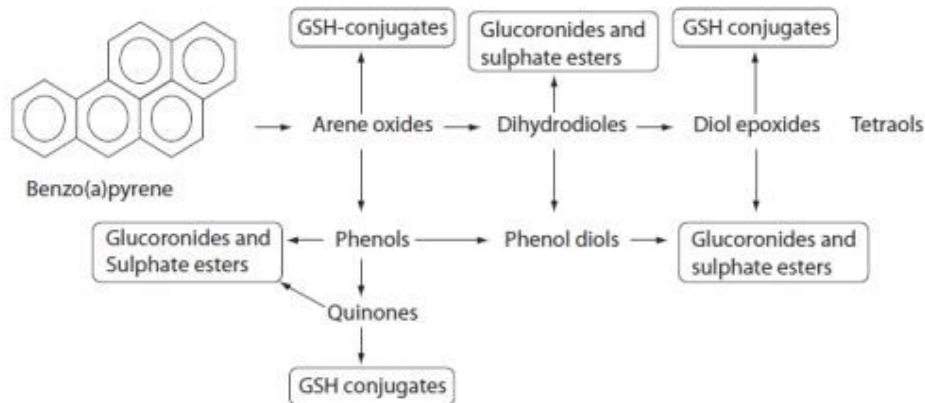
---

Aktivni su u jetri, bubrezima, tankom crijevu, škrgama kod riba.

Njihovu indukciju izazivaju PCB, PAH, PCDD.

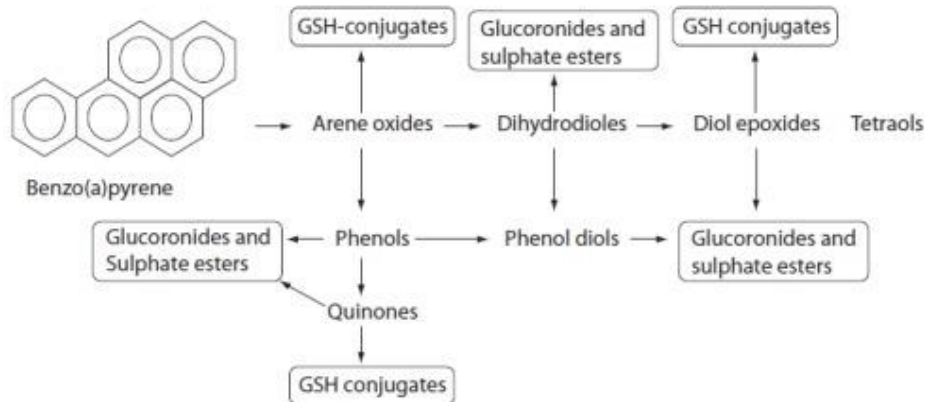
# Produkti biotransformacije ksenobiotika

Metaboliti biotransformacije ksenobiotika mogu biti jedinjenja čija su detekcija i mjerenje jednostavni, tako da mogu biti relevantni biomarkeri izlaganja.



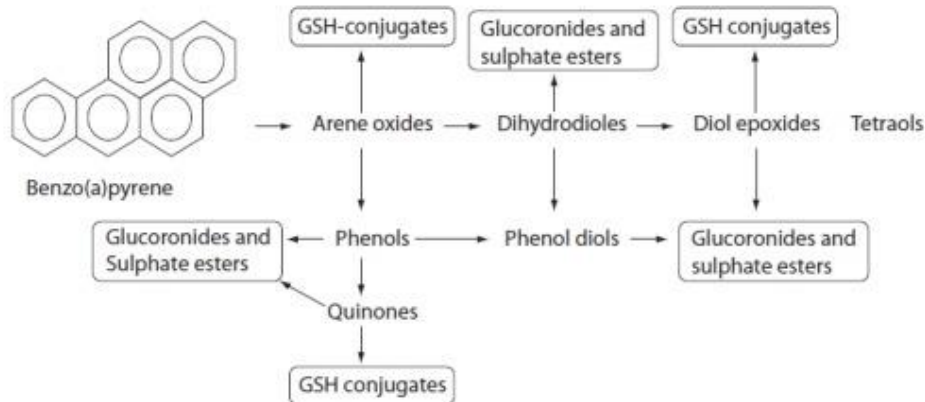
# Produkti biotransformacije ksenobiotika

- Poznavanje metaboličkog kapaciteta jedinke
- Poznavanje puteva metaboličke razgradnje jedinjenja



# Produkti biotransformacije ksenobiotika

- Pogodan su biomarker izlaganja PAH-ovima (brza biotransformacija).
- Hidrofilni produkti: fenoli, dihidrodioli, kinoni, epoksidi.



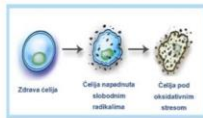


## Toksične supstance koje stvaraju reaktivne vrste kiseonika (ROS)

ROS-reactive oxygen species – dovode do oksidativnog stresa

Kada je nivo ROS ( $H_2O_2$ ,  $O_2^-$ ,  $OH^\cdot$ ), povišen, dovode do enzimske inaktivacije, oštećenja DNK, pa čak i smrti.

Odbrambeni mehanizma protiv oksidativnog stresa je regulisan antioksidativnim genima.



## Parametri oksidativnog stresa

Enzimi antioksidativne zaštite (AOE, antioxidant enzymes) imaju najznačajniju ulogu u odbrani organizma od oksidativnog stresa. Među njima se kao značajni biomarkeri ističu superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), GSP i glutation reduktaza. Mjerenje aktivnosti AOE je značajan pokazatelj toksičnih efekata PCBs i njihovih smješa, antrazina i sl.

# Biomarkeri

---

## Metalotioneini

Biomarkeri efekta, proteini bogati –SH grupama, učestvuju u regulaciji Cu, Zn, Cd, Hg.

## Stres proteini

Indukuju se kao odgovor na stresne promjene u spoljašnjoj sredini, najznačajniji HSP (heat shock proteins, proteini toplotnog stresa).

## Imunološki parametri

Brojnost limfocita i leukocita, težina i morfologija slezine, bubrega, povećana osjetljivost na bakterijske infekcije...

## Reproduktivni i endokrini parametri

Reproduktivni hormoni, tireoidni hormoni, hormoni rasta, hormoni hipotalamusa, hipofize...

## Neurotoksični parametri

Acetilholinesteraza, AChE, inhibirana je oragnofosfornim i karbamatnim pesticidima, najčešće se prati u mozgu i krvi.

## Fiziološki i morfološki parametri

Histopatološki parametri, parametri koji su pokazatelji rasta i razvoja.



# 02

## Laboratorijski testovi toksičnosti

---

Izvode se u strogo kontrolisanim, standardizovanim laboratorijskim uslovima, uvijek se testiraju različite vrste pojedinačno.

—zajedničko

---

# Laboratorijski testovi toksičnosti

---



## U toksikološkim ispitivanjama

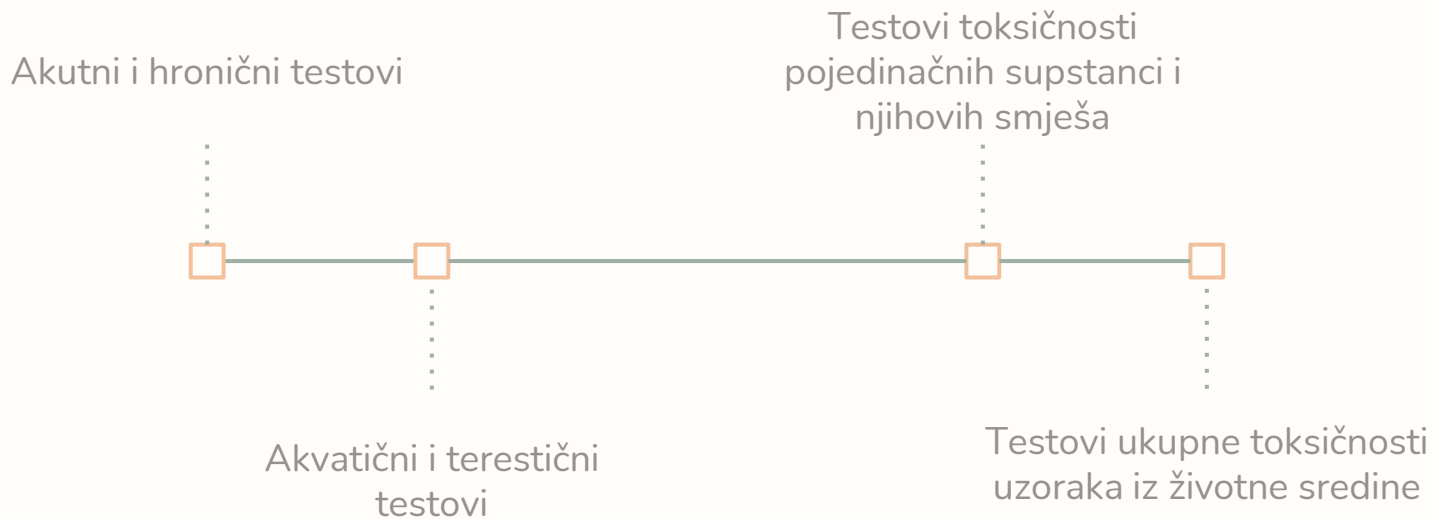
se koriste mali laboratorijski sisari (miševi, pacovi, kunići). U humanoj toksikologiji koriste se testovi na bakterijama, kvascima i sl.

## U ekotoksikološkim istraživanjima

koriste se autotrofni organizmi (alge, ), beskičmenjaci (rakovi, insekti, gliste), kičmenjaci (ribe, vodozemci, ptice) i mikroorganizmi (bakterije, kvasci).

# Laboratorijski testovi toksičnosti

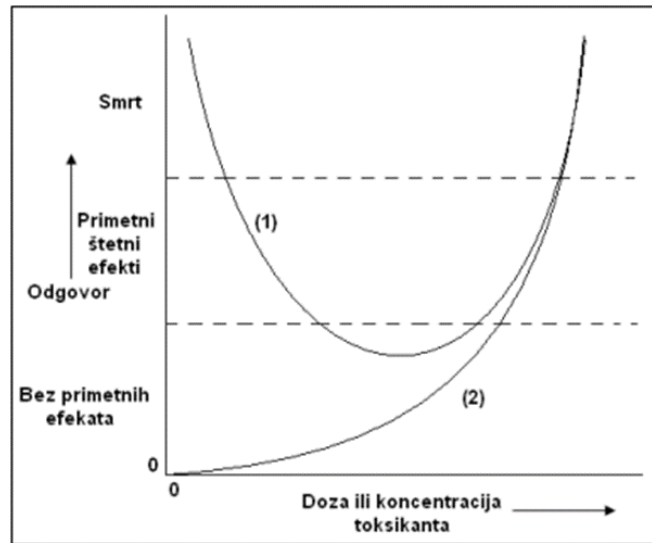
---





## Testovi akutne toksičnosti

Osnovni cilj jeste da se utvrdi makar približno, srednja smrtna doza,  $LD_{50}$  hemikalije kod malih laboratorijskih životinja. Tokom ovog ispitivanja neophodno je da se istraže efekti manjih doza, pokušavajući da se procijene minimalne toksične doze ispitivane hemikalije.



## Testovi akutne toksičnosti

- Praćenje preživljavanja organizma u periodu od 24-96 sati.
- 10-20 jedinki iste vrste se izlaže svakoj od doza test supstance (5-7 doza).
- Ako se umjesto mortaliteta posmatra neki od subletalnih faktora, određuje se  $EC_{50}$  i  $ED_{50}$ .





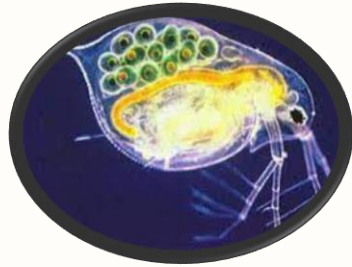
## Testovi hronične toksičnosti

---

Kontinuirano izlaganje niskim dozama toksikanata u dužem periodu može rezultovati hroničnom toksičnošću. Primjenom ovih testova prate se subletalni efekti kao što su: rast, reprodukcija, ponašanje, biohemijske i metaboličke promjene i sl.

# Testovi hronične toksičnosti

---



testovi punog  
životnog ciklusa

FLC, full life cycle



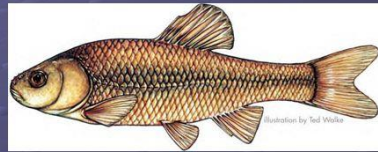
testovi dijela  
životnog ciklusa

subhronični testovi

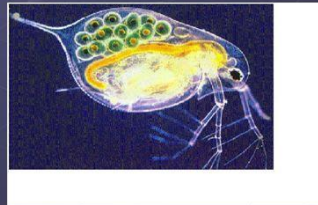
## Chronic toxicity testing

### Reproduction

Fish – life cycle at least 3  
to 6 months  
(fathead minnow)



Invertebrates – complete  
life cycle in 3 days  
(water flea -  
*Ceriodaphnia dubia*)



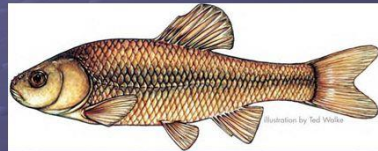
Na osnovu rezultata testova hronične  
toksičnosti određuju se:

- $EC_{1-99}$ , efektivne koncentracije
- $IC_{25}$  i  $IC_{50}$ , inhibitorne koncentracije
- NOEC, koncentracije bez efekta
- LOEC, najniža koncentracija koja izaziva efekat
- MATC, maksimalno prihvatljiva koncentracija

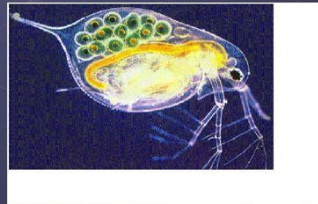
## Chronic toxicity testing

### Reproduction

Fish – life cycle at least 3  
to 6 months  
(fathead minnow)



Invertebrates – complete  
life cycle in 3 days  
(water flea -  
*Ceriodaphnia dubia*)

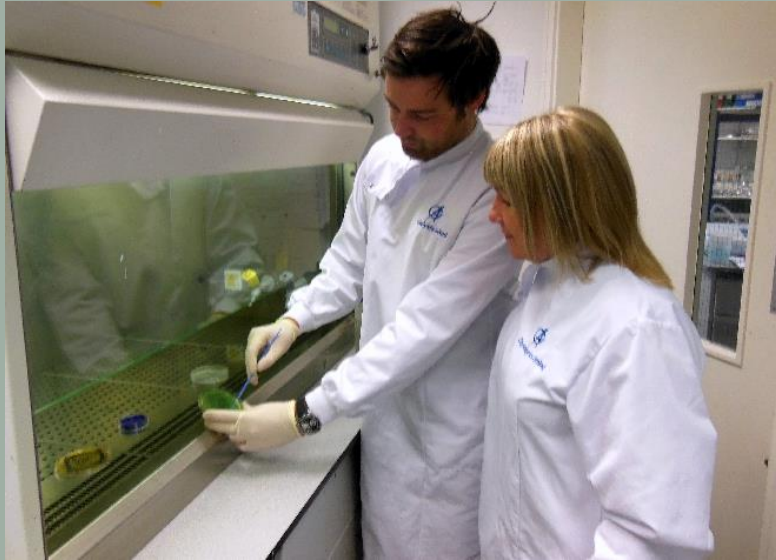


Na osnovu rezultata testova hronične  
toksičnosti određuju se:

- maksimalno netoksična doza (MNTD)

U praksi MNTD obično označava onu  
količinu hemikalije koja u hroničnom ogledu  
prouzrokuje gubitak tjelesne težine do 10%.

$$\text{PDU} = \frac{\text{MNTD za životinju}}{100} \text{ mg/kg/dan}$$

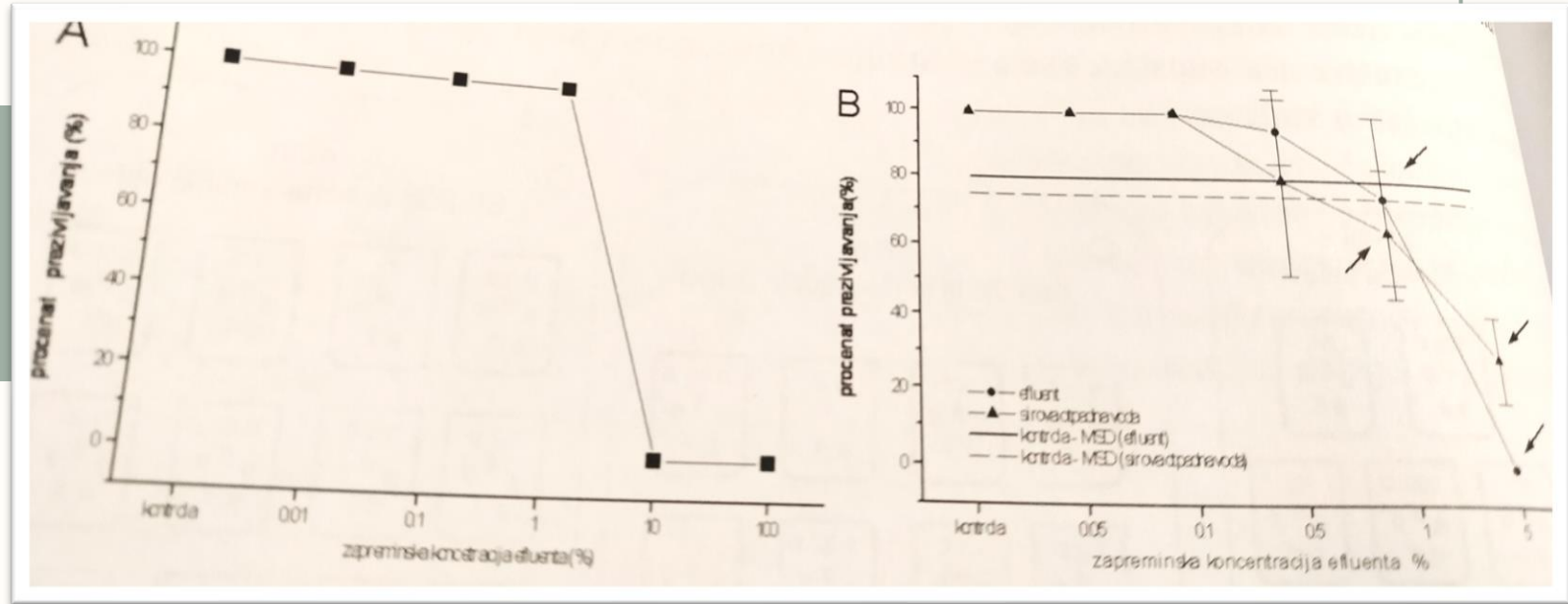


## Akvatični testovi toksičnosti

---

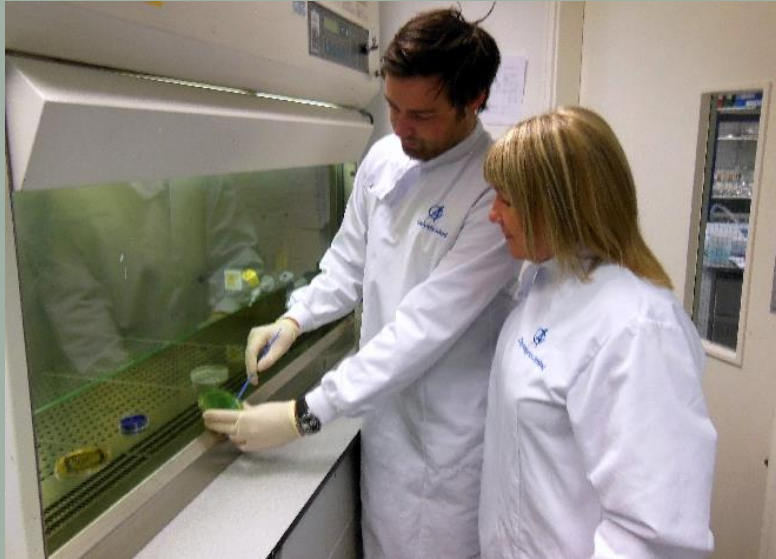
Laboratorijski akvatični testovi se izvode u statičkim, semi-statičkim ili protočnim sistemima.

# Test ukupne toksičnosti efluenta jednog metaloprerađivačkog industrijskog postrojenja sa test vrstom *Daphnia magna*



Preliminarni test

Definitivni test



## Akvatični testovi toksičnosti

---

Na početku i kraju testa se osim koncentracije test supstance određuju i osnovni fizičko-hemijski parametri medijuma: T, rastvoreni kiseonik, pH vrijednost, tvrdoća, salinitet i dr.



# *Daphnia magna*

---

Slatkovodna buva koja predstavlja univerzalan model za akvatične testove akutne i hronične toksičnosti



# Daphnia magna

---

relativno visoka  
senzitivnost za toksine



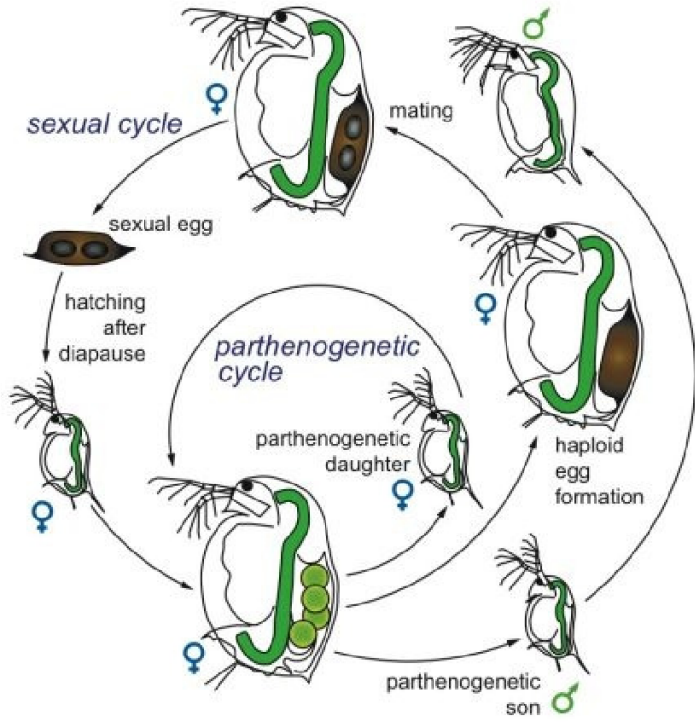
kratki životni vijek

brza reprodukcija



lako se uzgaja u  
laboratoriji

# Daphnia magna



jaje

juvenilni stadijum

stadijum adolescencije

adultni period

**40 - 60  
dana**



## Terestični testovi toksičnosti

---

Raznovrsni su, ovdje se ubrajaju i testovi toksičnosti na zemljišnim organizmima, na pčelama, testovi toksičnosti na divljim životinjama, testovi toksičnosti na pticama.



**Akutni :**

**Test jedinke:** Kišne gliste.

**Metod:** Akutna toksičnost u semistatičkim uslovima.

**Postupak:** 5 koncentracija test supstance u sintetičkom zemljištu. 40 jedinki/test, raspoređene u 4 posude.





**Trajanje:** 14 dana (provjera mortaliteta nakon 7 dana).  
**Uslovi:** Kontinuirano osvjetljenje.  
**Rezultat:** Srednja letalna koncentracija ( $EC_{50}$ ).



## Testovi hronične toksičnosti

**Test organizmi:** Kišne gliste, puževi, biljke.

**Praćeni parametri:**

- **Kišne gliste:** Reprodukcija, rast, ponašanje, ishrana.
- **Biljke:** Razvoj korijena, nicanje izdanaka.

**Rezultat:** Efektivne koncentracije i NOEC (koncentracija bez efekta).