

Određivanje citotoksičnog, prooksidacijskog i genotoksičnog učinka acetamiprida, nikosulfurona, S-metolaklora i terbutilazina na humanim kontinuiranim staničnim linijama želuca i jetre

Lenček, Mariana

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:159:385282>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-13**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2024.

Mariana Lenček

**ODREĐIVANJE CITOTOKSIČNOG,
PROOKSIDACIJSKOG I GENOTOKSIČNOG
UČINKA ACETAMIPRIDA,
NIKOSULFURONA, S-METOLAKLORA I
TERBUTILAZINA NA HUMANIM
KONTINUIRANIM STANIČNIM LINIJAMA
ŽELUCA I JETRE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta te u Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Ksenije Durgo te uz pomoć dr. sc. Ane Huđek Turković, više asistentice.

Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Kseniji Durgo na pomoći prilikom izrade ovoga rada. Hvala na prenesenom znanju i vještinama te što ste ovo iskustvo učinili zanimljivim i ugodnim. Također zahvaljujem i dr.sc. Ani Huđek Turković na ugodnom društvu i korisnim savjetima. Posebno zahvaljujem svojoj obitelji koja mi je pružila veliku podršku tijekom studiranja.

Deo gratias!

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: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Molekularna biotehnologija

ODREĐIVANJE CITOTOKSIČNOG, PROOKSIDACIJSKOG I GENOTOKSIČNOG UČINKA
ACETAMIPRIDA, NIKOSULFURONA, S-METOLAKLORA I TERBUTILAZINA NA HUMANIM
KONTINUIRANIM STANIČNIM LINIJAMA ŽELUCA I JETRE

Mariana Lenček, univ. bacc. ing. biotechn.
0058216277

Sažetak: Pesticidi značajno doprinose poljoprivrednoj produktivnosti, no prekomjerna uporaba dovela je do njihove akumulacije u okolišu. Nakupljaju se u podzemnim vodama, zraku, zemlji pa tako i u hrani. Na taj način dolaze u kontakt s mnogim neciljanim organizmima među kojima su i ljudi. Zbog toga je od iznimne važnosti pratiti potencijalne toksične učinke pesticida te njihovih metabolita na ljudsko zdravlje. Dugotrajna izloženost pesticidima povezana je s raznim zdravstvenim problemima, uključujući endokrine poremećaje, neurotoksičnost i karcinome. U ovom istraživanju ispitani su citotoksični, prooksidacijski i genotoksični učinci četiri pesticida (acetamiprid, nikosulfuron, S-metolaklor i terbutilazin) na humanim staničnim linijama hepatocelularnog karcinoma jetre (Hep G2) i adenokarcinoma epitela želuca (AGS). Ispitivane su koncentracije koje mogu biti prisutne u okolišu, omogućujući analizu realnog rizika za ljudsko zdravlje. Acetamiprid, S-metolaklor i nikosulfuron djelovali su proliferativno na Hep G2, a acetamiprid i terbutilazin na AGS staničnu liniju. Terbutilazin pri niskim koncentracijama djeluje prooksidacijski na AGS staničnu liniju te pokazuje prooksidacijsko djelovanje u prisutnosti hidroksilnih radikala pri većim koncentracijama. Na staničnoj kulturi AGS acetamiprid, terbutilazin i S-metolaklor pokazuju genotoksičan potencijal.

Ključne riječi: pesticidi, AGS i Hep G2 stanične linije, genotoksičnost, citotoksičnost, crijevni mikrobiom

Rad sadrži: 51 stranica, 15 slika, 1 tablicu, 39 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: prof. dr. sc. Ksenija Durgo

Pomoć pri izradi: dr. sc. Ana Huđek Turković, viši asistent

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Marina Krpan (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Ksenija Durgo (mentor)
3. dr. sc. Nevenka Kopjar, znan. savj. (tr. zv.) IMI (član)
4. prof. dr. sc. Kristina Radošević (zamjenski član)

Datum obrane: 17. prosinca 2024.

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: Biotechnology

Graduate university study programme: Molecular Biotechnology

DETERMINATION OF CYTOTOXIC, PROOXIDATIVE AND THE GENOTOXIC EFFECT OF
ACETAMIPRID, NICOSULFURON, S-METOLACHLOR AND TERBUTHYLAZINE ON HUMAN
CONTINUOUS GASTRIC AND LIVER CELL LINES

Mariana Lenček, univ. bacc. ing. biotechn.
0058216277

Abstract: Although pesticides significantly contribute to agricultural productivity, their excessive use has led to their accumulation in the environment. They can be found in groundwater, air, soil and therefore in food. This way they can come in contact with many non-target organisms, including humans. For this reason, it is crucial to monitor the potential toxic effects of pesticides on human health. Long-term exposure to pesticides has been associated with various health problems, including endocrine disorders, neurotoxicity, and cancer. In this study, the cytotoxic, pro-oxidative, and genotoxic effects of four pesticides (acetamiprid, nicosulfuron, S-metolachlor, and terbuthylazine) were examined on human cell lines of liver hepatocellular carcinoma (Hep G2) and stomach epithelial adenocarcinoma (AGS). Tested concentrations correspond to possible concentrations found in environment, allowing us to estimate realistic risk to human health. The results provide insight into the potential toxic effects of pesticides on the human digestive and metabolic systems. Acetamiprid, S-metolachlor and nicosulfuron had a proliferative effect on Hep G2, and acetamiprid and terbuthylazine on the AGS cell line. At low concentrations, terbuthylazine has a pro-oxidative effect on the AGS cell line and shows a pro-oxidative effect in the presence of hydroxyl radicals at higher concentrations. On AGS cell culture, acetamiprid, terbuthylazine and S-metolachlor show genotoxic potential.

Keywords: pesticides, AGS and Hep G2 cell lines, genotoxicity, cytotoxicity, gut microbiota

Thesis contains: 51 pages, 15 figures, 1 table, 39 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Ksenija Durgo, PhD, Full professor

Technical support and assistance: Ana Huđek Turković, PhD, Senior assistant

Reviewers:

1. Marina Krpan, PhD, Full professor (president)
2. Ksenija Durgo, PhD, Full professor (mentor)
3. Nevenka Kopjar, PhD, Scientific adviser (with tenure), IMI (member) (member)
4. Kristina Radošević, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: December 17th, 2024

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. PESTICIDI.....	2
2.2. UTJECAJ PESTICIDA NA CRIJEVNU MIKROFLORU LJUDI.....	4
2.3. ODABRANI PESTICIDI ZA EKSPERIMENTALNO ISTRAŽIVANJE.....	6
2.3.1. Acetamiprid	6
2.3.2. Nikosulfuron	8
2.3.3. S-metolaklor	9
2.3.4. Terbutilazin.....	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	12
3.1. MATERIJALI.....	12
3.1.1. Biološki testni sustav	12
3.1.2. Istraživani spojevi.....	15
3.1.3. Kemikalije	16
3.1.4. Otopine.....	17
3.1.5. Laboratorijska oprema	18
3.1.5.1. <i>Popis uređaja</i>	18
3.1.5.2. <i>Popis pribora</i>	19
3.2. METODE	20
3.2.1. Određivanje citotoksičnog učinka metodom Neutral Red.....	20
3.2.2. Određivanje prooksidacijskog učinka.....	21
3.2.2.1. <i>Određivanje prooksidacijskog učinka metodom DCFH-DA</i>	21
3.2.2.2. <i>Određivanje prooksidacijskog učinka na modelnom plazmidu ϕX174 RF1</i> ...	23
3.2.3. Određivanje genotoksičnog učinka komet testom	24
3.2.4. Statistička obrada podataka	26
4. REZULTATI I RASPRAVA	27
4.1. ANALIZA CITOTOKSIČNOG UČINKA PESTICIDA METODOM NEUTRAL RED..	27
4.2. ANALIZA PROOKSIDACIJSKOG UČINKA PESTICIDA	31
4.2.1. Analiza prooksidacijskog učinka pesticida metodom DCFH-DA	31
4.2.2. Analiza prooksidacijskog učinka pesticida na modelnom plazmidu ϕ X174 RF1	33
4.3. ANALIZA GENOTOKSIČNOG UČINKA PESTICIDA KOMET TESTOM.....	39
5. ZAKLJUČCI.....	46
6. LITERATURA.....	47

1. UVOD

Porastom stanovništva na globalnoj razini raste i potražnja za hranom. Kako bi se povećali poljoprivredni prinosi te time osigurala dovoljna količina hrane, sve se više upotrebljavaju pesticidi. Pesticidi (od lat. *pestis*: kuga; *cedere*: ubiti) su biološke i kemijske tvari s toksičnim djelovanjem koje se koriste za suzbijanje štetnih organizama u poljoprivredi, šumarstvu, vrtlarstvu, javnom zdravstvu i drugdje. Iako je njihova primjena značajno pridonijela povećanju poljoprivrednih prinosa, prekomjerno korištenje pesticida dovelo je do njihovog nakupljanja u tlu, vodi, zraku te hrani. Na taj način pesticidi kontaminiraju ekosustave i mogu nepovoljno djelovati na ne ciljane organizme. Zbog toga se sve više pažnje posvećuje ispitivanjima utjecaja pesticida na okoliš i ljudsko zdravlje. Izloženost ljudi i drugih ne ciljanih organizama pesticidima može biti akutna (kratkotrajna izloženost višim dozama) ili kronična (dugotrajna izloženost nižim koncentracijama). Ovisno o vremenu i dozi izloženosti te vrsti pesticida, učinci na zdravlje mogu biti različiti.

Mnoge studije povezuju dugotrajnu izloženost pesticidima s ozbiljnim zdravstvenim problemima. U literaturi se najčešće pojavljuje povezanost između izlaganja pesticidima i endokrinih i metaboličkih poremećaja, reproduktivnih problema, neurotoksičnosti, te razvoja karcinoma. Smatra se da pesticidi mogu djelovati citotoksično, kao prooksidansi te genotoksično. Zbog svega navedenog, ispitivanje učinaka pesticida na zdravlje i okoliš postalo je ključno za donošenje regulacija koje bi smanjile rizike za zdravlje i okoliš, uz očuvanje poljoprivredne produktivnosti.

Cilj ovog rada je bio istražiti citotoksični, prooksidacijski i genotoksični učinak četiri pesticida koji se često primjenjuju u poljoprivredi, a to su acetamiprid, nikosulfuron, S-metolaklor i terbutilazin. Kako bi se što autentičnije odredio potencijalno toksičan učinak ovih pesticida na ljudsko zdravlje, korištene su okolišno značajne koncentracije prisutne u vodi, hrani, zraku, tj. koncentracije kojima ljudi mogu biti izloženi u svakodnevnicima. Istraživanje je provedeno na kontinuiranim humanim staničnim linijama želuca i jetre. Rezultati dobiveni na takvom staničnom sustavu nisu u potpunosti usporedivi s onima koji bi se očekivali u *in vivo* uvjetima, no pružaju vrijedan uvid u razumijevanje specifičnih staničnih odgovora. AGS stanice koje predstavljaju stanice želuca, koji prilikom kontaminirane hrane ili vode dolazi u kontakt s toksinom, omogućuju *in vitro* praćenje učinka toksina na probavni sustav. Hep G2 stanična linija koja predstavlja metabolički aktivne stanice jetre daje nam uvid u to kako jetra reagira na ispitivane toksine.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PESTICIDI

Pesticidi su kemijska i mikrobiološka sredstva koja se koriste u poljoprivredi, šumarstvu te domaćim i javnozdravstvenim aktivnostima za suzbijanje štetnih organizama kao što su razni mikroorganizmi, kukci, korovi, grinje, nematode, štetni glodavci te biljni patogeni. Najčešće se koriste za zaštitu bilja, ali i za uništavanje parazita, insekata i drugih vektora koji prenose zarazne bolesti na životinje i ljude. Zato prema namjeni pesticide dijelimo na insekticide, sredstva za suzbijanje kukaca, nematocide, sredstva za suzbijanje oblića, akaricide koji se koriste za suzbijanje grinja, rodenticide za suzbijanje glodavaca, korvicide za odbijanje ptica, fungicide koji sprječavaju gljivične bolesti i herbicide koji se primjenjuju za suzbijanje korova, a pripadaju im fiziotropi i regulatori rasta (usporavaju rast, skraćuju duljine mladica, djeluju na disanje i transpiraciju biljke). Kako bi se učinkovito spriječile ili smanjile štete uzrokovane štetnim organizmima, važno je prvo pravilno identificirati vrstu štetnika. Na temelju razumijevanja njihovih bioloških, ekoloških i drugih karakteristika, odabiru se najučinkovitije mjere za zaštitu bilja (Hrvatska enciklopedija, 2024).

Napuštanjem nomadskog načina života i prelaskom na sjedilački, ljudi su započeli uzgajati biljke kao izvor hrane što je označilo početak razvoja poljoprivrede. Ubrzo su se pojavili problemi s organizmima koji su radili štete usjevima, doprinosili pojavi bolesti, uzrokovali velike poljoprivredne gubitke i glad, što je potaknulo ljude na traženje rješenja za suzbijanje štetnika i zaštitu biljaka. U početku su se uglavnom primjenjivale prirodne, lako dostupne metode zaštite biljaka od nametnika. Tako je jedna od prvih zabilježenih upotreba pesticida u vrijeme Sumerana bila korištenje sumporovih spojeva za zaštitu od kukaca i grinja, a Kinezi su koristili arsen pomješan s vodom za suzbijanje štetnika u polju. Koristili su se i olovni arsenat i kriolit kao stanični otrovi te boraks kao dehidrator. Prema spisima iz antičke Grčke i Rima, zabilježeno je korištenje dimova, koji su se dobivali spaljivanjem slame, živice, ribe, itd. u svrhu sprječavanja razvoja plijesni i nastanka plamenjače u voćnjacima. Za hvatanje gmižućih insekata na drveću koristio se katran, a korovi su se uglavnom suzbijali ručnim plijevljenjem. Mnoge anorganske kemikalije korištene su kao pesticidi, a Bordeaux smjesa na bazi bakrenog sulfata i vapna se još i danas koristi protiv raznih gljivičnih bolesti (Bažok i sur., 2020).

Sredinom 19. stoljeća započinje značajna upotreba kemikalija u zaštiti bilja, pa tako imamo primjer uspješne primjene bakrenog acetoarsenita protiv krumpirove zlatice, korištenje natrijevog klorata i sumporne kiseline za suzbijanje štetnika te uporabu naftalena, klorfenola i petrolejskog ulja za suzbijanje gljivica. No ubrzo se pojavljuju problemi prilikom korištenja ovih tvari, a to su nedostatak selektivnosti, otrovnost i fititoksičnost. Zato krajem 19.-og stoljeća

započinje sinteza kemijskih tvari za zaštitu bilja. 1874.-te je sintetiziran diklor-difenil-trikloretan (DDT) koji se koristio kao insekticid širokog spektra te iako se pokazao štetnim i toksičnim za gmazove, ptice i sisavce njegovo je otkriće značajno utjecalo na razvoj drugih sintetičkih pesticida poput aldrina, eldrina, kaptana, parationa i drugih, što je dovelo do značajnog povećanja poljoprivredne proizvodnje na svjetskoj razini i suzbijanja gladi (Bažok i sur., 2020).

Od sredine 20.-og stoljeća korištenje kemijskih sredstava za zaštitu bilja postaje glavna metoda zaštite protiv mnogih štetnih organizama. Pesticidi mogu biti kemijski spojevi, mikroorganizmi i virusi, biljni ekstrakti i slično. Kemijski čiste aktivne tvari uglavnom nisu prikladne za izravno korištenje kao sredstva za zaštitu bilja, a iznimka su sredstva za zaštitu bilja na osnovi bakrenog sulfata (kao modra galica) i određene formulacije na osnovi sumpora. Kemijska sredstva za zaštitu bilja su smjesa aktivnih i dodatnih tvari u određenim koncentracijama pri čemu je aktivna tvar temeljni sastojak pesticida koja ima opći ili specifičan učinak na štetnike ili na bilje, dijelove biljaka ili pak biljne proizvode, a dodatne tvari pospješuju učinak aktivne tvari. U formulaciji sredstava za zaštitu bilja se često nalaze i dodane tvari (ko-formulanti) čija je uloga spriječiti ili smanjiti fitotoksične učinke na određeno bilje npr. zaštitna tvar (engl. *safener*) ili poboljšati djelovanje aktivne tvari (tzv. sinergisti). Na tržište se sredstva za zaštitu bilja stavljaju kao formulirani pripravci, a korisniku trebaju osiguravati jednostavnu i sigurnu uporabu i rukovanje, učinkovitost aktivne tvari, manju izloženost aktivnoj tvari pri uporabi (ako se pripravak koristi sukladno uputama), ravnomjernu raspodjelu aktivne tvari tijekom uporabe i stabilnost sredstva za zaštitu bilja na određeno razdoblje (tijekom skladištenja) (Bokulić i sur., 2015).

U Republici Hrvatskoj se na tržištu nalazi više od 30 različitih vrsta formulacija sredstava za zaštitu bilja, a najzastupljeniji su koncentрати za emulziju, koncentрати za suspenziju, močiva prašiva, koncentрати za otopinu i samodispergirajuće mikrogranule. Prema načinu primjene postoje formulacije sredstava koje se primjenjuju u tekućem (prskanjem, raspršivanjem, zalijevanjem) i u krutom obliku (zapašivanjem, rasipanjem granula). Svaki pesticid koji se pojavljuje na tržištu u Republici Hrvatskoj mora biti registriran ili posjedovati odgovarajuću dozvolu Ministarstva poljoprivrede. Smije se prodavati isključivo u originalnoj ambalaži, koja je pravilno označena i opremljena etiketom s propisanim podacima na hrvatskom jeziku. Trgovačko ime pesticida je zakonski zaštićeno i korisnicima lako prepoznatljivo, a sastoji se od imena, te brojeva i kratica koji označavaju količinu aktivne tvari i vrstu formulacije u pesticidu. Na primjer, naziv „Mospilan 20 SP“ označava da je riječ o krutoj formulaciji u obliku vodotopivog prašiva koja sadrži 20 % aktivne tvari (Bokulić i sur., 2015).

Nažalost, nekontrolirana i prekomjerena upotreba pesticida rezultirala je razvojem organizama koji su otporni na pesticide, došlo je do porasta koncentracije ostataka pesticida u okolišu (posebno u podzemnim vodama) što ima negativan učinak na zdravlje ljudi i brojnih

neciljanih organizama te dovodi do narušavanja ekosustava (Bažok i sur., 2020). Zbog toga je izrazito bitno racionalno pristupati njihovoj uporabi, koristiti ih samo kada je to prijeko potrebno, u skladu s propisima i prema uputama. Odluke o pravilnoj upotrebi pesticida moraju se temeljiti na informacijama koje su prikupljene na terenu kroz redovite preglede usjeva i/ili na temelju informacija prognoznih službi, u skladu s načelima dobre poljoprivredne i okolišne prakse. Također je potrebno provoditi više studija u procesu registracije novih pesticida kako bi se pouzdano ispitala njihova toksičnost, te minimizirati uporabu dokazano toksičnih pesticida (Bokulić i sur., 2015).

2.2. UTJECAJ PESTICIDA NA CRIJEVNU MIKROFLORU LJUDI

Kao što je već rečeno, globalna, prekomjerna uporaba pesticida dovodi do mogućeg izlaganja ljudi i drugih neciljanih organizama njihovim potencijalno toksičnim učincima. Pesticidi se često ne apsorbiraju u cijelosti u ciljani organizam već se dio nakuplja u tlu, vodi i zraku te tako mogu doći izravno u kontakt s ljudima i životinjama. Istraživanja ukazuju na to da je izlaganje pesticidima direktno povezano s mnogim patološkim promjenama, uključujući metaboličke bolesti (kao što su dijabetes tip 2 i pretilost), imunološke bolesti (upalne bolesti crijeva), neurološke bolesti (autizam), ometaju endokrini sustav te mogu negativno utjecati na reproduktivni i spolni sustav. Neke studije upućuju da izlaganje određenim pesticidima može rezultirati i pojavom tumora (kancerogen). Novija istraživanja ukazuju na to da mnogi zagađivači (uključujući razne pesticide) utječu na promjenu sastava crijevne mikroflore zbog čega raste interes istraživanja na području toksikologije pesticida u interakciji s crijevnom mikroflorom (Yuan i sur., 2019) (Čalić, 2021).

Pod pojmom crijevne mikroflore ljudi (mikrobiota) govori se o kompleksu živih mikroorganizama koji tvore složeni mikrobní sustav, a nastanjuju ljudski gastrointestinalni trakt. To su uglavnom bakterije (90 %), virusi i gljivice koji su prirodno prisutni u ljudskom tijelu. Crijevna mikrobiota smatra se ključnom u održavanju zdravlja domaćina, a sastoji se približno od 10 do 100 trilijuna mikroorganizama (Čalić, 2021). Bakterijska mikrobiota sudjeluje u regulaciji metabolizma ugljikohidrata, aminokiselina i lipida, fermentaciji neprobavljenih sastojaka hrane, biosintezi i apsorpciji vitamina K, B1, B2, B3, B6 i B12, sudjeluje u razgradnji žučne kiseline, u konverziji prolijekova u aktivnu formu te sprječava zadržavanje štetnih, patogenih mikroorganizama i toksina u tijelu. Također sudjeluje u biotransformaciji ksenobiotika i u metaboliziranju mnogih štetnih kemikalija pa čak i teških metala (Abou Diwan i sur., 2023). Zbog svega navedenog, bilo kakve promjene u sastavu crijevne mikroflore, izravno utječu na zdravlje domaćina. Promjene crijevne mikrobiote povezane su s bolestima gastrointestinalnog

trakta (sindrom iritabilnog kolona, kolorektalni karcinom, upalne bolesti crijeva), ekstraintestinalnim poremećajima poput bolesti jetre (NAFLD) i respiratornog sustava (alergije, bronhalna astma; Mahmutović, 2015). Kao što je već ranije spomenuto, ljudi i životinje mogu doći u kontakt s pesticidima (ili njihovim metabolitima) koji se nalaze u zemlji (pa tako i hrani), zraku, pitkoj vodi te podzemnim vodama. Time se gastrointestinalni trakt domaćina izlaže (direktno ili indirektno) pesticidima koji mogu uzrokovati promjene u sastavu i funkciji crijevnne mikroflore i dovesti do disbioze (Yuan i sur., 2019). Povezanost između pesticida i razvoja bolesti ne ovisi samo o dozi izloženosti, već i o vremenu izloženosti, poput prenatalne izloženosti i razdoblja prve 3 godine života, te o trajanju izloženosti. Učestala izloženost niskim dozama ili dozama bez očitog štetnog učinka može imati veći utjecaj na zdravlje nego kratkotrajna izloženost višim dozama (Abou Diwan i sur., 2023).

Pesticidi poput organofosfata i piretroida dokazano izazivaju promjene u sastavu crijevne mikrobiote. Na primjer, otkriveno je da izloženost štakora klorpirifosu (organofosfatnom pesticidu) može značajno promijeniti sastav njihove crijevne mikrobiote, uključujući smanjenje koncentracije i raznolikosti „dobrih“ bakterija (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*) i porast broja bakterija povezanih s dijabetičkim i pretilim fenotipovima, što izaziva pro-pretili fenotip kod štakora hranjenih normalnom masnom prehranom. Također, promjena crijevne mikrobiote uzrokovana izlaganjem štakora klorpirifosu je dovela do promjena metabolita u mokraći povezanih s metabolizmom aminokiselina, energije, kratkolančanih masnih i žučnih kiselina. Te su promjene naknadno uzrokovale upalu crijeva i abnormalnu propusnost crijevne barijere (Yuan i sur., 2019). Prema prethodnim istraživanjima, izlaganje niskim dozama permetrina, koji je glavni predstavnik pesticida iz skupine piretroida, rezultira smanjenjem broja bakterija iz rodova *Bacteroides*, *Prevotella* i *Porphyromonas* i povećanjem bakterija iz porodica *Enterobacteriaceae* i *Lactobacillus* u crijevima. Vrste iz roda *Bacteroides* poznate su po proizvodnji kratkolančanih masnih kiselina te štite od upala crijeva, a vrste iz roda *Prevotella* pozitivno utječu na metabolizam vlakna i proizvodnju kratkolančanih masnih kiselina. Također permetrin pokazuje antimikrobna svojstva prema korisnim bakterijama iz rodova *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* (Giambò i sur., 2021). Oralna primjena karbendazima (fungicida širokog spektra, spada u skupinu benzimidazolnih spojeva) kod miševa u visokim dozama tijekom 28 dana izazvala je poremećaje metabolizma lipida u jetri, što je dovelo do nakupljanja lipida u jetri i pojave upale. Budući da se većina karbendazima zadržava u gastrointestinalnom traktu i dolazi u interakciju s crijevnom mikrobiotom, opaženo je smanjenje broja bakterija iz roda *Bacteroidetes*, te povećanje relativne zastupljenosti bakterija iz roda *Firmicutes*, *Proteobacteria* i *Actinobacteria*. Kronična primjena karbendazima u visokim dozama tijekom 14 tjedana ne samo da je promijenila sastav crijevne mikrobiote, nego je i poremetila metabolizam lipida, što je dovelo do povećane apsorpcije triglicerida u crijevima, hiperlipidemije i višestrukih

upalnih reakcija u tkivima kod miševa. Obje studije potvrđuju da su promjene u crijevnoj mikrobioti izazvane karbendazimom povezane s poremećajem metabolizma lipida u jetri i upalom, iako su točni mehanizmi još uvijek nepoznati (Yuan i sur., 2019).

Iz navedenih primjera, moguće je zaključiti da neki pesticidi imaju antimikrobna svojstva koja mogu smanjiti raznolikost mikroorganizama crijevne mikroflore, drugi mogu promijeniti metabolizam bakterija što rezultira poremećajem u proizvodnji ključnih metabolita poput kratkolančanih masnih kiselina, a neki mogu utjecati na imunološke putove povezane s mikrobiotom, što može dovesti do upalnih reakcija u crijevima. No, nedostatak mehanističkog znanja o putevima koji dovode do kvalitativnih i kvantitativnih poremećaja mikrobiote ograničava primjenu rezultata istraživanja u stvarnom životu. Buduća bi se istraživanja trebala usmjeriti na razumijevanje specifičnih mehanizama interakcije između pesticida i mikrobiote te na prepoznavanje potencijalnih biomarkera koji bi omogućili procjenu oštećenja crijevne barijere. Definiranjem tih faktora moguće je razviti preventivne strategije koje bi pomogle u očuvanju zdravlja mikrobiote i smanjenju rizika za zdravlje (Giambò i sur., 2021).

2.3. ODABRANI PESTICIDI ZA EKSPERIMENTALNO ISTRAŽIVANJE

U ovom poglavlju će biti opisani pesticidi koji su odabrani za ispitivanje prilikom izrade eksperimentalnog dijela rada. Radi se o četiri pesticida od kojih su tri herbicidi (nikosulfuron, S-metolaklor, terbutilazin) i jedan insekticid (acetamiprid).

2.3.1. Acetamiprid

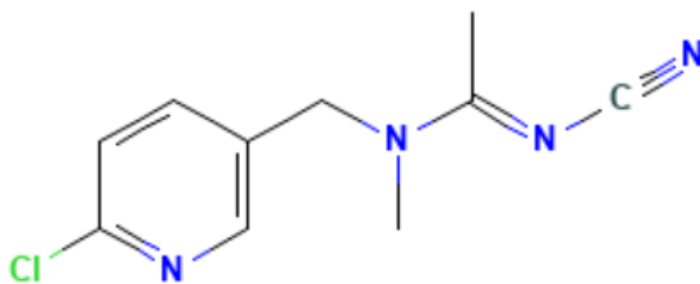
Acetamiprid N-[(6-kloropiridin-3-il)metil]-N'-cijano-N-metiletanimidamid je insekticid iz skupine kloronikotinil neonikotinoida čija je kemijska struktura prikazana na slici 1. Prvi put je sintetiziran 1984. godine, dok je prvi proizvod koji sadrži acetamiprid komercijaliziran 2002. godine za primjenu na usjevima i stoci. Tijekom posljednjeg desetljeća, acetamiprid se primjenjuje u poljoprivredi te domaćim i javnozdravstvenim aktivnostima kao zamjena za opasnije pesticide poput organofosforinih pesticida, karbamata i piretroida. Acetamiprid se najčešće koristi u poljoprivredi za zaštitu lisnatog povrća, agruma, jezgričavog voća te višanja od insekata s usnim ustrojem za sisanje, lisnih uši, cikada, moljaca, kornjaša te gusjenica iz roda *Lepidoptera* (Phogat i sur., 2022). U domaćim i javnozdravstvenim akcijama, acetamiprid se koristi za suzbijanje muha, žohara, komaraca, krpelja i grinja. Pokazao se jednako učinkovitim u svim fazama njihova razvoja (Çavaş i sur., 2012). Najčešće je dostupan u obliku bijelog praha ili granula bez mirisa.

Insekticidi iz grupe neonikotinoida djeluju na živčani sustav insekata uzrokujući ireverzibilnu

blokadu postsinaptičkih nikotinskih acetilkolinskih receptora (nAChR). Posljedično Na-kanali su stalno otvoreni te dolazi do stimulacije električnih impulsa čime dolazi do ometanja prijenosa podražaja u živčanom sustavu štetnika što rezultira blokiranjem njihovih osnovnih funkcija, paralizom i smrću (Lipovski, 2022).

Poznato je da je acetamiprid visoko toksičan za insekte, no različite studije su pokazale da ima afinitet i prema nikotinskim acetilkolinskim receptorima kod sisavaca. Neke studije su zabilježile inhibiciju ekspresije mRNA $\alpha 3$, $\alpha 4$ i $\alpha 7$ podjedinica nikotinskog acetilkolinskog receptora u stanicama malog mozga štakora, različitim regijama mozga i testisima miševa nakon izlaganja acetamipridu. U sisavaca se nikotinski acetilkolinski receptori nalaze uglavnom u živčano-mišićnom i reproduktivnom sustavu, a ozbiljnost trovanja acetamipridom prvenstveno ovisi o trajanju i dozi izlaganja (Phogat i sur., 2022). Iako su zabilježeni slučajevi trovanja ljudi acetamipridom rijetki, prijavljeno je da može uzrokovati poremećaje pamćenja, tahikardiju, respiratorni zastoje, mučninu, slabost i povraćanje te da su simptomi djelomično nalikovali akutnom trovanju organofosfatima. Moguće je da konzumacija veće količine acetamiprida uzrokuje zdravstvene probleme, no za sada se acetamiprid smatra nisko toksičnim prema sisavcima (Imamura i sur., 2010).

Francuska vlada je iz zabrinutosti da aktivna tvar acetamiprid predstavlja rizik za ljudsko zdravlje i okoliš tražila od Europske komisije (engl. *European Commission*, EC) da se ograniči njegova uporaba. Kako bi potvrdili svoju zabrinutost pozvali su se na znanstvene radove u kojima se istraživao utjecaj tj. opasnost izlaganja ljudi i okoliša acetamipridu. Nakon provedenih istraživanja, Europska agencija za sigurnost hrane (engl. *European Food Safety Authority*, EFSA) je došla do zaključka da na temelju dostupnih podataka nije pronađen konačan dokaz većih opasnosti za ljudsko zdravlje u usporedbi s prethodnim procjenama za genotoksičnost, razvojnu toksičnost, neurotoksičnost i imunitoksičnost. Međutim, ukazali su na značajnu razinu nesigurnosti u vezi s razvojnim neurotoksičnim (engl. *developmental neurotoxicity*, DNT) svojstvima acetamiprida. Kako bi se omogućilo razumijevanje mehanizama za prikladnu procjenu opasnosti i rizika potrebno je više podataka. S obzirom na te nesigurnosti, radna skupina EFSA-e predložila je snižavanje prihvatljivog dnevnog unosa (engl. *adequate daily intake*, ADI) i akutne referentne doze (engl. *acute reference dose*, ARfD) s 0,025 na 0,005 mg/kg tjelesne mase po danu.



Slika 1. Kemijska struktura acetamiprida (NCBI, 2024)

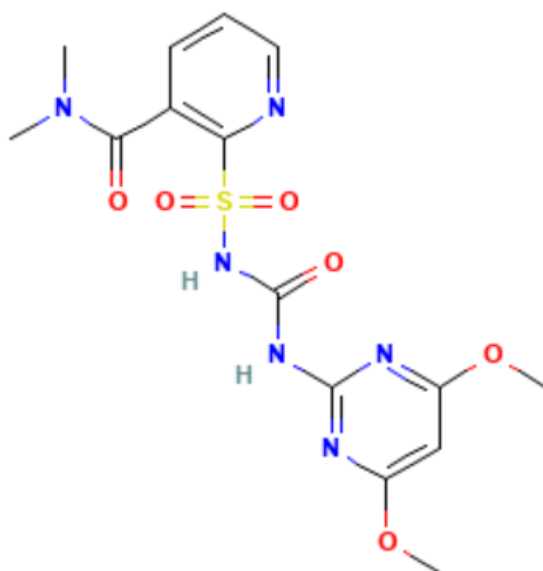
2.3.2. Nikosulfuron

Nikosulfuron 2-[(4,6-dimetoksipirimidin-2-ilkarbamoil)sulfamoil]-N,N-dimetilnikotinamid je herbicid širokog spektra iz obitelji sulfonilureja koji se koristi za suzbijanje brojnih jednogodišnjih i višegodišnjih uskolisnih te nekih širokolisnih korova. Kemijska struktura nikosulfurona prikazana je na slici 2. Herbicidi iz obitelji sulfonilureja su jedni od najefikasnijih i najčešće upotrebljavanih herbicida te im se zbog toga pridaje velika pažnja. Nikosulfuron se na tržištu pojavio 1990.-ih te se od tada koristi kako bi se zaštili usjevi kukuruza, riže, citrusa, loze i krumpira od širokog spektra korova. Jedan je od najčešće korištenih herbicida prilikom zaštite polja kukuruza zbog svoje visoke aktivnosti (efikasno suzbija korove) i selektivnosti (ima minimalan utjecaj na samu kulturu) prema kukuruzu (Zhong i sur., 2023).

Herbicide iz grupe sulfonilurea biljke primarno unose preko lista zbog čega se upotrebljavaju isključivo nakon nicanja korova. Nikosulfuron djeluje tako da inhibira aktivnost acetolaktat sintaze (ALS enzim) koji ima esencijalnu ulogu u stvaranju aminokiselina leucina, izoleucina i valina u biljkama. Ove aminokiseline su esencijalne za biosintezu proteina te time herbicidi koji inhibiraju ALS enzime rezultiraju prestankom rasta i smrću tretirane biljke. Kukuruz, kao i druge otporne biljke, efikasno razgrađuje nikosulfuron u bezopasne produkte putem metabolizma. S obzirom da ljudi i životinje ne posjeduju ALS enzim i ne mogu sintetizirati navedene aminokiseline, toksičnost nikosulfurona za ljude i životinje je niska. Za sve herbicide iz grupe sulfonilurea je specifično da su skloni ispiranju, no izrazito djelotvorni u vrlo niskim dozama i imaju kratko vrijeme poluraspada što ih čini ekološki prihvatljivijim od drugih herbicida. S druge strane sve je češća pojava rezistentnosti na pripravke koji sadrže sulfoniluree te je potrebno izbjegavati korištenje ako se u blizini nalaze površinske vode (Lipovski, 2022).

Prema provedenim studijama na štakorima, miševima i psima nikosulfuron se pokazao nisko toksičan te je primijećena blaga hepatotoksičnost pri visokim dozama na štakorima. U *in*

vivo i *in vitro* ispitivanjima na štakorima nije primijećena genotoksičnost niti se pokazao kao spoj koji ima kancerogeno djelovanje. Prihvatljivi dnevni unos (ADI) za nikosulfuron iznosi 2mg/kg tjelesne mase po danu. Na temelju navedenog zaključeno je da nema većih zabrinutosti i rizika te je korištenje nikosulfurona dozvoljeno u EU (EFSA, 2007).



Slika 2. Kemijska struktura nikosulfurona (NCBI, 2024)

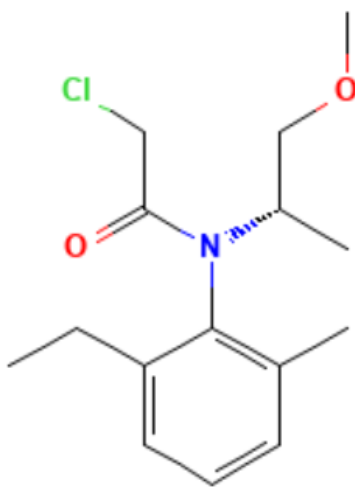
2.3.3. S-metolaklor

S-metolaklor, S-enantiomer 2-kloro-N-(2-etil-6metilfenil)-N-[(1S)-2-metoksi-1-metiletil]acetamida, je kloracetamidni herbicid koji se koristi za suzbijanje jednogodišnjih travnih i nekih širokolisnih korova u usjevima kukuruza, soje, suncokreta, duhana i šećerne repe. Često se koriste u kombinaciji s drugim herbicidima (terbutilazin, mezotrion) kako bi se proširio spektar djelovanja prema širokolisnim korovima. Kod osjetljivih biljaka inhibira pravilnu funkciju mikrotubulina što dovodi do neispravnog odvajanja sestrinskih kromatida kromosoma tijekom mitoze čime je spriječena pravilna dioba stanica te dolazi do zastoja rasta biljke. Također utječu na sintezu masnih kiselina, lipida, proteina i staničnu membranu čime sprječavaju klijanje biljke. Iz tog razloga je bitno da se ovi herbicidi primjene prije nicanja, tj. odmah nakon sjetve. Biljka herbicide iz grupe kloracetamida unosi preko hipokotila i korjena za što je potrebna voda kako bi se aktivirali i upili (Lipovski, 2022).

Metolaklor je spoj koji je u primjeni kao herbicid već više od 40 godina. Sastoji se od S- i R-

izomera (50:50) pri čemu S-izomer pokazuje značajno veću herbicidnu aktivnost zbog specifične prostorne konfiguracije svojih molekula koja omogućuje bolju interakciju s biljnim enzimima. Iz tog razloga, 1997. na tržištu se pojavljuje S-metolaklor, fizička i kemijska ekvivalenta metalokloru koja je obogaćena S-izomerom (88 %). Na taj način uz manju količinu korištenog proizvoda (preporučena doza za S-metolaklor je 35 % manja nego za metolaklor) postigla se jednako efikasna kontrola korova čime je smanjen rizik za potrošače i okoliš (Shaner i sur., 2006). Strukturna formula S-metolaklora prikazana je na slici 3.

U veljači 2024. godine Ministarstvo poljoprivrede informiralo je javnost da je provedbenom Uredbom Komisije (EU) potrebno oduzeti registraciju za stavljanje na tržište sredstvima za zaštitu bilja na osnovi aktivne tvari S-metolaklor. Time se s tržišta Republike Hrvatske povlači deset sredstava za zaštitu bilja. Razlog je taj što količina S-metolaklora i njegovih aktivnih metabolita (ESA, OXA), za koje postoji sumnja da su genotoksični i kancerogeni, prelazi graničnu vrijednost u podzemnim vodama. Također je zaključeno da postoji visok rizik za sekundarno trovanje sisavaca koji se hrane crvima. Prema EFSA-i provedena su mnoga *in vivo* i *in vitro* ispitivanja genotoksičnosti S-metolaklora te na temelju dostupnih rezultata i analize dokaza zaključeno je da S-metolaklor vjerojatno nije genotoksičan za ljude.



Slika 3. Kemijska struktura S-metolaklora (NCBI, 2024)

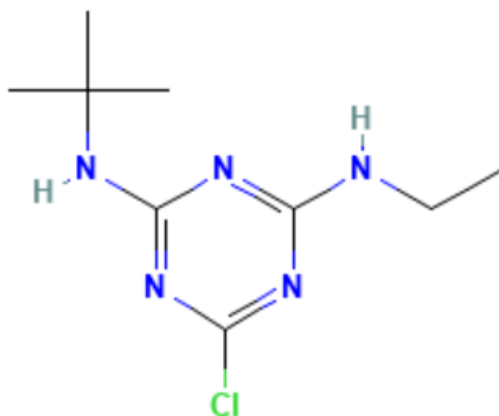
2.3.4. Terbutilazin

Terbutilazin (2-tert-butilamino-4-klor-6-etilamino-1,3,5-triazin) je selektivni herbicid koji pripada skupini klorotriazina a njegova strukturna formula je prikazana na slici 4. Koristi se u suzbijanju trava i jednogodišnjih širokolisnih korova u različitim poljoprivrdnim usjevima kao što su kukuruz, žitarice, mahunarke, loza i voćke prije ili neposredno nakon njihovog nicanja.

Kao i drugi herbicidi iz skupine triazina kod osjetljivih biljaka izaziva inhibiciju fotosinteze blokirajući fotosustav II. Biljke terbutilazin apsorbiraju preko korjena. On se zatim ksilemom transportira do zelenih dijelova biljke i ulazi u kloroplaste gdje sprječava proces prijenosa elektrona sa plastokinona Q_A na plastokinon Q_B što dovodi do prekida fiksacije CO_2 i produkcije ATP i $NADPH_2$. Posljedično dolazi do kloroze i nekroze te smrti biljke (Lipovski, 2022).

Najpoznatiji predstavnik skupine triazina je herbicid atrazin koji je Europska komisija 2004. godine zabranila zbog negativnog utjecaja na okoliš i na zdravlje ljudi. Atrazin se lako ispire iz tla u podzemne vode a njegova stabilnost i dugotrajna prisutnost u okolišu je dovela do toga da su pronađene koncentracije u vodama veće od dopuštenih što predstavlja rizik za ljudsko zdravlje. Također, neka istraživanja sugeriraju da ometa endokrini sustav kod životinja i ljudi. Iz navedenih razloga i s obzirom da je manje isparljiv, terbutilazin se od 2004. u Europi koristi kao zamjena za atrazin. No novije studije ukazuju na to da i on ima negativan utjecaj na podzemne vode, da se u njima nakuplja i nalazi u koncentracijama višim od dopuštenih, te da je potencijalno toksičan za ne ciljane organizme kao što su gliste, vodeni organizmi te neke vrste ptica i sisavaca (Bottcher i sur., 2022).

Prema Europskoj agenciji za sigurnost hrane i dvije provedene studije na psima i štakorima prihvatljivi dnevni unos za terbutilazin iznosi 0,004 mg/kg tjelesne mase po danu, a dnevni unos koji premašuje 7,6 mg/kg značajno povećava vjerojatnost za razvoj adenokarcinoma. Prema mnogim studijama negativno utječu na ekspresiju gena, inhibiraju rast te smanjuju preživljenje vodenih organizama i glista no i dalje nedostaje informacija o bioakumulaciji, sustavima antioksidacijske obrane, aktivnosti enzima za detoksifikaciju i oštećenju DNA uzrokovanu terbutilazinom.



Slika 4. Kemijska struktura terbutilazina (NCBI, 2024)

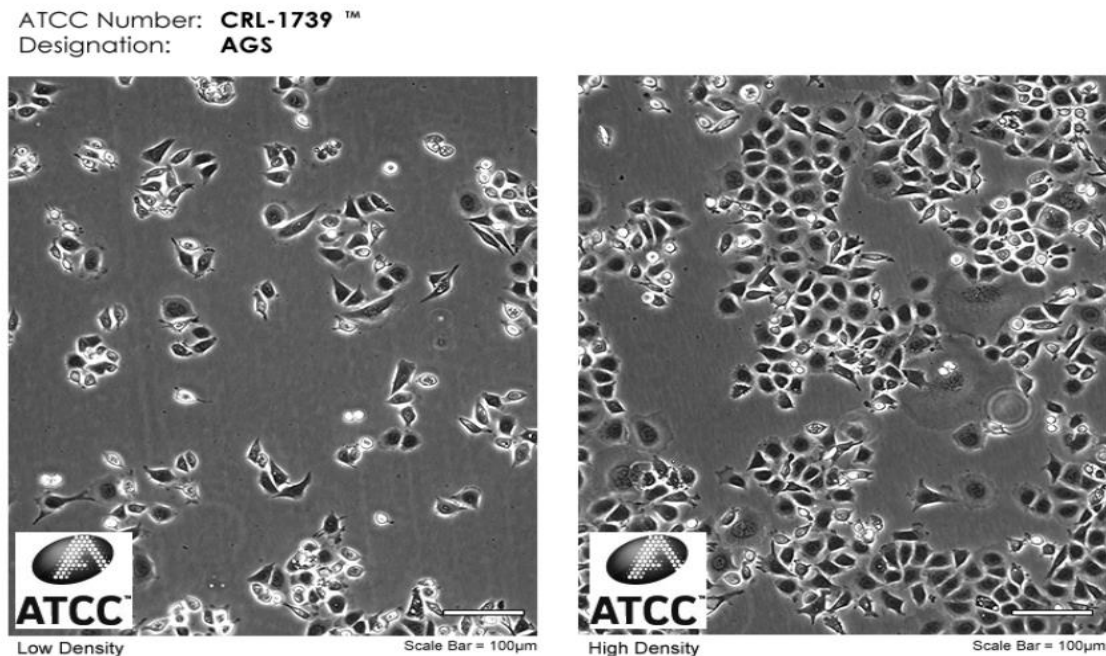
3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Biološki testni sustav

U provođenju eksperimentalnog djela rada korištene su dvije kontinuirane humane stanične linije: stanice adenokarcinoma epitela želuca, AGS, i stanice hepatocelularnog karcinoma jetre, Hep G2. Morfološki to su epitelne, a prema načinu uzgoja adherentne stanice. Obje stanične linije uzgajane su u monosloju u T-bocama.

AGS (eng. *Human gastric adenocarcinoma cell line*) je stanična linija izolirana 1979. iz tkiva želuca 54-godišnje žene bijele rase oboljele od adenokarcinoma epitela želuca. To je hiperploidna humana stanična linija (modalni broj kromosoma u 60 % stanica je 49) s tumorogenim karakteristikama, prikazana na slici 5. Stanice je potrebno čuvati u tekućem dušiku pri temperaturama nižim od -130 °C do trenutka upotrebe. Odgovarajuća temperatura uzgoja je 37 °C, a vrijeme udvostručenja populacije 2 do 3 dana (ATCC, 2024a).

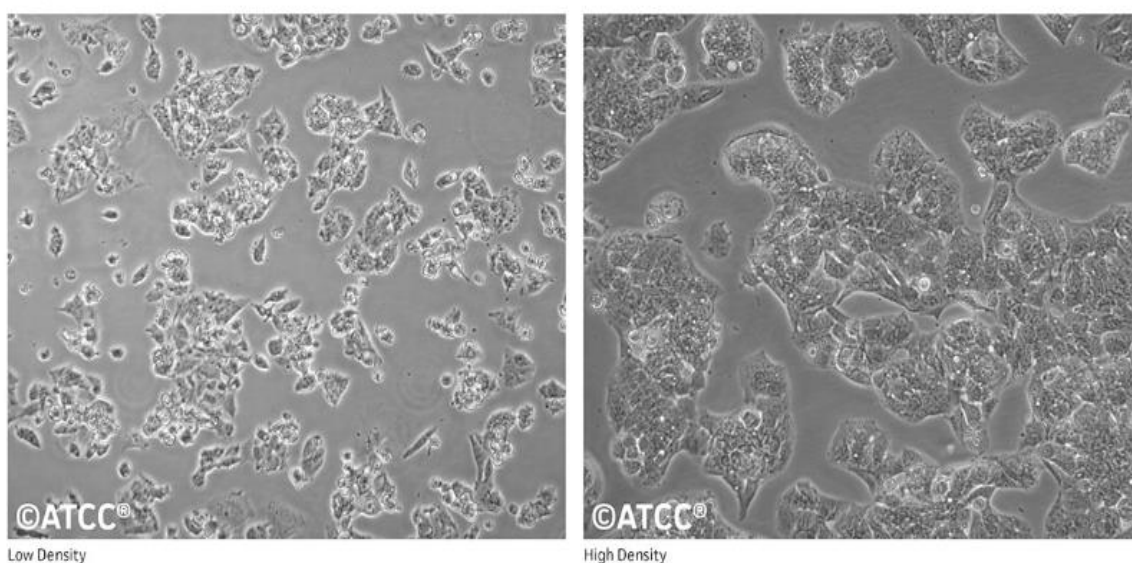


Slika 5. Mikroskopski prikaz stanične linije AGS (ATCC, 2024a)

Hep G2 je besmrtna stanična linija izolirana iz hepatocelularnog karcinoma petnaestogodišnjeg dječaka bijele rase prikazana na slici 6. Broj kromosoma u stanici varira između 50 i 60, a uglavnom je 55. Hep G2 stanice luče proteine plazme poput albumina, fibrinogena, transferina, itd. što je svojstvo zdravih hepatocita te se stoga često koriste kao *in vitro* model hepatocita, naročito u ispitivanjima toksičnosti spojeva. Jetra je ključni organ za metabolizam i detoksifikaciju pa se ova stanična linija često koristi za proučavanje metabolizma brojnih tvari kao što su lijekovi i toksini. Stanična linija Hep G2 se također čuva u tekućem dušiku pri temperaturama nižim od -130 °C (ATCC, 2024b).

ATCC Number: HB-8065

Designation: Hep G2



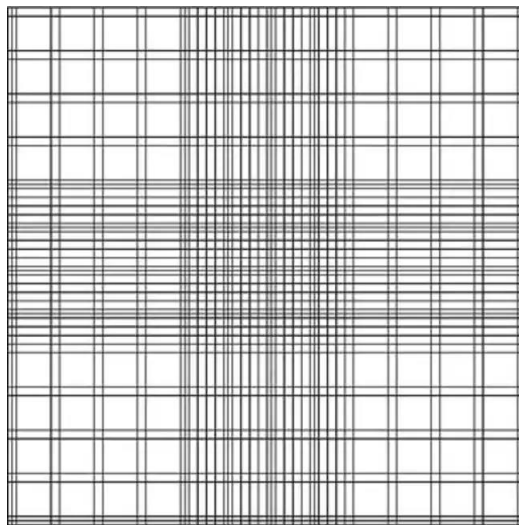
Slika 6. Mikroskopski prikaz stanične linije Hep G2 (ATCC, 2024b)

Prilikom provođenja eksperimentalnog djela ovog rada odabrane su ove linije s obzirom da predstavljaju tkiva s kojima su herbicidi i pesticidi najčešće u kontaktu nakon unosa kontaminirane vode i hrane u organizam. S obzirom da pesticidi mogu u tijelo dospjeti unosom hrane i vode, AGS stanice, koje predstavljaju gastrični epitel, omogućuju *in vitro* praćenje učinka toksina na probavni sustav, uključujući oštećenje DNA, oksidacijski stres i citotoksičnost. Stanična linija Hep G2 kao predstavnik stanica jetre koje su metabolički aktivne omogućuje uvid u to kako jetra reagira i metabolizira štetne tvari.

Uzgoj staničnih linija se provodi u T-bocama koje se inkubiraju na 37 °C u atmosferi s 5 % CO₂ i relativnom vlažnosti od 95 %. Za uzgoj stanica korišten je hranjivi medij Ham's F12 uz dodatak 10 % fetalnog goveđeg seruma (eng. *Fetal Bovine Serum*, FBS). Nakon formacije monosloja uklanja se medij te se višak seruma ispire 0,25 %-tnom otopinom tripsina u

fosfatnom puferu te se provodi postupak tripsinizacije u kojem se stanice „odljepljuju“ od podloge tijekom 10 minuta. Odvojene stanice, koje su okruglog oblika, se zatim ponovo ispiru medijem i serumom kako bi se zaustavilo djelovanje tripsina i spriječila razgradnja staničnih komponenti. Kao rezultat dobivamo staničnu suspenziju s kojom je jednostavno raditi (Freshney, 2010).

Kako bi se odredio broj stanica u 1 mL suspenzije stanice se broje pomoću Bürker-Türkove komorice koja je prikazana na slici 7 i invernog mikroskopa. Bürker-Türkova komorica se sastoji od četiri velika kvadrata a svaki od njih od šesnaest manjih. Volumen velikog kvadrata iznosi 10^{-4} mL, a konačni broj stanica u mL suspenzije dobiva se dijeljenjem srednje vrijednosti izbrojenih stanica u svakom velikom kvadratu s volumenom velikog kvadrata. Zatim se određuje volumen suspenzije koji je potreban za dobivanje radne suspenzije željene koncentracije stanica za daljnju provedbu eksperimenata. Ovisno o metodi koja se koristi stanice se nasađuju na prozirne ili crne ploče s 96 jažica (eng. *96 well plate*) ili u Petrijeve zdjelice te se stavljaju na inkubaciju 24 sata u ranije navedenim uvjetima.



Slika 7. Bürker-Türkova komorica za brojanje stanica (preuzeto s

<https://www.fishersci.se/shop/products/buerker-tuerk-counting-chambers-2/10297390>)

3.1.2. Istraživani spojevi

U istraživanju su testirana četiri pesticida, svaki u četiri različite koncentracije. Ishodišne otopine pesticida su pripravljene na način da se izvagana masa pesticida (prah ili tekućina) otopila u određenom volumenu otapala DMSO u Eppendorf epruветama. DMSO ili dimetil sulfoksid je netoksično, nehlapivo organsko otapalo. Pripremljene ishodišne otopine se skladište pri -20 °C te se po potrebi uzimaju alikvoti za pripremu radnih otopina. Koncentracije pesticida korištene prilikom izrade eksperimentalnog djela rada određene su u odnosu na ADI (prihvatljivi dnevni unos) vrijednosti pojedinih pesticida baš iz razloga što ljudi i životinje mogu relativno jednostavno biti izloženi tim koncentracijama. U tablici 1 su prikazane korištene koncentracije svakog pesticida u mg/mL.

Tablica 1. Korištene koncentracije pesticida (mg/mL)

	0,2· ADI	*ADI	5· ADI	10· ADI
Acetamiprid	$5 \cdot 10^{-6}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$	$1,25 \cdot 10^{-4}$	$2,5 \cdot 10^{-4}$
Nikosulfuron	$4 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-3}$	0,01	0,02
S-metolaklor	$2 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-3}$
Terbutilazin	$8 \cdot 10^{-7}$	$4 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^{-5}$

* prihvatljivi dnevni unos (eng. *Acceptable Daily Intake*)

3.1.3. Kemikalije

- 2,7-diklorodihidrofluorescein diacetat (DCFH-DA), Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka
- Acetamidrid, Hebei Yetian Agrochemicals Co., Ltd., Kina
- Agaroz niske točke tališta (LMP), Invitrogen, Engleska
- Agaroz normalne točke tališta (NMP), Lonza, Rockland, SAD
- Bromtimol plavo, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Demineralizirana voda
- Dimetil sulfoksid (DMSO), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- DNA plazmid ϕ X174 RF1, Thermo Scientific, SAD
- Etanol (C_2H_5OH), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Etidij bromid ($C_{21}H_{20}BrN_3$), Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka
- Etil acetat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Fetalni goveđi serum, Capricorn Scientific GmbH, Njemačka
- Giemsa boja, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- 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
- 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 ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$), 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
- Terbutilazin, Shandong Binnong Technology Co., Ltd., Kina
- Tripsin, Capricorn Scientific, Njemačka
- Tris, Invitrogen, SAD
- Triton X-100, Acros Organics, SAD
- Vodikov peroksid (H_2O_2), Kemika, Zagreb, Hrvatska

3.1.4. Otopine

Fosfatni pufer (PBS) (pH = 7,2 - 7,4)	
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	1,16 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
destilirana voda	do 1000 mL

TE (Tris-EDTA) pufer (10 ⁻⁴), pH = 8,0	
Na ₂ EDTA	2,92 g
Tris baza	15,75 g
destilirana voda	do 1000 mL

TAE (Tris baza, octena kiselina i EDTA) pufer (10 ⁻⁴), pH = 8,3	
Na ₂ EDTA	3,7 g
Tris baza	48,4 g
ledena octena kiselina	11,4 mL
destilirana voda	do 1000 mL

Pufer za lizu stanica (pH = 7,5)	
2,5 M NaCl	130 g
100 mM EDTA	29,225 g
10 mM Tris	1,078 g
1 % natrij-laurilsarkozinat	8,9 mL
destilirana 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
destilirana voda	do 1000 mL

Pufer za nautralizaciju (pH = 7,5)	
Tris	48,5 g
HCl	do pH = 7,5
destilirana voda	do 1000 mL

Boja za nanošenje uzoraka na gel (eng. <i>loading buffer</i>)	
Bromtimol plavo	0,2 g
50 % glicerol	6 mL
destilirana voda	4 mL

Ostale otopine:

- **10 M otopina NaOH** – 40 g NaOH, destilirana voda (do 100 mL)
- **200 mM otopina EDTA** – 5,1 g EDTA, destilirana voda (do 100 mL)
- **Etidijev bromid (10 mg/mL)** – 1 mL koncentrirane otopine etidijevog bromida (200 mg/mL) i 19 mL destilirane vode
- **Otopina *Neutral Red* (0,05 mg/mL)** – 1 mL koncentrirane otopine *Neutral Red* (5 mg/mL u 96 %-tnom etanolu), 99 mL kompletiranog medija za uzgoj staničnih linija
- **Otopina za odbojavanje (test *Neutral red*)** – 96 %-tni etanol : destilirana voda : octena kiselina = 50 : 49 : 1
- **Otopina Giemsa i Kristal Violet boje** – 1,25 mL Giemsa boje; 0,125 g Kristal Violet; destilirana voda (do 100 mL)
- **Otopina DCFH-DA (0,05 mM)** – 2,5 mL koncentrirane otopine DCFH-DA (2 mM u DMSO-u) i 97,5 mL PBS-a
- **Otopina LMP agaroze (0,5 %)** – 50 mg LMP agaroze, 10 mL destilirane vode
- **Otopina NMP agaroze (1,5 %)** – 150 mg NMP agaroze, 10 mL PBS-a
- **Agarozni gel (1 %)** – 1 g agaroze i 100 mL TAE pufera (1·)

3.1.5. Laboratorijska oprema

3.1.5.1. Popis uređaja

- Analitička vaga 1712 Mp8, Silver Edition, Sartorius, Engleska
- Centrifuga za epruvete po Eppendorfu, HC-240, Tehnica-Železniki, Slovenija
- Čitač mikrotitarskih pločica, Cecil Instruments Ltd, Cambridge, Engleska
- Digestor
- Epifluorescencijski mikroskop, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Njemačka
- Fluorimetar, Cecil Instruments Ltd, Cambridge, Engleska
- Germicidna UV lampa, 30 W, Philips, Nizozemska
- 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

- 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, Tehnica-Železniki, Slovenija
- Zamrzivač: Ultralow temperature freezer, New Brunswick Scientific, SAD

3.1.5.2. *Popis pribora*

- 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
- Marker za pisanje
- Menzura
- Metalna špatula
- Mikropipete, Eppendorf, Hamburg, Njemačka
- Mikrotitarske ploče s 24 i 96 jažica, Falcon, SAD
- Nastavci za mikropipete
- 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
- Sterilni filteri

- Špatula
- Štapić za struganje stanica
- T-boce, Falcon, BD Company, Franklin Lakes, SAD
- Višekanalska automatska pipeta

3.2. METODE

3.2.1. Određivanje citotoksičnog učinka metodom Neutral Red

Za utvrđivanje citotoksičnog učinka pesticida na humane stanične linije u *in vitro* uvjetima korištena je metoda Neutral Red. To je često korištena metoda za određivanje citotoksičnosti, a omogućuje kvantitativnu procjenu broja živih stanica u kulturi. Neutral red je kationska 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorid boja koja difuzijom prolazi kroz neoštećenu staničnu membranu te se veže na lizosomski matriks stanica. Fiziološki pH omogućava boji da prodre neionskom difuzijom kroz staničnu membranu, a kad se boja nađe u citoplazmi pH gradijent omogućava prodor do lizosoma gdje je pH vrijednost niža u odnosu na citoplazmu te dolazi do nakupljanja boje. Nakon bojanja, stanice se ispiru te se koristi otopina za odbojavanje u kojoj se otapa samo boja koju su apsorbirale vijabilne stanice jer mrtve ili oštećene stanice ne mogu zadržati boju (zato je intenzitet obojenja linearno proporcionalan s koncentracijom vijabilnih stanica). Kvantifikacija vijabilnih stanica (količina ekstrahirane boje) se vrši spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 540 nm (Repetto i sur., 2018).

Za određivanje citotoksičnog djelovanja ispitivanih uzoraka potrebno je nasaditi stanice u prozirne mikrotitarske pločice s 96 jažica na način da se u svaku jažicu nacjepi po 100 μ L suspenzije AGS ili Hep G2 stanica koncentracije 10^5 stanica/mL. Stanice se inkubiraju pri temperaturi od 37 °C u atmosferi s 5 % CO₂ relativne vlažnosti 95 %. Nakon 24 sata uklanjanja se hranjivi medij te se stanice tretiraju s određenim, prethodno pripremljenim koncentracijama pesticida. Koncentracije su prikazane u tablici 1, a pripremljene su iz ishodišnih (*stock*) otopina acetamiprida, nikosulfurona, S-metolaklora i terbutilazina u hranjivom mediju Ham's F12. Negativna kontrola sadržavala je samo hranjivi medij, bez pesticida. Tretman traje 24 sata nakon čega se uklanja medij s tretmanom, stanice se ispiru PBS-om te se na njih stavlja 100 μ L radne otopine boje Neutral Red (0,05 mg/mL). Kako bi došlo do vezanja boje unutar lizozoma, stanice se inkubiraju 1h, zatim se uklanja višak boje ispiranjem s PBS-om. Dodatkom otopine za odbojavanje (100 μ L u svaku jažicu) otapa se samo boja koju su vijabilne stanice apsorbirale, spektrofotometrijski se mjeri intenzitet odbojenja pri 540 nm, a pomoću dobivene apsorbancije računa se postotak preživljenja stanica u odnosu na negativnu kontrolu te se

izražava kao omjer apsorbancije tretiranih stanica i apsorbancije kontrole, na način kako je prikazano u formuli [1]:

$$\text{preživljenje (\%)} = 100 \cdot \frac{A_{540}(\text{tretirani uzorak})}{A_{540}(\text{kontrola})} \quad [1]$$

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

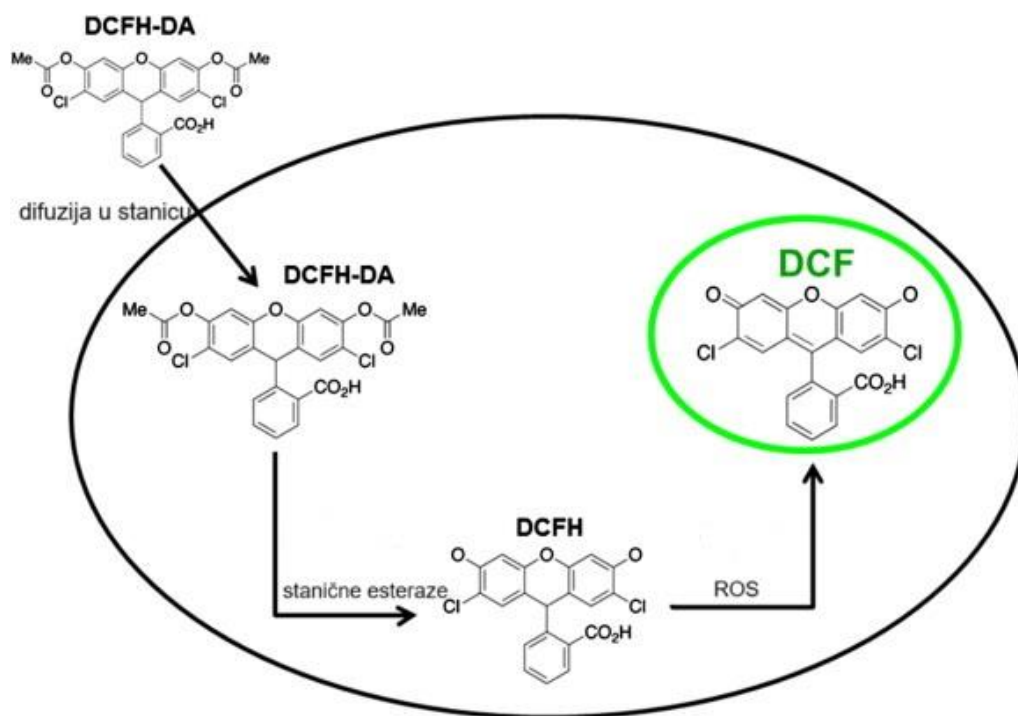
Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti postotaka preživljenja s pripadajućim standardnim devijacijama, a statistička obrada podataka je opisana u poglavlju 3.2.4.

3.2.2. Određivanje prooksidacijskog učinka

3.2.2.1. Određivanje prooksidacijskog učinka metodom DCFH-DA

Za određivanje nastalih reaktivnih kisikovih spojeva (eng. *Reactive Oxygen Species*, ROS) unutar stanice korištena je metoda DCFH-DA. ROS su djelomično reducirani, nestabilni kisikovi spojevi koji mogu biti slobodni radikali (sadrže jedan ili više nespareni elektron) ili molekule. Izvori ROS-ova su većinski endogeni, ali mogu biti i egzogeni. Većina ROS-ova u stanici nastaje kao prirodni nusprodukt aerobnog staničnog metabolizma. Tijekom staničnog disanja, elektron se ispušta iz lanca prijenosa elektrona i veže se za kisik, čime nastaje superoksidni radikal. Vanjski (egzogeni) izvori ROS-ova su ozon, dim cigareta, ionizirajuće zračenje, lijekovi, ioni teških metala, toksini te pesticidi. Reaktivni spojevi kisika se uslijed normalnih metaboličkih procesa (i različitih toksičkih procesa) mogu nakupljati unutar stanice te zbog svoje reaktivnosti uzrokovati oštećenja bioloških makromolekula poput ugljikohidrata, lipida, proteina i nukleinskih kiselina (oksidacijski stres). Smatra se da je oksidacijski stres jedan od uzročnika procesa starenja, upala, kancerogeneze, te brojnih drugih oboljenja (dijabetes, neurodegenerativne bolesti, itd.) (Režan, 2024).

DCFH-DA ili 2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetat je nefluorescentna, lipofilna boja koja u stanicu ulazi difuzijom te u citoplazmi posredovanjem staničnih estera dolazi do hidrolize acetatnih skupina boje. Dolazi do oslobađanja polarnog, nefluorescentnog aniona DCFH (2',7'-diklorodihidrofluorescein) koji ostaje u stanici i reagira s postojećim ROS-ovima. Vezanjem DCFH-a za ROS-ove dolazi do nastajanja DCF (2',7'-diklorofluorescein) fluorescentne molekule te se pomoću fluorimetra može mjeriti fluorescencija pri 485 nm za eksitaciju i pri 530 nm za emisiju. Oksidacija DCFH-DA i formiranje fluorescentnog DCF spoja prikazano je na slici 8. Intenzitet fluorescencije proporcionalno se povećava s koncentracijom ukupnih formiranih ROS-ova u stanici (Katerji i sur., 2019).



Slika 8. Difuzija u stanicu i deacetilacija uz pomoć staničnih esteraza DCFH-DA spoja, te formiranje DCF fluorescentnog spoja oksidacijom nefluorescentnog DCFH spoja posredovanjem reaktivnih kisikovih čestica (ROS) (*prema* Grisham, 2013)

Za provedbu testa potrebno je nasaditi stanice u crne mikrotitrarske pločice s 96 jažica na način da se u svaku jažicu nacjepi po 100 μL suspenzije AGS ili Hep G2 stanica koncentracije 10^5 stanica/mL. Stanice se inkubiraju pri temperaturi od 37°C u atmosferi s 5 % CO_2 relativne vlažnosti 95 %. Nakon 24 sata uklanja se hranjivi medij te se stanice tretiraju s prethodno pripremljenim koncentracijama pesticida (tablica 1). Stanice se nakon 24 sata ispiru PBS-om te se na njih dodaje 100 μL radne otopine DCFH-DA, slijedi inkubacija u trajanju od pola sata. Nastali DCF omogućuje mjerenje intenziteta fluorescencije koji je proporcionalan količini ROS-ova u stanici. Intenzitet fluorescencije mjeri se pri valnoj duljini eksitacije od 485 nm i emisije 530 nm. Za mjerenje prooksidacijske aktivnosti potrebno je u omjer staviti intenzitet fluorescencije tretiranih stanica i kontrole. Kako bi se dobila realna procjena prooksidacijskog djelovanja, u račun je potrebno uključiti i postotak preživljenja stanica. Prikazana je formula [2] pomoću koje se računa postotak indukcije ROS-ova.

$$\% \text{ indukcije ROS} = \frac{\frac{\text{fluorescencija (tretirani uzorak)}}{\% \text{ preživljenja (tretirani uzorak)}}}{\frac{\text{fluorescencija (kontrola)}}{\% \text{ preživljenja (kontrola)}}} \cdot 100 \quad [2]$$

3.2.2.2. Određivanje prooksidacijskog učinka na modelnom plazmidu ϕ X174 RF1

Metoda se temelji na namjerno izazvanom oštećenju kružne DNA (plazmida) kombinacijom UV zračenja i vodikovog peroksida (H_2O_2) u uzorcima sa i bez dodatka ispitivanih pesticida. Eksperiment je proveden na modelu ϕ X174 RF1 plazmida DNA. ϕ X174 RF1 je dvolančana, kružna, superzavijena DNA molekula izolirana iz bakterije *Escherichia coli* koju je prethodno inficirao bakteriofag ϕ X174. Molekulska masa plazmida je $3,5 \cdot 10^6$ Da, a dugačak je 5386 parova baza. Kada se plazmid izloži kombinaciji vodikovog peroksida i UV zračenja dolazi do nastajanja hidroksilnih radikala koji uzrokuju nastajanje jednolančanog loma te dolazi do relaksacije DNA i prelaska iz superzavijene u relaksiranu, cirkularnu (RF2) formu plazmida. Daljnjim oštećenjem može doći do nastajanja dvolančanog loma unutar molekule DNA te do linearizacije plazmida (RF 3). Sva tri oblika moguće je vizualizirati provedbom elektroforeze u agaroznom gelu pri čemu će superzavijena forma (RF 1) putovati najbrže, zatim molekule plazmidne DNA u cirkularnoj formi (RF 2), a najsporije će kroz gel migrirati linearizirani plazmidi (RF 3).

Eksperiment započinje pripremom reakcijske smjese ukupnog volumena 20 μL , a sastoji se od ϕ X174 RF1 plazmida DNA čija koncentracija iznosi 0,01 mg/mL, TE (Tris-EDTA) pufera, H_2O_2 (0,03 M) i prethodno pripremljenih koncentracija pesticida prikazanih u tablici 1. S obzirom da se prooksidacijski učinak određuje za četiri različita pesticida u tri različite koncentracije (acetamiprid, nikosulfuron, S-metolaklor, terbutilazin; 0,2· ADI, 1· ADI, 10· ADI) te uz i bez dodatka 6 %-tnog H_2O_2 za svaki je pesticid pripremljeno po šest uzoraka. Također su pripremljene dvije negativne kontrole koje nisu bile izložene zračenju (jedna sadrži samo plazmid i TE pufer, a druga plazmid, pufer i vodikov peroksid), i jedna pozitivna kontrola (plazmid, pufer, vodikov peroksid). Svi uzorci (osim negativne kontrole) su izloženi UV zračenju na udaljenosti od 50 cm. Vrijeme izlaganja UV zračenju određeno je prethodnom optimizacijom metode koja je opisana u poglavlju 4.2.2.. Nakon tretmana zračenjem uzorci se inkubiraju 30 minuta.

Priprema gela za provođenje elektroforeze započinje otapanjem (zagrijavanjem u mikrovalnoj pećnici uz povremeno miješanje) 1 %-tne otopine agaroze u TAE puferu te njezinim hlađenjem (na približno 65 °C) i izljevanjem u kalup. U kalup se stavlja češljic za formiranje jažica te se otopina ostavi kako bi se gel polimerizirao. Nakon formacije čvrstog gela, uklanjamo češljic, a kalup prebacimo u kadicu za elektroforezu. Kadiku punimo 1· TAE puferom kako bismo u potpunosti prekrili gel.

Nakon inkubacije u uzorke se dodaje 1 μL pufera za nanošenje uzoraka na gel (eng. *loading buffer*) te se uzorci nanose u jažice pripremljenog agaroznog gela. Pufer za nanošenje uzorka na gel sadrži boju bromitmol plavo koja omogućuje vizualizaciju migracije uzorka kroz gel i

glicerol koji povećava gustoću uzorka i onemogućava uzorku da ispliva iz jažice. Kao standard korišten je je *1 kb Plus DNA Ladder for Safe Stains* (BioLabs). Gel elektroforeza uzoraka provedena je pri naponu od 60 V tijekom 2 sata. Po završetku elektroforeze, gel je stavljen u otopinu etidij bromida na 1 sat kako bi se omogućila vizualizacija i daljnja analiza. Etidij bromid se veže za DNA i fluorescira pod UV svjetlom. Rezultati su dobiveni u obliku slike gela te su obrađeni u programu GelAnalyzer 23.1.1. Izraženi su kao omjer površine vrpce superzavijene i relaksirane forme plazmida te su statistički obrađeni u odnosu na kontrolu. Postotak oštećenja superzavijene strukture plazmida je određen prema formuli [3]:

$$\% \text{ oštećenja SCP} = \frac{\frac{\text{intenzitet vrpce SCP}(\text{tretirani uzorak})}{\text{intenzitet vrpce RCP}(\text{tretirani uzorak})}}{\frac{\text{intenzitet vrpce SCP}(\text{kontrola})}{\text{intenzitet vrpce RCP}(\text{kontrola})}} \cdot 100 \quad [3]$$

pri čemu SCP označava superzavijenu, a RCP relaksiranu formu plazmida.

3.2.3. Određivanje genotoksičnog učinka komet testom

Genotoksičnost opisuje štetan utjecaj ispitivane kemikalije na cjelokupni genetički materijal stanice. Dokazano genotoksične tvari su one koje mogu izazvati oštećenje DNA ili kromosoma, a time potiču mutagenezu i kancerogenu. Nisu sve genotoksične tvari mutagene, ali su svi mutageni genotoksični. Komet test je *in vitro* elektroforetska metoda koja omogućuje mjerenje lomova lanaca DNA (tj. oštećenja) u svakoj pojedinačnoj stanici (Jarak, 2011). To je relativno jednostavna, jeftina te osjetljiva metoda zbog čega se često koristi, a korištena je i u ovom radu pri određivanju genotoksičnosti pesticida.

Metoda se provodi tako da se stanice koje su uronjene u agarozu niske točke tališta (LMP agaroz, eng. *low melting point agarose*) na predmetnom stakalcu liziraju pomoću etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA) i detergenta. Ovaj korak omogućuje uklanjanje proteina, histona i membrane stanice. Sada, na mjestu gdje su bile stanice vezane unutar mreže polimera, zaostaje samo goli nukleoid. Prisutnost lomova (jednolančanih i dvolančanih) u DNA, uzrokovana genotoksičnom tvari, dovodi do relaksacije superzavijene forme DNA u nukleoidu te fragmentacije. Zatim se provodi horizontalna elektroforeza u agaroznom gelu. Predmetna stakalca na koja su u agarozu uklopljeni uzorci tretiranih i liziranih stanica se izlažu djelovanju istosmjerne struje. Kada se propusti električni naboj kroz gel relaksirani i fragmentirani dijelovi DNA koji su negativno nabijeni putuju prema pozitivno nabijenoj elektrodi i tako formiraju „rep“

kometa dok ostatak netaknute DNA formira „glavu“ kometa. Nakon provedene elektroforeze, DNA se oboji etidij-bromidom, a kometi tj. oštećenja se pregledavaju i mjere pod fluorescentnim mikroskopom. Danas se za mjerenje kometa i procjenu oštećenja koriste sustavi za analizu slike, u kojima je epifluorescencijski mikroskop povezan s računalom te uz pomoću specijaliziranih računalnih programa moguće je istovremeno izmjeriti više parametara za svaki pojedinačni komet. Količina DNA u repu direktno odgovara količini lomova lanaca (Jarak, 2011).

Postupak započinje naciepljivanjem 5 mL AGS ili Hep G2 stanične suspenzije početne koncentracije 10^5 stanica/mL u Petrijeve zdjelice. Stanice se zatim inkubiraju 24 sata pri temperaturi od 37 °C u atmosferi s 5 % CO₂ i 95 % relativne vlažnosti. Nakon inkubacije, uklanja se hranjivi medij, a stanice se podvrgavaju tretmanu s tvarima čiju genotoksičnost ispituje. Nakon tretmana s četiri različita pesticida u četiri različite koncentracije (prikazano u tablici 1), stanice se ispiru PBS-om te se s dna Petrijeve zdjelice ostružu pomoću strugača i prebacuju u mikroeprovete. Mikroeprovete se zatim stavljaju u centrifugu te se stanice centrifugiraju tijekom 5 minuta na 5000 rpm. Na brušena predmetna stakalca se nanosi 300 µL 1,5 %-tne agaroze normalne točke tališta (NMP, eng. *Normal Melting Point agarose*). Nakon polimerizacije 1. sloja, talog stanica zadobiven centrifugiranjem se resuspendira u 100 µL 0,5 %-tne LMP agaroze te se nanosi kao 2. sloj na brušena stakalca. Nakon polimerizacije 2. sloja, nanosi se i 3. sloj tj. 100 µL LMP agaroze te se stakalca ostavljaju kako bi se i posljednji sloj polimerizirao. Stakalca se zatim uranjaju u pufer za lizu pri 4 °C na sat vremena. Nakon lize stanica, stakalca se uranjaju u kadicu za elektroforezu prethodno napunjenu puferom za alkalnu elektroforezu. Elektroforeza se provodi pri jakosti struje od 300 mA i naponu od 25 V, 20 minuta. Stakalca se ispiru tri puta (uz razmak između ispiranja od 5 minuta) puferom za neutralizaciju (Tris-HCl, pH=7,5). nakon toga se mogu dehidrirati primjenom 70 %-tnog i 96 %-tnog etanola i osušiti na zraku te pohraniti na sobnoj temperaturi prije analize. Analiza se može provesti i odmah, pri čemu se pripremljeni preparati oboje 10 minuta otopinom etidij bromida. Uzorci se ponovno ispiru puferom za neutralizaciju te se ostavljaju kroz 15 minuta kako bi se etidij bromid stabilizirao. Mjerenje se provodi uz pomoć epifluorescencijskog mikroskopa s ekscitacijskim filterom podešenim na 515-560 nm. Dobivene slike su analizirane upotrebom programa Comet Assay II. U radu su analizirani parametri dužine i intenziteta repa, te repni moment kao pokazatelji razine oštećenja DNA. Dužina repa kometa definira se kao najveća udaljenost na koju su otputovali najkraće oslobođene petlje i fragmenti DNA, intenzitet repa kometa označava postotak DNA koja je migrirala u rep, a izražava se u odnosu na ukupnu količinu DNA u kometu. Repni moment kometa predstavlja umnožak dužine repa i postotka DNA u repu (intenziteta repa) (Collins, 2004).

3.2.4. Statistička obrada podataka

Za obradu dobivenih rezultata provedenih eksperimenata, u ovom je radu korišten program za statističku analizu JASP 0.19.1.0. Svi dobiveni rezultati su provjereni na parametrijsku distribuciju korištenjem Shapiro-Wilk testa. Parametrijski podatci su zatim obrađeni Classical ANOVA statističkom analizom uz primjenu Tukey i Scheffé *Post Hoc* testa usporedbe uz granicu statističke značajnosti $p < 0,05$. Neparametrijske vrijednosti su obrađene Dunn-ovim *Post Hoc* testom, također uz granicu statističke značajnosti $p < 0,05$, pri čemu se svaki rezultat koji polazuje razinu značajnosti manju od 0,05 smatra statistički značajnim. Rezultati genotoksičnog učinka su prije statističke obrade normalizirani prirodnim logaritmom, a rezultati određivanja prooksidacijskog učinka na modelnom plazmidu ϕ X174 RF1 su obrađeni u programu GelAnalyzer 23.1.1.

Rezultati su prikazani grafički, korištenjem programa Microsoft Excel. Rezultati komet testa prikazani su u *Box-Whisker* dijagramu s medijan vrijednostima, dok su rezultati ostalih testova prikazani kao srednje vrijednosti. Za sve testove su prikazane i standardne devijacije.

4. REZULTATI I RASPRAVA

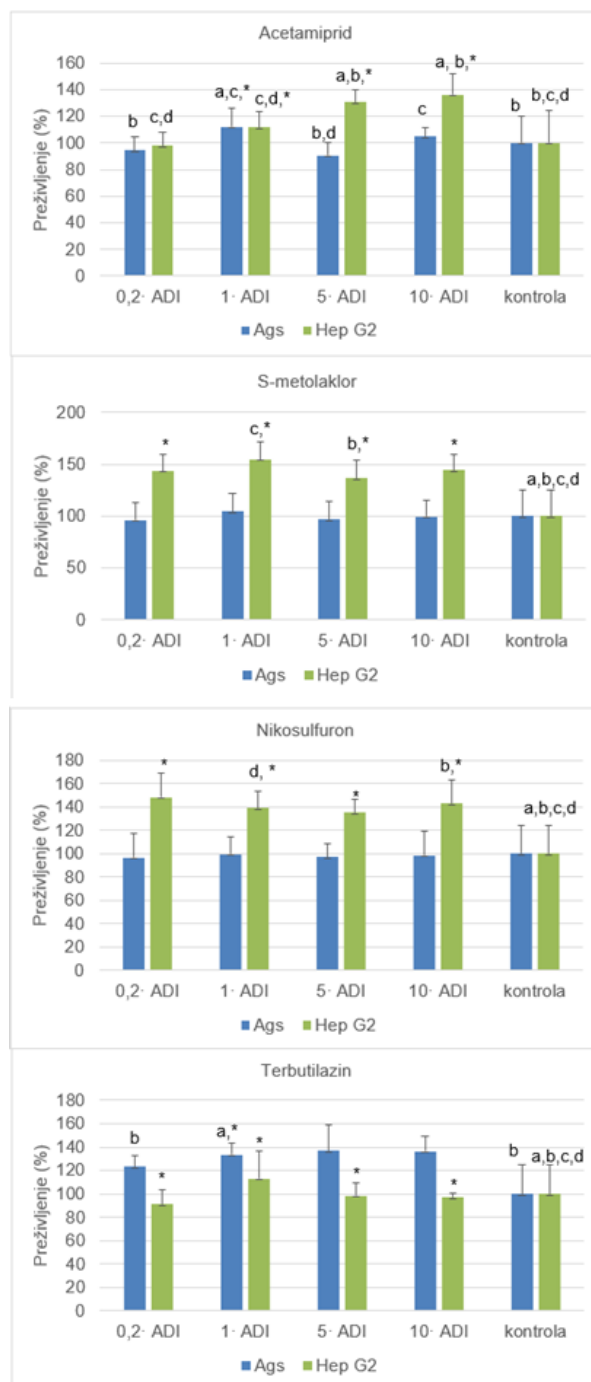
U ovom radu provedeno je ispitivanje citotoksičnog, prooksidacijskog i genotoksičnog učinka četiri pesticida (acetamiprida, nikosulfurona, S-metolaklora i terbutilazina) na kontinuiranim humanim staničnim linijama adenokarcinoma epitela želuca (AGS) i hepatocelularnog karcinoma jetre (Hep G2). Raspon ispitivanih koncentracija pesticida određen je u odnosu na vrijednosti dopuštenog dnevnog unosa (ADI), a navedene su u tablici 1. Najmanja ispitivana koncentracija je 5 puta manja, dok je najveća 10 puta veća od ADI vrijednosti.

Citotoksični učinak spomenutih pesticida je ispitan metodom Neutral Red, a za ispitivanje prooksidacijskog učinka korištene su metoda DCFH-DA, i metoda koja koristi modelnu plazmidnu ϕ X174 RF1 DNA. Za određivanje genotoksičnog učinka korišten je komet test. Za sva navedena istraživanja stanice su bile izložene djelovanju pesticida tijekom 24 sata.

4.1. ANALIZA CITOTOKSIČNOG UČINKA PESTICIDA METODOM NEUTRAL RED

Za utvrđivanje citotoksičnog učinka pesticida *in vitro* u ovom radu je korištena metoda Neutral Red opisana u poglavlju 3.2.1. Istraživanje je provedeno na kontinuiranim humanim staničnim linijama AGS i Hep G2. Stanice su tretirane pesticidima acetamipridom, nikosulfurom, S-metolaklorom i terbutilazinom u četiri različite koncentracije tijekom 24 sata.

Dobiveni rezultati prikazani su grafički kao postotak preživljenja stanica (relativna vijabilnost stanica iskazana u odnosu na kontrolu) u ovisnosti o različitim koncentracijama ispitivanih pesticida. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti dobivenih podataka za svaku pojedinačnu koncentraciju uz pripadajuće standardne devijacije. Podatci su statistički obrađeni te su naznačene statistički značajne razlike (slika 9).



Slika 9. Postotak preživljenja staničnih linija AGS i Hep G2 nakon tretmana različitim koncentracijama acetamiprida, S-metolaklora, nikosulfurona i terbutilazina

* – statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$); a – statistički značajna razlika u odnosu na 0,2· ADI [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] ($p < 0,05$)

Citotoksičan učinak pesticida na stanične linije AGS i Hep G2 tijekom 24 sata grafički je prikazan na slici 9. Iz slike je vidljivo da nikosulfuron i S-metolaklor ni u jednoj koncentraciji na staničnoj liniji AGS ne uzrokuju statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu, tj. ne djeluju citotoksično na stanice želuca. Acetamiprid i terbutilazin u koncentraciji od 1· ADI uzrokuju statistički značajan porast preživljenja stanične linije AGS u odnosu na kontrolu, što upućuje na njihov potencijalni proliferativni učinak.

Na staničnu liniju Hep G2 S-metolaklor i nikosulfuron, u cijelom ispitivanom koncentracijskom rasponu uzrokuju statistički značajan porast preživljenja u odnosu na kontrolu, no nije primijećena doza-učinak poveznica. Dakle, nakon tretmana stanica Hep G2 S-metolaklorom i nikosulfuronom, primijećen je proliferirajući učinak u cijelom koncentracijskom rasponu. Stanice tretirane terbutilazinom u cijelom rasponu ispitivanih koncentracija pokazuje statistički značajne rezultate u odnosu na kontrolu. Povećanjem koncentracije acetamiprida kojim su stanice tretirane povećava se i vijabilnost stanica pri čemu sve koncentracije, osim najmanje (0,2· ADI) uzrokuju statistički značajan porast stanica. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da svi spojevi u koncentracijama kojima opća populacija može biti izložena imaju potencijal izazvati proliferaciju stanica bez obzira na metaboličku aktivnost stanica.

Wang i sur. (2023) su proveli *in vitro* istraživanje toksičnog učinka pesticida acetamiprida, klorpirifosa i karbopfurana na staničnoj liniji Hep G2. Ispitivane koncentracije za acetamiprid su bile mnogo veće nego koncentracije korištene pri izradi ovog rada, a iznosile su: 0,125· EC₅₀ (3· 10⁻³ mg/mL); 0,25· EC₅₀ (6· 10⁻³ mg/mL); 0,5· EC₅₀ (1,5· 10⁻² mg/mL); 1· EC₅₀ (2,5· 10⁻² mg/mL); 2· EC₅₀ (5· 10⁻² mg/mL). Dobiveni rezultati ukazuju na to da acetamiprid, i ostali pojedinačni ispitivani pesticidi induciraju početak apoptoze, ali manje nego smjesa triju pesticida. Također, istražili su i učinak pojedinačnih pesticida i njihovih smjesa na nekrozu u Hep G2 stanicama mjerenjem enzima LDH (laktat dehidrogenaze) oslobođenog u kultivacijski medij nakon bojenja stanica. Enzim LDH je prisutan u svim stanicama pa se može koristiti kao pokazatelj oštećenja stanične membrane i nekroze. Acetamipridom tretirane stanice su imale veći postotak oslobođene laktat dehidrogenaze u odnosu na kontrolu što znači da tretman djeluje štetno na staničnu membranu i time potiče nekrozu. Zaključeno je da smjese pesticida mogu uzrokovati veće oštećenje membrane Hep G2 stanica nego pojedinačni pesticidi (Wang i sur., 2023).

Istraživanje citotoksičnosti acetamiprida na staničnoj liniji gušterače štakora, AR42J, su proveli Kara i sur. (2020). Ispitivani raspon koncentracija acetamiprida je bio od 1 do 50 mM, tj. 0,223 mg/mL – 11,13 mg/mL, a koristili su MTT test za određivanje citotoksičnosti. Sve koncentracije pesticida su uzrokovale koncentracijski-ovisnu inhibiciju rasta stanica gušterače

pri čemu su više koncentracije uzrokovale veći postotak inhibicije. IC_{50} vrijednost izračunata je kao 12,61 mM (2,81 mg/mL). Pri čemu IC_{50} vrijednost označava koncentraciju tvari koja smanjuje vitalnost ili funkcionalnost stanica za 50 % u usporedbi s kontrolom (Kara i sur., 2020).

U istraživanju citotoksičnosti i genotoksičnosti herbicida S-metolaklora, koje su proveli Nikoloff i sur. (2013) na staničnoj liniji Hep G2, korišten je raspon koncentracija sličan rasponu koncentracija korištenih pri izradi ovog rada, a to je: 0,25-15 μ g/mL. Za određivanje citotoksičnog učinka koristili su Neutral Red i MTT metodu. Rezultati su pokazali da čisti S-metolaklor, u čitavom rasponu ispitivanih koncentracija, ne izaziva smanjenje aktivnosti lizozoma ni mitohondrija, to jest ne dolazi do smanjenja vijabilnosti stanica. Dobiveni rezultati podudaraju se s rezultatima dobivenim pri izradi ovog rada. Također su ispitali citotoksičnost komercijalne formulacije S-merolaklora, *Twin Pack Gold* (96 % S-metolaklor). Rezultati istraživanja ukazuju na to da koncentracije od 1–15 μ g/ml *Twin Pack Gold* formulacije izazvaju značajno smanjenje mitohondrijske aktivnosti Hep G2 stanica, a sve testirane koncentracije formuliranog proizvoda dovele su do značajnog smanjenja funkcije lizosoma. Ovo potvrđuje važnost procjene ne samo aktivnog sastojka pesticida koji se stavlja na tržište, nego i komercijalne formulacije prilikom određivanja stvarne opasnosti (Nikoloff i sur., 2013).

Želježić i sur. su u svojem radu iz 2018.-e proveli istraživanje utjecaja herbicida terbutilazina *in vitro* na humanim staničnim linijama limfocita i Hep G2 i *in vivo* na miševima. Korištene koncentracije terbutilazina su iznosile $8 \cdot 10^{-6}$ mg/mL, $8 \cdot 10^{-7}$ mg/mL te $5,8 \cdot 10^{-7}$ mg/mL. Trajanje tretmana iznosilo je 4 sata. Dobiveni rezultati ukazali su na to da u ispitivanim koncentracijama terbutilazin na Hep G2 stanice ne djeluje citotoksično. Izlaganje stanica limfocita istim koncentracijama terbutilazina dovelo je do koncentracijski-ovisno statistički značajnog smanjenja preživljenja u odnosu na kontrolu. Pri najvećoj koncentraciji herbicida došlo je do najvećeg pada preživljenja stanica (Želježić i sur., 2018).

U ovom radu ispitivane su niske koncentracije pesticida acetamiprida, nikosulfurona, S-metolaklora i terbutilazina. Stoga je za očekivati da nema značajnog citotoksičnog učinka na stanicama, no uočen je proliferirajući učinak na tumorske stanice AGS i Hep G2. Mnoge studije upućuju na to da pesticidi u visokim koncentracijama mogu uzrokovati apoptozu tumorskih stanica te da niske koncentracije mogu doprinijeti proliferaciji. Moguće je da pri niskim koncentracijama pesticidi mogu promijeniti stanične signale tako da potiču proliferaciju. Na primjer, povećanje reduciranih kisikovih spojeva inducirano pesticidima koje ne prelazi prag za apoptozu može aktivirati proliferacijske putove i time uzrokovati povećanje otpornosti tumorskih stanica. Većina istraživanja ukazuje na to da učinak pesticida na stanice ovisi o koncentraciji

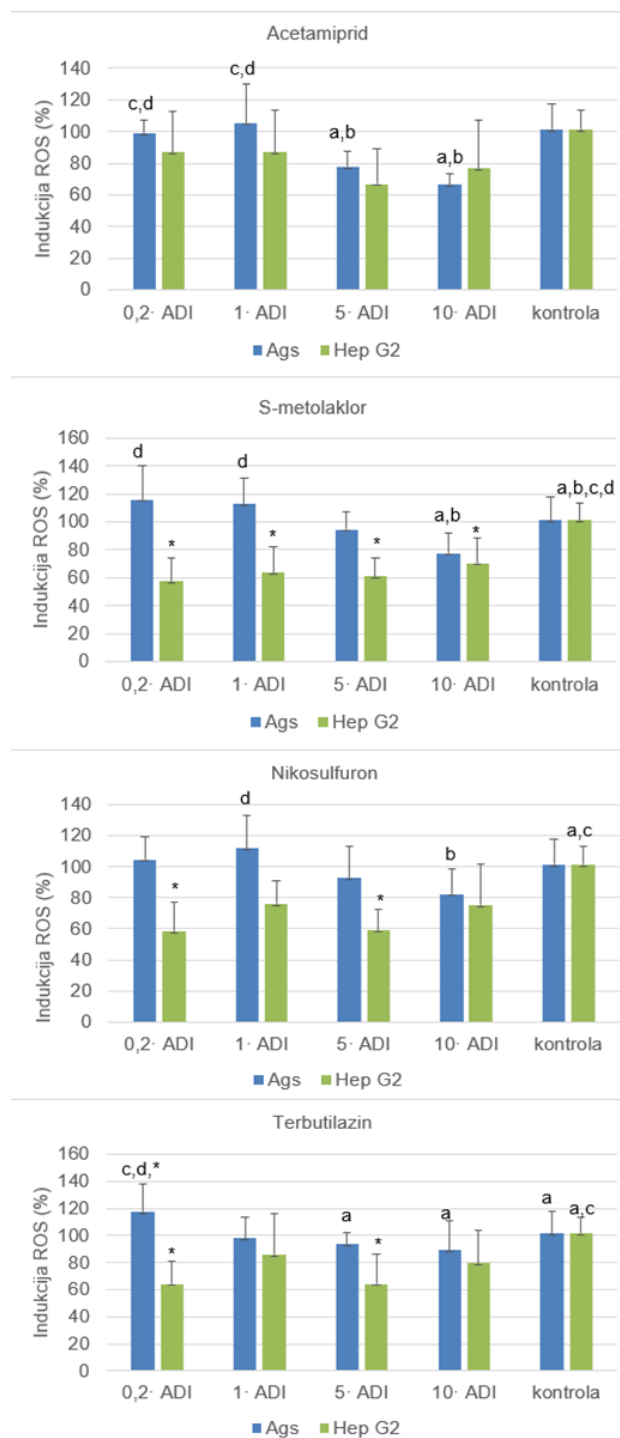
pesticida, tipu stanica i okolišnim uvjetima.

4.2. ANALIZA PROOKSIDACIJSKOG UČINKA PESTICIDA

4.2.1. Analiza prooksidacijskog učinka pesticida metodom DCFH-DA

Ispitivanje prooksidacijskog učinka pesticida acetamiprida, S-metolaklora, nikosulfurona i terbutilazina provedena je na kontinuiranim humanim staničnim linijama AGS i Hep G2 korištenjem metode DCFH-DA. Provođenje metode detaljno je opisano u poglavlju 3.2.2.1., a korištene koncentracije pesticida su 5 puta manja koncentracija od vrijednosti ADI, vrijednost ADI, 5 puta veća koncentracija od ADI vrijednosti i 10 puta veća koncentracija od vrijednosti ADI. Stanice su bile podvrgnute tretmanu pesticidima u trajanju od 24 sata.

Rezultati su prikazani grafički grafički kao postotak indukcije reaktivnih kisikovih skupina (omjer vrijednosti intenziteta fluorescencije tretiranih stanica i preživljenja stanica određenog metodom Neutral Red u odnosu na kontrolu) u ovisnosti o ispitivanim koncentracijama pojedinačnih pesticida. Dobiveni rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti podataka za svaku pojedinačnu koncentraciju s odgovarajućim standardnim devijacijama te su na slici 10 naznačene i statistički značajne razlike dobivene provedenom statističkom analizom.



Slika 10. Postotak indukcije reaktivnih kisikovih skupina na staničnim linijama AGS i Hep G2 nakon tretmana različitim koncentracijama acetamiprida, S-metolaklora, nikosulfurona i terbutilazina

* – statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$); a – statistički značajna razlika u odnosu na 0,2· ADI [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] ($p < 0,05$)

Na slici 10 prikazan je prooksidacijski učinak pesticida acetamiprida, S-metolaklora, nikosulfurona i terbutilazina na humane stanične linije AGS i Hep G2. Iz te je slike vidljivo da je nakon izlaganja AGS stanica terbutilazinu u koncentraciji od 0,2· ADI došlo do statistički značajnog povećanja reaktivnih kisikovih skupina u odnosu na kontrolu. Preostale ispitane koncentracije terbutilazina, kao i ostalih pesticida na staničnoj liniji AGS nisu izazvale statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu. Također je vidljivo da prilikom ispitivanja S-metolaklora i terbutilazina na AGS staničnoj liniji, porastom koncentracije tih dvaju pesticida dolazi do koncentracijski-ovisnog pada razine slobodnih radikala u preživjelim stanicama.

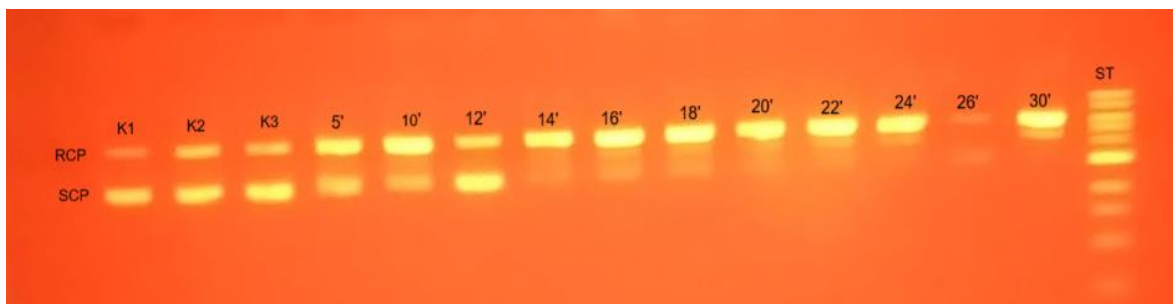
Iz grafičkog prikaza na slici 10 vidljivo je da prilikom ispitivanja prooksidacijskog djelovanja pesticida na staničnoj liniji Hep G2 pesticidi nikosulfuron i terbutilazin u koncentracijama od 0,2· ADI i 5· ADI uzrokuju statistički značajni pad razine reaktivnih kisikovih čestica u odnosu na kontrolu. Nakon izlaganja Hep G2 stanica acetamipridu, nisu primijećene nikakve statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu u čitavom rasponu ispitivanih koncentracija, znači da ne dolazi do nastajanja slobodnih radikala. Prilikom izlaganja Hep G2 stanica S-metolakloru dolazi do statistički značajnog smanjenja razine reaktivnih kisikovih čestica u odnosu na kontrolu u cijelom rasponu ispitivanih koncentracija.

4.2.2. Analiza prooksidacijskog učinka pesticida na modelnom plazmidu ϕ X174 RF1

Prooksidacijski učinak pesticida acetamiprida, nikosulfurona, S-metolaklora i terbutilazina se prilikom izrade rada određivao, osim korištenjem DCFH-DA metode, i na modelu DNA plazmida ϕ X174 RF1. Postupak izvođenja metode opisan je u poglavlju 3.2.2.2., a korištene koncentracije ispitivanih pesticida su 0,2· ADI, 1· ADI i 10· ADI. Vrijeme zračenja uzoraka određeno je prethodnom optimizacijom prikazanom na slici 11. Rezultati djelovanja UV-fotolize na molekulu vodikova peroksida te na DNA molekulu uz dodatak tretmana ispitivanim pesticidima prikazani su na slikama 12 i 13.

Vrijeme zračenja uzoraka određeno je prethodnom optimizacijom. Na slici 11 vidljivo je da se intenzitet gornje vrpce povećao, a doljnje smanjio prilikom zračenja plazmida u trajanju od 5 i 10 minuta, to znači da se povećao udio relaksirane cirkularne forme plazmida (RCP), a smanjio udio superzavijene cirkularne forme plazmida (SCP) u odnosu na kontrole. Bitno je primjetiti da superzavijena forma u vremenskom rasponu zračenja 5' - 10' ne nestaje u potpunosti kao što je slučaj prilikom duljeg izlaganja UV zračenju (više od 14 minuta). Prisutnost novih, kraćih vrpca pri duljem izlaganju UV-u upućuje na raspad plazmida. Analizom

dobivenih rezultata određeno je optimalno vrijeme izlaganja uzoraka UV zračenju u trajanju od 6 minuta.

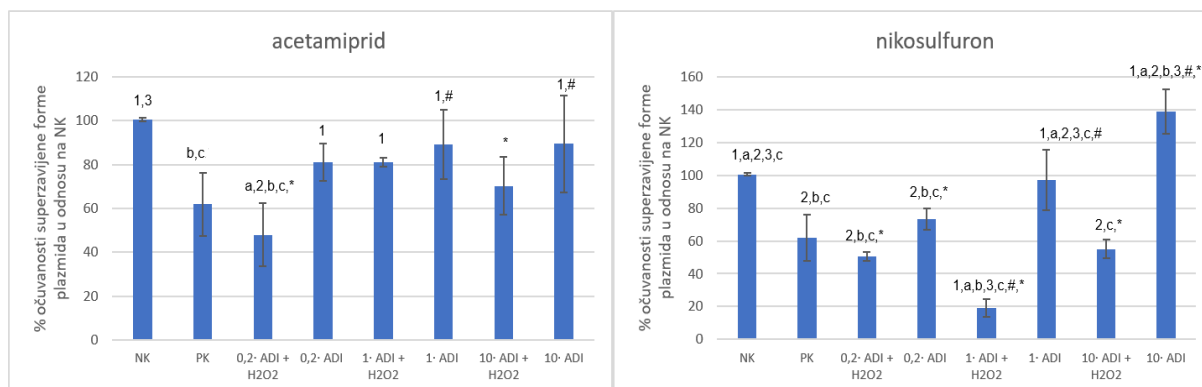


Slika 11. Optimizacija vremena UV zračenja plazmida ϕ X174 RF1

RCP – relaksirana cirkularna forma plazmida; SCP – superzavijena cirkularna forma plazmida; K1 – kontrola koja sadrži samo plazmid ϕ X174 RF1, nije tretirana UV svjetlom; K2 – kontrola koja sadrži plazmid ϕ X174 RF1, H_2O_2 i nije tretirana UV svjetlom; K3 – kontrola koja sadrži plazmid ϕ X174 RF1, tretirana UV svjetlom u trajanju od 5'; 5' – 30' – trajanje izlaganja plazmida ϕ X174 RF1 UV svjetlu u minutama; ST – standard 1 kb *Plus DNA Ladder for Safe Stains*

Stupanj oštećenja plazmida uz dodatak pesticida moguće je odrediti uspoređujući intenzitet fluorescencije vrpce relaksiranog sa superzavijenim plazmidom. Iz dobivenih podataka određuje se prooksidacijski učinak pesticida pri čemu veći stupanj oštećenja plazmida označava jači prooksidacijski učinak.

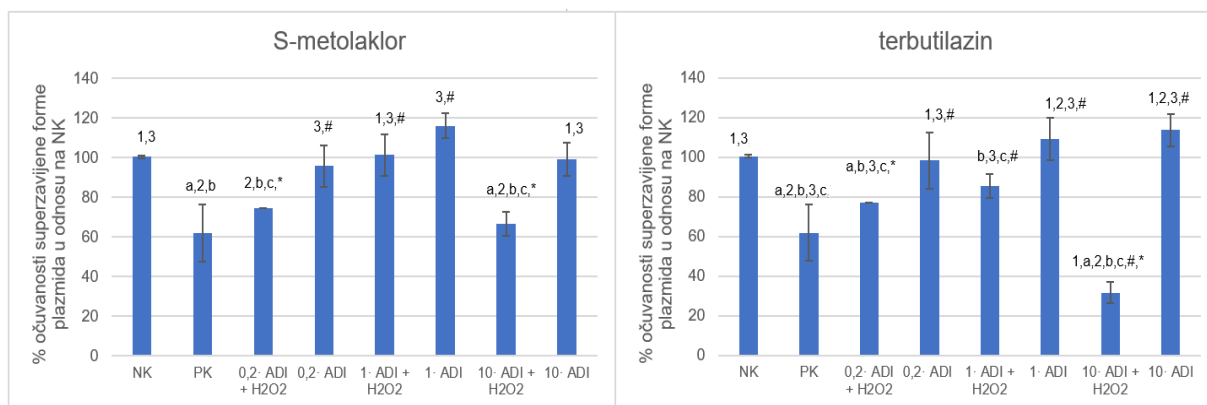
Dobiveni rezultati prikazani su grafički kao postotak očuvanosti superzavijene forme plazmida u ovisnosti o različitim koncentracijama ispitivanih pesticida. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti podataka za svaku pojedinačnu koncentraciju, uz pripadajuće standardne devijacije te su naznačene statistički značajne razlike.



Slika 12. Udio superzavijene forme plazmida Φ X174 RF1 nakon tretmana acetamipridom i nikosulfuronom sa i bez dodatka H₂O₂

* – statistički značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu ($p < 0,05$); # – statistički značajna razlika u odnosu na pozitivnu kontrolu; a – statistički značajna razlika u odnosu na 0,2· ADI [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 10· ADI [mg/mL] ($p < 0,05$); 1 – statistički značajna razlika u odnosu na 0,2· ADI uz dodatak H₂O₂ [mg/mL] ($p < 0,05$); 2 – statistički značajna razlika u odnosu na ADI uz dodatak H₂O₂ [mg/mL] ($p < 0,05$); 3 – statistički značajna razlika u odnosu na 10· ADI uz dodatak H₂O₂ [mg/mL] ($p < 0,05$); NK – negativna kontrola; PK – pozitivna kontrola

Na slici 12 je prikazan postotak očuvanosti superzavijene forme plazmida Φ X174 RF1 nakon tretmana pesticidima acetamipridom i nikosulfuronom u koncentracijama od 0,2· ADI, 1· ADI i 10· ADI, sa i bez dodatka vodikovog peroksida. Kao pozitivna kontrola korišten je plazmid u puferu, vodikov peroksid te je bila podvrgnuta UV zračenju. Kombinacijom H₂O₂ i UV-a dolazi do nastanka hidroksilnih radikala koji razmotavaju plazmidnu DNA i time ju provode iz superzavijene u relaksiranu formu. Iz dobivenih rezultata prikazanih na slici 12 vidljivo je da oba pesticida pri višim koncentracijama (1· ADI i 10· ADI) pokazuju statistički značajno veći postotak očuvanosti superzavijene forme plazmida u odnosu na pozitivnu kontrolu. Nikosulfuron uz dodatak vodikovog peroksida značajno smanjuje postotak očuvanosti DNA u odnosu na pozitivnu i negativnu kontrolu. Negativna kontrola nije sadržavala vodikov peroksid te nije bila podvrgnuta UV zračenju. Najniža i najviša ispitana koncentracija acetamiprida uz dodatak vodikovog peroksida, uzrokuje statistički značajno smanjenje očuvanosti superzavijene forme plazmida u odnosu na negativnu kontrolu. Nikosulfuron u cijelom rasponu ispitivanih koncentracija uz dodatak vodikovog peroksida uzrokuje statistički značajno smanjenje postotka očuvanosti superzavijene forme plazmida u odnosu na negativnu kontrolu.



Slika 13. Udio superzavijene forme plazmida ϕ X174 RF1 nakon tretmana S-metolaklorom i terbutilazinom sa i bez dodatka H₂O₂

* – statistički značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu ($p < 0,05$); # – statistički značajna razlika u odnosu na pozitivnu kontrolu; a – statistički značajna razlika u odnosu na 0,2· ADI [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 10· ADI [mg/mL] ($p < 0,05$); 1 – statistički značajna razlika u odnosu na 0,2· ADI uz dodatak H₂O₂ [mg/mL] ($p < 0,05$); 2 – statistički značajna razlika u odnosu na ADI uz dodatak H₂O₂ [mg/mL] ($p < 0,05$); 3 – statistički značajna razlika u odnosu na 10· ADI uz dodatak H₂O₂ [mg/mL] ($p < 0,05$); NK – negativna kontrola; PK – pozitivna kontrola

Slika 13 prikazuje postotak očuvanosti superzavijene forme plazmida ϕ X174 RF1 nakon tretmana pesticidima S-metolaklorom i terbutilazinom u koncentracijama od 0,2· ADI, 1· ADI i 10· ADI, sa i bez dodatka vodikovog peroksida. Iz navedene slike je vidljivo da u odnosu na negativnu kontrolu oba pesticida u uzorcima s dodatkom vodikovog peroksida u koncentracijama od 0,2· ADI i 10· ADI uzrokuju statistički značajno smanjenje postotka očuvanosti superzavijene forme plazmidne DNA. S obzirom na pozitivnu kontrolu, uzorci tretirani S-metolaklorom bez dodatka vodikovog peroksida u nižim koncentracijama (0,2 i 10· ADI), te koncentracija 1· ADI uz dodatak vodikovog peroksida uzrokuju statistički značajno povećanje očuvanosti superzavijene forme plazmidne DNA. U uzorcima tretiranim terbutilazinom, u čitavom rasponu ispitivanih koncentracija bez dodatka peroksida dolazi do statistički značajnog povećanje očuvanosti superzavijene forme plazmida u odnosu na pozitivnu kontrolu, isto se odnosi i na uzorak tretiran terbutilazinom uz dodatak vodikovog peroksida u koncentraciji 1· ADI. Međutim, u uzorku tretiranom terbutilazinom koncentracije 10· ADI i uz dodatak vodikovog peroksida dolazi do drastičnog smanjenja očuvanosti superzavijene forme plazmidne DNA u odnosu na obje kontrole.

Iz slika 12 i 13 je, uspoređujući pojedinačne koncentracije sa i bez dodatka vodikovog peroksida, moguće zamijetiti da dodatkom vodikovog peroksida dolazi do očekivanog

odmotavanja superzavijene forme plazmidne DNA i njenog prelaska u relaksiranu formu.

Wang i sur. (2023) su u svojem istraživanju ispitali zasebni i sinergistički prooksidacijski učinak pesticida acetamiprida, klorpirifosa i karbopfurana metodom DCFH-DA na staničnoj liniji Hep G2. Ispitivane koncentracije za acetamiprid su bile veće od ispitivanih koncentracija korištenih pri izradi ovog rada, a iznosile su: $0,125 \cdot EC_{50}$ ($3 \cdot 10^{-3}$ mg/mL); $0,25 \cdot EC_{50}$ ($6 \cdot 10^{-3}$ mg/mL); $0,5 \cdot EC_{50}$ ($1,25 \cdot 10^{-2}$ mg/mL); $1 \cdot EC_{50}$ ($2,5 \cdot 10^{-2}$ mg/mL); $2 \cdot EC_{50}$ ($5 \cdot 10^{-2}$ mg/mL). EC_{50} označava 50 % maksimalne učinkovite koncentracije pesticida. Vrijeme tretmana bilo je 24 sata, a rezultati su pokazali da sam acetamiprid izaziva povećanje razine reaktivnih kisikovih spojeva u Hep G2 stanicama te je zamijećen koncentracijski-ovisan učinak, tj. da pri većim koncentracijama acetamiprida dolazi do veće generacije ROS-ova. Studija upućuje na to da sva tri pesticida samostalno ometaju redoks homeostazu povećanjem razine ROS-ova, ali pri nižoj koncentraciji nego kad se koristi smjesa triju pesticida zajedno (Wang i sur., 2023).

Nadalje, Želježić i sur. (2018) su proveli istraživanje utjecaja terbutilazina *in vitro* na humanim staničnim linijama limfocita i Hep G2 stanicama te *in vivo* na miševima. Za ispitivanje *in vitro* koristili su DCFH-DA metodu, a korištene koncentracije terbutilazina su iznosile $8 \cdot 10^{-6}$ mg/mL, $8 \cdot 10^{-7}$ mg/mL te $5,8 \cdot 10^{-7}$ mg/mL. Vrijeme tretiranja stanica iznosilo je 4 sata. Pri ispitivanju prooksidacijskog učinka, rezultati su pokazali da terbutilazin u ispitivanim koncentracijama na staničnoj liniji Hep G2 ne uzrokuje povišenu razinu ROS-ova u odnosu na kontrolu. Zamijećeno je da su razine ROS-ova u plazmi bile značajno povećane u usporedbi s kontrolom pri svim testiranim koncentracijama, kao i u limfocitima tretiranim s 0,80 i 0,58 ng/mL terbutilazina. To upućuje na bolju učinkovitost antioksidacijske obrane u Hep G2 stanicama u odnosu na stanice plazme i limfocita. U ovom istraživanju određena je aktivnost glutation peroksidaze (GPx) i superoksid dismutaze (SOD), oba enzima uklanjaju slobodne radikale kako bi spriječili oksidacijsko oštećenje i suzbili povećanu proizvodnju ROS-ova. Rezultati ukazuju na smanjenu aktivnost GSH-Px u krvi i SOD-a u eritrocitima nakon tretmana terbutilazinom. No suprotno tome, aktivnost spomenutih enzima se povećala nakon tretmana u Hep G2 stanicama i limfocitima, vjerojatno kao odgovor na narušenu ravnotežu stvaranja i neutralizacije slobodnih radikala uzrokovanu tretmanom. Autori zaključuju da razlike u aktivnostima enzima opažene između limfocita i HepG2 stanica proizlaze iz različite razine metaboličke aktivnosti ovih različitih tipova stanica, što je rezultiralo drugačijim antioksidacijskim kapacitetima (Želježić i sur., 2018).

Davidović-Plavšić i sur. (2024) su proveli *in vitro* istraživanje utjecaja visokih koncentracija

terbutilazina i nikosulfurona na humanim eritrocitima. Korištene su koncentracije terbutilazina $0,85 \cdot 10^{-3}$ mg/mL i $8,5 \cdot 10^{-3}$ mg/mL te nikosulfurona 0,25 mg/mL i 0,4 mg/mL. Stanice su bile podvrgnute tretmanu u trajanju od 1 sata. Rezultati istraživanja ukazuju na to da su oba pesticida uzrokovala povećanje koncentracije malondialdehida (MDA) što indicira oštećenje membrane i oksidacijski stres. MDA je toksični produkt lipidne peroksidacije te se koristi u evaluaciji oksidacijskog stresa. Također je zabilježena povećana aktivnost enzima superoksid dismutaze (SOD) i katalaze (CAT) kao odgovor na oksidacijski stres (Davidović-Plavšić i sur., 2024).

Na temelju dobivenih rezultata ispitivanja prooksidacijskog učinka pesticida metodom DCFH-DA može se zaključiti da na staničnu liniju AGS niti jedan ispitivani pesticid nema prooksidacijsko djelovanje, osim terbutilazina u najnižoj koncentraciji. Rezultati ispitivanja na staničnoj liniji Hep G2 sugeriraju da svi pesticidi, osim acetamiprida, uzrokuju smanjenje razine ROS-ova u stanicama. Budući da ne možemo pričati o antioksidacijskom učinku pesticida, moguće je da u niskim koncentracijama ispitivani pesticidi djeluju kao stimulansi aktivacije i transkripcije enzima koji sudjeluju u antioksidacijskoj obrani kao što su već navedeni enzimi SOD, CAT i GPx. Ti enzimi neutraliziraju slobodne radikale prevodeći ih u bezopasne molekule kao što su voda, alkohol i kisik (Ighodaro i Akinloye, 2018). Ovu tezu potvrđuje i činjenica da Hep G2 stanice karakterizira pojačana ekspresija mRNA koja kodira za enzim katalazu kao odgovor na izloženost parakvatu tj. oksidacijskom stresu.

U ovom su radu ispitivani pesticidi u relativno niskim koncentracijama te, iako u tim koncentracijama nisu pokazali prooksidacijsko djelovanje, mnoge prijašnje studije upućuju na to da isti pesticidi pri višim koncentracijama mogu uzrokovati povećanje razine ROS-ova i oksidacijskog stresa u stanicama.

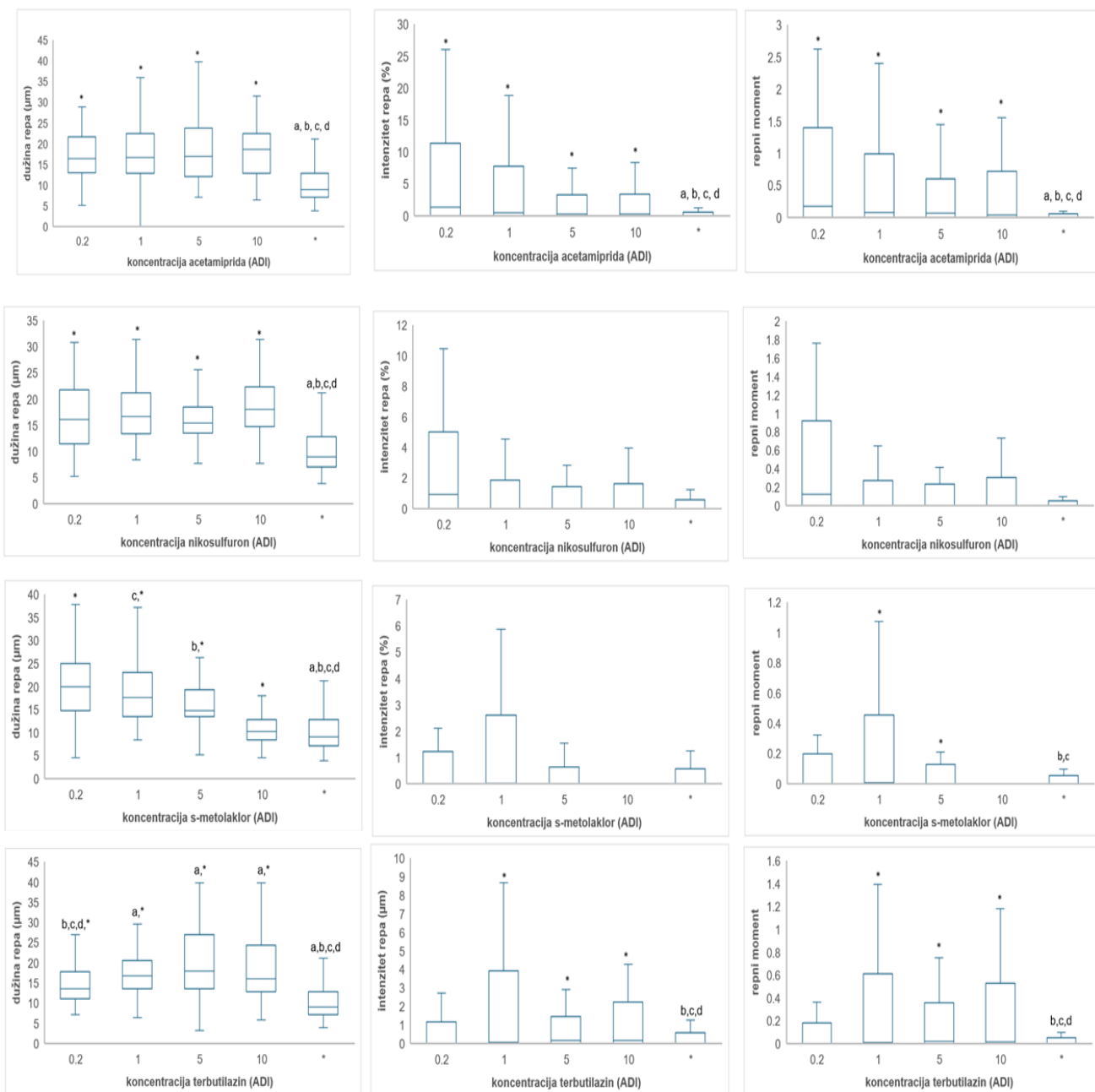
Rezultati ispitivanja prooksidacijskog učinka pesticida na modelnom plazmidu ϕ X174 RF1 sugeriraju da sami pesticidi, osim nikosulfuron u najnižoj koncentraciji, u kontaktu s UV svjetlom ne generiraju slobodne radikale, te ne dovode do dodatnih oštećenja plazmidne DNA. U provedenom istraživanju kada su se generirali hidroksilni radikali dodatkom vodikovog peroksida i UV zračenjem, tretman acetamipridom i S-metolaklorom nije uzrokovao značajan pojačani prooksidacijski učinak u odnosu na pozitivnu kontrolu. Međutim, terbutilazin u najvećoj ispitivanoj koncentraciji pokazuje značajno smanjenje superzavijene forme plazmida te to upućuje na njegov prooksidacijski potencijal.

Nikosulfuron u najvećoj ispitivanoj koncentraciji ($10 \cdot \text{ADI}$) uzrokuje povećanje udjela superzavijene forme plazmida u odnosu na pozitivnu kontrolu. Moguće je da dolazi do interakcije između nikosulfurona i generiranih ROS-ova te se time smanjuje koncentracija slobodnih radikala koji odmataju plazmid. Moguća je i interakcija nikosulfuron-plazmid, pri čemu

pesticid obavlja strukturu plazmida i onemogućava slobodnim radikalima da izazovu oštećenje DNA.

4.3. ANALIZA GENOTOKSIČNOG UČINKA PESTICIDA KOMET TESTOM

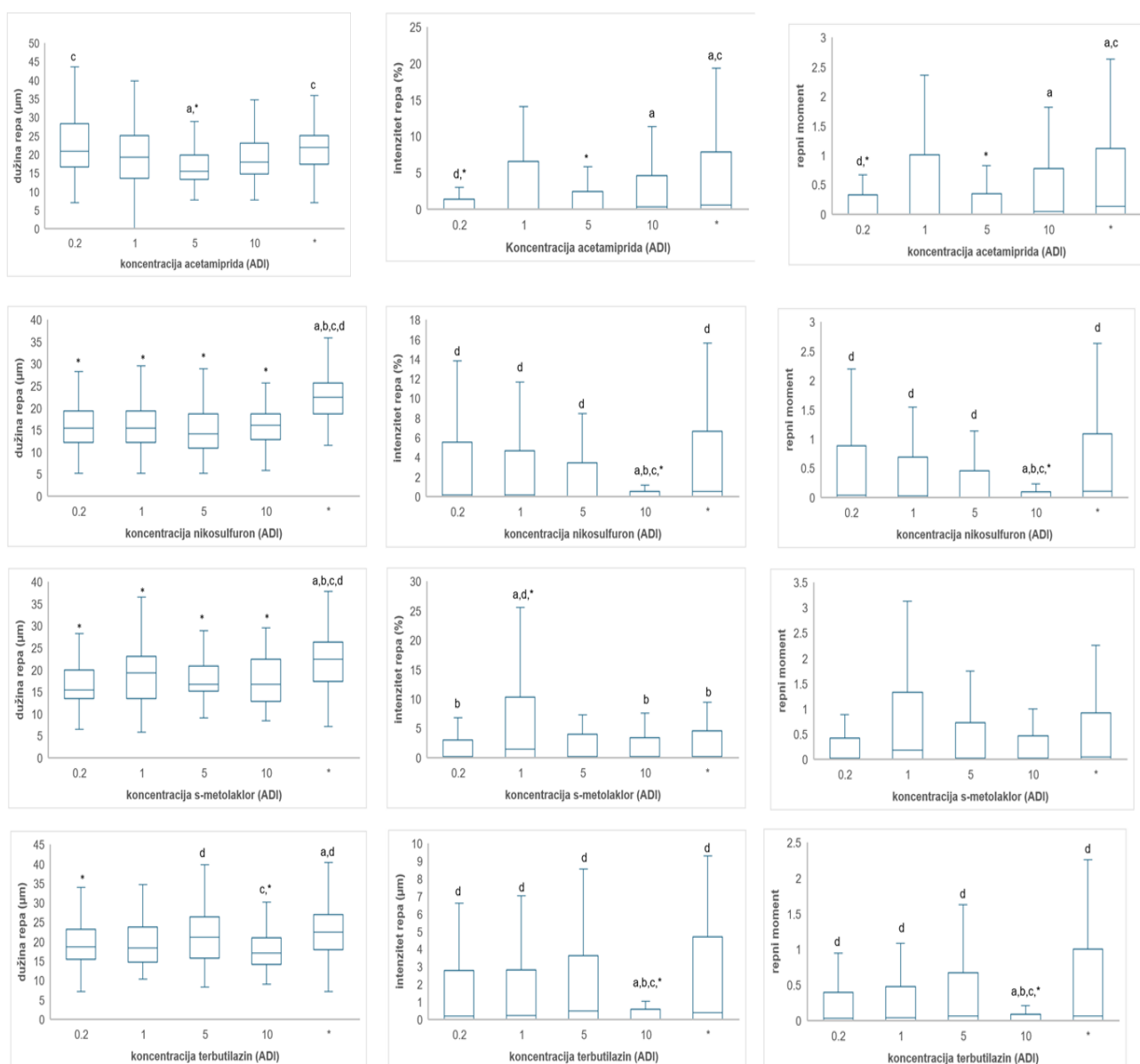
U ovom je radu potencijalan genotoksičan učinak pesticida acetamiprida, nikosulfurona, S-metolaklora i terbutilazina ispitan na staničnim linijama AGS i Hep G2 koristeći komet test. Postupak provedbe komet testa opisan je u poglavlju 3.2.3.. Stanice su tretirane tijekom 24 sata, a ispitane su četiri koncentracije svakog pojedinačnog pesticida (0,2· ADI, 1· ADI, 5· ADI i 10· ADI). Kao pozitivna kontrola korištene su stanice tretirane vodikovim peroksidom (H_2O_2). Kako bismo odredili razinu oštećenja DNA, proučavani su parametri dužina i intenzitet repa kometa, te repni moment kometa. Rezultati su prikazani grafički kao skup pojedinačnih podataka za svaku koncentraciju ispitivanih pesticida te su podatci statistički obrađeni. Na slici 14 su naznačene statistički značajne razlike.



Slika 14. Genotoksični učinak acetamiprida, nikosulfurona, S-metolaklora i terbutilazina na staničnoj liniji AGS izražen pomoću parametara dužine repa, intenziteta repa te repnog momenta kometa

* – statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$); a – statistički značajna razlika u odnosu na 0,5· ADI [mg/mL] ($p < 0,05$); b – statistički značajna razlika u odnosu na ADI [mg/mL] ($p < 0,05$); g – glifosat; k – kaptan; s – spinosad; d – deltametrin; nk – negativna kontrola

Slika 14 prikazuje grafičke prikaze izmjerenih vrijednosti parametara dužine repa (μm), intenziteta repa (% DNA) te repnog momenta kometa na staničnoj liniji AGS tretiranoj ispitivanim koncentracijama acetamiprida, nikosulfurona, S-metolaklora i terbutilazina. Iz prikazanih rezultata vidljivo je da svi pesticidi u cijelom rasponu ispitivanih koncentracija uzrokuju statistički značajno povećanje duljine repa kometa u odnosu na kontrolu. Također je iz slike vidljivo da acetamiprid u čitavom rasponu koncentracija izaziva statistički značajno povećanje intenziteta repa kometa i repnog momenta u odnosu na kontrolu. Terbutilazin u cijelom koncentracijskom rasponu, osim u najnižoj koncentraciji ($0,2 \cdot \text{ADI}$), uzrokuje statistički značajno povećanje intenziteta repa kometa i repnog momenta u odnosu na kontrolu. Nikosulfuron i S-metolaklor ne pokazuju statistički značajne razlike intenziteta repa kometa u odnosu na kontrolu. S-metolaklor uzrokuje statistički značajno povećanje repnog momenta u odnosu na kontrolu u koncentracijama od $5 \cdot \text{ADI}$ i $10 \cdot \text{ADI}$, dok nikosulfuron ne pokazuje statistički značajne rezultate promjene repnog momenta u odnosu na kontrolu. Moguće je zamijetiti da S-metolaklor pri najvišoj koncentraciji od $10 \cdot \text{ADI}$ uzrokuje uništavanje genetičkog materijala. Dobiveni rezultati ukazuju na to da acetamiprid i S-metolaklor djeluju mutageno na stanice AGS. Nikosulfuron ne pokazuje mutagena svojstva prema AGS stanicama. Terbutilazin na staničnoj liniji AGS također pokazuje mutageni učinak.



Slika 15. Genotoksični učinak acetamiprida, nikosulfurona, S-metolaklora i terbutilazina na staničnoj liniji Hep G2 izražen pomoću parametara dužine repa, intenziteta repa te repnog momenta kometa

* – statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$); a – statistički značajna razlika u odnosu na 0,5· ADI [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] ($p < 0,05$); g – glifosat; k – kaptan; s – spinosad; d – deltametrin; nk – negativna kontrola

Na slici 15 prikazane su izmjerene vrijednosti parametara dužine repa (μm), intenziteta repa (% DNA) te repnog momenta kometa na staničnoj liniji Hep G2 tretiranoj ispitivanim koncentracijama acetamiprida, nikosulfurona, S-metolaklora i terbutilazina. Iz prikazanih rezultata vidljivo je da S-metolaklor i nikosulfuron u čitavom rasponu ispitivanih koncentracija uzrokuju statistički značajno smanjenje duljine repa kometa u odnosu na kontrolu. Acetamiprid jedino u koncentraciji od $5 \cdot \text{ADI}$ uzrokuje statistički značajno smanjenje dužine repa kometa u odnosu na kontrolu, dok rezultati stanica tretiranih terbutilazinom pokazuju statistički značajne razlike duljine repa u odnosu na kontrolu u najmanjoj ($0,2 \cdot \text{ADI}$) i najvećoj koncentraciji ($10 \cdot \text{ADI}$). Stanice Hep G2 tretirane terbutilazinom i nikosulfuronom najveće ispitivane koncentracije ($10 \cdot \text{ADI}$) pokazuju statistički značajno smanjenje intenziteta repa kometa i repnog momenta u odnosu na kontrolu, a može se primjetiti i koncentracijski-ovisno smanjenje tj. povećanje vrijednosti repnog momenta i intenziteta repa kometa. Acetamiprid uzrokuje statistički značajno smanjenje intenziteta repa i repnog momenta kometa u odnosu na kontrolu u koncentracijama $0,2 \cdot \text{ADI}$ i $5 \cdot \text{ADI}$. S-metolaklor uzrokuje statistički značajno povećanje intenziteta repa kometa u odnosu na kontrolu u koncentraciji $1 \cdot \text{ADI}$. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da acetamiprid, S-metolaklor, nikosulfuron i terbutilazin nemaju mutageni učinak na stanice Hep G2.

Senyildiz i sur. su u svojem istraživanju 2018-e ispitali genotoksični učinak acetamiprida na staničnim linijama Hep G2 i SH-SY5Y. Kao i pri izradi ovog rada, pri određivanju genotoksičnosti su koristili komet test. Ispitane su koncentracije acetamiprida u rasponu $50\text{-}500 \mu\text{M}$ ($0,01\text{-}0,1 \text{ mg/mL}$), što su značajno veće koncentracije acetamiprida u odnosu na koncentracije korištene pri izradi ovog rada. Stanice su bile izložene tretmanu 24 sata. Zapaženo je da je oštećenje DNA bilo značajno inducirano u SH-SY5Y stanicama nakon tretmana najvišom koncentracijom pesticida, dok tretman na stanicama Hep G2 nije uzrokovao nikakve statistički značajne razlike u intenzitetu repa kometa. Ovi rezultati upućuju na to da je jednaka koncentracija acetamiprida uzrokovala izraženije oštećenje DNA u humanim stanicama neuroblastoma nego u stanicama humanog hepatocelularnog karcinoma te se poklapaju s rezultatima dobivenim u ovom istraživanju (Senyildiz i sur., 2018).

Çavas i sur. (2012) su ispitali *in vitro* genotoksičnost acetamiprida na CaCo-2 stanicama koristeći mikronukleus i komet test. Stanice su tretirane 24 sata koncentracijama pesticida u rasponu od $25 \mu\text{M}$ ($5 \cdot 10^{-3} \text{ mg/mL}$) do $300 \mu\text{M}$ ($0,06 \text{ mg/mL}$). Analizom dobivenih rezultata, autori

su zamijetili povećan broj mikronukleusa te značajno povećanje jednolančanih lomova DNA pri svim ispitivanim koncentracijama acetamiprida. Ti rezultati upućuju na potencijalni mutageni učinak acetamiprida (Čavas i sur., 2012). Ovi rezultati su u skladu s rezultatima dobivenim na AGS staničnoj liniji pri izradi ovog rada.

Željezić i sur. (2018) su komet testom proveli analizu genotoksičnosti terbutilazina na ljudskim stanicama limfocita i na stanicama Hep G2. Korištene koncentracije terbutilazina su iznosile $8 \cdot 10^{-3}$ mg/L, $8 \cdot 10^{-4}$ mg/mL i $5,8 \cdot 10^{-4}$ mg/mL, a trajanje tretmana 4 sata. Analizom dobivenih rezultata primijećeno je da terbutilazin, pri koncentracijama $8 \cdot 10^{-3}$ mg/L i $8 \cdot 10^{-4}$ mg/mL, u stanicama limfocita uzrokuje statistički veće oštećenje DNA u odnosu na kontrolu, dok u stanicama Hep G2 uzrokuje statistički značajnu razliku samo u koncentraciji od $8 \cdot 10^{-4}$ mg/mL. Niža razina oštećenja DNA zamijećena u Hep G2 stanicama može biti posljedica metaboličke aktivnosti ili pak učinkovitijih mehanizama za popravak jednolančanih lomova. Moguće je da je acetamiprid u stanicama Hep G2 metaboliziran do nekog manje mutagenog spoja te je uzrokovao manja oštećenja nego u limfocitima koji ne posjeduju endogenu metaboličku aktivnost (Željezić i sur., 2018).

Prema EFSA-inom članku „*Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance S-metolachlor excluding the assessment of the endocrine disrupting properties*“, EFSA- European Food Safety Authority, potencijalna genotoksičnost S-metolaklora istraživana je u nizu *in vitro* i *in vivo* studija koje su analizirale mutagenost, klastogenost i aneuploidnost. U studijama mutagenosti, S-metolaklor nije bio mutagen za mikrobne stanice niti klastogen za životinje. EFSA je na temelju dostupnih rezultata i procjene težine dokaza, zaključila da je S-metolaklor malo vjerojatno genotoksičan za ljude. No, navela je i da testiranje na fotogenotoksičnost nije provedeno.

Prema rezultatima ispitivanja genotoksičnog učinka četiri pesticida ispitivanih u ovom radu proizlazi da acetamiprid, S-metolaklor i terbutilazin imaju genotoksičan učinak na stanice AGS, no ne i na Hep G2 stanice. Ovi rezultati su u skladu s istraživanjima drugih autora koji su na istim ili drugim staničnim linijama ispitali genotoksičnost spomenutih pesticida. Na temelju sakupljenih podataka proizlazi da visoka razina metaboličke aktivnosti Hep G2 stanica značajno utječe na smanjenje količine štete uzrokovane pesticidima. Moguće je da Hep G2 stanice metaboliziraju pesticide do manje štetnih produkata ili je njihova povećana otpornost posljedica

učinkovitijeg sustava za popravak DNA te jačeg antioksidacijskog sustava za obranu od slobodnih radikala.

Naposljetku, prema rezultatima predstavljenim u ovom radu može se zaključiti da niti jedan od ispitivanih pesticida u ispitivanim koncentracijama nije pokazao citotoksično djelovanje korištenjem metode Neutral Red. Ipak, primijećeno je proliferativno djelovanje acetamiprida, S-metolaklora i nikosulfurona na Hep G2 staničnoj liniji, te acetamiprida i terbutilazina na AGS staničnoj liniji. Moguće je da navedeni pesticidi (pri niskim koncentracijama) mijenjaju stanične signale tako da potiču proliferaciju. Rezultati dobiveni ispitivanjem prooksidacijskog učinka navedenih pesticida DCFH-DA metodom sugeriraju da na staničnu liniju AGS niti jedan pesticid ne uzrokuje pojačanu generaciju ROS-ova, osim terbutilazina u najnižoj koncentraciji. Također, na staničnoj liniji Hep G2 nije primijećen prooksidacijski učinak, ali rezultati sugeriraju da terbutilazin, S-metolaklor i nikosulfuron uzrokuju smanjenje razine ROS-ova u stanici. Moguće je da u niskim koncentracijama ispitivani pesticidi djeluju kao stimulansi aktivacije i transkripcije enzima (SOD, CAT i GPx) koji sudjeluju u antioksidacijskoj obrani prevodeći slobodne radikale u bezopasne molekule. Prilikom ispitivanja prooksidacijskog učinka na modelnom plazmidu ϕ X174 RF1 uočeno je da acetamiprid i S-metolaklor ne djeluju prooksidacijski na AGS ni Hep G2 stanične linije, no terbutilazin je u najvećoj ispitivanoj koncentraciji uzrokovao značajno smanjenje superzavijene forme plazmida što upućuje na njegov prooksidacijski potencijal. Nikosulfuron pak u najvećoj ispitivanoj koncentraciji uzrokuje povećanje udjela superzavijene forme plazmida, moguće je da dolazi do interakcije nikosulfurona s DNA ili s ROS-ovima te se time sprječava oštećenje DNA. Genotoksičan učinak pesticida određen je komet testom, a rezultati testa sugeriraju da na staničnu kulturu AGS acetamiprid, terbutilazin i S-metolaklor djeluju mutageno dok nikosulfuron ne pokazuje mutageni potencijal. Međutim, niti jedan pesticid nije pokazao mutagena svojstva na staničnoj liniji Hep G2. Vjerojatno je da metabolička aktivnost Hep G2 stanica utječe na smanjenje štete uzrokovane pesticidima. Hep G2 stanice mogu metabolizirati pesticide do manje štetnih produkata ili pak posjeduju učinkovitiji sustav za popravak DNA te posjeduju jači antioksidacijski sustav za obranu od slobodnih radikala.

5. ZAKLJUČCI

1. Niti jedan od testiranih pesticida u testiranim koncentracijama nije pokazao značajno citotoksično djelovanje na staničnim linijama AGS i Hep G2. Primijećeno je proliferativno djelovanje acetamiprida, S-metolaklora i nikosulfurona na staničnoj liniji Hep G2, te acetamiprida i terbutilazina na staničnoj liniji AGS.
2. Acetamiprid, S-metolaklor i nikosulfuron nisu pokazali prooksidacijsko djelovanje, niti su povećali razinu prooksidacijskih oštećenja genetičkog materijala u prisutnosti hidroksilnih radikala.
3. Terbutilazin je u najnižoj koncentraciji na staničnoj liniji AGS uzrokovao značajno povećanje količine ROS-ova u stanici, te je u najvišoj koncentraciji u prisutnosti hidroksilnih radikala uzrokovao značajne štete na DNA plazmidu. Oboje navedneo ukazuje na njegov potencijalan prooksidacijski učinak.
4. Na staničnoj kulturi AGS acetamiprid, terbutilazin i S-metolaklor pokazuju genotoksičan potencijal. No, na Hep G2 stanicama niti jedan pesticid nije pokazao mutagena svojstva.

6. LITERATURA

Abou Diwan M, Lahimer M, Bach V, Gosselet F, Khorsi-Cauet H, Candela P (2023) Impact of Pesticide Residues on the Gut-Microbiota–Blood–Brain Barrier Axis: A Narrative Review. *Int J Mol Sci*, **24**(7):6147. <https://doi.org/10.3390/ijms24076147>

ATCC (2023a) The Global Bioresource Center: AGS. ATCC – American Type Culture Collection, <https://www.atcc.org/products/crl-1739>. Pristupljeno 14. listopada 2023.

ATCC (2023b) The Global Bioresource Center: Hep G2. ATCC – American Type Culture Collection, <https://www.atcc.org/products/hb-8065>. Pristupljeno 14. listopada 2023.

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>

Bokulić A, Budinščak Ž, Čelig D, Deždek B, Hamel D, Ivić D, i sur. (2015) Priručnik za sigurno rukovanje i primjenu sredstava za zaštitu bilja. Zagreb: Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske. https://savjetodavna.mps.hr/wp-content/uploads/2018/11/Priru%C4%8Dnik-za-sigurno-rukovanje-i-primjenu-sredstava-za-za%C5%A1titu-bilja_9_2_2015.pdf Pristupljeno 8. studenog 2024.

Bottcher AA, Albrecht A J P, Albrecht L P, Silva A F M, de Freitas J, Souza T (2022) Terbutylazine herbicide: an alternative to atrazine for weed control in glyphosate-tolerant maize. *J Environ Sci Heal B*, **57**(8), 609–616. <https://doi.org/10.1080/03601234.2022.2088015>

Çavaş T, Çinkılıç N, Vatan Ö, Yılmaz D, Coşkun M (2012) In vitro genotoxicity evaluation of acetamiprid in CaCo-2 cells using the micronucleus, comet and γH2AX foci assays, *Pestic Biochem Phys* **104** (3), 212-217. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.08.004>.

Collins A R (2004) The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol biotechnol* **26**(3), 249–261. <https://doi.org/10.1385/MB:26:3:249>

Čalić K (2021) Utjecaj crijevne mikroflore na zdravlje organizma (završni rad), Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:290950>

Davidović-Plavšić B, Kukavica B, Lukić N, Mujagić H, Šabić S, Jimenez-Gallardo C i sur. (2024) Mode of action of high concentrations of terbuthylazine and nicosulfuron in human erythrocytes in vitro. *Toxicol Environ Health Sci* **16**, 367–375. <https://doi.org/10.1007/s13530-024-00226-8>

EFSA (2007) Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance nicosulfuron. EFSA- European Food Safety Authority, EFSA Scientific Report 120, 1-91.

EFSA (2023) Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance S-metolachlor excluding the assessment of the endocrine disrupting properties. EFSA- European Food Safety Authority, EFSA Journal **21** (2), e07852. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.7852>

EFSA (2024) Statement on the toxicological properties and maximum residue levels of acetamiprid and its metabolites. EFSA- European Food Safety Authority, EFSA Journal **22** (5), e8759. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2024.8759>

Freshney I (2010) Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey.

Giambò F, Teodoro M, Costa C, Fenga C (2021) Toxicology and Microbiota: How Do Pesticides Influence Gut Microbiota? A Review. *Int J Environ Res Pub He* **18** (11):5510. <https://doi.org/10.3390/ijerph18115510>

Grisham MB (2013) Methods to detect hydrogen peroxide in living cells: Possibilities and pitfalls *Comp Biochem Phys A* **165** (4), 429-438 <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.02.003>.

Hrvatska enciklopedija (2024) Pesticidi, <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=47818>. Pristupljeno 14. listopada 2024.

Ighodaro O M, Akinloye O A (2018) First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid, *Alexandria J Med*, **54** (4), 287-293. ISSN 2090-5068, <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>.

Imamura T, Yanagawa Y, Nishikawa K, Matsumoto N, Sakamoto T (2010) Two cases of acute poisoning with acetamiprid in humans. *Clin Toxicol* **48** (8): 851–53.

<https://doi.org/10.3109/15563650.2010.517207>

Jarak M (2011) Metode za procjenu genotoksičnosti (završni rad), Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, citirano: 12.11.2024., <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:364457>

Kara M, Öztaş E., Özhan G (2020) Acetamiprid-induced Cyto- and Genotoxicity in the AR42J Pancreatic Cell Line. Turk j pharm sci, **17**(5), 474–479. <https://doi.org/10.4274/tips.galenos.2019.89719>

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 Longev*, 1279250. <https://doi.org/10.1155/2019/1279250>

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

Mahmutović A (2015) Crijevna mikrobiota u pacijenata s poremećajima probavnog trakta (diplomski rad), Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:415951>

National Center for Biotechnology Information (2024) PubChem Compound Summary for CID 213021, Acetamiprid, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acetamiprid> Pristupljeno 10. listopada 2024.

National Center for Biotechnology Information (2024) PubChem Compound Summary for CID 73281, Nicosulfuron, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Nicosulfuron> Pristupljeno 10. listopada 2024.

National Center for Biotechnology Information (2024) PubChem Compound Summary for CID 11140605, S-Metolachlor, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/S-Metolachlor> Pristupljeno 10. listopada 2024.

National Center for Biotechnology Information (2024) PubChem Compound Summary for CID 22206, Terbutylazine, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Terbutylazine> Pristupljeno 10. listopada 2024.

Nikoloff N, Escobar L, Soloneski S, Larramendy M L (2013) Comparative study of cytotoxic and genotoxic effects induced by herbicide S-metolachlor and its commercial formulation Twin Pack Gold® in human hepatoma (HepG2) cells. *Food Chem Toxicol*, **62**, 777–781. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.10.015>.

Phogat A, Singh J, Kumar V, Malik V (2022) Toxicity of the acetamiprid insecticide for mammals: a review. *Environ Chem Lett* **20**, 1453–1478. <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01353-1>

Repetto G, del Peso A, Zurita JL (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>

Režan L (2024) Optimiziranje uvjeta mjerenja superoksidnog radikala fluorescentnom mikroskopijom (diplomski rad), Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, citirano: 13.11.2024., <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:435264>

Şenyildiz M, Kilinc A, Sibel O (2018) Investigation of the genotoxic and cytotoxic effects of widely used neonicotinoid insecticides in HepG2 and SH-SY5Y cells. *Toxicol Ind Health*. <https://doi.org/10.1177/0748233718762609>

Shaner DL, Brunk G, Belles D, Westra P, Nissen S (2006) Soil dissipation and biological activity of metolachlor and S-metolachlor in five soils. *Pest Manag Sci*, **62**(7), 617–623. doi:10.1002/ps.1215

Vlada RH. (2024). Povlačenje s tržišta Republike Hrvatske sredstva za zaštitu bilja na osnovi aktivne tvari S-metolaklor. Pristupljeno na <https://poljoprivreda.gov.hr/vijesti/povlacenje-s-trzista-republike-hrvatske-sredstva-za-zastitu-bilja-na-osnovi-aktivne-tvari-s-metolaklor/6758>

Wang R, Yang X, Wang T, Kou R, Liu P, Huang Y, Chen C (2023) Synergistic effects on oxidative stress, apoptosis and necrosis resulting from combined toxicity of three commonly used pesticides on HepG2 cells, *Ecotox Environ Safe*, **263**, 115237. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.115237>.

Yuan X, Pan Z, Jin C, Ni Y, Fu Z, Jin, Y (2019) Gut microbiota: an underestimated and unintended recipient for pesticide-induced toxicity. *Chemosphere* **227**, 425-434. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.04.088>.

Zhong J, Wu S, Chen W-J, Huang Y, Lei Q, Mishra S, Bhatt P, Chen S (2023) Current insights into the microbial degradation of nicosulfuron: Strains, metabolic pathways, and molecular mechanisms. *Chemosphere* **326**, 138390. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138390>.

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* **25**, 19065–19081. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2046-7>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Mariana Lenček 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.

Mariana Lenček

Vlastoručni potpis