

Određivanje genotoksičnog učinka glifosata, kaptana, spinosada i deltametrina na humanim kontinuiranim staničnim linijama karcinoma želuca i jetre

Shahini, Fiona

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:159:629873>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-09**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2024.

Fiona Shahini

**ODREĐIVANJE GENOTOKSIČNOG UČINKA
GLIFOSATA, KAPTANA, SPINOSADA I
DELTAMETRINA NA HUMANIM
KONTINUIRANIM STANIČNIM LINIJAMA
KARCINOMA 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 na 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.

ZAHVALA

Prvenstveno se zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Kseniji Durgo na prenesenom znanju i vještinama prilikom izrade diplomskog rada. Hvala Vam na strpljenju, razumijevanju i neprekidnoj podršci koju ste mi pružili. Također, zahvaljujem se i dr. sc. Ani Huđek Turković na pomoći i mnogobrojnim korisnim savjetima koji su mi olakšali pisanje ovog rada.

Želim zahvaliti i svojim prijateljima koji su mi uljepšali godine studiranja i učinili ih nezaboravnima.

Od srca hvala mojim roditeljima i bratu na svoj pruženoj podršci, razumijevanju i ljubavi. Hvala vam što ste uvijek bili uz mene.

Na kraju, hvala Ti za sve.

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: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Upravljanje sigurnošću hrane

ODREĐIVANJE GENOTOKSIČNOG UČINKA GLIFOSATA, KAPTANA, SPINOSADA I DELTAMETRINA NA HUMANIM KONTINUIRANIM STANIČNIM LINIJAMA KARCINOMA ŽELUCA I JETRE

Fiona Shahini, univ. bacc. ing. biotechn.
0114030705

Sažetak: Pesticidi su tvari koje se upotrebljavaju za uništavanje ili kontrolu štetnih organizama, uključujući nepoželjne kukce, životinje i biljke te organizme koji prenose bolesti. Zbog masovne upotrebe pesticida i izloženosti opće populacije bitno je istražiti njihove potencijalne toksične učinke. U ovom su radu testirana četiri pesticida: herbicid glifosat, fungicid kaptan te insekticidi spinosad i deltametrin pri koncentracijama koje su okolišno značajne i koje se mogu naći u vodi, tlu, zraku, kao i u tretiranoj hrani. Ispitan je njihov citotoksični, proliferacijski, prooksidacijski i genotoksični učinak na kontinuiranim humanim staničnim linijama adenokarcinoma epitela želuca- AGS i hepatocelularnog karcinoma jetre- Hep G2. Dobiveni rezultati pokazali su da niti jedan testirani pesticid ne djeluje citotoksično ni prooksidacijski na ispitivanim staničnim linijama. Testirani pesticidi ne uzrokuju promjene u proliferativnoj sposobnosti stanica, međutim glifosat i kaptan pri najvišim koncentracijama pokazuju inhibitorni učinak na staničnu diobu. Samo je glifosat pokazao povećanje parametara genotoksičnih učinaka, ukazujući na potencijalno genotoksično djelovanje.

Ključne riječi: pesticidi, stanične linije AGS i Hep G2, genotoksičnost, citotoksičnost, prooksidacijsko djelovanje

Rad sadrži: 49 stranica, 17 slika, 1 tablicu, 44 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. izv. prof. dr. sc. Kristina Radošević (zamjenski član)

Datum obrane: 27. rujna 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: Food Technology

Graduate university study programme: Food Safety Management

DETERMINATION OF THE GENOTOXIC EFFECT OF GLYPHOSATE, CAPTAN, SPINOSAD AND DELTAMETRIN ON HUMAN CONTINUOUS CELL LINES OF STOMACH AND LIVER CARCINOMA

Fiona Shahini, univ. bacc. ing. biotechn.
0114030705

Abstract: Pesticides are substances used to destroy or control harmful organisms, including unwanted insects, animals, plants, and disease-transmitting organisms. Due to the widespread use of pesticides and their exposure to the general population, it is essential to investigate their potential toxic effects. This study tested four pesticides: the herbicide glyphosate, the fungicide captan, and the insecticides spinosad and deltamethrin, at environmentally relevant concentrations found in water, soil, air, and treated food. Their cytotoxic, proliferative, pro-oxidative, and genotoxic effect was examined on continuous human cell lines of gastric epithelium adenocarcinoma- AGS and liver hepatocellular carcinoma- Hep G2. The results showed that none of the tested pesticides exhibited cytotoxic or pro-oxidative effects on the examined cell lines. The tested pesticides did not alter cell proliferative capacity, although glyphosate and captan at the highest concentrations showed an inhibitory effect on cell division. Only glyphosate showed an increase in genotoxic parameters, indicating a potential genotoxic effect.

Keywords: pesticides, AGS and Hep G2 cell lines, genotoxicity, cytotoxicity, prooxidative effect

Thesis contains: 49 pages, 17 figures, 1 table, 44 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)
4. Kristina Radošević, PhD, Associate professor (substitute)

Thesis defended: September 27th, 2024

Sadržaj

| | |
|--|-----------|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO | 2 |
| 2.1. PESTICIDI..... | 2 |
| 2.2. UTJECAJ PESTICIDA NA LJUDSKO ZDRAVLJE..... | 3 |
| 2.3. ODABRANI PESTICIDI ZA EKSPERIMENTALNO ISTRAŽIVANJE | 4 |
| 2.3.1. Glifosat..... | 4 |
| 2.3.2. Kaptan..... | 6 |
| 2.3.3. Spinosad | 8 |
| 2.3.4. Deltametrin..... | 10 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 12 |
| 3.1. MATERIJALI..... | 12 |
| 3.1.1. Biološki test sustav | 12 |
| 3.1.2. Istraživani spojevi | 13 |
| 3.1.3. Kemikalije..... | 14 |
| 3.1.4. Otopine | 15 |
| 3.1.5. Laboratorijska oprema..... | 18 |
| 3.1.5.1. <i>Laboratorijski uređaji</i> | 18 |
| 3.1.5.2. <i>Laboratorijski pribor</i> | 18 |
| 3.2. METODE..... | 19 |
| 3.2.1. Određivanje citotoksičnog učinka metodom Neutral Red..... | 19 |
| 3.2.2. Određivanje proliferacijskog učinka klonogenim testom..... | 20 |
| 3.2.3. Određivanje prooksidacijskog učinka..... | 21 |
| 3.2.3.1. <i>Određivanje prooksidacijskog učinka metodom DCFH-DA</i> | 21 |
| 3.2.3.2. <i>Određivanje prooksidacijskog učinka na modelnom plazmidu ϕX174 RF1</i> | 22 |
| 3.2.4. Određivanje genotoksičnog učinka komet testom..... | 23 |
| 3.2.5. Obrada podataka..... | 25 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 26 |
| 4.1. ANALIZA CITOTOKSIČNOG UČINKA PESTICIDA METODOM NEUTRAL RED..... | 26 |
| 4.2. ANALIZA PROLIFERACIJSKOG UČINKA PESTICIDA KLONOGENIM TESTOM... 29 | 29 |
| 4.3. ANALIZA PROOKSIDACIJSKOG UČINKA PESTICIDA..... | 32 |
| 4.3.1. Analiza prooksidacijskog učinka pesticida metodom DCFH-DA..... | 32 |
| 4.3.2. Analiza prooksidacijskog učinka pesticida na modelnom plazmidu ϕ X174 RF1 ... | 35 |
| 4.4. ANALIZA GENOTOKSIČNOG UČINKA PESTICIDA KOMET TESTOM | 39 |

| | |
|---------------------|----|
| 5. ZAKLJUČCI..... | 44 |
| 6. LITERATURA | 45 |

1. UVOD

Pesticidi predstavljaju ključan alat u modernoj poljoprivredi i industriji za kontrolu štetnih organizama. Iako su pesticidi neophodni za očuvanje poljoprivrednih prinosa i osiguranje prehrambene sigurnosti, njihova široka upotreba nosi sa sobom značajne zdravstvene i ekološke rizike. Pesticidi se prema namjeni dijele na različite skupine, a svaka od tih skupina ima specifično djelovanje na ciljne organizme. No zbog svoje kemijske prirode, pesticidi često utječu i na neciljane vrste, uključujući i ljude. Ljudi mogu biti izloženi pesticidima putem hrane, vode, zraka, te tijekom rada u poljoprivredi ili drugim industrijama koje koriste ove kemikalije. Izloženost pesticidima može biti akutna, što podrazumijeva kratkotrajnu izloženost visokim dozama, ili kronična, koja uključuje dugotrajnu izloženost nižim razinama pesticida. Učinci pesticida na ljudsko zdravlje mogu biti različiti i ovise o vrsti pesticida, dozi izloženosti, načinu unosa u tijelo i trajanju izloženosti. S obzirom na sve veće izazove koje donosi upotreba pesticida, postavlja se pitanje kako osigurati njihovu sigurnu upotrebu. Regulacija pesticida, koja uključuje rigorozno testiranje i procjenu rizika, ključna je za minimiziranje štetnih učinaka. Samo kroz pažljivo upravljanje i primjenu načela održive poljoprivrede moguće je postići ravnotežu između koristi i rizika, te osigurati dugoročno zdravlje populacije.

Cilj ovog diplomskog rada je bio istražiti nekoliko vrsta toksičnih učinaka na humanim stanicama koje mogu uzrokovati pesticidi. S obzirom da su pesticidi jedni od rijetkih kemijskih spojeva s toksičnim djelovanjem koji se masovno upotrebljavaju bitno je pratiti eventualne posljedice primjene ovakvih spojeva. Stoga, ovaj se rad fokusirao na kvantifikaciju citotoksičnog, proliferacijskog, prooksidacijskog i genotoksičnog učinka četiri široko korištena pesticida: glifosata, kaptana, spinosada i deltametrina, pri koncentracijama koje su okolišno značajne i prisutne u vodi, tlu, zraku te hrani tretiranoj tim spojevima. Istraživanje je provedeno na kontinuiranim humanim staničnim linijama adenokarcinoma epitela želuca (AGS) i hepatocelularnog karcinoma jetre (Hep G2). U svrhu određivanja citotoksičnog učinka pesticida korištena je Neutral Red metoda, dok je proliferacijski učinak pesticida određen klonogenim testom. Prooksidacijski učinak pesticida ispitan je pomoću DCFH-DA metode te na modelnom plazmidu ϕ X174 RF1. Za određivanje genotoksičnog učinka pesticida korišten je komet test.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PESTICIDI

Pesticidi su tvari uglavnom dobivene kemijskom sintezom, ali mogu biti i biološkog podrijetla, a koriste se u poljoprivredi, šumarstvu te nepoljoprivrednim i javnim površinama za kontrolu i suzbijanje štetnih organizama bilja kao što su biljni patogeni i bolesti, kukci, nematode, grinje, štetni glodavci i korovi te drugi štetni organizmi bilja. Prema namjeni pesticidi se dijele na: insekticide (suzbijaju kukce), akaricide (suzbijaju grinje), nematocide (suzbijaju fitoparazitske nematode), limacide (suzbijaju puževe), korvifuge (odbijaju napad ptica – repelenti), rodenticide (suzbijaju glodavce), fungicide (suzbijaju fitopatogene gljive), herbicide (suzbijaju korove) i regulatore rasta (utječu na životne procese bilja drukčije od hranjiva) (Pathak i sur., 2022; Bokulić i sur., 2015).

Za uspješno sprječavanje ili smanjenje šteta od štetnih organizama, ključno je prvo prepoznati i identificirati vrstu štetnika. Na temelju poznavanja njihovih bioloških, ekoloških i drugih karakteristika, potrebno je odabrati najprikladnije mjere zaštite bilja. Od druge polovice 20. stoljeća, kemijska sredstva za zaštitu bilja postala su najvažniji način borbe protiv štetnih organizama. Ipak, brojni toksikološki, ekotoksikološki, ekološki i ekonomski razlozi ukazuju na potrebu racionalizacije njihove upotrebe. Primjenom načela integrirane zaštite bilja, upotreba kemijskih sredstava je smanjena na minimum, čime se smanjuje rizik za ljude, korisne organizme i okoliš. Pesticidi se trebaju koristiti samo kad je to prijeko potrebno ili u skladu s pragovima štetnosti, ako su definirani. Odluke o upotrebi pesticida moraju se temeljiti na informacijama prikupljenim na terenu kroz redovite preglede usjeva i/ili na temelju informacija prognoznih službi, u skladu s načelima dobre poljoprivredne i okolišne prakse. Svaki odabir i primjenu pesticida treba provoditi stručno, prema uputama koje dolaze s proizvodom, te u skladu s načelima integrirane zaštite bilja (Bokulić i sur., 2015).

Pesticidi se sastoje od aktivne tvari i dodatnih tvari (koformulanti) u određenim koncentracijama koje su zajedno pomiješane. Aktivna tvar je glavni sastojak i može imati opće ili specifično djelovanje na štetne organizme, biljke, dijelove biljaka ili biljne proizvode. Najčešće su aktivne tvari kemijski spojevi, mikroorganizmi, virusi ili biljni ekstrakti, a svaka od njih ima svoj kemijski naziv prema međunarodno dogovorenoj IUPAC nomenklaturi. Budući da su ti nazivi često složeni i nepraktični za širu upotrebu, za svaku tvar postoji pojednostavljeni trivijalni naziv, odobren od strane Međunarodne organizacije za normizaciju (ISO). Osim aktivne tvari, važnu ulogu imaju i dodatne tvari koje mogu spriječiti ili smanjiti fitotoksične učinke na određene biljke (zaštitne tvari) ili poboljšati djelovanje aktivne tvari (sinergističke tvari). Ove dodatne tvari

ne moraju biti navedeni na etiketi, osim ako posjeduju toksikološka svojstva, u kojem slučaju se njihova koncentracija izražava unutar propisanog raspona vrijednosti (Bokulić i sur., 2015).

Svaki pesticid koji se plasira na tržište u Hrvatskoj mora biti registriran ili imati odgovarajuću dozvolu Ministarstva poljoprivrede. Mora se nalaziti isključivo u originalnom pakiranju, koje je označeno i opremljeno etiketom s propisanim podacima na hrvatskom jeziku. Trgovačko ime pesticida je zakonom zaštićeno i za korisnika prepoznatljivo, a kratice i brojevi koji slijede iza trgovačkog naziva najčešće označavaju vrstu formulacije i količinu aktivne tvari u pesticidu. Primjerice, naziv „Insekticid G 10“ označava da je riječ o formulaciji u obliku granula koja sadrži 10 % aktivne tvari (Bokulić i sur., 2015).

2.2. UTJECAJ PESTICIDA NA LJUDSKO ZDRAVLJE

Pesticidi su zaslužni za poboljšanje standarda ljudskog zdravlja kontroliranjem bolesti koje se prenose putem vektora. Međutim, njihova kontinuirana i neselektivna upotreba dovela je do ozbiljnih zdravstvenih problema. Ljudi, osobito dojenčad i djeca, vrlo su osjetljivi na štetne učinke pesticida kao posljedica njihove nespecifične prirode i neprikladne primjene. Kako se upotreba pesticida povećavala tijekom posljednjih nekoliko desetljeća, tako se i vjerojatnost izloženosti tim kemikalijama znatno povećala. Učinci pesticida na ljudsko zdravlje vrlo su varijabilni. Mogu se pojaviti unutar nekoliko dana i biti trenutni, ili se mogu manifestirati nakon nekoliko mjeseci ili godina, te se stoga nazivaju kroničnim ili dugoročnim učincima (Mahmood i sur., 2016).

Ljudsko tijelo može biti izloženo pesticidima na izravan ili neizravan način. Kada se pesticidi koriste na usjevima, ljudi dolaze u izravan kontakt s njima, što može imati utjecaj na kožu, oči, usta i dišni sustav te uzrokovati akutne reakcije kao što su glavobolja, iritacija, povraćanje, kihanje i osipi na koži. Težina tih reakcija ovisi o vremenu izloženosti i koncentraciji pesticida. Neizravna izloženost uključuje konzumaciju povrća i voća uzgojenog u tlu kontaminiranom pesticidima. Navedena konzumacija povećava koncentraciju toksina unutar tijela i može biti uzrok kroničnih bolesti poput raka, nekroze, astme, reproduktivnih poremećaja, srčanih bolesti, neurotoksičnosti, dijabetesa i slično (Kalyabina i sur., 2021).

Kvarterni dušikovi spojevi poput herbicida parakvata povezani su s neurodegenerativnim bolestima poput Parkinsonove bolesti, no njihovi molekularni mehanizmi još uvijek nisu dobro poznati (Franco i sur., 2010). Slično tome, skupina pesticida karbamata inhibira aktivnost acetilkolinesteraze i koristi se kao biomarker neurotoksičnosti (Gupta i sur., 2016). Problemi s rakom uzrokovani su različitim pesticidima, a rak dojke je najčešći među svim

vrstama raka i povezan je s organofosforinim pesticidima (malation i paration) koji utječu na stanični rast i proliferaciju. Slično, muskarinski M2 receptori na parasimpatičkim neuronima koji nadražuju glatke mišiće dišnih putova uključeni su u astmu uzrokovanu organofosforinim pesticidima (Calaf, 2021). Zabilježeno je da pojedini pesticidi također smanjuju plodnost i uzrokuju anomalije genitalnog trakta muškaraca i žena utječući na djelovanje endokrinih hormona te vrijeme njihovog otpuštanja, kao i imitirajući te hormone. Prema nekim istraživanjima, organofosforni pesticidi također smanjuju aktivnost paraoksonaze i povećavaju rizik od bolesti koronarnih arterija (Kabir i sur., 2015).

2.3. ODABRANI PESTICIDI ZA EKSPERIMENTALNO ISTRAŽIVANJE

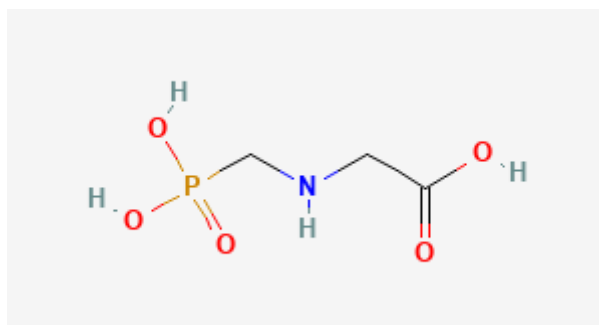
U ovom poglavlju će biti ukratko opisani pesticidi koji su testirani u eksperimentalnom dijelu rada. Riječ je o jednom herbicidu (glifosat), jednom fungicidu (kaptan) i dva insekticida (spinosad i deltametrin).

2.3.1. Glifosat

Glifosat je jedan od najprodavanijih i najpoznatijih poljoprivrednih herbicida. Koristi se širom svijeta za suzbijanje jednogodišnjih i višegodišnjih korova, te je poznat po svom arboricidnom djelovanju. Prvi ga je sintetizirao švicarski kemičar Henri Martin iz farmaceutske tvrtke Cilag, ali tada nije bio ispitivan u svrhu korištenja kao herbicida. Glifosat je u početku bio razvijen kao kelator, tvar koja na sebe veže metale poput magnezija, kalcija i mangana (Soares i sur., 2021). Njegova herbicidna svojstva otkrio je i testirao John E. Franz iz tvrtke Monsanto dvadeset godina kasnije. Otkrio je da se glifosat veže za mangan i time inhibira enzim koji kod biljaka i bakterija sudjeluje u sintezi triju esencijalnih aminokiselina: tirozina, fenilalanina i triptofana. Ovo otkriće omogućilo je razvoj glifosata kao herbicida širokog spektra, što je dovelo do njegovog komercijalnog uspjeha. Glifosat je patentiran 1970. godine od strane tvrtke Monsanto, a prvi herbicid na bazi glifosata, Roundup, predstavljen je 1974. godine. Danas se herbicidi na bazi glifosata proizvode diljem svijeta, a stotine njih je komercijalizirano pod različitim imenima (Richmond, 2018).

Glifosat, poznat i kao *N*-(fosfonometil)-glicin, pripada skupini amino kiselinskih pesticida. Molekulska formula glifosata je $C_3H_8NO_5P$, a njegova molekulska masa iznosi 169,074 g/mol. Kemijska struktura glifosata prikazana je na slici 1. Molekula glifosata vrlo je mala te sadrži

jednu amino skupinu (bazična) i tri hidroksilne skupine (kisele) koje se mogu ionizirati. Pojavljuje se u obliku bijelih kristala bez mirisa, vrlo dobro topljivih u vodi. Pri fiziološkim pH vrijednostima, glifosat se nalazi u anionskom obliku te u tom obliku ima sposobnost vezanja dvovalentnih kationa metala. Glavni metabolit glifosata kod životinja i biljaka je α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionska kiselina (AMPA), a ostali metaboliti koji se mogu pojaviti su acetamidometilfosfonska kiselina (*N*-acetil-AMPA) i *N*-acetil(fosfonometil)glicin (*N*-acetil-glifosat). Kao i glifosat, njegovi metaboliti se dobro otapaju u vodi (Duke, 2020).



Slika 1. Kemijska struktura glifosata (National Center for Biotechnology Information, 2024)

Djelovanje glifosata započinje njegovim nanošenjem, odnosno špricanjem na lišće biljaka kroz koje se apsorbira u biljku. Glifosat djeluje na način da inhibira enzim odgovoran za sintezu aromatskih aminokiselina. Unutar biljke, glifosat sprječava odvijanje ključnog koraka u šikiminskom putu, odnosno inhibira enzim 5-enolpiruvilšikimat-3-fosfat sintazu (EPSPS). EPSPS katalizira pretvorbu fosfoenolpiruvata (PEP) u 5-enolpiruvilšikimat-3-fosfat (EPSP). Kao analog supstrata PEP-a, glifosat inhibira enzim EPSPS te se veže na katalitičko mjesto na enzimu umjesto PEP-a, čime sprječava stvaranje ključnog intermedijera. Inhibicija ovog koraka sprječava sintezu triptofana, fenilalanina i tirozina, esencijalnih aminokiselina potrebnih za izgradnju proteina. Zbog nemogućnosti stvaranja proteina, listovi biljke počinju se sušiti te dolazi do njezinog propadanja (Denžić Lugomer i sur., 2019).

Aktivna tvar glifosat pripada neselektivnim herbicidima jer inhibira enzim EPSPS kod svih biljaka višeg reda. Također, ima vrlo širok raspon djelovanja na različite biljne vrste. Njegova jedinstvena sposobnost inhibiranja enzima EPSPS čini ga posebnim i idealnim herbicidom. Šikiminska kiselina, koja se može pronaći u gljivicama i bakterijama, preteča je aromatskih aminokiselina te zbog toga glifosat pokazuje negativno djelovanje i na ove mikroorganizme. Ovaj metabolički put, put šikiminske kiseline, odvija se u bakterijama, gljivama i biljkama, ali ne postoji kod životinja i ljudi. Iz tog razloga, kod organizama višeg reda se ne očekuje izravan negativan utjecaj glifosata. Međutim, mnoga istraživanja dokazuju suprotno (Denžić Lugomer i sur., 2019).

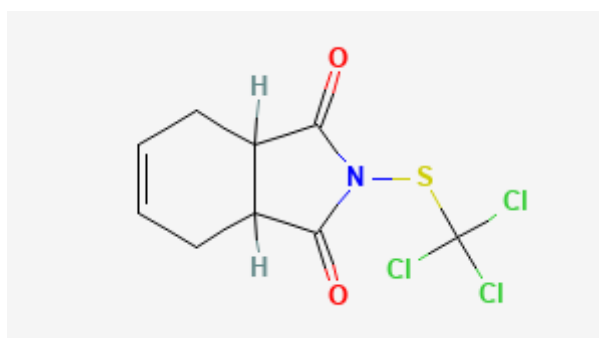
Posljednjih godina sve je više istraživanja usmjereno na utjecaj glifosata na ljude, životinje i okoliš. Potvrđeno je da se herbicidi na bazi glifosata nalaze u hrani i piću koje ljudi konzumiraju, krvi, vodi, urinu i cjepivima. Dobrovoljnim testiranjem zastupnika Europskog parlamenta utvrđeno je da svi ispitanici imaju određenu koncentraciju glifosata u urinu. Veće količine glifosata zabilježene su u urinu osoba koje konzumiraju konvencionalnu hranu i kod oboljelih od kroničnih bolesti. Puno manje koncentracije glifosata u mokraći su pak detektirane kod osoba koje se hrane organskom hranom (Denžić Lugomer i sur., 2019). Druga istraživanja pokazuju da se prisutnost glifosata u organizmu može povezati s problemima gastrointestinalnog sustava te da je povećan rizik od nastanka celijakije. Također, ispostavilo se da izloženost glifosatu uzrokuje oksidativni stres i oštećenja jetre uslijed povećane koncentracije slobodnih radikala kisika. Kada je riječ o kancerogenosti, 2015. godine je Međunarodna agencija za istraživanje raka (engl. *International Agency for Research on Cancer*, IARC) klasificirala glifosat u skupinu 2A, što znači da je vjerojatno kancerogen za ljude. Međutim, ovaj zaključak IARC-a bio je kritiziran od strane znanstvenih zajednica zbog nedovoljnih dokaza. EFSA je iste godine naglasila da ne postoji jasna poveznica između glifosata i raka kod ljudi. Godinu kasnije, FAO i WHO zaključili su da glifosat nije kancerogen te da količine glifosata koje se unesu u organizam putem hrane ne utječu na razvoj raka kod ljudi. Također, FAO je 2016. godine došao do zaključka da glifosat nema teratogene učinke, odnosno ne uzrokuje malformacije fetusa. Budući da postoji neslaganje unutar znanstvene zajednice o tome je li glifosat toksičan i štetan za ljudsko zdravlje i okoliš, potrebno je provesti dodatna istraživanja njegova utjecaja na ljude, a posebnu pažnju treba posvetiti i djelovanju njegovih metabolita (Soares i sur., 2021).

Kao i u ostatku svijeta, herbicidi na bazi glifosata su najprodavaniji herbicidi i u Hrvatskoj. U Hrvatskoj je na popisu Ministarstva poljoprivrede registriran 21 pripravak koji sadrži glifosat kao aktivnu tvar. Pripravci na bazi glifosata dozvoljeni su za korištenje u nasadima maslina, agruma, vinove loze, kao i u nasadima koštičavog, jezgričavog i lupinastog voća. Međutim, glifosat se može početi koristiti tek kada je nasad stariji od 4 godine. Također je dozvoljen za suzbijanje korova prije pripreme tla za sjetvu ili sadnju te nakon berbe ili žetve prethodnih nasada ili usjeva. Često se koristi i za uređenje travnjaka, okućnica, te područja uz ceste, staze ili puteve (Ostojić i sur., 2018).

2.3.2. Kaptan

Kaptan je fungicid iz grupe ftalimida, prvi puta registriran 1951. godine (Song, 2014). Molekulska formula kaptana je $C_9H_8Cl_3NO_2S$, a IUPAC-ov naziv glasi 2-(triklorometilsulfanil)-

3a,4,7,7a-tetrahydroizoindol-1,3-dion (National Center for Biotechnology Information, 2024). Molekulska masa kaptana iznosi 300,6 g/mol, a njegova kemijska struktura prikazana je na slici 2. Riječ je o bijeloj kristalnoj tvari koja je vrlo slabo topiva u vodi i većini organskih otapala. Topiv je u kloroformu, slabo hlapiv, a u suhom stanju ostaje stabilan izlaganjem svjetlosti i toplini. U vodenoj smjesi na 1000 °C, kao i u alkalnom mediju se brzo razlaže. Budući da je slabo topiv u vodi, ostatke je moguće samo djelomično ukloniti pranjem. Međutim, kuhanje i drugi prerađivački postupci uzrokuju njegovu brzu razgradnju (Kipčić, 2010). Fungicid kaptan se, nakon oralne izloženosti, brzo metabolizira u tijelu, stvarajući dva metabolita koja se mogu detektirati u urinu: tetrahidroftalimid (THPI) i 2-tio-tiazolidin-4-karboksilna kiselina (TTCA) (National Center for Biotechnology Information, 2024).



Slika 2. Kemijska struktura kaptana (National Center for Biotechnology Information, 2024)

Ciljna mjesta djelovanja kaptana su brojna i nisu u potpunosti identificirana. Njegova lokalna aktivnost očituje se na više mjesta zbog brze reakcije s tiolnim skupinama (tj. sulfhidrilnim, -SH skupinama) prisutnima u mnogim enzimima i drugim biološki važnim molekulama, poput cisteinskog dijela glutationa (EFSA, 2024).

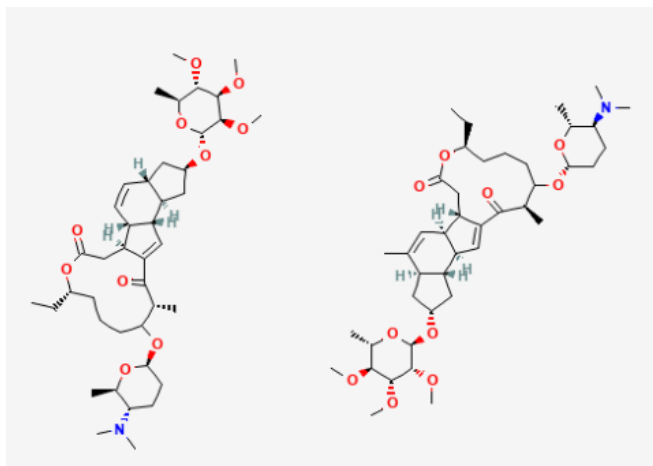
Općenito, ftalimidi su poznati po svojoj sposobnosti da djeluju na više različitih načina, pružajući kontaktno i protektivno djelovanje, odnosno djeluju kao nesistemiци. Budući da djeluju površinski, često se kombiniraju sa sistemičnim fungicidima za učinkovitiju zaštitu biljaka. Nadalje, imaju mali rizik za razvoj rezistentnosti i ne izazivaju unakrsnu rezistentnost kada se koriste u kombinaciji s drugim fungicidima, kao što su oni na bazi bakra i sumpora ili fungicidi iz grupa ditiokarbamata, kloronitrila, sulfamida, guanidina i kinona (Bažok i sur., 2020). Kaptan se pretežno koristi u poljoprivredi kao fungicid za suzbijanje bolesti na mnogim voćnim, ukrasnim i povrtnim kulturama. Također se koristi i kao tretman sjemena kako bi zaštitio mlade biljke od truljenja i polijeganja. Kaptan svoju primjenu nalazi i u prahovima za ukorjenjivanje biljaka, a koristi se i kao fungicid u ljepilima za tapete (National Center for Biotechnology Information, 2024). Kaptan je za upotrebu u EU odobren na jabukama, šljivama, trešnjama,

breskvama, nektarinama, te na jagodama uzgajanim na otvorenom i u staklenicima. Primjenjuje se i kao preventivni fungicid, prije pojave patogenih gljiva (EFSA, 2024).

U slučaju prekomjerne izloženosti ljudi prilikom rukovanja kaptanom, potencijalni simptomi su iritacija očiju, kože i gornjih dišnih puteva, zamagljen vid, osjetljivost kože, dermatitis, otežano disanje, proljev te povraćanje (National Center for Biotechnology Information, 2024). Djelovanje kaptana je proučavano kroz niz toksikokinetičkih istraživanja. Kaptan se brzo apsorbira iz gastrointestinalnog trakta (> 80 %) i metabolizira, bez znakova nakupljanja u tijelu. Većina se izlučuje mokraćom. U istraživanju u kojem su štakori oralno primili kaptan, trećina doze izlučila se izmetom, a polovica urinom unutar 24 sata. Kao posljedica izuzetno kratkog poluživota kaptana (u ljudskoj krvi iznosi 0,97 s) koja proizlazi iz brze reaktivnosti s tiolima, teško je postići i ispitati njegovu akutnu sistemsku toksičnost oralnim putem. Toksični učinci ograničeni su na mjesta prvog kontakta, kao što su sluznica i površina crijeva, zbog brzog oslobađanja tiosfena i njegove reaktivnosti s tiolima. EFSA je pak 2020. godine donijela zaključak da za kaptan nije utvrđen potencijal za reproduktivnu toksičnost, no da bi njegovi metaboliti, THPI i TTCA, trebali postati toksikološki relevantni budući da njihov potencijal za reproduktivnu toksičnost još nije istražen (EFSA, 2024).

2.3.3. Spinosad

Spinosini su biološki aktivne tvari dobivene fermentacijom iz gram-pozitivne filamentne bakterije *Saccharopolyspora spinosa*, koja je prvi put izolirana iz uzorka tla na Karibima 1982. godine (Santos i Pereira, 2020). Spinosad je insekticid složene kemijske strukture, koji se sastoji od mješavine dva vrlo slična kemijska spoja, spinosina A i spinosina D, u omjeru 5:1. IUPAC-ov naziv za spinosin A glasi (1*S*,2*R*,5*S*,7*R*,9*R*,10*S*,14*R*,19*S*)-15-[(2*R*,5*S*,6*R*)-5-(dimetilamino)-6-metiloksan-2-il]oksi-19-etil-14-metil-7-[(2*R*,3*R*,4*R*,5*S*,6*S*)-3,4,5-trimetoksi-6-metiloksan-2-il]oksi-20-oksatetraciklo[10.10.0.0²,10.0⁵,9]dokoza-3,11-dien-13,21-dion, dok za spinosin D glasi (1*S*,2*S*,5*R*,7*S*,9*S*,10*S*,14*R*,19*S*)-15-[(2*R*,5*S*,6*R*)-5-(dimetilamino)-6-metiloksan-2-il]oksi-19-etil-4,14-dimetil-7-[(2*R*,3*R*,4*R*,5*S*,6*S*)-3,4,5-trimetoksi-6-metiloksan-2-il]oksi-20-oksatetraciklo[10.10.0.0²,10.0⁵,9]dokoza-3,11-dien-13,21-dion. Molekulska formula spinosada je C₈₃H₁₃₂N₂O₂₀, a molekulska masa iznosi 1477,93 g/mol. Kemijska struktura spinosada prikazana je na slici 3. Pojavljuje se u obliku kristala (bezbojni ili krem boje) bez mirisa, netopljivih u vodi (National Center for Biotechnology Information, 2024).



Slika 3. Kemijska struktura spinosada: spinosin A i spinosin D (National Center for Biotechnology Information, 2024)

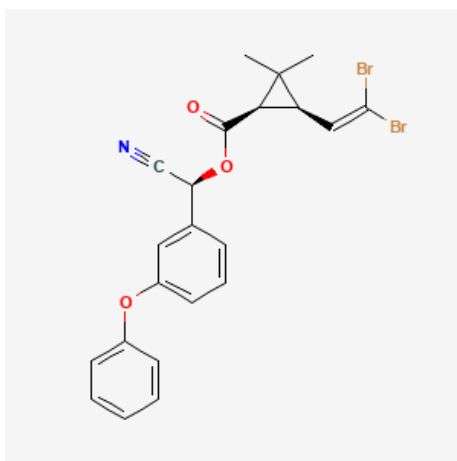
Spinosini djeluju djeluju želučano i kontaktno te su učinkoviti insekticidi protiv različitih vrsta kukaca. Zbog svoje široke primjene i specifičnog mehanizma djelovanja, spinosini su postali značajna alternativa konvencionalnim insekticidima u integriranoj zaštiti bilja, uz rijetku pojavu rezistentnosti. Također, nema unakrsne rezistentnosti s piretroidima, organofosforinim insekticidima i regulatorima rasta i razvoja kukaca. Spinosini su ekološki prihvatljivi jer su učinkoviti u malim dozama i uglavnom ne štete korisnim insektima i drugim organizmima. Zbog svoje niske štetnosti za okoliš i korisne organizme, neki spinosini su odobreni za upotrebu i u organskoj proizvodnji. Spinosad djeluje kontaktno na sve stadije štetnika, uključujući jaja, ličinke i odrasle jedinke. Jaja moraju biti izravno tretirana, a djelovanje na ličinke i odrasle može biti i putem kontakta s tretiranom površinom. Spinosad pokazuje najveću učinkovitost kada se primjenjuje oralno, što povećava njegovu selektivnost i štedi prirodne neprijatelje i druge organizme (Čačija i sur., 2018).

Spinosad, kao i ostali spinosini, djeluje neurotoksično na insekate. Izravno utječe na nikotinske acetilkolinске receptore (nAChR) u živčanom sustavu, djelujući kao alosterički modulator. Stimulacijom nAChR i γ -aminomaslačne kiseline (GABA) receptora, spinosad izaziva brzu ekscitaciju živčanog sustava organizma, što posljedično dovodi do njegove paralize i smrti (Santos i Pereira, 2020).

Spinosad se od strane Agencije za zaštitu okoliša (engl. *Environmental Protection Agency*, EPA) prema otrovnosti ubraja u III. skupinu otrova. U akutnim je dozama vrlo nisko otrovan za sisavce i ne smatra se opasnim za ljudsko zdravlje. Ne pokazuje kancerogeno, teratogeno, mutageno ili neurotoksično djelovanje na sisavcima ni pri najvećim testiranim dozama, iako postoji mogućnost da utječe na GABA i druge receptore u mozgu sisavaca (Čačija i sur., 2018).

2.3.4. Deltametrin

Deltametrin je insekticid iz skupine sintetskih piretroida, prvi puta sintetiziran 1974. godine. Piretroidi su sintetički spojevi koji imaju slična svojstva kao prirodni insekticid piretrin koji je dobiven iz cvjetova buhača (biljaka iz porodice glavočika). Deltametrin je razvijen kao analog piretrina, ali s poboljšanom stabilnošću i dugotrajnim učinkom, zbog čega je postao najzastupljeniji na tržištu, čineći 16% svih piretroida (Juran i sur., 2012). IUPAC-ov naziv za deltametrin glasi [(S)cijano-(3-fenoksifenil)metil] (1R,3R)-3-(2,2-dibromoetenil)-2,2-dimetilciklopropan-1-karboksilat. Slika 4 prikazuje kemijsku strukturu deltametrina. Njegova molekulska formula je $C_{22}H_{19}Br_2NO_3$, a molekulska masa iznosi 505,2 g/mol. Deltametrin se pojavljuje u obliku praha bez boje i mirisa. Nije topljiv u vodi. (National Center for Biotechnology Information, 2024).



Slika 4. Kemijska struktura deltametrina (National Center for Biotechnology Information, 2024)

Deltametrin je nesistemični insekticid vrlo širokog spektra djelovanja, s brzim kontaktnim i želučanim djelovanjem. Zbog svoje visoke insekticidnosti djelotvoran je u vrlo malim dozama, što smanjuje rizik od onečišćenja okoliša. Posjeduje dugotrajno rezidualno djelovanje te se najčešće koristi za suzbijanje jabučnog, breskvinog i šljivinog savijača, kao i grozdavog i štitastog moljca. Kao negativna svojstva sintetskih piretroida, a time i deltametrina, ističe se mogućnost brze pojave rezistentnosti, kao i vrlo širok spektar djelovanja zbog čega često izazivaju i uništenje korisnih insekata. Iz tog razloga, ne preporuča se njihova česta upotreba te ih je potrebno koristiti naizmjenično s drugim grupama insekticida kako bi se usporio razvoj rezistentnosti (Lipovski, 2022).

Kada je riječ o mehanizmu djelovanja piretroida, oni djeluju na živčani sustav insekata. Inhibicijom protoka natrijevih iona kroz natrijeve kanale na membranama živčanih stanica remeti se protok živčanih impulsa, što na kraju rezultira njihovom paralizom i smrću. Ovaj mehanizam djelovanja deltametrin čini izuzetno učinkovitim u suzbijanju insekata, ali također može imati i štetne posljedice na korisne organizme poput pčela i drugih oprašivača (Lipovski, 2022).

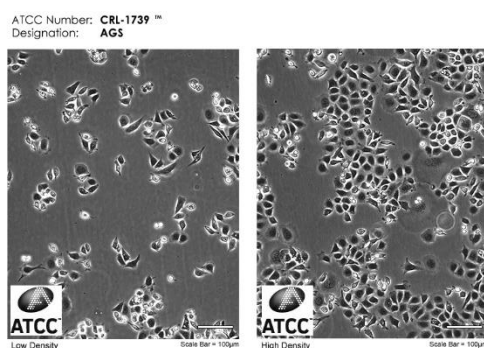
Piretroidi se općenito slabo apsorbiraju kroz kožu te umjereno u gastrointestinalnom traktu. Metabolizam deltametrina odvija se brzo putem cijepanja estera i hidroksilacije. Deltametrin se sporije eliminira iz masnog tkiva nego iz drugih mjesta poput mozga ili krvi, dok je primarni put eliminacije putem urina (Harp, 2005). Što se kratkotrajne izloženosti, odnosno akutne toksičnosti tiče, opsežna dermalna izloženost kod ljudi uzrokuje privremene učinke parestezije poput peckanja, žarenja, trnaca i utrnulosti. Simptomi nakon ingestije uključuju mučninu, povraćanje, proljev, nesvjesticu, a u najtežim slučajevima i smrt kao posljedicu respiratornog zatajenja. Kronični učinci nakon izloženosti deltametrinu nisu ispitani (National Center for Biotechnology Information, 2024).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

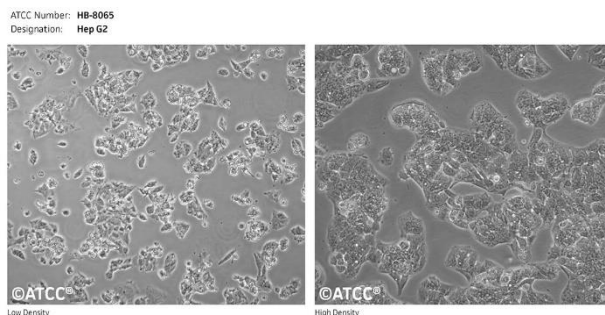
3.1.1. Biološki test sustav

U istraživanju su korištene dvije humane kontinuirane stanične linije: AGS i Hep G2. AGS je stanična linija, prikazana na slici 5, koja pokazuje epitelnu morfologiju, izolirana 1979. godine iz tkiva želuca 54-godišnje ženske osobe bijele rase oboljele od adenokarcinoma epitela želuca. Riječ je o hiperploidnoj staničnoj liniji s modalnim brojem kromosoma 49 u 60 % stanica. Staničnu liniju je potrebno čuvati na temperaturama nižim od $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$, po mogućnosti u tekućem dušiku, do trenutka upotrebe (ATCC, 2024).



Slika 5. Stanična linija AGS (ATCC, 2024)

Hep G2 je stanična linija, prikazana na slici 6, koja pokazuje epitelnu morfologiju, izolirana iz tkiva jetre 15-godišnje muške osobe bijele rase oboljele od hepatocelularnog karcinoma. Radi se o staničnoj liniji s modalnim brojem kromosoma 55, čiji raspon može varirati između 50 i 60 kromosoma. Osim toga, kromosom 1 je modificiran. Stanična linija Hep G2 se čuva pri jednakim uvjetima kao i stanična linija AGS (ATCC, 2024).



Slika 6. Stanična linija Hep G2 (ATCC, 2024)

Stanične linije AGS i Hep G2 uzgajaju se u monosloju u T-bocama, inkubirane na 37 °C u atmosferi s 5 % CO₂ i relativnom vlažnosti od 95 %. Stanice rastu u mediju Ham's F12 uz dodatak 10 % fetalnog goveđeg seruma (FBS). Nakon što se formira monosloj, medij se uklanja te se višak seruma ispire 0,25 % otopinom tripsina. Stanice se zatim podvrgavaju tripsinizaciji kako bi se odvojile od podloge na način da se minimalna količina tripsina dodaje tek toliko da prekrije dno T-boce. Nakon što se stanice odvoje, tretiraju se medijem i serumom kako bi se spriječila razgradnja njihovog sadržaja i dobila stanična suspenzija. Stanice koje su odlijepljene od podloge poprimaju okrugli oblik (Freshney, 2010).

Slijedi brojanje stanica u suspenziji pomoću Bürker-Türkove komorice s ciljem određivanja broja stanica u 1 mL suspenzije. Bürker-Türkova komorica sastoji se od četiri velika kvadrata od kojih se svaki sastoji od 16 manjih kvadrata. Volumen velikog kvadrata iznosi 10⁻⁴ mL. Konačni broj stanica u 1 mL suspenzije dobiva se dijeljenjem srednje vrijednosti izbrojanih stanica u svakom velikom kvadratu s volumenom jednog velikog kvadrata. Nakon toga određuje se volumen suspenzije potreban za dobivanje radne suspenzije željene koncentracije stanica (10⁵ ili 20 stanica/mL), ovisno o metodi koja će se koristiti. Stanice iz radne suspenzije se zatim nasađuju na prozirne ili crne ploče s 96 jažica ili u Petrijeve zdjelice, također ovisno o metodi koja će se koristiti. Ploče, odnosno Petrijeve zdjelice se inkubiraju 24 sata u ranije navedenim uvjetima temperature, CO₂ i vlažnosti prije samog tretmana stanica.

3.1.2. Istraživani spojevi

U istraživanju su testirana četiri pesticida (glifosat, kaptan, spinosad i deltametrin) u četiri različite koncentracije (iznimka je eksperiment s plazmidom ϕ X174 RF1 gdje je izuzeta koncentracija 5· ADI). U tablici 1 su prikazane koncentracije pojedinih pesticida u mg/mL.

Tablica 1. Korištene koncentracije pesticida (mg/mL)

| | ADI / 5 | *ADI | 5· ADI | 10· ADI |
|--------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
| Glifosat | 1· 10 ⁻⁴ | 5· 10 ⁻⁴ | 2,5· 10 ⁻³ | 5· 10 ⁻³ |
| Kaptan | 5· 10 ⁻⁵ | 2,5· 10 ⁻⁴ | 1,25· 10 ⁻³ | 2,5· 10 ⁻³ |
| Spinosad | 4,8· 10 ⁻⁶ | 2,4· 10 ⁻⁵ | 1,2· 10 ⁻⁴ | 2,4· 10 ⁻⁴ |
| Deltametrin | 2· 10 ⁻⁶ | 1· 10 ⁻⁵ | 5· 10 ⁻⁵ | 1· 10 ⁻⁴ |

* Prihvatljivi dnevni unos (ADI)

3.1.3. Kemikalije

- 2,7-diklorodihidrofluorescein diacetat (DCFH-DA), Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka
- Acetamidrid, Hebei Yetian Agrochemicals Co., Ltd., Kina
- Agaroza niske točke tališta (LMP), Invitrogen, Engleska
- Agaroza normalne točke tališta (NMP), Lonza, Rockland, SAD
- Bromtimol plavo, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Deltametrin, Tagros Chemicals Pvt., Ltd., Indija
- Demineralizirana voda
- Dimetil sulfoksid (DMSO), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Etanol (C₂H₅OH), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Etidij bromid (C₂₁H₂₀BrN₃), Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka
- Etil acetat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Fetalni goveđi serum, Capricorn Scientific GmbH, Njemačka
- Giemsa boja, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Glifosat, Jingma Chemicals Co., Ltd., Kina
- Ham's F-12 medij za uzgoj stanica, Capricorn Scientific GmbH, Njemačka
- Kalijev hidrogenfosfat (K₂HPO₄), Riedel-de Haën AG Seelze, Hannover, Njemačka
- Kalijev klorid (KCl), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Kaptan, Inner Mongolia Golden Season Chemistry Co., Ltd., Mongolija
- Klorovodična kiselina, Carlo Erba Reagents, Francuska
- Kristal Violet, Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka
- Ledena octena kiselina, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev hidrogenfosfat (Na₂HPO₄), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev hidrogenfosfat dodekahidrat (Na₂HPO₄ · 12H₂O), 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
- Plazmid φX174 RF1 DNA, Thermo Scientific, SAD
- S-metolaklor, Shandong Binnong Technology Co., Ltd., Kina
- Spinosad, Qilu Pharmaceutical (Inner Mongolia), Co., Ltd., Mongolija
- Terbutilazin, Shandong Binnong Technology Co., Ltd., Kina

- Tripsin, Capricorn Scientific, Njemačka
- Tris, Invitrogen, SAD
- Triton X-100, Acros Organics, SAD
- Vodikov peroksid (H_2O_2), Kemika, Zagreb, Hrvatska

3.1.4. Otopine

Fosfatni pufer (PBS) (pH = 7,2 - 7,4)

| | |
|---------------------------|------------|
| NaCl | 8,0 g |
| KCl | 0,2 g |
| $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$ | 1,16 g |
| K_2HPO_4 | 0,2 g |
| Destilirana voda | do 1000 mL |

Ishodišna otopina Neutral Red-a (5 mg/mL)

| | |
|------------------|--------|
| Boja Neutral Red | 5,0 mg |
| Etanol | 1,0 mL |

Radna otopina Neutral Red-a (50 μ g/mL)

Otopina za odbojavanje

| | |
|------------------------|---------|
| Ledena octena kiselina | 1,0 mL |
| Etanol | 50,0 mL |
| Destilirana voda | 49,0 mL |

Otopina Giemsa i Kristal Violet boje

| | |
|----------------|---------|
| Kristal Violet | 0,125 g |
|----------------|---------|

| | |
|------------------|-----------|
| Giemsa boja | 1,25 mL |
| Destilirana voda | do 100 mL |

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

| | |
|---------|------|
| DCFH-DA | 1 mg |
| DMSO | 1 mL |

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

Otopina LMP agaroze (0,5 %)

| | |
|------------------|-------|
| LMP agarozna | 50 mg |
| Destilirana voda | 10 mL |

Otopina NMP agaroze (1,5 %)

| | |
|--------------|--------|
| NMP agarozna | 150 mg |
| PBS | 10 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 |

Sat vremena prije upotrebe dodati:

| | |
|--------------|-------|
| 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 |

Otopina NaOH (10 M)

| | |
|------------------|-----------|
| NaOH | 40 g |
| Destilirana voda | do 100 mL |

Otopina EDTA (200 mM)

| | |
|------------------|-----------|
| EDTA | 5,1 g |
| Destilirana voda | do 100 mL |

Pufer za neutralizaciju (pH = 7,5)

| | |
|------------------|-------------|
| Tris | 48,5 g |
| Destilirana voda | do 1000 mL |
| HCl | do pH = 7,5 |

Otopina etidij bromida (10 mg/mL)

| | |
|---------------------------|-------|
| Etidij bromid (200 mg/mL) | 1 mL |
| Destilirana voda | 19 mL |

Agarozni gel (1 %)

| | |
|----------------|--------|
| Agarozna | 1 g |
| TAE pufer (1·) | 100 mL |

3.1.5. Laboratorijska oprema

3.1.5.1. Laboratorijski uređaji

- Analitička vaga, 1712 Mp8 Silver Edition, *Sartorius*, Engleska
- Centrifuga za epruvete po Eppendorfu, HC-240, *Tehnica-Železniki*, Slovenija
- Čitač mikrotitarskih ploča, *Cecil Instruments Ltd, Cambridge*, Engleska
- Digestor
- Epifluorescencijski mikroskop, *Leica Microsystems GmbH, Wetzlar*, Njemačka
- Fluorimetar, *Cecil Instruments Ltd, Cambridge*, Engleska
- Hladnjak, *Gorenje*, Slovenija
- Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂, *Forma Scientific*, SAD
- Invertni svjetlosni mikroskop, *Optika Microscopes*, Italija
- Komora za sterilan rad, IBK 1 V2, *Iskra*, Slovenija
- 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. Laboratorijski pribor

- Aluminijska folija
- Automatska propipeta, Eppendorf, Hamburg, Njemačka
- Brušena predmetna stakalca
- Bürker-Türkova komorica
- Hemocitometar
- Eppendorf epruvete
- Erlenmeyerove tikvice
- Filter papir
- Laboratorijske staklene čaše
- Laboratorijske žlice
- Marker za pisanje

- Menzure
- 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

Citotoksični učinak pesticida je ovom radu ispitan korištenjem metode Neutral Red. Metoda se temelji na sposobnosti metabolički aktivnih stanica da transportiraju i vežu kationsku boju Neutral Red, čija ime glasi 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorid, unutar lizosoma. Mehanizam djelovanja podrazumijeva ulazak boje u stanicu kroz neoštećenu membranu putem neionske difuzije. Unutar stanice, boja se koncentrira u lizosomima i veže za anionske i/ili fosfatne grupe lizosomskog matriksa. Stanice se nakon bojanja ispiru te se koristi otopina za odbojavanje kako bi se inkorporirana boja oslobodila iz lizosoma. Spektrofotometrijskim mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 540 nm se kvantificira količina ekstrahirane boje. Mrtve stanice ne aporbiraju boju Neutral Red, stoga se ovom metodom određuje broj preživjelih stanica nakon tretmana određenim ksenobiotikom budući da je izmjerena apsorbancija izravno proporcionalna broju preživjelih stanica (Repetto i sur., 2008).

Postupak određivanja citotoksičnosti započinje naciepljivanjem po 100 µL suspenzije stanica AGS ili Hep G2 koncentracije 10⁵ stanica/mL u prozirne mikrotitarske pločice s 96 jažica. Stanice se zatim inkubiraju kroz 24 sata pri temperaturi od 37 °C u atmosferi s 5 % CO₂ relativne vlažnosti 95 %. Nakon 24 sata uklanja se medij, a stanice se tretiraju s pesticidima u četiri koncentracije koje su prikazane u tablici 1. Navedene koncentracije su pripremljene u hranjivom mediju Ham's F12 iz ishodišnih otopina. Negativna kontrola sadržavala je samo hranjivi medij. Tretman traje 24 sata nakon čegase uklanja medij s testiranim spojevima, a stanice se ispiru s PBS-om te se u svaku jažicu doda po 100 µL radne otopine boje Neutral Red. Stanice se ponovno inkubiraju na sat vremena kako bi došlo do vezanja boje u lizosomima. Slijedi uklanjanje viška boje koja nije ušla u lizosome, tako da se stanice 2 do 3 puta ispiru s PBS-om te se dodaje po 100 µL otopine za odbojavanje u svaku jažicu. Otopina za odbojavanje ekstrahira boju iz stanica te se zatim mjeri intenzitet obojenja pri 540 nm pomoću spektrofotometra. Pomoću dobivene apsorbancije računa se postotak preživljenja te se izražava kao omjer apsorbancije tretiranih stanica i apsorbancije kontrole, što je prikazano u formuli [1]:

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

gdje je A₅₄₀ vrijednost apsorbancije izmjerena pri 540 nm.

3.2.2. Određivanje proliferacijskog učinka klonogenim testom

Za procjenu proliferacijskog učinka u ovom je radu korišten klonogeni test, odnosno test formiranja kolonija. Riječ je o *in vitro* metodi pomoću koje se određuje svojstvo dijeljenja stanica nakon tretmana, a temelji se na mogućnosti pojedinačne stanice da izraste u koloniju. Kolonija je pritom definirana kao skup od barem 50 stanica. Ova metoda se izabire prilikom određivanja preživljenja stanica nakon tretmana ionizirajućim zračenjem ili za određivanje učinkovitosti citotoksičnih agensa, budući da samo mali dio izloženih stanica, na čije mehanizme odgovorne za staničnu diobu testirana kemikalija ne utječe, zadržava sposobnost stvaranja kolonija, odnosno dijeljenja. Tretman se provodi prije nego stanice započnu s dijeljenjem kako ne bi došlo do preuranjenog stvaranja kolonija koje je nepoželjno. Stanicama je nakon tretmana potrebno oko 1 do 3 tjedna za formiranje kolonija, koje se zatim boje smjesom boja Kristal Violet/Giems. Formirane kolonije se na kraju izbroje pomoću olovke za brojenje kolonija i lupe (Franken i sur., 2006).

Postupak započinje naciepljivanjem po 1 mL stanične suspenzije AGS ili Hep G2 u koncentraciji 50 stanica/mL u prozirne mikrotitarske pločice s 24 jažice. Slijedi inkubacija

stanica kroz 24 sata pri 37 °C, u atmosferi s 5 % CO₂ i relativnom vlažnosti 95 %. Nakon toga se uklanja medij, a stanice se tretiraju s istraživanim pesticidima u četiri koncentracije koje su prikazane u tablici 1, uključujući i negativnu kontrolu koju čini hranjivi medij. Nakon tretmana u trajanju od 24 sata uklanjaju se prethodno dodani medij i pesticidi, a stanicama se dodaje po 1 mL čistog medija. Stanice se potom inkubiraju pri temperaturi 37 °C kroz 7 dana kako bi došlo do stvaranja kolonija. Nakon toga se uklanja medij, a kolonije se boje otopinom boja Kristal Violet i Giemsa te se ostavljaju na sobnoj temperaturi kako bi se boje mogle upiti. Stanice se zatim ispiru 2 do 3 puta PBS-om kako bi se uklonio višak boja te se na kraju izbroje nastale kolonije. Preživljenje se računa prema formulama [2] i [3]:

$$SF = \frac{\text{broj kolonija (tretirani uzorak)}}{\text{broj kolonija (kontrola)} \times PE} \quad [2]$$

$$PE = \frac{\text{broj formiranih kolonija}}{\text{broj nacjepljenih stanica}} \times 100\% \quad [3]$$

gdje SF označava frakciju preživljenja, a PE učinkovitost nacjepljivanja.

3.2.3. Određivanje prooksidacijskog učinka

3.2.3.1. Određivanje prooksidacijskog učinka metodom DCFH-DA

Reaktivne kisikove vrste (ROS) su nestabilne molekule koje u svom sastavu imaju kisik. One teže brzoj stabilizaciji, stoga lako reagiraju s molekulama iz svoje okoline i na taj način započinju lančanu reakciju u kojoj nastaju novi radikali. Kod prekomjernih koncentracija ROS-ova nastupa oksidacijski stres što može rezultirati oštećenjem nukleinskih kiselina, proteina i lipida i na taj način doprinijeti razvoju bolesti. U ovom radu za procjenu ukupnog sadržaja ROS-ova u stanici korištena je metoda DCFH-DA. DCFH-DA (2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetat) je fluorogena sonda pomoću koje se kvantitativno određuju razine hidroksilnih (OH·) i peroksilnih radikala (ROO·) te vodikovog peroksida (H₂O₂). Riječ je o nefluorescentnoj lipofilnoj boji koja ima sposobnost difundiranja kroz staničnu membranu do citosola gdje se pomoću staničnih esteraza hidrolizira u polarni, nefluorescentni anion 2',7'-diklorodihidrofluorescein (DCFH). Nastali DCFH ostaje zarobljen unutar stanice i reagira s već postojećim radikalima pri čemu dolazi do stvaranja fluorescentne molekule 2',7'-diklorofluorescein (DCF). Fluorescencija molekule DCF mjeri se pomoću fluorimetra pri valnoj duljini od 485 nm za ekscitaciju te pri 530 nm za emisiju. Izmjereni intenzitet fluorescencije proporcionalno se povećava s koncentracijom ukupnih ROS-ova koji su se formirali u stanici (Katerji i sur., 2019).

Postupak započinje naciepljivanjem po 100 µL stanične suspenzije AGS ili Hep G2 u koncentraciji 10⁵ stanica/mL u crne mikrotitarske pločice s 96 jažica. Stanice se kroz 24 sata inkubiraju pri temperaturi 37 °C, u atmosferi s 5 % CO₂ relativne vlažnosti 95 %. Nakon 24 sata, uklanja se medij, a stanice se zatim tretiraju s pesticidima u koncentracijskom rasponu prikazanom u tablici 1, uključujući negativnu kontrolu. Nakon tretmana u trajanju od 24 sata i ispiranja stanica u svaku se jažicu dodaje po 100 µL radne otopine DCFH-DA te se stanice inkubiraju pola sata. U tom vremenu nefluorescentni DCFH-DA prelazi u fluorescentni DCF što omogućava mjerenje intenziteta fluorescencije pri valnoj duljini emisije od 485 nm i valnoj duljini ekscitacije od 530 nm. Izmjereni intenzitet fluorescencije proporcionalan je količini nastalih ROS-ova. Za mjerenje prooksidacijske aktivnosti potrebno je u omjer staviti intenzitet fluorescencije tretiranih stanica i intenzitet fluorescencije kontrole. Kako bi se dobila realna procjena prooksidacijskog djelovanja, u račun je potrebno uključiti i postotak preživljenja stanica. Formula [4] pomoću koje se računa postotak indukcije ROS-ova prikazana je u nastavku:

$$\% \text{ indukcije ROS} = \frac{\frac{\text{fluorescencija (tretirani uzorak)}}{\% \text{ preživljenja (tretirani uzorak)}}}{\frac{\text{fluorescencija (kontrola)}}{\% \text{ preživljenja (kontrola)}}} \times 100 \quad [4]$$

3.2.3.2. Određivanje prooksidacijskog učinka na modelnom plazmidu φX174 RF1

Plazmid φX174 RF1 je dvolančana DNA molekula, karakterizirana superzavijenom strukturom, duljine 5386 parova baza i molekulske mase 3,5 · 10⁶ Da. Molekula pripada bakteriofagu φX174 koji inficira bakteriju *Escherichia coli*. Ukoliko se u superzavijenoj formi molekule DNA (RF I) nastane jednolančani lom doći će do relaksacije molekule odnosno do pojave cirkularne forme (RF II). Daljnja oštećenja molekule DNA mogu rezultirati pucanjem oba lanca (dvolančani lom) što rezultira linearizacijom molekule DNA, odnosno plazmida (RF III). Sva tri oblika plazmida jednostavno se vizualiziraju elektroforezom u agaroznom gelu što ovaj plazmid čini idealnim modelom za procjenu učinkovitosti cijepanja molekule DNA od strane različitih bioloških i sintetskih molekula (Alsulami i sur., 2019). Princip djelovanja plazmida kao modelnog sustava temelji se na činjenici da se plazmid, uslijed oksidacijskog oštećenja, relaksira i zbog toga sporije migrira kroz agarozni gel u usporedbi sa superzavijenom formom.

Postupak određivanja prooksidacijskog učinka na modelnom plazmidu φX174 RF1 započinje pripremom 1 %-tne otopine agaroze u TAE puferu. Nakon otapanja i hlađenja navedena otopina se izljeva u kalup kako bi gel polimerizirao. U kalup se stavlja i češljic za formiranje jažica. Nakon što se formirao čvrsti gel, češljic se uklanja, a kalup se prebacuje u

kadicu za elektroforezu te se nalije 1· TAE pufer u količini dovoljnoj da prekrije gel. Sljedeći korak uključuje pripremu uzoraka koji se nanose na gel. Budući da se prooksidacijski učinak određuje za četiri različita pesticida (glifosat, kaptan, spinosad i deltametrin) u tri različite koncentracije (0,5· ADI; 1· ADI; 10· ADI) bez i uz dodatak 0,6 % H₂O₂ (dodaje se u uzorke u kojima želimo generirati hidroksilne radikale te vidjeti utjecaj pesticida na njihovu reaktivnost) za svaki ispitivani pesticid je pripremljeno po šest uzoraka, a uz to su pripremljene i dvije negativne i jedna pozitivna kontrola. Kao standard korišten je *1 kb Plus DNA Ladder for Safe Stains (BioLabs)*. Reakcijska smjesa, ukupnog volumena 20 µL, sadrži plazmid φX174 RF1 čija koncentracija iznosi 0,01 mg/mL, 1· TE pufer te različite koncentracije pesticida navedene u tablici 1. Svi navedeni uzorci podvrgnuti su djelovanju UV svjetla u trajanju od 7 minuta (vrijeme zračenja je prethodno određeno optimiziranjem metode i izlaganjem reakcijske smjese UV svjetlu u širokom vremenskom rasponu). Nakon što su svi uzorci pripremljeni i tretirani UV zračenjem, dodano je po 1 µL pufera koji sadrži boju bromtimol plavo (engl. *loading buffer*) kako bi se omogućila vizualizacija migracije uzoraka u gelu, te su uzorci nanoseni u jažice gela. Konačno, pokrenuta je elektroforeza pri naponu od 60 V u trajanju od 2 sata. Po završetku elektroforeze, gel je stavljen na sat vremena u otopinu etidij bromida kako bi se omogućila vizualizacija i analiza njegovog sadržaja. Analizom gela pomoću programa Gel Analyser određen je intenzitet nastalih vrpca (engl. *raw volume*) te je prema slijedećoj formuli [5] određen postotak oštećenja superzavijene strukture plazmida:

$$\% \text{ oštećenja SCP} = \frac{\frac{\text{intenzitet vrpce SCP (tretirani uzorak)}}{\text{intenzitet vrpce RCP (tretirani uzorak)}}}{\frac{\text{intenzitet vrpce SCP (kontrola)}}{\text{intenzitet vrpce RCP (kontrola)}}} \times 100 \quad [5]$$

gdje SCP označava superzavijenu cirkularnu formu plazmida, a RCP relaksiranu cirkularnu formu plazmida.

3.2.4. Određivanje genotoksičnog učinka komet testom

Genotoksični učinak pesticida u ovom je radu određen korištenjem komet testa. To je brza i osjetljiva metoda koja ima mogućnost analiziranja oštećenja nastalih na molekulama DNA u svakoj pojedinačnoj stanici (engl. *single cell gel electrophoresis*). Metoda se provodi na način da se stanice pomiješaju s LMP agarozom (agarozna niske točke tališta) te se ta smjesa nanosi na predmetno stakalce pri čemu dolazi do polimerizacije agaroze i vezanja stanica unutar mreže polimera, nakon čega slijedi liza pomoću etilen-diamintetraoctene kiseline (EDTA) i detergenata kako bi se uklonili proteini unutar stanice, kao i sama stanična membrana. Kao rezultat, u gelu zaostaje samo DNA na mjestu gdje se prije lize nalazila „zarobljena“ stanica.

Ukoliko je istraživana tvar genotoksična, DNA će biti fragmentirana zbog jednolančanih i dvolančanih lomova DNA različitih duljina koji će se iz nakupine izdvojiti nakon horizontalne elektroforeze koja se provodi na način da se predmetna stakalca s imobiliziranom DNA izlažu tijekom istosmjernog struje. Negativno nabijene petlje DNA kreću se kroz gel prema pozitivno nabijenoj anodi pod utjecajem električnog polja. Razdvajanje oslobođenih fragmenata u gelu se dešava zbog toga što kraći fragmenti putuju brže od dugih. Nakon provedene elektroforeze, DNA se boji etidij-bromidom koji interkalira u molekulu DNA, a nastala oštećenja promatraju se pod fluorescencijskim mikroskopom gdje se mogu uočiti strukture stanica koje podsjećaju na komete po čemu je metoda dobila i ime. „Glavu“ kometa čini neoštećena DNA, dok „rep“ kometa čine oslobođene petlje s odlomljenim fragmentima te je njegova duljina direktno proporcionalna količini nastalih oštećenja na DNA (Dmitrieva i Burg, 2007).

Postupak određivanja genotoksičnog učinka započinje naciepljivanjem po 5 mL stanične suspenzije AGS ili Hep G2 čija je početna koncentracija 10^5 stanica/mL u plastične Petrijeve zdjelice, nakon čega se stanice inkubiraju kroz 24 sata na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ u atmosferi s 5 % CO_2 i 95 % relativne vlažnosti. Nakon 24 sata, uklanja se medij, a stanice se tretiraju s četiri različita pesticida u četiri koncentracije koje su prikazane u tablici 1, uključujući negativnu kontrolu. Nakon tretmana u trajanju od 24 sata, stanice se ispiru s PBS-om dva do tri puta. Nakon ispiranja, stanice se s površine Petrijevih zdjelica uklanjaju pomoću strugača, a zatim prebacuju u mikropruvete kako bi se podvrgnule centrifugiranju tijekom 5 minuta na 5000 rpm. Rezultat centrifugiranja je talog stanica koji je potreban za daljnji postupak. Slijedi nanošenje po 300 μL 1,5 %-tne NMP agaroze (agarosa normalne točke tališta) na brušena predmetna stakalca (1. sloj). Nakon što je 1. sloj polimerizirao, prethodno spomenuti talog stanica resuspendira se s po 100 μL 0,5 %-tne LMP agaroze (temperirane na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$) te se nanese na stakalca (2. sloj). Nakon što se polimerizira na stakalca se nanosi još po 100 μL LMP agaroze (3. sloj). Predmetna stakalca se zatim prekriju pokrovnim stakalcima kako bi došlo do ravnomjerne raspodjele stanica i njihove fiksacije. Kao pozitivna kontrola koriste se stanice koje su, kad su nanese na predmetno stakalce, tretirane 1 mM vodikovim peroksidom tijekom 15 minuta. Kada posljednji, 3. sloj LMP agaroze polimerizira, stakalca se uranjaju u pufer za lizu na sat vremena pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ kako bi došlo do lize stanica. Kada su se stanice lizirale, stakalca se uranjaju u kadicu za elektroforezu prethodno napunjenu puferom za alkalnu elektroforezu. Slijedi elektroforeza koja se provodi 20 minuta pri parametrima jakosti struje od 300 mA i napona od 25 V, nakon čega se stakalca vade iz kadice i suše na sobnoj temperaturi. Stanice se zatim neutraliziraju ispiranjem puferom za neutralizaciju (Tris-HCl, pH=7,5) po tri puta u razmaku od 5 minuta, nakon čega se boje otopinom etidij bromida kroz 10 minuta te prekriju pokrovnim stakalcem. Ponovno se ispiru Tris-HCl puferom te se ostavljaju 15 minuta kako bi se etidij bromid stabilizirao. Slijedi mjerenje pomoću epifluorescencijskog mikroskopa s

ekscitacijskim filterom podešenim na 515-560 nm. Dobivene slike se analiziraju upotrebom programa *Comet Assay II*. U ovom su radu analizirani parametri dužine i intenziteta repa, kao i repni moment kao pokazatelji razine oštećenja DNA.

3.2.5. Obrada podataka

U ovom je radu za obradu dobivenih rezultata korišten program za statistiku JASP 0.18.3. Svi dobiveni rezultati su provjereni na parametrijsku distribuciju, korištenjem Shapiro-Wilkovog testa. Parametrijski podaci obrađeni su *Classical ANOVA* statističkom analizom uz primjenu Tukey i Scheffé *Post Hoc* testa usporedbe uz razinu statističke značajnosti $p < 0,05$, dok su neparametrijske vrijednosti obrađene Dunn-ovim *Post Hoc* testom uz razinu statističke značajnosti $p < 0,05$. Rezultati genotoksičnog učinka su prije statističke obrade normalizirani prirodnim logaritmom. Rezultati određivanja prooksidacijskog učinka na modelnom plazmidu ϕ X174 RF1 obrađeni su u programu Gel Analyzer.

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

4. REZULTATI I RASPRAVA

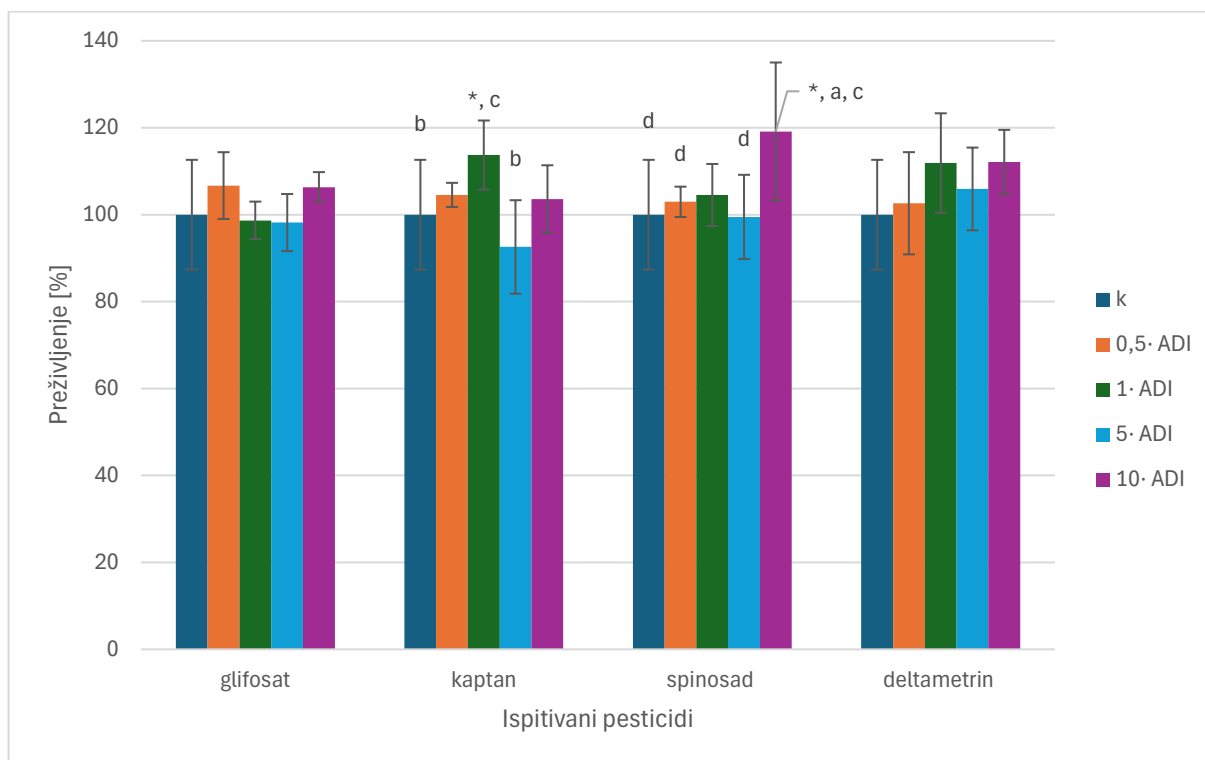
U ovom je radu provedeno ispitivanje citotoksičnog, proliferacijskog, prooksidacijskog i genotoksičnog učinka pesticida glifosata, kaptana, spinosada i deltametrina na kontinuiranim humanim staničnim linijama adenokarcinoma epitela želuca (AGS) i hepatocelularnog karcinoma jetre (Hep G2). Raspon ispitivanih koncentracija pesticida određen je u odnosu na vrijednosti dopuštenog dnevnog unosa (ADI) koje su navedene u tablici 1. Najmanja ispitivana koncentracija je 5 puta manja, dok je najveća 10 puta veća od ADI vrijednosti.

Citotoksični učinak navedenih pesticida ispitivan je metodom Neutral Red. Za ispitivanje prooksidacijskog učinka korištena je metoda DCFH-DA, kao i modelni plazmid ϕ X174 RF1. Proliferacijski učinak je ispitivan pomoću klonogenog testa. Kako bi se odredio genotoksični učinak pesticida korišten je komet test.

4.1. ANALIZA CITOTOKSIČNOG UČINKA PESTICIDA METODOM NEUTRAL RED

Ispitivanje citotoksičnog učinka pesticida glifosata, kaptana, spinosada i deltametrina provedeno je na kontinuiranim humanim staničnim linijama AGS i Hep G2 korištenjem metode Neutral Red opisane u potpoglavlju 3.2.1. Stanice su tretirane tijekom 24 sata.

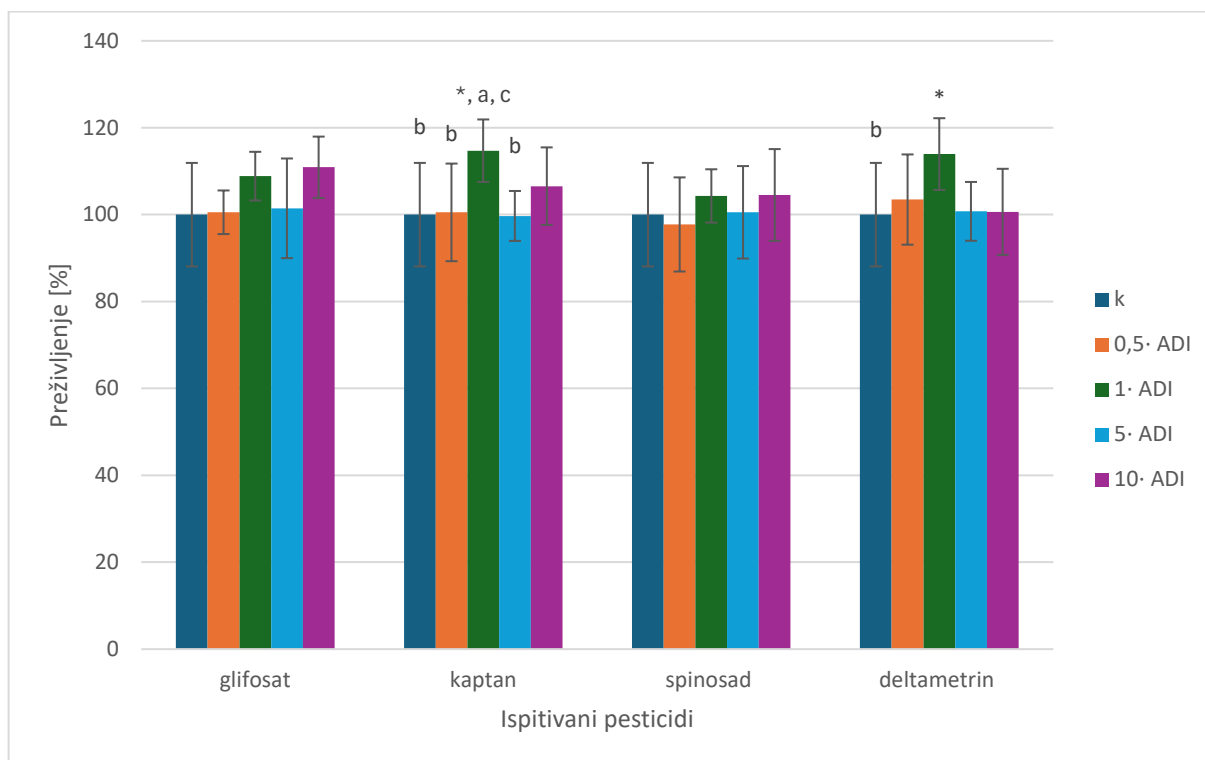
Dobiveni rezultati prikazani su grafički kao postotak preživljenja stanica (relativna vijabilnost stanica iskazana u odnosu na kontrolu) u ovisnosti o različitim koncentracijama ispitivanih pesticida. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti dobivenih podataka za svaku pojedinačnu koncentraciju, uz pripadajuće standardne devijacije. Na slikama 7 i 8 su naznačene i statistički značajne razlike.



* – 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] ($p < 0,05$); k – kontrola

Slika 7. Citotoksični učinak glifosata, kaptana, spinosada i deltametrina na staničnu liniju AGS

Citotoksični učinak pesticida na staničnu liniju AGS tijekom 24 sata prikazan je na slici 7. Iz slike 7 je vidljivo da ni glifosat ni deltametrin ne djeluju citotoksično. Kod kaptana je koncentracija 1· ADI uzrokovala statistički značajni porast preživljenja stanične linije AGS u odnosu na kontrolu, dok je kod spinosada statistički značajan porast preživljenja stanične linije AGS u odnosu na kontrolu prouzrokovala koncentracija 10· ADI što upućuje na potencijalni proliferativni učinak ova dva spoja.



* – 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] ($p < 0,05$); k – kontrola

Slika 8. Citotoksični učinak glifosata, kaptana, spinosada i deltametrina na staničnu liniju Hep G2

Citotoksični učinak pesticida na staničnu liniju Hep G2 prikazan je na slici 8. Iz slike se može vidjeti da glifosat i spinosad nisu ni u jednoj koncentraciji uzrokovali statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu. Koncentracija kaptana 1· ADI je uzrokovala statistički značajan porast preživljenja u odnosu na kontrolu. Deltametrin je također u koncentraciji 1· ADI uzrokovao statistički značajan porast preživljenja stanične linije Hep G2 u odnosu na kontrolu iz čega proizlazi da deltametrin i kaptan imaju potencijal izazivati proliferaciju stanica bez obzira na njihovo porijeklo ili metaboličku aktivnost i to pri koncentracijama za koje je očekivano da će opća populacija biti izložena.

U istraživanju koje su proveli Mesnage i sur. (2021) na staničnoj liniji Caco-2 testirana je citotoksičnost samog glifosata, formulacije herbicida *RangerPro* koja osim glifosata sadrži i pomoćne tvari poput površinski aktivne tvari POE-15, kao i citotoksičnost samog POE-15. Istraživanje je dokazalo da sam glifosat pokazuje određenu razinu citotoksičnosti ($LC_{50} = 17200 \mu\text{g/mL}$), ali je znatno manje toksičan u usporedbi s formulacijama koje uključuju pomoćne tvari poput POE-15, pri čemu LC_{50} za formulaciju *RangerPro* iznosi $125 \mu\text{g/mL}$, dok LC_{50} za POE-15 iznosi $5,7 \mu\text{g/mL}$. Također, zaključeno je i da formulacija *RangerPro* te POE-15 izazivaju nekrotične učinke na stanice, dok sam glifosat ne izaziva takve učinke. Istraživanje sugerira

kako prisutni koformulanti značajno povećavaju ukupnu citotoksičnost herbicida u usporedbi sa samim glifosatom (Mesnage i sur., 2021).

Yang i sur. (2016) su u svom istraživanju ispitali citotoksičnost spinosada na staničnim linijama HEK293 i Hep G2. Ispitane su koncentracije spinosada u rasponu od 5 $\mu\text{mol/L}$ ($7,4 \cdot 10^{-3}$ mg/mL) do 80 $\mu\text{mol/L}$ (0,12 mg/mL). Istraživanje je dokazalo kako spinosad uzrokuje smanjenje vijabilnosti obje stanične linije ovisno o primijenjenoj koncentraciji i vremenu izlaganja. Veće koncentracije i duže trajanje tretmana značajno povećavaju citotoksični učinak ovog pesticida. Promatrajući mehanizam djelovanja, spinosad je inducirao akumulaciju proteina p53, ključnog u procesu apoptoze, što je posljedično rezultiralo povećanjem ekspresije Bax proteina (promotora apoptoze) te smanjenjem ekspresije Bcl-2 proteina (inhibitora apoptoze). Povećani omjer Bax/Bcl-2 pogoduje apoptozi, odnosno programiranoj staničnoj smrti (Yang i sur., 2016).

Romero i sur. (2012) su pak proveli istraživanje o *in vitro* neurotoksičnosti deltametrina i njegovih metabolita (3-fenoksibenzojeva kiselina, 2'-OH-deltametrin, 4'-OH-deltametrin) u SH-SY5Y staničnim linijama. Od tri testirana metabolita, samo 3-fenoksibenzojeva kiselina nije pokazala neurotoksičnost dok su i 2'-OH-deltametrin i 4'-OH-deltametrin bili toksičniji od deltametrina (Romero i sur., 2012).

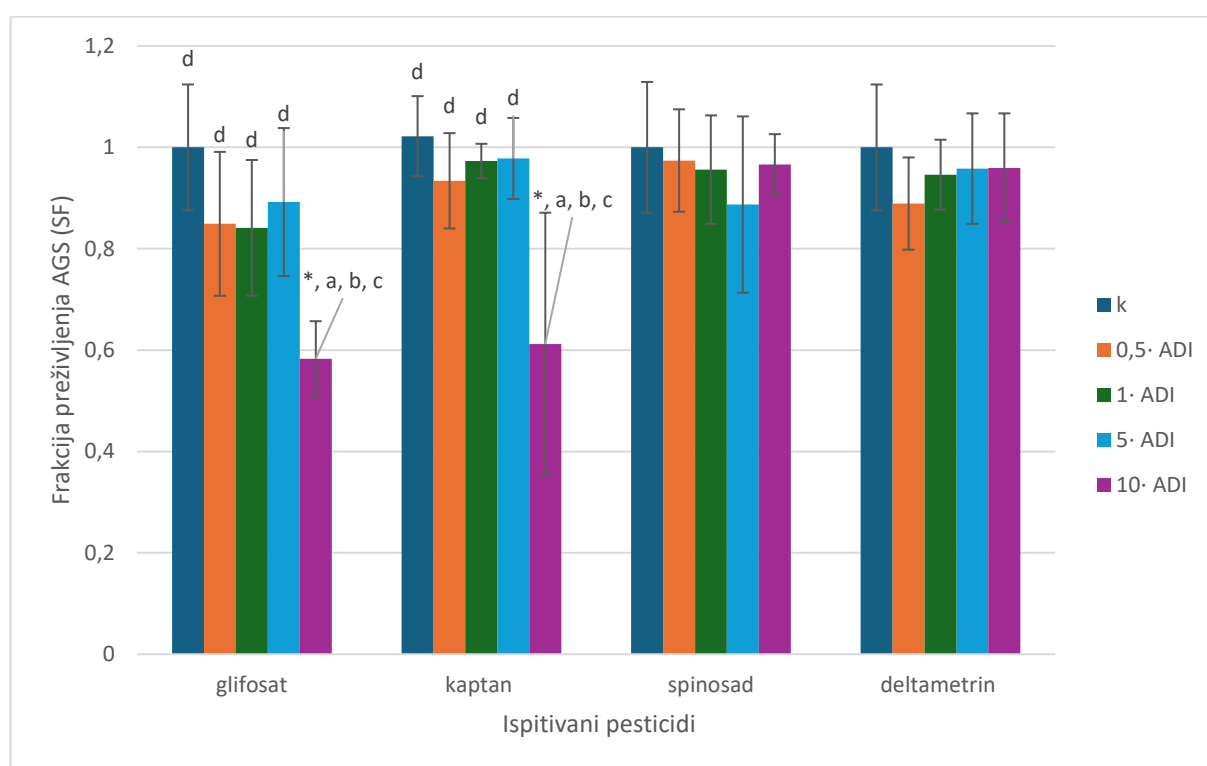
U ovom su radu ispitane relativno niske koncentracije pesticida glifosata, kaptana, spinosada i deltametrina, pri čemu je najveća ispitivana koncentracija bila tek 10 puta veća od definiranog prihvatljivog dnevnog unosa (ADI) stoga je izostanak citotoksičnog učinka ovih pesticida bio priželjkivan i očekivan. No, iako se pesticidi u ispitivanim koncentracijama u ovom radu nisu pokazali citotoksičnima, iz drugih istraživanja je moguće zaključiti da tretman većim koncentracijama može izazvati citotoksičnost. Pojačano citotoksično djelovanje može biti i uzrok upotrebe pomoćnih tvari u konačnim formulacijama pesticida koje su namijenjene ljudskoj uporabi, kao i raznih proizvoda metabolizma navedenih pesticida. Također, citotoksični učinak može biti rezultat pojačanog djelovanja pesticida na druge sustave unutar organizma koji nisu istraženi eksperimentalnim modelom primijenjenim u ovom radu.

4.2. ANALIZA PROLIFERACIJSKOG UČINKA PESTICIDA KLONOGENIM TESTOM

S obzirom da je određivanjem citotoksičnog učinka ustanovljeno da pojedine koncentracije kaptana, spinosada i deltametrina povećavaju postotak preživljenja, provedeno je detaljnije istraživanje djelovanja ovih spojeva na proliferacijski učinak. Proliferacijski učinak

pesticida glifosata, kaptana, spinosada i deltametrina na kontinuiranim humanim staničnim linijama AGS i Hep G2 ispitan je pomoću klonogenog testa opisanog u poglavlju 3.2.2. Stanice su tretirane pesticidima tijekom 24 sata nakon čega su ostavljene 7 dana kako bi došlo do proliferacije.

Dobiveni rezultati prikazani su grafički kao frakcija preživljenja stanica (broj poraslih kolonija uzorka u odnosu na kontrolu, korigiran za učinkovitost nacepljivanja) u ovisnosti o različitim koncentracijama ispitivanih pesticida. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti dobivenih podataka za svaku pojedinačnu koncentraciju, uz pripadajuće standardne devijacije. Na slikama 9 i 10 su naznačene i statistički značajne razlike.

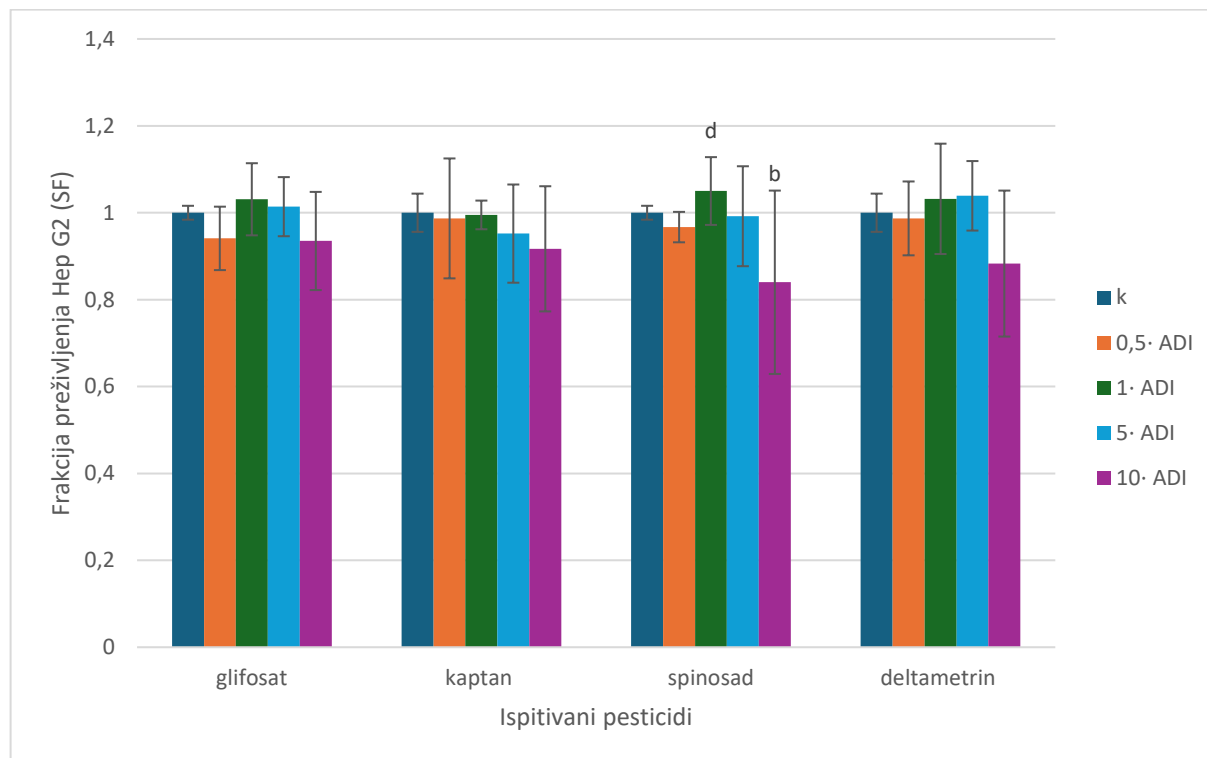


* – statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$); a – statistički značajna razlika u odnosu na 0,5· ADI [mg/mL] ($p < 0,05$); b – statistički značajna razlika u odnosu na ADI [mg/mL] ($p < 0,05$); c – statistički značajna razlika u odnosu na 5· ADI [mg/mL] ($p < 0,05$); d – statistički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

Slika 9. Proliferacijski učinak glifosata, kaptana, spinosada i deltametrina na staničnu liniju AGS

Slika 9 prikazuje proliferacijski učinak pesticida na staničnu liniju AGS prilikom tretmana u trajanju od 7 dana. Iz slike 9 se može vidjeti kako glifosat i kaptan samo u najvećoj ispitivanoj koncentraciji (10· ADI) uzrokuju statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu. Pri toj koncentraciji zapažen je statistički značajan inhibitorni efekt navedenih pesticida na staničnu diobu stanične linije AGS, odnosno smanjenje sposobnosti stvaranja kolonija. Spinosad i

deltametrin ni u jednoj koncentraciji nisu uzrokovali statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu čime nije potvrđeno njihovo produljeno proliferativno djelovanje nakon izlaganja stanica ovim spojevima.



b – statistički značajna razlika u odnosu na ADI [mg/mL] ($p < 0,05$); d – statistički značajna razlika u odnosu na 10· ADI [mg/mL] ($p < 0,05$); k – kontrola

Slika 10. Proliferacijski učinak glifosata, kaptana, spinosada i deltametrina na staničnu liniju Hep G2

Na slici 10 je prikazan proliferacijski učinak pesticida na staničnu liniju Hep G2 prilikom tretmana u trajanju od 7 dana. Iz navedene slike je vidljivo da niti jedan spoj ne utječe na proliferaciju stanica.

Budući da je jetra glavni metabolički organ za detoksikaciju vanjskih spojeva te ima nezamjenjivu ulogu u biotransformaciji pesticida, njezine su stanice otporne i prilagodljive toksičnim uvjetima. To je jedan od mogućih razloga zbog kojeg Hep G2 stanice pokazuju bolju proliferacijsku sposobnost od stanične linije AGS prilikom tretmana višim koncentracijama pesticida glifosata i kaptana.

Bianco i sur. (2023) proveli su istraživanje u kojem su ispitali učinak glifosata na proliferaciju stanica glioblastoma. Stanična linija A172 je bila izložena analitičkom standardu glifosata, formulaciji herbicida na bazi glifosata te metabolitu aminometilfosfonskoj kiselini

(AMPA). Koncentracija ispitivanih tvari iznosila je $5 \cdot 10^{-4}$ mg/mL (ADI). Analiza jedinica koje stvaraju kolonije (CFU) pokazala je da je AMPA povećala broj stvorenih CFU, dok su sami glifosat i formulacija herbicida na bazi glifosata povećali veličinu CFU. Rezultati istraživanja sugeriraju da izloženost A172 stanica glifosatu (izoliranom ili u formulaciji) ili njegovom metabolitu može utjecati na stanične signalne putove i na taj način rezultirati nepoželjnim povećanjem njihove proliferacije i rasta (Bianco i sur., 2023). U drugom istraživanju je pak ispitan učinak glifosata na proliferaciju stanične linije HEK293. Rezultati sugeriraju da koncentracije glifosata u rasponu od $1 \cdot 10^{-5}$ do $3 \cdot 10^{-3}$ mg/mL potiču proliferaciju stanica, dok niže ili više koncentracije ne potiču rast stanica niti ga ometaju (Jeon i sur., 2020).

Istraživanje koje su proveli Zhang i sur. (2019) proučavalo je učinak spinosada na proliferaciju stanica A549. Povećanjem koncentracije spinosad je inhibirao proliferaciju stanica pri čemu se pri višim koncentracijama broj jedinica koje stvaraju kolonije (CFU) značajno smanjio. Navedeni rezultati sugeriraju da inhalacija spinosada potencijalno povećava rizik od oštećenja pluća kod ljudi (Zhang i sur., 2019).

Şekeroğlu i sur. (2020) su u svom istraživanju proučavali proliferacijski učinak deltametrina na staničnim linijama BEAS-2B. Tretman epitelnih stanica bronha rastućim koncentracijama deltametrina rezultirao je smanjenjem učinkovitosti nacjepljivanja (PE) i frakcije preživljenja stanica (SF), odnosno smanjenom proliferacijskom sposobnošću stanica (Şekeroğlu i sur., 2021).

Iako rezultati istraživanja proliferacijskog učinka glifosata i kaptana u ovom radu sugeriraju kako najveće ispitivane koncentracije ($10 \cdot$ ADI) smanjuju sposobnost stvaranja kolonija kada je u pitanju stanična linija AGS, iz radova drugih autora možemo zapaziti kako je zabilježeno da glifosat na nekim drugim ljudskim staničnim sustavima, koji su tretirani sličnim koncentracijama pesticida koje su korištene u ovom radu, zapravo potiče proliferaciju stanica. Za razliku od glifosata, spinosad i deltametrin su se u radovima ostalih autora pokazali kao inhibitori proliferacije ispitivanih staničnih sustava, pri čemu se zapaža povećanje inhibitornog učinka povećanjem korištene koncentracije pesticida za tretman.

4.3. ANALIZA PROOKSIDACIJSKOG UČINKA PESTICIDA

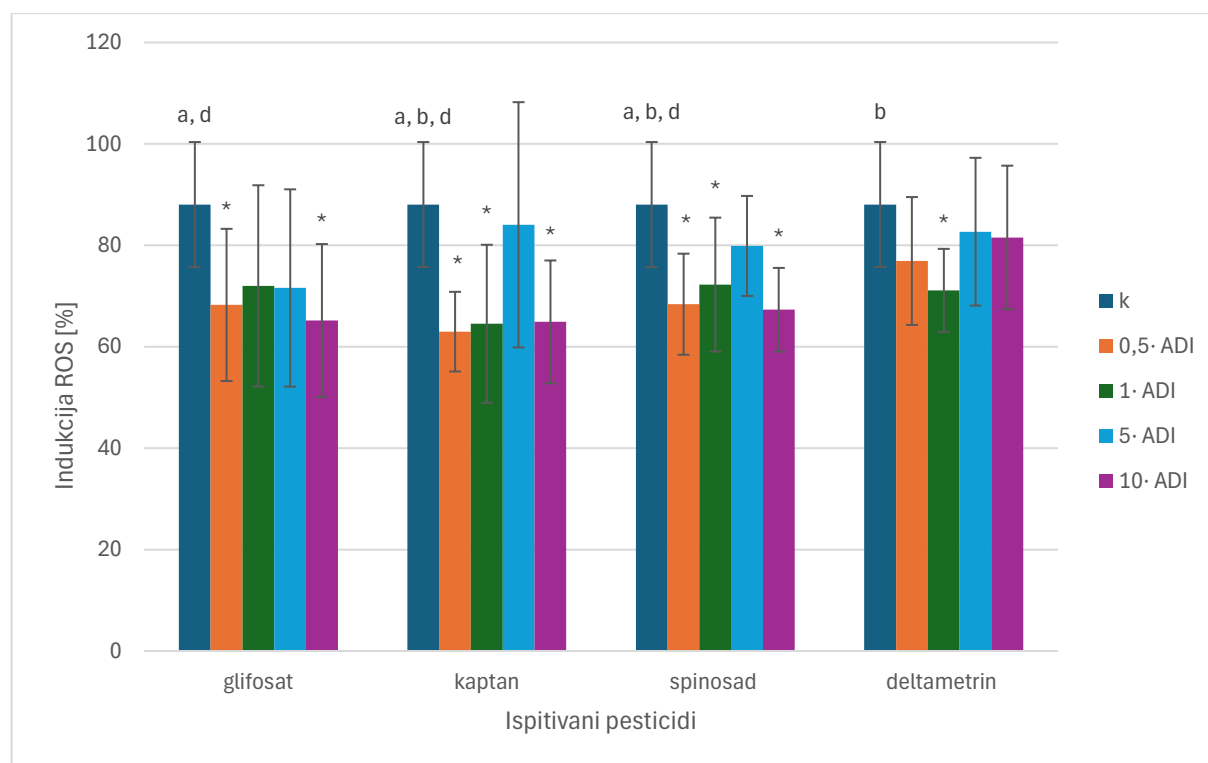
4.3.1. Analiza prooksidacijskog učinka pesticida metodom DCFH-DA

Metoda DCFH-DA opisana u potpoglavlju 3.2.3. korištena je za ispitivanje prooksidacijskog učinka pesticida glifosata, kaptana, spinosada i deltametrina na kontinuiranim humanim staničnim linijama AGS i Hep G2. Korištene su četiri koncentracije navedenih

pesticida: 5 puta manja koncentracija od ADI vrijednosti, ADI vrijednost, 5 puta veća koncentracija od ADI vrijednosti i 10 puta veća koncentracija od ADI vrijednosti. Stanice su tretirane tijekom 24 sata.

Rezultati su prikazani 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 različitim koncentracijama ispitivanih pesticida. Također, dobiveni rezultati prikazani su kao srednje vrijednosti podataka za svaku pojedinačnu koncentraciju s odgovarajućim standardnim devijacijama i statistički značajnim razlikama.

Prilikom određivanja prooksidacijskog učinka pesticida metodom DCFH-DA rezultati su izraženi kao omjer fluorescencije uzorka i postotka preživljenja stanica kako bi se dobilo realan prikaz odnosa prooksidacijskog i citotoksičnog učinka.

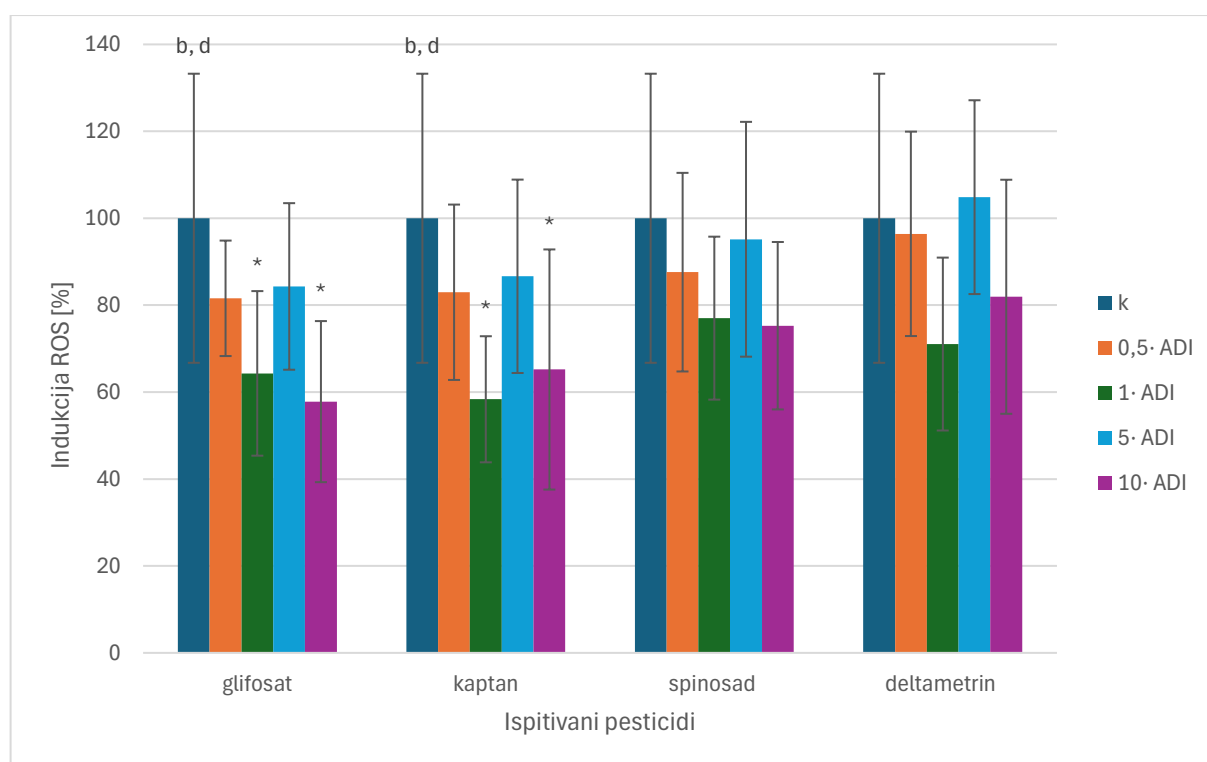


* – statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$); a kontinuiranim humanim staničnim linijama statistički značajna razlika u odnosu na 0,5· ADI [mg/mL] ($p < 0,05$); b – statistički značajna razlika u odnosu na ADI [mg/mL] ($p < 0,05$); d – statistički značajna razlika u odnosu na 10· ADI [mg/mL] ($p < 0,05$); k – kontrola

Slika 11. Prooksidacijski učinak glifosata, kaptana, spinosada i deltametrina na staničnu liniju AGS

Na slici 11 prikazan je prooksidacijski učinak pesticida na staničnoj liniji AGS. Iz navedene slike je vidljivo da je nakon izlaganja AGS stanica glifosatu u koncentracijama

0,5· ADI i 10· ADI došlo do statistički značajnog smanjenja razina reaktivnih kisikovih skupina, dok preostale ispitivane koncentracije nisu izazvale statistički značajnu razliku. Kaptan i spinosad su u koncentracijama 0,5· ADI, 1· ADI i 10· ADI izazvali statistički značajno smanjenje razina reaktivnih kisikovih skupina u staničnoj liniji AGS, dok se učinak izlaganju koncentraciji 5· ADI nije pokazao statistički značajnim. Deltametrin je pak jedino u koncentraciji 1· ADI izazvao statistički značajno smanjenje razina reaktivnih kisikovih skupina prilikom tretmana stanične linije AGS.



* – statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$); b – statistički značajna razlika u odnosu na ADI [mg/mL] ($p < 0,05$); d – statistički značajna razlika u odnosu na 10· ADI [mg/mL] ($p < 0,05$); k – kontrola

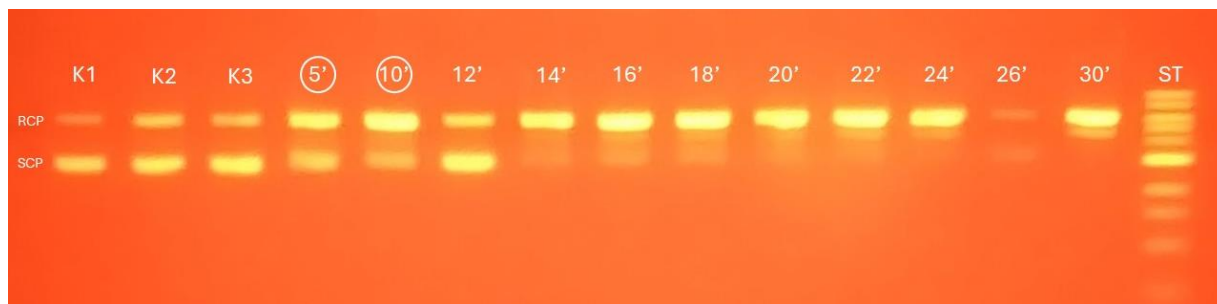
Slika 12. Prooksidacijski učinak glifosata, kaptana, spinosada i deltametrina na staničnu liniju Hep G2

Na slici 12 je prikazan prooksidacijski učinak pesticida na staničnu liniju Hep G2. Iz slike 12 je vidljivo da su koncentracije 1· ADI i 10· ADI glifosata i kaptana izazvale statistički značajno smanjenje razina reaktivnih kisikovih skupina prilikom tretmana stanične linije Hep G2, dok se preostale dvije koncentracije (0,5· ADI i 5· ADI) nisu pokazale statistički značajnima. Nakon izlaganja Hep G2 stanica spinosadu i deltametrinu nema statistički značajne razlike s kontrolom kod niti jednog ispitivanog pesticida u cijelom rasponu koncentracija.

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

Za određivanje prooksidacijskog učinka pesticida glifosata, kaptana, spinosada i deltametrina, osim metode DCFH-DA, korišten je i modelni plazmid ϕ X174 RF1. Postupak provedbe te metode opisan je u potpoglavlju 3.2.4. U ovoj su metodi korištene tri koncentracije navedenih pesticida (0,5· ADI, 1· ADI i 10· ADI).

Stanice su nakon tretmana pesticidima podvrgnute djelovanju UV zračenja. Vrijeme ozračivanja određeno je nakon optimizacije prikazane na slici 13. Na navedenoj slici je vidljivo kako se prilikom zračenja plazmida u trajanju od 5 i 10 minuta intenzitet gornje vrpce povećava, a donje smanjuje, odnosno raste udio relaksirane cirkularne forme plazmida, a smanjuje se udio superzavijene cirkularne forme plazmida u odnosu na kontrole, no superzavijena forma ne nestaje u potpunosti kao što je slučaj prilikom duljeg izlaganja UV zračenju (14 do 30 minuta). Iz tog razloga, utvrđena je optimalna duljina izloženosti u trajanju od 7 minuta. Iz slike 13 je također vidljivo kako se prilikom duljeg izlaganja plazmida UV zračenju, osobito prilikom izlaganja u trajanju od 30 minuta, vrpca superzavijenog plazmida u potpunosti gubi te se pojavljuje nova vrpca koja sadrži kraće fragmente plazmida koji su rezultat raspada, odnosno razaranja zavijenog plazmida dugotrajnim izlaganjem UV svjetlu.



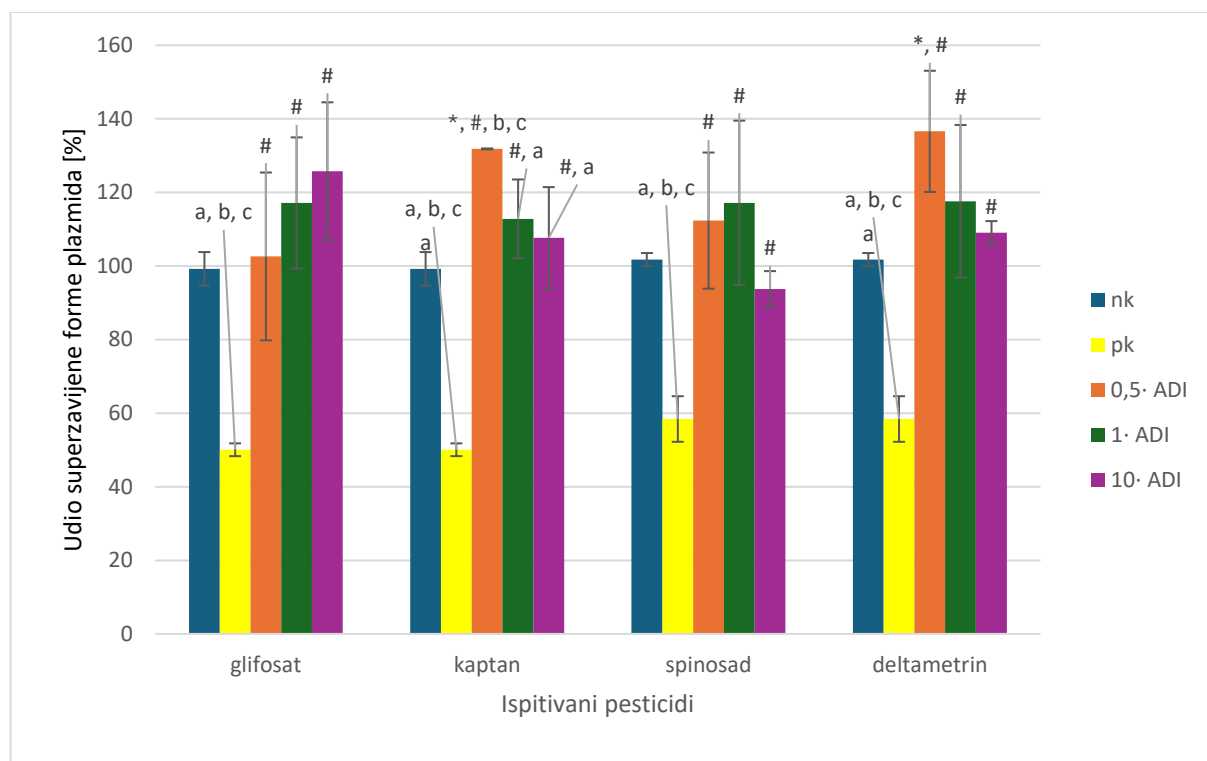
RCP – relaksirana cirkularna forma plazmida; SCP – superzavijena cirkularna forma plazmida; K1 – kontrola koja sadrži samo plazmid ϕ X174 RF1 i nije tretirana UV svjetlom; K2 – kontrola koja uz plazmid ϕ X174 RF1 sadrži i H_2O_2 , ali nije tretirana UV svjetlom; K3 – kontrola koja sadrži plazmid ϕ X174 RF1 te je 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

Slika 13. Optimizacija vremena UV zračenja plazmida ϕ X174 RF1

Uspoređujući intenzitet fluorescencije vrpce relaksiranog sa superzavijenim plazmidom moguće je odrediti stupanj oštećenja plazmida. Iz dobivenih podataka određuje se prooksidacijski učinak pesticida pri čemu veći stupanj oštećenja plazmida (prelazak iz superzavijene u relaksiranu formu) označava jači prooksidacijski učinak.

Dobiveni rezultati prikazani su grafički kao udio superzavijene forme plazmida u ovisnosti o različitim koncentracijama ispitivanih pesticida. Rezultati su izraženi kao srednje

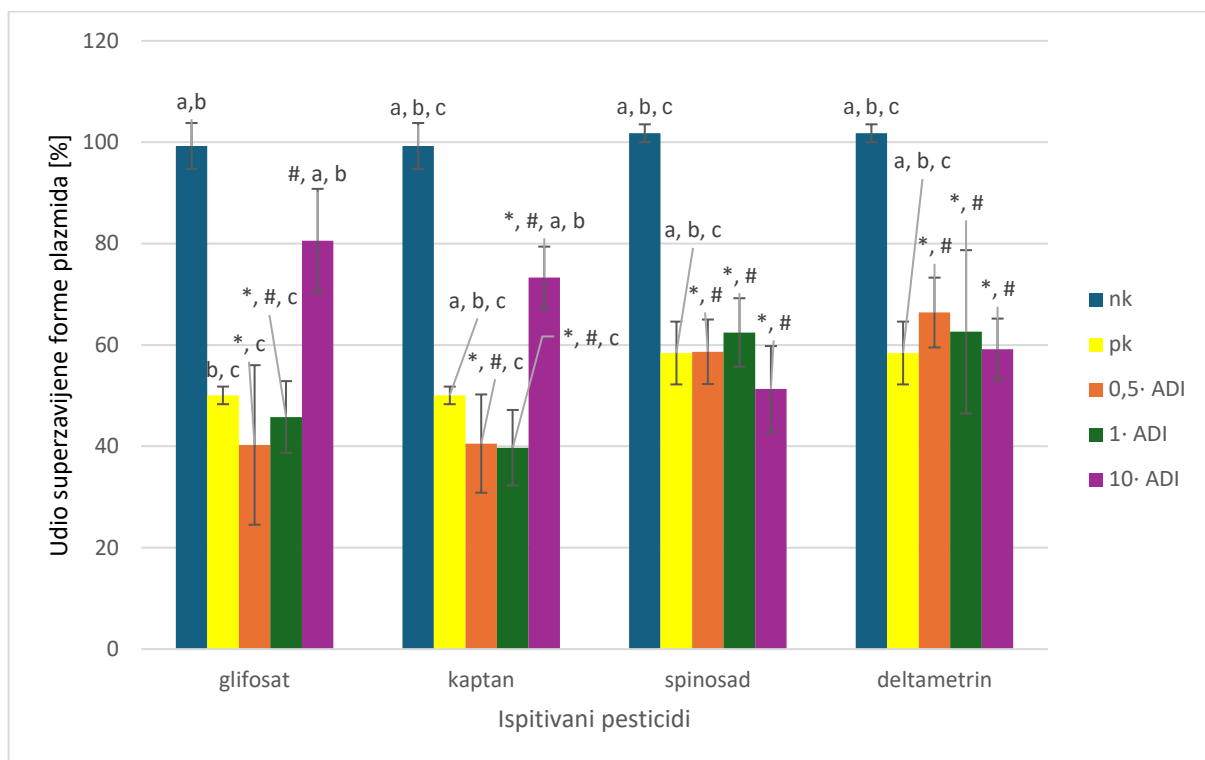
vrijednosti dobivenih podataka za svaku pojedinačnu koncentraciju, uz pripadajuće standardne devijacije. Na slikama su naznačene i statistički značajne razlike.



* – 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 0,5· 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 10· ADI [mg/mL] ($p < 0,05$); nk – negativna kontrola; pk – pozitivna kontrola

Slika 14. Udio superzavijene forme plazmida ϕ X174 RF1 nakon tretmana pesticidima (bez dodatka H_2O_2)

Na slici 14 je prikazan udio superzavijene forme plazmida ϕ X174 RF1, nakon tretmana isključivo pesticidima, u odnosu na pozitivnu i negativnu kontrolu. U pozitivnoj kontroli (sadrži H_2O_2) plazmid je bio izložen djelovanju hidroksilnih radikala nastalih djelovanjem UV zračenja na H_2O_2 . Hidroksilni radikali oštećuju plazmid te u tom slučaju dolazi do njegovog prelaska iz superzavijene u zavijenu formu. Iz slike 14 je vidljivo kako sva 4 pesticida u sve 3 koncentracije (0,5· ADI, 1· ADI, 10· ADI) pokazuju statistički značajno veći udio superzavijene forme plazmida u odnosu na negativnu kontrolu. Negativna kontrola pak ne sadrži H_2O_2 i nije bila podvrgnuta djelovanju UV zračenja. Iz slike 14 je vidljivo da statistički značajno povećanje udjela superzavijene forme plazmida u odnosu na negativnu kontrolu izazivaju jedino kaptan i deltametrin u koncentraciji od 0,5· ADI. Sve preostale koncentracije navedenih pesticida, kao i sve ispitivane koncentracije glifosata i spinosada ne uzrokuju nikakvu statistički značajnu razliku u odnosu na negativnu kontrolu.



* – 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 0,5· 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 10· ADI [mg/mL] ($p < 0,05$); nk – negativna kontrola; pk – pozitivna kontrola

Slika 15. Udio superzavijene forme plazmida ϕ X174 RF1 nakon tretmana pesticidima (uz dodatak H_2O_2)

Slika 15 prikazuje udio superzavijene forme plazmida ϕ X174 RF1, nakon tretmana pesticidima i uz dodatak H_2O_2 , u odnosu na pozitivnu i negativnu kontrolu. Uspoređujući uzorke s pozitivnom kontrolom, na prethodno navedenoj slici je vidljivo kako glifosat u koncentraciji 1· ADI izaziva statistički značajno smanjenje udjela superzavijene forme plazmida u odnosu na kontrolu, dok u koncentraciji 10· ADI izaziva statistički značajno povećanje udjela superzavijene forme plazmida u odnosu na kontrolu. Promatrajući kaptan, koncentracije 0,5· ADI i 1· ADI izazivaju statistički značajno smanjenje udjela superzavijene forme plazmida, dok koncentracija 10· ADI uzrokuje statistički značajno povećanje udjela superzavijene forme plazmida u odnosu na pozitivnu kontrolu. Kod spinosada pak, koncentracije 0,5· ADI i 1· ADI izazivaju statistički značajno povećanje udjela superzavijene forme plazmida, a koncentracija 10· ADI statistički značajno smanjenje udjela superzavijene forme plazmida u odnosu na pozitivnu kontrolu. U slučaju deltametrina, sve 3 ispitivane koncentracije (0,5· ADI, 1· ADI, 10· ADI) uzrokuju statistički značajno povećanje udjela superzavijene forme plazmida u odnosu na pozitivnu kontrolu. Usporedbom uzoraka s negativnom kontrolom, iz slike 15 se može vidjeti kako u slučaju kaptana, spinosada i deltametrina sve 3 ispitivane koncentracije (0,5· ADI, 1· ADI, 10·

ADI) izazivaju statistički značajno smanjenje udjela superzavijene forme plazmida u odnosu na kontrolu, odnosno, sami spojevi kada su u kontaktu. Glifosat pak uzrokuje statistički značajno smanjenje udjela superzavijene forme plazmida u odnosu na negativnu kontrolu u koncentracijama 0,5· ADI i 1· ADI, dok koncentracija 10· ADI ne uzrokuje nikakvu statistički značajnu razliku u odnosu na negativnu kontrolu.

Kašuba i sur. (2017) u svojem su istraživanju ispitali prooksidacijski učinak glifosata metodom DCFH-DA na staničnoj liniji Hep-G2, pri čemu su stanice bile izložene djelovanju glifosata kroz 4 i 24 sata, a ispitivane su koncentracije iznosile 0,5 µg/mL (ADI), 2,91 µg/mL (REL, rezidencijalna razina izloženosti) i 3,5 µg/mL (OEL, razina profesionalne izloženosti). Rezultati navedenog istraživanja sugeriraju da nije došlo do promjene u razini ROS-ova nakon 4 i 24-satnog izlaganja. Autori objašnjavaju da su navedeni rezultati posljedica učinkovitog antioksidacijskog sustava koji je uklonio stvorenu količinu ROS-ova tijekom 4 i 24-satnog izlaganja (Kašuba i sur., 2017).

He i sur. (2022) proveli su istraživanje u kojem su ispitali prooksidacijski utjecaj kaptana na ženski reproduktivni sustav sisavaca, točnije na jajne stanice miševa. Zabilježeno je da izloženost najvišoj ispitivanoj dozi kaptana (100 mg/kg) kroz 28 dana dovodi do povećanja intenziteta fluorescencije DCFH-DA sonde, odnosno do povećanja razine ROS-ova. Navedeno povećanje razine ROS-ova pridonosi oksidacijskom stresu koji je povezan s povećanom apoptozom i autofagijom, što negativno utječe na kvalitetu jajnih stanica miševa (He i sur., 2022).

Kumar i sur. (2018) su pak u svojem istraživanju ispitali prooksidacijski učinak deltametrina na stanične suspenzije timusa i slezene miševa. U istom istraživanju je ispitan i antioksidacijski učinak piperina i kurkumina na navedene stanične sustave. Rezultati sugeriraju da deltametrin u testiranoj dozi (5 mg/kg) kroz 7 dana značajno povećava proizvodnju ROS-ova u timocitima i splenocitima. Ovo povećanje ROS-ova ključni je faktor u oksidacijskom stresu koji dovodi do stanične smrti. Navedeno istraživanje je također pokazalo da su povećane razine ROS-ova učinkovito smanjene primjenom piperina i kurkumina (2,5 mg/kg), koji imaju antioksidacijska svojstva (Kumar i sur., 2018).

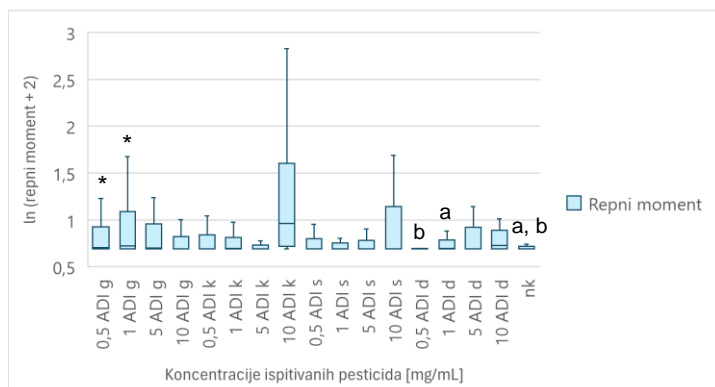
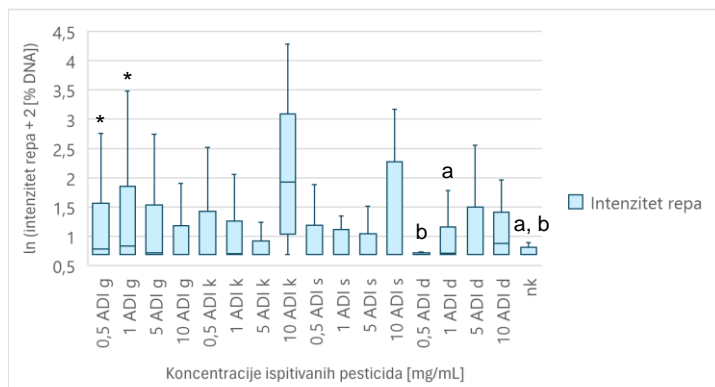
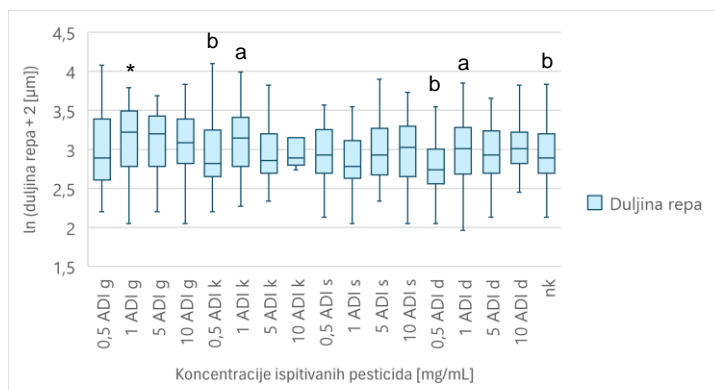
Rezultati ispitivanja prooksidacijskog učinka pesticida metodom DCFH-DA u ovom radu sugeriraju da svi ispitivani pesticidi uzrokuju smanjenje razina ROS-ova na staničnoj liniji AGS, dok u slučaju stanične linije Hep-G2 to čine samo glifosat i kaptan. Kašuba i sur. (2017) su u svojem istraživanju u kojem su ispitane slične koncentracije glifosata kao i u ovom radu (koje nisu dovele do značajnih promjena u razini ROS-ova) zaključili kako je to posljedica učinkovitog antioksidacijskog sustava stanica. Na temelju prethodno navedenoga može se zaključiti da

ispitivani pesticidi nemaju prooksidacijski učinak na testiranim staničnim linijama. Rezultati ispitivanja prooksidacijskog učinka pesticida na modelnom plazmidu ϕ X174 RF1 također sugeriraju da sami pesticidi ne djeluju prooksidacijski u kontaktu s UV svjetlom, a u slučaju kada se dodatkom H_2O_2 generiraju hidroksilni radikali također nije zabilježen značajan pojačani prooksidacijski učinak u odnosu na pozitivnu kontrolu. Najveće ispitivane koncentracije glifosata i kaptana ($10 \cdot ADI$) pak uzrokuju povećanje udjela superzavijene forme plazmida u odnosu na pozitivnu kontrolu, a moguće objašnjenje toga je da navedeni pesticidi obavijaju strukturu plazmida i onemogućuju oštećenja izazvana utjecajem hidroksilnih radikala ili pak na sebe vežu generirane hidroksilne radikale. Iako rezultati ovog rada poriču prooksidacijsko djelovanje ispitivanih pesticida, iz radova drugih autora može se vidjeti kako kaptan i deltametrin na drugim, nehumanim, staničnim sustavima dovode do povećanja razine ROS-ova i posljedično prooksidacijskog učinka posebno nakon dužeg izlaganja stanica pesticidima.

4.4. ANALIZA GENOTOKSIČNOG UČINKA PESTICIDA KOMET TESTOM

Genotoksični učinak pesticida glifosata, kaptana, spinosada i deltametrina na kontinuiranim humanim staničnim linijama AGS i Hep G2 ispitan je komet testom koji je opisan u potpoglavlju 3.2.5. Stanice su tretirane tijekom 24 sata. Kao pozitivna kontrola korišten je vodikov peroksid.

Izmjereni parametri oštećenja DNA bili su duljina repa kometa, intenzitet repa kometa i repni moment kometa. Rezultati su prikazani grafički kao skup pojedinačnih podataka za svaku koncentraciju ispitivanih pesticida te su naznačene statistički značajne razlike.

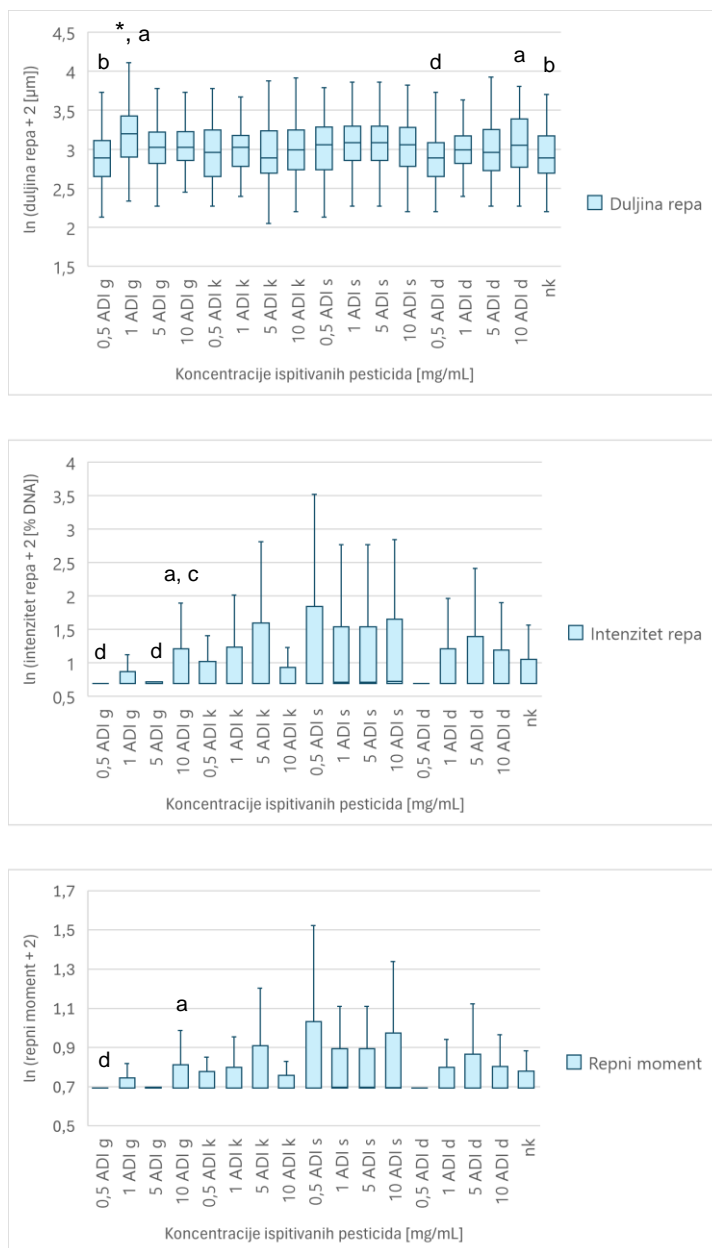


* – statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$); a – statistički značajna razlika u odnosu na 0,5· ADI [mg/mL] ($p < 0,05$); b – statistički značajna razlika u odnosu na ADI [mg/mL] ($p < 0,05$); g – glifosat; k – kaptan; s – spinosad; d – deltametrin; nk – negativna kontrola

Slika 16. Genotoksični učinak glifosata, kaptana, spinosada i deltametrina na staničnoj liniji AGS izražen pomoću parametara genotoksičnog učinka

Na slici 16 prikazane su vrijednosti parametara genotoksičnosti izmjereni na staničnoj liniji AGS izloženoj djelovanju pesticida. Redom su prikazani duljina repa kometa (μm), intenzitet repa kometa (% DNA) i repni moment. Iz navedene slike je vidljivo da jedino glifosat u koncentraciji 1· ADI uzrokuje statistički značajno povećanje duljine repa kometa. Sve preostale koncentracije ispitivanih pesticida nisu pokazale statistički značajne razlike u odnosu

na kontrolu. Također je vidljivo da glifosat u koncentracijama 0,5· ADI i 1· ADI uzrokuje statistički značajno povećanje intenziteta repa kometa i repnog momenta kometa, dok preostale koncentracije ispitivanih pesticida nisu pokazale statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu.



* – 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

Slika 17. Genotoksični učinak glifosata, kaptana, spinosada i deltametrina na staničnoj liniji Hep G2 izražen pomoću parametara genotoksičnog učinka

Slika 17 prikazuje vrijednosti parametara genotoksičnih učinaka izmjerene na staničnoj liniji Hep G2 izloženoj djelovanju pesticida. Redom su prikazani duljina repa kometa (μm), intenzitet repa kometa (% DNA) i repni moment. Iz navedene je slike vidljivo da isto kao i kod stanične linije AGS, jedino glifosat u koncentraciji 1· ADI uzrokuje statistički značajno povećanje duljine repa kometa, dok preostale koncentracije ispitivanih pesticida nisu pokazale statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu. Iz slike je također vidljivo da niti jedan spoj ne značajno utječe na promjenu vrijednosti intenziteta repa, kao ni na promjenu vrijednosti repnog momenta.

Mañas i sur. (2009) su u svojem istraživanju ispitali genotoksični učinak glifosata na staničnoj liniji Hep G2. Za ispitivanje genotoksičnosti je kao i u ovom radu korišten komet test. Ispitane su koncentracije u rasponu od 3mM (0,51 mg/mL) do 7,5 mM (1,27 mg/mL). Rezultati istraživanja ukazuju na značajan porast oštećenja DNA u Hep G2 stanicama. Oštećenje je mjereno putem parametara duljine i intenziteta repa te repnog momenta. Svi navedeni parametri pokazali su značajna povećanja s porastom koncentracija glifosata (Mañas i sur., 2009). Genotoksični učinak glifosata i njegovih formulacija ispitali su i Alvarez-Moya i Reynoso-Silva (2023), također korištenjem komet testa. Kao stanični sustav korišteni su ljudski limfociti koji su bili izloženi koncentracijama glifosata od 0,1 mM (0,02 mg/mL), 1 mM (0,17 mg/mL), 10 mM (1,69 mg/mL) i 50 mM (8,45 mg/mL), kao i ekvivalentnim koncentracijama glifosata u sklopu komercijalnih formulacija. Rezultati istraživanja sugeriraju da i čisti glifosat i komercijalni herbicidi na bazi glifosata izazivaju genotoksične učinke u stanicama ljudske krvi. Genotoksični učinci su bili izraženiji nakon izlaganja stanica komercijalnim formulacijama, što dokazuje da prisutni koformulanti doprinose jačanju genotoksičnog učinka (Alvarez-Moya i Reynoso-Silva, 2023).

Osim ispitivanja citotoksičnog učinka spinosada, Yang i sur. (2016) su u svojem istraživanju proučili i njegov genotoksični učinak na staničnim linijama HEK293 i Hep G2. Na staničnoj liniji HEK293 su ispitane koncentracije spinosada u rasponu od 10 $\mu\text{mol/L}$ (0,015 mg/mL) do 80 $\mu\text{mol/L}$ (0,12 mg/mL), dok su na staničnoj liniji Hep G2 ispitane koncentracije spinosada u rasponu od 12,5 $\mu\text{mol/L}$ (0,018 mg/mL) do 100 $\mu\text{mol/L}$ (0,15 mg/mL). Rezultati provedenog komet testa pokazuju značajnu indukciju lomova u molekuli DNA, što upućuje na genotoksični učinak spinosada pri testiranim koncentracijama (Yang i sur., 2016). Genotoksični učinak spinosada na staničnoj liniji A549 ispitali su i Zhang i sur. (2019) upotrebom komet testa, pri čemu su testirane koncentracije u rasponu od 10 μM (0,015 mg/mL) do 80 μM (0,12 mg/mL). Rezultati istraživanja potvrđuju rezultate istraživanja koje su proveli Yang i sur. (2016), budući da se pokazalo da povećanje koncentracije spinosada dovodi do veće fragmentacije DNA i oštećenja tretiranih stanica, što upućuje na njegov genotoksični učinak (Zhang i sur., 2019).

Rezultati ispitivanja genotoksičnog učinka pesticida u ovom radu pokazuju da glifosat u koncentracijama od 0,5· ADI i 1· ADI uzrokuje statistički značajno povećanje pojedinih parametara genotoksičnog učinka. Ovi rezultati su u skladu s rezultatima radova drugih autora koji su ispitivali genotoksični učinak glifosata na drugim humanim staničnim sustavima, što ukazuje na rizik od genotoksičnog učinka glifosata. Preostali pesticidi (kaptan, spinosad i deltametin), u ispitivanim koncentracijama, nisu pokazali značajan utjecaj na genotoksičnost u usporedbi s kontrolom. Ipak, na primjeru spinosada, je vidljivo da veće koncentracije od onih ispitanih u ovom radu konzistentno uzrokuju povećanje vrijednosti parametara genotoksičnog učinka. Stoga je moguće zaključiti kako genotoksični učinci pesticida mogu varirati ovisno o korištenoj metodologiji, staničnim linijama i koncentracijama te vremenu izloženosti.

Na temelju svih dobivenih rezultata, moguće je donijeti konkretne zaključke o citotoksičnom, proliferacijskom, prooksidacijskom i genotoksičnom učinku pesticida glifosata, kaptana, spinosada i deltametrina kada se primjenjuju u koncentracijama ispitivanim u ovom radu.

Niti jedan testirani pesticid nije pokazao citotoksično djelovanje korištenjem metode Neutral Red. Iako rezultati navedene metode sugeriraju potencijalno proliferativno djelovanje kaptana, spinosada i deltametrina, ispitivanje proliferacijskog učinka klonogenim testom ukazuje na to da niti jedan pesticid ne izaziva produljeno proliferativno djelovanje. Štoviše, glifosat i kaptan pri najvišim ispitivanim koncentracijama pokazuju inhibitorni učinak na staničnu diobu. Prilikom ispitivanja prooksidacijskog učinka pesticida metodom DCFH-DA, rezultati sugeriraju da svi ispitivani pesticidi uzrokuju smanjenje ROS-ova. Budući da se ne može govoriti o antioksidacijskom učinku pesticida, pretpostavka je da je navedeno smanjenje ROS-ova posljedica učinkovitog antioksidacijskog sustava unutar samih stanica. Rezultati ispitivanja prooksidacijskog učinka na modelnom plazmidu ϕ X174 RF1 također poriču prooksidacijsko djelovanje ispitivanih pesticida, dok povećanje udjela superzavijene forme plazmida prilikom tretmana najvećim koncentracijama glifosata i kaptana može biti posljedica toga da ti pesticidi omataju strukturu plazmida, onemogućujući oštećenja uzrokovana hidroksilnim radikalima, ili vežu generirane hidroksilne radikale na sebe. Genotoksični učinak pesticida ispitan je komet testom, a rezultati sugeriraju da od svih ispitanih pesticida, jedino glifosat uzrokuje povećanje promatranih parametara genotoksičnog učinka, odnosno genotoksično djelovanje.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. Niti jedan od testiranih pesticida nije pokazao značajno citotoksično djelovanje na ispitivanim staničnim linijama. Ovo ukazuje na relativnu sigurnost ovih kemikalija u kontekstu kratkotrajne izloženosti, barem na staničnoj razini.
2. Rezultati ispitivanja proliferacijskog učinka pokazali su da testirani pesticidi ne uzrokuju dugotrajne promjene u proliferativnoj sposobnosti stanica. Međutim, glifosat i kaptan pri najvišim testiranim koncentracijama (10· ADI) pokazali su inhibitorni učinak na staničnu diobu, što ukazuje na njihov potencijalno štetan učinak pri višim dozama.
3. Niti jedan istraživani pesticid nije pokazao prooksidacijsko djelovanje i nije povećavao prooksidacijska oštećenja genetičkog materijala u prisutnosti hidroksilnih radikala.
4. Od svih testiranih pesticida, samo je glifosat pokazao povećanje vrijednosti parametara genotoksičnog učinka, što ukazuje na njegovo potencijalno genotoksično djelovanje.

6. LITERATURA

Alsulami RN, Sallans L, Khisamutdinov EF, Pandey U, Glusac K, Wilson RM (2019) Oxidation of nucleic acids: Chemistry of pyrene quinone (PQ 1) and development of dihydrodioxins (DHD 2) as DNA photooxidizing agents. *J Photochem Photobiol A Chem* **376**, 224–237. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2018.09.010>

Alvarez-Moya C, Reynoso-Silva M (2023) Assessment of Genetic Damage Induced via Glyphosate and Three Commercial Formulations with Adjuvants in Human Blood Cells. *Int J Mol Sci* **24**, 4560. <https://doi.org/10.3390/ijms24054560>

Bažok R, Cvjetković B, Ostojčić Z, Barić K (2020) Revolucija i evolucija kemijske metode zaštite bilja, *Glasilo biljne zaštite* **20**, 346-377. <https://hrcak.srce.hr/file/344463> Pristupljeno 16. kolovoza 2024.

Bianco CD, Ourique F, dos Santos DC, Pedrosa RC, Kviecinski MR, Zamoner A (2023) Glyphosate-induced glioblastoma cell proliferation: Unraveling the interplay of oxidative, inflammatory, proliferative, and survival signaling pathways. *Environ Pollut* **338**, 122695. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.122695>

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://www.savjetodavna.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 15. kolovoza 2024.

Calaf GM (2021) Role of organophosphorous pesticides and acetylcholine in breast carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* **76**, 206–217. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.03.016>

Čačija M, Bažok R, Lemić D, Mrganić M, Virić Gašparić H, Drmić Z (2018) Spinosini- insekticidi biološkog podrijetla, *Fragmenta phytomedica* **32**, 43-60. <https://hrcak.srce.hr/file/318288> Pristupljeno 18. kolovoza 2024.

Denžić Lugomer M, Pavliček D, Bilandžić N (2019) Glifosat - od primjene do životinja i ljudi, Veterinarska stanica **50**, 211-221. <https://hrcak.srce.hr/file/326422> Pristupljeno 14. kolovoza 2024.

Dmitrieva NI, Burg MB (2007) Osmotic Stress and DNA Damage. U: Häussinger D, Sies H (ured.) *Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego, str. 241–252.

- Duke SO (2020) Glyphosate: environmental fate and impact. *Weed Sci* **68**, 201–207. <https://doi.org/10.1017/wsc.2019.28>
- EFSA (2024) Statement on the refined environmental risk assessment and impact of the new classification for captan. EFSA- European Food Safety Authority, *EFSA Journal* **22**, e8576. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2024.8576>
- Franco R, Li S, Rodriguez-Rocha H, Burns M, Panayiotidis MI (2010) Molecular mechanisms of pesticide-induced neurotoxicity: Relevance to Parkinson's disease. *Chem Biol Interact* **188**, 289–300. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.06.003>
- Franken NAP, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C (2006) Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc* **1**, 2315–2319. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339>
- Freshney I (2010) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey.
- Gupta VK, Pathak A, Siddiqi NJ, Sharma B (2016) Carbofuran Modulating Functions of Acetylcholinesterase from Rat Brain In Vitro. *Adv Biol* **2016**, 3760967. <https://doi.org/10.1155/2016/3760967>
- Harp PR (2005) Deltamethrin. U: Wexler P (ured.) *Encyclopedia of Toxicology*, 2. izd., Elsevier, New York, str. 736–737.
- He QK, Xu CL, Li YP, Xu ZR, Luo YS, Zhao SC, i sur. (2022) Captan exposure disrupts ovarian homeostasis and affects oocytes quality via mitochondrial dysfunction induced apoptosis. *Chemosphere* **286**, 131625. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131625>
- Jeon S, Lee S-H, Roh J, Kim J-E, Bunch H (2020) Glyphosate influences cell proliferation in vitro. *All Life* **13**, 54–65. <https://doi.org/10.1080/26895293.2019.1702108>
- Juran I, Gotlin Čuljak T, Bažok R (2012) Sintetski piretroidi, *Glasilo biljne zaštite* **3**, 196-210. <https://hrcak.srce.hr/file/249204> Pristupljeno 17. kolovoza 2024.
- Kabir ER, Rahman MS, Rahman I (2015) A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environ Toxicol Pharmacol* **40**, 241–258. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.06.009>
- Kalyabina VP, Esimbekova EN, Kopylova K V, Kratasyuk VA (2021) Pesticides: formulants, distribution pathways and effects on human health – a review. *Toxicol Rep* **8**, 1179–1192. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2021.06.004>

Kašuba V, Milić M, Rozgaj R, Kopjar N, Mladinić M, Žunec S, i sur. (2017) Effects of low doses of glyphosate on DNA damage, cell proliferation and oxidative stress in the HepG2 cell line. *Environ Sci Pollut R* **24**, 19267–19281. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9438-y>

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

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

Kumar A, Sasmal D, Sharma N (2018) Mechanism of deltamethrin induced thymic and splenic toxicity in mice and its protection by piperine and curcumin: in vivo study. *Drug Chem Toxicol* **41**, 33–41. <https://doi.org/10.1080/01480545.2017.1286352>

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

Mahmood I, Imadi SR, Shazadi K, Gul A, Hakeem KR (2016) Effects of Pesticides on Environment. U: Hakeem KR, Akhtar MS, Abdullah SNA (ured.) *Plant, Soil and Microbes: Volume 1: Implications in Crop Science*, Springer International Publishing, Cham, str. 253–269.

Mañas F, Peralta L, Raviolo J, Ovando HG, Weyers A, Ugnia L, i sur. (2009) Genotoxicity of glyphosate assessed by the comet assay and cytogenetic tests. *Environ Toxicol Pharmacol* **28**, 37–41. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2009.02.001>

Mesnager R, Ferguson S, Mazzacuva F, Caldwell A, Halket J, Antoniou MN (2021) Cytotoxicity mechanisms and composition of the glyphosate formulated herbicide RangerPro. *bioRxiv* 2021.11.18.469091. <https://doi.org/10.1101/2021.11.18.469091>

National Center for Biotechnology Information (2023) PubChem Compound Summary for CID 3496, Glyphosate, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glyphosate> Pristupljeno 17. kolovoza 2024.

National Center for Biotechnology Information (2023) PubChem Compound Summary for CID 8606, Captan, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Captan> Pristupljeno 17. kolovoza 2024.

National Center for Biotechnology Information (2023) PubChem Compound Summary for CID 56841558, Spinosad, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Spinosad> Pristupljeno 18. kolovoza 2024.

National Center for Biotechnology Information (2023) PubChem Compound Summary for CID 40585, Deltamethrin, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Deltamethrin> Pristupljeno 18. kolovoza 2024.

Ostojić Z, Brzoja D, Barić K (2018) Status, namjena i potrošnja glifosata u Hrvatskoj i svijetu, *Glasilo biljne zaštite* **18**, 531-541. <https://hrcak.srce.hr/file/344151> Pristupljeno 15. kolovoza 2024.

Pathak VM, Verma VK, Rawat BS, Kaur B, Babu N, Sharma A, i sur. (2022) Current status of pesticide effects on environment, human health and it's eco-friendly management as bioremediation: A comprehensive review. *Front Microbiol* **13**, 962619. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.962619>

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>

Richmond M (2018) Glyphosate: A review of its global use, environmental impact, and potential health effects on humans and other species. *J Environ Stud Sci* **8**, 416-434. <https://doi.org/10.1007/s13412-018-0517-2>

Romero A, Ramos E, Castellano V, Martínez MA, Ares I, Martínez M, i sur. (2012) Cytotoxicity induced by deltamethrin and its metabolites in SH-SY5Y cells can be differentially prevented by selected antioxidants. *Toxicol In Vitro* **26**, 823–830. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.05.004>

Santos VSV, Pereira BB (2020) Properties, toxicity and current applications of the biolarvicide spinosad. *J Toxicol Env Health* **23**, 13–26. <https://doi.org/10.1080/10937404.2019.1689878>

Şekeroğlu V, Ertürk B, Atlı Şekeroğlu Z (2021) Effects of deltamethrin and thiacloprid on cell viability, colony formation and DNA double-strand breaks in human bronchial epithelial cells. *Chemosphere* **263**, 128293. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128293>

Soares D, Silva L, Duarte S, Pena A, Pereira A (2021) Glyphosate Use, Toxicity and Occurrence in Food. *Foods* **10**, 2785. <https://doi.org/10.3390/foods10112785>

Song X (2014) Captan. U: Wexler P (ured.) Encyclopedia of Toxicology, 3. izd., Academic Press, Oxford, str. 659–660.

Yang M, Xiang G, Li D, Zhang Y, Xu W, Tao L (2016) The insecticide spinosad induces DNA damage and apoptosis in HEK293 and HepG2 cells. *Mutat Res-Gen Tox En* **812**, 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2016.11.001>

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

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Fiona Shahini izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Fiona Shahini

Vlastoručni potpis