

МАКЕДОНСКО ЕКОЛОШКО ДРУШТВО

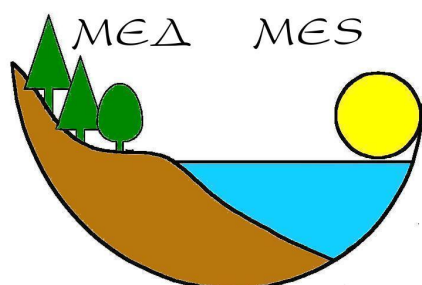
Наслов на проектот:

Развој на методологија за испитување на ендокрини
нарушувачи (пестициди и други хемикалии) во човечка коса

Раководител на проектот: Каролина Пендовска

Извештај за периодот: *октомври – декември 2010*

Датум на поднесување: 20. 12. 2010



1. Општа цел на проектот:

Главна цел на овој проект е развивање на методологија за испитување на ендокрини нарушувачи (ЕКН) (endocrine disruptors)¹, односно пестициди и други хемикалии во коса. Со примена на современа и многу осетлива техника како гасно-масена (GC-MS) хроматографија за анализа на примероци хумана коса, се овозможува одредување на позитивните примероци со голема точност, бидејќи косата како медиум за анализа има уникатна способност за подолготрајно складирање на туѓи супстанции (ксенобиотици), спротивно на нивното кратко присуство во крвта и урината. Овој материјал поради цврстата и издржлива градба овозможува ретроспективно истражување на хронично изложување на токсични супстанции. Истовремено лесните околности на земање примерок и малите количини проба потребни за анализа одат во прилог на достапноста на оваа аналитичка постапка.

Голем број на абнормалности во фертилитетот на жени и мажи, ризик од компликации во бременоста, конгенитални и развојни нарушувања², како и зголемување на инциденцата на разни форми на рак (тестикуларен, леукемија, остеосарком и др.) асоцирани со изложување на хемикалии како ЕКН поттикнува истражувања за ризикот од развивање на горенаведените промени во здравјето како резултат на изложеноста на овие хемикалии.

Иницијативата за испитување на коса за пестициди и други хемикалии кои се користат и на кои луѓето се изложени во секојдневниот живот во текот на извршувањето на работните обврски и генерално изложени во животната средина, во домовите, исхраната, се смета за неопходен чекор во обидот за поставување основа за идни скрининг програми за присутност на ендокрини нарушувачи ЕКН во човечката популација.

2. Посебни цели на проектот:

1) На резултатите од анализа на ЕКН во коса на лозари и фризери со гасно-масена (GC-MS) хроматографија им предходеа подготовка на материјалот за екстракција на ЕКН и екстракција на овие соединенија, што воедно беше најголемиот предизвик во целата аналитичка постапка

¹ Од хемиска гледна точка во потенцијални ЕКН спаѓаат диоксини и фурани, полихлорирани бифенили, пестициди, фталати, алкилфенолни соединенија, бифенолни соединенија, тешки метали (кадмиум, олово, жива) и фитоестрогени од исхраната (како продукти од соја). Дефиницијата за ЕКН според Организацијата за Економска Ко-операција и Развој (Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD)) е следна: “Ендокрино нарушувачка хемикалија (ЕКН) е егзогена супстанца која има негативни ефекти врз здравјето на интактен организам или врз неговото потомство, што се должи на промени во ендокрината функција.” и

“Потенцијално ендокрино нарушувачка хемикалија (ЕКН) е супстанца која поседува својства кои може да се очекува да доведат до ендокрино нарушување во интактен организам.” Европската Комисија во својата стратегија за ендокрини нарушувачи (Community Strategy for Endocrine Disrupters) има изработено листа на супстанции за кои се смета дека интерферираат со хормоналните системи на луѓето и живиот свет ((COM (1999) 706), (COM (2001) 262), (SEC (2004) 1372), SEC(2007)).

² Vrijheid et al.: Risk of hypospadias in relation to maternal occupational exposure to potential endocrine disrupting chemicals. Occupational Environmental Medicine. 2003; 60:543–550.

поради недостатокот на стандардизирани методи за собирање пробата - коса, миене и хемиска анализа.

2) Изведовме анализа на екстрактите од коса со примена на гасна хроматографија спрегната со масена спектрометрија (GC-MS), како алатка која е прв избор во испитување на ЕКН загадувачи во коса (Wada et.al, Covaci et. al, Schramm)³ и интерпретација на добиените аналитички резултати.

Задачи дефинирани со предлог-проектот	Постигнати мерливи резултати и активности	Коментари
Посебна цел 1	Мерливи резултати кои ја претставуваат Посебна цел 1) се постигнати со продолжување на фазата на Екстракциони методи. Тие беа применети на собраните примероци коса од лозари (Кавадаречки регион) и фризери (Скопје).	Активностите предвидени за оваа цел беа успешно спроведени, запазувајќи го наведениот рок на извршување. Истата беше успешно изведена и фотодокументирана.
Посебна цел 2	На добиените екстракти од коса беа извршени анализи со GC-MS и резултатите се соодветно обработени.	Предвидените активности беа успешно реализирани.

3. Активности

1. Екстракција на ЕКН од коса
2. Анализа на екстракти од коса со гасно – масена спектрометрија

Активност 1

(1. Екстракција на ЕКН од човечка коса)

Опис (опишете го текот на активноста и нејзината динамика, ве молиме користете табели ако е тоа соодветно)

Втората фаза од проектот е суштината на проектната задача. Имено изнаоѓањето оптимална екстракциона постапка, која дава проба за GC-MS анализа што ќе овозможи веродостојни и репродуцибилни резултати е предмет на истражување на многу научни тимови. Основата за испитување на коса се наоѓа во карактеристиките на овој биолошки матрикс способен за внес и секвестрирање на ксенобиотици во влакното, што дава информација кои ксенобиотици се присутни и времетраење на изложеност на ксенобиотиците.

³ Covaci et.al.: Organochlorine contaminants in hair of adolescents from Iassy, Romania. *Chemosphere*. 2008; 72 (16-20).

Wada et al. Analytical methods for abused drugs in hair and their applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010; 397: 1039-1067.

Групи од интерес за оваа студија беа лозари и стилисти од Република Македонија (соодветно Кавадарци и Скопје)⁴, како групи кои се изложени на хемикалии со можни ЕКН својства на работното место. Собраните примероци коса од лозари пред прскање ($n = 20$), коси од лозари после прскање ($n = 37$) и примероци од стилисти ($n = 10$), во втората фаза од проектот беа подложени на соодветен третман кој овозможува ослободување на вградените материји од косата во соодветниот растворувач.

Според литературните податоци, неиспарливите органски соединенија како пестицидите најдобро се одредуваат со гасна или течна хроматографија и со имунолошки тестови. Одвојувањето на супстанците од интерес од матриксот на примерокот се заоснова на диференцијална екстракција, при што одвојувањето се врши со подесување на рН на водената фаза и екстракција со растворувач кој не се меша со вода или може да се користат сорбенти. Овие постапки се со голем недостаток, а тоа е губиток на значаен дел од анализите од интерес, а воедно може од економска гледна точка да чинат многу.

Затоа целта во оваа фаза беше да ја оптимизираме постапката на екстракција, како би имале метод што е едноставен и осетлив за детекција (не се работеше квантификација) на ксенобиотици (пестициди и други токсични материји) во коса, бидејќи во Македонија постојат услови во повеќе лаборатории за извршување на вакови анализи.

Чекори во постапката

Фазата на екстракција на коса се состоеше од два чекора:

а) Предтретман на коса. Органски растворувачи може да се применат за отстранување на надворешна контаминација на примероците коса. Ние применивме миење на сите примероци коса со дихлорометан што е во согласност со методот на Cirimele.

Во стаклено садче секој примерок коса беше внимателно потопен со 5 mL дихлорометан и со бавно мешање на садчето се чуваше потопен 2 минути. Потоа се декантираше растворувачот, а косата се сушеше со благо тапкање меѓу целулозни марамчиња. Измиената коса се сецкаше на сегменти коса од 1 - 2 mm и така иситнета се толчеше во мермерно аванче со капки метанол, до формирање на што е можно похомоген прашок од коса. Ова беше и најважната модификација на методот на Cirimele. Од вака подготвен примерок коса, се вагаа 19-20 mg коса во стаклени 5 mL шишенца со капаче.

б) Оптимизација на екстракционата постапка и екстракција. За оптимизација на екстракционата постапка применивме различни растворувачи и различни односи на истите. Беше изведена и екстракција со различни волумени на органските растворувачи. Начинот на концентрирање на примерокот коса беше уште испитан параметар. Во стакленото шишенце со одваганиот прашак коса се додаваше 2 mL метанол. Вака подготвениот примерок се поставуваше на екстракција во специјално наместена апаратура за екстракција претставена со стаклен сад исполнет со силиконско масло (заради долготрајноста на

⁴ други групи од интерес може да се: фармери, градинари, столари, молери, дреари, чистачки итн.

екстракцијата) поставен на магнетна мешалка, кое масло се загреваше со мал грејач, а температурата се регулираше со контактен термометар. Со постојано мешање на растворот, екстракцијата се спроведуваше 24 часа на температура од 45 °C. По завршената екстракција, екстрактот беше собран со памук на стаклена Пастерова пипета во епендорф од 1,5 mL и се центрифугираше на 10000 rpm во времетраење од 15 минути. Добиениот супернатант беше распределен во помали порции во чисти епендорфи за подобра понатамошна реконституција. Супернатантот се отпаруваше до суво под благ проток на азот, што е воедно модификација на методот според Cirimele според кој вршење отпарување под топол воздух во сушара на 50 °C до четвртина волумен. Реконституција на сувиот остаток се вршеше со 50 µL метанол, со вортексирање на растворот 1 минута. Вака подготвениот екстракт беше префрлен во стаклен инсерт за стаклена 2 mL виалка од и се анализираше со GC-MS.

Методи (образложете ја во детали користената методологија)

Според целта на проектот, методот кој се создава е модификација на постоечки метод (V. Cirimele, P. Kintz, B. Ludes, Evidence of pesticide exposure by hair analysis, 1999) кој се покажал успешен во детекција на пестициди во коса на лозари. Како и во сите анализи на траги, така и во овој метод, најважен е чекорот на подготовка на примерокот за хемиска анализа, така што нашиот метод се фокусира на модификации во наведениот метод токму во чекорот на екстракција на аналитите.

Учесници и соработка (ве молиме наведете имиња на лица и институции/организации)

Во активноста 1. учествуваа членовите на проектниот тим (Каролина Пендовска - раководител, Сања Марковска), со поддршка од ментор-постар истражувач проф. д-р Зоран Здравковски. Во подготовката на примероците коса за екстракција активно учествуваше и претставник на средношколците кои ја посетија нашата лабораторија.

Фотодокументација за овие чекори е во посебен Word документ означен Екстракција, приложен електронски со извештајот.

Резултати (ве молиме објаснете во детали, и користете табели и графици каде што е соодветно)

Од 20 примероци коса пред прскање, еден примерок не беше подложен на екстракција, бидејќи беше доставена малку коса. Од 37 примероци коса после прскање⁵, еден примерок не се анализираше поради мало количество коса, додека 7 примероци коса се екстрахираа и анализираа со GC-MS, но поради малото количество коса добиено по толчење (1-3 mg) се очекуваше да дадат несоодветни резултати. Кај фризерите, сите 10 примероци беа анализирани.

Оптимизацијата на екстракционата постапка, каде не интересираше квалитетот на добиените хроматограми и релативната застапеност на

⁵ по предавањето на извештајот на напредок на работата добивме уште 4 примероци коса, кои ги означивме oPE-20 до PE-23.

аналитите, ја спроведовме на еден примерок коса пред прскање, со доволна количина за изведба на планираните експерименти. Средна вредност на порциите коса од овој примерок кои подлежат на различни екстракциони услови беше 19 mg. Како реперна супстанца за квалитетот на екстракциите го земавме присуството на кофеин во примерокот, бидејќи кофеинот е егзогена супстанца која се влегува во организмот по пат на ингестија и се екскретира од организмот и во косата, меѓу останатите органи.

Метанолот како растворувач за екстракција бил применет во истражувањето на Cirimele, но на коса во сегменти од 1 - 2 mm (види Прилог 1, слика 1). Нашата модификација на овој метод е употреба на метанол за екстракција на толчена коса во иста порција како и кај Cirimele (2 mL), која даде подобри резултати (види Прилог 1. слика 1). Пробавме и екстракција со помал и поголем волумен на метанол, 1 mL и 3 mL, но најдобра беше екстракцијата со 2 mL метанол.

Екстракции на соодветни температури под вриење на растворувачите, се одвиваа и со други органски растворувачи, како со толуен и хексан и тоа уште во фазата на толчење. Не се добија задоволителни резултати (види Прилог 1. слика 2 и слика 3) од аспект на присуство на кофеин. Воедно изведовме и екстракции со различни односи на растворувачите метанол и толуен (1:1; 1:5 и 5:1), но сепак не беа задоволителни резултатите, како што беа при примена на чисти растворувачи.

Друг параметар кој сменивме во текот на анализите на примероците коса беше и отпарувањето до суво на метанолните екстракти со азот. Предходно, серија од 19 примероци коса пред прскање беше подготвена со отпарување до $\frac{1}{4}$ од волуменот на екстрактот во сушара на 50 °C и како таков концентрираниот екстракт го анализиравме со GC-MS. Отпарувањето до суво под азот се покажа како подобар чекор за понатамошните анализи (види Прилог 1. слика 4 и слика 5).

Дискусија и заклучоци

Schramm et al. (1992), забележале дека сукцесивно миеење на косата одстранува масти и пот, како и егзогени супстанции од косата, со што би се одвоиле надворешната од внатрешна контаминација.

Активност 2

(2. GC-MS анализа на екстракти од коса)

1. GC-MS услови

Опис (опишете го текот на активноста и нејзината динамика, ве молиме користете табели ако е тоа соодветно)

GC-MS анализа беше изведувана под следните услови: гасниот хроматограф беше Agilent GC 6890N со автосемплер, додека масениот спектрометар беше Agilent 5975B со електронска и хемиска јонизација (EI/CI). Колоната на гасниот хроматограф беше HP-5MS, должина 30 m, внатрешен дијаметар 250 μ m, дебелина 0,25 μ m. Како гас носач беше користен хелиум, при константен проток од 1 mL/мин. Примероците (1 μ L) беа неразделно инјектирани при температура на инјекторот од

200 °C. Иницијалната температура на колоната беше 60 °C, одржувана на 1 min, покачена на 200 °C во стапка од 20 °C/мин, потоа до 250 °C во стапка од 10 °C/мин, на крај до 295 °C, во стапка од 5 °C/мин за 10 мин. Времето за анализа беше 32 минути. Температурата на излезната линија до масениот спектрометар беше 280 °C. Температурата на јонскиот извор беше 230 °C, а на масениот анализатор - квадруполот беше 150 °C. Јонизацијата беше тип електронска јонизација. Масениот спектрометар оперираше во опција SCAN (скенирање на цел масен опсег од 50 – 450 u). Добиените хроматограми и масени спектри беа анализирани со AMDIS – Automated Mass Deconvolution and Identification System со EPA/NIST вградена библиотека.

Како критериум за идентификација на анализите од интерес беа применети ретенционото време, јонот за квантизација и јоните за потврда на идентитетот (види Табела 1). Бидејќи цел на истражувањето беше само детекција на ЕКН во коса не применивме додавање на внатрешен стандард, кој често се среќава во литературата за MS квантификација.

Хемиска група Пестицид	Ретенционо време t_R (мин)	Јон за квантизација и јони за потврда на идентитет
Пиретроид Циперметрин Ламбда цихалотрин	19,099 – 19,125 16,551 – 16,588	163 181 165 91 181 197 208 141
Органофосфат Хлорпирифос	11,461 – 11,485	197 199 314 97
Фталимид Фолпет	12,255 – 12,276	104 76 260 130
Триазол Триадименол	12,141 – 12,157	112 57 168 128
Фениламид Металаксил	10, 896 – 10,927	206 160 132 146
Динитрофенол Диносам- метаболит на Динокап	12,297 – 12,909	27 43 41 29
Стробилурин Крезоксим-метил	13, 122 - 13,137	116 131 206 132

Табела 1. Ретенционо време и целни јони на пестициди

Методи (образложете ја во детали користената методологија)

Според целта на проектот, методот кој се создава е модификација на постоечки метод (V. Cirimele, P. Kintz, B. Ludes, Evidence of pesticide exposure by hair analysis, 1999) кој се покажал успешен во детекција на пестициди во коса на лозари. GC-MS условите за анализа ги превземавме од веќе постоечкиот метод и се наведени погоре.

Учесници и соработка (ве молиме наведете имиња на лица и институции/организации)

Во активноста 2. учествуваа членовите на проектниот тим, со поддршка од ментор-постар истражувач проф. д-р Зоран Здравковски и проф. д-р Марина Стефова.

Резултати (ве молиме објаснете во детали, и користете табели и графици каде што е соодветно)

Пестицидите како отрови се применуваат за уништување на биолошките организми штетни за човекот. Според биолошката врста која ја уништуваат се делат на инсектициди, хербициди, родентициди и фунгициди. Од спроведените анкети на испитаниците лозари најчесто применувани пестициди се инсектициди, фунгициди и некои хербициди (види Листа на пестициди приложена како посебен Excel документ).⁶ Технички спецификации за активните материи од поединечните пестициди добивме од базата на податоци за пестициди FOOTPRINT.⁷

Препаратите што се применуваат во лозарството се со токсични ефекти кај човекот и имаат познати вредности за LD₅₀. Повеќето се и со статус канцерогени материи и за ЕКН со состојба возможно, статус сеуште неидентифициран. Во Р. Македонија сеуште се во продажба пестициди кои според Директивата 2008/127/ЕС на ЕУ Комисијата (Анекс I)⁸ не се на позитивната листа на активни супстанции кои се прифатливи за животната средина, човековото здравје и здравјето на животните (на пример LEYBACID, FOLAR).

Постои интерес за одредување на овие хемикалии бидејќи листата на негативни ефекти врз здравјето на земјоделците (лозарите) е долга. Во зависност од тежината на изложување, здравствени проблеми кои се должат на изложеност на пестициди се манифестираат со серија на симптоми: благо органофосфатно труење се манифестира со омалаксаност, дијареа, повраќање, потење, абдоминална болка и саливација. Умерено труење пак вклучува и диспнеа, намалена мускулна сила, бронхоспазам, тремор, брадикардија. Тешко труење резултира со кома, респираторна парализа, екстремна хиперсекреција, цијаноза, мускуларна парализа и конвулзија. Други болести асоцирани со изложеност на пестициди како дерматитис, појава на астма, дефекти на сензорните периферни нерви, моторни дисфункции, дефицит во вербална абстракција, внимание и меморија, вознемиреност и депресија се претпоставува дека ја намалуваат способноста на земјоделците да работат во согласност со процедури за безбедност. Традиционалните крајни точки на токсичност како структурни малформации, намалена репродуктивна функција, намалена имуна и нервна реакција, што се асоцираат со дејството на ЕКН се испитувани пред се кај животни. Резултатите наведуваат на изработка на студии за реални оценки на

⁶ База на податоци за агро-препарати во Република Македонија: <http://aba.ugd.edu.mk/>

⁷ FOOTPRINT база на податоци за својства на пестициди изработена од Универзитетот Хертфордшир како дел од ЕУ финансиран проект (FP6-SSP-022704): <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/en/index.htm>

⁸ http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/rev_prog_exist_pest_en.htm

опасностите од долготрајна изложеност (во животната средина, на работното место, исхраната) на бројни агро-хемикалии како потенцијални ЕКН и кај општата популација.

Фризерите како лозарите, на работното место се изложени перкутано и по инхалационен пат на дејството на многу хемикалии кои се наоѓаат во козметички производи за нега на коса и тоа за миеење, боење на коса, бланширање, стилирање, прскање и сушење на коса. Ова изложување може да влијае на здравјето и да се манифестира како болести на кожата или респираторни болести. Воедно ефектите врз репродукцијата долго време се приложуваат во литературата.⁹

Од хемикалиите кои се асоцираат со ЕКН ефекти се издвојуваат диметил фталат, диетил фталат, бутил бензил фталат, дибутил фталат и ди(2-етилхексил) фталат кои се присутни во многу козметички производи вклучително и дезодоранси, парфеми, производи за нега на нокти и коса. Голем број на хемикалии присутни во пена за коса, разни спрејови за коса имаат токсични ефекти аако се инхалираат. Овие супстанции се поливинил алкохол, поливинилпирилон, хидрофлуоро-јаглерод и полипропилен гликол иако овие супстанции се примарно асоцирани со акутни ефекти на кардиореспираторниот систем, кожата и очите.

Бидејќи станува збор за развивање на аналитичка постапка за биомониторинг на хемикалии, мора да се земе предвид зависноста на концентрацијата на хемикалиите од шемата на кинетика и експонирање:

At work, the exposure is at most for a period of 8 hours daily, and very often is limited to only short periods of time within the working hours. Some chemicals or their metabolites have a very short half time in the body, especially in blood, and thus the concentration drops very rapidly immediately after the exposure— and the concentration measured may reflect more the time lapse between exposure and sample collection than the actual original concentration while the exposure takes place. This will lead to badly distorted assessment of the exposure – and of the risk involved, and even to the conclusion that there is no exposure when in fact there was exposure but by the time the sample was collected all chemical has disappeared from the blood. While the excretion in the urine functions as a buffer and the problem thus is not equally conspicuous, all biomonitoring requires knowledge of the timing of the sample collection, and of the kinetics of the analyte measured in that matrix.

За да увидиме која е границата на детекција на нашиот метод извршивме GC-MS мерења на стандардни раствори од аналитички стандард на хлорпирифос во хексан со опсег на десет концентрации од 0,00625 ng/ μ L до 50 ng/ μ L (види Прилог 1, слика 1 и слика 2). Стандардните раствори ги подготвивме со сериско разредување на основен стандарден раствор од 1 mg/mL хлорпирифос во хексан. Хлорпирифос увидовме од анкетите дека е најчесто употребуван меѓу испитаниците и за истиот во скромните податоци од литературата, постои одредување во коса со граници на детекција од 0,031-0,488 μ g/g.¹⁰ Нашата граница на детекција на стандардните раствори кои не

⁹ Peters et al.: Fertility disorders and pregnancy complications in hairdressers - a systematic review. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*. 2010; 5:24.

¹⁰ Posecion et al.: Detection of exposure to environmental pesticides during pregnancy by the analysis of maternal hair using GC-MS. *Chromatographia*. 2006; 64 (11-12): 681-687.

беа концентрирани со отпарување со азот, туку подготвените раствори беа директно инјектирани во инструментот, се наоѓа во граници од 1 – 50 ng/ μ L, при што 1 ng/ μ L во AMDIS не се детектира, туку хроматограмот мануелно се пребаруваше и селектираната компонента се потврдуваше со масени спектри од EPA/NIST библиотеката.

Дискусија и заклучоци

Веруваме дека количината на коса дадена за анализа е лимитирачки фактор за успехот на истражувањето. Максимална количина на коса која ја одмерувавме беше 20 мг¹¹, што одговара на концентрација од на пестицид во коса, според граница на детекција преземена од литературата. Нашите услови - опремата дозволуваат детекција на пестицидите до ... концентрација, што значи не може да се детектираат концентрациите пониски од таа концентрација. Овие резултати не се изненадувачки, споредено со резултати од литературата (наведи трудови), бидејќи станува збор за матрикс каде има најмала елиминација на ксенобиотици. Воедно сакавме да опфатиме детекција на различни групи на пестициди и др.ЕКН со еден метод. Обидите да не се пречистуваат екстрактите лежат во фактот што без стандарден додаток или внатрешен стандард, се очекуваа огромни загуби на аналитите од интерес.

Цел на испитувањето беше детекција на ЕКН во коса, кој матрикс покрај погодностите што ги нуди во поглед на собирање на примерок има недостатоци како предизвикот/прашање дали измерените аналити се биолошки инкорпорирани во структурата на влакното или се депонирани од амбиенталниот воздух. Недостасуват и информации за врските помеѓу нивоата на пестициди и други ЕКН во коса и ткива.

Со постапките во нашата студија се обидовме да ги детектираме само пестицидите кои се инкорпорирале во косата, бидејќи надворешните контаминанти претпоставувавме дека со предтретман на косата ќе се елиминираат. Во студијата на Posecion et al., која ја сметавме за најблиска до нашето истражување, е одредувана вкупна концентрација на пестициди (нема предтретман на примероците) во коса од испитаници кои живеат во области каде е неопходна употреба на пестицидни препарати во домовите, а не само на работното место.

Работните навики и услови на работното место на лозарите, фризерите наведуваа на можни позитивни резултати. Ако просториите се соодветно проветрувани, ако фризерите носат ракавици и избегнуваат производи кои содржат забранети супстанции, се намалува експозицијата на ЕКН на работно место и се намалуваат здравствените ризици асоцирани со овие супстанции.

Certain behaviors and practices were identified to predisposed to pesticide exposure and illness. Twenty percent (20%) of the farmers used pesticides for more than 20 years and almost 15% have used it for 11–20 years. This is very significant, and indicates chronic exposure among these farmers. The farmers were exposed to 30 minutes to 4 hours per day every application, with an

¹¹ некои примероци коса немаа ни 5 mg коса.

average of 3 hours. They are exposed about 1 to 4 days a week or an average of one and a half days in the application of pesticide.

The activities performed by the farmers while working with pesticides were loading, applying, and mixing (76.4%, 77.4% and 76.4% respectively). During these activities, they are exposed for more than 12 times a year, which is quite considerable. Incorrect work practices were also noted among farmers such as re-entering recently sprayed area (79.3%), wiping sweat off the face (66.8%), spraying against the wind (23.1), spills at the back (45.2%) and while spraying (51.9%), loading (29.8%) and mixing (35.1).

Despite the high risk and frequency of exposure, farmers did not wear proper personal protection while working with pesticides. Boots were the only protective equipment worn by majority of the farmers, and practically no one used aprons or gauntlet gloves. Cloth face masks which do not offer adequate coverage for some chemicals were used by a number of respondents (41%). Improvised forms of PPE were also used such as handkerchiefs, long sleeves and plastic pants. Re-entering a recently sprayed area has been the cause of a poisoning outbreak in Poland in 2002 after applicators re-entered a contaminated area before the required safety period has lapsed. In the same country, 22 poisoning cases were seen as a result of spraying without adequate protective gear (Przybylska, 2004) [14]. This shows the seriousness of the situation faced by the farmers. When it comes to disposal of pesticide containers, majority (32.4%) said that they stored used containers in their backyard. This is a dangerous practice since household members may mistake it for another container and reuse it. Other previously identified risk behaviors for exposure included frequent pesticide use, washing pesticides equipment in water sources used by humans, inadequate disposal of empty pesticide containers, and eating and drinking during pesticide application (Hurtig, San Sebastian, Soto, Shingre, 2003) [15].

Со оваа студија не беше цел да се одредат разлики во резултатите што произлегуваат од возраст, пол или животни навики (исхрана, пушачки навики, стилирање). Од собраните податоци при анкетањето на лозарите и стилистите наведуваме дека кај лозарите опфативме возрасна популација до 65 годишна возраст и претежно примероци коса од машки пол (само 5 примероци коса беа од жени), додека кај стилистите опфатена беше пред се женска популација.

Меѓутоа, резултатите беа негативни кај 66-те анализирани примероци (во Прилог 1 од слика 8 до слика .. се приложени хроматограми и масени спектри на некои примероци коса). Можни објаснувања за овој исход може да се следните:

- различните хемиски карактеристики на ксенобиотиците, пред се големина на молекулите, степенот на јонизација, растворливоста во вода и масти, врзување за протеините, како и физиолошките фактори како пропустливост на мембраната низ која минуваат ксенобиотиците, влијаат на апсорпцијата и дистрибуцијата на истите во индивидуалните организми.
- за повеќето испитувани пестициди не се познати метаболизмите на биотрансформација и елиминација во коса, следствено барањето на интактен пестицид може да несоодветствува на неговата вистинска форма во косата.

- време на собирање на примерокот не бил соодветен, а воедно ни местото на собирање.
- теренските (географски) услови во кои работат испитаниците лозари може да внесуваат варијабилност од примерок до примерок, во смисла на присутност на ветер, влага за време на работните активности.
- фактори како пушење, фарбање, боја на коса, возраст влијаат на резултатите
- влијание има и количината на примерок за испитување која ни беше на располагање за анализа.

4. Резиме

Активност	Оценка на постигнатиот резултат
Активност 1 (Екстракција на ЕКН)	изведена како што беше планирана во предлог проектот /задоволни од бројот на анализирани примероци
Активност 2 (GC/MS анализа)	успешна изработка/ задоволни од добиените резултати

5. Заклучоци:

Изведените проектни активности ги оценуваме позитивно, бидејќи истите се реализирани во целост, и покрај тоа што се јавуваа потешкотии за собирање на примероци коса и собирање податоци преку анкети (детално образложено во предходниот извештај).

Детекција на ЕКН во коса покрај погодностите што ги нуди во поглед на собирање на примерок, има недостатоци во поглед на тоа дали измерените анализи се биолошки инкорпорирани во структурата на влакното или се депонирани од амбиенталниот воздух. Иако работните навики и услови на работното место на лозарите, фризерите наведуваа на можни позитивни резултати, со извршените анализи не беше утврдено присуство на ЕКН во примероците коса. Ваквите резултати може да се објаснат со различен метаболизам на ксенобиотици помеѓу испитаниците, индивидуални разлики во поглед на изложеност на пестицидите што директно зависи од количината и фреквенцијата на користени пестициди или козметички препарати, количина на примерок за испитување и сл.

Со оглед на тоа дека ова се првични истражувања од ваков тип кај нас, при промени во експерименталните услови, што и зависи од распложливите финансиски средства, може да се очекува и детекција и квантификација на ЕКН во коса. Со ова се отвора простор за понатамошни истражувања за изложеност на ЕКН, особено што постои и интерес кај испитаниците за учество во ваква студија.

6. Финансиски извештај

Финансискиот извештај е приложен во посебен документ во Excel формат.

7. Проблеми и предизвици при реализирањето на проектот

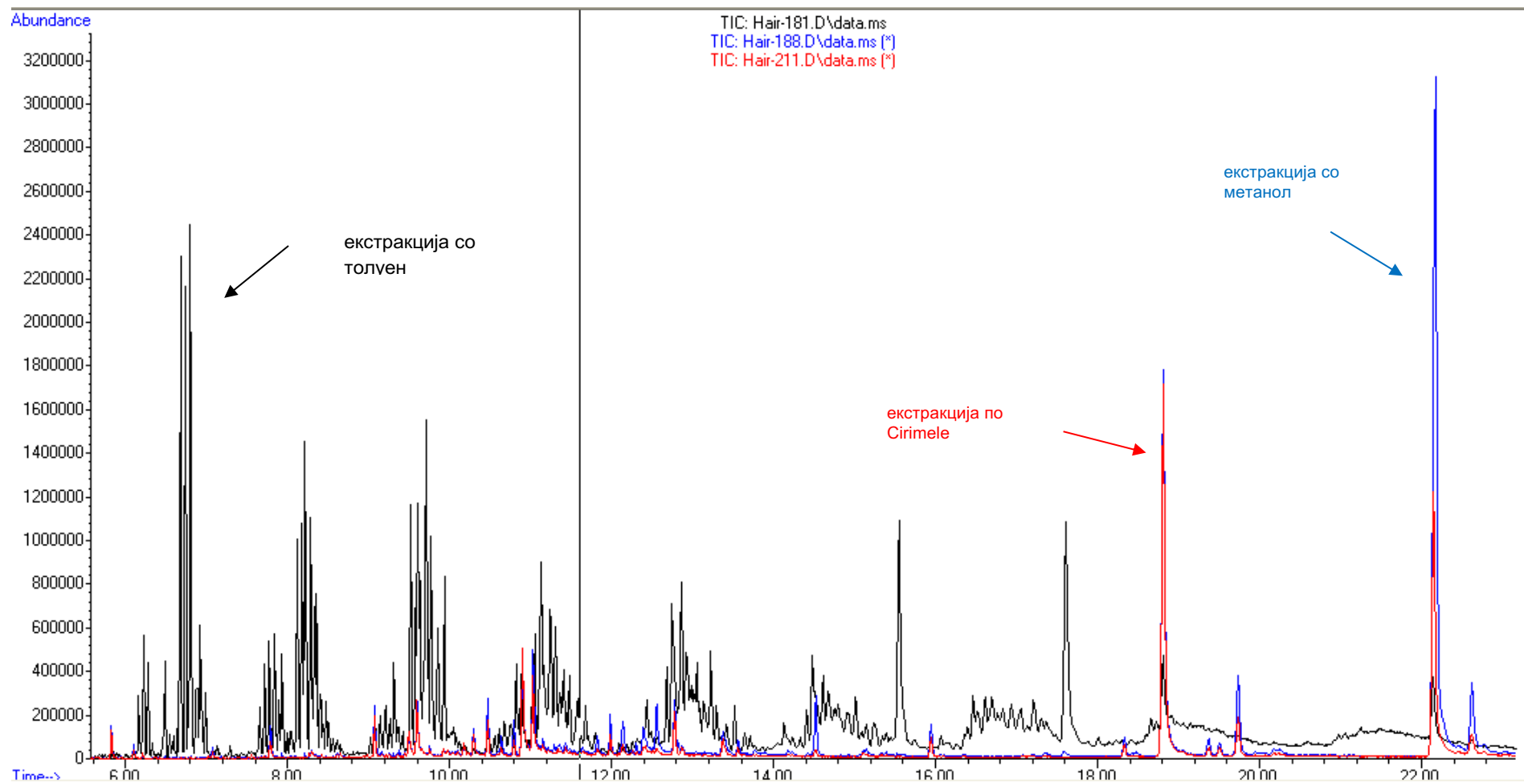
Од целиот тек на активностите ќе ги издвоиме скратената финансиска рамка и ексклузивноста на застапниците за реагенси и материјали на пазарот во Македонија кои се наметнаа како ограничувачки фактор во завршните фази од проектот, што и најмногу зависеа од снабденост со опрема и материјали. Со оглед на тоа што ова истражување е новост во Македонија, а во светски рамки е тема со ограничена литература, неопходни беа што повеќе литературни податоци од оваа област. Поради изменетиот буџет се соочивме со тешкотија при наоѓање на целосни научни публикации.

8. Научени лекции при водењето на проектот

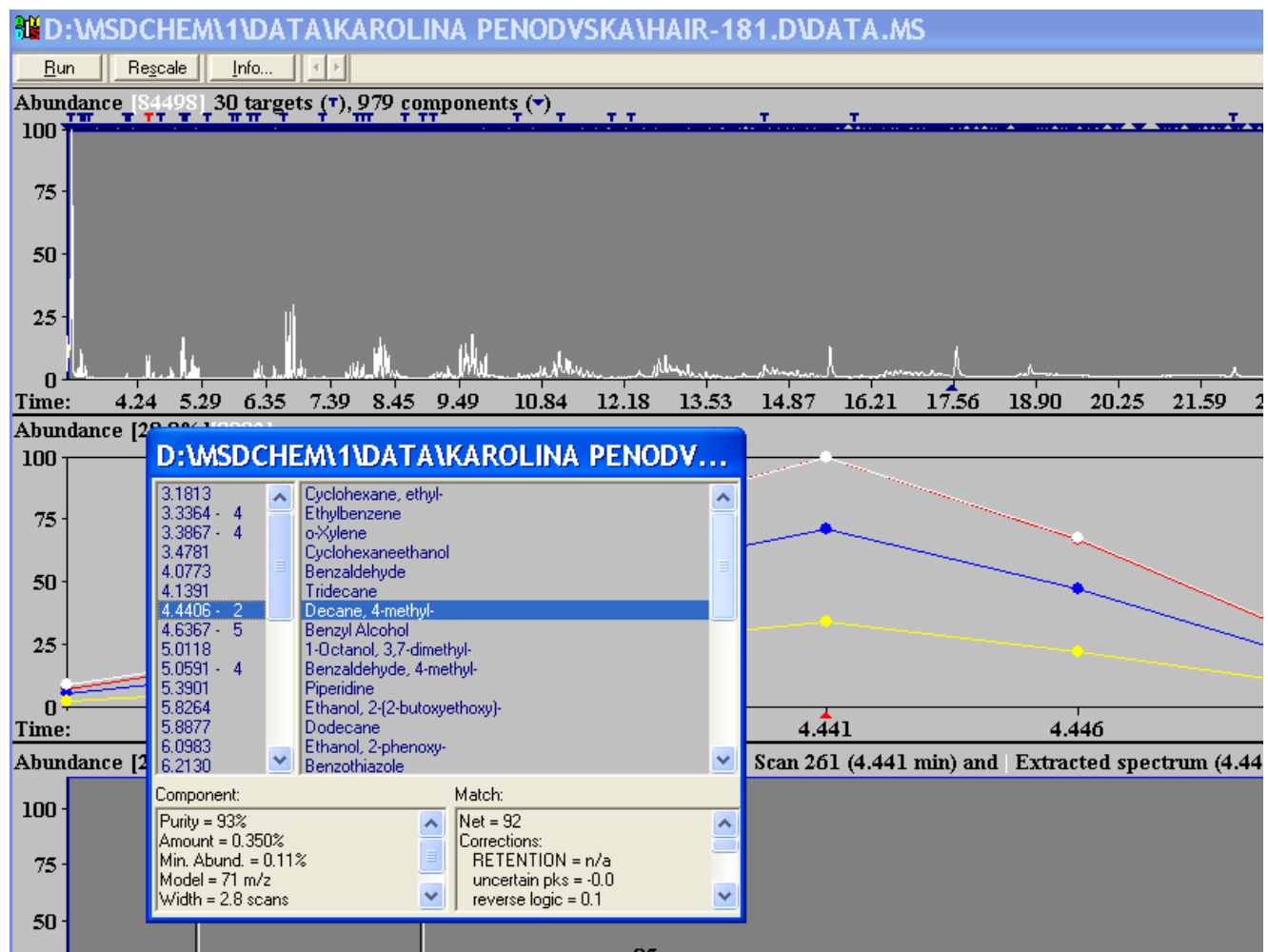
Како прв научно-истражувачки проект за кој сами сме одговорни, задоволни сме од изработените активности и од искуствата што ги стекнавме.

Лабораториските активности отворија можност да ги усовршине нашите аналитичките перформанси, особено запознавање и совладување на работа со инструмент како гасно-масен спектрометар. Работата со инструменти со високи перформанси е мошне динамична активност за која е потребно поголемо лабораториско искуство. Оттука поддршката и одличната комуникација со ментор-постар истражувач проф.д-р Зоран Здравковски и проф. д-р Марина Стефова беше есенцијална за полесно менаџирање и координација на проектните активности.

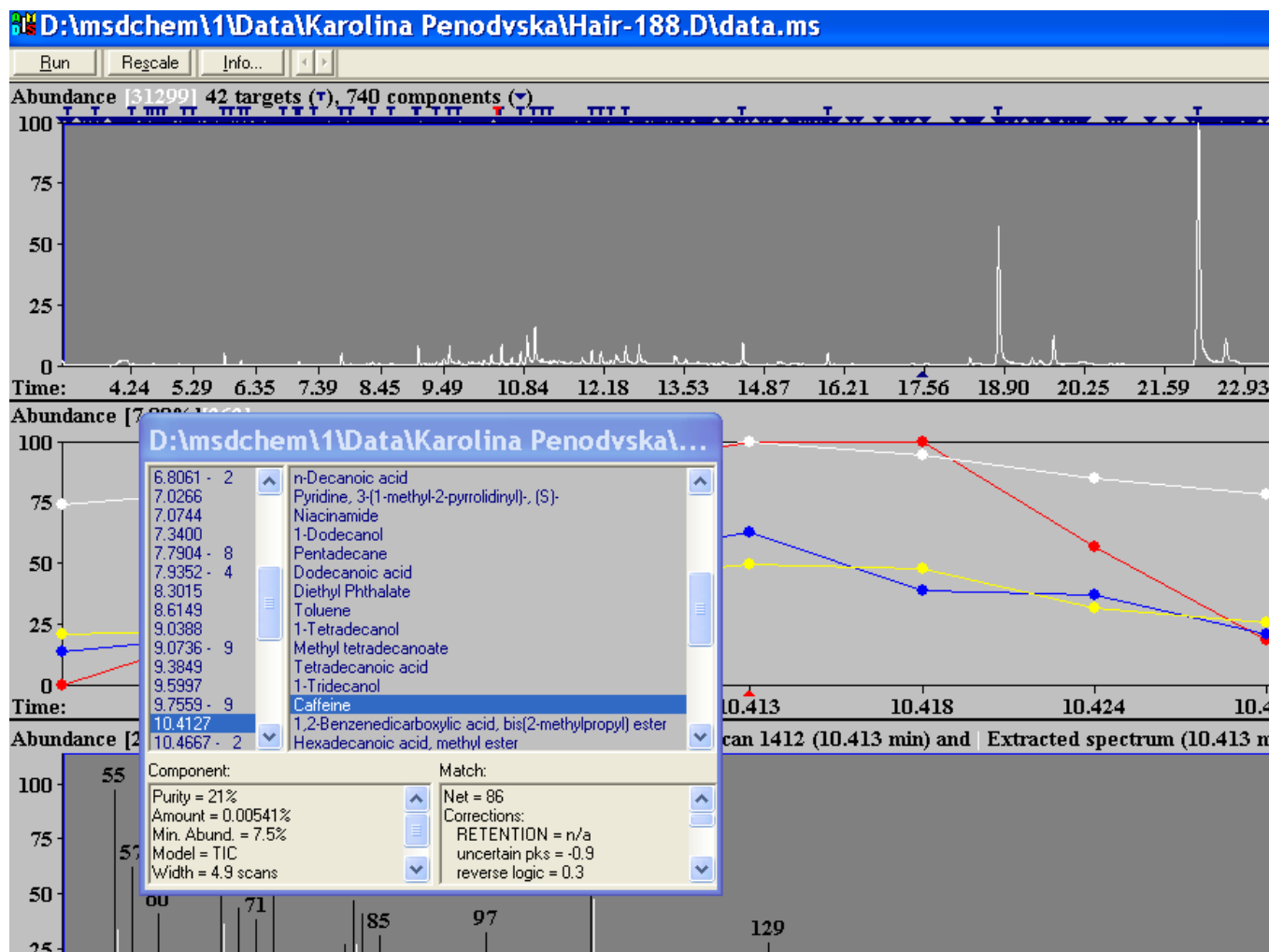
ПРИЛОГ 1



Слика 1. Споредба на добиените хроматограми од екстракциите со толуен, по Cirimele на нетолчена коса и со метанол на толчена коса.

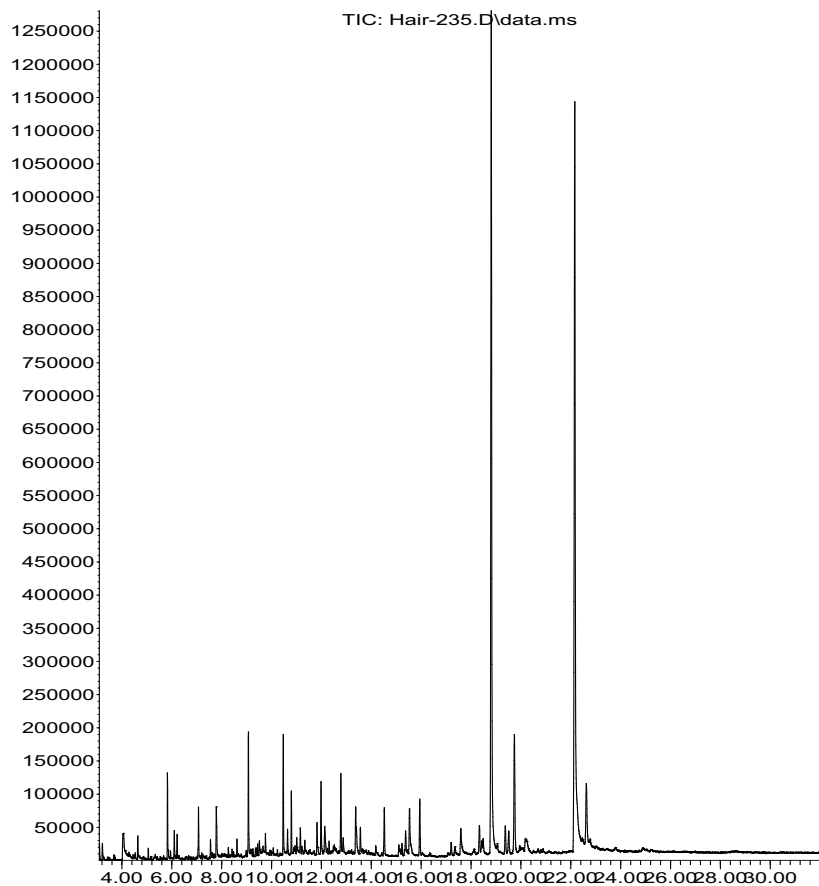


Слика 2. AMDIS резултати од екстракција со толуен.



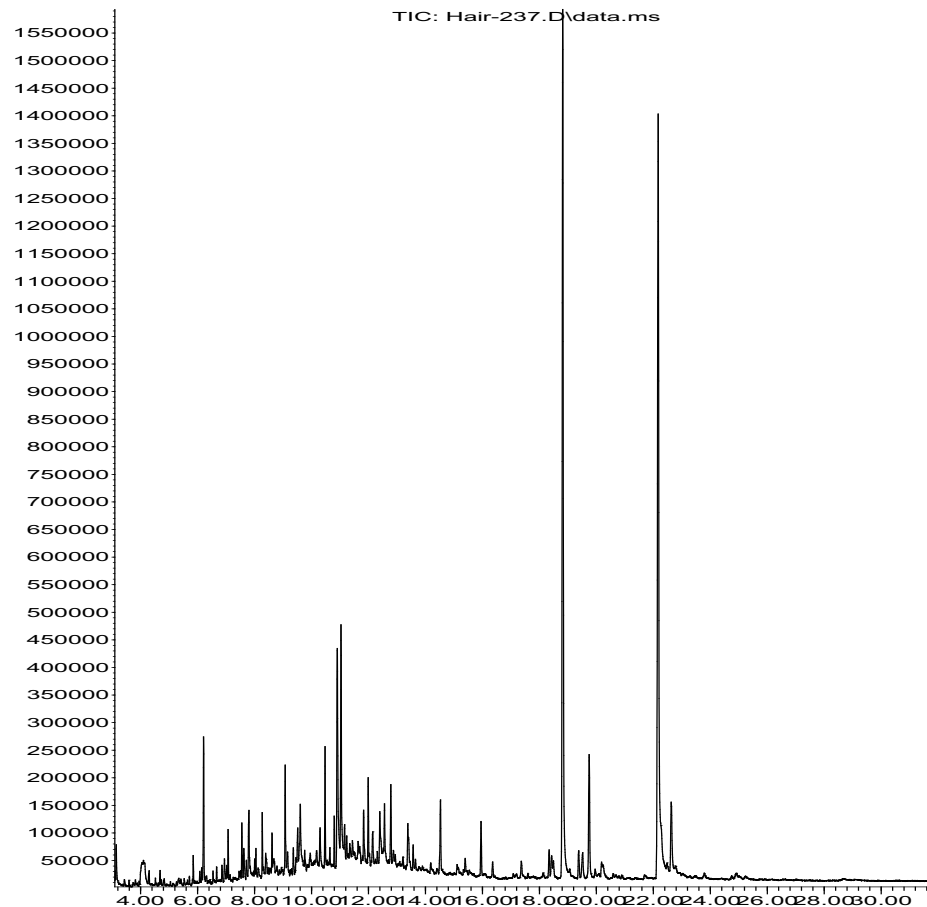
Слика 3. AMDIS резултати од екстракција со метанол на толчена коса.

Abundance



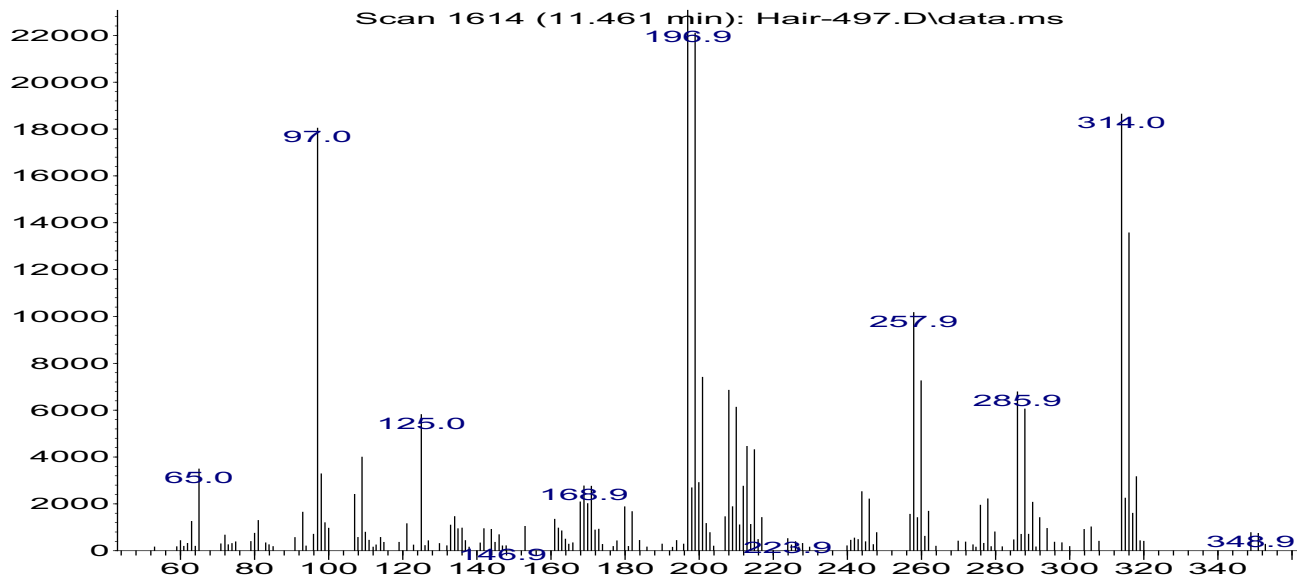
Слика 4. Хроматограм од коса отпарена до сув остаток со азот.

Abundance



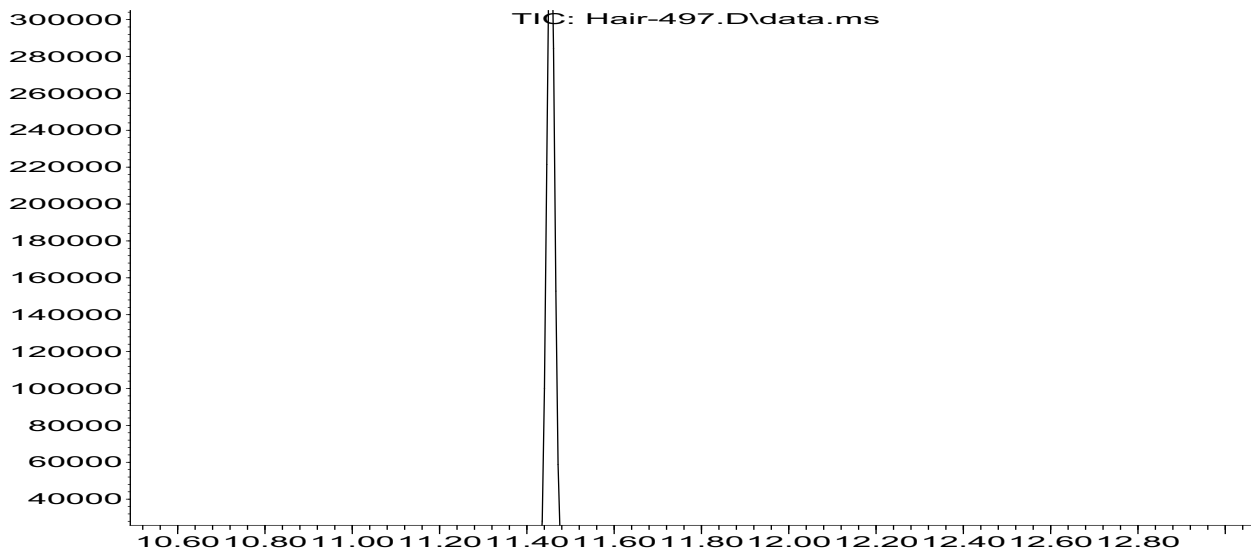
Слика 5. Хроматограм од коса со тпарување во сушара

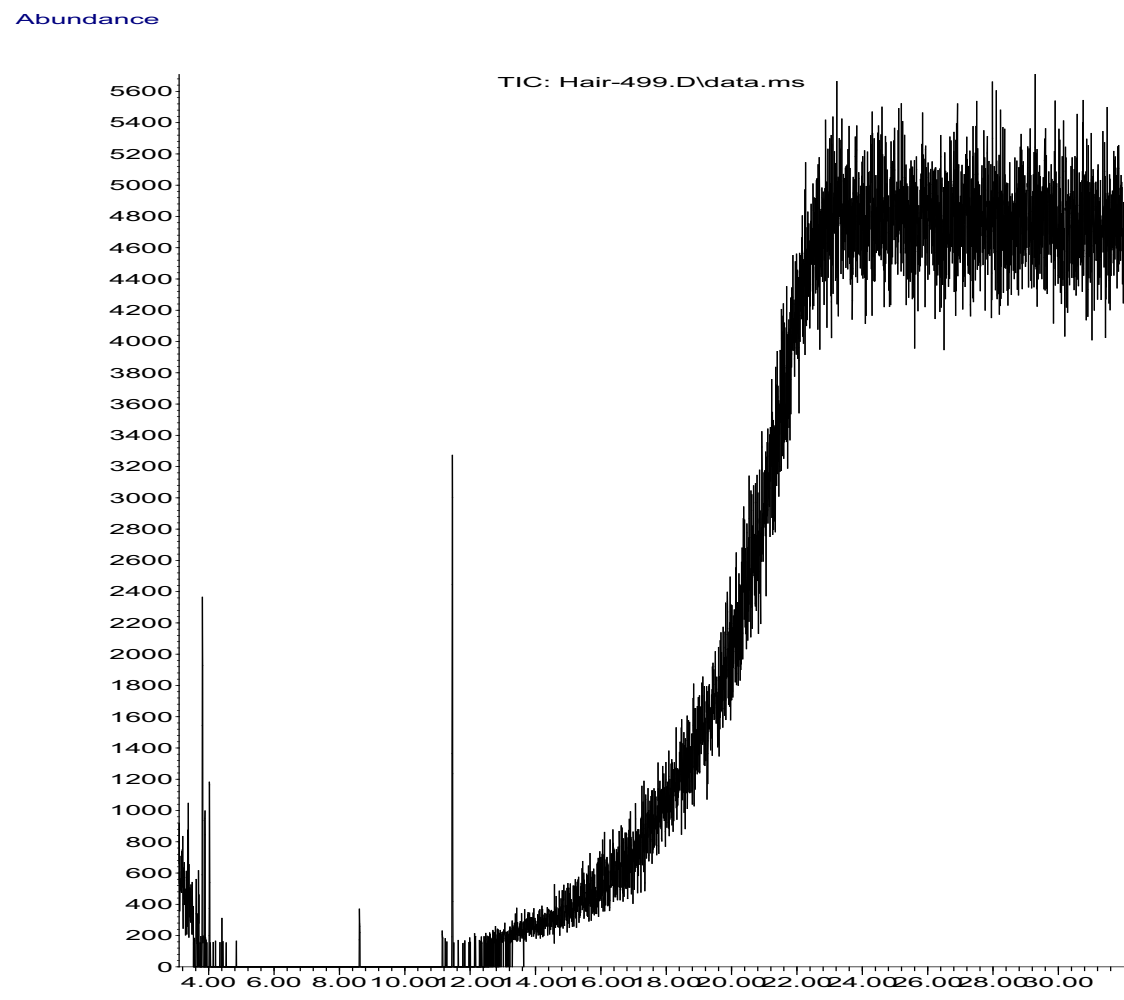
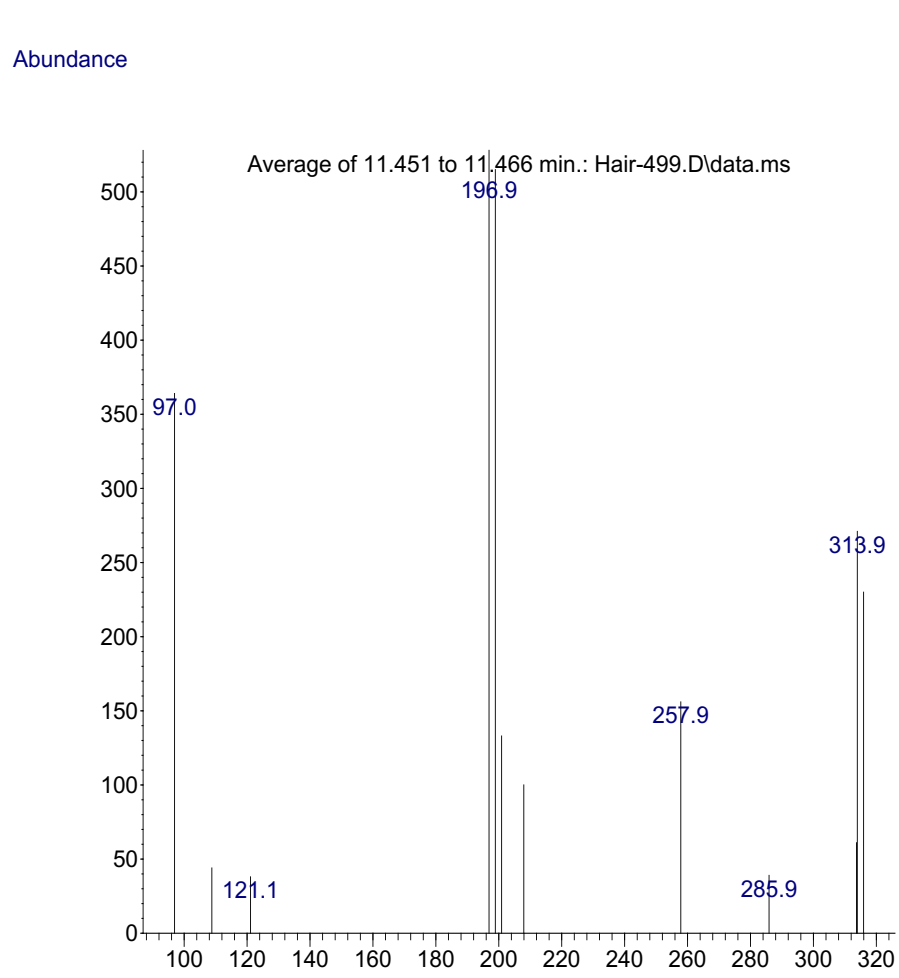
Abundance



Слика 6. Аналитички стандард на хлорпирифос со концентрација 25 ng/ μ L со соодветен масен спектар и хроматограм.

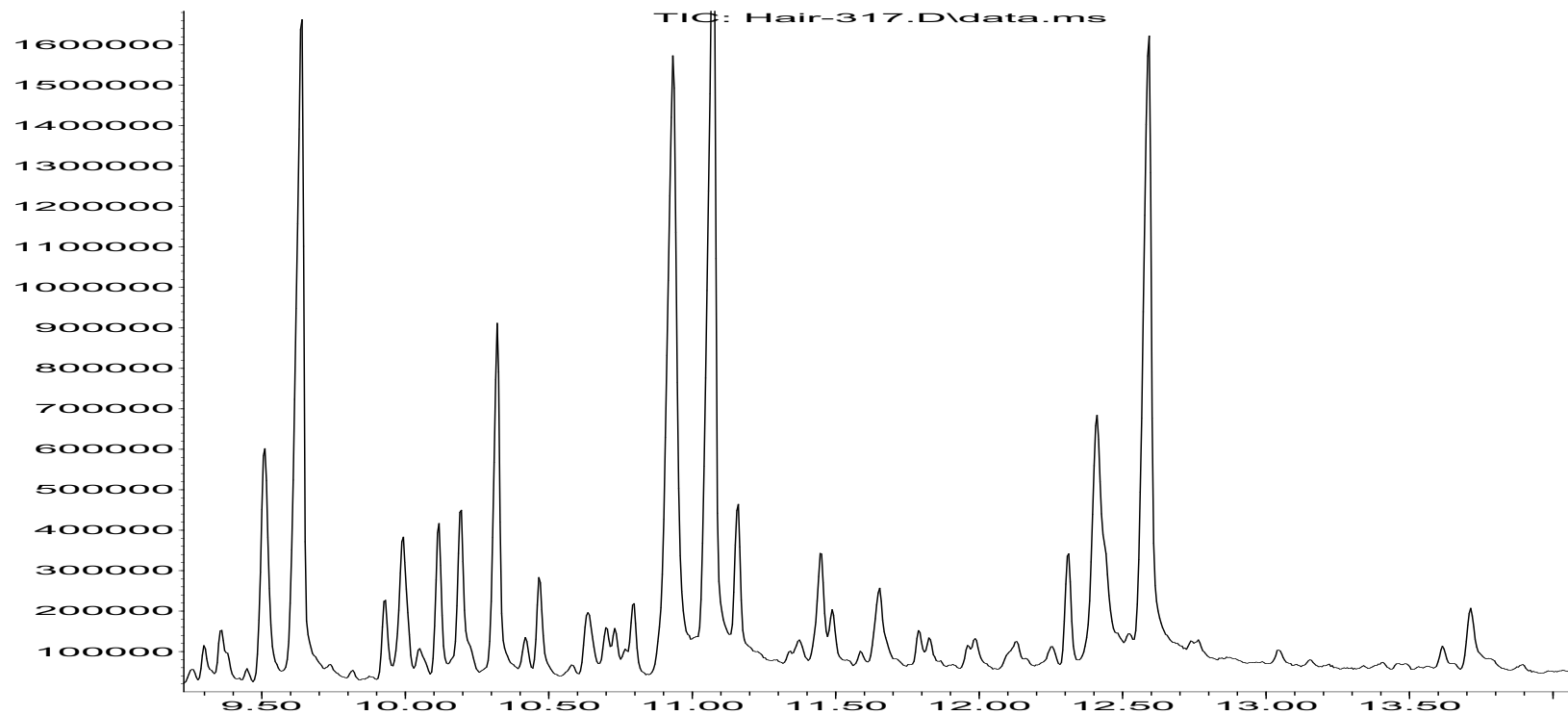
Abundance





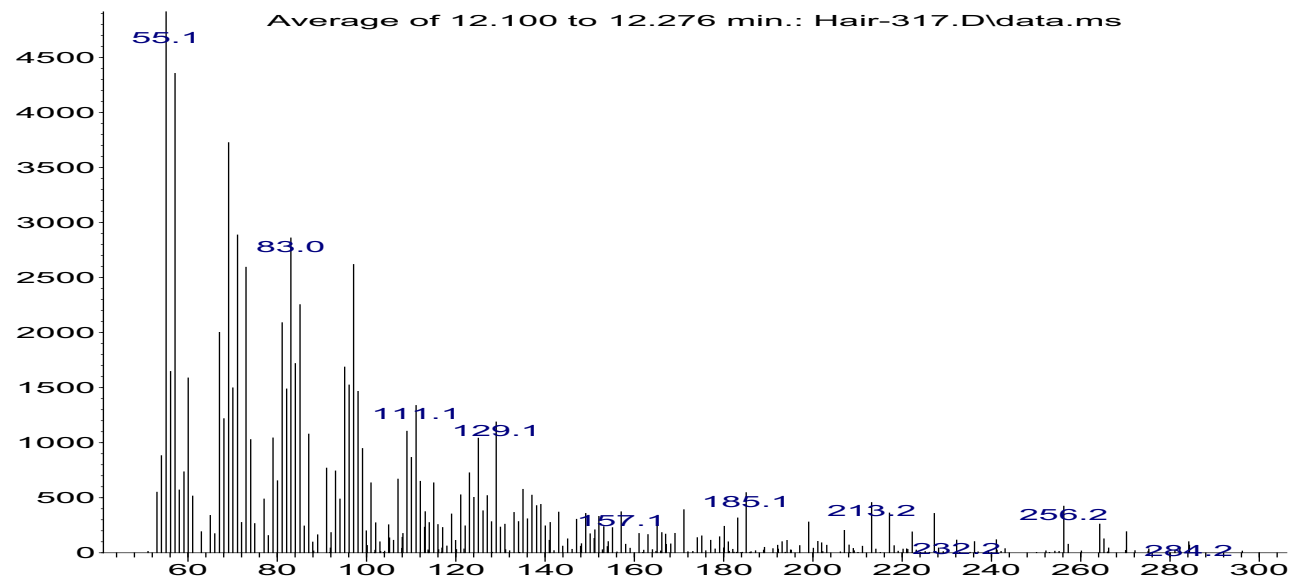
Слика 7. Масен спектар и хроматограм на аналитички стандард на хлорпирифос со концентрација 1 ng/ μ L.

Abundance



Слика 333. Хроматограм на примерок PE-1. Се бараше триадименол, според ретенционото време.

Abundance



Слика 333. Масен спектар на примерок PE-1. Се бараше триадименол, според целните јони.

