

Istraživanje utjecaja odabranih aktivnih tvari iz pesticida na ekspresiju gena primjenom in silico analiza

Galić, Mia

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:159:699723>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, svibanj 2024.

Mia Galić

**ISTRAŽIVANJE UTJECAJA ODABRANIH
AKTIVNIH TVARI IZ PESTICIDA NA
EKSPRESIJU GENA PRIMJENOM *IN SILICO*
ANALIZA**

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

Zahvaljujem mentorici prof.dr.sc. Kseniji Durgo na velikoj podršci pri izradi diplomskog rada te na prenesenom znanju i vještinama. Također zahvaljujem i dr.sc. Ani Huđek Turković na izdvojenom vremenu i pomoći sa bazama podataka.

Zahvaljujem prijateljima na svim lijepim trenucima tijekom studiranja.

Veliko hvala mojim roditeljima, koji su mi omogućili da studiram i završim studij, sestri i bratu na strpljenju, podršci i ljubavi.

Hvala mome suprugu na poticanju i motiviranju pri pisanju diplomskog rada i završetku studija.

I na kraju, hvala dragom Bogu 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: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Upravljanje sigurnošću hrane

ISTRAŽIVANJE UTJECAJA ODABRANIH AKTIVNIH TVARI IZ PESTICIDA NA EKSPRESIJU GENA PRIMJENOM *IN SILICO* ANALIZA

Mia Galić, univ. bacc. ing. biotechn. 0058214001

Sažetak: U ovom radu istraživao je utjecaj pesticida na ekspresiju gena pomoću *in silico* analize. Pesticidi čiji je utjecaj istraživao su: glifosat, kaptan, spinosad, deltametrin, acetamiprid, nikosulfuron, S-metolaklor i terbutilazin. Upotreba *in silico* metoda sve je više uznapredovala te se koriste radi relativno brzog prikupljanja podataka o toksičnosti tvari koje nije moguće potpuno ispitati standardnim toksikološkim testovima ili pak za tvari za koje postoje podaci dobiveni standardnim metodama kako bi se provjerila valjanost modela. *In silico* metode se mogu primijeniti s ciljem relativno brzog dobivanja podataka o toksičnosti supstanci koje nije moguće u potpunosti ispitati standardnim toksikološkim testovima. U radu su korištene dvije *online* baze podataka: „*Comparative toxicogenomics database*“ (CTD) i „*String*“. One sadrže podatke o toksičnom djelovanju pesticida. U ovom radu, usmjerenost je bila na utjecaju pesticida na ekspresiju gena u ljudskom genomu.

Ključne riječi: pesticidi, *in silico*, utjecaj, ekspresija, geni

Rad sadrži: 45 stranica, 12 slika, 1 tablica, 41 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. izv. prof. dr. sc. Marina Krpan (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Ksenija Durgo (mentor)
3. dr.sc. Ana Butorac, znan. sur. BIOCentar, Zagreb (član)
4. doc.dr.sc. Teuta Murati (zamjenski član)

Datum obrane: 19. lipanj 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Food Safety Management

RESEARCH ON THE IMPACT OF SELECTED ACTIVE SUBSTANCES FROM PESTICIDES ON GENE EXPRESSION USING IN SILICO ANALYSIS

Mia Galić, univ. bacc. ing. biotechn. 0058214001

Abstract: This study investigates the impact of pesticides on gene expression using in silico analysis. The pesticides investigated include glyphosate, captan, spinosad, deltamethrin, acetamiprid, nicosulfuron, S-metolachlor, and terbutylazine. The use of in silico methods has advanced significantly, providing quick data collection on the toxicity of substances that cannot be fully examined by standard toxicological tests, or for substances with existing data obtained by standard methods to verify model validity. In silico methods can be applied to obtain relatively fast data on the toxicity of substances that cannot be fully examined by standard toxicological tests. The study utilized two online databases: the Comparative Toxicogenomics Database (CTD) and String, both containing data on the toxic effects of pesticides. The focus of this study was on the impact of pesticides on gene expression in the human genome.

Keywords: pesticides, in silico, impact, expression, genes

Thesis contains: 45 pages, 12 figures, 1 tables, 41 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, Associate professor (President)
2. Ksenija Durgo, PhD, Full professor (Supervisor)
3. Ana Butorac, PhD, Research Associate, BIOCenter, Zagreb (Member)
4. Teuta Murati, PhD, Assistant professor (Substitute Member)

Thesis defended: June 19th, 2024

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Glifosat	2
2.2. Kaptan	4
2.3. Spinosad	6
2.4. Deltametrin	7
2.5. Acetamiprid	7
2.6. Nikosulfuron	9
2.7. S-metolaklor	10
2.8. Terbutilazin	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO	12
3.1. <i>In silico</i> metoda	12
3.2. Komparativna baza toksikogenomike	12
3.3. Baza podataka veza (eng. „String“)	16
4. REZULTATI I RASPRAVA	17
4.1. Analiza pesticida i njihovih interakcija s genima <i>in silico</i> metodom	17
4.1.1 Glifosat	17
4.1.2 Kaptan	23
4.1.3 Spinosad	25
4.1.4 Deltametrin	26
4.1.5 Acetamiprid	26
4.1.6 Nikosulfuron	28
4.1.7 S-metolaklor	28
4.1.8 Terbutilazin	30
4.2. Rezultati procjene sinergističkog djelovanja pesticida <i>in silico</i> metodom	32
4.2.1. Glifosat, kaptan i acetamiprid	32
4.2.2. Glifosat, kaptan i deltametrin	33
4.2.3. Nikosulfuron, kaptan i acetamiprid	33
4.2.4. Nikosulfuron, kaptan i deltametrin	34
4.2.5. S-metolaklor, kaptan i acetamiprid	34
4.2.6. S-metolaklor, kaptan i deltametrin	34
4.2.7. Terbutilazin, kaptan i acetamiprid	34
4.2.8. Terbutilazin, kaptan i deltametrin	35
4.3. Procjena utjecaja istraživanih pesticida na ljudski genom i zdravlje	35
5. ZAKLJUČCI	40
6. LITERATURA	41

1. UVOD

U današnje vrijeme, kada su podaci dostupniji nego ikada, u toksikološkim ispitivanjima kemikalija sve se češće koriste *in silico* metode. Postoje različiti načini provođenja te metode, korištenjem različitih *softwarea* i programa do internetki dostupnih baza podataka. Svi ti alati koriste se u svrhu olakšavanja istraživanja koja se provode *in vitro* i *in vivo* metodama, a često se preliminarnim pretraživanjem baze podataka smanjuje broj eksperimenata u koje su uključene eksperimentalne životinje (Javorac i sur. 2019).

Pesticidi su kemijske i biološke tvari koje se koriste za kontrolu, uništavanje ili sprječavanje širenja štetnih organizama koji ugrožavaju biljke ili životinje. Pesticidi se primjenjuju u poljoprivredi, šumarstvu, vrtlarstvu i drugim područjima kako bi se povećao prinos usjeva, spriječile bolesti i uništile štetočine. No, sve više se govori o štetnim učincima pesticida te se provodi sve više istraživanja i procjena „benefit-risk“. Ta procjena ocjenjuje koristi poljoprivredne proizvodnje koje proizlaze iz upotrebe pesticida, poput povećanja prinosa i smanjenja gubitaka od štetnika ili bolesti, u odnosu na rizike koje pesticidi mogu predstavljati za okoliš, zdravlje ljudi, sigurnost hrane i druge aspekte. Ova analiza obično uključuje procjenu različitih čimbenika kao što su toksičnost pesticida, izloženost, ekološki učinci i slično te pomaže regulatornim tijelima u donošenju odluka o reguliranju upotrebe pesticida (EFSA, 2024).

U ovom radu cilj je bio istražiti postoje li podaci o interakciji gena u ljudskom organizmu sa pesticidima koji se danas široko koriste u poljoprivredi. Pesticidi koji su proučavani su: glifosat, kaptan, spinosad, deltametrin, acetamiprid, nikosulfuron, S-metolaklor i terbutilazin. Kako bi se istražilo postoje li takvi podaci, korištene su baze podataka komparativna toksikogenomska baza podataka „CTD“ (eng. *Comparative toxicogenomic database*), baza podataka veza eng. („*String*“) i „*Nacionalna medicinska knjižnica*“ (eng. National Library of medicine). U njima su pretraživani podaci koji su pohranjeni prema istraživanjima i objavljivanim znanstvenim radovima o interakcijama gena sa traženim pesticidima. Na temelju tih podataka te uspoređivanjem znanstvenih radova objavljenih na temu štetnosti navedenih pesticida, doneseni su zaključci o korisnosti baza podataka, ali i o štetnosti pesticida na ljudsko zdravlje.

2. TEORIJSKI DIO

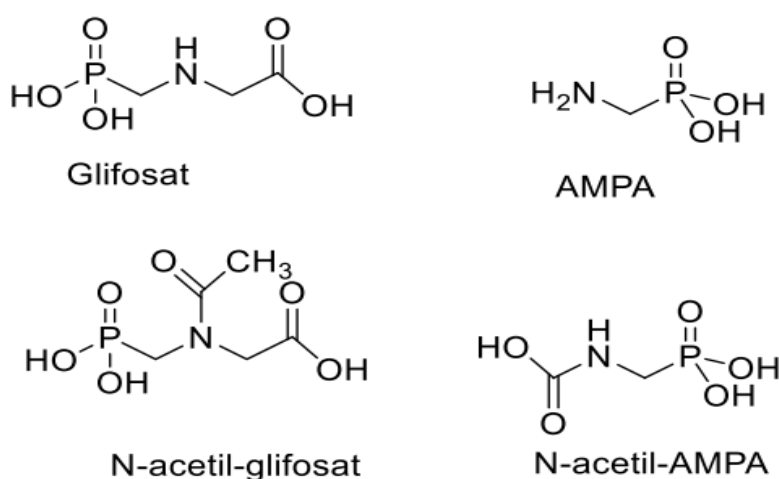
Pesticidi su kemijska sredstva koja se koriste u poljoprivredi za suzbijanje štetnika, bolesti i korova koji mogu oštetiti usjeve. Njihova uporaba može značajno povećati prinose i kvalitetu hrane, ali također može predstavljati rizik za ljudsko zdravlje i okoliš. Postoji nekoliko vrsta pesticida, uključujući insekticide koji se koriste za suzbijanje insekata, herbicide za suzbijanje korova, fungicide za suzbijanje gljivičnih bolesti i rodenticide za suzbijanje glodavaca. (EFSA, 2024).

Sigurnost hrane odnosi se na osiguranje da je hrana koja dopijeva na tržište sigurna za konzumaciju i bezopasna za zdravlje ljudi. To uključuje kontrolu ostataka pesticida u hrani. U mnogim zemljama, upotreba pesticida strogo je regulirana. Agencije poput Europske agencije za sigurnost hrane (EFSA) i Američke agencije za zaštitu okoliša (EPA) postavljaju maksimalne razine ostataka pesticida (eng. MRL - *Maximum Residue Limits*) koje su dopuštene u hrani. Rizici povezani s pesticidima uključuju zdravstvene probleme i utjecaj na okoliš. Dugotrajna izloženost pesticidima može dovesti do različitih zdravstvenih problema, uključujući neurološke poremećaje, rak i probleme s reprodukcijom. Pesticidi također mogu kontaminirati tlo i vodu, te imati štetne učinke na ne ciljane organizme, uključujući korisne insekte poput pčela. Postoji nekoliko načina za smanjenje rizika povezanih s pesticidima. Edukacija poljoprivrednika o pravilnoj upotrebi pesticida može smanjiti rizike. To uključuje korištenje zaštitne opreme, pravilno doziranje i rotaciju pesticida. Organska poljoprivreda, koja koristi prirodne metode suzbijanja štetnika poput bioloških pesticida i integriranog upravljanja štetnicima (IPM), može smanjiti upotrebu kemikalija. Pranje i guljenje voća i povrća također može smanjiti razine pesticida na površini. Pesticidi igraju važnu ulogu u modernoj poljoprivredi, ali njihova upotreba mora biti pažljivo kontrolirana kako bi se osigurala sigurnost hrane i zaštitilo ljudsko zdravlje i okoliš. Kontinuirana istraživanja, edukacija i stroga regulacija ključni su za postizanje tog cilja. (EFSA, 2024).

2.1. Glifosat

Najrasprostranjeniji herbicid je glifosat, koji se primjenjuje kao herbicid za suzbijanje jednogodišnjih i višegodišnjih uskolisnih i širokolisnih korova, kao i višegodišnjih zeljastih i drvenastih korova s dubokim korijenom u vinogradima, voćnjacima, šumskim nasadima, strništima i nepoljoprivrednim površinama. Ovaj kemijski spoj je prvi put sintetiziran u maloj švicarskoj farmaceutskoj tvrtki, no prvo testiranje kao herbicid provela je grupa pod vodstvom Johna E. Franze iz Monsanto grupe 1970-ih (Duke i Powles, 2008). Glifosat, poznat i kao N-(fosfonometil)glicin, pripada skupini aminokiselinskih pesticida. Karakterizira ga mala molekularna veličina te visoka topljivost u vodi, sa strukturnom sličnošću mnogim prirodnim

biljnim materijalima poput aminokiselina i sekundarnih biljnih spojeva. U životinjskom i biljnom organizmu, glifosat se slabo metabolizira, a glavni metabolit je aminometilfosfonska kiselina (AMPA). Ostali mogući metaboliti uključuju acetamidometilfosfonsku kiselinu (N-acetil-AMPA) i N-acetil-(fosfonometil)glicin (N-acetil-glifosat). Kemijska struktura i metaboliti su prikazani na slici 1. U konvencionalnim i genetski modificiranim usjevima koji sadrže CP4-EPSPS modifikaciju, glavni ostatak je nepromijenjen glifosat, dok su u usjevima s glukoza oksidazom (GOX) prisutne jednake ili veće količine AMPA u usporedbi s glifosatom.



Slika 1. Kemijska struktura glifosata i njegovih metabolita (Denžić Lugomer i sur., 2019)

U Europskoj uniji, glifosat je odobren za upotrebu na širokom spektru konvencionalnih usjeva, dok je odobrenje za samo nekoliko GM kultura otpornih na glifosat. Na popisu Ministarstva poljoprivrede u Republici Hrvatskoj trenutno je registrirano 21 sredstvo za zaštitu bilja s glifosatom kao aktivnom tvari. Glifosat se prema klasifikaciji Američke Agencije za zaštitu okoliša (EPA) smatra "praktički netoksičnim i ne nadražujućim". Ova klasifikacija temelji se na podacima o toksičnosti i jedinstvenom načinu djelovanja putem biokemijskog puta koji je prisutan samo u malom broju organizama, većinom zelenih biljaka, koje koriste put šikimske kiseline za proizvodnju aminokiselina. Iako većina znanstvene literature podržava ovu klasifikaciju, Organizacija za hranu i poljoprivredu (FAO) izvijestila je 2005. godine da glifosat i njegov glavni metabolit, aminometilfosfonska kiselina (AMPA), mogu biti potencijalno opasni zbog nakupljanja ostataka u prehrambenom lancu. Studije su pokazale da glifosat i AMPA ostaju prisutni u okolišu dulje vrijeme, što vjerojatno proizlazi iz različitih svojstava tla i uvjeta

okoliša (Denžić Lugomer i sur., 2019).

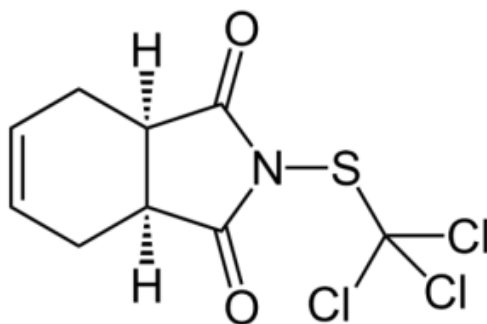
Glifosat djeluje na biljke tako da ometa sintezu aminokiselina fenilalanina, tirozina i triptofana, koje su ključni gradivni blokovi proteina. Budući da su proteini neophodni za razvoj biljne stanice, njihova inhibicija dovodi do smrti biljke, sušenja listova i propadanja cijele biljke. Interesantno je da je šikiminska kiselina univerzalni prekursor za sintezu ovih aminokiselina, a prisutna je u bakterijama i gljivicama. Stoga je očekivano da glifosat ima negativan utjecaj na ove mikroorganizme. Jedinstvenost djelovanja glifosata leži u tome što je on jedina molekula koja izrazito efikasno inhibira enzim 5-enolpiruvil-šikimat-3-fosfat sintazu (EPSPS) u šikiminskom putu (Duke i Powles, 2008). Nekada se vjerovalo da ovaj mehanizam ne postoji u ljudskom organizmu. Međutim, sada znamo da šikimatski put igra ulogu u regulaciji crijevnih bakterija kod ljudi, koje su ključne za imunološki sustav. Istraživanja sugeriraju vezu između glifosata i povećanog rizika od raznih oblika raka kod ljudi, uključujući ne-Hodgkinov limfom i multipli mijelom. Također je utvrđeno da glifosat utječe na ljudske estrogenske receptore te može potaknuti proliferaciju hormonski ovisnog karcinoma dojke. Osim zabrinutosti za potrošače ili one koji dolaze u kontakt s pesticidima, postoji i posebna zabrinutost za one koji rukuju tim kemikalijama. Istraživanja su pokazala da je glifosat disruptor endokrinog sustava u stanicama ljudske posteljice. Studije na tri generacije vodenih puževa otkrile su da glifosat može imati štetne učinke na reprodukciju i razvoj, što implicira moguće posljedice i za ljude. Također, istraživanja na ljudskim bukalnim epitelnim stanicama (uzetim iz unutrašnjosti usta) pokazala su da glifosat ima citotoksična svojstva i mogu oštetiti DNA (Denžić Lugomer i sur., 2019).

2.2. Kaptan

Kaptan (N-[triklormetiltio]-4-cikloheksen-1,2-dikarboksimid) je poljoprivredni fungicid koji se koristi na širokom geografskom području i koji se primjenjuje za suzbijanje različitih bolesti biljaka, posebno plijesni i gljivičnih infekcija. (Gale i sur., 1971) Pripada klasi fungicida N-sulfinil ftalimida (ili kloroalkiltio skupini, zajedno sa strukturno sličnim molekulama kao što su folpet i captafol). Na slici 2 prikazana je kemijska struktura kaptana. Ciljna mjesta djelovanja kaptana su brojna i nisu u potpunosti identificirana. Pokazuje lokalnu aktivnost na više mjesta, što je posljedica njegove brze reakcije s tiolnim skupinama (tj. sulfhidrilne, -SH skupine) koje se nalaze u mnogim enzimima i drugim molekulama od biološke važnosti (npr. cisteinski dio glutaciona ili GSH) (EFSA, 2024). Prva registracija kaptana za uporabu u SAD-u dogodila se 1951. godine prema podacima Agencije za zaštitu okoliša. Do 2003. godine, kaptan je postao drugi najkorišteniji fungicid na jabukama i breskvama u SAD-u prema informacijama iz

Američkog ureda za poljoprivredu. Kaptan je klasificiran od strane Američke agencije za zaštitu okoliša (EPA) kao tvar koja izaziva ozbiljne iritacije očiju, spadajući u kategoriju I otrovnih tvari. Njegov kratki poluživot u ljudskoj krvi (0,97 s) sugerira da možda neće dostići ciljne organe u koncentracijama dovoljnim da izazove kancerogenost. EPA je, osim nakon dugotrajne izloženosti visokim razinama, klasificirala kaptan kao malo vjerojatno kancerogen za ljude, prema Federalnom registru iz 2004. godine (Snyder, 1992).

Kaptan je odobren za upotrebu u EU na jabučastom voću, breskvama i nektarinama, šljivama, trešnjama, rajčicama, jagodama (poljska upotreba) i jagodama u staklenicima. Kao preventivni fungicid, učinkovit je kada se primijeni prije pojave patogenih gljiva. Zahtjev za obnovu odobravanja primjene kaptana prema kriterijima odobrenja predviđenim Uredbom EU 1107/2009 ocijenili su država članica izvjestiteljica (RMS) Austrija i država suizvjestiteljica Italija. RMS je pružio svoju početnu procjenu u kaptan RAR-u koji je dostavljen EFSA-i krajem 2017. Nakon toga EFSA je objavila svoju recenziju 2020. godine. Prema toj recenziji nije identificiran nikakav utjecaj na toksikološke referentne vrijednosti utvrđene u zaključku EFSA-e. Međutim, kao posljedica nove klasifikacije kaptana, metaboliti cis-1,2,3,6-tetrahidroftalimid (THPI) i tiazolidin-2-tion-4-karboksilna kiselina (TTCA) trebali bi postati toksikološki relevantni jer njihov potencijal reproduktivne toksičnosti nije istražen (EFSA, 2024).



Slika 2. Kemijska struktura kaptana (EFSA, 2024)

Kaptan je temeljito proučavan kroz niz toksikokinetičkih istraživanja s i bez smjernica. Brzo se apsorbira iz gastrointestinalnog trakta (> 80%) i metabolizira, ne pokazujući znakove nakupljanja u tijelu. Nema razlika u apsorpciji između spolova. Većina se izlučuje mokraćom. Kod štakora koji su oralno primili kaptan, trećina se izlučila izmetom, a polovica urinom unutar 24 sata. Tkivni ostaci su zanemarivi (najviše u bubrezima). Nalazi toksikokinetičkih studija pomažu razumjeti potencijalnu opasnost kaptana. Teško je postići akutnu sistemsku izloženost oralnim putem zbog njegova izuzetno kratkog poluživota, što proizlazi iz brze reaktivnosti s tiolima. Toksični učinci su ograničeni na mjesta prvog kontakta poput sluznica i površina crijeva

zbog brzog oslobađanja tiofosgena i njegove reaktivnosti prema tiolima (EFSA, 2024). Metabolizam kaptana opisan je kod ljudi. Nakon oralne primjene, metaboliti kaptana cis-1,2,3,6-tetrahidroftalimid (THPI) i tiazolidin-2-tion-4-karboksilna kiselina (TTCA) izlučuju se urinom. THPI se eliminira uglavnom unutar 24 sata i pri visokim (1 mg kg^{-1}) i niskim ($0,1 \text{ mg kg}^{-1}$) dozama (Hines i sur., 2008).

2.3. Spinosad

Spinosad, najznačajniji spoj u skupini spinosina, je biološki aktivna tvar koja je izolirana iz zemljišne bakterije *Saccharopolyspora spinosa* koja se koristi kao insekticid. Ovi spojevi djeluju želučano i kontaktno te su efikasni insekticidi protiv različitih vrsta kukaca. Zahvaljujući širokoj primjeni i specifičnom mehanizmu djelovanja, spinosini su postali važna alternativa konvencionalnim insekticidima u integriranoj zaštiti bilja, pri čemu je rijetko zabilježena rezistentnost. Nema unakrsne rezistentnosti s piretroidima, organofosfornim insekticidima i regulatorima rasta i razvoja kukaca. Ovi spojevi su ekološki prihvatljivi jer su djelotvorni 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 u organskoj proizvodnji (Čačija i sur., 2018). Tijekom aerobne fermentacije bakterija *S. spinosa* stvara se prirodna smjesa, pri čemu spinosin A čini glavnu komponentu (oko 85 %), dok je spinosin D manje zastupljen (oko 15 %) te se takva smjesa naziva spinosad (Kirst i sur., 2010). Budući da je spinosad pokazao izvanredno insekticidno djelovanje, Dow AgroScience je pokrenuo program istraživanja kemije spinosina kako bi proširio primjenu i poboljšao insekticidna svojstva (Sparks i sur., 2001). Spinosad ima kontaktno djelovanje 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 ostale organizme. Kalifornija je prvi put registrirala Spinosad 1997. godine. Iako je rezistentnost rijetka, postoji mogućnost njenog razvoja, stoga bi spinosin trebalo kombinirati ili izmjenjivati s insekticidima drugačijeg mehanizma djelovanja. Otkrića spinetorama, butenil-spinosina i ciklobutil-spinosina sugeriraju da postoje mnogi potentniji analozi spinosada, a daljnjim istraživanjima moguće je pronaći ili stvoriti spinosine s još jačim djelovanjem. Otkriće i komercijalni razvoj spinosina predstavljaju primjer uspješnog iskorištavanja potencijala prirodnih proizvoda u pronalaženju novih, komercijalno korisnih i vrijednih proizvoda koji se mogu koristiti u integriranoj zaštiti bilja (Čačija i sur., 2018).

Spinosad trenutno prolazi kroz EU procese obnove: EFSA evaluacija, ECHA pregled razvrstavanja i obnova biocida. U tijeku je procjena podataka o mogućem uzrokovanju

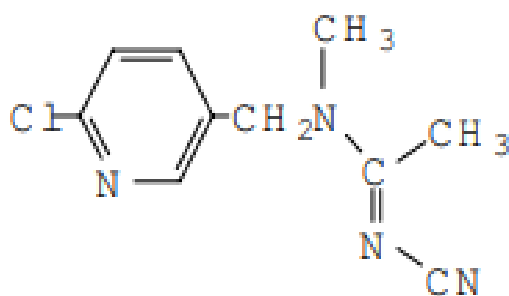
endokrinih poremećaja od strane Nizozemske (CTGB) kao države članice izvjestiteljice – očekuju se zaključci oko ljeta 2024. Zaključak EFSA-e očekuje se u prvom tromjesečju 2024., a zaključak ECHA-e u četvrtom tromjesečju 2024. Dozvola za upotrebu spinosada istječe 30. travnja 2025.

2.4. Deltametrin

Deltametrin je jedan od najčešće korištenih piretroidnih insekticida, prvi put sintetiziran 1974. godine. Piretroidi su sintetički spojevi koji imaju slična svojstva kao prirodni insekticid piretrin, koji se izvlači iz cvjetova nekih vrsta kamilice. Deltametrin je razvijen kao analog piretrina, ali s poboljšanom stabilnošću i dugotrajnim djelovanjem te je kao takav najzastupljeniji na tržištu (16% svih piretroida). Svjetska Zdravstvena Organizacija (WHO) svrstala ga je u grupu 2 umjereno štetnih djelatnih tvari. Ovaj insekticid se koristi za kontrolu širokog spektra insekata u poljoprivredi, kućanstvima i industriji. Može se primijeniti na različitim površinama, uključujući biljke, tlo, drveće, kao i unutar zgrada za kontrolu insekata kao što su komarci, mravi, moljci i stjenice. Deltametrin djeluje tako da blokira natrijeve kanale u živčanim stanicama insekata, što rezultira njihovom paralizom i smrću. Ovaj mehanizam djelovanja čini ga vrlo učinkovitim u kontroli insekata, ali također može imati štetan utjecaj na neke korisne organizme poput pčela i drugih oprašivača. Razgrađuje se kroz procese hidrolize, fotolize i mikrobiološke aktivnosti. Ima mali potencijal ispiranja u podzemne vode zbog jake tendencije vezanja za organsku tvar tla. Deltametrin se ne veže jako za dijelove biljaka, pa je vrijeme isparavanja s biljaka veće u odnosu na tlo. Istraživanja pokazuju visoku stopu mortaliteta korisnih kukaca iz porodica *Staphylinidae* i *Lynphiidae* nakon primjene deltametrina u uljanoj repici i pšenici (Juran i sur. 2012). Ova tvar je odobrena za upotrebu kao biocid u EEA i/ili Švicarskoj za suzbijanje insekata, mrava, itd.

2.5. Acetamiprid

Acetamiprid je insekticid iz razreda kloronikotinil neonikotinoida. Pretežna upotreba acetamiprida je suzbijanje insekata koji oštećuju lisnate biljke. Dostupan je kao prašak za vlaženje spreman za upotrebu ili granule koje se mogu raspršiti u vodi. Ostali neonikotinoidi podvrgavaju se biotransformaciji u glodavaca što rezultira metabolitom s većim afinitetom za nikotinske receptore, povećavajući mogućnost toksičnosti kod sisavaca.



Slika 3. Kemijska struktura acetamiprida (EPA, 2002)

Trenutačno, acetamiprid nije pokazao biotransformaciju u toksični metabolit, no nedavno je pokazano da acetamiprid podliježe transepitelnoj apsorpciji kroz crijevne stanice, što potencijalno može dovesti do nakupljanja acetamiprida u tijelu. S obzirom na dosadašnja istraživanja, acetamiprid predstavlja niske rizike opasnosti za populacije ljudi ili kralježnjaka u normalnim uvjetima. U situacijama visoke bioakumulacije, toksičnost za divlje životinje može biti očita (Wallace, 2005). Pesticid je kontaktnog, želučanog i sistemičnog djelovanja, namijenjen za suzbijanje insekata koji imaju usni ustroj za sisanje i grizenje, kao i gusjenica iz reda *Lepidoptera*. Dozvoljena je njegova primjena na krumpiru, šećernoj trsci, jabukama, breskvama, krastavcima, rajčici, paprici te ukrasnom bilju. Aktivna tvar u sredstvu djeluje na način da ometa prijenos podražaja u živčanom sustavu štetnika na drugačiji način nego što je to primijećeno kod organofosforinih pesticida, karbamata i piretroida. Pokazuje izraženu sistemičnost te brzo i snažno, ali umjereno rezidualno djelovanje (Lipovski, 2019).

Primarni mehanizam toksičnosti acetamiprida protiv insekata posljedica je njegovog djelovanja na nikotinske kolinergičke receptore. Jedinstvena priroda neonikotinoida kao insekticida je da će negativno nabijena cijano (ili nitro) skupina specifično komunicirati s kationskim veznim područjem koje je jedinstveno za insekte. Ovo će djelovanje prenijeti selektivnost djelovanja protiv insekata i ostaviti nikotinske receptore sisavaca relativno nepromijenjenima (Wallace, 2024).

Prema EPA-i, pesticid acetamiprid je klasificiran kao "malo vjerojatno" kancerogen za ljude. Kod sisavaca je acetamiprid izazvao generaliziranu, nespecifičnu toksičnost i čini se da nije imao specifičnu toksičnost za ciljne organe. Ne očekuje se da će ukupna izloženost acetamipridu koja proizlazi iz traženih uporaba premašiti razinu zabrinutosti Agencije (EPA) za bilo koju podskupinu stanovništva, uključujući dojenčad i djecu. Acetamiprid ima relativno nisku akutnu i kroničnu toksičnost kod sisavaca i nije bilo dokaza o karcinogenosti, neurotoksičnosti, mutagenosti ili endokrinom poremećaju. Ukupne procjene rizika za acetamiprid za hranu i vodu

ne premašuju razinu zabrinutosti Agencije za akutne i kronične razine izloženosti.

2.6. Nikosulfuron

Nikosulfuron (2-[(4,6-dimetoksipirimidin-2-ilkarbamoi)sulfamoil]-N,N-dimetilnikotinamid) je herbicid širokog spektra, unutarnje apsorpcije te selektivnih, provodljivih sulfonilurea nakon nicanja. Na tržištu je prisutan od 1990-ih i uglavnom se koristi za sprječavanje i kontrolu jednogodišnjih trava i širokih korova u poljima kukuruza. Nikosulfuron ima visoku učinkovitost u suzbijanju korova u kukuruznim poljima, što znači da trenutačno ne postoji bolji alternativni herbicid, pa se očekuje rast potražnje za njim. Poznat je po selektivnosti prema kukuruzu, što znači da ima minimalan utjecaj na samu kulturu, dok istovremeno efikasno suzbija korove. Nikosulfuron se primjenjuje nakon nicanja korova i kukuruza, a unutar biljaka se kreće putem provodnih tkiva, što mu omogućuje da djeluje i na korove koji nisu u neposrednom kontaktu s herbicidom. Glavni način djelovanja nikosulfurona jest inhibicija enzima acetolaktat sintaze (ALS), koji je ključan u biosintezi aminokiselina u biljkama. No, ostaci nikosulfurona u okolišu potencijalno mogu izazvati štetne ekološke i biološke učinke. Nikosulfuron se razgrađuje putem foto-razgradnje, kemijske hidrolize i mikrobne razgradnje (Zhong i sur., 2023). Acetolaktat sintaza (ALS) je ciljno mjesto za djelovanje nikosulfurona, a osjetljive biljke ne uspijevaju dobro rasti kada je ovaj enzim inhibiran. Nikosulfuron smanjuje sintezu aminokiselina razgranatog lanca (BCAA), uključujući valin, leucin i izoleucin, te istovremeno inhibira aktivnost acetolaktat sintaze i rast biljnih stanica, što rezultira smrću biljaka. Fitotoksičnost uzrokovana nikosulfuronom može uzrokovati skraćivanje korijena, lokalnu klorozu, žućenje, ljubičastost i kovrčavost lišća kod nekih biljaka. Neki hibridi kukuruza su osjetljivi na nikosulfuron, a nakon tretmana od 7 do 14 dana, takva fitotoksičnost može ozbiljno oštetiti osjetljive sadnice. Nasuprot tome, manje osjetljivi hibridi kukuruza obično mogu razgraditi nikosulfuron do neaktivnih spojeva ili ga konjugirati s glukozom. Nikosulfuron također djeluje kao inhibitor fotosintetskog sustava, smanjujući sadržaj klorofila i sposobnost biljke da provodi fotosintezu ometanjem brzine prijenosa elektrona. Prskanje nikosulfuronom mijenja metabolizam biljnih stanica, što dovodi do raspadanja kloroplasta i promjene boje lišća biljaka (Xu i sur., 2022). Prema članku "Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance nicosulfuron" Europske agencije za sigurnost hrane (EFSA), ocjena rizika nikosulfurona obuhvaćala je procjenu potencijalnih rizika za ljude, životinje i okoliš. Prema navedenoj procjeni nije bilo većih zabrinutosti i rizika te je korištenje nikosulfurona dozvoljeno u EU.

2.7. S-metolaklor

S-metolaklor (2-kloro-N-(2-etil-6-metilfenil)-N-[(1S)-2-metoksi-1-metiletil]acetamid} je herbicid koji se koristi za suzbijanje jednogodišnjih sjemenskih uskolisnih i određenih širokolisnih korova. Najčešće se koristi nakon sjetve, prije nicanja uzgajanih biljaka, te se često kombinira s drugim aktivnim tvarima (Šunjić, 2018). S-metolaklor je neionki spoj koji pripada kloracetamidnim herbicidima. On je rezultat zaštićenog pomaka u sustavu katalizatora proizvodnog procesa za metaloklor, koji se sastoji od 50% R- i 50% S-izomera (Shaner i sur., 2006). Iako je fizički i kemijski ekvivalentan metalokloru, S-metolaklor je obogaćen S-izomerom, što povećava njegovu herbicidnu aktivnost kod osjetljivih biljaka (Blaser i Spindler, 1997). Ovo obogaćivanje rezultiralo je značajnim smanjenjem rizika za aplikatore, potrošače i okoliš jer su stope primjene u poljoprivrednim usjevima smanjene za 35% (Shaner i sur., 2006). Početkom 2024. godine, Ministarstvo poljoprivrede obavjestilo je javnost o povlačenju S-metolaklora sa tržišta: „Provedbenom uredbom Komisije (EU) 2024/20 od 12. prosinca 2023. o neproduljenju odobrenja aktivne tvari S-metolaklor, koja je stupila na snagu 23. siječnja 2024. godine, propisano je da države članice moraju oduzeti registraciju sredstvima za zaštitu bilja koji sadržavaju aktivnu tvar S-metolaklor.“ Prema podacima praćenja Europske komisije, sadržaj S-metolaklor i njemu srodnih aktivnih metabolita u podzemnim vodama prelazi graničnu vrijednost od 0,1 µg/L, uključujući metabolite za koje postoji velika sumnja da su genotoksični i kancerogeni. Također, postoji visok rizik od sekundarnog trovanja za sisavce koji se hrane glistama.

2.8. Terbutilazin

Terbutilazin (2-tert-butilamino-4-klor-6-etilamino-1,3,5-triazin), jest herbicid širokog spektra koji postaje sve značajniji u poljoprivredi. Koristi se za suzbijanje korova u različitim poljoprivrednim usjevima kao što su kukuruz, šećerna repa, suncokret, soja i voće poput jabuka i šljiva. Zamjenjuje poznatiji, duže proučavani atrazin u nekoliko regija svijeta (Steinberg et al., 1994). On pripada skupini klortriazinskih herbicida, kao i atrazin i simazin, koji su zabranjeni za upotrebu zbog ekoloških problema u većini zemalja. Terbutilazin djeluje i nakon nicanja korova, ali se i često koristi za tretmane prije nicanja, kao na primjer u uzgoju kukuruza. Njegov način djelovanja jest inhibiranje Hillove reakcije te apsorpcija CO₂ u fotosintezi. Zabrinutost oko sigurnosti terbutilazina raste zbog njegove toksičnosti u malim dozama i dugotrajne stabilnosti u okolišu. Primjerice, poluživot terbutilazina iznosi oko 70 dana, ali ta vrijednost može varirati ovisno o karakteristikama tla, kao što su vlažnost i temperatura. Također, dugoročni rizik za neciljane organizme evidentiran je kod sisavaca, biljaka, beskralježnjaka i vodenih organizama. Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA) predložila je klasifikaciju terbutilazina u kategoriju

3 karcinogena. Utvrđeno je da terbutilazin (u kombinaciji s drugim herbicidima) negativno utječe na tlo budući da je inhibitor enzima poput dehidrogenaze, katalaze, ureaze, β -glukozidaze, arilsulfataze i fosfataze. Također, ima negativan utjecaj na članove mikrobioma tla kao što je *Azotobacter*, aktinomicete i gljive (Caggia, 2022).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. *In silico* metoda

Prema EFSA-inoj definiciji, *in silico* metoda jest istraživačka teorijska metoda, posebno ona koja obuhvaća računalne modele za predviđanje vjerojatnih toksikoloških ili drugih učinaka tvari. *In silico* metode koriste se radi relativno brzog prikupljanja podataka o toksičnosti tvari koje nije moguće potpuno ispitati standardnim toksikološkim testovima, ili pak za tvari za koje postoje podaci dobiveni standardnim metodama kako bi se provjerila valjanost modela (Myatt i sur., 2018). *In silico* metode se mogu primijeniti s ciljem relativno brzog dobivanja podataka o toksičnosti supstanci koje nije moguće u potpunosti ispitati standardnim toksikološkim testovima. Jedan od primjera za primjenu *in silico* metoda u toksikologiji je biotransformacija kemikalija, s obzirom na to da nastali metaboliti mogu biti toksičniji od polazne kemikalije ili ih je teško identificirati, izolirati i sintetizirati u svrhe testiranja. Zatim, u tijeku procesa sinteze ljekovite supstance može doći do formiranja nečistoća (intermedijeri i sporedni produkti) čiji toksikološki profil je potrebno ispitati, kao i procijeniti rizik po zdravlje ljudi. Još jedna značajna uloga *in silico* metoda je da pruži uvid u strukturne karakteristike supstance, koje su odgovorne za toksičnost, i na taj način omogućiti dizajn i sintezu sigurnijih kemikalija. Također, *in silico* metode se mogu koristiti za rangiranje nedovoljno ispitanih supstanci za daljnja toksikološka ispitivanja, radi dobivanja svih neophodnih podataka o toksičnosti supstance (Javorac i sur., 2019).

U osnovi *in silico* metode su različite baze podataka koje omogućuju jednostavan pristup integriranim informacijama u strukturiranom i standardiziranom formatu što olakšava usporedbu i analizu podataka. Postoji mnogo različitih baza podataka o kemikalijama, genima i bolestima, od kojih svaka ima svoje specifične prednosti, ali i nedostatke (Živančević i sur., 2019). U ovom radu, korištene su *online* baze podataka koje sadrže različite podatke o toksikološkim osobinama različitih kemikalija, u ovom slučaju korištene za toksikološku procjenu pesticida.

3.2. Komparativna baza toksikogenomike

Komparativna baza toksikogenomike „CTD“ (eng. *Comparative Toxicogenomic Database*) baza je javno dostupan izvor podataka na internetskoj stranici <http://CTD.mdibl.org>, koji povezuje kemikalije, njihove interakcije s genima s utjecajem na fenotip i razvoj bolesti te omogućava konstruiranje mreže puteva neželjenih ishoda. Baza pruža detaljniju analizu mehanizama toksičnosti, identifikaciju biomarkera i mogućnost ispitivanja utjecaja dviju ili više kemikalija, što predstavlja ogroman značaj u ispitivanju toksičnosti mješavina i polaznu osnovu za daljnja istraživanja. „CTD“ baza podataka je konstruirana 2004. godine kao rezultat suradnje

Katedre za biološke znanosti Sveučilišta u Sjevernoj Karolini i MDi Biološkog laboratorija u američkoj saveznoj državi Maine. Ova baza integrira podatke koji opisuju odnos između kemikalija, gena/proteina i bolesti ljudi, te je podržana od strane Nacionalnog instituta za zdravlje okoliša SAD-a (Živančević i sur., 2019).

U ovom radu, istraživane su interakcije pesticida s genima pomoću navedene „CTD“ baze podataka. To se provodilo na način da se odabirom opcije „Chemical-gene interaction“ u sustav unio traženi pesticid te su odabrane opcije „gene“, što označava interakcije s genima te za organizam opcija „human“, kako bi proučili gene u ljudskom organizmu s kojima navedeni pesticid ulazi u interakciju (slika 4).

The screenshot shows the CTD (Comparative Toxicogenomics Database) interface. At the top is the CTD logo with the tagline "Illuminating how chemicals affect human health." Below this is a navigation bar with links: Home, Search, Analyze, Download, Commercial Users, and Help. The main section is titled "Chemical-Gene Interaction Query". It contains several input fields and dropdown menus:

- Chemical**: A dropdown menu set to "equals" and a text input field containing "name: Glyphosate".
- Chemical-gene interaction**: A section with three checked checkboxes: "increases", "decreases", and "affects (degree unspecified)". To the right is a dropdown menu with options: "ANY", "abundance", "activity", "binding", and "cotreatment".
- Gene**: A dropdown menu set to "equals" and a text input field.
- Gene form**: A dropdown menu with options: "protein", "gene", "mRNA", and "promoter".
- Pathway**: A dropdown menu set to "equals" and a text input field.
- Organism**: A dropdown menu set to "equals" and a text input field containing "TAXON:9606".
- Gene Ontology**: A dropdown menu set to "equals" and a text input field.
- Sort by**: A dropdown menu set to "Chemical".
- Results per page**: Radio buttons for "50" (selected) and "500".

 At the bottom of the form are "Search" and "Clear" buttons.

Slika 4. Primjer pretrage iz baze „Comparative Toxicogenomics Database“. „TAXON:9606“ označava ljudski organizam.

Geni koji su dobiveni pretraživanjem, proučavani su pomoću baze podataka „National Library of Medicine“ koja je povezana sa „CTD“ bazom direktnim hiperlinkom na svakome genu. Baza se može naći na internetskoj stranici sa hiperlinkom: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Ona sadrži informacije o svakome genu (primjer na slici 5) navedenom u poglavlju „Rezultati i rasprava“ te su takve informacije dobivane iz znanstvenih radova.

ABAT 4-aminobutyrate aminotransferase [*Homo sapiens* (human)]

Gene ID: 18, updated on 3-Apr-2024

Summary	
Official Symbol	ABAT provided by HGNC
Official Full Name	4-aminobutyrate aminotransferase provided by HGNC
Primary source	HGNC:HGNC:23
See related	Ensembl:ENSG00000183044 MIM:137150; AllianceGenome:HGNC:23
Gene type	protein coding
RefSeq status	REVIEWED
Organism	Homo sapiens
Lineage	Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo
Also known as	GABAT; NPD009; GABA-AT
Summary	4-aminobutyrate aminotransferase (ABAT) is responsible for catabolism of gamma-aminobutyric acid (GABA), an important, mostly inhibitory neurotransmitter in the central nervous system, into succinic semialdehyde. The active enzyme is a homodimer of 50-kD subunits complexed to pyridoxal-5-phosphate. The protein sequence is over 95% similar to the pig protein. GABA is estimated to be present in nearly one-third of human synapses. ABAT in liver and brain is controlled by 2 codominant alleles with a frequency in a Caucasian population of 0.56 and 0.44. The ABAT deficiency phenotype includes psychomotor retardation, hypotonia, hyperreflexia, lethargy, refractory seizures, and EEG abnormalities. Multiple alternatively spliced transcript variants encoding the same protein isoform have been found for this gene. [provided by RefSeq, Jul 2008]
Expression	Biased expression in liver (RPKM 93.2), kidney (RPKM 61.6) and 11 other tissues See more

Slika 5. Primjer informiranja o genu „ABAT“ sa stranice baze podataka „*National Library of Medicine*“

Također, pomoću baze i njezinog alata „VennViewer“ provedena je analiza potencijalnog zajedničkog djelovanja pesticida u grupama po tri. Analizirani su geni, fenotipski učinci i bolesti na koje pesticidi utječu. Na slici 6 prikazan je primjer takvog pretraživanja, a na slici 7 kako izgledaju rezultati.

Create a Venn diagram to compare associated data sets for up to three chemicals, diseases, or genes.

1
Select your input type

☒ Chemicals (MeSH® names, synonyms, or IDs, or CAS RNs) ?
☐ Genes (NCBI symbols or IDs) ?
☐ Phenotypes (NCBI symbols or IDs) ?
☐ Diseases (MeSH or OMIM names, synonyms, or IDs) ?

2
Enter your chemicals

Chemical 1:
Chemical 2:
Chemical 3: (optional)

3
Choose the data sets to compare

Chemical associations ?

Gene associations ?

☒ Curated

Phenotype associations ?

☐ Curated

Disease associations ?

☐ Curated
☐ Inferred

Pathway associations ?

☐ Enriched (recommended)
☐ Inferred

Gene Ontology associations ?

☐ Enriched (recommended)
☐ All

4
Add a filter

Chemical-gene interaction type ?

☒ increases
☒ decreases
☒ affects (degree unspecified)

ANY

abundance

activity

binding

cotreatment

Hierarchical or Direct Relationships ?

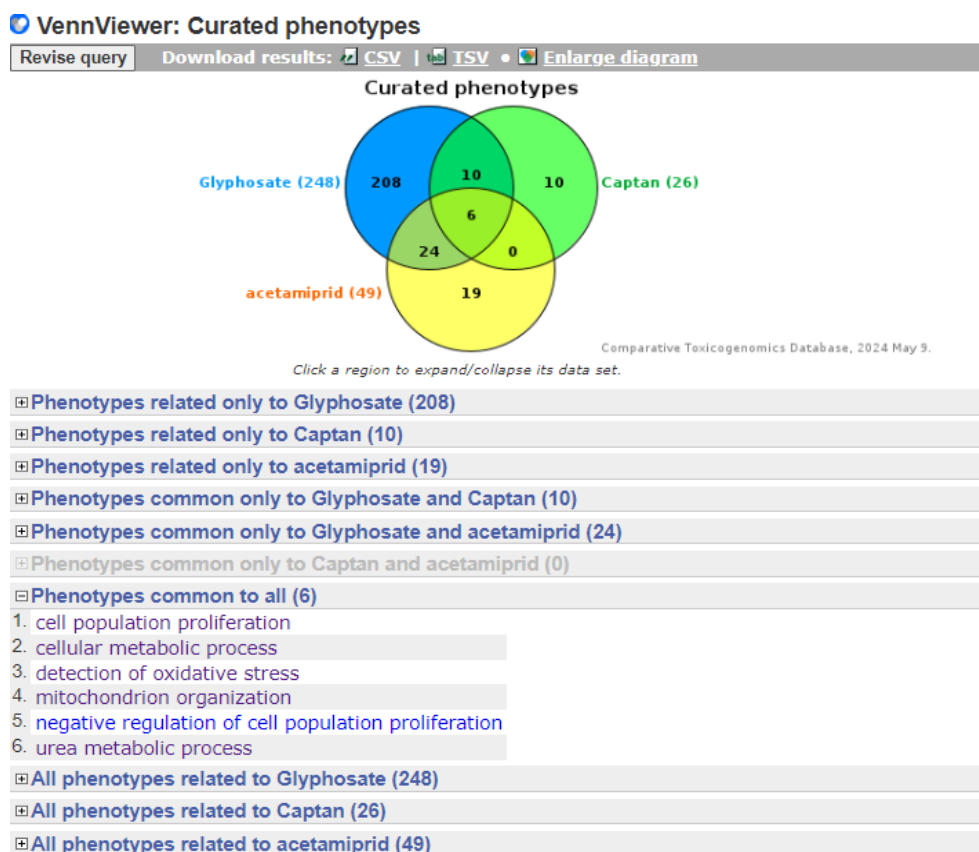
☒ Commonalities between exact terms only
☐ Commonalities between exact terms and any descendant terms (warning: may result in too many hits)

Disease interaction type ?

Submit

Clear

Slika 6. Alat „VennViewer“ i primjer pretraživanja zajedničkih genskih učinaka glifosata, kaptana i acetamiprida



Slika 7. Prikaz rezultata alata „VennViewer“ u obliku fenotipskih učinaka glifosata, kaptan i acetamiprida

3.3. Baza podataka veza (eng. „String“)

„String“ je baza podataka poznatih i predviđanih protein-protein interakcija. Interakcije uključuju izravne (fizičke) i neizravne (funkcionalne) asocijacije. Oni proizlaze iz računalnog predviđanja, iz prijenosa znanja između organizama i iz interakcija agregiranih iz drugih (primarnih) baza podataka. Interakcije u bazi „String“ izvedene su iz pet glavnih izvora: genomske prognoze konteksta, visokoprotočnih laboratorijskih eksperimenata, s (očuvanom) koekspresijom, automatizirano pretraživanje teksta (eng. *textmining*) te prethodno znanje iz baza podataka. Baza podataka „String“ trenutno pokriva 59 309 604 proteina iz 12 535 organizama (Szkarczyk i sur., 2023).

U ovom radu, putem „String“ baze podataka, analizirane su protein-protein interakcije onih proteina za koje kodiraju geni s kojima potencijalni pesticid, prema informacijama iz „CTD“ baze podataka, ulazi u interakciju. Na taj način, može se dobiti slika o ukupnom utjecaju pesticida na određene genske klastere u ljudskom organizmu, što se potom prenosi i na različite biološke i molekularne funkcije. U poglavlju „Rezultati i rasprava“ prikazani su rezultati interakcija što se može vidjeti i na slikama.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Analiza pesticida i njihovih interakcija s genima *in silico* metodom

4.1.1 Glifosat

Analizom kemikalije glifosat pomoću *in silico* metode, korištenjem baze podataka "CTD" (*Comparative Toxicogenomics Database*) dobiveni su rezultati koji su prikazani u obliku gena s kojima glifosat stupa u interakciju te koji kodiraju za različite proteine.

Dobiveni geni kodiraju za proteine koji sudjeluju u različitim funkcijama u ljudskom organizmu. U nastavku su pojašnjene funkcije pojedinih proteina. Svi podaci o genima i proteinima dobiveni su iz baze podataka „National Library of Medicine“ (NLM).

- ABAT kodira za enzim 4-aminobutirat aminotransferazu (ABAT) koja je odgovorna za katabolizam gama-aminobutiratne kiseline (GABA), važnog, uglavnom inhibicijskog neurotransmitera u središnjem živčanom sustavu, u sukcinat polu-fosforan.
- B3GNT2 kodira za enzim iz obitelji beta-1,3-N-acetilglukozaminiltransferaze. Ovaj enzim je tip II transmembranski protein. Preferira supstrat lakto-N-neotetroza te sudjeluje u biosintezi poli-N-acetilaktosaminskih lanaca.
- Protein kodiran genom CASP3 je kaspaza 3. To je cisteinsko-asparaginska proteaza koja igra ključnu ulogu u završnoj fazi apoptoze stanica. Kodirani protein razdvaja i deaktivira poli(ADP-riboza) polimerazu, dok razdvaja i aktivira proteine vezane za regulatorni element sterola, kao i kaspaze 6, 7 i 9. Ovaj protein sam je procesuiran od strane kaspaza 8, 9 i 10. To je dominantna kaspaza uključena u razdvajanje prekursora proteina amiloid-beta 4A, povezanog s neuronskom smrću u Alzheimerovoj bolesti.
- CDKN1A je gen koji kodira za snažan inhibitor kinaza ovisnih o ciklinu. Kodirani protein veže se za i inhibira aktivnost kompleksa ciklin-ciklinsko-dependentna kinaza 2 ili ciklinsko-dependentna kinaza 4, te tako djeluje kao regulator staničnog ciklusa u G1 fazi. Ekspresiju ovog gena strogo kontrolira tumorski supresorski protein p53, putem kojeg ovaj protein posreduje u zadržavanju staničnog ciklusa u G1 fazi kao odgovor na različite stresne podražaje. Ovaj protein može interagirati s jezgrinim antigenom proliferirajućih stanica, pomoćnim faktorom DNA polimeraze te ima regulatornu ulogu u replikaciji DNA u S fazi i popravku oštećenja DNA. Ovaj protein cijepaju kaspaze slične CASP3, što dovodi do dramatične aktivacije kinaze ovisne o ciklinu 2 i može biti ključan u izvršenju apoptoze nakon aktivacije kaspaza.
- CEP68 kodira za centrosomalni protein 68. On omogućuje specifičnu aktivnost vezanja proteinske domene i aktivnost vezanja protein kinaze. Uključen u koheziju centriola-centriola i lokalizaciju proteina u organele. Smješten u nekoliko staničnih komponenti,

uključujući centriolarni satelit, citosol i nukleoplazmu.

- Gen CHMP1A (eng. Charged multivesicular body protein 1A) kodira člana CHMP/Chmp obitelji proteina koji su uključeni u multivezikularno tjelesno razvrstavanje proteina u unutrašnjost lizosoma. Početno predviđanje proteinske sekvence koju kodira ovaj gen sugeriralo je da je kodirani protein metalopeptidaza. Nomenklatura je nedavno ažurirana kako bi odražavala ispravnu biološku funkciju ovog kodiranog proteina. Za ovaj gen pronađeno je nekoliko transkripata koji kodiraju različite izoforme.
- COQ7 kodira za protein koenzim Q7 hidroksilazu-protein sličan mitohondrijskoj hidroksilazi iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae* koja je uključena u biosintezu ubikinona. Mutacije u genu kvasca dovode do sporijeg razvoja i duljeg životnog vijeka.
- ENTPD8 je gen koji kodira za ektonukleozid trifosfat difosfohidrolazu 8. Predviđeno je da taj enzim omogućuje aktivnost gvanozin-difosfataze i aktivnost uridin-difosfataze te da je uključen u katabolički proces nukleozid difosfata. Također, predviđa se da djeluje uzvodno ili unutar procesa biosinteze nukleozid difosfata i procesa biosinteze nukleozid monofosfata.
- ERCC8 kodira za ERCC ekscizijski popravak 8, CSA podjedinica kompleksa ubikvitin ligaze. Ovaj gen kodira WD ponavljajući protein, koji je u interakciji s proteinom Cockayneovog sindroma tipa B (CSB) i s proteinom p44, podjedinicom RNA polimeraze II transkripcijskog faktora IIH. Mutacije u ovom genu identificirane su kod pacijenata s nasljednom bolešću Cockayneovim sindromom (CS).
- ESR1- estrogen receptor 1. Protein kodiran ovim genom regulira transkripciju mnogih gena induciranih estrogenom koji igraju ulogu u rastu, metabolizmu, spolnom razvoju, gestaciji, i druge reproduktivne funkcije te se izražava u mnogim nerekproduktivnim tkivima. Receptor kodiran ovim genom igra ključnu ulogu u raku dojke, raku endometrija i osteoporozi. Ovaj gen navodno ima desetke varijanti transkripta zbog upotrebe alternativnih promotora i alternativnog spajanja, međutim, priroda pune dužine mnogih od ovih varijanti ostaje neizvjesna.
- GTPBP4 kodira za GTP vezujući protein 4. GTP-vezujući proteini su GTPaze i funkcioniraju kao molekularni prekidači koji se mogu prebacivati između dva stanja: aktivno, kada je GTP vezan, i neaktivno, kada je GDP vezan. 'Aktivno' u ovom kontekstu obično znači da molekula djeluje kao signal za pokretanje drugih događaja u stanici. Kada se izvanstanični ligand veže za receptor vezan za G-protein, receptor mijenja svoju konformaciju i uključuje trimernu G proteine koji se povezuju s njim uzrokujući da izbace svoj GDP i zamijene ga GTP-om. Prekidač se isključuje kada G protein hidrolizira vlastiti vezani GTP, pretvarajući ga natrag u BDP. Ali prije nego što se to dogodi, aktivni protein ima priliku difundirati dalje od receptora i isporučiti svoju poruku na dulje vrijeme

svojoj nižnjoj meti.

- HAVCR2 jest gen koji kodira za stanični receptor virusa hepatitisa A 2. Protein kodiran ovim genom pripada superobitelji imunoglobulina i TIM obitelji proteina. CD4-pozitivni T pomoćni limfociti mogu se podijeliti u tipove 1 (Th1) i 2 (Th2) na temelju njihovih obrazaca lučenja citokina. Th1 stanice uključene su u stanično posredovanu imunost na intracelularne patogene i reakcije preosjetljivosti odgođenog tipa, dok su Th2 stanice uključene u kontrolu izvanstaničnih helmintičkih infekcija i promicanje atopijskih i alergijskih bolesti. Ovaj protein je protein stanične površine specifičan za Th1 koji regulira aktivaciju makrofaga, inhibira auto- i aloimune odgovore posredovane Th1, te potiče imunološku toleranciju.
- HM13 (eng. histocompatibility minor 13) - Protein kodiran ovim genom, koji se nalazi na endoplazmatskom retikulumu, katalizira intramembransku proteolizu nekih signalnih peptida nakon što su odcijepljeni od predproteina. Ova aktivnost je potrebna za generiranje epitopa ljudskog limfocitnog antigena-E izvedenih iz signalne sekvence koje imunološki sustav prepoznaje i za obradu proteina jezgre virusa hepatitisa C.
- KCNA6 kodira za člana potporodice A kalijevih naponskih kanala 6. Kalijevi kanali predstavljaju najsloženiju klasu naponskih ionskih kanala s funkcionalnog i strukturnog stajališta. Njihove različite funkcije uključuju regulaciju otpuštanja neurotransmitera, otkucaja srca, lučenja inzulina, neuronske ekscitabilnosti, epitelnog transporta elektrolita, kontrakcije glatkih mišića i volumena stanica. Kodirajući dio ovog gena je bez introna, a gen je grupiran s genima KCNA1 i KCNA5 na kromosomu 12.
- KCP (eng. kielin cysteine rich BMP regulator) - Predviđeno je da djeluje uzvodno od ili unutar diferencijacije hematopoetskih progenitorskih stanica i pozitivne regulacije BMP signalnog puta. Predviđeno je da se nalazi u izvanstaničnom prostoru.
- MAP2K4 je gen koji kodira protein kinazu 4 aktiviranu mitogenom. Ovaj gen kodira člana porodice protein kinaze aktivirane mitogenom (MAPK). Članovi ove porodice djeluju kao integracijska točka za više biokemijskih signala i uključeni su u širok raspon staničnih procesa kao što su proliferacija, diferencijacija, regulacija transkripcije i razvoj. Ovaj protein je fosforiliran na ostacima serina i treonina pomoću MAPKKK i nakon toga fosforilira nizvodno ciljeve MAPK na ostacima treonina i tirozina. Prijavljeno je da sličan protein kod miša igra ulogu u organogenezi jetre. Pseudogen ovog gena nalazi se na dugom kraku kromosoma X. Alternativno spajanje rezultira višestrukim varijantama transkripta.
- MAPK1 gen kodira protein kinazu 1 aktiviranu mitogenom, člana porodice MAP kinaza. MAP kinaze djeluju kao integracijska točka za višestruke biokemijske signale i uključene su u širok raspon staničnih procesa kao što su proliferacija, diferencijacija, regulacija

transkripcije i razvoj. Aktivacija ove kinaze zahtijeva njezinu fosforilaciju pomoću uzvodnih kinaza. Nakon aktivacije, ova kinaza prelazi u jezgru stimuliranih stanica, gdje fosforilira nuklearne mete. Jedna studija također sugerira da ovaj protein djeluje kao transkripcijski represor neovisno o njegovoj kinaznoj aktivnosti.

- MAPK3 gen kodira protein kinazu 3 aktiviranu mitogenom, člana ranije spomenute porodice MAP kinaza. Ovu kinazu aktiviraju uzvodne kinaze, što rezultira njezinom translokacijom u jezgru gdje fosforilira nuklearne mete.
- MSH4 (eng. mutS homolog 4) - Ovaj gen kodira člana mutS porodice za popravak DNA. Ovaj član je protein specifičan za mejozu koji nije uključen u korekciju neusklađenosti DNA, ali je potreban za recipročnu rekombinaciju i pravilnu segregaciju homolognih kromosoma u mejozi I. Ovaj protein i MSH5 tvore heterodimer koji se jedinstveno veže za „Holliday Junction“ i njegov razvojni progenitor, izazivajući na taj način ADP-ATP razmjenu i stabilizirajući interakciju između roditeljskih kromosoma tijekom popravka dvolančanog loma mejoze.
- NDUFAF2 – NADH ubikinon oksidoreduktaza (kompleks I) katalizira prijenos elektrona s NADH na ubikinon (koenzim Q) u prvom koraku dišnog lanca mitohondrija, što rezultira translokacijom protona kroz unutarnju membranu mitohondrija. Mutacije u ovom genu uzrokuju progresivnu encefalopatiju koja je posljedica nedostatka mitohondrijskog kompleksa I.
- NOL7 kodira za nukleolarni protein 7. Protein kodiran ovim genom nalazi se u jezgri, gdje održava nukleolarnu strukturu i stopu rasta stanice. Kodirani protein također djeluje kao supresor tumora i regulator angiogeneze. RB tumor supresorski gen regrutira faktore transkripcije na ovaj gen i pozitivno regulira njegovu ekspresiju.
- NSMCE4A kodira za NSE4 homolog A, komponenta kompleksa SMC5-SMC6. Uključen u pozitivnu regulaciju odgovora na podražaj oštećenja DNA. Smješten u nuklearnom tijelu. Dio je kompleksa SMC5-SMC6.
- PEX26 je gen koji kodira za peroksisomalni faktor biogeneze 26. On usidrava gene PEX1 i PEX6 na membrane peroksisoma, vjerojatno za stvaranje heteromernih kompleksa AAA ATPaze potrebnih za uvoz proteina u peroksisome. Defekti u ovom genu uzrok su poremećaja biogeneze peroksisoma komplementacijske skupine 8 (PBD-CG8). PBD se odnosi na skupinu peroksisomalnih poremećaja koji proizlaze iz neuspjeha uvoza proteina u peroksisomalnu membranu ili matriks. PBD skupinu čine četiri poremećaja: Zellwegerov sindrom (ZWS), neonatalna adrenoleukodistrofija (NALD), infantilna Refsumova bolest (IRD) i klasična rizomelična hondrodisplazija točkasta (RCDP).
- QARS1 kodira za glutaminil-tRNA sintetazu 1. Aminoacil-tRNA sintetaze kataliziraju

aminoacilaciju tRNA pomoću njihove srodne aminokiseline. Zbog svoje središnje uloge u povezivanju aminokiselina s tripletima nukleotida sadržanim u tRNA, smatra se da su aminoacil-tRNA sintetaze među prvim proteinima koji su se pojavili u evoluciji. Iako je prisutna u eukariotima, glutaminil-tRNA sintetaza (QARS) je odsutna u mnogim prokariotima, mitohondrijima i kloroplastima, u kojima Gln-tRNA(Gln) nastaje transamidacijom pogrešno acilirane Glu-tRNA(Gln). Glutaminil-tRNA sintetaza pripada porodici aminoacil-tRNA sintetaze klase I.

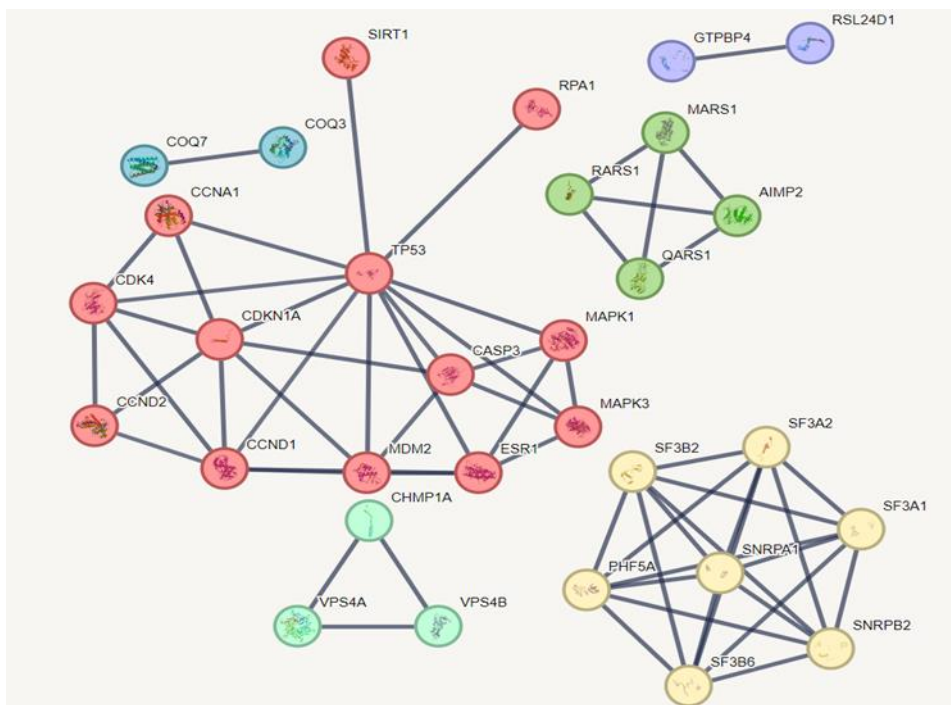
- RNF39 (eng. ring finger protein 39)- Ovaj gen nalazi se unutar glavne regije histokompatibilnog kompleksa klase I na kromosomu 6. Studije sličnog štakorskog proteina sugeriraju da ovaj gen kodira protein koji igra ulogu u ranoj fazi sinaptičke plastičnosti.
- SF3B2 kodira za „splicing factor 3b subunit 2“, podjedinicu 2 proteinskog kompleksa faktora spajanja 3b. Faktor spajanja 3b, zajedno s faktorom spajanja 3a i 12S RNA jedinicom, tvori U2 mali nuklearni ribonukleoproteinski kompleks (U2 snRNP). Kompleks faktora spajanja 3b/3a veže pre-mRNA uzvodno od mjesta grananja introna na način neovisan o sekvenci i može usidriti U2 snRNP na pre-mRNA. Faktor spajanja 3b također je sastavni dio manjeg spliceosoma tipa U12. Podjedinica 2 povezuje se s pre-mRNA uzvodno od mjesta grananja na mjestu sidrenja. Podjedinica 2 također izravno djeluje s podjedinicom 4 kompleksa faktora spajanja 3b. Podjedinica 2 je hidrofilni protein s N-završetkom bogatim prolinom i produžetkom bogatim glutamatom na C-završetku.
- SYNPO2 kodira za protein sinaptopodin 2 koji omogućuje aktivnost vezanja alfa-aktinina i aktivnost vezanja filamina. Uključen je u pozitivnu regulaciju snopa aktin filamenta te pozitivnu regulaciju migracije stanica. Smješten u nekoliko staničnih komponenti, uključujući „Z“ liniju tj. granicu sarkomera.
- TP53 kodira za tumorski protein p53. tumorski supresorski protein koji sadrži domene transkripcijske aktivacije, vezanja DNA i oligomerizacije. Kodirani protein reagira na različite stanične stresove kako bi regulirao ekspresiju ciljnih gena, čime inducira zaustavljanje staničnog ciklusa, apoptozu, starenje, popravak DNA ili promjene u metabolizmu. Mutacije u ovom genu povezane su s raznim vrstama raka kod ljudi, uključujući nasljedne vrste raka kao što je Li-Fraumenijev sindrom.
- TRIM31 (eng. tripartite motif containing 31) što bi u slobodnom prijevodu značilo trodjelni protein koji sadrži motiv, gdje je motiv podjedinica DNA. Ovaj gen kodira protein koji funkcionira kao E3 ubikvitin-protein ligaza. Ovaj gen pokazuje promijenjenu ekspresiju u određenim tumorima i može biti negativan regulator rasta stanica.
- UBE2W kodira za ubikvitin konjugirajući enzim E2 W. Ovaj gen kodira enzim koji konjugira ubikvitin lokaliziran u jezgri (E2) koji, zajedno s enzimima koji aktiviraju

ubikvitin (E1) i ligiraju (E3), koordinira dodavanjem ubikvitinskog dijela na postojeći protein. Kodirani protein potiče sveprisutnost proteinske skupine komplementacije Fanconijeve anemije i može biti važan u popravku oštećenja DNA.

- VMO1 (eng. vitelline membrane outer layer 1 homolog) homolog proteina koji je prisutan u vanjskom sloju žućkaste membrane jaja i igra bitnu ulogu u odvajanju žumanjka od bjelanjka te sprječavanju infekcije bakterijama stvaranjem barijere od vlaknastih slojeva u ptičjim jajima. Smješten u ekstracelularnom egzosomu.

Unošenjem navedenih gena u bazu podataka „*String*“ dobiveni su rezultati prikazani u obliku interakcije istih gena te su nastali genski klasteri prikazani na slici 8. Geni koji ne ulaze u interakcije s drugim genima nisu prikazani na slici 8.

Prema bazi podataka „*String*“, interakcije između gena sudjeluju u odgovoru stanice na oštećenje DNA, regulaciji metaboličkih procesa DNA te na molekularnoj razini utječe na aktivnost MAP kinaza kinaze. Time se može zaključiti kako glifosat ulazi u navedene procese i uzrokuje promjene u njima.



Slika 8. Prikaz genskih klastera koje stvaraju geni na koje utječe glifosat zajedno sa drugim genima na koje on nužno nema utjecaj u ljudskom organizmu. Svaka boja predstavlja jedan genski cluster. Svaki od njih na različit način sudjeluje u odgovoru stanice na oštećenje DNA, regulaciji metaboličkih procesa DNA te na molekularnoj razini utječu na aktivnost MAP kinaza.

4.1.2. Kaptan

Sljedeći pesticid koji je analiziran korištenjem baze podataka „CTD“ (Comparative Toxicogenomics Database) jest kaptan. Dobiveni su rezultati koji su prikazani u obliku gena s kojima on stupa u interakciju te koji kodiraju za različite proteine.

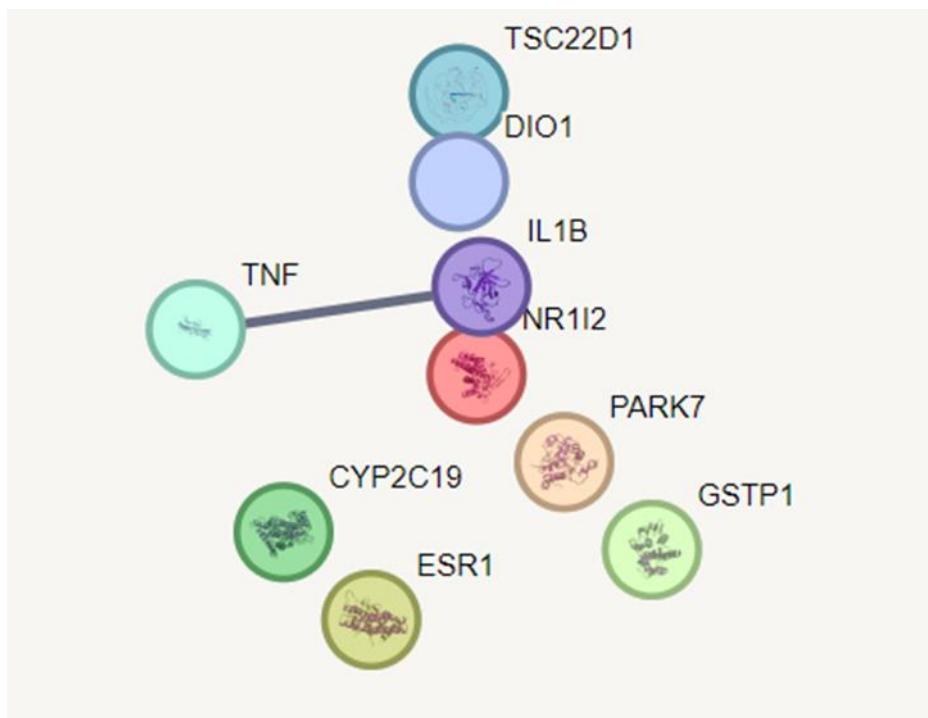
Dobiveni geni kodiraju za proteine koji sudjeluju u različitim funkcijama u ljudskom organizmu. U nastavku su pojašnjene funkcije pojedinih proteina. Svi podaci o genima i proteinima dobiveni su iz baze podataka „National Library of Medicine“ (NLM).

- CYP2C19 (eng. cytochrome P450 family 2 subfamily C member 19) ovaj gen kodira člana superobitelji enzima citokroma P450. Proteini citokroma P450 su monooksigenaze koje kataliziraju mnoge reakcije uključene u metabolizam lijekova i sintezu kolesterola, steroida i drugih lipida. Ovaj protein se nalazi u endoplazmatskom retikulumu i poznato je da metabolizira mnoge ksenobiotike, uključujući antikonvulzivni lijek mefenitoin, omeprazol, diazepam i neke barbiturate.
- DIO1 kodira za jodotironin dejodinazu 1. Protein kodiran ovim genom pripada porodici jodotironin dejodinaza. On katalizira aktivaciju, kao i inaktivaciju hormona štitnjače dejodinacijom vanjskog i unutarnjeg prstena. Reakcija aktivacije uključuje pretvorbu prohormona tiroksina (3,5,3',5'-tetrajodotironina, T4), koji luči štitnjača, u bioaktivni hormon štitnjače (3,5,3'-trijodotironin, T3) putem 5'-dejodinacija. Ovaj protein osigurava većinu cirkulirajućeg T3, koji je neophodan za rast, diferencijaciju i bazalni metabolizam u kralješnjaka. Ovaj protein je selenoprotein, koji sadrži rijetku aminokiselinu selenocistein (Sec) na svom aktivnom mjestu.
- ESR1 kodira za estrogen receptor 1 (već opisano u poglavlju 4.1.1.).
- GSTP1 je gen koji kodira za protein glutation S-transferaza pi 1. Glutacion S-transferaze (GST) su enzimi koji igraju važnu ulogu u detoksikaciji katalizirajući konjugaciju mnogih hidrofobnih i elektrofilnih spojeva s reduciranim glutationom. Na temelju njihovih biokemijskih, imunoloških i strukturnih svojstava, topljivi GST-ovi su kategorizirani u 4 glavne klase: alfa, mu, pi i theta. Ovaj član obitelji GST je polimorfni gen koji kodira aktivne, funkcionalno različite proteine varijante GSTP1 za koje se smatra da funkcioniraju u metabolizmu ksenobiotika i igraju ulogu u osjetljivosti na rak i druge bolesti.
- IL1B - Protein kodiran ovim genom, interleukin 1 beta, član je porodice interleukina 1 citokina. Ovaj citokin proizvode aktivirani makrofagi kao proprotein, koji se proteolitički obrađuje u svoj aktivni oblik pomoću kaspaze 1 (CASP1/ICE). Ovaj citokin je važan medijator upalnog odgovora i uključen je u niz staničnih aktivnosti, uključujući staničnu

proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu. Utvrđeno je da indukcija ciklooksigenaze-2 (PTGS2/COX2) ovim citokinom u središnjem živčanom sustavu (SŽS) doprinosi upalnoj preosjetljivosti na bol. Slično, IL1B je uključen u patogenezu ljudskog osteoartritisa.

- NR1I2 (eng. nuclear receptor subfamily 1 group I member 2). Ovaj genski produkt pripada superobitelji nuklearnih receptora, čiji su članovi faktori transkripcije karakterizirani domenom koja veže ligand i domenom koja veže DNA. Kodirani protein je transkripcijski regulator gena citokroma P450 CYP3A4, koji se veže na odgovorni element promotora CYP3A4 kao heterodimer s 9-cis receptorom retinoične kiseline RXR. Aktivira ga niz spojeva koji induciraju CYP3A4, uključujući deksametazon i rifampicin.
- PARK7 kodira za protein-deglikazu DJ-1, koji pripada porodici proteina peptidaze C56. Djeluje kao pozitivan regulator transkripcije ovisne o androgenskom receptoru. Također može funkcionirati kao redoks-osjetljivi šaperon, kao senzor za oksidativni stres, i očito štiti neurone od oksidativnog stresa i stanične smrti. Defekti u ovom genu uzrok su autosomno recesivne rane Parkinsonove bolesti 7.
- TNF kodira za tumorski faktor nekroze, višenamjenski proupalni citokin koji pripada superobitelji tumorskih faktora nekroze (TNF). Ovaj citokin uglavnom izlučuju makrofagi. Može se vezati i tako funkcionirati preko svojih receptora TNFRSF1A/TNFR1 i TNFRSF1B/TNFR2. Uključen je u regulaciju širokog spektra bioloških procesa uključujući staničnu proliferaciju, diferencijaciju, apoptozu, metabolizam lipida i koagulaciju, kao i u razne bolesti, uključujući autoimune bolesti, inzulinsku rezistenciju, psorijazu, reumatoidni artritis, ankilozantni spondilitis, tuberkulozu, autosomno dominantnu policističnu bolest bubrega i rak. Mutacije u ovom genu utječu na osjetljivost na cerebralnu malariju, septički šok i Alzheimerovu bolest.
- TSC22D1 kodira za domenski protein 1 porodice TSC22, člana porodice TSC22 domene faktora transkripcije leucinskog zatvarača. Protein nastao ekspresijom ovog gena je stimuliran transformirajućim faktorom rasta beta i regulira transkripciju više gena uključujući natriuretski peptid tipa C te može igrati ključnu ulogu u supresiji tumora putem indukcije apoptoze stanica raka, a polimorfizam jednog nukleotida u promotoru ovog gena povezan je s dijabetičkom nefropatijom.

Prethodno navedeni geni su uneseni u bazu podataka „String“. dobiveni su rezultati prikazani u obliku interakcije gena. Prema navedenom prikazu, jasno je da geni uglavnom ne ulaze u interakcije međusobno, osim IL1B i TNF, tako da niti jedan klaster nije prikazan, već su rezultati zapravo zajednički utjecaji pojedinih gena u ljudskom organizmu. Rezultati su prikazani na slici 9.



Slika 9. Prikazani su rezultati interakcija gena s kojima kaptan ulazi u interakciju. Vidljivo je da nema stvaranja genskog klastera, već samo veze između TNF i IL1B.

4.1.3. Spinosad

Analiza korištenjem baze podataka „CTD“ (Comparative Toxicogenomics Database) dala je rezultate o pesticidu spinosadu te o genima s kojima on stupa u interakciju. U ovom slučaju dobivena su samo dva gena koji kodiraju za proteine koji sudjeluju u različitim funkcijama u ljudskom organizmu. U nastavku su pojašnjene funkcije pojedinih proteina. Svi podaci o genima i proteinima dobiveni su iz baze podataka „National Library of Medicine“ (NLM).

- ABCB1 (eng. ATP binding cassette subfamily B member 1) kodira za protein povezan s membranom i član superobitelji ATP-vezujućih kaseti (ABC) transportera. ABC proteini prenose različite molekule kroz izvanstanične i unutarstanične membrane. Geni ABC podijeljeni su u sedam različitih podfamilija (ABC1, MDR/TAP, MRP, ALD, OABP, GCN20, White). Ovaj protein je član podfamilije MDR/TAP. Članovi podobitelji MDR/TAP uključeni su u rezistenciju na više lijekova. Protein kodiran ovim genom je pumpa efluksa lijeka ovisna o ATP-u za ksenobiotske spojeve sa širokom specifičnošću supstrata. Odgovoran je za smanjeno nakupljanje lijeka u stanicama rezistentnim na više lijekova i često posreduje u razvoju otpornosti na lijekove protiv raka. Ovaj protein također djeluje kao prijenosnik u krvno-moždanoj barijeri. Mutacije u ovom genu povezane su s rezistencijom na kolhicin i upalnom bolesti crijeva 13.

- CHRNA7 kodira za protein alfa 7 nikotinski kolinergički receptor. Nikotinski acetilkolinski receptori (nAChR) članovi su superobitelji ionskih kanala upravljanih ligandima koji posreduju u brzom prijenosu signala u sinapsama. Smatra se da su nAChR heteropentameri sastavljeni od homolognih podjedinica. Predložena struktura za svaku podjedinicu je očuvana N-terminalna izvanstanična domena nakon koje slijede tri očuvane transmembranske domene, varijabilna citoplazmatska petlja, četvrta očuvana transmembranska domena i kratka C-terminalna izvanstanična regija. Protein kodiran ovim genom tvori homo-oligomerni kanal, pokazuje izrazitu propusnost za ione kalcija i glavna je komponenta nikotinskih receptora mozga koji su blokirani alfa-bungarotoksinom i koji su vrlo osjetljivi na njega. Jednom kada ovaj receptor veže acetilkolin, prolazi kroz opsežnu promjenu u konformaciji koja utječe na sve podjedinice i dovodi do otvaranja kanala koji vodi ion preko plazma membrane. Ovaj gen nalazi se u regiji koja je identificirana kao glavni lokus osjetljivosti na juvenilnu miokloničku epilepsiju i kromosomsko mjesto koje je uključeno u genetski prijenos shizofrenije.

Budući da je analiza rezultirala samo sa dva gena, baza podataka „String“ nije pokazala nikakvu značajnu povezanost istih.

4.1.4. Deltametrin

Kemikalija deltametrin unesena je u bazu podataka „CTD“ (Comparative Toxicogenomics Database) s ciljem analize, međutim nisu dobiveni rezultati o stupanju iste u interakcije s genima u ljudskom organizmu. Time se može pretpostaviti da deltametrin nema nikakvog utjecaja na ljudski organizam ili da o njemu ne postoje podaci u bazi podataka „CTD“.

4.1.5. Acetamiprid

Analiza provedena pomoću Comparative Toxicogenomics Database (CTD) pružila je rezultate o pesticidu acetamipridu, uključujući informacije o genima s kojima interagira i koji kodiraju proteine od značaja za različite funkcije u ljudskom organizmu. U nastavku su opisane funkcije pojedinih proteina. Svi podaci o genima i proteinima potječu iz baze podataka National Library of Medicine (NLM).

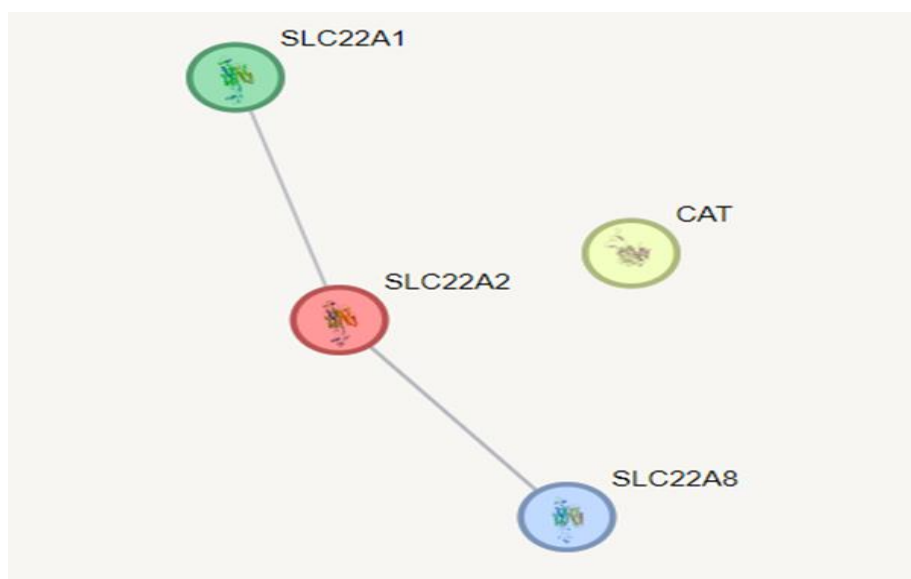
- CAT - Ovaj gen kodira katalazu, ključni antioksidativni enzim u obrani tijela od oksidativnog stresa. Katalaza je hemski enzim koji je prisutan u peroksisomu gotovo svih aerobnih stanica. Katalaza pretvara reaktivne vrste kisika, vodikov peroksid u vodu i kisik i time ublažava toksične učinke vodikovog peroksida. Pretpostavlja se da oksidativni stres igra ulogu u razvoju mnogih kroničnih ili kasnih bolesti kao što su

dijabetes, astma, Alzheimerova bolest, sistemski eritematozni lupus, reumatoidni artritis i karcinomi. Polimorfizmi u ovom genu povezani su sa smanjenjem aktivnosti katalaze, ali do danas je akatalazemija jedina bolest za koju se zna da je uzrokovana ovim genom.

- SLC22A1 i SLC22A2 (eng. solute carrier family 22 member 1 i 2) su polispecifični prijenosnici organskih kationa u jetri, bubrezima, crijevima i drugim organima ključni su za eliminaciju mnogih endogenih malih organskih kationa, kao i širokog spektra lijekova i toksina iz okoliša. Ovi geni služe za prijenos kationa i nalaze se u klasteru na kromosomu 6.
- SLC22A8 je gen koji kodira protein uključen u prijenos i izlučivanje organskih aniona neovisno o natriju, od kojih su neki potencijalno toksični. Kodirani protein je integralni membranski protein i lokaliziran je na bazolateralnoj membrani bubrega.

Unošenjem navedenih gena u bazu podataka „String“ dobiveni su rezultati prikazani u obliku interakcije istih gena kao što se može vidjeti na slici 10.

Prema bazi podataka „String“, geni u interakciji sudjeluju u sljedećim biološkim procesima: transport ksenobiotika preko krvno-moždane barijere, preuzimanje norepinefrina, preuzimanje serotonina, preuzimanje dopamina, transmembranski transport spojeva koji sadrže purine. Molekularne funkcije na koje utječu geni u interakcijama su: aktivnost transmembranskog prijenosnika pirimidin nukleozida, aktivnost transmembranskog transportera toksina, aktivnost transmembranskog transportera monoamina, aktivnost transmembranskog prijenosnika neurotransmitera te aktivnost transmembranskog prijenosnika organskih kationa.



Slika 10. Prikaz gena s kojima acetamidrid ulazi u interakciju. SLC22A1, SLC22A2 i

SLC22A8 stvaraju međusobne interakcije dok katalaza ne ulazi u interakcije niti sa jednim od gena.

4.1.6. Nikosulfuron

Sljedeći pesticid koji je analiziran putem baze podataka "CTD" (Comparative Toxicogenomics Database) jest nikosulfuron. Prikazani su rezultati u obliku gena s kojima on interagira i koji kodiraju različite proteine. Ti geni kodiraju proteine koji obavljaju različite funkcije u ljudskom organizmu. U nastavku su objašnjenje funkcija pojedinih proteina. Svi podaci o genima i proteinima dobiveni su iz baze podataka "National Library of Medicine" (NLM).

U ovom slučaju, dobiven je samo jedan gen s kojim je poznato da nikosulfuron stupa u interakciju i ljudskom organizmu:

- ACHE je gen koji kodira za acetilkolinesterazu koja hidrolizira neurotransmiter, acetilolin na neuromuskularnim spojevima i moždanim kolinergičkim sinapsama te tako prekida prijenos signala. Također se nalazi na membranama crvenih krvnih stanica, gdje predstavlja antigen Yt krvne grupe. Acetilkolinesteraza postoji u višestrukim molekularnim oblicima koji posjeduju slična katalitička svojstva, ali se razlikuju po svojoj oligomernoj strukturi i načinu pričvršćivanja stanice na površinu stanice. Kodiran je jednim genom ACHE, a strukturna raznolikost u genskim produktima proizlazi iz alternativnog spajanja mRNA i post-translacijskih asocijacija katalitičkih i strukturnih podjedinica. Glavni oblik acetilkolinesteraze koji se nalazi u mozgu, mišićima i drugim tkivima je hidrofilna vrsta, koja tvori disulfidno povezane oligomere sa kolagenskim ili strukturnim podjedinicama koje sadrže lipide. Aktivnost ACHE može predstavljati osjetljivi biomarker starenja crvenih krvnih zrnaca in vivo, te stoga može biti od pomoći u razumijevanju učinaka transfuzije.

Budući da je rezultat pretraživanja „CTD“ baze bio samo jedan gen, ne provodi se analiza putem baze „String“, budući da nema drugih gena s kojima se može istraživati mogućnost intereagiranja.

4.1.7. S-metolaklor

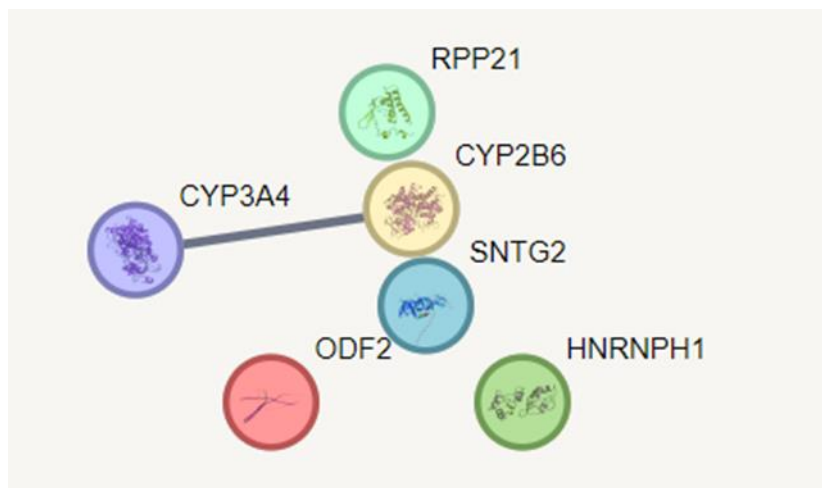
Sljedeća provedena analiza bila je ona sa S-metolaklorom. U „CTD“ bazi dobiveni su rezultati u obliku 6 različitih gena koji kodiraju za određene proteine. U nastavku su objašnjenje funkcija pojedinih proteina za koje ti geni kodiraju. Svi podaci o genima i proteinima dobiveni su iz baze podataka "National Library of Medicine" (NLM).

- CYP2B6 (eng. cytochrome P450 family 2 subfamily B member 6) - Ovaj gen kodira člana superobitelji enzima citokroma P450. Proteini citokroma P450 su

monooksigenaze koje kataliziraju mnoge reakcije uključene u metabolizam lijekova i sintezu kolesterola, steroida i drugih lipida. Ovaj protein lokalizira se u endoplazmatskom retikulumu, a njegovu ekspresiju inducira fenobarbital. Poznato je da enzim metabolizira neke ksenobiotike, kao što su lijekovi protiv raka ciklofosfamid i ifosfamid.

- CYP3A4 (eng. cytochrome P450 family 3 subfamily A member 4) - Ovaj gen također kodira člana superobitelji enzima citokroma P450. Ovaj protein lokalizira se u endoplazmatskom retikulumu, a njegovu ekspresiju induciraju glukokortikoidi i neki farmakološki agensi. Ovaj enzim je uključen u metabolizam otprilike polovice lijekova koji se danas koriste, uključujući acetaminofen, kodein, ciklosporin A, diazepam, eritromicin i klorokin. Enzim također metabolizira neke steroide i karcinogene. Ovaj gen je dio klastera gena citokroma P450 na kromosomu 7q21.1.
- HNRNPH1 kodira za heterogeni nuklearni ribonukleoprotein tipa H1, člana potporodice sveprisutno izraženih heterogenih nuklearnih ribonukleoproteina (hnRNP). hnRNP su proteini koji vežu RNA koji se kompleksiraju s heterogenom nuklearnom RNA. Ti su proteini povezani s pre-mRNA u jezgri i čini se da utječu na procesiranje pre-mRNA i druge aspekte metabolizma i transporta mRNA. Iako su svi hnRNP prisutni u jezgri, neki se mogu kretati između jezgre i citoplazme. Proteini hnRNP imaju različita svojstva vezanja nukleinske kiseline. Ovaj gen može biti povezan s nasljednim limfedemom tipa I.
- ODF2 kodira za vanjski gusti vlaknasti protein 2. Vanjska gusta vlakna su citoskeletne strukture koje okružuju aksonem u srednjem dijelu i glavnom dijelu repa spermija. Vlakna funkcioniraju u održavanju elastične strukture i trzaja repa spermija kao i u zaštiti repa od sila smicanja tijekom epididimalnog transporta i ejakulacije. Defekti u vanjskim gustim vlaknima dovode do abnormalne morfologije spermija i neplodnosti. Ovaj gen kodira jedan od glavnih proteina vanjskih gustih vlakana.
- RPP21 je gen koji kodira za ribonukleazu P/MRP, podjedinica p21. RPP21 je proteinska podjedinica nuklearne ribonukleaze P, koja obrađuje vodeću sekvencu prekursora tRNA.
- SNTG2 kodira za gama-2-sintrofina. Sintrofina su proteini periferne membrane citoplazme koji se vežu na komponente mehanoosjetljivih natrijevih kanala i ekstremne karboksi-terminalne domene distrofina i distrofinu srodnih proteina. PDZ domena ovog proteinskog proizvoda stupa u interakciju s proteinskom komponentom mehanoosjetljivog natrijevog kanala koji utječe na usmjeravanje kanala. Odsutnost ili smanjenje ovog proteinskog proizvoda povezuje se s Duchenneovom mišićnom distrofijom.

Navedeni geni su zatim analizirani u „*String*“ bazi podataka te su dobiveni rezultati prikazani u obliku interakcije istih gena kao što se može vidjeti na slici 11. Na slici je vidljivo da samo geni CYP2B6 i CYP3A4 stvaraju međusobne interakcije.



Slika 11. Rezultati interakcija gena iz baze podataka „*String*“. Samo geni CYP2B6 i CYP3A4 stvaraju međusobne interakcije.

Također, prema bazi podataka „*String*“ ovakva povezanost gena ima utjecaj na sljedeće molekularne funkcije: Anandamid 11,12 epoksidazna aktivnost, anandamid 8,9 epoksidazna aktivnost, anandamid 14,15 epoksidazna aktivnost, estrogen 2-hidroksilazna aktivnost, oksidoreduktazna aktivnost koja djeluje na uparene donore s uključivanjem ili smanjenjem molekularnog kisika, reduciranim flavinom ili flavoproteinom kao jednim donorom i uključivanjem jednog atoma kisika.

4.1.8. Terbutilazin

Posljednji analizirani pesticid bio je terbutilazin. U „CTD“ bazi dobiveni su rezultati u obliku 3 različita gena koji kodiraju za određene proteine. U nastavku su objašnjenje funkcija pojedinih proteina za koje ti geni kodiraju. Svi podaci o genima i proteinima dobiveni su iz baze podataka "National Library of Medicine" (NLM).

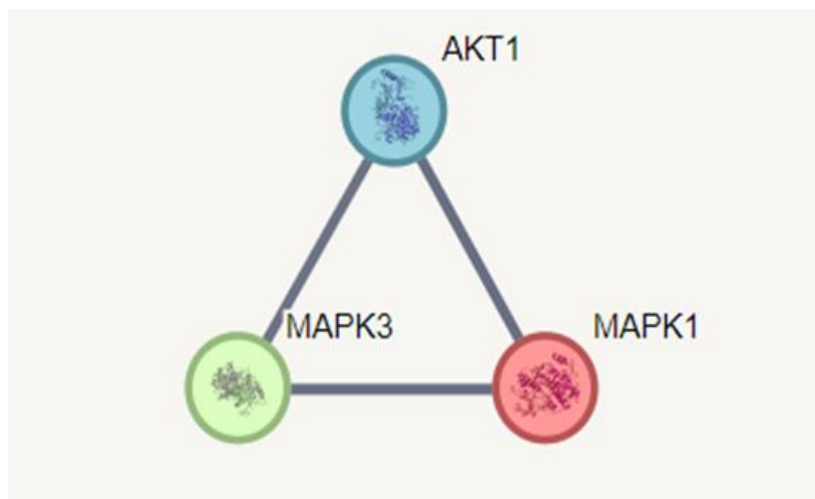
- AKT1 (AKT serine/treonin kinaza 1) - Ovaj gen kodira jednog od tri člana ljudske AKT obitelji serin-treonin protein kinaza koji se često nazivaju protein kinazama B alfa, beta i gama. Svi ovi vrlo slični AKT proteini imaju N-terminalnu plekstrin homolognu domenu, serin/treonin-specifičnu kinaznu domenu i C-terminalnu regulatornu domenu. Ove proteine fosforilira fosfoinozimid 3-kinaza (PI3K). AKT/PI3K čini ključnu komponentu

mnogih signalnih putova koji uključuju vezanje liganda vezanih na membranu kao što su receptorske tirozin kinaze, G-protein spregnuti receptori i integrin-vezane kinaze. Ovi AKT proteini stoga reguliraju širok raspon staničnih funkcija uključujući staničnu proliferaciju, preživljavanje, metabolizam i angiogenezu u normalnim i malignim stanicama. AKT proteini se regrutiraju na staničnu membranu pomoću fosfatidilinozitol 3,4,5-trifosfata (PIP3) nakon fosforilacije fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfata (PIP2) pomoću PI3K. Naknadna fosforilacija i treoninskog ostatka 308 i serinskog ostatka 473 potrebna je za punu aktivaciju AKT1 proteina kodiranog ovim genom. Fosforilacija dodatnih ostataka također se događa, na primjer, kao odgovor na inzulin faktor rasta-1 i epidermalni faktor rasta. Proteinske fosfataze djeluju kao negativni regulatori AKT proteina defosforilacijom AKT ili PIP3. PI3K/AKT signalni put ključan je za preživljavanje tumorskih stanica. Čimbenici preživljavanja mogu suzbijati apoptozu na način neovisan o transkripciji aktiviranjem AKT1 koji potom fosforilira i inaktivira komponente apoptotičkog mehanizma. Mutacije u ovom genu povezane su s višestrukim vrstama raka i prekomjernim rastom tkiva, uključujući Proteusov sindrom i Cowdenov sindrom 6, te rak dojke, debelog crijeva i jajnika.

- MAPK1 - (već opisano u poglavlju 4.1.1.)
- MAPK3 - (već opisano u poglavlju 4.1.1.)

Navedeni geni su zatim analizirani pomoću baze podataka „*String*“ kako bi se ustanovilo ulaze li proteini međusobno u interakcije. Rezultati su prikazani na slici 12. te je vidljivo da sva 3 gena tvore međusobne interakcije.

Baza nam također donosi podatke o utjecaju takvog klastera na molekularne funkcije u ljudskom tijelu. Prema bazi, ovi geni uključeni su u: MAP kinazna aktivnost, aktivnost proteina serin/treonin/tirozin kinaze, veza fosfotirozinskog ostatka, aktivnost proteina serin kinaze i aktivnost proteina serin/treonin kinaze. Također, sudjeluju i u nekim biološkim procesima kao što su pozitivna regulacija proliferacije makrofaga, formacija dušnika, morfogeneza vanjskog uha, razvoj kardijalnih neuralnih krestnih stanica uključenih u razvoj srca, signalni put posredovan lipopolisaharidom, razvoj štitnjače, odgovor na epidermalni faktor rasta, morfogeneza pluća, razvoj timusa i sl.



Slika 12. Sva 3 gena koja prema „CTD“ bazi ulaze u interakcije sa terbutilazinom, tvore međusobne interakcije u genski klaster prikazan na slici. Ovaj klaster sudjeluje u biološkim procesima kao što su pozitivna regulacija proliferacije makrofaga, formacija dušnika, morfogeneza vanjskog uha, razvoj kardijalnih neuralnih krestnih stanica uključenih u razvoj srca, signalni put posredovan lipopolisaharidom, razvoj štitnjače, odgovor na epidermalni faktor rasta, morfogeneza pluća, razvoj timusa i sl.

4.2. Rezultati procjene sinergističkog djelovanja pesticida *in silico* metodom

Provedena je analiza pomoću „CTD“ baze podataka o sinergističkom djelovanju pojedinih grupa pesticida. Pesticidi su analizirani u skupinama po tri. Analizirani su geni, fenotipski učinci i bolesti na koje pesticidi utječu. Rezultati su navedeni u nastavku. Odabir i grupiranje pesticida je provedeno s obzirom na veliku vjerojatnost da se te aktivne tvari u isto vrijeme apliciraju ili nađu u okolišu prilikom aktivnosti zaštite bilja te smo time htjeli dokazati neke neočekivane interakcije i moguće posljedice za zdravlje ljudi koji su izloženi smjesama aktivnih tvari pesticida.

4.2.1. Glifosat, kaptan i acetamiprid

U bazi podataka zatraženi su podaci o zajedničkom djelovanju pesticida glifosata, kaptana i acetamiprida. Analiza je pokazala da svi navedeni pesticidi utječu na sljedeće gene: BCL2, CASP3, CAT, ESR1, HSD3B2, IL1B, SOD1, SOD2, TNF i TOP2A. Fenotipski učinci na koje utječu glifosat, kaptan i acetamiprid su: proliferacija populacije stanica, stanični metabolički proces, detekcija oksidativnog stresa, organizacija mitohondrija, negativna regulacija

proliferacije populacije stanica i metabolički proces uree. Također, analizirane su bolesti povezane sa sva tri pesticida, ali nije prikazana niti jedna takva bolest. Međutim, pronađene su bolesti koje odgovaraju parovima pesticida. Stoga, glifosat i kaptan utječu na sljedeće zajedničke bolesti: bolesti poljoprivrednih radnika, astma, masna jetra, rinitis i povećanje tjelesne težine. Glifosat i acetamiprid utječu na pojavu: ozljeda jetre izazvana kemikalijama i lijekovima, kromosomski lom, bolesti bubrega, oligospermija, otrovanje i gubitak težine; dok kaptan i acetamiprid utječu na hiperglikemiju.

4.2.2. Glifosat, kaptan i deltametrin

Analizom je utvrđeno da pesticidi glifosat, kaptan i deltametrin svi utječu na veliki broj gena: ABCC2, AKT1, ALDH7A1, ATG3, ATP5F1B, ATP6V0D1, BAX, BBC3, BCL2, BECN1, BNIP3, C1QB, C1QC, CASP3, CAT, CCND1, CD74, CIRBP, CLSTN1, CS, CTH, CYP1A1, DBP, DDIT3, DHFR, EIF4G1, ESR1, FBN1, FDFT1, FOS, GADD45G, GCLM, GFAP, GIMAP4, GLUL, GPX3, GSR, HDAC1, HGF, HMGCS2, HMOX1, HSP90AA1, HSP90B1, HSPA5, IGF1, IL1B, IL6, KLF2, KLHL9, KRT7, KRT8, LPIN1, MAFF, MAPK3, MAPK8, MCM7, MLEC, MOB1A, MTHFD1L, MVP, MYC, NFIL3, NOTCH1, NQO1, NR1I3, PDIA5, PDK4, PSMC4, PTK2B, RAB31, RAP1GAP, RBM6, RELB, RIMS1, RUVBL1, S100A6, SCG2, SLC16A2, SLC16A3, SOD1, SOD2, TNF, TOP2A, VIM, YAP1. Kada se to odrazi na fenotip, dobiveni su rezultati koji nam ukazuju da su svojstva i procesi na koja utječu sva tri pesticida sljedeći: apoptoza tj. stanična smrt, ATP metabolički proces, proliferacija populacije stanica, stanični odgovor na podražaj oštećenja DNA, detekcija oksidativnog stresa, lokomocija uključena u lokomotorno ponašanje, organizacija mitohondrija, negativna regulacija proliferacije populacije stanica i metabolički proces uree. Provedenom analizom nije prikazana niti jedna bolest koju se može povezati sa sva tri pesticida, ali u za glifosat i kaptan su pronađene bolesti koje su navedene u prethodnom poglavlju, dok su za glifosat i deltametrin pronađene sljedeće bolesti: poremećaj autističnog spektra, kardiotoksičnost, ozljeda jetre izazvana kemikalijama i lijekovima, kraniofacijalne abnormalnosti, depresivni poremećaj, fibroza, bolesti bubrega, poremećaji pamćenja, invazivnost neoplazme, neurobihevioralne manifestacije, sindromi neurotoksičnosti, oligospermija, trovanje, bolesti prostate, bolesti testisa i gubitak težine. Zajedničke bolesti povezane sa kaptanom i deltametrinom nisu pronađene.

4.2.3. Nikosulfuron, kaptan i acetamiprid

Prema „CTD“ bazi podataka, nikosulfuron, kaptan i acetamiprid ne pokazuju zajedničko djelovanje ni na jedan gen. Također, posljedično tome ne pokazuju zajedničko djelovanje niti na jedno fenotipsko svojstvo ali ni na jednu bolest. Kao što je već spomenuto ranije, kaptanu i

acetamipridu je zajednički utjecaj na hiperglikemiju.

4.2.4. Nikosulfuron, kaptan i deltametrin

Prema „CTD“ bazi podataka, nikosulfuron, kaptan i deltametrin ne pokazuju zajedničko djelovanje ni na jedan gen. Također, posljedično tome ne pokazuju zajedničko djelovanje niti na jedno fenotipsko svojstvo ali ni na jednu bolest.

4.2.5. S-metolaklor, kaptan i acetamiprid

Analiza je pokazala da pesticidi S-metolaklor, kaptan i acetamiprid utječu na gene CAT, ESR1 i SOD2. Fenotipska svojstva na koja utječu sva tri pesticida su proliferacija populacije stanica i negativna regulacija proliferacije populacije stanica, ukazujući na dvojako djelovanje u ovisnosti o koncentraciji i omjerima spojeva u smjesi dok podataka o bolestima povezanim sa sva tri pesticida u bazi nema.

4.2.6. S-metolaklor, kaptan i deltametrin

Prema „CTD“ bazi podataka, S-metolaklor, kaptan i deltametrin pokazuju zajedničko djelovanje na sljedeće gene: ACTA2, CAT, CYP1A1, CYP2C19, CYP3A4, ESR1, GLUL, HNRNPH1, NR1I2 i SOD2. Fenotipski učinci zajednički svim navedenim pesticidima su proliferacija populacije stanica, stanični odgovor na podražaj oštećenja DNA i negativna regulacija proliferacije populacije stanica te se ponovno implicira proliferirajući i inhibirajući učinak na rast stanica, au ovisnosti o koncentracijama spojeva u smjesi. Nisu pronađeni podaci o bolestima povezanim sa sva tri pesticida.

4.2.7. Terbutilazin, kaptan i acetamiprid

Terbutilazin, kaptan i acetamiprid utječu, prema analizi baze podataka „CTD“, na gene CAT i ESR1. Fenotipska svojstva na koja utječu sva tri pesticida su proliferacija stanične populacije i negativna regulacija proliferacije stanične populacije. U bazi se ne nalaze podaci o zajedničkim bolestima povezanim sa sva tri pesticida.

4.2.8. Terbutilazin, kaptan i deltametrin

Prema analizi baze podataka „CTD“ terbutilazin, kaptan i deltametrin utječu na gene AKT1, CAT, CYP1A1, ESR1, GLUL, MAPK3, MYC i NR1I2. Fenotipska svojstva na koja utječu sva tri pesticida su proliferacija stanične populacije, stanični odgovor na oštećenje DNA podražaja i negativna regulacija proliferacije stanične populacije. U bazi se ne nalaze podaci o zajedničkim bolestima povezanim sa sva tri pesticida.

4.3. Procjena utjecaja istraživanih pesticida na ljudski genom i zdravlje

Rezultati dobiveni *in silico* analizom baza podataka pokazuju različita potencijalna štetna djelovanja pesticida na ljudski genom. To se može odraziti i na fenotipske učinke kao i na biološke procese u ljudskom organizmu. Postoji mnogo laboratorijskih studija koje prijavljuju negativne učinke glifosata na ljudske stanice. Unatoč neodređenim i ponekad kontradiktornim rezultatima o ljudskom zdravlju, sažeti rezultati (tablica 1.) prikazuju učinke glifosata na ljudske *in vitro* stanične kulture. (Rivas-Garcia i sur., 2022)

Vrsta ljudske stanice	Doza glifosata ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Vrijeme izlaganja (h)	Procijenjeni učinci
Krvne	0,500	52	Mutagenost, citotoksičnost, DNA oštećenje, hemoliza, aktivnost acetil kolinesteraze
Epitelne	0,300	18	Oksidativni stres, oštećenje stanice, genotoksičnost
Embrionalne	0,450	24	Oštećenje stanice, toksičnost, endokrina disrupcija
Pluripotentne matične stanice	0,100	48	Krvno-moždana barijera
Bubrežne	0,600	24	Vitalnost stanica, apoptoza
Jetrene	0,540	24	Transkriptomske promjene, genotoksičnost, oksidativni stres, DNA oštećenje
Dojke	0,100	48	Endokrina disrupcija, toksičnost, DNA oštećenje
Jajnici	0,500	72	Abnormalni rast
Plućne	0,540	24	Vitalnost stanice
Neurološke	0,540	24	Toksičnost, DNA oštećenje

Sperma	0,36	1	Vitalnost stanice, DNA fragmentacija
--------	------	---	--------------------------------------

Tablica 1. Učinci glifosata na ljudske in vitro stanične kulture (Rivas-Garcia i sur., 2022).

Neke od najznačajnijih studija pokazuju korelaciju između glifosata i pojave određenih bolesti. Leon i sur. zaključuju da postoji umjerena povezanost između izlaganja glifosatu i limfoma raka β -stanica. Osim direktnog izlaganja i ingestije, glifosat se može udisati iz zračnog okoliša. Važno je napomenuti da je izloženost zraku koju su procijenili bila otprilike pet puta manja od prihvatljivog dnevnog unosa predloženog od strane EFSA-e. Određena su istraživanja procijenila i neurološke učinke izlaganja glifosatu. Caballero i sur. su otkrili 33% veći rizik od smrtnosti od Parkinsonove bolesti nakon izlaganja glifosatu. Von Ehrenstein i sur. zaključuju da postoji povezanost između prenatalnog izlaganja glifosatu i poremećaja iz spektra autizma. Tijekom trudnoće, fetus bi mogao biti neizravno izložen glifosatu pa su stoga Parvez i sur. koristili uzorke urina i zaključili da je više od 90% ispitanika imalo otkrivene razine glifosata koje su bile povezane sa skraćenom trudnoćom. Sva ova otkrića poklapaju su se podacima iz *in silico* analiza dobivenih pretraživanjem baza podataka, iz kojih je vidljiv široki spektar utjecaja glifosata na različite gene, što posljedično može uzrokovati učinke navedene u tablici te bolesti i poremećaje navedene u spomenutim radovima.

Kaptan, prema podacima iz baza podataka, ulazi u interakcije sa genima koji su često povezani sa proliferacijom stanica, apoptozom, oksidativnim stresom itd. Prema jednom znanstvenom istraživanju, kaptan je ispitan u pogledu njegovih učinaka na DNA kako bi se bolje razumjela genotoksičnost povezana s tim pesticidom. Tretiranje kaptanom rezultiralo je stvaranjem jednostrukih lomova DNA i unakrsnim vezama DNA-proteina i izazvalo odgovor popravka ekscizije u ljudskim diploidnim fibroblastima. Također se pokazalo da kaptan inhibira sintezu stanične DNA i stvara stabilne adukte u spermi haringe i ljudskoj staničnoj DNA. Pogrešna ugradnja nukleotida u sintetičke DNA šablone obrađene kaptanom bila je značajno povećana u *in vitro* testu pomoću *E. coli* DNA polimeraze I, što sugerira da stvaranje adukta DNA pomoću kaptana može imati mutagene posljedice. Ove studije dakle pokazuju da je kaptan sposoban za interakciju s DNA na brojnim razinama i da te interakcije mogu pružiti osnovu za genotoksičnost kaptana (Snyder, 1992). Skupni *in vivo* testovi ukazuju na odsutnost genotoksičnosti. Konkretno, kaptan ne inducira klastogene promjene u kancerogenom ciljnom tkivu, duodenumu miša. Kaptan ne uzrokuje mutagene ili klastogene učinke nakon oralne ingestije *in vivo*. Ako se omogući pristup DNA, kao u *in vitro* testnim sustavima, kaptan ima sposobnost induciranja mutagenih učinaka u prokariotskim i eukariotskim stanicama. Prisutnost malih molekula i makromolekula koje sadrže tiol u cijeloj životinji neutralizira kaptan prije nego što mogu izazvati oštećenje DNA (Arce i sur., 2010).

Spinosad je insekticid koji spada u skupinu spinosina, koji su, uspoređujući s mnogim drugim insekticidima, općenito najmanje otrovni za ne ciljane organizme, uključujući sisavce, ptice, druge kralježnjake i biljke. Spinosad se smatra vrlo nisko akutno otrovnim za sisavce i ne predstavlja opasnost za ljudsko zdravlje. Prema EPA-i (Environmental Protection Agency) svrstan je u grupu III prema klasifikaciji otrovnosti iz 1999. Oralna srednja letalna doza (LD_{50}) u štakora iznosi 3738 mg/kg za mužjake i više od 5000 mg/kg za ženke. Akutne dermalne doze u zečeva su više od 2000 mg/kg, dok je inhalacijska srednja letalna koncentracija (LC_{50}) u štakora više od 5,18 mg/l. Spinosad se brzo apsorbira i metabolizira u organizmu štakora, pri čemu se 60 do 80 % spinosada ili njegovih metabolita izlučuje urinom ili fecesom. Pokazano je da je doza pri kojoj se ne opažaju negativni učinci (NOAEL) za kroničnu otrovnost 4,98 mg/kg/dan u pasa i 6 mg/kg/dan u miševa. Prema tim podacima, Američka agencija za zaštitu okoliša (EPA) odredila je referentnu dozu (RfD) za čovjeka od 0,0268 mg/kg/dan. Spinosad ne pokazuje kancerogeno, teratogeno, mutageno ili neurotoksično djelovanje na sisavce čak ni pri najvećim testiranim dozama, iako je moguće da ima neke učinke na GABA i druge receptore u mozgu sisavaca. Spinosad je slabo otrovan za ptice i umjereno otrovan za ribe i vodene beskrležnjake. U laboratorijskim testovima pokazao se jako otrovnim za kamenice i druge mekušce (Čačija i sur., 2018). Prema analiziranim rezultatima, za spinosad je otkriveno da stupa u interakciju sa samo dva gena, što je potencijalno i razlog niske toksičnosti istog. Znanstveni rad iz 2022., koristeći mušicu *Drosophila*, dokazao je da niske doze spinosada antagoniziraju njegovu neuronsku metu, podjedinicu nikotinskog acetilkolinškog receptora alfa 6 (nAChR α 6), smanjujući kolinergički odgovor. nAChR α 6 receptori se transportiraju do lizosoma koji se povećavaju i njihov broj se povećava nakon izlaganja malim dozama spinosada. Lizosomska disfunkcija povezana je s mitohondrijskim stresom i povišenim razinama reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) u središnjem živčanom sustavu gdje je nAChR α 6 široko izražen. ROS remete skladištenje lipida u metaboličkim tkivima na način ovisan o nAChR α 6. Toksičnost spinosada je ublažena s antioksidansom N-acetilcistein amidom. Kronična izloženost odraslih djevičanskih ženki malim dozama spinosada dovodi do mitohondrijskih defekata, teške neurodegeneracije i sljepoće (Martelli i sur., 2022). Prema bazi podataka „CTD“, spinosad ulazi u interakciju sa genom CHRNA7 koji kodira za protein alfa 7 nikotinski kolinergički receptor, što je povezano sa smanjivanjem kolinergičkog odgovora. Deltametrin je jedini pesticid za koji baza ne prepoznaje niti jedan gen s kojim ulazi u interakciju. To ne treba značiti da on ni na koji način ne utječe na ljudski genom, nego postoji mogućnost da isti nije dovoljno istražen tj. njegov utjecaj na ljudski genom te da u bazu nisu uneseni ti podaci. Istraživan je učinak deltametrina i drugih piretroida na životinjskim (fibroblastima) i biljnim (algama) stanicama u kulturi. Deltametrin je utjecao na rast fibroblasta, ali je bio neaktivan na druge stanice (Baeza-Squiban i sur., 1987). Prema istraživanju iz 2022.,

deltametrin je najjači sintetski piretroid koji djeluje toksično na središnji živčani sustav i dovodi do promjena u ponašanju i kod životinja i kod ljudi. Taj je učinak posredovan izazivanjem promjena u djelovanju neurotransmitera i patoloških promjena u mozgu. Provedeni su testovi ponašanja kako bi se zabilježila lokomotorna aktivnost, anksiozno ponašanje i kratko pamćenje štakora kojima je davan deltametrin u kukuruznom ulju. Osim toga, mjerena je ekspresija antioksidansa/oksidansa u mozgu, serumskih neurotransmitera kao što su acetilkolin esteraza (AChE) i monoaminooksidaza (MAO), JAK2 i STAT3 gena i proteina. U tretiranoj skupini došlo je do visokog značajnog povećanja sadržaja malondialdehida, MAO, AChE, razine faktora rasta vaskularnog endotela (VEGF) i razine ekspresije neurogenih gena, JAK2 i STAT3, u usporedbi s kontrolnom skupinom. Time je zaključeno da deltametrin može izazvati neurobihevioralnu toksičnost kod štakora (Khalifa i sur., 2022).

Acetamiprid djeluje kao inhibitor acetilkolinesteraze (AChE) u insekata, što znači da sprječava razgradnju neurotransmitera acetilkolina u njihovom živčanom sustavu. To dovodi do akumulacije acetilkolina na sinaptičkim spojevima, što uzrokuje prekomjerno stimuliranje živčanih stanica i na kraju paralizu i smrt insekata (Hiyama i sur., 2017). Kod ljudi, acetamiprid ne djeluje kao klasični inhibitor acetilkolinesteraze kao što je to slučaj kod nekih drugih insekticida. Umjesto toga, acetamiprid djeluje selektivno na određene subtipove nikotinskih acetilkolinskih receptora u živčanim stanicama. Ovi receptori su prisutni u centralnom i perifernom živčanom sustavu ljudi te su uključeni u brojne fiziološke procese, uključujući prijenos živčanih impulsa. Kada se acetamiprid veže za ove receptore, izaziva stimulaciju živčanih stanica, što rezultira povećanom aktivnošću nikotinskih receptora. To može imati različite učinke na ljudski organizam, uključujući promjene u neurotransmisiji, poremećaje u motoričkim funkcijama, promjene u raspoloženju i potencijalno toksične učinke ako se u organizam unese u prevelikim količinama (Vieria i sur., 2015). Važno je napomenuti da se specifični mehanizmi djelovanja i učinci acetamiprida u ljudskom organizmu još uvijek istražuju i razumijevanje njihove toksičnosti kod ljudi zahtijeva daljnja istraživanja. Ovakva istraživanja podudaraju se s rezultatima iz baze „*String*“ gdje je opisano kako geni s kojima acetamiprid ulazi u interakciju sudjeluju u molekularnim funkcijama kao što su aktivnost transmembranskog prijenosnika pirimidin nukleozida, aktivnost transmembranskog transportera toksina, aktivnost transmembranskog transportera monoamina, aktivnost transmembranskog prijenosnika neurotransmitera te aktivnost transmembranskog prijenosnika organskih kationa. Diljem svijeta su prijavljeni slučajevi trovanja neonikotinoidima, uključujući slučajeve trovanja acetamipridom kod ljudi. Samo je jedan slučaj trovanja acetamipridom povezan s ozbiljnim nuspojavama opisan u Šri Lanki. Teške nuspojave mogu se pojaviti ako se acetamiprid konzumira u prekomjernim količinama. Taj slučaj trovanja acetamipridom bio je kod čovjeka koji je razvio tešku laktacidozu, supresiju miokarda, hiperglikemiju i crijevnu opstrukciju nakon slučajnog

unošenja insekticida acetamiprida (Pravinson i sur., 2021).

Nikosulfuron je herbicid koji djeluje selektivno na biljke inhibirajući sintezu aminokiselina, posebno valina, leucina i izoleucina, što rezultira zaustavljanjem rasta i razvoja biljaka. Međutim, kada je u pitanju ljudski organizam, učinci nikosulfurona nisu dobro istraženi kao kod insekticida ili fungicida. Nikosulfuron nije namijenjen za konzumaciju ili izravnu primjenu na ljude, stoga nema specifično definiranog mehanizma djelovanja u ljudskom organizmu kao što bi to bio slučaj s lijekovima ili kemijskim spojevima namijenjenim za ljudsku upotrebu. Međutim, ako dođe do izloženosti nikosulfuronu, pretpostavlja se da bi njegovo djelovanje moglo biti povezano s njegovim sposobnostima da inhibira enzime u biljnim stanicama koji su ključni za njihov rast i razvoj. U bazi je stoga moguće pronaći samo jedan gen na koji nikosulfuron djeluje u ljudskom organizmu.

Prema bazi podataka, S-metolaklor ulazi u interakcije s nekoliko gena te takve interakcije mogu izazvati potencijalne toksične činke. Poznato je da izlaganje S-metolakloru može uzrokovati simptome kao što su glavobolja, mučnina, povraćanje, vrtoglavica, slabost, konvulzije i druge neurološke probleme. Međutim, važno je napomenuti da su stvarni učinci izloženosti S-metolakloru na ljudski organizam ovisni o razini izloženosti, trajanju izlaganja i individualnoj osjetljivosti. Toksikološki podaci za S-metolaklor prethodno su dokumentirani. Zabilježeno je da herbicid ne pokazuje genotoksični, kancerogeni ili neurotoksični potencijal kod glodavaca. U studijama mutagenosti, S-metolaklor nije bio mutagen za mikrobne stanice niti klastogen za životinje. Slično tome, nije bilo dokaza o oštećenju/popravku DNA u hepatocitima dobivenim od tretiranih štakora. Međutim, dok su tretmani s niskim dozama S-metolaklora inducirali izrazito povećanje proliferacije hepatocita, što ukazuje da je herbicid dosegao ciljani organ, više koncentracije izazvale su hepatotoksične, ali ne i genotoksične učinke. Testovi za herbicid bili su negativni u hepatocitima štakora kada je korišten *in vitro* test mutacije gena stanica sisavaca. (Nikoloff i sur., 2013) Pereira i sur. (2009) pokazali su da je herbicid utjecao na respiratornu aktivnost bakterije *Bacillus stearothermophilus* i aktivnost mitohondrija jetre štakora, iako su autori sugerirali da je spoj sigurniji od drugih pesticida koje su prethodno proučavali. Međutim, toksikološke informacije za S-metolaklor su nepotpune, a njegovi učinci na neciljane organizme, uključujući ljude, još nisu u potpunosti razjašnjeni. Nedavne studije su otkrile da je herbicid uzrokovao promjene u reproduktivnoj endokrinologiji mužjaka štakora (Nikoloff i sur., 2013).

Posljednji istraživani pesticid jest terbutilazin. Prema rezultatima, terbutilazin također ulazi u interakcije sa više različitih gena i na taj način izaziva potencijalnu toksičnost u ljudskom organizmu. Dokazana je toksičnost terbutilazina za vodene organizme, što rezultira povećanjem broja stanica i odvajanjem epitela u škrgama grgeča, steatozom u jajašcima šarana te morfološkim promjenama u strukturnim stanicama mramornog raka (*Procambarus fallax f. virginalis*), dok se također nakuplja u masnom tkivu i ometa jetrenu detoksikaciju

kalifornijske pastrve. U *in vitro* uvjetima, terbutilazin povećava aktivnost enzima aromataze u JEG-3 stanicama ljudskog koriokarcinoma te se također veže na citoplazmatski estrogenski receptor, inducirajući njegovu transkripcijsku aktivnost u MLVN stanicama ljudskog karcinoma dojke. S obzirom da je aromataza enzim odgovoran za kataliziranje posljednjeg koraka u biosintezi estrogena, važnog spolnog hormona za sazrijevanje i razvoj ženskog spolnog sustava, terbutilazin bi mogao djelovati proestrogeno kao endokrini disruptor (Mužinić, 2021). Kronična izloženost laboratorijskih životinja povećava incidenciju nekancerogenih lezija u jetri, plućima, štitnoj žlijezdi i testisima (WHO, 1998).

5. ZAKLJUČCI

1. Korištenjem *in silico* metode pretraživanja baza podataka dobiveni su rezultati koji se uglavnom poklapaju sa dosad objavljenim istraživanjima o učincima pesticida na ljudsko zdravlje ili nedostatkom tih istih podataka. Time se može zaključiti da takve baze mogu biti od velike pomoći u znanstvenim istraživanjima.
2. Prema podacima koji se nalaze u bazama podatak „CTD“ i „String“, pesticidi ulaze u interakcije s genima u ljudskom organizmu što može uzrokovati negativne učinke na biološke procese te to može manifestirati fenotipski ili u obliku bolesti. Jedina kemikalija za koju „CTD“ baza podataka nije pružila rezultate o stupanju u interakcije s genima u ljudskom organizmu jest deltametrin. Time se može pretpostaviti da deltametrin nema nikakvog utjecaja na ljudski organizam ili da o njemu ne postoje podaci u bazi podataka „CTD“ tj. da još nije dovoljno istražen.
3. Određeni pesticidi koji su analizirani u „VennVieweru“ pokazuju zajedničko djelovanje na gene, fenotip i bolesti. Međutim, ne može se tim putem sa sigurnošću utvrditi jesu li oni nužno toksičniji u smjesama ili samostalno. Za ovakva istraživanja bolje je provesti *in vivo* ili *in vitro* pokuse kako bi se dobili relevantiji rezultati.

6. LITERATURA

Arce, G. T., Gordon, E. B., Cohen, S. M., & Singh, P. (2010). Genetic toxicology of folpet and captan. *Critical Reviews in Toxicology*, 40(6), 546-574. DOI: 10.3109/10408444.2010.481663

Baeza-Squiban, A., Marano, F., Ronot, X., Adolphe, M., & Puiseux-Dao, S. (1987). Effects of deltamethrin and its commercial formulation DECIS on different cell types in vitro: Cytotoxicity, cellular binding, and intracellular localization. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 28(1), 103-113. doi: 10.1016/0048-3575(87)90118-0

Blaser, H. U.; Spindler, F. (1997) Enantioselective catalysis for agrochemicals: the case history of the Dual Magnum herbicide. *Chimia*, 51(6), pp. 297-299.

Caballero, M., Amiri, S., Denney, J.T., Monsivais, P., Hystad, P., & Amram, O. (2018). Estimated residential exposure to agricultural chemicals and premature mortality by Parkinson's disease in Washington state. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15, 2885.

Caggia, V. L. L. (2022). Effects of environmental chemicals on soil and plant health. (Thesis). Universität Bern, Bern.

Čačija, M., et al. (2018). 'SPINOSINI – INSEKTICIDI BIOLOŠKOG PODRIJETLA', *Fragmenta phytomedica*, 32(2), str. 43-60. Preuzeto s: <https://hrcak.srce.hr/218059> (Datum pristupa: 24.04.2024.)

Denžić Lugomer, M., Pavliček, D., i Bilandžić, N. (2019). 'Glyphosate - from applications to animals and humans', *Veterinarska stanica*, 50(3), str. 0-0. Preuzeto s: <https://hrcak.srce.hr/223828> (Datum pristupa: 29.04.2024.)

Duke, S., Powels, S. B. (2008). Mini-review glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science*, 64, 319-325.

EPA. Web stranice EPA. Dostupno na: https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-099050_15-Mar-02.pdf (Pristupljeno: 6.5.2024.)

European Food Safety Authority (EFSA). (2024). Statement on the refined environmental risk assessment and impact of the new classification for captan. *EFSA Journal*, 22(2), e8576. doi:10.2903/j.efsa.2024.8576

European Food Safety Authority. (2008). Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance nicosulfuron. *EFSA Journal*, 6(1), RN-120, 91 pp. doi:10.2903/j.efsa.2008.120r

Gale, G. R., Smith, A. B., Atkins, L. M., Walker, E. M., & Gadsden, R. H. (1971). Pharmacology of captan: Biochemical effects with special reference to macromolecular synthesis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 18(2), 426–441. doi:10.1016/0041-008x(71)90135-9

Hiyama, T., Iwata, K., Mitsugi, H., Taira, D., Sankai, T., Matsuda, S., & Hayashi, T. I. (2017). Acute and subchronic toxicity of neonicotinoids dinotefuran and acetamiprid in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 50(1), 40-46. DOI: 10.1016/j.etap.2017.01.011.

Hines, C. J., Deddens, J. A., Jaycox, L. B., Andrews, R. N., Striley, C. A. F., Alavanja, M. C. R. (2008). Captan Exposure and Evaluation of a Pesticide Exposure Algorithm among Orchard Pesticide Applicators in the Agricultural Health Study. *The Annals of Occupational Hygiene*, 52(3), 153–166. <https://doi.org/10.1093/annhyg/men001>

Javorac, D. et al. (2019) In silico metodologija u toksikologiji - softveri za predviđanje toksičnosti, *Arhiv za farmaciju*, 69(1), pp. 28-38. doi:10.5937/arhfarm1901028J.

Juran, I., Gotlin Čuljak, T., & Bažok, R. (2012). Sintetski piretroidi. *Glasilo biljne zaštite*, 3, 196-210.

Khalifa, A.G., Moselhy, W.A., Mohammed, H.M., Khalil, F., Shaban, M., El-Nahass, E.S., Al-Muzafar, H.M., Adel Amin, K., & Abdou, K.A. (2022). Deltamethrin and Its Nanoformulations Induce Behavioral Alteration and Toxicity in Rat Brain through Oxidative Stress and JAK2/STAT3 Signaling Pathway. *Toxics*, 10(6), 303. doi: 10.3390/toxics10060303. PMID: 35736911; PMCID: PMC9228259.

Kirst, H. A. (2010). The spinosyn family of insecticides: realizing the potential of natural products research. *J. Antibiot.*, Vol. 63, 3:101-111

Leon, M.E., Schinasi, L.H., Lebailly, P., Beane Freeman, L.E., Nordby, K.C., Ferro, G., Monnereau, A., Brouwer, M., Tual, S., Baldi, I., et al. (2019). Pesticide use and risk of non-Hodgkin lymphoid malignancies in agricultural cohorts from France, Norway and the USA: A pooled analysis from the AGRICOH consortium. *International Journal of Epidemiology*, 48, 1519–1535.

Lipovski, A. (2019). Sredstva za zaštitu bilja 2019. *Glasnik Zaštite Bilja*, 42(1-2), 8–83.

Martelli, F., Hernandez, N. H., Zuo, Z., Wang, J., Wong, C. O., Karagas, N. E., Roessner, U., Rupasinghe, T., Robin, C., Venkatachalam, K., Perry, T., Batterham, P., & Bellen, H. J. (2022). Low doses of the organic insecticide spinosad trigger lysosomal defects, elevated ROS, lipid dysregulation, and neurodegeneration in flies. *eLife*, 11, e73812. doi: 10.7554/eLife.73812.

Mužinić, V. (2021). 'Genotoksični učinci insekticida klorpirifosa, imidakloprida i α -cipermetrina i herbicida terbutilazina, glifosata i tembotriona u uvjetima in vitro i in vivo', Disertacija, *Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet*, citirano: 17.04.2024., <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:461703>

Myatt, Glenn; Ahlberg, Ernst; Akahori, Yumi; Allen, David; Amberg, Alexander; Anger, Lennart; et al. (2018) In silico toxicology protocols. *Regul Toxicol Pharmacol.*, 96:1-7.

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

Pereira, S. P., Fernandes, M. A. S., Martins, J. D., Santos, M. S., Moreno, A. J. M., Vicente, J. A. F., ... Jurado, A. S. (2009). Toxicity assessment of the herbicide metolachlor comparative effects on bacterial and mitochondrial model systems. *Toxicology in Vitro*, 23(8), 1585-1590. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.06.032>.

Parvez, S., Gerona, R.R., Proctor, C., Friesen, M., Ashby, J.L., Reiter, J.L., Lui, Z., & Winchester, P.D. (2018). Glyphosate exposure in pregnancy and shortened gestational length: A prospective Indiana birth cohort study. *Environmental Health: A Global Access Science Source*, 17, 23.

Pravinson, M., Pirasath, S., Ghetheeswaran, S., & Uthayakumaran, S. (2021). Acute poisoning with acetamiprid, a type of neonicotinoid insecticide causing severe lactic acidosis: A case report. *SAGE Open Med Case Rep.*, 9, 2050313X211059296. doi: 10.1177/2050313X211059296. PMID: 34888052; PMCID: PMC8649425.

Rivas-Garcia, T., Espinosa-Calderón, A., Hernández-Vázquez, B., & Schwentesius-Rindermann, R. (2022). Overview of Environmental and Health Effects Related to Glyphosate Usage. *Sustainability*, 14(11), 6868. [Online] Available at: <https://doi.org/10.3390/su14116868>

Shaner, D. L. et al. (2006) Soil dissipation and biological activity of metolachlor and S-metolachlor in five soils. *Pest Manag. Sci.*, 62(7), pp. 617-623.

Sparks, T. C., Crouse, G. D. Durst, G. (2001). Natural products as insecticides: the biology, biochemistry and quantitative structure–activity relationships of spinosyns and spinosoids. *Pest. Manag. Sci.*, Vol. 57, 10: 896-905.

Snyder, R.D. (1992), Effects of captan on dna and dna metabolic processes in human diploid fibroblasts. *Environ. Mol. Mutagen.*, 20: 127-133. <https://doi.org/10.1002/em.2850200208>

Steinberg, C.E.W., Mayr, C., Lorenz, R., Spieser, O.H., Kettrup, A. (1994). Dissolved humic material amplifies irritant effects of Terbutylazine (triazine herbicide) on fish. *Naturwissenschaften*, 81, 225–227.

Szklarczyk, D., Kirsch, R., Koutrouli, M., Nastou, K., Mehryary, F., Hachilif, R., Gable, A. L., Fang, T., Doncheva, N. T., Pyysalo, S., Bork, P., Jensen, L. J., & von Mering, C. (2023). The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D638-D646. doi:10.1093/nar/gkac1000.

Šunjić, K. (2018). 'Utjecaj herbicidnih tretmana na korove i prinos soje', *Završni specijalistički*, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, citirano: 07.05.2024., <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:151016>

Vieira, J. M. P., Bichinho, K. M., Soares, A. M. V. M., Loureiro, S., & Nogueira, A. J. A. (2016). Acute toxicity and genotoxic effects of two neonicotinoid insecticides on the earthworm *Eisenia andrei* Bouché. *Chemosphere*, 144, 155-162. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2015.08.005.

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

Von Ehrenstein, O.S., Ling, C., Cui, X., Cockburn, M., Park, A.S., Yu, F., Wu, J., & Ritz, B. (2019). Prenatal and infant exposure to ambient pesticides and autism spectrum disorder in children: Population based case-control study. *BMJ*, 364, 962.

Wallace, D.R. (2024). Acetamiprid. U P. Wexler (Ur.), *Encyclopedia of Toxicology* (Četvrto izdanje) (str. 53-59). Academic Press. DOI: 10.1016/B978-0-12-824315-2.00267-0.

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

Xu, N., Wu, Z., Li, X., Yang, M., Han, J., Lu, B., et al. (2022). Effects of nicosulfuron on plant growth and sugar metabolism in sweet maize (*Zea mays* L.). *PLoS ONE*, 17(10), e0276606.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0276606>

Živančević, K., Baralić, K., Jorgovanović, D., Đukić-Čosić, D. (2019) Komparativna toksikogenomička baza podataka: uticaj hemikalija iz životne sredine na gene i razvoj bolesti. MD, [online] 11(3/4), pp.159–164.
Available at: [http://www.md-medicaldata.com/files/septembar2019/08-Zivancevic%20K.%20et%20al%20MD-Medical%20Data%202019_11\(3-4\)%20159-164.pdf](http://www.md-medicaldata.com/files/septembar2019/08-Zivancevic%20K.%20et%20al%20MD-Medical%20Data%202019_11(3-4)%20159-164.pdf).
Pristupljeno: 7.5.2024.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Vlastoručni potpis