

Određivanje citotoksičnog, proliferacijskog, prooksidacijskog i genotoksičnog učinka mješavine odabranih pesticida na humanim kontinuiranim staničnim linijama karcinoma želuca i jetre

Odak, Katarina Ivona

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:534228>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-04**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2023.

Katarina Ivona Odak

7722/N

**ODREĐIVANJE
CITOTOKSIČNOG,
PROLIFERACIJSKOG,
PROOKSIDACIJSKOG I
GENOTOKSIČNOG UČINKA
MJEŠAVINE ODABRANIH
PESTICIDA NA HUMANIM
KONTINUIRANIM STANIČNIM
LINIJAMA KARCINOMA ŽELUCA
I JETRE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Ksenije Durgo.

ZAHVALA

Od srca sam zahvalna svojoj mentorici prof. dr. sc. Kseniji Durgo koja mi je dala priliku da svoj diplomski rad izradim u njezinom društvu. Zahvalna sam joj što je naš zajednički rad učinila zanimljivim i što mi je prenijela neka svoja iskustva koja nikad neću zaboraviti. Isto tako, zahvalna sam što je bila susretljiva i dostupna za sva moja pitanja te mi pomogla da uspješno napišem ovaj rad.

Zahvalna sam i svojim roditeljima koji su mi omogućili da se obrazujem i poticali me da ustrajem do kraja. Veliko im hvala što su se svakom mom položenom ispitu veselili kao da je prvi.

Posebno se zahvaljujem svojim prijateljicama koje su me tijekom studija ohrabrivale i uskakale kad god mi je trebala pomoć. Zahvalna sam na teškim trenucima koje smo zajedno prošle, kao i na onim lijepim koji bi poslije toga dolazili.

Na kraju, zahvalna sam što sam uz Božju pomoć završila ovaj studij s vjerom da će biti uz mene u svim životnim bitkama koje slijede.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Nutricionizam

ODREĐIVANJE CITOTOKSIČNOG, PROLIFERACIJSKOG, PROOKSIDACIJSKOG I GENOTOKSIČNOG UČINKA MJEŠAVINE ODABRANIH PESTICIDA NA HUMANIM KONTINUIRANIM STANIČNIM LINIJAMA KARCINOMA ŽELUCA I JETRE

Katarina Ivona Odak, univ. bacc. nutr.
0058214886

Sažetak: Pesticidi su kemijske tvari u širokoj suvremenoj upotrebi zbog čije se sve učestalije primjene povećava izloženost opće populacije. Iz tog razloga, provodi se sve veći broj studija, *in vitro* i *in vivo* koje ispituju njihove potencijalne toksične učinke. U ovom su istraživanju korištene dvije humane stanične linije karcinoma želuca i jetre – AGS i Hep G2. Tretirane su mješavinom koja se sastojala od osam pesticida, među kojima su 4 herbicida (glifosat, S-metolaklor, nikosulfuron i terbutilazin), 3 insekticida (acetamiprid, deltametrin i spinosad) i 1 fungicid (kaptan). Smjesa pesticida uzrokovala je citotoksični i prooksidacijski učinak kod obje stanične linije u ovisnosti o koncentraciji, a snažnije djelovanje uočeno je u Hep G2 stanicama koje su metabolički aktivne. Povećanjem koncentracije mješavine pesticida došlo je do smanjenja stanične diobe kod obje stanične linije. Pri nižim su koncentracijama AGS stanice pokazivale bolju proliferacijsku sposobnost, dok porastom koncentracije dolazi do selekcije rezistentnih klonova Hep G2 stanica. Mješavina pesticida uzrokovala je povećanje postotka DNA repa kometa u staničnoj liniji Hep G2, dok se za AGS staničnu liniju nije pokazala genotoksičnost. Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se objasnio učinak pesticida na ovim staničnim linijama te rastumačio njihov mehanizam obrane i prilagodbe ovakvim ksenobioticima.

Ključne riječi: *mješavina pesticida, AGS stanična linija, Hep G2 stanična linija, citotoksičnost, prooksidacijsko djelovanje, genotoksičnost*

Rad sadrži: 51 stranicu, 16 slika, 1 tablicu, 57 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *prof. dr. sc. Ksenija Durgo*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Izv. prof. dr. sc. *Kristina Radošević*
2. Prof. dr. sc. *Ksenija Durgo*
3. Prof. dr. sc. *Ivana Kmetič*
4. Izv. prof. dr. sc. *Marina Cvjetko Bubalo*

Datum obrane: 27. rujna 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biology and Microbial Genetics

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Nutrition

DETERMINING CYTOTOXIC, PROLIFERATIVE, PROOXIDATIVE AND GENOTOXIC EFFECT OF PESTICIDE MIXTURE ON HUMAN CONTINUOUS GASTRIC AND LIVER CARCINOMA CELL LINES

Katarina Ivona Odak, univ. bacc. nutr.
0058214886

Abstract: Pesticides are chemical substances widely used in modern times, and their increasing use exposes the general population to potential risks. For this reason, an increasing number of studies, both in vitro and in vivo, are being conducted to examine their potential toxic effects. In this research, two human cell lines of gastric and liver cancer – AGS and Hep G2 – were used. They were treated with a mixture consisting of eight pesticides, including 4 herbicides (glyphosate, S-metolachlor, nicosulfuron and terbuthylazine), 3 insecticides (acetamiprid, deltamethrin, and spinosad), and 1 fungicide (captan). The pesticide mixture caused cytotoxic and prooxidative effects on both cell lines, depending on the concentration, with stronger effects observed in Hep G2 cells, which are metabolically active. Increasing the concentration of the pesticide mixture led to a decrease in cell division in both cell lines. At lower concentrations, AGS cells showed better proliferation ability, while higher concentrations led to the selection of resistant clones in Hep G2 cells. The pesticide mixture caused an increase in the percentage of DNA comet tails in the Hep G2 cell line, while it did not show genotoxic effects on the AGS cell line. Additional research is needed to explain the effects of pesticides on these cell lines and to understand their defense mechanisms and adaptation to such xenobiotics.

Keywords: *pesticide mixture, AGS cell line, Hep G2 cell line, cytotoxicity, prooxidative effect, genotoxicity*

Thesis contains: 51 pages, 16 figures, 1 tables, 57 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in: The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: *PhD. Ksenija Durgo, Full Professor*

Reviewers:

1. PhD. *Kristina Radošević*, Associate professor
2. PhD. *Ksenija Durgo*, Full professor
3. PhD. *Ivana Kmetič*, Full professor
4. PhD. *Marina Cvjetko Bubalo*, Associate professor

Thesis defended: September 27th, 2023

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. SREDSTVA ZA ZAŠTITU BILJA	2
2.2. POVIJESNI RAZVOJ SREDSTAVA ZA ZAŠTITU BILJA	4
2.3. ADITIVNI I SINERGISTIČKI UČINCI KOMBINACIJE PESTICIDA	6
2.4. ODABRANI PESTICIDI ZA EKSPERIMENTALNO ISTRAŽIVANJE	7
2.4.1. Glifosat	7
2.4.2. S-metolaklor	8
2.4.3. Nikosulfuron.....	9
2.4.4. Acetamiprid	10
2.4.5. Terbutilazin.....	11
2.4.6. Deltametrin.....	12
2.4.7. Kaptan	14
2.4.8. Spinosad	15
2.5. DOSADAŠNJA ISTRAŽIVANJA TOKSIČNIH UČINAKA ODABRANIH PESTICIDA ..	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO	21
3.1. MATERIJALI.....	21
3.1.1. Biološki test sustavi.....	21
3.1.2. Istraživani spojevi.....	22
3.1.3. Kemikalije	23
3.1.4. Otopine	24
3.1.5. Laboratorijska oprema.....	27
3.2. METODE	29
3.2.1. Određivanje citotoksičnog učinka Neutral Red metodom.....	29
3.2.2. Određivanje proliferacijskog učinka klonogenim testom.....	30
3.2.3. Određivanje prooksidacijskog učinka DCFH-DA metodom.....	31
3.2.4. Određivanje genotoksičnog učinka komet testom.....	32
3.2.5. Statistička obrada podataka	33
4. REZULTATI I RASPRAVA	34
4.1. ANALIZA CITOTOKSIČNOG UČINKA MJEŠAVINE PESTICIDA NEUTRAL RED METODOM	34
4.2. ANALIZA PROLIFERACIJSKOG UČINKA MJEŠAVINE PESTICIDA KLONOGENIM TESTOM	36

4.3. ANALIZA PROOKSIDACIJSKOG UČINKA MJEŠAVINE PESTICIDA DCFH-DA METODOM	38
4.4. ANALIZA GENOTOKSIČNOG UČINKA MJEŠAVINE PESTICIDA KOMET TESTOM	40
5. ZAKLJUČCI.....	45
6. LITERATURA.....	46

1. UVOD

Pesticidi, odnosno sredstva za zaštitu bilja, su kemijske tvari koje se u poljoprivredi koriste za suzbijanje organizama štetnih za razvoj željenih biljnih kultura. Bez njihove upotrebe suvremena proizvodnja hrane bila bi nezamisliva. Svake se godine na globalnoj razini iskoristi oko 2 milijuna tona pesticida, a Kina, SAD i Argentina su države koje prednjače u njihovoj potrošnji (Sule i sur., 2022). S obzirom na to da postoje različite formulacije istih agrokemikalija, a ujedno se istovremeno koriste različite, kako formulacije tako i aktivne tvari, često se u okolišu i u hrani mogu pronaći ostatci mješavina različitih sredstava za zaštitu bilja. Zbog njihove sve učestalije upotrebe sve više se povećava izloženost ljudi štetnom djelovanju smjesa tih spojeva što može predstavljati ozbiljan zdravstveni rizik. Osim toga, povećana primjena različitih pesticida u poljoprivredi i prehrambenoj industriji dovodi i do veće mogućnosti nastanka njihovih međusobnih interakcija koje mogu rezultirati aditivnim ili sinergističkim toksičnim učinkom. Rezultati pojedinih studija pokazali su da kombinacije određenih pesticida i njihovih skupina mogu dovesti do takvih vrsta interakcija koje znatno i nepredvidivo pojačavaju njihov toksični učinak. Takvi učinci mogu dovesti do sve veće pojave rezistentnosti štetnih organizama na pesticide, ali i do narušavanja prirodnog ekosustava. U današnje vrijeme, broj provedenih studija na pesticidima raste, a rezultati dobiveni u posljednjih nekoliko desetljeća potaknuli su preispitivanja o sigurnosti primjene pesticida te doveli do brojnih zabrana i ograničenja.

Cilj ovog diplomskog rada bio je istražiti nekoliko vrsta toksičnih učinaka na ljudskim stanicama koje može uzrokovati mješavina pojedinih herbicida, insekticida i fungicida. Korištena mješavina sastojala se od 4 herbicida (glifosat, S-metolaklor, nikosulfuron, terbutilazin), 3 insekticida (acetamiprid, deltametrin, spinosad) i 1 fungicida (kaptan). Istraživanje je provedeno na kontinuiranim humanim staničnim linijama adenokarcinoma epitela želuca (AGS) i hepatocelularnog karcinoma jetre (Hep G2). Stanice su tretirane spomenutom mješavinom pesticida nakon čega su se određivali citotoksični, proliferacijski, prooksidacijski i genotoksični učinci u koncentracijama relevantnim za okolišnu izloženost. Stoga, svrha ovog istraživanja je dokazati potencijalnu interaktivnu toksičnost kod istovremene izloženosti različitim vrstama pesticida te naglasiti važnost razumijevanja tih učinaka kako bi se uspostavile smjernice za sigurniju primjenu pesticida i efikasniju zaštitu zdravlja ljudi i okoliša.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. SREDSTVA ZA ZAŠTITU BILJA

U današnje vrijeme gotovo je nemoguće zamisliti uzgoj voća, povrća, ljekovitog bilja i brojnih drugih biljnih vrsta bez primjene zaštitnih tvari. Pesticidi (lat. *pestis* = kuga, pošast; *concido* = uništenje) su tvari koje se u poljoprivredi koriste za suzbijanje štetnika poput kukaca, korova, mikroorganizama, grinja, puževa, ptica, glodavaca itd. Prema vrstama organizama za čije su uništenje namijenjeni, dijele se na insekticide (za suzbijanje kukaca), akaricide (za suzbijanje grinja), fungicide (za suzbijanje gljivičnih bolesti), herbicide (za uništavanje korova), rodenticide (za suzbijanje glodavaca), nematocide (za suzbijanje oblića), limacide (za suzbijanje puževa) i korvicide (za odbijanje ptica) (Hrvatska enciklopedija, 2021).

Pojam „pesticidi“ je širi pojam koji obuhvaća veliki broj tvari koje se, osim u poljoprivredi, koriste u javnom zdravstvu, komunalnoj higijeni, veterinarstvu za suzbijanje nametnika na životinjama itd. Točniji naziv za tvari korištene u poljoprivredi je „sredstva za zaštitu bilja“ i odnosi se na pripravke koji sadrže aktivne tvari i dodatne nepesticidne tvari kao što su zaštitne tvari, antikoagulansi, nosači, stabilizatori... Upotrebljavaju se za zaštitu bilja i biljnih proizvoda od štetnih organizama i njihovih djelovanja, djeluju na životne procese u biljci (npr. rast biljke), koriste se za konzerviranje biljnih proizvoda, za uništavanje neželjenog bilja ili dijelova bilja te za sprječavanje ili suzbijanje neželjenog rasta bilja. U kategoriju pesticida, osim sredstava za zaštitu bilja, ubrajaju se i biocidni proizvodi. To su proizvodi koji se sastoje ili sadrže aktivnu tvar čija je svrha uništiti, spriječiti djelovanje ili kontrolirati neki štetni organizam nefizičkim ili nemehaničkim putem (Bokulić i sur., 2015).

Kada se govori o sredstvima za zaštitu bilja, svako sredstvo, koje se u Hrvatskoj stavlja na tržište, mora biti registrirano ili imati dozvolu Ministarstva poljoprivrede. Mora se nalaziti u originalnom pakiranju i biti označeno etiketom s propisanim podacima na hrvatskom jeziku. Sva sredstva za zaštitu bilja nose određeno trgovačko ime koje je zakonom zaštićeno, a uz ime sadrže kraticu i broj koji se odnose na vrstu formulacije i količinu aktivne tvari prisutne u proizvodu. Primjerice, naziv „Fungicid SC 500“ znači da se radi o formulaciji koncentrirane suspenzije koja sadrži 500 g aktivne tvari na 1 L sredstva za zaštitu bilja (Bokulić i sur., 2015).

Kao što je već rečeno, sredstva za zaštitu bilja sastoje se od aktivne tvari i dodatnih tvari u određenim koncentracijama koje su zajedno pomiješane. Aktivna tvar je osnovni sastojak u

ovim proizvodima, a može imati opće i specifično djelovanje na štetne organizme, biljke, dijelove biljaka ili biljne proizvode. Najčešće aktivnu tvar čine kemijski spojevi, mikroorganizmi, virusi ili biljni ekstrakti, a svaka od njih ima svoj kemijski naziv koji je definiran prema međunarodno dogovorenoj IUPAC nomenklaturi. S obzirom na to da se radi o složenim i neprimjenjivim nazivima za širu uporabu, za svaku tvar je definiran i trivijalni naziv koji je pojednostavljen i odobren od strane Međunarodne organizacije za normizaciju (ISO). Tako je, primjerice, glifosat trivijalni naziv za kemijski spoj N-(fosfometil)glicin. Kada se navodi količina aktivne tvari u sredstvu za zaštitu bilja, važno je razlikovati tekuće i krute formulacije. U tekućim formulacijama aktivna tvar je izražena u gramima po litri sredstva, dok se za krute formulacije izražava u gramima po kilogramu sredstva. Uz aktivnu tvar važan sastojak sredstava za zaštitu bilja su i dodane tvari čija je uloga spriječiti ili smanjiti fitotoksične učinke na određeno bilje (zaštitne tvari) ili poboljšati djelovanje aktivne tvari (sinergističke tvari). Dodane tvari, odnosno ko-formulanti se ne moraju navoditi na etiketi, osim u slučaju kada imaju neka toksikološka svojstva i tada se njihova koncentracija izražava kao raspon propisanih vrijednosti (Bokulić i sur., 2015).

Kod primjene sredstava za zaštitu bilja važno je da je njihova upotreba jednostavna i neškodljiva, ali da se pritom postigne adekvatna učinkovitost aktivne tvari koja će se tijekom primjene moći ravnomjerno raspršiti, kao i stabilnost tijekom skladištenja. Kako bi se to postiglo, a da se istovremeno proizvod prilagodi određenoj biljnoj vrsti, danas se u svijetu primjenjuje više od 90 vrsta formulacija sredstava za zaštitu bilja, dok se na hrvatskom tržištu nalazi više od 30 vrsta formulacija ovih proizvoda. Formulacije sredstava za zaštitu bilja dijele se prema agregatnom stanju i načinu primjene. Prema agregatnom stanju najčešće tekuće formulacije su koncentracije za emulziju (EC), koncentrirane suspenzije (SC), koncentracije za otopinu (SL), a krute formulacije dolaze u obliku močivih prašiva (WP) te močivih granula (WG). S druge strane, prema načinu primjene tekuće formulacije se primjenjuju raspršivanjem, zalijevanjem i prskanjem, dok se krute primjenjuju zaprašivanjem i rasipanjem granula (Bokulić i sur., 2015). Većinu sredstava za zaštitu bilja prije same primjene potrebno je razrijediti vodom pa se, ovisno o korištenom koncentratu, dobivaju različiti oblici tekućina (emulzije, otopine ili suspenzije) koje se nazivaju škropiva. No, postoje i rjeđi oblici sredstava za zaštitu bilja koje nije potrebno razrjeđivati. Tako se, primjerice, neka prašiva i granule direktno rasipaju po površini tla ili deponiraju uz biljke (Bokulić i sur., 2015).

Uz sve navedeno, sredstva za zaštitu bilja mogu se dijeliti prema načinu djelovanja i prema mehanizmu djelovanja aktivne tvari. Način djelovanja označava put ulaska aktivne tvari u štetni

organizam. Tako se, primjerice, neki herbicid može apsorbirati samo putem lista ili samo putem korijena ili može ući i kroz list i kroz korijen. Usto, način djelovanja se odnosi i na pokretljivost primijenjenog sredstva za zaštitu bilja (kontaktno ili sistemsko). Kontaktna sredstva nakon primjene ostaju u obliku zaštitne prevlake na površini tretiranih biljnih dijelova, dok sistemsko sredstvo nakon primjene biljka apsorbira i ona ulaze u provodni sustav te biljke. Nakon što uđe u štetni organizam, očituje se mehanizam djelovanja aktivne tvari koja može ometati jedan ili više biokemijskih procesa u organizmu tog štetnika, kao što su inhibicija sinteze lipida ili inhibicija sinteze sterola (Bokulić i sur., 2015).

2.2. POVIJESNI RAZVOJ SREDSTAVA ZA ZAŠTITU BILJA

Od samih početaka poljoprivredne proizvodnje ljudi su se susretali sa štetnim organizmima koji su bili razlogom raznih bolesti i poljoprivrednih gubitaka. Usjevi, koje su uzgajali, propadali bi zbog štetnika i bolesti što je nerijetko dovodilo do gladi i siromaštva. Podatak iz 2010. navodi kako se i uz dotadašnji napredak u poljoprivrednim znanostima gubici zbog štetnika i bolesti kreću između 10 i 90 %, s prosjekom od 35 do 40 %, za sve potencijalne usjeve hrane i vlaknaste usjeve. Tako veliki gubici bili su veliki poticaj za pronalaženje načina za prevladavanje problema uzrokovanih štetnicima i bolestima (IUPAC, 2010).

Prije 10 000 godina ljudi su počeli napuštati nomadski način života, odnosno osiguravati hranu kroz lov divljih životinja i sakupljanje plodova. Prelaskom na sjedilački način života započinje i uzgoj biljaka koje postaju izvor hrane. Razvoj pesticida odvijao se dosta sporo, a za zaštitu od nametnika su se uglavnom primjenjivale prirodne, nekemijske metode. Prva zabilježena uporaba insekticida bila je prije 4500 godina u vrijeme Sumerana koji su koristili spojeve sumpora iz prirodnih izvora kako bi se zaštitili od kukaca i grinja. Sumporni spojevi su se koristili najviše za suzbijanje skladišnih štetnika kako bi se očuvale zalihe hrane. Nadalje, Kinezi su 800. godine poslije Krista koristili arsen pomiješan s vodom za suzbijanje štetnika u polju, a započela je i primjena olovnog arsenata i kriolita kao staničnih otrova te boraksa kao dehidratora u insekticidima (Bažok i sur., 2020).

S obzirom na to da nije bilo kemijske industrije, svi su preparati bili biljnog, životinjskog ili mineralnog podrijetla. Tako je, prema spisima iz antičke Grčke i Rima, zabilježeno korištenje dimova, koji su se dobivali spaljivanjem slame, živice, rakova, ribe, balege, govedeg roga itd. u svrhu sprječavanja razvoja plijesni i nastanka plamenjače u voćnjacima. Nadalje, katran se koristio na deblima drveća za hvatanje gmižućih insekata. Korovi su se uglavnom suzbijali ručnim plijevljenjem, ali u te su svrhe postojale i neke „kemijske” metode, poput upotrebe soli

ili morske vode. Mnoge anorganske kemikalije korištene su od davnina kao pesticidi. Tako se, primjerice, Bordeaux smjesa, na bazi bakrenog sulfata i vapna, još uvijek koristi protiv raznih gljivičnih bolesti (IUPAC, 2010). Također, neki pesticidi iz prirodnih izvora poput piretruma iz osušenih cvjetova dalmatinskog buhača ili nikotinskog ekstrakta iz duhanskih biljaka značajno su se upotrebljavali u poljoprivredi. Nadalje, 1660. godine je zabilježeno da je ispiranje sjemenki žitarica u morskoj vodi značajno smanjilo infekcije smrdljive snijeti čiji je uzročnik gljivice *Tilletia* spp. Od 1880. je u širu primjenu ušlo je ispiranje snijetljivog sjemena toplom vodom.

Tek je sredinom 19. stoljeća započela značajnija upotreba kemikalija u zaštiti bilja. Tako se od 1871. primjenom bakrenog acetoarsenita, koji je poznat pod nazivom „Pariško zelenilo“, uspješno rješavao problem krumpirove zlatice (Bažok i sur., 2020). Do 1940-ih godina značajno su se upotrebljavale anorganske tvari poput natrijevog klorata i sumporne kiseline za suzbijanje štetnih organizama, a svoju upotrebu su pronašle i organske tvari dobivene iz ugljena ili industrijskim putem kao što su naftalen, klorofenol i petrolejsko ulje za suzbijanje gljivica. Problemi, koji su se javljali primjenom ovakvih tvari, su nedostatak selektivnosti, otrovnost i fitotoksičnost. Zelena galica se od 1901. uspješno koristila za suzbijanje korova; natrijev arsenoklorid se upotrebljavao kao herbicid, ali je njegovo korištenje bilo zabranjeno zbog ekotoksikoloških razloga. Dolazi do sve veće primjene mineralnih gnojiva poput kalcijevog cijanida, kainita i čilske salitre čija je uloga bila i suzbijanje korova u žitaricama poput pšenice i ječma te u luku (Bažok i sur., 2020).

Krajem 19. stoljeća počinje revolucija kemijskih metoda zaštite bilja. Tako je 1874. godine sintetiziran kemijski spoj diklor-difenil-trikloretan, poznat pod kraticom DDT. Upotrebljavao se kao insekticid koji djeluje na široki spektar štetnika. Zbog visoke učinkovitosti DDT-a došlo je do proizvodnje drugih sintetičkih pesticida poput benzenheksaklorida (BHC), aldrina, dieldrina, endrina, klordana, parationa i kaptana, a uz njih, 50-ih godina prošlog stoljeća otkriven je herbicid 2,4-D, što se smatra početkom modernog kemijskog suzbijanja korova. Iako se DDT na početku činio sigurnim za upotrebu, te je kao velika prednost primjene ovog sredstva bilo značajno smanjenje niza bolesti koje se prenose kukcima poput malarije, žute groznice i tifusa, 1946. zabilježena je otpornost kućne muhe na DDT. Osim toga, uočena je njegova štetnost i toksičnost za gmazove, ptice i sisavce kao i da se dugo zadržava u okolišu. No, otkriće DDT-a i razvoj tehnologije u 20. stoljeću doveli su do značajnog povećanja poljoprivredne proizvodnje na svjetskoj razini, suzbijanja gladi, razvoja visokorodnih sorti žitarica, opću modernizaciju kao i razvoj sredstava za zaštitu bilja (Bažok i sur., 2020).

U današnje vrijeme suzbijanje korova predstavlja glavni trošak pri proizvodnji hrane (Kipčić, 2010), a nekontrolirana prekomjerna upotreba pesticida rezultirala je velikim promjenama u okolišu koje su dovele do narušavanja ekosustava. Dolazi do razvoja štetnih organizama rezistentnih na pesticide, uništavanja prirodnih neprijatelja i konkurentskih vrsta. Povećala se štetnost dotad zanemarivo štetnih organizama što dovodi do poremećaja prirodne ravnoteže. Došlo je i do porasta koncentracije ostataka pesticida u okolišu što je imalo negativne toksikološke posljedice na ljude i brojne neciljne organizme. Kako bi se postigla adekvatna kemijska zaštita okoliša potrebno je smanjiti dozu primjene određenog pesticida s kg/ha korištenih u prošlosti na g/ha. Potrebno je provesti više ekoloških studija u procesu registracije novog pesticida kako bi se pouzdano ispitala njegova toksičnost, kao i minimizirati uporabu jako toksičnih pesticida (Bažok i sur., 2020).

2.3. ADITIVNI I SINERGISTIČKI UČINCI KOMBINACIJE PESTICIDA

S obzirom na to da se pesticidi iz različitih skupina nerijetko kombiniraju u svrhu učinkovitije zaštite bilja od nametnika, u nekim slučajevima može doći do raznih i teško predvidivih interakcija među njima, što posljedično može izazvati neželjene toksične učinke. Za potrebe ovoga rada spomenut će se dvije učestale vrste interakcija do kojih može doći prilikom istovremene primjene određenih vrsta pesticida, a to su aditivni i sinergistički učinci.

Aditivni učinci kombinacije pesticida definiraju se kao zbroj individualnih toksičnih potencijala svakog pojedinog pesticida. Ovakav učinak imaju pesticidi sličnih kemijskih struktura koji izazivaju isti toksični učinak na iste ciljane organe ili tkiva, ali i na kemijske spojeve u biokemijskim mehanizmima. Na takav način, primjerice, djeluju pesticidi iz skupina organofosfata, (di)tiokarbamata i kloroacetanilida. Aditivni učinak može se uočiti kada mješavina od najmanje dva pesticida, od kojih nijedan pri određenoj koncentraciji samostalno ne djeluje toksično, u kombinaciji dovodi do indukcije toksičnih učinaka. Tada zbroj njihovih koncentracija prelazi minimalnu koncentraciju pri kojoj taj toksični učinak postaje vidljiv (Hernández i sur., 2013).

Sinergistički učinak nastaje kada ukupna toksičnost znatno premaši zbroj pojedinačnih toksičnih učinaka pesticida u mješavini, odnosno aditivni učinak. Osim toga, do sinergističkog djelovanja dolazi kada dva ili više pesticida djeluju nepredvidljivo na različite organe ili tkiva te uzrokuju neočekivane toksične učinke. Nadalje, pesticidi sa sličnim kemijskim strukturama, kada se nađu u kombinaciji, ne uzrokuju uvijek isključivo aditivne učinke, odnosno na različitim organima mogu inducirati različite toksične učinke zbog drugačijeg mehanizma

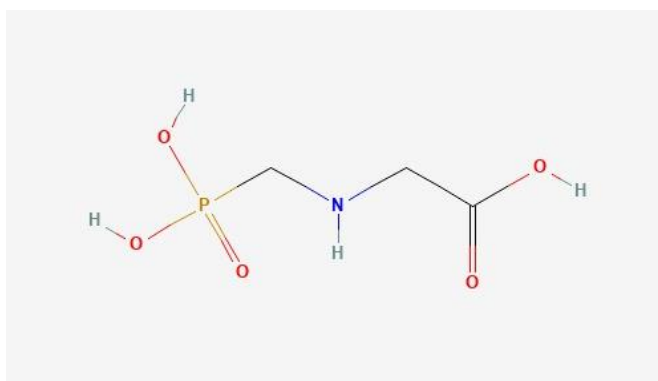
djelovanja. Primjerice, unatoč sličnostima u kemijskoj strukturi, piretroidni insekticidi mogu djelovati na više različitih područja, a njihove mješavine mogu uzrokovati različite sinergističke toksične učinke. Također, mješavine različitih klasa pesticida često uzrokuju sinergističke učinke koje je jako teško predvidjeti. Isto tako, permetrin iz skupine piretroida i propoksur iz skupine karbamata koji zasebno djeluju na različite komponente transmisije živčanog signala, kvantitativno su uzrokovali veće toksične učinke na obje komponente nego što bi se očekivalo za aditivno djelovanje. Još jedan od primjera je mješavina diazinona (organofosforni insekticid) i benomila (benzimidazolni fungicid) koji zasebno ne uzrokuju genotoksičnost, dok u kombinaciji djeluju genotoksično (Hernández i sur., 2013). Stoga, važno je istražiti potencijalne interakcije između pesticida kako bi se procijenila njihova sigurnost i minimizirala izloženost ljudi tim spojevima i njihovim toksičnim učincima. U svrhu boljeg razumijevanja interakcija među pesticidima, u ovom radu korištena je mješavina pesticida iz različitih skupina.

2.4. ODABRANI PESTICIDI ZA EKSPERIMENTALNO ISTRAŽIVANJE

U ovom poglavlju ukratko će biti opisani pesticidi koji su korišteni u eksperimentalnom dijelu rada. Riječ je o mješavini sastavljenoj od osam pesticida od kojih su njih četiri herbicidi (glifosat, S-metolaklor, nikosulfuron i terbutilazin), tri su insekticida (acetamiprid, deltametrin i spinosad), a jedan je fungicid (kaptan).

2.4.1. Glifosat

Glifosat (N-fosfometil glicin) je neselektivni sistemski herbicid kemijske formule $C_3H_8NO_5P$ koji je namijenjen za suzbijanje velikog broja jednogodišnjih travnih i širokolisnih korova te višegodišnjih korova s dubokim korijenom, rizomima i gomoljima. Jedini je predstavnik herbicida iz grupe glicina (aminofosfonata) (Lipovski, 2022) te ima najširi spektar djelovanja među svim herbicidima (Slika 1).



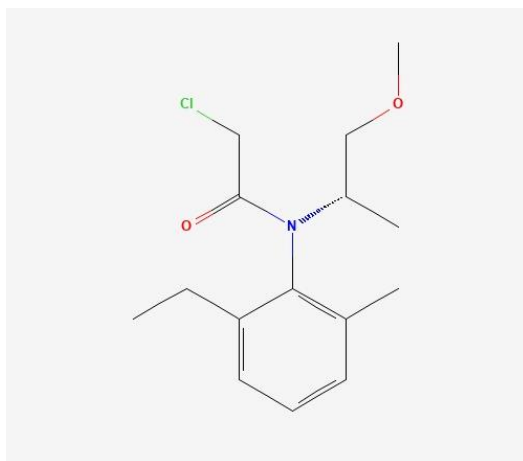
Slika 1. Kemijska struktura glifosata (NCBI, 2023a)

Primjenjuje se u formi izopropilamino soli na listove korova. Djeluje tako da prodire kroz list i zeljaste dijelove biljke u provodne snopove, odakle se asimilatima translociraju u sve ostale nadzemne i podzemne biljne organe. Prvi znakovi oštećenja uočavaju se već nekoliko dana nakon tretmana, a brzina propadanja ovisna je o osjetljivosti vrste, primijenjenoj dozi, starosti biljke i vremenskim prilikama (Ostojić i sur., 2018). Na staničnoj razini glifosat inhibira enzim EPSP sintetazu i tako priječi tvorbu aromatskih aminokiselina (triptofana, tirozina i fenilalanina) koje su neophodne za sintezu proteina koji određuju rast biljke (Lipovski, 2022). EPSP sintetaza producira 5-enolpiruvilšikimat-3-fosfat (EPSP) iz šikimat-3 fosfata i fosfoenolpiruvata u metaboličkom putu šikiminske kiseline. Inhibicijom ove reakcije posljedično se onemogućuje i rast biljke, odnosno korova. U biljkama se razgrađuje do aminometilfosfonske kiseline koja, kada dospije u tlo, počinje se nakupljati i adsorbirati u tlo. Nastali spoj ima visok stupanj mineralizacije.

Kada se glifosat veže za tlo, ne desorbira i ne dospijeva u tekuću fazu tla pa ga biljke putem korijena ne mogu apsorbirati što znači da ne dolazi do rezidualnog djelovanja. Ta svojstva omogućuju sijanje i sadnju, neposredno nakon tretmana može se sijati ili saditi bez ikakvih štetnih posljedica. Umjerene je perzistentnosti s prosječnim vremenom poluraspada (DT50) od 6 dana do 41 dan. Tijekom jedne se sezone od dana primjene 10-70 % glifosata razgradi do konačnog raspadnog produkta odnosno do CO₂ (Lipovski, 2022). ADI vrijednost za glifosat iznosi 0,5 mg/kg t.m./dan, a izvedena je iz NOAEL vrijednosti od 50 mg/kg t.m./dan koja je definirana na temelju tri studije (na štakorima, psima i zečevima) (EFSA, 2023). Toksikološkim istraživanjima, uočeno je da pri višim koncentracijama dolazi do povećane smrtnosti ženki štakora kao i incidencije abnormalnosti kostiju fetusa. Pri koncentraciji od 350 mg/kg/dan, trudne zečice pokazale su simptome proljeva, iscjetka iz nosa uz povećanu incidenciju smrtnosti (Henderson i sur., 2010).

2.4.2. S-metolaklor

S-metolaklor je herbicid iz skupine kloracetamida molekulske formule C₁₅H₂₂ClNO₂ čija aktivna tvar djeluje na zaustavljanje rasta klijanaca uskolisnih korova, ali i manjeg broja klijanaca jednogodišnjih širokolisnih korova (Lipovski, 2022). Prema IUPAC nomenklaturi naziv kemijskog spoja je 2-kloro-N-(2-etil-6-metilfenil)-N-[(2S)-1-metoksipropan-2-il]acetamid (NCBI, 2023b). Na staničnoj razini inhibira funkcije mikrotubulina što onemogućava odvajanje kromatida kromosoma tijekom mitoze. Posljedično, nije moguća dioba stanica, a tako ni rast biljke (Slika 2).



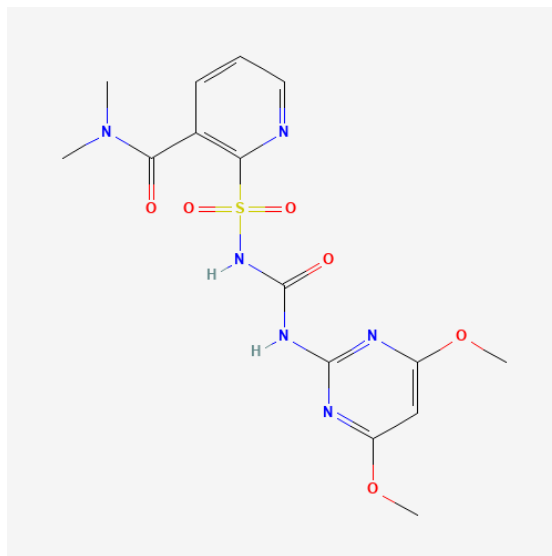
Slika 2. Kemijska struktura S-metolaklora (NCBI, 2023b)

Najčešće se upotrebljava poslije sjetve, ali prije nicanja uzgajane biljke u kombinaciji s drugim aktivnim tvarima. To traje obično oko mjesec dana jer mu je poluvrijeme razgradnje 15-25 dana. Tako se, primjerice, za bolji učinak na širokolisne korove S-metolaklor koristi u kombinaciji s mezotrionom i terbutilazinom (Barić, 2015). Na tlima, koja su siromašnija humusom, upotrebljavaju se manje doze. Nije sklon ispiranju u dublje slojeve tla, kao ni pretjeranom hlapljenju, a razgradnja se odvija na dva načina: uz pomoć svjetlosti ako se upotrebljava na površini tla i djelovanjem mikroorganizama ako se inkorporira u tlo. Iako mehanizam djelovanja S-metolaklora nije u potpunosti jasan, poznato je da utječe na inhibiciju biosinteze masnih kiselina, lipida, proteina, giberelina i antocijana (Lipovski, 2022). Kod osjetljivijih biljaka tretiranih S-metolaklorom razvit će se abnormalna stabljika koja ne može iskljati. ADI vrijednost, koja iznosi 0,1 mg/kg t.m./dan, izvedena je iz NOAEL vrijednosti od 15 mg/kg t.m./dan na temelju dvogodišnje studije na miševima i jednogodišnje studije na psima. Kod miševa je, pri koncentraciji od 450 mg/kg t.m./dan uočena povećana incidencija smrtnosti te povišena koncentracija alkalne fosfataze, AST i ALT enzima u krvi što su pokazatelji oštećenja stanica jetre. U studiji na psima, također je zabilježen značajan porast razine alkalne fosfataze u krvi kod ženki pri koncentraciji od 9.7 mg/kg t.m./dan (OEHHA, 2017).

2.4.3. Nikosulfuron

Nikosulfuron (sulfonilurea) je herbicid koji se koristi za suzbijanje jednogodišnjih i višegodišnjih uskolisnih (sirak iz rizoma, pirika, itd.), kao i nekih širokolisnih korova u usjevu kukuruza (Lipovski, 2022). Njegova molekulska formula glasi $C_{15}H_{18}N_6O_6S$, a IUPAC-ov naziv 2-[(4,6-dimetoksipirimidin-2-il)karbamoi]sulfamoil]-N,N-dimetilpiridin-3-karboksamid (NCBI, 2023c). Strukturna formula prikazana je na Slici 3. Apsorpcija u biljkama odvija se

preko lista. Kod osjetljivih biljaka izaziva inhibiciju enzima acetolaktat sintetaze (ALS), što posljedično dovodi do nemogućnosti biosinteze esencijalnih aminokiselina (valina, leucina i izoleucina). Krajnji rezultat je brzi prestanak rasta i ugibanje tretiranih biljaka (Lipovski, 2022).



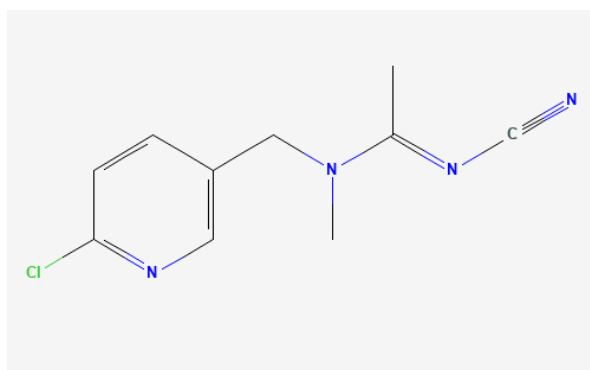
Slika 3. Kemijska struktura nikosulfurona (NCBI, 2023c)

Važno je navesti da nikosulfuron ima visoku biološku učinkovitost na veliki broj korova. Ima kratko vrijeme poluraspada, a bržu razgradnju pogoduju tla s nižom pH vrijednosti. Karakterizira ga niska toksičnost za ljude i životinje jer ne posjeduju acetolaktat sintetazu (Lipovski, 2022). Herbicidi iz skupine sulfonilurea skloni su ispiranju u tla, ali kako bi bili ekološki prihvatljiviji, upotrebljavaju se u malim količinama. Najčešće se upotrebljava u kombinaciji s bentazonom, dikambom, bromoksinilom, atrazinom i 2,4-D (Lipovski, 2022). Za nikosulfuron ADI vrijednost iznosi 2 mg/kg t.m./dan, što je izvedeno iz dvogodišnje studije na štakorima. Ustanovljena NOAEL vrijednost za ovu studiju iznosila je 199 mg/kg t.m./dan. Kod štakora je, prilikom primjene viših koncentracija, utvrđena blaga anemija te blago povećanje incidencije intersticijalnog adenoma i tiroidnog folikularnog karcinoma (EFSA, 2007). Nikosulfuron pripada relativno novoj skupini herbicida čija upotreba dovodi do sve češće pojave rezistentnosti štetnih organizama na korištene pripravke. Stoga, vrlo je važno biti na oprezu kod njihove primjene.

2.4.4. Acetamiprid

Acetamiprid je insekticid koji se koristi protiv insekata s usnim ustrojem za sisanje, kao i gusjenica iz roda Lepidoptera. Pripada grupi neonikotinoida. Molekulska formula glasi $C_{10}H_{14}ClN_4$, dok je strukturalna N-[(6-kloropiridin-3-il)metil]-N'-cijano-N-metiletanimidamid

(NCBI, 2023d). Strukturna formula prikazana je na Slici 4. Insekticidi iz grupe neonikotinoidea djeluju na živčani sustav insekata tako što uzrokuju ireverzibilnu blokadu postsinaptičkih nikotinergičnih acetilkolinskih receptora (nAChR). To posljedično dovodi do održavanja stalno otvorenih Na-kanala i stimulacije električnih impulsa. Na taj način dolazi do ometanja prijenosa podražaja u živčanom sustavu štetnika što na kraju rezultira blokiranjem njihovih osnovnih funkcija (Lipovski, 2022). Usto, acetamiprid ima sistemsko, kontaktno i želučano djelovanje.



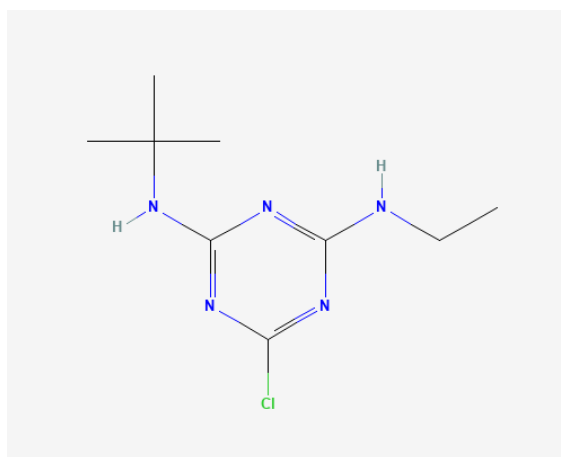
Slika 4. Kemijska struktura acetamiprida (NCBI, 2023d)

ADI vrijednost za acetamiprid iznosi 0,025 mg/kg t.m./dan (EFSA, 2013), a izveden je iz NOAEL vrijednosti za razvojnu neurotoksičnost štakora od 2,5 mg/kg t.m./dan. Zabilježeni simptomi su smanjeni broj preživjelih mladunaca, manja masa i lokomotorna sposobnost mladunaca. U 90-dnevnoj studiji na štakorima, acetamiprid je uzrokovao hepatotoksičnost i nefrotoksičnost pri koncentracijama od 15, 25 i 35 mg/kg. Značajno su izmijenjeni udjeli kolesterola, ALT, AST te uree, a bubrezi i jetra su dobili na povećanju mase (Karaca i sur., 2019). Insekticidi iz grupe neonikotinoidea svrstavaju se u III. skupinu otrova; zbog opasnosti treba biti oprezan prilikom rukovanja s njima. Nije preporučljivo miješati acetamiprid s insekticidima poput imidakloprida, tiakloprida i tiametoksama jer imaju isti mehanizam djelovanja, što može dovesti do unakrsne rezistentnosti insekata (Lipovski, 2022).

2.4.5. Terbutilazin

Terbutilazin je herbicid iz grupe triazina koji se upotrebljava za suzbijanje jednogodišnjih širokolisnih korova u kukuruzu bez podusjeva te sjemenskih korova u nasadima voćaka i vinove loze starijim od 2 godine (Lipovski, 2022). Prema IUPAC-u nosi naziv 2-N-tert-butil-6-kloro-4-N-etil-1,3,5-triazin-2,4-diamin, a kemijska formula glasi $C_9H_{16}ClN_5$ (NCBI, 2023e). Slika 5. prikazuje strukturnu formulu terbutilazina. Općenito, herbicidi iz grupe triazina imaju širok spektar djelovanja na dikotiledone korove tako što inhibiraju proces fotosinteze. Apsorpcija terbutilazina odvija se preko korijena, zatim se ksilemom transportiraju do zelenih dijelova

biljke i ulazi u kloroplaste. Dolazi do inhibicije u fotosustavu II. u tilakoidnim membranama kloroplasta. Tako se onemogućava transport elektrona s kinonskog nosača elektrona QA na nosač QB pa dolazi do zaustavljanja fiksacije CO₂, a posljedično i do inhibicije proizvodnje ATP-a i NADPH. Krajnji rezultat je onemogućen rast biljke (Lipovski, 2022). Na površini biljaka vidljive su promjene boje; dolazi do pojave intravenozne kloroze (gubitak zelene boje) i žutila na rubu listova, a kod osjetljivijih biljaka može doći i do nekroze.



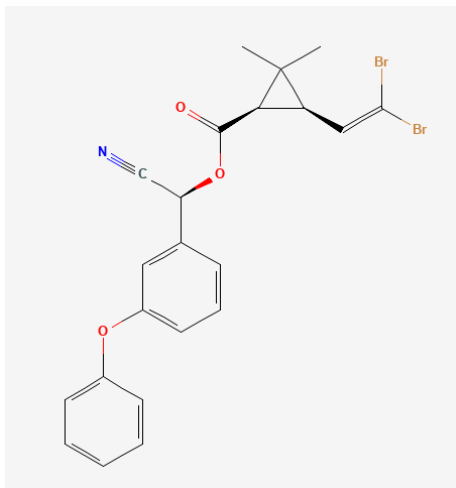
Slika 5. Kemijska struktura terbutilazina (NCBI, 2023e)

Herbicidi iz grupe triazina relativno su jeftini i duga je povijest njihove upotrebe. Skloni su adsorpciji pa u tlu dugo perzistiraju. Razgradnja prosječno korištenih doza traje 4-6 mjeseci (Lipovski, 2022). Najznačajniji predstavnik ove grupe herbicida u prošlosti bio je atrazin. Zbog masovne upotrebe i svojstva ispiranja, došlo je do nakupljanja atrazina u vodi u nedopuštenim količinama te je zbog pooštrenja propisa zabranjen. Zbog manje ispriljivosti od atrazina danas je terbutilazin jedini dozvoljeni herbicid iz grupe triazina, a u tlu je manje ispriljiv od atrazina (Barić, 2015). Za terbutilazin, ADI vrijednost iznosi 0,004 mg/kg t.m./dan, što je ustanovljeno na temelju dvije studije provedene na psima i na štakorima (EFSA, 2011) na temelju kojih je određena NOAEL vrijednost od 0,4 mg/kg t.m./dan. Uočena je povišena incidencija adenokarcinoma dojki kod ženki štakora pri koncentraciji od 7,6 mg/kg t.m./dan, kao i smanjena fertilitet ženki, dok je u drugoj studiji zabilježena povišena incidencija malih septalnih defekata na srcu kod štenaca.

2.4.6. Deltametrin

Deltametrin je insekticid iz skupine sintetskih piretroida koji nosi kemijski naziv [(S)-cijano-(3-fenoksifenil)metil] (1R,3R)-3-(2,2-dibromoetenil)-2,2-dimetilciklopropan-1-karboksilat molekulske formule C₂₂H₁₉Br₂N₃ (NCBI, 2023f). Radi se o kontaktnom i

želučanom insekticidu širokog spektra djelovanja koji je zbog svojstva visoke insekticidnosti učinkovit u vrlo niskim dozama što pridonosi smanjenju opasnosti od onečišćenja okoliša (Slika 6). Ima dugo rezidualno djelovanje, a najčešće se koristi za suzbijanje jabučnog, breskvinog i šljivinog savijača, grozdavog i štitastog moljaca, itd. Piretroidi djeluju na živčani sustav insekata na način da inhibiraju protok natrijevih iona kroz natrijeve kanale na membranama živčanih stanica. To dovodi do poremećaja protoka živčanih impulsa i na kraju do smrti insekta (Lipovski, 2022).

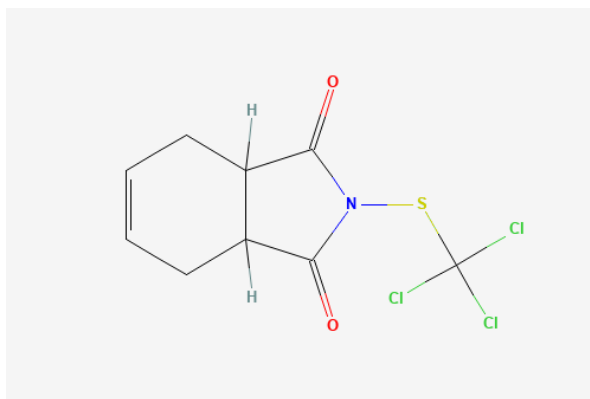


Slika 6. Kemijska struktura deltametrina (NCBI, 2023f)

Piretroidi su djelotvorni pri nižim temperaturama, a na pčele djeluju kao repelenti zbog čega su za njih manje opasni. S obzirom na to da su djelotvorni u niskim količinama, smatraju se opasnim sredstvima. Kao takvi značajno povećavaju rizik od brze pojave rezistentnosti štetnika, a zbog svog širokog spektra djelovanja izazivaju uništenje i mnogih korisnih insekata (Lipovski, 2022). ADI vrijednost za deltametrin iznosi 0,01 mg/kg t.m./dan, a izveden je iz NOAEL vrijednosti od 1 mg/kg t.m./dan, na temelju dvije studije na psima. U 90-dnevnoj studiji, pri koncentraciji od 50 mg/kg t.m./dan, zabilježeni simptomi su povraćanje, smanjenje u tjelesnoj masi, kao i drhtanje te nesiguran hod, dok je u jednogodišnjoj studiji pri koncentracijama od 10 i 50 mg/kg t.m./dan zabilježen smanjeni volumen eritrocita i ukupnog hemoglobina (EMA, 2001). Kako bi se smanjila pojava rezistentnosti, nije preporučljivo često upotrebljavati insekticide skupine piretroida, nego ih je potrebno koristiti naizmjenično s drugim grupama insekticida, a tijekom vegetacije dozvoljena je njihova primjena najviše dva puta.

2.4.7. Kaptan

Kaptan je fungicid molekulske formule $C_9H_8Cl_3NO_2S$. Spada u grupu ftalimida i nosi IUPAC-ov naziv 2-(triklorometilsulfanil)-3a,4,7,7a-tetrahidroizoindol-1,3-dion (NCBI, 2023g). Radi se o bijeloj kristalnoj tvari koja je gotovo netopiva u vodi i u većini organskih otapala. Topiv je u kloroformu, slabo hlapiv, a u suhom stanju je stabilan kad se izlaže svjetlosti i toplini. Brzo se razlaže u vodenoj smjesi na $1000\text{ }^{\circ}\text{C}$ kao i u alkalnom mediju (Slika 7). S obzirom na to da je nisko topiv u vodi, ostatke je samo djelomično moguće ukloniti s površine pranjem. Kuhanje i drugi prerađivački postupci dovode do njegove brze razgradnje (Kipčić, 2010). Suzbija najopasnije gljivične bolesti na voću, vinovoj lozi, povrću i cvijeću i djeluje na površini biljaka (Lipovski, 2022).



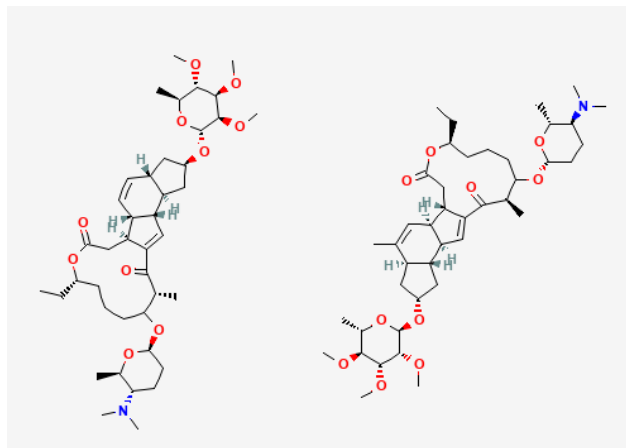
Slika 7. Kemijska struktura kaptana (NCBI, 2023g)

Općenito, za ftalimide je karakteristično da djeluju na više različitih načina, a imaju kontaktno i protektivno djelovanje, odnosno djeluju kao nesistemicima (Lipovski, 2022). S obzirom na to da djeluju površinski, za efikasniju zaštitu biljaka često se kombiniraju sa sistemskim fungicidima. Nadalje, imaju mali rizik za razvoj rezistentnosti, a i ne dolazi do pojave unakrsne rezistentnosti u kombinaciji s drugim fungicidima, kao što su fungicidi na bazi bakra i sumpora ili fungicidima iz grupa ditiokarbamata, kloronitrila, sulfamida, guanidina i kinona. Ftalimidi djeluju na veliki broj fitopatogenih gljiva, a imaju dugu povijest upotrebe. Među njima, najranije otkriveni fungicid je kaptan koji je u upotrebi još od 1949. (Bažok i sur., 2020). ADI vrijednost za kaptan izvedena je iz dvogodišnje studije na štakorima te iznosi $0,25\text{ mg/kg t.m./dan}$ dok NOAEL vrijednost iznosi 25 mg/kg t.m./dan . U 22-mjesečnoj studiji na miševima, zabilježene su pojave makroskopskih i mikroskopskih lezija na tankom crijevu i tumori na duodenumu pri koncentracijama od $60,9\text{ mg/kg t.m./dan}$. U koncentracijama iznad

450 mg/kg t.m./dan, zabilježene su manje skeletne promjene na fetusima, kao i smanjena masa fetusa (EFSA, 2020).

2.4.8. Spinosad

Spinosad je insekticid koji se sastoji od mješavine dva vrlo slična kemijska spoja spinosina A i spinosina D. IUPAC-ov naziv za spinosin A glasi (1S,2R,5S,7R,9R,10S,14R,19S)-15-[(2R,5S,6R)-5-(dimetilamino)-6-metiloksan-2-il]oksi-19-etil-14-metil-7-[(2R,3R,4R,5S,6S)-3,4,5-trimetoksi-6-metiloksan-2-il]oksi-20-oksatetraciklo[10.10.0.0²,10.0⁵,⁹]dokoza-3,11-dien-13,21-dion, dok za spinosin D glasi (1S,2S,5R,7S,9S,10S,14R,19S)-15-[(2R,5S,6R)-5-(dimetilamino)-6-metiloksan-2-il]oksi-19-etil-4,14-dimetil-7-[(2R,3R,4R,5S,6S)-3,4,5-trimetoksi-6-metiloksan-2-il]oksi-20-oksatetraciklo[10.10.0.0²,10.0⁵,⁹]dokoza-3,11-dien-13,21-dion (Slika 8). Molekulska formula spinosada je C₈₃H₁₃₂N₂O₂₀, ovaj spoj pripada grupi spinosina koji nastaje kao produkt metabolizma bakterije *Saccharopolyspora spinosa* (NCBI, 2023h).



Slika 8. Kemijska struktura spinosada: spinosin A i spinosin D (NCBI, 2023h)

Karakterizira ga sistemično, želučano i kontaktno djelovanje, a primjenjuje se za suzbijanje različitih insekata koji mogu biti prisutni u krumpiru, vinovoj lozi i jabukama. Kao i ostali spinosini, spinosad djeluje na živčani sustav insekata tako što alosterički aktivira nikotinergičke acetilkolinske receptore (nAChR). Na taj način dovodi do ometanja prijenosa podražaja u živčanom sustavu insekata što rezultira blokiranjem njihovih osnovnih funkcija (Lipovski, 2022). ADI vrijednost za spinosad iznosi 0,024 mg/kg t.m./dan te je izveden na temelju NOAEL vrijednosti od 2,4 mg/kg t.m./dan u dvogodišnjoj studiji nad štakorima. NOAEL vrijednost donesena je na temelju hematoloških promjena, vakuolizacije stanica štitnjače te stanica bubrega, akumulacije retikuloendotelinih stanica i degradacije srčanih i mišićnih vlakana

(EFSA, 2018). Prema otrovnosti spinosad se ubraja u III. skupinu otrova i u akutnim je dozama vrlo nisko otrovan za sisavce. Stoga, ne smatra se opasnim za ljudsko zdravlje (Čačija i sur., 2018).

2.5. DOSADAŠNJA ISTRAŽIVANJA TOKSIČNIH UČINAKA ODABRANIH PESTICIDA

Iako se pesticidi koriste prvenstveno za zaštitu željenih kultura od posljedica djelovanja štetnih organizama, važno je obratiti pozornost na njihov utjecaj na korisne organizme: biljke i životinje, a osobito kakav učinak mogu imati na zdravlje i sigurnost ljudi. U te svrhe provedene su brojne studije. Glifosat, koji je već dugo prisutan u komercijalnoj upotrebi, smatrao se sigurnim za zdravlje ljudi. Međutim, novija istraživanja pokazuju da je profesionalna izloženost glifosatu povezana s povećanim rizikom od raka (Mesnage i sur., 2013). U jednom istraživanju mjerena je potencijalna toksičnost 9 formulacija na bazi glifosata, tehničkog glifosata i polietoksiliranog lojamina POE-15 (pomoćno sredstvo u formulacijama na bazi glifosata) na ljudske stanice jetre, embrionalne i placentne stanične linije nakon 24 sata izlaganja. Sve su formulacije bile toksičnije od glifosata, ali se pokazalo da je POE-15 najotrovniji za ljudske stanice (Mesnage i sur., 2013).

Isto tako, studije pokazuju da je glifosat, čiji se ostatci mogu naći u hrani, u ljudskom organizmu interferira s enzimima citokroma P450 i ometa biosintezu aromatičnih aminokiselina inhibirajući put šikiminske kiseline kod crijevnih bakterija koje imaju važnu ulogu u imunološkom sustavu ljudi (Mesnage i sur., 2013). Istraživanje provedeno na 48 eurozastupnika iz 13 država članica EU pokazalo je prisutnost glifosata u mokraći kod svih zastupnika, prosječne koncentracije 1,7 µg/L što je 17 puta viša razina od europske norme za pitku vodu (0,1 µg/L). Također, neka istraživanja pokazala su da su koncentracije glifosata u mokraći bile znatno niže kod zdrave populacije, naspram kronično oboljelih (Denžić Lugomer i sur., 2019). Sve to ukazuje na njegov negativan učinak na metabolizam crijevnih bakterija.

Neke studije pokazale su da glifosat smanjuje mogućnost detoksikacije ksenobiotika iz organizma pa posljedično pojačava štetne učinke drugih kemijskih ostataka iz hrane i toksina iz okoliša (Samsel i Seneff, 2013). Stoga, dugotrajna izloženost glifosatu može dovesti do brojnih upalnih procesa u organizmu što može uzrokovati oštećenja staničnih sustava u cijelom tijelu uključujući bolesti gastrointestinalnog trakta, pretilost, dijabetes, bolesti srca, depresiju, autizam, neplodnost, rak i Alzheimerovu bolest.

Studija iz 2013. proučavala je *in vitro* učinke S-metolaklora i njegove formulacije Twin Pack Gold (sadrži 96% aktivne tvari) na ljudske stanice jetre (Hep G2). Stanice su izložene koncentracijama S-metolaklora u rasponu 0,25-15 µg/mL tijekom 24 sata, a korišteni su CBMN-cyt, MTT test i Neutral Red metoda kako bi se procijenila genotoksičnost i citotoksičnost. Oba spoja su statistički neznačajno smanjila indeks jezgrine diobe. Čisti S-metolaklor nije inducirao stvaranje mikronukleusa, dok je Twin Pack Gold u koncentracijama 0,5–6 µg/mL povećao njihovu frekvenciju što je pokazatelj genotoksičnosti. Nadalje, kod procjene citotoksičnosti S-metolaklor nije imao utjecaja na lizosomske i mitohondrijske aktivnosti, dok je formulacija u rasponu koncentracija 1–15 µg/mL inducirala značajno smanjenje mitohondrijske aktivnosti, a sve primijenjene koncentracije izazvale su značajno smanjenje lizosomske učinkovitosti (Nikoloff i sur., 2013). Ovakvi rezultati pokazuju da je pri procjeni sigurnosti potrebno obratiti pozornost na prisutnost pomoćnih tvari u komercijalnim formulacijama pesticida koji mogu biti puno toksičniji od same aktivne tvari.

Godine 2022. provedeno je novije istraživanje u kojem su jaja žabe krastače (*Bufo spinosus*) izložena subletalnim, ali u okolišu prirodno prisutnim koncentracijama nikosulfurona (~0,1 µg/L i ~0,8 µg/L) tijekom cijelog embrionalnog razvoja. Rezultati su pokazali da je došlo do produženja embrionalnog razvoja. Nakon izlaganja jedinke su bile veće u odnosu na one netretirane i povećala se učestalost malformacija. Tretirane jedinke imale su povećane koncentracije tiola i katalazne aktivnosti, što je pokazatelj oksidativnog stresa. Nije bilo utjecaja na razine superoksid dismutaze i glutation peroksidaze. Ovakvi rezultati pokazali su da izmjena u razinama antioksidansa može biti jedan od mehanizama djelovanja nikosulfurona na stanice embrija (Cheron i sur., 2022).

Istraživanje iz 2014. godine provedeno je na mišjim zametnim stanicama s ciljem ispitivanja genotoksičnog učinka acetamiprida i propineba (fungicid) pojedinačno i u mješavini. Ispitivanje je provedeno pomoću testa morfologije spermija. Miševima je intraperitonealno ubrizgano 0,625, 1,25 i 2,50 µg/mL acetamiprida te 12,5, 25 i 50 µg/mL propineba, kao i njihova smjesa u istim koncentracijama tijekom 24 i 48 sati. Dobiveni rezultati pokazali su da acetamiprid nije statistički značajno povećao postotak abnormalnosti spermija ni pri jednoj koncentraciji. S druge strane, učestalost abnormalnosti spermija značajno se povećala pri izloženosti mješavini pesticida u koncentracijama 2,50 µg/mL acetamiprida te 50 µg/mL propineba tijekom 24 i 48 sati. Dok se acetamiprid smatra nisko mutagenim sredstvom,

propineb je snažan mutagen te je u ovom slučaju sinergistički povećao citotoksičnost acetamiprida (Rasgele, 2014).

Zatim, u studiji provedenoj na ljudskim perifernim limfocitima ispitivana je genotoksičnost komercijalne formulacije acetamiprida (Mosetam 20 SP, koji sadrži 20% acetamiprida kao aktivnog sastojka). Stanice su tretirane s 25, 30, 35 i 40 $\mu\text{g/mL}$ acetamiprida tijekom 24 i 48 sati. Rezultati su pokazali da je acetamiprid značajno inducirao izmjene sestrinskih kromatida i pojavu kromosomskih aberacija pri svim koncentracijama. Osim toga, pri 2., 3. i 4. koncentraciji došlo je do značajnijeg stvaranja mikronukleusa. Ovakvi rezultati pokazuju da acetamiprid potiče nastanak oštećenja na DNA što može biti posljedica nastanka reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) (Kocaman i Topaktaş, 2007).

Nadalje, provedena su dva istraživanja, koja su mjerila utjecaj terbutilazina: prvo na stanicama jetre (Hep G2) i humanim perifernim limfocitima, a drugo na albino miševima. Stanice su 4 sata bile izložene terbutilazinu u koncentracijama 8,00, 0,80 i 0,58 ng/mL (referentne vrijednosti Europske komisije iz 2011.), nakon čega se ispitivala citotoksičnost, genotoksičnost i indukcija oksidativnog stresa. Najviša testirana koncentracija smanjila je vitalnost limfocita za 15%, uglavnom zbog apoptoze, dok je citotoksični učinak u Hep G2 stanicama bio zanemariv. Test alkalnog kometa pokazao je nisku razinu nestabilnosti DNA tretiranih Hep G2 stanica i stanica limfocita, dok je hOGG1-modificirani komet test pokazao da oksidativno oštećenje DNA ne prevladava u ukupnom oštećenju što su potvrdile izmjerene razine markera oksidativnog stresa. S druge strane, albino miševi izloženi su čistom terbutilazinu i komercijalnoj formulaciji Radazin TZ-50 u dozi od 0,0035 mg/kg tjelesne težine tijekom 14 dana kako bi se procijenila genotoksičnost. Rezultati su pokazali da su i čisti terbutilazin i formulirani komercijalni proizvod uzrokovali nestabilnost DNA u leukocitima, koštanoj srži, jetrenim i bubrežnim stanicama, odnosno svim ispitivanim tipovima stanica. Reaktivni metaboliti, koji nastaju metaboliziranjem terbutilazina mogu inducirati umrežavanje DNA, što posljedično onemogućuje izlazak DNA iz jezgre, a ovakvi su učinci bili najizraženiji u stanicama jetre *in vivo* i Hep G2 stanicama *in vitro*. Može se zaključiti kako je ovo istraživanje ukazalo na toksikološki rizik terbutilazina u koncentracijama usporedivim s referentnim vrijednostima iz 2011. godine (Želježić i sur., 2018).

Godine 2019. objavljen je pregledni rad u kojem su navedeni rezultati iz odabranih studija koje su ispitivale mehanizme djelovanja deltametrina. Većina istraživanja pokazala je da ovaj insekticid utječe na stvaranje enzima sintaze dušikovog oksida koji je glavni čimbenik za

nastanak oksidativnog stresa u stanicama. Osim toga, većina analiziranih studija potvrdila je kako izloženost stanica deltametrinu dovodi do stvaranja reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta što posljedično dovodi do nastanka oksidativnog stresa i disbalansa između prooksidacijskih i antioksidacijskih molekula. Na taj način dolazi do oštećenja lipida, DNA i proteina što na kraju može rezultirati smrću stanica i apoptozom. Ipak, točan mehanizam djelovanja deltametrina pri stvaranju ovih spojeva ostao je nepoznat (Lu i sur., 2019).

Studija provedena 2018. godine ispitala je utjecaj kaptana na membranske i stanične parametre na limfocitima timusa štakora. Primijenjene koncentracije kaptana od 10 i 30 $\mu\text{mol/L}$ povisile su unutarstanične koncentracije Ca^{2+} i Zn^{2+} iona i smanjile koncentraciju staničnih tiolnih spojeva što je na kraju izazvalo apoptotičku i nekrotičnu smrt stanica. Osim toga, kaptan je povećao citotoksični učinak vodikovog peroksida. Smatra se da je mehanizam kojim dolazi do smrti stanica usred djelovanja kaptana sličan oksidativnom stresu. Rezultati ovog istraživanja ukazali su na citotoksične učinke kaptana na stanice sisavaca, a usto važno je napomenuti da njegova visoka razina rezidualnosti u tlu može značajno doprinijeti nastanku tih učinaka (Inoue i sur., 2018).

Nacionalni centar za informacije o pesticidima (NPIC) u SAD-u zabilježio je važne podatke o primjeni spinosada na voćne mušice. Prilikom tretmana u nekim slučajevima korištene su koncentracije koje su više u odnosu na preporučene. Osobe, koje su bile izložene tim koncentracijama, pokazivale su simptome poput privremene iritacije kože, očiju i/ili gornjeg respiratornog sustava (Bunch i sur., 2014). Stoga, pluća su jedan od organa koji može biti izložen štetnom djelovanju pesticida. Tako su se u jednoj studiji procjenjivali genotoksični i citotoksični učinci spinosada na humane epitelne stanice pluća (A549). Rezultati su pokazali da spinosad može inhibirati proliferaciju A549 stanica, inducirati oštećenje DNA i pojačati programiranu smrt tih stanica. Unutarstanični biokemijski test pokazao je da je cijepanje molekule poli (ADP riboza) polimeraze (uključena u popravak DNA i stabilnost genoma), stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) te smanjenje potencijala mitohondrijske membrane pridonijelo nastanku toksičnih učinaka spinosada u stanicama A549. Dobiveni rezultati ukazuju na to da spinosad može izazvati genotoksične i citotoksične učinke na stanicama pluća kod ljudi (Zhang i sur., 2019).

Ovo su samo neka od provedenih istraživanja koja pokazuju kakav učinak mogu imati pesticidi i njihove pomoćne tvari na stanice i pojedine organizme. Neki od njih bili su toksični pri visokim koncentracijama, dok su kod nekih i dopuštene koncentracije izazvale negativne učinke. Pesticidi mogu djelovati citotoksično, genotoksično, kao i inducirati slobodne radikale.

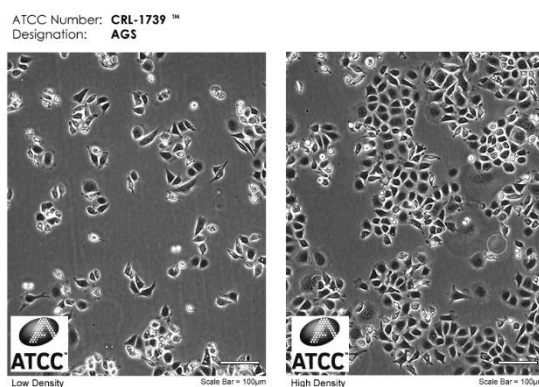
Ako se to poveže s visokim rezidualnim potencijalom nekih pesticida, posljedice koje nastaju mogu biti vrlo ozbiljne. Stoga, važno je pri korištenju pesticida primjenjivati ih oprezno i odgovorno. U eksperimentalnom dijelu rada bit će istraženi citotoksični, inhibitorni, prooksidacijski i aberacijski učinak smjese dosad opisanih pesticida.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

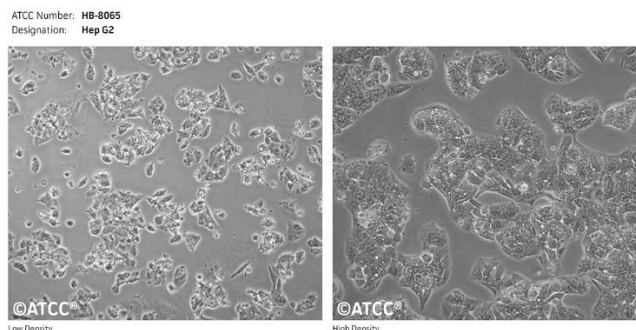
3.1.1. Biološki test sustavi

U ovom istraživanju korištene su dvije kontinuirane humane stanične linije: AGS i Hep G2. AGS je stanična linija koja je izolirana iz tkiva želuca 54-godišnje žene bijele rase oboljele od adenokarcinoma epitela želuca (Slika 9). Radi se o hiperploidnoj staničnoj liniji čiji je modalni broj kromosoma bio 49 u 60 % stanica. Čuvaju se na temperaturama nižim od -130 °C u parama tekućeg dušika (ATCC, 2023).



Slika 9. Stanična linija AGS (ATCC, 2023a)

Hep G2 stanična linija izolirana je iz tkiva jetre 15-godišnjeg dječaka bijele rase koji je bolovao od hepatocelularnog karcinoma jetre (Slika 10). Modalni broj kromosoma ovih stanica je 55, a njihov raspon može varirati između 50 i 60 kromosoma. Osim toga, modificiran je kromosom 1. Čuvaju se pri jednakim uvjetima kao AGS stanične linije (ATCC, 2023).



Slika 10. Stanična linija Hep G2 (ATCC, 2023b)

Stanične linije AGS i Hep G2 uzgajaju se u monosloju u T bocama koje se inkubiraju na 37 °C u atmosferi s 5 % CO₂ i relativnom vlažnosti od 95 %. Stanice rastu u mediju Ham's F-12 uz 10 % fetalnog goveđeg seruma (FBS). Nakon formiranja monosloja uklanja se medij, a višak seruma ispire se 0,25 %-tnom otopinom tripsina i stanice se podvrgavaju postupku tripsinizacije kako bi se odlijepile od podloge. Dodaje se minimalna količina tripsina, tek toliko da se prekrije dno T-boce. Odlijepljene stanice ponovo se tretiraju medijem i serumom kako bi se spriječila razgradnja njihovog sadržaja i dobila suspenzija, a kada se odlijepe, poprimaju okrugli oblik (Freshney, 2010).

Nakon toga, stanice u suspenziji se prebrajaju pomoću Türken-Bürkove komorice kako bi se odredio broj stanica u 1 mL te suspenzije. Navedena komorica se sastoji od četiri velika kvadrata, a svaki od njih od 16 manjih kvarata. Volumen velikog kvadrata je 10⁻⁴ mL, a konačni broj stanica u 1 mL dobiva se dijeljenjem srednje vrijednosti izbrojanih stanica u svakom velikom kvadratu s volumenom jednog velikog kvadrata. Nakon toga odredi se volumen suspenzije koji je potreban za dobivanje radne suspenzije željene koncentracije stanica (10⁵ ili 10² st/mL) ovisno o tome za koju će se metodu koristiti. Zatim se stanice iz radne suspenzije nasađuju na prozirne ili crne ploče s 96 jažica ili u Petrijeve zdjelice (ovisno o korištenoj metodi). Ploče se inkubiraju 24 sata u ranije navedenim uvjetima temperature, vlažnosti i CO₂.

3.1.2. Istraživani spojevi

U ovom istraživanju korištena je mješavina od osam pesticida u četiri različite koncentracije. U Tablici 1. prikazane su koncentracije svakog pojedinog pesticida u mg/mL.

Tablica 1. Primijenjene koncentracije pojedinih pesticida u mješavini (mg/mL).

	*ADI u 5 L krvi	**ADI	5 x ADI	10 x ADI
Glifosat	1×10^{-4}	5×10^{-4}	$2,5 \times 10^{-3}$	5×10^{-3}
S-metolaklor	2×10^{-5}	1×10^{-4}	5×10^{-4}	1×10^{-3}
Nikosulfuron	4×10^{-4}	2×10^{-3}	0,01	0,02
Acetamiprid	5×10^{-6}	$2,5 \times 10^{-5}$	$1,25 \times 10^{-4}$	$2,5 \times 10^{-4}$
Terbutilazin	8×10^{-7}	4×10^{-6}	2×10^{-5}	4×10^{-5}
Deltametrin	2×10^{-6}	1×10^{-5}	5×10^{-5}	1×10^{-4}
Kaptan	5×10^{-5}	$2,5 \times 10^{-4}$	$1,25 \times 10^{-3}$	$2,5 \times 10^{-3}$
Spinosad	$4,8 \times 10^{-6}$	$2,4 \times 10^{-5}$	$1,2 \times 10^{-4}$	$2,4 \times 10^{-4}$

* ADI koncentracija razrijeđena u 5 L (prosječni volumen krvi)

** prihvatljivi dnevni unos

3.1.3. Kemikalije

- 02,7-diklorodihidrofluorescein diacetat (DCFH-DA), *Sigma-Aldrich*, Steinheim, Njemačka
- Acetamiprid, *Hebei Yetian Agrochemicals Co., Ltd.*, Kina
- Agaroza niske točke tališta (LMP), *Invitrogen*, Engleska
- Agaroza normalne točke tališta (NMP), *Lonza*, Rockland, SAD
- Deltametrin, *Tagros Chemicals Pvt., Ltd.*, Indija
- Demineralizirana voda
- Dimetil sulfoksid (DMSO), *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Etanol (C₂H₅OH), *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Etidij bromid (C₂₁H₂₀BrN₃), *Sigma Aldrich*, Steinheim, Njemačka
- Etil acetat, *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA), *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Giemsa boja, *Kemika*, Zagreb, Hrvatska

- Glifosat, *Jingma Chemicals Co., Ltd.*, Kina
- Ham's F-12 medij za uzgoj stanica, *Capricorn Scientific GmbH*, Njemačka
- Kalijev hidrogenfosfat (K_2HPO_4), *Riedel-de Haën AG Seelze*, Hannover, Njemačka
- Kalijev klorid (KCl), *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Kaptan, *Inner Mongolia Golden Season Chemistry Co., Ltd.*, Mongolija
- Klorovodična kiselina, *Carlo Erba Reagents*, Francuska
- Kristal Violet, *Sigma Aldrich*, Steinheim, Njemačka
- Ledena octena kiselina, *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4), *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev hidrogenfosfat dodekahidrat ($Na_2HPO_4 \times 12H_2O$), *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev hidroksid (NaOH), *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev klorid (NaCl), *Gram-mol d.o.o.*, Hrvatska
- Natrijev laurilsarkozinat, *Sigma-Aldrich*, Steinheim, Njemačka
- Neutral Red (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorid), *Sigma-Aldrich*, Steinheim, Njemačka
- Nikosulfuron, *Zibo NAB Agrochemicals Ltd.*, Kina
- S-metolaklor, *Shandong Binnong Technology Co., Ltd.*, Kina
- Spinosad, *Qilu Pharmaceutical (Inner Mongolia), Co., Ltd.*, Mongolija
- Terbutilazin, *Shandong Binnong Technology Co., Ltd.*, Kina
- Tripsin, *Capricorn Scientific*, Njemačka
- Tris, *Invitrogen*, SAD
- Triton X-100, *Acros Organics*, SAD
- Vodikov peroksid, *Kemika*, Zagreb, Hrvatska

3.1.4. Otopine

Fosfatni pufer (PBS) – pH = 7,2-7,4:

KCl	0,2 g
K_2HPO_4	0,2 g
NaCl	8,0 g
$Na_2HPO_4 \times 12 H_2O$	1,16 g
destilirana voda	do 1000 mL

I. Otopine korištene za provođenje testa citotoksičnosti

Ishodišna otopina Neutral Red-a – 5 mg/mL:

boja Neutral Red	5,0 mg
etanol	1,0 mL

Radna otopina Neutral Red-a

ishodišna otopina Neutral Red-a	0,2 mL
Ham's F-12	19,8 mL

Otopina za odbojavanje:

ledena octena kiselina	1,0 mL
etanol	50,0 mL
demineralizirana voda	49,0 mL

II. Otopine korištene za provođenje klonogenog testa

Otopina Giemsa i Kristal Violet boje:

Kristal Violet	0,125 g
Giemsa boja	1,25 mL
demineralizirana voda	do 100 mL

III. Otopine korištene za određivanje reaktivnih kisikovih spojeva

Ishodišna otopina 2',7'-diklorofluorscein-diacetata (2 mM):

DCFH-DA	1 mg
DMSO	1 mL

Radna otopina 2',7'-diklorofluorscein-diacetata (50 μ M):

Ishodišna otopina DCFH-DA:	0,5 mL
PBS	19,5 mL

IV. Otopine korištene za provođenje komet testa

Otopina LMP agaroze (0,5 %):

LMP agarosa	50 mg
demineralizirana voda	10 mL

Otopina NMP agaroze (1,5 %):

NMP agarosa	150 mg
PBS	10 mL

Pufer za lizu stanica (pH = 7,5) – 890 mL

2,5 M NaCl	130 g
100 mM EDTA	29,225 g
10 mM Tris	1,078 g
1 % Natrij-laurilsarkozinat	8,9 mL
demineralizirana voda	do 1000 mL
Triton X-100	1 mL
10 % DMSO	10 mL

Pufer za alkalnu elektroforezu (pH > 13):

10 M NaOH	30 mL
200 mM EDTA	5 mL
demineralizirana voda	do 1000 mL

Otopina NaOH (10 M):

NaOH	40 g
demineralizirana voda	do 100 mL

Otopina EDTA (200 mM):

EDTA	5,1 g
------	-------

demineralizirana voda do 100 mL

Pufer za neutralizaciju (pH = 7,5):

Tris 48,5 g

demineralizirana voda do 1000 mL

HCl do pH = 7,5

Otopina etidij bromida (10 mg/mL):

etidij bromid (200 mg/mL) 1 mL

demineralizirana voda 19 mL

3.1.5. Laboratorijska oprema

I. Laboratorijski uređaji

- Analitička vaga, 1712 Mp8 Silver Edition, *Sartorius*, Engleska
- Centrifuga za epruvete po Eppendorfu, HC-240, *Tehtnica-Železniki*, Slovenija
- Čitač mikrotitarskih ploča, *Cecil Instruments Ltd, Cambridge*, Engleska
- Digestor
- Epifluorescencijski mikroskop, *Leica Microsystems GmbH, Wetzlar*, Njemačka
- Fluorimetar, *Cecil Instruments Ltd, Cambridge*, Engleska
- Hladnjak, *Gorenje*, Slovenija
- Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂, *Forma Scientific, SAD*
- Invertni svjetlosni mikroskop, *Optika Microscopes*, Italija
- Komora za sterilan rad, IBK 1 V2, *Iskra*, Slovenija
- Spektrofotometar, *Cecil Instruments Ltd, Technical Centre Cambridge*, Engleska
- Sustav za analizu slike i mjerenje kometa, *Comet Assay II, Perceptive Instruments Ltd*, Engleska
- Svjetlosni mikroskop, *Carl Zeiss, Jena*, Njemačka
- Tehnička vaga, *Sartorius*, Engleska
- Uređaj za elektroforezu, *Life Technologies*, New York, SAD
- Vibromikser EV-202, *Tehtnica-Železniki*, Slovenija
- Zamrzivač: Ultralow temperature freezer, *New Brunswick Scientific, SAD*

II. Laboratorijski pribor

- Aluminijska folija
- Automatska propipeta, *Eppendorf*, Hamburg, Njemačka
- Brušena predmetna stakalca
- Bürker-Türkova komorica
- Hemocitometar
- Eppendorf epruvete
- Erlenmeyerove tikvice
- Filter papir
- Laboratorijske staklene čaše
- Laboratorijske žlice
- Markeri za pisanje
- Menzure
- Mikropipete, *Eppendorf*, Hamburg, Njemačka
- Mikrotitarske ploče s 96 jažica, *Falcon*, SAD
- Odmjerne tikvice različitih volumena
- Pamučna vata
- Plastične Petrijeve zdjelice različitih promjera, *Aptaca*, Canelli, Italija
- Pokrovna stakalca
- Staklena kapaljka
- Staklene epruvete
- Staklene pipete
- Stakleni lijevak
- Stalci za epruvete
- Špatula
- Štapić za struganje stanica
- T-boce, *Falcon*, *BD Company*, Franklin Lakes, SAD
- Tipsevi
- Višekanalska automatska pipeta

3.2. METODE

3.2.1. Određivanje citotoksičnog učinka Neutral Red metodom

Za ispitivanje citotoksičnosti u ovom radu korištena je Neutral Red metoda. Ova je metoda često korištena za ispitivanje citotoksičnog učinka različitih ksenobiotika, a temelji se na sposobnosti metabolički aktivnih stanica da transportiraju i vežu kationsku boju Neutral Red unutar lizosoma. Kemijska formula Neutral Red-a glasi 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorid. Mehanizam djelovanja uključuje prodiranje boje u stanicu neionskom difuzijom kroz neoštećenu membranu koja se zatim koncentrira u lizosomima i veže na anionske i/ili fosfatne grupe lizosomskog matriksa. Nakon bojanja stanice se ispiru, a inkorporirana boja se iz lizosoma oslobađa primjerom otopine za odbojavanje. Količina ekstrahirane boje kvantificira se spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 540 nm. S obzirom na to da mrtve stanice ne apsorbiraju Neutral Red, ovom se metodom kvantitativno određuje broj stanica koje su preživjele nakon tretmana s određenim ksenobiotikom jer je izmjerena apsorbancija proporcionalna broju preživjelih stanica (Respetto i sur., 2008).

Postupak započinje naciepljivanjem po 100 μ L suspenzije Hep G2 ili AGS stanica koncentracije 10^5 stanica/mL u mikrotitarske prozirne ploče s 96 jažica. Stanice se zatim 24 sata kultiviraju u inkubatoru pri 37°C u atmosferi s 5 % CO₂ i relativnom vlažnosti 95 %. Nakon toga uklonjen je medij, a stanice su tretirane mješavinom od osam pesticida u četiri koncentracije koje se dobivaju miješanjem koncentracija pojedinačnih pesticida kako je prikazano u Tablici 1. Tako se „koncentracija 1“ odnosi na mješavinu koncentracija „ADI u 5L krvi“; „koncentracija 2“ predstavlja „ADI“; „koncentracija 3“ predstavlja „5 \times ADI“; dok se „koncentracija 4“ odnosi na mješavinu koncentracija pesticida iz stupca „10 \times ADI“. Navedene koncentracije pripravljene su u hranjivom mediju Ham's F-12, a stanice se tretiraju s po 100 μ L 1., 2., 3. i 4. koncentracije smjese agrokemikalija. Za negativnu kontrolu dodaje se samo po 100 μ L hranjivog medija. Nakon tretmana stanice se inkubiraju 24 sata pa se potom uklanjaju medij i pesticidi. Zatim se stanice dva puta ispiru s PBS-om pa se u svaku jažicu doda po 100 μ L radne otopine Neutral Red-a. Stanice se ponovo inkubiraju, ali na sat vremena, kako bi se boja mogla vezati u lizosomima. Nakon toga uklanja se boja, a stanice se dva puta ispiru s PBS-om kako bi se uklonio zaostali višak boje pa se u jažice doda po 100 μ L otopine za odbojavanje. Dodana otopina ekstrahirat će boju iz stanica, nakon čega se spektrofotometrijski mjeri intenzitet obojenja pri 540 nm. Dobivena apsorbancija se koristi za izračun postotka

preživljenja koji se izražava kao omjer apsorbancije tretiranih stanica i apsorbancije kontrole što je prikazano prema formuli [1]:

$$\% \text{ preživljenja} = \frac{A_{540}(\text{tretirani uzorak})}{A_{540}(\text{kontrola})} \quad [1]$$

gdje je A_{540} vrijednost apsorbancije izmjerena pri 540 nm.

3.2.2. Određivanje proliferacijskog učinka klonogenim testom

Jedna od često korištenih metoda za procjenu proliferacijskog učinka je klonogeni test, odnosno test formiranja kolonija, a korišten je i u ovom istraživanju. Riječ je o *in vitro* metodi koja se temelji na sposobnosti jedne stanice da izraste u koloniju koju sačinjava minimalno 50 stanica, odnosno sposobnosti svake stanice da se neograničeni broj puta podijeli ukoliko kemikalija koja se testira ne utječe na mehanizme odgovorne za staničnu diobu. Koristi se za praćenje utjecaja ionizirajućeg zračenja na proliferaciju stanica, kao i nekih drugih citotoksičnih tvari. Kada su stanice nasadene na podlogu, samo dio njih zadržat će sposobnost stvaranja kolonija. Tretman istraživanom tvari je potrebno provesti prije nego se stanice počnu dijeliti kako ne bi došlo do nepoželjnog preuranjenog stvaranja kolonija. Stanice stvaraju kolonije u periodu od 1 do 3 tjedna nakon čega se boje Kristal Violet/Giemsa smjesom boja. Na kraju se pomoću „olovke za brojanje kolonija“ i stereomikroskopa izbroje kolonije koje su se formirale (Franken i sur., 2006).

Metoda se provodi tako da se u plastične Petrijeve zdjelice nacijepi po 5 mL stanične suspenzije Hep G2 ili AGS stanica u koncentraciji 10^2 stanica/mL. Zatim se stanice inkubiraju tijekom 24 sata pri 37 °C, u atmosferi s 5 % CO₂ i relativnom vlažnosti od 95 %. Nakon toga, uklanja se medij, a stanice se tretiraju mješavinom pesticida u koncentracijama koje su opisane u potpoglavlju 3.2.1. (1., 2., 3., i 4. koncentracija). Ove četiri koncentracije pripremljene su u hranjivom mediju Ham's F-12 i u svaku zdjelicu dodaje se po 5 mL navedene mješavine. Kao negativna kontrola koristi se 5 mL medija. Nakon provedenog tretmana stanice se inkubiraju tijekom 24 sata pri uvjetima temperature, vlažnosti i CO₂ koji su ranije navedeni. Poslije inkubacije uklanja se prethodno dodani medij i pesticidi, a stanicama se doda po 5 mL čistog medija. Stanice se potom inkubiraju pri 37 °C, ali u periodu od 7 dana kako bi se mogle formirati kolonije. Nakon toga uklanja se medij, a porasle kolonije se boje otopinom Giemsa i Kristal Violet boje i ostavljaju na sobnoj temperaturi kako bi se boja upila. Zatim se stanice isperu dva puta s PBS-om kako bi se uklonio višak boje, a na kraju se golim okom izbroje nastale kolonije.

Postotak preživljenja tretiranih kolonija proporcionalan je broju nastalih kolonija, a izračunava se prema formuli [2]:

$$\% \text{ preživljenja} = \frac{\text{broj kolonija (tretirani uzorak)}}{\text{broj kolonija (kontrola)}} \times 100 \quad [2]$$

3.2.3. Određivanje prooksidacijskog učinka DCFH-DA metodom

Reaktivne kisikove vrste (ROS) uobičajeni su nusprodukti normalnog aerobnog staničnog metabolizma koji su regulirani antioksidativnim sustavima u organizmu. Međutim, kod prekomjernih koncentracija ROS-a dolazi do oksidativnog stresa što može uzrokovati oštećenje proteina, lipida i nukleinskih kiselina što doprinosi razvoju bolesti. Metoda za procjenu ukupnog sadržaja ROS-a u stanici korištena u ovom radu je DCFH-DA metoda. DCFH-DA (2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetat) je tzv. fluorogena sonda pomoću koje se mogu kvantitativno odrediti razine vodikovog peroksida (H₂O₂), hidroksilnih (OH⁻) i peroksilnih radikala (ROO⁻). Radi se o nefluorescentnoj lipofilnoj boji koja može difundirati kroz staničnu membranu nakon čega se u citosolu pomoću staničnih esteraza hidrolizira u polarni, također nefluorescirajući karboksilatni anion 2',7'-diklorodihidrofluorescein (DCFH). Nastali DCFH ostaje zarobljen unutar stanica i reagira s postojećim radikalima stvarajući fluorescentnu molekulu 2',7'-diklorofluorescein (DCF), čija se fluorescencija mjeri pomoću fluorimetra pri valnoj duljini od 485 nm za ekscitaciju te pri 530 nm za emisiju. Izmjereni intenzitet fluorescencije proporcionalno raste s koncentracijom ukupnih ROS-ova nastalih u stanici (Katerji i sur., 2019).

Za potrebe izvođenja ove metode koriste se crne mikrotitarske ploče s 96 jažica na koje se najepljuje po 100 μL AGS ili Hep G2 stanične suspenzije u koncentraciji 10⁵ stanica/mL. Stanice se 24 sata kultiviraju u inkubatoru pri 37 °C, u atmosferi s 5 % CO₂ i 95 % relativne vlažnosti. Nakon toga, uklanja se medij, a stanice se tretiraju s četiri koncentracije koje su dobivene miješanjem osam pesticida pripremljenih u Ham's F-12 hranjivom mediju. Stanicama se dodaje po 100 μL 1., 2., 3. i 4. koncentracije koje su opisane u potpoglavlju 3.2.1., a za negativnu kontrolu dodaje se po 100 μL medija. Nakon tretmana stanice se inkubiraju 24 sata pri ranije opisanim uvjetima, a potom se uklanjaju mješavina pesticida i medij. Stanice se zatim dva puta ispiru s PBS-om pa se u svaku jažicu doda po 100 μL radne otopine DCFH-DA te se stanice inkubiraju 30 minuta. Nakon pola sata nefluorescentni DCFH-DA prelazi u fluorescentni DCF pa slijedi mjerenje intenziteta fluorescencije pri valnoj duljini emisije od 485 nm i valnoj duljini ekscitacije od 530 nm. Intenzitet izmjerene fluorescencije

proporcionalan je s količinom nastalih ROS-ova, a za mjerenje prooksidacijske aktivnosti koristi se omjer intenziteta fluorescencije tretiranih stanica i intenziteta fluorescencije kontrole. Za realnu procjenu prooksidacijskog djelovanja potrebno je uključiti postotak preživljenja stanica, a postotak indukcije ROS-ova izračunava se prema formuli [3]:

$$\% \text{ indukcije ROS} = \frac{\frac{\text{fluorescencija (tretirani uzorak)}}{\% \text{ preživljenja (tretirani uzorak)}}}{\frac{\text{fluorescencija (kontrola)}}{\% \text{ preživljenja (kontrola)}}} \times 100 \quad [3]$$

3.2.4. Određivanje genotoksičnog učinka komet testom

U ovom radu ispitivali su se genotoksični učinak korištenjem komet testa. Komet test je često korištena, brza i osjetljiva metoda kojom se mogu analizirati oštećenja na DNA u svakoj pojedinačnoj stanici zbog čega nosi engleski naziv *single cell gel electrophoresis*. Radi se o horizontalnoj elektroforezi individualnih stanica u gelu agaroze. Stanice se prvo „zarobe“ unutar LMP agaroze (agarozna niske točke tališta) pa se zatim liziraju uz djelovanje otopine etilen-diamintetraoctene kiseline (EDTA) i detergenata kako bi se uklonila stanična membrana i proteini unutar stanice. Posljedično, dolazi do razmotavanja i oslobađanja DNA iz stanice, a nastali jednolančani i dvolančani lomovi DNA pod utjecajem genotoksične tvari rezultiraju formiranjem malih fragmenata DNA različitih duljina. Nakon toga stanice prolaze elektroforeza pri čemu negativno nabijeni fragmenti DNA u električnom polju putuju kroz gel prema pozitivno nabijenoj anodi. Kraći fragmenti će putovati brže od dužih zbog čega dolazi do njihovog razdvajanja. Nakon provođenja elektroforeze DNA se boji fluorescentnom bojom, a nastala oštećenja promatraju se pomoću fluorescencijskog mikroskopa (Dmitrieva i Burg, 2007). Pod mikroskopom se mogu uočiti strukture stanica koje podsjećaju na komet po čemu je ova metoda i nazvana. Tako „glavu“ kometa čini intaktna neoštećena DNA, dok „rep“ sačinjavaju odlomljeni fragmenti. Stoga, duljina „repa“ kometa direktno je proporcionalna količini nastalih oštećenja na DNA (Beedanagari i sur., 2014).

Postupak korišten u radu započinje nacjepljivanjem po 5 mL stanične suspenzije AGS ili Hep G2 stanica u plastične Petrijeve zdjelice čija početna koncentracija iznosi 10^5 stanica/mL. Stanice se potom kultiviraju na 37 °C u atmosferi s 5 % CO₂ i 95 % relativne vlažnosti tijekom 24 sata. Nakon toga uklanja se postojeći medij i stanice se tretiraju mješavinom pesticida u koncentracijama 1, 2, 3 i 4 koje su opisane u potpoglavlju 3.2.1, mješavine pesticida pripremljene su u Ham's F-12 hranjivom mediju. Za negativnu kontrolu uzima se po 5 mL medija. Nakon tretmana stanice se inkubiraju 24 sata poslije čega se uklanjaju pesticidi i medij,

a stanice se dva puta isperu s PBS-om. Potom se stanice tripsiniziraju kako bi se mogle prebaciti u mikroeprevete nakon čega se centrifugiraju tijekom 5 minuta na 5000 rpm kako bi se dobio talog tih stanica i supernatant. Supernatant se odbacuje, a talog stanica upotrebljava se u daljnjem postupku. Zatim se na brušena predmetna stakalca nanosi po 300 μ L 1,5 %-tne NMP agaroze, odnosno agaroze s normalnom točkom tališta (1. sloj). Nakon polimerizacije NMP agaroze pri 4 °C, talog stanica, koji je prethodno pripremljen u mikroeprevetama, resuspendira se s po 100 μ L 0,5 %-tne otopine LMP agaroze, odnosno agaroze s niskom točkom tališta i nanese na stakalca (2. sloj). LMP agarozu se temperira pri 37 °C, a nakon što se polimerizira na stakalca se nanosi još po 100 μ L LMP agaroze (3. sloj). Stakalca se prekriju pokrovnim stakalcima kako bi se stanice ravnomjerno rasporedile i fiksirale za predmetno stakalce. Za pozitivnu kontrolu stanice, koje su nanese na predmetno stakalce, tretirane su 1 mM vodikovim peroksidom tijekom 15 minuta. Kada zadnji sloj LMP agaroze polimerizira, stakalca se pri temperaturi od 4 °C uranjaju u pufer za lizu na sat vremena kako bi se stanice lizirale.

Nakon provedene lize stanica stakalca se uranjaju u kadicu za elektroforezu koja je prethodno napunjena puferom za alkalnu elektroforezu (pH > 13). Prije same elektroforeze odvija se denaturacija na 4°C u trajanju od 20 minuta. Nakon toga kreće elektroforeza koja traje 20 minuta, a provodi se uz jakost struje od 300 mA i naponom od 25 V, nakon čega se stakalca izvade iz kadice i posuše pri sobnoj temperaturi. Zatim slijedi neutralizacija stanica koja se provodi ispiranjem stanica puferom za neutralizaciju (Tris-HCl, pH = 7,5) po tri puta u razmaku od 5 minuta. Stanice se boje otopinom etidij bromida (10 mg/mL) kroz 10 minuta i prekriju pokrovnim stakalcem. Zatim se ispiru Tris-HCl puferom i ostavljaju da se etidij bromid boja stabilizira kroz 15 minuta. Potom se provode mjerenja pod epifluorescencijskim mikroskopom s ekscitacijskim filterom koji je podešen na 515-560 nm, a dobivena slika se zatim analizira uz pomoć programa *Comet Assay II*. U ovom radu koristili su se parametri dužine i intenziteta repa te repni moment kao pokazatelji razine oštećenja DNA.

3.2.5. Statistička obrada podataka

Za obradu dobivenih rezultata u ovom radu korišten je program za statistiku JASP 0.17.3.0, a provedena je Classical ANOVA statistička analiza uz primjenu Tukey i Scheffé *Post Hoc* testa usporedbe uz razinu statističke značajnosti $p < 0,05$. Rezultati su prikazani grafički korištenjem programa Microsoft Excel 2019. Rezultati komet testa prikazani su u Box-Whisker dijagramu sa srednjom i medijan vrijednošću. Rezultati ostalih testova prikazani kao srednje vrijednosti, a za sve su testove prikazane i standardne devijacije.

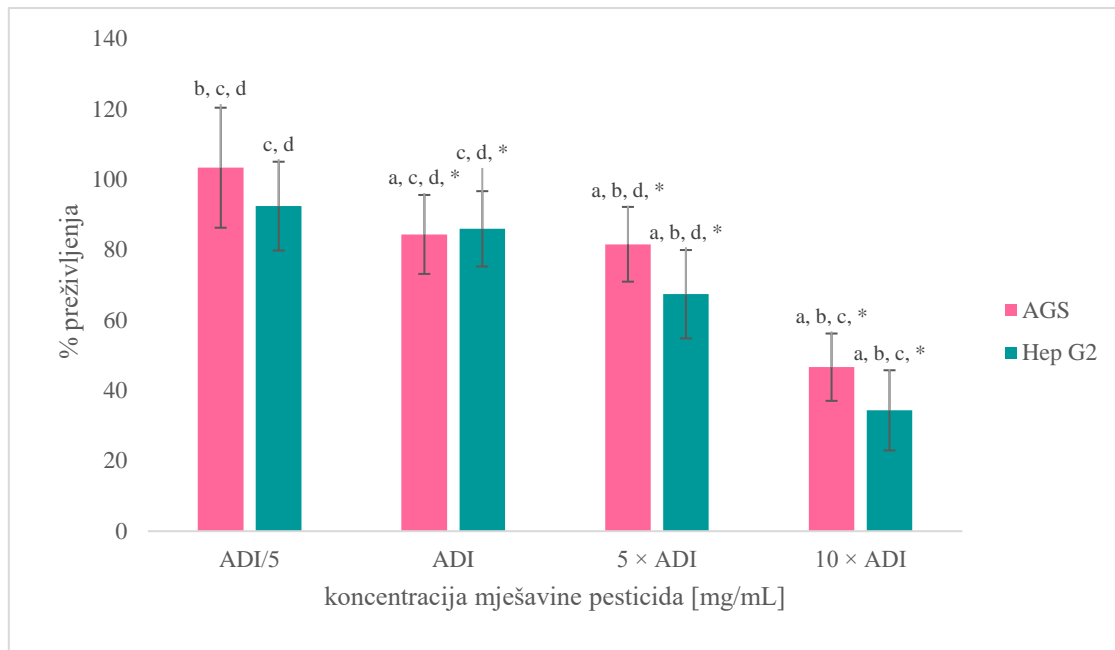
4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu ispitani su biološki učinci na kontinuiranim humanim staničnim linijama AGS (stanice adenokarcinoma epitela želuca) i Hep G2 (stanice hepatocelularnog karcinoma jetre). Ispitali su se citotoksični, proliferacijski, prooksidacijski i genotoksični učinci mješavine sastavljene od osam različitih pesticida, a to su glifosat, S-metolaklor, nikosulfuron, acetamiprid, terbutilazin, deltametrin, kaptan i spinosad. Raspon korištenih koncentracija određen je u odnosu na ADI vrijednost (dopušteni dnevni unos) svakog pojedinog pesticida, od čega je najmanja korištena koncentracija bila 5 puta manja, a najveća 10 puta veća od ADI vrijednosti. ADI vrijednost za svaki pojedini pesticid nalazi se u Tablici 1.

Citotoksični učinak mješavine pesticida na AGS i Hep G2 staničnim linijama ispitani su Neutral Red metodom, dok je prooksidacijski učinak istraživao pomoću DCFH-DA metode. Proliferacijski učinak ispitivao se pomoću klonogenog testa, a genotoksični učinak pomoću komet testa na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu. U svim navedenim metodama stanice su bile izložene djelovanju pesticida tijekom 24 sata na temperaturi od 37 °C.

4.1. ANALIZA CITOTOKSIČNOG UČINKA MJEŠAVINE PESTICIDA NEUTRAL RED METODOM

Ispitivanje citotoksičnog učinka mješavine od osam pesticida provedeno je na kontinuiranim humanim staničnim linijama AGS i Hep G2 korištenjem Neutral Red metode koja je opisana u potpoglavlju 3.2.1. Korištene su četiri koncentracije navedene mješavine: 5 puta manja koncentracija od ADI vrijednosti (koncentracija 1), ADI vrijednost (koncentracija 2), 5 puta veća koncentracija od ADI vrijednosti (koncentracija 3) i 10 puta veća koncentracija od ADI vrijednosti (koncentracija 4), a stanice su izložene tretmanu tijekom 24 sata. Dobiveni rezultati prikazani su grafički kao postotak preživljenja stanica (relativna vijabilnost stanica iskazana u odnosu na kontrolu) u ovisnosti o primijenjenim koncentracijama mješavine pesticida.



* – statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$); a - statistički značajna razlika u odnosu na ADI/5 [mg/mL] ($p < 0,05$); b – statistički značajna razlika u odnosu na ADI [mg/mL] ($p < 0,05$); c – statistički značajna razlika u odnosu na 5 × ADI [mg/mL] ($p < 0,05$); d – statistički značajna razlika u odnosu na 10 × ADI [mg/mL] ($p < 0,05$)

Slika 11. Postotak preživljenja staničnih linija AGS i Hep G2 nakon tretmana različitim koncentracijama mješavine pesticida tijekom 24 sata

Citotoksični učinak mješavine pesticida na staničnim linijama AGS i Hep G2 tijekom 24 sata prikazan je na Slici 11. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti podataka dobivenih za svaku pojedinačnu koncentraciju, uz pripadajuće standardne devijacije te iskazane statistički značajne razlike. Iz Slike 11. vidljivo je da su koncentracije u vrijednosti ADI [mg/mL], 5 × ADI [mg/mL] i 10 × ADI [mg/mL] uzrokovale statistički značajan pad preživljenja u odnosu na kontrolu kod obje stanične linije u koncentracijski ovisnom odgovoru. Osim toga, mješavina pesticida uzrokovala je veću smrtnost Hep G2 stanica u odnosu na AGS stanice gotovo pri svim korištenim koncentracijama. Tako se prva koncentracija (ADI/5 [mg/mL]) pokazala netoksičnom za AGS staničnu liniju, dok je za Hep G2 staničnu liniju ta koncentracija bila subtoksična ($92,4 \pm 12,6$ %). Prva i druga koncentracija za Hep G2 staničnu liniju rezultirale su sličnim preživljenjem. Treća koncentracija (10 × ADI [mg/mL]) rezultirala je statistički značajnim padom preživljenja Hep G2 stanične linije ($67,4 \pm 12,6$ %) u odnosu na koncentraciju 1 (ADI/5 [mg/mL]) i koncentraciju 2 (5 × ADI [mg/mL]) te se pokazala toksičnom za tu staničnu liniju. Ovakvi rezultati mogu biti posljedica pojačanog sinergističkog učinka.

Prema Wang i sur. mješavina od tri pesticida (acetamiprid, klorpirifos i karbofuran), kojoj su izložene Hep G2 stanice, izazvala je puno jače sinergističke učinke u indukciji apoptoze nego svaki pesticid zasebno. Pri nižim koncentracijama zabilježen je jači sinergistički učinak koji se uslijed antagonističkog djelovanja kod viših koncentracija počeo gubiti. Kao parametar stanične nekroze u toj studiji korištena je razina LDH oslobođena uslijed oštećenja stanične membrane. Pesticidi u kombinaciji izazvali su značajno povećanje otpuštanja LDH iz stanice u usporedbi s pojedinačnim pesticidima, odnosno mješavine su dovele do većeg oštećenja stanične membrane (Wang i sur., 2023).

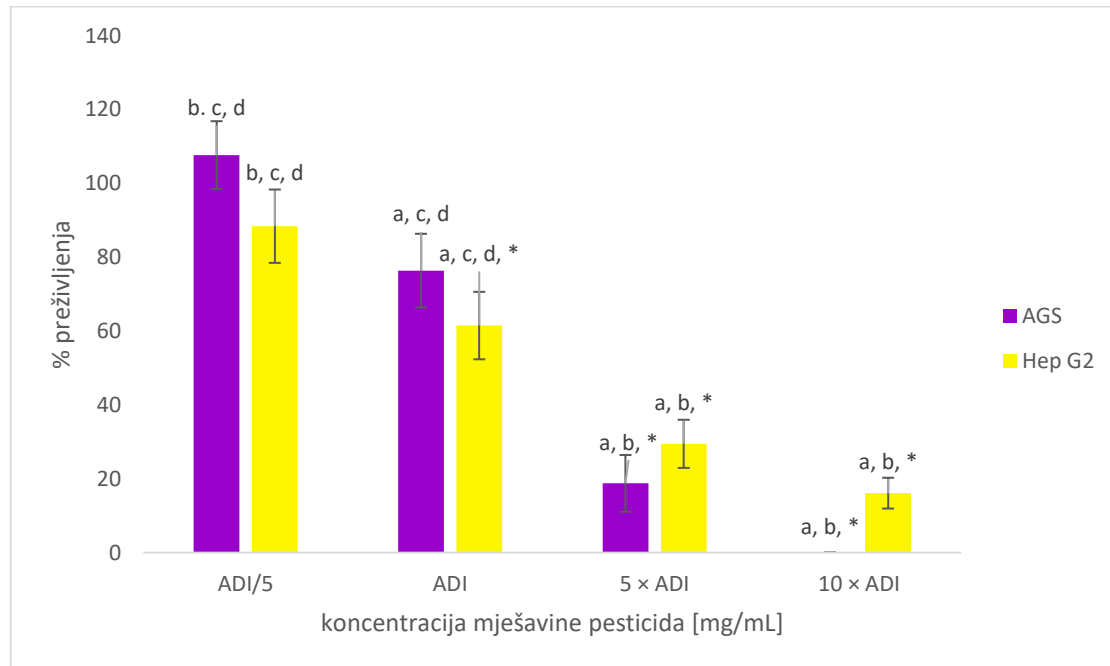
Iako je treća koncentracija 5 puta veća od druge, vidljivo je da je preživljenje AGS stanične linije pri tim koncentracijama slično što je rezultat povećane proliferacije uslijed tretmana subtoksičnim dozama pesticida. Za AGS staničnu liniju četvrta koncentracija ($10 \times \text{ADI}$ [mg/mL]) je uzrokovala statistički značajno smanjenje preživljenja u odnosu na sve korištene koncentracije ($46,6 \pm 9,6 \%$). Najtoksičnijom se pokazala četvrta koncentracija za obje stanične linije što je povezano s većim udjelom aktivnih tvari svakog pojedinog pesticida u odnosu na ostale koncentracije. Na povećanje citotoksičnog učinka može djelovati nastanak oksidativnog stresa do kojeg dolazi uslijed izloženosti stanica djelovanju pesticida (Huang i sur., 2016).

Također, u studiji u kojoj se utvrđivao citotoksični i prooksidacijski učinak 20 različitih pesticida, pojedinačno i u kombinacijama na Hep G2 staničnim linijama dokazano je da su izazvani citotoksični učinci uglavnom posljedica apoptoze. Razlog tome je pojačana aktivnost kaspaze-3 i kaspaze-7, enzima koji imaju važnu ulogu u regulaciji procesa apoptoze (Ma i sur., 2016). Iz svega navedenog, može se zaključiti da je citotoksični učinak mješavine pesticida ovisan o vrsti staničnih linija, pri čemu je evidentno da su metabolički aktivne stanice jetre puno osjetljivije na toksično djelovanje istraživanih smjesa u odnosu na stanice želuca. Iz radova drugih autora, može se zaključiti da su za staničnu smrt odgovorni mehanizmi nekroze i apoptoze, a vrsta stanične smrti ovisi o vrsti stanične linije, vremenu tretmana, testiranim koncentracijama te vrsti pesticida.

4.2. ANALIZA PROLIFERACIJSKOG UČINKA MJEŠAVINE PESTICIDA KLONOGENIM TESTOM

Proliferacijski učinak mješavine od osam pesticida na kontinuiranim humanim staničnim linijama AGS i Hep G2 ispitan je pomoću klonogenog testa koji je opisan u po poglavlju 3.2.2. Stanice su tretirane tijekom 24 sata s četiri koncentracije navedene mješavine i ostavljene 7 dana kako bi mogle proliferirati. Korištene koncentracije su: 5 puta manja koncentracija od ADI

vrijednosti (koncentracija 1), ADI vrijednost (koncentracija 2), 5 puta veća koncentracija od ADI vrijednosti (koncentracija 3) i 10 puta veća koncentracija od ADI vrijednosti (koncentracija 4). Dobiveni rezultati prikazani su grafički kao postotak preživljenja stanica (broj poraslih kolonija uzorka u odnosu na kontrolu) u ovisnosti o korištenim koncentracijama mješavine pesticida.



* – statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$); a - statistički značajna razlika u odnosu na ADI/5 [mg/mL] ($p < 0,05$); b – statistički značajna razlika u odnosu na ADI [mg/mL] ($p < 0,05$); c – statistički značajna razlika u odnosu na 5 × ADI [mg/mL] ($p < 0,05$); d – statistički značajna razlika u odnosu na 10 × ADI [mg/mL] ($p < 0,05$)

Slika 12. Postotak preživljenja staničnih linija AGS i Hep G2 i proliferacijski učinak tretmana različitim koncentracijama mješavine pesticida nakon 7 dana

Slika 12. prikazuje proliferacijski učinak mješavine sastavljene od osam pesticida koji su se manifestirali na kontinuiranim staničnim linijama AGS i Hep G2 nakon 7 dana. Dobiveni rezultati prikazani su grafički kao srednje vrijednosti postotka preživljenja uz pripadajuće standardne devijacije, kao i iskazane statistički značajne razlike. Grafički podatci pokazuju da je s porastom koncentracije došlo do smanjenja postotka preživljenja kod obje stanične linije. Tako je, primjerice, koncentracija 2 (ADI [mg/mL]) uzrokovala statistički značajno smanjenje preživljenja u odnosu na koncentraciju 1 (ADI/5 [mg/mL]) kod obje stanične linije. Smanjenje postotka preživljenja rezultat je citotoksičnog i prooksidacijskog djelovanja aktivnih tvari svakog pojedinog pesticida koje utječu i na smanjenu sposobnost proliferacije tih stanica.

Najmanja korištena koncentracija (ADI/5 [mg/mL]) je za AGS staničnu liniju uzrokovala statistički značajno veći postotak preživljenja ($107,7 \pm 9,2$ %) u odnosu na koncentraciju 2 (ADI [mg/mL]), koncentraciju 3 ($5 \times$ ADI [mg/mL]) i koncentraciju 4 ($10 \times$ ADI [mg/mL]) te je pri toj koncentraciji preživljenje stanica bilo potpuno. Za Hep G2 staničnu liniju najmanja koncentracija je izazvala pad preživljenja u odnosu na AGS staničnu liniju ($88,4 \pm 9,9$ %).

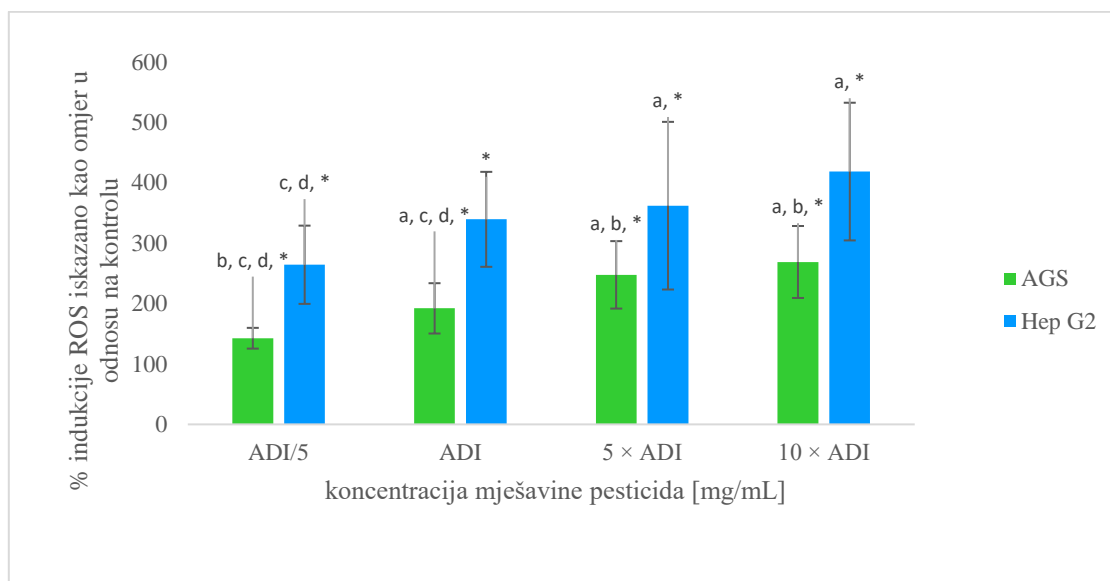
Na Slici 11., citotoksičnost određena Neutral Red metodom povećavala se s porastom koncentracije mješavine pesticida. Međutim, suprotno od Neutral Red metode, rezultati klonogenog testa pokazali su da je kod AGS stanične linije došlo do većeg pada proliferacijske sposobnosti u odnosu na Hep G2 staničnu liniju. Vidljivo je da Hep G2 stanice pokazuju bolju sposobnost proliferacije pri koncentraciji 3 ($5 \times$ ADI [mg/mL]) i koncentraciji 4 ($10 \times$ ADI [mg/mL]). Premda je najveća korištena koncentracija ($10 \times$ ADI [mg/mL]) kod obje stanične linije rezultirala najvećim smanjenjem proliferacijske sposobnosti stanica, kod Hep G2 stanične linije nije u potpunosti onemogućila njihovu proliferaciju ($16,1 \pm 4,2$ %). Kod AGS stanične linije ta je koncentracija dovela do potpunog uništenja stanica što se može povezati s visokom koncentracijom aktivnih tvari pesticida koje su onemogućile proliferaciju tih stanica.

U studiji na Hep G2 stanicama izloženim trikloropiridinolu, glavnom metabolitu klorpirifosa, test formiranja kolonija pokazao je da ovaj spoj može značajno inhibirati proliferaciju Hep G2 stanica, što je osobito vidljivo pri višim koncentracijama. Jetra je važan metabolički organ koji zauzima glavno mjesto pri sustavu detoksikacije vanjskih spojeva te ima nezamjenjivu ulogu u biotransformaciji pesticida (Zhang i sur., 2021). S obzirom na to, njezine stanice su otporne i prilagodljive toksičnim uvjetima što je jedan od mogućih razloga zbog kojeg pokazuju bolju proliferacijsku sposobnost od AGS stanične linije prilikom tretmana višim koncentracijama mješavine pesticida.

4.3. ANALIZA PROOKSIDACIJSKOG UČINKA MJEŠAVINE PESTICIDA DCFH-DA METODOM

Za ispitivanje prooksidacijskog učinka mješavine sastavljene od osam pesticida na AGS i Hep G2 kontinuiranim staničnim linijama korištena je DCFH-DA metoda koja je opisana u potpoglavlju 3.2.3. Stanice su tretirane tijekom 24 sata s četiri koncentracije spomenute mješavine pesticida, a to su: 5 puta manja koncentracija od ADI vrijednosti (koncentracija 1), ADI vrijednost (koncentracija 2), 5 puta veća koncentracija od ADI vrijednosti (koncentracija 3) i 10 puta veća koncentracija od ADI vrijednosti (koncentracija 4). Rezultati su prikazani grafički kao postotak indukcije reaktivnih kisikovih skupina (omjer vrijednosti intenziteta

fluorescencije tretiranih stanica i preživljenja stanica određenog Neutral Red metodom u odnosu na kontrolu) u ovisnosti o primijenjenim koncentracijama mješavine pesticida.



* – statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$); a - statistički značajna razlika u odnosu na ADI/5 [mg/mL] ($p < 0,05$); b – statistički značajna razlika u odnosu na ADI [mg/mL] ($p < 0,05$); c – statistički značajna razlika u odnosu na 5 × ADI [mg/mL] ($p < 0,05$); d – statistički značajna razlika u odnosu na 10 × ADI [mg/mL] ($p < 0,05$)

Slika 13. Postotak indukcije reaktivnih kisikovih skupina u staničnim linijama AGS i Hep G2 nakon tretmana različitim koncentracijama mješavine pesticida tijekom 24 sata

Na Slici 13. prikazan je prooksidacijski učinak mješavine od osam pesticida na kontinuiranim humanim staničnim linijama AGS i Hep G2 tijekom 24 sata. Rezultati su izraženi kao omjer fluorescencije uzorka i postotka preživljenja stanica kako bi se dobilo realan prikaz odnosa prooksidacijskog i citotoksičnog učinka. Također, dobiveni rezultati prikazani su kao srednje vrijednosti podataka za svaku pojedinačnu koncentraciju s odgovarajućim standardnim devijacijama i statistički značajnim razlikama.

Iz grafičkog prikaza na Slici 13. vidljivo je da su sve koncentracije kod obje stanične linije izazvale statistički značajno povećanje reaktivnih kisikovih skupina u odnosu na kontrolu. Svaka pojedinačna koncentracija za Hep G2 staničnu liniju rezultirala je porastom razine slobodnih radikala u odnosu na AGS staničnu liniju. Najmanja korištena koncentracija (ADI/5 [mg/mL]) imala je najblaži prooksidacijski učinak kod obje stanične linije. S porastom koncentracije mješavine pesticida došlo je i do porasta razine slobodnih radikala u preživjelim stanicama. Tako je, primjerice, kod AGS stanične linije treća koncentracija (5 × ADI [mg/mL]) uzrokovala statistički značajno povećanje koncentracije slobodnih radikala u stanicama (247,6

$\pm 55,8 \%$) u odnosu na koncentraciju 1 (ADI/5 [mg/mL]) i koncentraciju 2 (ADI [mg/mL]). Za Hep G2 staničnu liniju ta ista koncentracija uzrokuje znatno veći porast koncentracije slobodnih radikala u odnosu na AGS staničnu liniju ($362,0 \pm 138,8 \%$). Četvrta koncentracija ($10 \times$ ADI [mg/mL]) je pokazala najjače prooksidacijsko djelovanje na obje stanične linije, a osobito na Hep G2 staničnu liniju ($418,5 \pm 114,0 \%$) što se može povezati s najvećom koncentracijom aktivne tvari svakog pojedinog pesticida u usporedbi s ostalim koncentracijama.

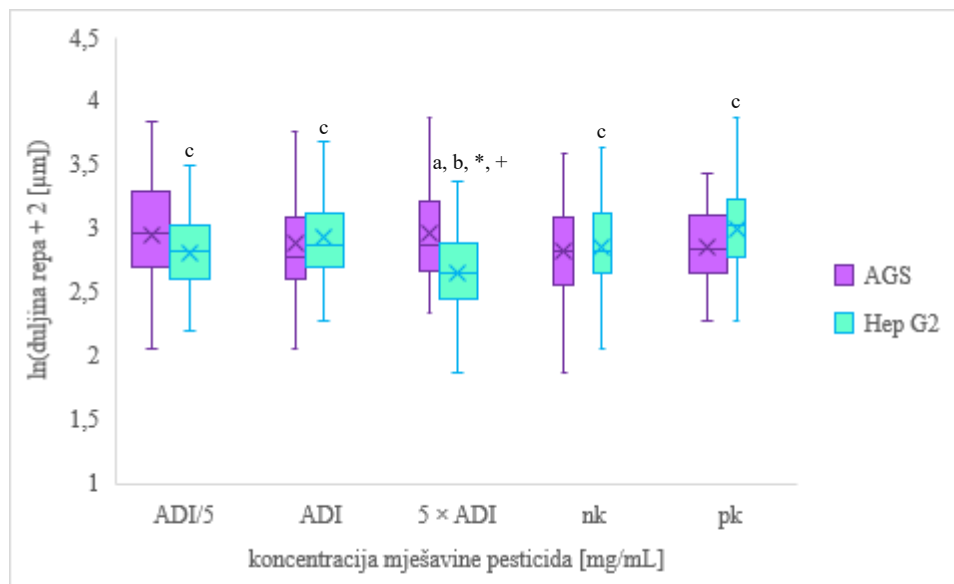
Iz slike 13 vidljivo je da su rezultati prooksidacijskog djelovanja puno veći u Hep G2 staničnoj liniji. Razlozi mogu biti različiti; stanična linija Hep G2 metabolički je aktivna, te metabolizmom agrokemikalija vjerojatno nastaje puno više slobodnih radikala nego što je to slučaj u staničnoj liniji želuca. Nadalje, jedan od razloga snažnijeg prooksidacijskog djelovanja mješavine pesticida na staničnu liniju Hep G2 naspram AGS stanične linije može biti inhibicija aktivnosti antioksidacijskog enzima superoksid-dismutaze (SOD), uslijed nastanka oksidativnog stresa zabilježenog u studiji na jetri štakora (Lu i Yu, 2014). U prisutnosti ksenobiotika s potencijalnim toksičnim djelovanjem poput pesticida i njihovih mješavina pri nižim koncentracijama dolazi do povećanja aktivnosti SOD-a, no s porastom koncentracije, njezina se aktivnost smanjuje što rezultira snažnijim prooksidacijskim djelovanjem (Wang i sur., 2023).

Brojne studije pokazale su da većina pesticida, zasebno ili u mješavini, djeluje prooksidacijski putem indukcije nastanka slobodnih radikala i putem oštećenja antioksidativnih mehanizama stanica. Pod utjecajem pesticida, koncentracija ROS-a u stanici postaje toliko visoka da ih stanica svojim zaštitnim mehanizmima koje ima ne može stabilizirati. Primjerice, studija na štakorima pokazala je da je mješavina deltametrina i klorpirifosa inducirala oksidativni stres u stanicama te je smanjila razine antioksidativnih enzima među kojima su CAT (katalaza), SOD i GPx (glutation peroksidaza). Također, povišene su razine MDA, što je pokazatelj intenzivnog odvijanja lipidne peroksidacije koja nastaje kao posljedica oksidativnog stresa (Sule i sur., 2022).

4.4. ANALIZA GENOTOKSIČNOG UČINKA MJEŠAVINE PESTICIDA KOMET TESTOM

Za istraživanje genotoksičnog učinka mješavine sastavljene od osam pesticida na kontinuiranim humanim staničnim linijama AGS i Hep G2 korišten je komet test koji je opisan u potpoglavlju 3.2.4. stanice su izložene djelovanju mješavine pesticida tijekom 24 sata, a primijenjene su četiri koncentracije: 5 puta manja koncentracija od ADI vrijednosti

(koncentracija 1), ADI vrijednost (koncentracija 2), 5 puta veća koncentracija od ADI vrijednosti (koncentracija 3) i 10 puta veća koncentracija od ADI vrijednosti (koncentracija 4). Kao negativna kontrola (nk) korišten je medij, dok se za pozitivnu kontrolu (pk) upotrebljavao vodikov peroksid (H_2O_2). Proučavani parametri oštećenja DNA su duljina repa kometa, intenzitet repa kometa i repni moment kometa koji su prikazani grafički u ovisnosti o korištenim koncentracijama mješavine pesticida. Navedeni parametri su usklađeni korištenjem prirodnog logaritma kako bi se olakšala statistička obrada njihovih rezultata.



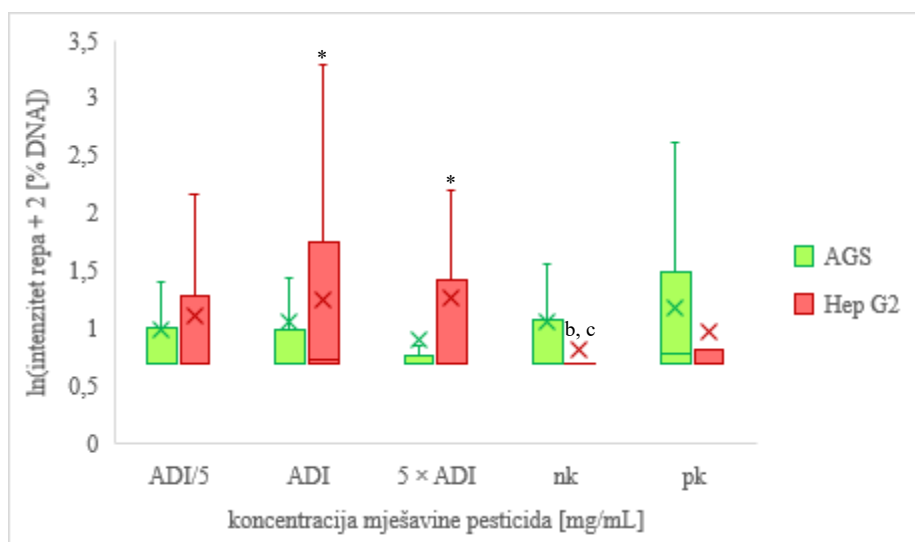
* – statistički značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu ($p < 0,05$); + – statistički značajna razlika u odnosu na pozitivnu kontrolu ($p < 0,05$); a - statistički značajna razlika u odnosu na ADI/5 [mg/mL] ($p < 0,05$); b – statistički značajna razlika u odnosu na ADI [mg/mL] ($p < 0,05$); c – statistički značajna razlika u odnosu na 5 × ADI [mg/mL] ($p < 0,05$)

Slika 14. Duljina repa kometa AGS i Hep G2 stanica nakon tretmana različitim koncentracijama mješavine pesticida

Na Slici 14. prikazana je duljina repa kometa (μm) staničnih linija AGS i Hep G2 koje su bile izložene djelovanju mješavine pesticida pri različitim koncentracijama, a rezultati su prikazani kao skup pojedinačnih podataka za svaku koncentraciju uz pripadajuće statistički značajne razlike. Iz slike je vidljivo da mješavina pesticida pri koncentraciji 1 (ADI/5 [mg/mL]), koncentraciji 2 (ADI [mg/mL]) te negativnoj i pozitivnoj kontroli izaziva statistički značajno povećanje duljine repa kometa Hep G2 stanica u odnosu na koncentraciju 3 (5 × ADI [mg/mL]). Pri trećoj koncentraciji duljina repa kometa je najmanja što znači da je ta koncentracija izazvala odlamanje većih fragmenata DNA u odnosu na sve ostale koncentracije.

Jedna studija ispitala je može li komet test razlikovati citotoksične i genotoksične učinke na stanicama koje su tretirane raznim ksenobioticima. Određivala se relevantnost njegovih rezultata ispitivanjem utjecaja citotoksičnog učinka tih tvari na rezultate genotoksičnosti. Istraživanje je pokazalo da postotak preživljenja stanica mora biti minimalno 75 % kako bi se pouzdano mogao procijeniti genotoksičan učinak tih tvari na stanicama.

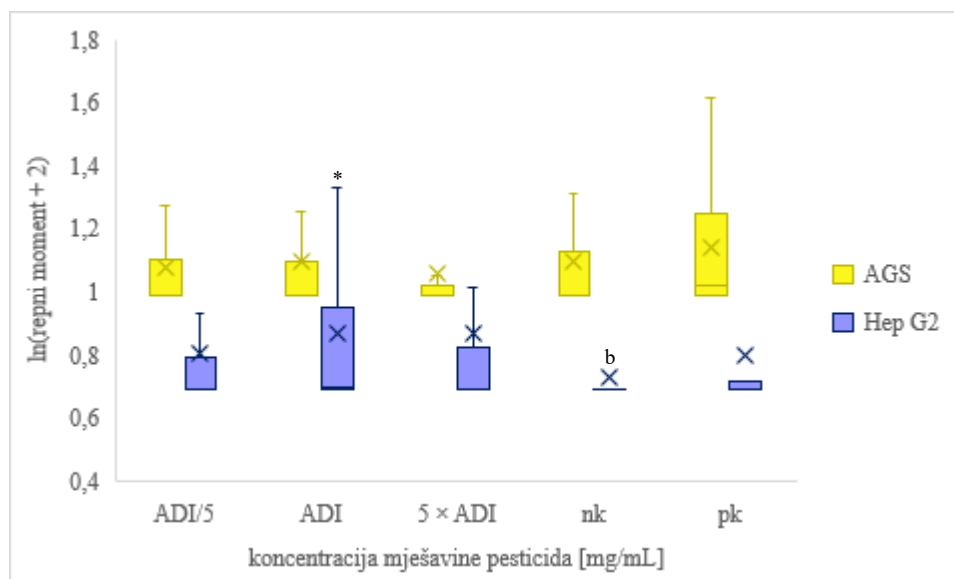
Rezultati studije pokazali su da su citotoksične tvari mogle dovesti do povećanja migracije DNA (nastanak repa kometa) u uzorcima u kojima je preživljenje stanica bilo manje od 75 % što može biti posljedica apoptoze, stanične nekroze ili oštećenja stanične membrane (Henderson i sur., 1998). To znači da je uslijed citotoksičnog djelovanja mješavine pesticida moglo doći do izlaženja DNA iz stanice koje je bilo zabilježeno u komet testu, a nije nužno posljedica genotoksičnosti. Osim toga, može se uočiti da na slici nisu prikazani podaci za četvrtu koncentraciju ($10 \times \text{ADI}$ [mg/mL]) ni za AGS ni za Hep G2 staničnu liniju. Razlog tome je što nije bilo moguće izmjeriti duljinu repa kometa za 50 stanica (raspršena DNA), što je minimalan broj potreban za određivanje tog parametra. Zbog snažnog citotoksičnog djelovanja nije bilo moguće odrediti genotoksični učinak. Za AGS staničnu liniju nije bilo statistički značajnih razlika među koncentracijama, odnosno mješavina pesticida nije izazvala lomove na DNA tih stanica.



* – statistički značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu ($p < 0,05$); b – statistički značajna razlika u odnosu na ADI [mg/mL] ($p < 0,05$); c – statistički značajna razlika u odnosu na $5 \times \text{ADI}$ [mg/mL] ($p < 0,05$)

Slika 15. Intenzitet repa kometa AGS i Hep G2 stanica nakon tretmana različitim koncentracijama mješavine pesticida

Slika 15. prikazuje intenzitet repa kometa izražen kao postotak oštećenja DNA staničnih linija AGS i Hep G2 koje su bile izložene različitim koncentracijama mješavine pesticida. Rezultati su prikazani grafički kao skup pojedinačnih podataka za svaku koncentraciju s odgovarajućim statistički značajnim razlikama. Iz slike se može uočiti da koncentracija 2 (ADI [mg/mL]) i koncentracija 3 ($5 \times$ ADI [mg/mL]) uzrokuju statistički značajno povećanje intenziteta repa kometa Hep G2 stanica u odnosu na negativnu kontrolu. Druga koncentracija (ADI [mg/mL]) izazvala je najjači intenzitet repa kometa što znači da se pri toj koncentraciji odlomio najveći postotak DNA u odnosu na ostale koncentracije. Pri trećoj koncentraciji ($5 \times$ ADI [mg/mL]) uočljiv je manji postotak oštećenja DNA u usporedbi s drugom koncentracijom što može biti posljedica popravka oštećenja DNA koji je rezultat prilagodbe stanica nepovoljnim uvjetima. Za četvrtu koncentraciju ($10 \times$ ADI [mg/mL]) nema podataka jer nije bilo moguće odrediti intenzitet repa kometa za 50 stanica ni za AGS ni za Hep G2 staničnu liniju što je posljedica pojačanog citotoksičnog učinka uslijed visokih koncentracija pesticida. Za AGS staničnu liniju nije bilo statistički značajnih razlika u koncentracijama što znači da mješavina pesticida nije uzrokovala lomove na DNA stanica AGS stanične linije.



* – statistički značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu ($p < 0,05$); b – statistički značajna razlika u odnosu na ADI [mg/mL] ($p < 0,05$)

Slika 16. Repni moment kometa AGS i Hep G2 stanica nakon tretmana različitim koncentracijama mješavine pesticida

Na Slici 16. prikazan je repni moment za stanične linije AGS i Hep G2 koje su bile izložene djelovanju različitih koncentracija mješavine pesticida. Repni moment predstavlja umnožak duljine i intenziteta repa kometa, a rezultati za taj parametar prikazani su grafički kao skup

pojedinačnih podataka za svaku koncentraciju uz odgovarajuće statistički značajne razlike. Iz grafičkog prikaza vidljivo je da koncentracija 2 (ADI [mg/mL]) uzrokuje statistički značajno povećanje repnog momenta u odnosu na negativnu kontrolu. To znači da je druga koncentracija dovela do nastanka većeg broja manjih fragmenata, odnosno lomova DNA stanica Hep G2 stanične linije u odnosu na kontrolu, to jest da ta koncentracija mješavine pesticida uzrokuje genotoksični učinak. Zbog citotoksičnog učinka nije bilo podataka ni za AGS ni za Hep G2 staničnu liniju pri koncentraciji 4 ($10 \times$ ADI [mg/mL]), odnosno nije bilo moguće odrediti repni moment ni za jednu staničnu liniju. Za AGS staničnu liniju nema zabilježenih statistički značajnih razlika ni za jednu koncentraciju što znači da repni moment AGS stanica nije rezultat genotoksičnog djelovanja mješavine pesticida. Studija iz 2021. godine na Hep G2 stanicama proučavala je toksične učinke glavnog metabolita klorpirifosa - trikloropiridinola. Između ostalog, pratio se genotoksični učinak preko komet testa. Nakon tretmana, porastom koncentracije, uočeno je povećanje repa i smanjenje glave kometa, što je pokazatelj oštećenja DNA (Zhang i sur., 2021).

Barrón Cuenca i sur. istraživali su genotoksične učinke 12 pesticida i njihovih mješavina na Hep G2 staničnu liniju. Među njima je korišten cipermetrin (piretroid), a proučavani parametri oštećenja DNA bili su pChk1 (enzim odgovoran za regulaciju staničnog ciklusa i popravak oštećenja DNA) i γ H2AX (protein koji pomaže u organizaciji i kompaktnosti DNA). Oba markera uključena su u signalizaciju formiranja DNA adukata, jednolančanih i dvolančanih lomova DNA. Razina γ H2AX proteina je u stanicama tretiranim mješavinom pesticida bila znatno viša od one koja bi se očekivala da su se pesticidi koristili zasebno, odnosno nije bilo aditivnog učinka (Barrón Cuenca i sur., 2022). Rezultati upućuju na sinergističko djelovanje pesticida.

Studija koju su proveli Ojha i Gupta pokazala je da pesticidi mogu inducirati formiranje veza između lanaca DNA i značajno povisiti aktivnosti kaspaze-3 (aktivator razgrađuje staničnih komponenata) i kaspaze-9 (inicijator apoptoze) u limfocitima štakora (Ojha i Gupta, 2015). Na temelju toga može se reći da do apoptoze dolazi u prisutnosti oksidativnog stresa i aktiviranih kaspaze-3 i kaspaze-9 koje sudjeluju u razgradnji staničnih komponenti povezanih s popravkom i oštećenjem DNA. To znači da samim prooksidacijskim djelovanjem pesticida mogu uzrokovati citotoksični i genotoksični učinak.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih istraživanja može se zaključiti sljedeće:

1. Smjesa pesticida uzrokuje citotoksični učinak kod obje stanične linije u ovisnosti o koncentraciji. Snažnije citotoksično djelovanje uočeno je na Hep G2 stanicama koje su metabolički aktivne.
2. Povećanjem koncentracije mješavine pesticida dolazi do smanjenja stanične diobe kod obje stanične linije. Pri nižim koncentracijama AGS stanice pokazuju snažniju proliferacijsku sposobnost, dok porastom koncentracije dolazi do selekcije rezistentnih klonova Hep G2 stanica.
3. Smjesa pesticida djeluje prooksidacijski na obje stanične linije u koncentracijskoj ovisnosti, s time da je prooksidacijski odgovor bio veći kod Hep G2 stanične linije.
4. Mješavina pesticida uzrokovala je povećanje postotka DNA repa kometa u staničnoj liniji Hep G2. Za AGS staničnu liniju mješavina pesticida nije se pokazala genotoksičnom. Najveća koncentracija mješavine pesticida narušila je staničnu strukturu te nije bilo moguće izmjeriti genotoksični učinak.
5. U svrhu boljeg razumijevanja utjecaja pesticida na humane stanične linije, potrebno je provesti dodatna istraživanja kako bi se razjasnili stanični mehanizmi obrane i prilagodbe ovim ksenobioticima.

6. LITERATURA

ATCC (2023a) The Global Bioresource Center: AGS. ATCC – American Type Culture Collection, <https://www.atcc.org/products/crl-1739>. Pristupljeno 1. kolovoza 2023.

ATCC (2023b) The Global Bioresource Center: Hep G2. ATCC – American Type Culture Collection, <https://www.atcc.org/products/hb-8065>. Pristupljeno 1. kolovoza 2023.

Čačija M, Bažok R, Lemić D, Mrganić M, Virić Gašparić H, Drmić Z (2018) Spinosini – insekticidi biološkog podrijetla. *Fragm Phytomed* **32**, 43-60. <https://hrcak.srce.hr/218059>

Barić K (2015) Pregled sredstava za zaštitu bilja u Republici Hrvatskoj: Herbicidi. *Glas Biljne Zašt* **15**, 139-177. <https://hrcak.srce.hr/169325>

Barrón Cuenca J, de Oliveira Galvão MF, Ünlü Endirlik B, Tirado N, Dreij K (2022) In vitro cytotoxicity and genotoxicity of single and combined pesticides used by Bolivian farmers. *Environ Mol Mutagen* **63**, 4–17. <https://doi.org/10.1002/em.22468>

Bažok R, Cvjetković B, Ostojić Z, Barić K (2020) Revolucija i evolucija kemijske metode zaštite bilja. *Glas Biljne Zašt* **20**, 346-377. <https://hrcak.srce.hr/237217>

Beedanagari S, Vulimiri SV, Bhatia S, Mahadevan B (2014) Genotoxicity biomarkers: Molecular basis of genetic variability and susceptibility. U: Gupta RC (ured.) Biomarkers in Toxicology. Academic Press, Cambridge, Massachusetts, SAD, str. 729-742.

Bokulić A, Budinšćak Ž, Čelig D, Deždek B, Hamel D, Ivić D, i sur. (2015) Priručnik za sigurno rukovanje i primjenu sredstava za zaštitu bilja, Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske, Zagreb

Bunch TR, Bond C, Buhl K, Stone D (2014) Spinosad General Fact Sheet - National Pesticide Information Center, Oregon State University Extension Services. <http://npic.orst.edu/factsheets/spinosadgen.html>. Pristupljeno: 28. srpnja 2023.

Cheron M, Costantini D, Brischoux F (2022) Nicosulfuron, a sulfonyleurea herbicide, alters embryonic development and oxidative status of hatchlings at environmental concentrations in an amphibian species. *Ecotoxicol Environmental Safety* **232**, 113-277. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113277>

Denžić Lugomer M, Pavliček D, Bilandžić N (2019) Glifosat - od primjene do životinja i ljudi. *Vet Stanica* **50**, 211-221. <https://hrcak.srce.hr/223828>

Dmitrieva NI, Burg MB (2007) Osmotic stress and DNA damage. *Methods Enzymol* **428**, 241–252. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)28013-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)28013-9)

EFSA (2007) Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance nicosulfuron. EFSA - European Food Safety Authority, <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2008.120r>. Pristupljeno 5. kolovoza 2023.

EFSA (2011) Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance terbuthylazine. EFSA - European Food Safety Authority, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.1969>. Pristupljeno 4. kolovoza 2023.

EFSA (2013) Scientific Opinion on the developmental neurotoxicity potential of acetamiprid and imidacloprid. EFSA - European Food Safety Authority, <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3471>. Pristupljeno 6. kolovoza 2023.

EFSA (2018) Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance spinosad. EFSA - European Food Safety Authority, <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2903/j.efsa.2018.5252>. Pristupljeno 7. kolovoza 2023.

EFSA (2020) Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance captan. EFSA - European Food Safety Authority, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6230>. Pristupljeno 6. kolovoza 2023.

EFSA (2022) Report of Pesticide Peer Review Tc 80 Glyphosate. EFSA - European Food Safety Authority, <https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/2023-01/glyphosate-peer-review-minutes-nov-dec-2022.pdf>. Pristupljeno 5. kolovoza 2023.

EMA (2001) Summary report: Deltamethrin. EMA - The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/deltamethrin-summary-report-3-committee-veterinary-medicinal-products_en.pdf. Pristupljeno 6. kolovoza 2023.

Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C (2006) Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc* **1**, 2315–2319. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339>

Freshney RI (2010) Culture of animalia cells: a manual on basic tehniqe and specialized applications, 4. izd., John Wiley & Sons, Inc., New Jersey.

Henderson AM, Gervais JA, Luukinen B, Buhl K, Stone D, Strid A, i sur. (2010) Glyphosate Technical Fact Sheet – National Pesticide Information Center. <http://npic.orst.edu/factsheets/archive/glyphotech.html>, Pristupljeno 5. kolovoza 2023.

Henderson L, Wolfreys A, Fedyk J, Bourner C, Windebank S (1998) The ability of the Comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. *Mutagenesis* **13**, 89–94. <https://doi.org/10.1093/mutage/13.1.89>

Hernández AF, Parrón T, Tsatsakis AM, Requena M, Alarcón R, López-Guarnido O (2013) Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: their relevance to human health. *Toxicology* **307**, 136–145. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.06.009>

Hrvatska enciklopedija (2021) Pesticidi, <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=47818>. Pristupljeno 14. 7. 2023.

Huang F, Liu Q, Xie S, Xu J, Huang B, Wu Y i sur. (2016) Cypermethrin Induces Macrophages Death through Cell Cycle Arrest and Oxidative Stress-Mediated JNK/ERK Signaling Regulated Apoptosis. *Int J Mol Sci* **17**, 885. <https://doi.org/10.3390/ijms17060885>

Inoue T, Kinoshita M, Oyama K, Kamemura N, Oyama Y (2018) Captan-induced increase in the concentrations of intracellular Ca²⁺ and Zn²⁺ and its correlation with oxidative stress in rat thymic lymphocytes. *Environ Toxicol Pharmacol* **63**, 78–83. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.08.017>

Karaca BU, Arican YE, Boran T, Binay S, Okyar A, Kaptan E, i sur. (2019) Toxic effects of subchronic oral acetamiprid exposure in rats. *Toxicol Ind Health* **35**, 11-12. <https://doi.org/10.1177/0748233719893203>

Katerji M, Filippova M, Duerksen-Hughes P (2019) Approaches and Methods to Measure Oxidative Stress in Clinical Samples: Research Applications in the Cancer Field. *Oxid Med Cell Long* **5**, 1-29. <https://doi.org/10.1155/2019/1279250>

Kipčić D (2010) Prehrambeni aditivi. U: Hengl B (ured.) Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani, Hrvatska agencija za hranu, Osijek, str. 83-110.

Kocaman AY, Topaktaş M (2007) In vitro evaluation of the genotoxicity of acetamidrid in human peripheral blood lymphocytes. *Environ Mol Mutagen* **48**, 483–490. <https://doi.org/10.1002/em.20309>

Lipovski A (2022) Sredstva za zaštitu bilja 2022. *Glas Zašt Bilja* **45**, 14-328. <https://doi.org/10.31727/gzb.45.1-2.1>

Lu Q, Sun Y, Ares I, Anadón A, Martínez M, Martínez-Larrañaga MR, i sur. (2019) Deltamethrin toxicity: A review of oxidative stress and metabolism. *Environ Res* **170**, 260–281. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.12.045>

Lu X, Yu C (2014) Enantiomer-specific profenofos-induced cytotoxicity and DNA damage mediated by oxidative stress in rat adrenal pheochromocytoma (PC12) cells. *J Appl Toxicol* **34**, 166–175. <https://doi.org/10.1002/jat.2847>

Ma M, Chen C, Yang G, Li Y, Chen Z, Qian Y (2016) Combined cytotoxic effects of pesticide mixtures present in the Chinese diet on human hepatocarcinoma cell line. *Chemosphere* **159**, 256–266. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.05.050>

Mesnage R, Bernay B, Séralini GE (2013) Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity. *Toxicology* **313**, 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.09.006>

NCBI (2023a) PubChem Compound Summary for CID 3496, Glyphosate. NCBI – National Center for Biotechnology Information, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glyphosate>. Pristupljeno 10. srpnja 2023.

NCBI (2023b) PubChem Compound Summary for CID 11140605, S-Metolachlor. NCBI – National Center for Biotechnology Information, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/S-Metolachlor>. Pristupljeno 13. srpnja 2023.

NCBI (2023c) PubChem Compound Summary for CID 73281, Nicosulfuron. NCBI – National Center for Biotechnology Information, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Nicosulfuron>. Pristupljeno 14. srpnja 2023.

NCBI (2023d) PubChem Compound Summary for CID 213021, Acetamiprid. NCBI – National Center for Biotechnology Information, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acetamiprid>. Pristupljeno 14. srpnja 2023.

NCBI (2023e) PubChem Compound Summary for CID 22206, Terbutylazine. NCBI – National Center for Biotechnology Information, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Terbutylazine>. Pristupljeno 16. srpnja 2023.

NCBI (2023f) PubChem Compound Summary for CID 40585, Deltamethrin. NCBI – National Center for Biotechnology Information, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Deltamethrin>. Pristupljeno 17. srpnja 2023.

NCBI (2023g) PubChem Compound Summary for CID 8606, Captan. NCBI – National Center for Biotechnology Information, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Captan>. Pristupljeno 18. srpnja 2023.

NCBI (2023h) PubChem Compound Summary for CID 56841558, Spinosad. NCBI – National Center for Biotechnology Information, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Spinosad>. Pristupljeno 19. srpnja 2023.

Nikoloff N, Escobar L, Soloneski S, Larramendy ML (2013) Comparative study of cytotoxic and genotoxic effects induced by herbicide S-metolachlor and its commercial formulation Twin Pack Gold® in human hepatoma (Hep G2) cells. *Food Chem Toxicol* **62**, 777–781. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.10.015>

OEHHA (2017) Metolachlor and Metolachlor Degradates Ethanesulfonic Acid and Oxanilic Acid in Groundwater. OEHHA - California Office of Environmental Health Hazard Assessment, <https://oehha.ca.gov/pesticides/report/public-health-concentrations-metolachlor-and-metolachlor-degradates-ethanesulfonic> Pristupljeno 4. kolovoza 2023.

Ojha A, Gupta YK (2015) Evaluation of genotoxic potential of commonly used organophosphate pesticides in peripheral blood lymphocytes of rats. *Hum Exp Toxicol* **34**, 390–400. <https://doi.org/10.1177/0960327114537534>

Ostojić Z, Brzoja D, Barić K (2018) Status, namjena i potrošnja glifosata u Hrvatskoj i svijetu. *Glas Biljne Zašt* **18**, 531-541. <https://hrcak.srce.hr/237005>

Rasgele PG (2014) Abnormal sperm morphology in mouse germ cells after short-term exposures to acetamiprid, propineb, and their mixture. *Arhi Hig Rada Toksikol* **65**, 47–56. <https://doi.org/10.2478/10004-1254-65-2014-2408>

Repetto G, del Peso A, Zurita J (2008) Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc* **3**, 1125–1131. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.75>

Samsel A, Seneff S (2013) Glyphosate's Suppression of Cytochrome P450 Enzymes and Amino Acid Biosynthesis by the Gut Microbiome: Pathways to Modern Diseases. *Entropy* **15**, 1416–1463. <http://dx.doi.org/10.3390/e15041416>

Sule RO, Condon L, Gomes AV (2022) A Common Feature of Pesticides: Oxidative Stress-The Role of Oxidative Stress in Pesticide-Induced Toxicity. *Oxid Med Cell Long* **2022**, 5563759. <https://doi.org/10.1155/2022/5563759>

Unsworth J (2010) History of pesticide use – IUPAC. https://agrochemicals.iupac.org/index.php?option=com_sobi2&sobi2Task=sobi2Details&catid=3&sobi2Id=31 Pristupljeno 3. srpnja 2023.

Wang R, Yang X, Wang T, Kou R, Liu P, Huang Y i sur. (2023) Synergistic effects on oxidative stress, apoptosis and necrosis resulting from combined toxicity of three commonly used pesticides on Hep G2 cells. *Ecotoxicol Environmental Saf* **263**, 115-237. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.115237>

Zhang N, Zhu L, Zhang R, Zhang C, Cheng J, Tao L i sur. (2021) Evaluation of toxicological effects of organophosphorus pesticide metabolites on human Hep G2 cells. *Environ Toxicol Pharmacol* **88**, 103741. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2021.103741>

Zhang Y, Chen H, Fan Y, Yang Y, Gao J, Xu W, i sur. (2019) Cytotoxic effects of bio-pesticide spinosad on human lung A549 cells. *Chemosphere* **230**, 182–189. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.042>

Želježić D, Žunec S, Bjeliš M, Benković V, Mladinić M, Lovaković Tariba B, i sur. (2018) Effects of the chloro-s-triazine herbicide terbuthylazine on DNA integrity in human and mouse cells. *Environ Sci Pollut Res Int* **25**, 19065–19081. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2046-7>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, **Katarina Ivona Odak** izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



Vlastoručni potpis