

Toksičnost odabranih herbicida analizirana in silico metodama i biološkim testovima

Pehar, Vesna

Doctoral thesis / Disertacija

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:877075>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Vesna Pehar

**TOKSIČNOST ODABRANIH HERBICIDA
ANALIZIRANA *IN SILICO* METODAMA I
BIOLOŠKIM TESTOVIMA**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

Nasl. izv. prof. dr. sc. Zrinka Kovarik, zn. savj. u tr. zv.
Dr. sc. Višnja Stepanić, v. zn. sur.

Zagreb, 2023.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Vesna Pehar

**TOXICITY OF SELECTED HERBICIDES
ANALYSED BY *IN SILICO* METHODS AND
BY BIOASSAYS**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:

Zrinka Kovarik, PhD, Permanent Scientific Adviser
Višnja Stepanić, PhD, Senior Scientific Associate

Zagreb, 2023

ZAHVALA

Najveće HVALA mojim mentoricama izv. prof. dr. sc. Zrinki Kovarik i dr. sc. Višnji Stepanić na ukazanom povjerenju, strpljenju, potpori i mogućnosti za usavršavanjem i stjecanjem novih profesionalnih i životnih znanja i iskustava.

Hvala budućoj doktorici Dori Kolić na pomoći u izvođenju eksperimenata, posebno njezinom angažmanu pri izvođenju pokusa progresivne inhibicije, strpljenju, korisnim savjetima kako bi mi olakšala rad u laboratoriju i uspješnu provedbu eksperimenata.

Hvala dr. sc. Antoniu Zandoni na posebnom angažmanu vezano uz pokuse za citotoksičnost herbicida i pomoći pri interpretaciji rezultata, a dr. sc. Goranu Šinku u provedbi analize odnosa strukture herbicida i inhibicije kolinesteraza.

Hvala dr. sc. Teni Čadež na korisnim savjetima tijekom provedbe eksperimenata i svim ostalim djelatnicima Jedinice za biokemiju i organsku analitičku kemiju Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada.

VELIKO HVALA mojoj obitelji, roditeljima, bratu i sestri na neizmjenoj podršci, ohrabrenju, strpljenju, ljubavi i razumijevanju. Uvijek ste bili moja snaga, inspiracija i „vjetar u leđa“.

Hvala Marku što je sve izdržao i bio tu kada je bilo lijepo, ali i teško.

Hvala mojim prijateljima, kolegama, Valentini, Vedrani i svima koji su na bilo koji način pomogli da dođem do ostvarenja svog cilja.

Sadržaj

SAŽETAK.....	IX
ABSTRACT	XI
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	4
2.1. Herbicidi.....	4
2.1.1. Povijesni razvoj herbicida.....	4
2.1.2. Klasifikacija herbicida.....	5
2.2. Toksičnost herbicida.....	8
2.2.1. Pregled toksičnosti herbicida.....	8
2.2.2. Neurotoksičnost herbicida	9
2.2.3 Toksičnost organofosfornih herbicida	10
2.2.3.1. Glifosat.....	10
2.2.3.2. Anilofos.....	11
2.2.3.3. Benzulid	12
2.2.3.4. Butamifos	13
2.2.3.5. Piperofos.....	13
2.2.4. Herbicidi na bazi parakvata.....	13
2.2.5. Toksičnost karbamatnih herbicida i oksiacetamilida.....	14
2.2.5.1. Desmedifam.....	14
2.2.5.2. Fenmedifam.....	15
2.2.5.3. Flufenacet	15
2.2.6. Toksičnost oksadiazolona, triketona i triazina.....	16
2.2.6.1. Oksadiazon.....	16
2.2.6.2. Tembotrion.....	16
2.2.6.3. Terbutilazin.....	17
2.2.7. ECHA regulativa.....	17
2.2.8. Primjena QSAR modela za predviđanje toksičnih ishoda	18
2.3. Kolinesteraze	20
2.3.1. Uloga i struktura kolinesteraza.....	20
2.3.2. Mehanizam djelovanja kolinesteraza	22
2.4. Inhibitori kolinesteraza	23
2.4.1. Reverzibilni inhibitori	23

2.4.2. <i>Progresivni inhibitori</i>	26
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	31
3.1. <i>In silico</i> metode	31
3.1.1. <i>Predviđanje toksičnosti herbicida pomoću programa ADMETPredictorTM</i>	31
3.1.2. <i>Predviđanje fizikalno-kemijskih svojstava herbicida</i>	32
3.1.3. <i>Odabir herbicida za in vitro analizu</i>	32
3.2. Inhibicija kolinesteraza	34
3.2.1. <i>Herbicidi, kemikalije i enzimi</i>	34
3.2.2. <i>Inhibicija kolinesteraza odabranim herbicidima</i>	35
3.2.3. <i>Molekulska modeliranje interakcija kolinesteraza s herbicidima</i>	36
3.3. Citotoksičnost	37
3.3.1. <i>Stanične kulture</i>	37
3.3.2. <i>Korištene kemikalije</i>	37
3.3.3. <i>Određivanje broja stanica u uzorku za daljnju analizu toksičnosti</i>	38
3.3.4. <i>Određivanje citotoksičnosti herbicida praćenjem promjene vijabilnosti stanica</i>	38
3.3.5. <i>Određivanje markera oksidacijskog stresa</i>	40
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	41
4.1. <i>In silico</i> analiza toksičnosti herbicida	41
4.1.1. <i>Procjena toksičnosti prikupljenih skupova herbicida</i>	41
4.1.1.1. <i>Toksikološki profil komercijalnih herbicida</i>	45
4.1.1.2. <i>Toksikološki profil napuštenih herbicida</i>	48
4.1.2. <i>Analiza fizikalno-kemijskih svojstava prikupljenih skupova herbicida</i>	51
4.1.3. <i>Analiza herbicida za odabir potencijalnih inhibitora kolinesteraza</i>	53
4.1.4. <i>Analiza fizikalno-kemijskih svojstava odabranih herbicida</i>	55
4.2. Interakcije herbicida s kolinesterazama	57
4.2.1. <i>Određivanje inhibicije aktivnosti kolinesteraza</i>	57
4.2.2. <i>Progresivna inhibicija kolinesteraza odabranim herbicidima</i>	63
4.2.3. <i>Odnos strukture herbicida i inhibicije kolinesteraza</i>	66
4.3. Citotoksičnost herbicida	71
4.4. Odabrani herbicidi i neurotoksičnost	74
§ 5. ZAKLJUČAK	77
§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ	80
§ 7. LITERATURNI IZVORI	82
§ 8. ŽIVOTOPIS	XIII



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

TOKSIČNOST ODABRANIH HERBICIDA ANALIZIRANA *IN SILICO* METODAMA I BIOLOŠKIM TESTOVIMA

Vesna Pehar

Hrvatsko vojno učilište „Dr. Franjo Tuđman“, Ilica 256b, Zagreb

Skup od 346 komercijalna herbicida prikupljen je iz dostupnih internetskih baza podataka, dok su 163 herbicida, koja nisu u primjeni, preuzeti iz literaturnih izvora te su oba skupa klasificirana prema mehanizmu djelovanja na korov (HRAC klasifikacija). *In silico* su predviđena fizikalno-kemijska svojstva i potencijal herbicida za toksično djelovanje na ljudsko zdravlje. Njihovom opsežnom analizom kao potencijalno najtoksičniji identificirani su spojevi iz klase K1, K3/N, F1 i E. Za *in vitro* analizu potencijalnih inhibitora acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze odabrano je 11 herbicida. Organofosfat anilofos (K3) i oksiacetanilid flufenacet (K3) bili su najpotentniji inhibitori obje kolinesteraze. Glifosat (G), oksadiazon (E), tembotrion (F2) i terbutilazin (C1) bili su vrlo slabi inhibitori kolinesteraza. Općenito, aktivni herbicidi imali su nešto veći potencijal za inhibiciju butirilkolinesteraze nego acetilkolinesteraze. Anilofos, benzulid (Z), butamifos (K1), piperofos (K3) i oksadiazon djelovali su citotoksično na ljudske živčane i jetrene stanice. Rezultati provedenih *in silico* i *in vitro* istraživanja daju uvid u potencijalnu toksičnost herbicida i moguću primjenu u dizajnu novih herbicida sigurnih za ljudsko zdravlje i okoliš.

(XV+99 stranica, 22 slika, 10 tablica, 169 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: acetilkolinesteraza/ anilofos/ citotoksičnost/ flufenacet/ glifosat/ inhibitori/ organofosfati

Mentori: nasl. izv. prof. dr. sc. Zrinka Kovarik, zn. savj. u tr. zv.
dr. sc. Višnja Stepanić, v. zn. sur.

Rad prihvaćen: 7. lipnja 2023.

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Ines Primožič
2. prof. dr. sc. Branimir Bertoša
3. dr. sc. Suzana Žunec, v. zn. sur.
4. dr. sc. Anita Bosak, v. zn. sur. (zamjena)



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

TOXICITY OF SELECTED HERBICIDES ANALYSED BY *IN SILICO* METHODS AND BY BIOASSAYS

Vesna Pehar

Croatian Defense Academy "Dr. Franjo Tuđman", Ilica 256b, Zagreb, Croatia

Sets of 346 commercial and 163 outdated herbicides were collected from available internet databases and literature and classified according to their mode of action on weeds (HRAC classification). Potential toxic effects on human health and relevant physicochemical properties were predicted. By their extensive analysis the compounds from K1, K3/N, F1, and E classes were identified as the most risky. Eleven herbicides were selected for further *in vitro* study as potential acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors. The organophosphate anilophos (K3) and the oxyacetanilide flufenacet (K3) were found to be the most potent inhibitors of both cholinesterases. Glyphosate (G), oxadiazon (E), tembotrione (F2), and terbuthylazine (C1) were poor cholinesterase inhibitors. In general, the active herbicides showed slightly higher potential to inhibit butyrylcholinesterase. Anilophos, bensulide (Z), butamifos (K1), piperofos (K3), and oxadiazon showed cytotoxicity on human nerve and liver cells. The results of the study provide information on the potential toxicity of herbicides, and can be used in design of new herbicides with no toxicity to humans and the environment.

(XV+99 pages, 22 figures, 10 tables, 169 references, original in Croatian)

Thesis deposited in the Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: acetylcholinesterase/ anilophos/ cytotoxicity/ flufenacet/ glyphosate/ inhibitors/ organophosphates

Supervisor: Zrinka Kovarik, PhD, Permanent Scientific Advisor
Višnja Stepanić, PhD, Senior Research Associate

Thesis accepted: 7th June 2023

Reviewers:

1. Professor Ines Primožič, PhD
2. Professor Branimir Bertoša, PhD
3. Suzana Žunec, PhD, Senior Research Associate
4. Anita Bosak, PhD, Senior Research Associate (substitute)

§ 1. UVOD

Herbicidi su spojevi koji se koriste za uništavanje korova ili za kontrolu i usporavanje njihova rasta. Najčešće se koriste kao tekuće emulzije ili u obliku granula. Osim za uništavanje korova u poljoprivredi koriste se i za raščišćavanje raznih industrijskih i javnih površina kao što su željezničke pruge, prometnice, travnate površine (travnjaci, parkovi, vrtovi), ribnjaci, jezera, kanali za navodnjavanje i rekreacijski tereni. To su fitotoksični spojevi čija se upotreba u zadnjih trideset godina povećala sa 48 % na 55 % ukupne uporabe pesticida na globalnoj razini¹. Stalni razvoj i široka i rasprostranjena upotreba herbicida nastala je prvenstveno zbog potrebe za većim prinosima u proizvodnji usjeva i shodno tome potrebe za uništavanjem i/ili uklanjanjem neželjenih biljaka-korova²⁻³.

Herbicidi se mogu klasificirati prema djelovanju na određenu vrstu korova (jednogodišnjih i/ili višegodišnjih; širokolisnih i/ili uskolisnih), kemijskoj strukturi (razni anorganski i organski spojevi), vremenu primjene, distribuciji kroz korov (kontaktni, sustavni/translokacijski), metodi primjene (preko korijena ili listova) te mjestu ili mehanizmu djelovanja⁴.

Tisuće herbicida i njihovih smjesa su u svakodnevnoj uporabi, ali samo za neke od njih provedene su procjene toksičnosti i utjecaja na ljude⁵. Toksičnost je danas jedan od glavnih razloga za povlačenje raznih spojeva (npr. lijekova) iz kliničkih istraživanja i tržišta⁵⁻⁶. Pesticidi - herbicidi, fungicidi i insekticidi skupine su spojeva kojima su ljudi svakodnevno izloženi, a ipak većina njih do nedavno nisu bile podvrgnute toksikološkom ispitivanju. Podaci o toksičnosti spojeva koriste se u procesu procjene rizika njihovog štetnog utjecaja na ljude i okoliš. Toksičnost spojeva ispituje se pomoću raznih *in vitro* testova i *in vivo* modela⁷⁻⁸. S obzirom da su *in vivo* istraživanja dugotrajna i skupa, a uz to ispitivanje toksičnosti na životinjama je i etički problem, znanstvenici koriste alternativne metode određivanja toksičnosti spojeva, njihovih metabolita i degradacijskih produkata u okolišu. Tako *in silico* metode kao alternativne metode uključuju primjenu različitih računalnih metoda koje su za razliku od eksperimentalnog pristupa sigurne za ljude i okoliš, brze i jeftine, a što je osobito važno mogu se koristiti i za predviđanje toksičnosti spojeva prije nego se krene u sintezu⁹.

Iako je široka i rasprostranjena upotreba herbicida pridonijela većem urodu poljoprivrednih kultura te poboljšanju životnih i prehrambenih navika na globalnoj razini,

njihova ponekad slabo ili nikako kontrolirana primjena u poljoprivredi i nestručno rukovanje korisnika dovelo je do akumulacije ovih spojeva u različite ekološke sustave. Vodene površine kontaminiraju se postupcima ispiranja i erozijom tla što uzrokuje kontaminaciju/trovanje vodenih organizama (npr. alge, ribe, rakovi), a isparavanjem herbicidi odlaze u atmosferu pa vjetrom se mogu proširiti i u okoliš koji je daleko od mjesta primjene herbicida¹⁰⁻¹⁴. Osim za biljke herbicidi mogu biti toksični i za sisavce - ljude i životinje^{11,15-18} i mogu izazvati različite vrste toksičnosti od reproduktivne, hepatotoksičnosti do neurotoksičnosti¹⁸⁻²⁸.

Svrha ove disertacije bila je da se za dva skupa komercijalnih i napuštenih herbicida uz primjenu *in silico* alata procijeni njihov potencijal za izazivanje različitih vrsta toksičnosti, primarno neurotoksičnosti, ispituju fizikalno-kemijske predispozicije za prolazak kroz krvno-moždanu barijeru (KMB) te napravi odabir herbicida za daljnje *in vitro* ispitivanje utjecaja na aktivnost acetilkolinesteraze (AChE) i butirilkolinesteraze (BChE) i citotoksičnost na odabrane ljudske stanične linije. Pri odabiru spojeva ispitana je i strukturna sličnost herbicida s poznatim inhibitorima kolinesteraza kako bi se istražilo može li se toksični učinak na molekularnoj odnosno staničnoj razini povezati sa specifičnim strukturnim elementima.

Postavljena hipoteza istraživanja u okviru ove disertacije bila je da će odabrani herbicidi koji imaju potencijal za prolazak kroz krvno-moždanu barijeru i inhibiraju kolinesteraze biti neurotoksični, odnosno da njihov mehanizam toksičnosti uključuje razvijanje simptoma kolinergičke krize.

Herbicidi su prikupljeni iz literaturnih izvora i dostupnih internetskih baza podataka, grupirani u dvije skupine (komercijalni i napušteni) i klasificirani prema mjestu/mehanizmu djelovanja na korov. Zatim su izračunati parametri za različite vrste toksičnosti i niz fizikalno-kemijskih svojstava povezanih s apsorpcijom, distribucijom, metabolizmom, ekskrecijom i toksičnosti (ADMET). Predviđene vrijednosti upotrijebljene su za statističku analizu kako bi se odredio ADMET profil herbicida s obzirom na njihov način djelovanja. *In silico* analizom različitih vrsta toksičnosti profilirale su se klase spojeva s najvišim potencijalom za toksično djelovanje na ljude, životinje i okoliš te je izabrano 11 herbicida za daljnja *in vitro* testiranja. Spektrofotometrijskim metodama provedena su mjerenja inhibicije enzima AChE i BChE u prisutnosti nekoliko koncentracija odabranih herbicida kako bi se odredila IC₅₀ vrijednost, tj. koncentracija pri kojoj je očuvano 50% aktivnosti testiranog enzima nakon 30 minuta reakcije. Za progresivne inhibitore inhibicija je praćena tijekom vremena te su određene inhibicijske konstante. Također, molekulskim modeliranjem opisane su interakcije odabranih herbicida u

aktivnim mjestima AChE i BChE. Ispitivanje citotoksičnosti napravljeno je na odabranim ljudskim staničnim linijama uz praćenje vijabilnosti i pojave oksidacijskog stresa.

Kombinirana *in silico* i *in vitro* istraživanja toksičnosti herbicida pomoći će u identifikaciji vrsta toksičnosti herbicida i omogućiti će nove spoznaje o djelovanju herbicida na ljudski organizam te usmjeriti daljnja istraživanja prema dizajniranju i sintezi herbicida sigurnih za ljude i okoliš.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Herbicidi

2.1.1. Povijesni razvoj herbicida

Razvoj herbicida započinje s inteziviranjem i razvojem poljoprivrede. Prvi spojevi koji su se koristili kao herbicidi bili su sumporna kiselina, natrijev-klorat, arsenijev-trioksid, natrijev-arsenat i petrolej. Problemi u primjeni prvih herbicida bili su štetni učinci na ljude i neselektivno djelovanje na korov. Početkom 1930-ih godina pojavljuju se metode biološke kontrole rasta korova²⁹, a krajem 1940-ih razvija se kemijska kontrola korova i na tržištu se pojavljuju sintetski organski herbicidi³. Jedan od glavnih ciljeva razvoja novih vrsta herbicida je povećanje selektivnosti djelovanja na korove kako bi se očuvali ili povećali prinosi uzgajanih kultura i sačuvala voda i hranjive tvari iz tla neophodne za rast i razvoj zasađenih usjeva.

Prvo otkriće na polju selektivne kontrole korova bio je herbicid 2,4-dinitro-*o*-krezol (DNOC) predstavljen 1933. godine u Francuskoj koji se pokazao kao izrazito toksičan za ljude izazivajući mrenu. Sljedeće 1934. godine predstavljen je herbicid 2,4-diklorofenoksiacetatna kiselina (2,4-D) koji pripada skupini fenoksi herbicida. Tijekom Drugog svjetskog rata uloženi su veliki naponi u razvoju novih, učinkovitih herbicida kao potencijalno kemijsko oružje³. Nešto kasnije neki od njih, parakvat i „Agent Orange“ (kombinacija 2,4-D i 2,4,5-triklorofenoksiacetatna kiselina (2,4,5-T)) korišteni su kao kemijski agensi i defolijanti u Maleziji³⁰ i Vijetnamskom ratu uzrokujući razne psihološke probleme, reproduktivnu toksičnost kao i razne vrste karcinoma (ne-Hodgkinov limfom, sarkom)³¹. Nakon razvoja fenoksi-herbicida i herbicida iz bipiridilne skupine slijedila je pojava prvog herbicida iz skupine urea, monurona. Sredinom 1960-ih godina na tržište izlazi nitrofen, predstavnik inhibitora protoporfirinogen-oksidade koja sudjeluje u biosintezi protoporfirina IX koji je prekursor životno važnih molekula poput hemoglobina i klorofila. Tijekom 1970-ih godina pojavljuje se sistemski, neselektivni organofosforni herbicid, glifosat (na tržištu pod imenom Roundup) sintetiziran za uništavanje svih širokolisnih godišnjih i polugodišnjih korova proizvođača Monsanto. Njegova upotreba do današnjih dana je pod povećalom jer još ne postoje jedinstveni dokazi o njegovoj toksičnosti i utjecaju na okoliš, životinje i ljude. Daljnji

razvoj predstavio je triazinske herbicide, kloroacetamidne herbicide i imidazolinonske herbicide s različitim mehanizmima djelovanja³.

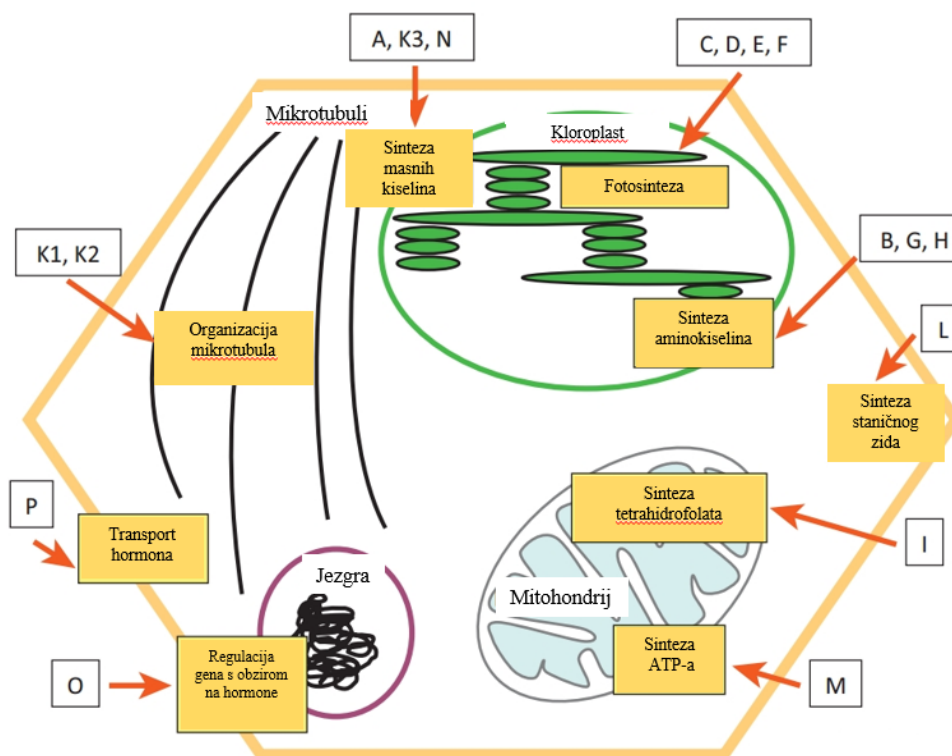
2.1.2. *Klasifikacija herbicida*

Herbicidi se klasificiraju na više načina. Prema sposobnosti translokacije kroz biljku razlikuju se sistemski i nesistemski herbicidi. Sistemski/translokacijski herbicidi su spojevi koji se zajedno s vodom i nutrijentima vrlo lako šire biljkom od mjesta apsorpcije do mjesta djelovanja putem vaskularnog sustava biljke. Sistemski herbicidi su mnogo učinkovitiji za višegodišnje biljke. Potrebno im je nekoliko dana ili tjedana kako bi učinkovito uništili korov za razliku od kontaktnih herbicida koji vrlo brzo djeluju na korov. Nesistemski/kontaktne herbicidi su spojevi koji uništavaju samo dio korova s kojim dođu u kontakt i ne šire se dalje kroz biljku⁴.

Herbicidi se također klasificiraju na selektivne i neselektivne spojeve s obzirom na vrstu korova na koji djeluju. Selektivni herbicidi kontroliraju ili suzbijaju određenu vrstu korova i ne utječu na rast drugih vrsta korova. Selektivnost može biti zbog translokacijskog svojstva, tj. različite apsorpcije, morfoloških ili fizioloških razlika između biljnih vrsta. Neselektivni herbicidi ne djeluju na određeni korov, nego kontroliraju ili uništavaju svaku biljnu vrstu s kojom dođu u kontakt, a koriste se za čišćenje industrijskih zona, odlagališta otpada, željezničkih pruga i pristupnih površina⁴.

Osim navedenih klasifikacija herbicidi se klasificiraju i prema mjestu ili mehanizmu djelovanja, uz pretpostavku da će herbicidi izazvati iste simptome i osjetljivost korova⁴. Dosada je poznato oko 20 različitih bioloških meta herbicida (**slika 2.1**)³². Razumijevanje biokemijskih mehanizama djelovanja herbicida postaje koristan alat u poboljšanju metoda primjene herbicida i otkrivanju toksikoloških svojstava herbicida. Karakterizacija novih mehanizama djelovanja i novih ciljnih meta pomažu u pronalasku novih kemijskih klasa herbicida, a struktura kompleksa ciljnog proteina i herbicida pomaže u razumijevanju biološkog odgovora organizma nakon izlaganja djelovanju herbicida. Nadalje, poznavanje mehanizma djelovanja herbicida omogućuje manipulaciju kod probira selektivnih herbicida za rješavanja problema rezistentnosti herbicida³³. Klasifikacija herbicida je jedan od načina koji se koristi u dizajniranju dobrih rotacijskih programa herbicida koji bi trebali omogućiti smanjenje otpornosti herbicida na korove nastale zbog njihove opetovane uporabe na istu vrstu korova.

S obzirom na mjesto i mehanizam djelovanja, herbicidi su grupirani prema WSSA klasifikaciji herbicida koju propisuje Američko društvo za znanost o korovima (engl. *Weed Science Society of America*)³⁴ i HRAC klasifikaciji herbicida koju propisuje Odbor za borbu protiv otpornosti korova na herbicide (engl. *Herbicide Resistance Action Committee*)³⁵.



Slika 2.1. Biološke mete djelovanja herbicida i klasifikacija herbicida prema mjestu i mehanizmu djelovanja, HRAC2020 klasifikaciji. Prema HRAC2022 klasifikaciji prikazane klase asignirane su brojkama; A-1; B-2; C-5/6; D-22; E-14; F-12/13/27/34; G-9; H-10; I-18; K1-3; K2-23; K3-15; L-29; M-24; N-15; O-4; P-19. Slika preuzeta iz ref. ³⁸ i prilagođena.

HRAC klasifikacija³⁶ grupira herbicide prema mehanizmu djelovanja u 25 klasa³⁷. Općenito, na fiziološkoj razini različite vrste herbicida kontroliraju biljke inhibirajući proces fotosinteze, inhibirajući/oponašajući regulatore rasta biljke, inhibirajući biosintezu lipida ili biosintezu aminokiselina, te inhibirajući razvoj stanica i staničnu diobu (**slika 2.1**)³⁸. Unutar HRAC klase herbicidi sa zajedničkim mjestom/ mehanizmom djelovanja na biljke, grupirani su prema pripadajućim kemijskim skupinama spojeva. Mogući problemi za uspješnu primjenu rotacijske strategije koji se javljaju kod ovakvih vrsta klasifikacija jesu pogrešno određivanje kemijske obitelji herbicida ili nemogućnost određivanja mehanizma djelovanja herbicida³⁶.

U 2020. godini došlo je do promjena u klasifikaciji herbicida sukladno novim saznanjima i do objedinjavanja HRAC i WSSA klasifikacija u HRAC/WSSA klasifikaciju prihvaćajući brojčanu oznaku klase. Zadnja ažurirana verzija HRAC/WSSA dostupna je od 2022. godine gdje su dodane četiri nove klase, a N klasa (HRAC2020) pridodana K3 [15] klasi te je nastala jedinstvena [15] klasa³⁷.

2.2. Toksičnost herbicida

2.2.1. Pregled toksičnosti herbicida

Herbicidi se najčešće klasificiraju kao netoksični ili slabo toksični spojevi³. Međutim, rasprostranjena i učestala uporaba herbicida diljem svijeta kao i slabo kontrolirana uporaba mogu dovesti do njihove akumulacije u različite ekološke sustave. Mnoge znanstvene studije pokazale su da pesticidi uključujući herbicide kontaminiraju izvore vode, okolni zrak, maglu, padaline i tla¹⁵. Herbicidi prodiru u vodu ispiranjem tla ili ispiranjem i erozijom njihovih ostataka sa susjednih zemljišta i prometnica. Ostaci herbicida mogu isparavanjem ili erozijom vjetra dospjeti u atmosferu što dalje dovodi do širenja kontaminacije i njihovog taloženja i zagađenja površinskih i podzemnih voda, obalnih voda, flore i faune¹⁰⁻¹³. Životinjski svijet direktno može akumulirati herbicide preko škrge ili kože, te oralno unosom suspendiranih ostataka preko kontaminirane hrane ili vode i kroz prirodni hranidbeni lanac^{11,16,17}. Herbicidi su sintetizirani da budu toksični za korove s obzirom na svoja fizikalno-kemijska svojstva, ali kako imaju sposobnost kontaminirati zrak, vodu, tlo i hranidbeni lanac mogu biti toksični i za ljude i druge životinjske vrste. Općenito se smatra da su herbicidi relativno netoksični spojevi za neciljane organizme (engl. *non-targeted organisms*) zbog toga jer nemaju zajedničke biološke mete u sisavcima^{10,39}.

Razni biološki organizmi i vrste kao što su alga, protozoa (*Tetrahymena pyriformis*), račić, vodenbuha (*Daphnia* spp.), slatkovodna riba (*Fathead minnow*) i zlatna ribica (*Carassius auratus*) koriste se kao modeli za predviđanje potencijalnih opasnih/toksičnih efekata herbicida na više organizme, živi svijet^{19,40-44}.

Ljudi mogu biti izloženi herbicidima radeći na poslovima proizvodnje, transporta, dostave i upotrebe herbicida ili biti u blizini mjesta/površina koje se tretiraju velikim količinama herbicida¹⁸. Herbicidi najčešće ulaze u organizam putem kože, udisanjem suspendiranih čestica u zraku i unosom hrane odnosno gastrointestinalnim sustavom^{3,15}. Mostafalou i Abdollahi¹⁸ napisali su sistematični pregled slučajeva raznih malignih, neurodegenerativnih bolesti, respiratornih, reproduktivnih, razvojnih i metaboličkih bolesti povezanih sa različitim načinima ljudske izloženosti pesticidima. Po tom pregledu herbicidi izazivaju najčešće kancerogenost (51 %), a slijedi neurotoksičnost sa 22 % pojavnosti nakon izlaganja organizma herbicidima¹⁸.

Organofosforni spojevi (OP), koji se često koriste kao pesticidi, poznati su po svom neurotoksičnom djelovanju^{39,45,46}. Ovi spojevi su inhibitori aktivnosti acetilkolinesteraze

(AChE) i butirilkolinesteraze (BChE), serinskih hidrolaza koje se nalaze u sinapsama središnjeg živčanog sustava (SŽS), neuromuskularnim spojnica periferanog živčanog sustava (PŽS), membranama eritrocita i krvnoj plazmi⁴⁷. OP izazivaju neurotoksičnost prvenstveno fosforilirajući AChE, enzim koji hidrolizira esencijalni neurotransmiter acetilkolin (ACh). Inhibicija AChE dovodi do gomilanja acetilkolina u sinapsama i uzrokuje prekomjernu stimulaciju kolinergičkih receptora što se očituje pojavom raznih simptoma kao što su mioze, bronhoreja, bradikardija, pojačano slinjenje, konvulzije, a u slučaju trovanja može doći do gubitka svijesti, prestanka disanja i zatajenje rada srca^{39,46,48,49}. Iako BChE nije esencijalni ljudski enzim kao što je to AChE, BChE može hidrolizirati ksenobiotike u cirkulaciji i tako služiti kao zaštita od inhibicije sinaptičke AChE i trovanja s inhibitorima AChE poput organofosforinih pesticida^{47,50,51}.

U dosadašnjim studijama vrlo malo pažnje se posvećivalo istraživanju mehanizama toksičnosti herbicida općenito ili neurotoksičnosti u ne ciljanim organizmima, ljudima ili drugim sisavcima. Kako je ranije spomenuto glavni razlog tome je što se mehanizmi/mjesta djelovanja herbicida u biljkama razlikuju i nisu pronađeni u ljudskom organizmu^{39,52}. Međutim postoje studije istraživanja specifičnih urođenih mana čiju pojavu uključujući i blago povećani rizik za oštećenjem središnjeg živčanog sustava povezuju uz rad na poljoprivrednim površinama¹⁵.

2.2.2. *Neurotoksičnost herbicida*

Upotreba herbicida dovodi do potrebe praćenja i istraživanja okoliša te njihovog djelovanja i utjecaja na žive organizme. Međutim, istraživanja općenitih i neurotoksičnih mehanizama djelovanja herbicida na ne-ciljane organizme dugo vremena bila su zanemarena jer većina herbicida djeluje na mehanizme u biljkama koji nisu prisutni u ljudi i sisavaca³⁹.

Najrasprostranjeniji herbicid na svijetu, „Roundup“ u svom kemijskom sastavu sadrži glifosat kao aktivnu komponentu⁵². Njegov mehanizam djelovanja ne postoji u sisavaca i zbog toga su studije o potencijalnoj toksičnosti glifosata bile zanemarene do 21. stoljeća³⁹. Drugi problem kod dizajniranja studija o toksičnosti herbicida je taj što je većina komercijalnih herbicida smjesa jedne ili više aktivnih tvari s mnogo pomoćnih tvari (adjuvanata) koji povećavaju učinak/efikasnost herbicida⁵³. Zbog nepoznavanja njihove točne prirode koji može varirati od države i proizvođača, studije o mehanizmima neurotoksičnosti i neuropatologije

komercijalnih herbicida moraju uključiti i svojstava pomoćnih tvari kako bi se otkrio izvor toksičnosti. Takva saznanja bi uvelike pridonijela dizajniranju komercijalnih smjesa s aktivnim tvarima (herbicidima) smanjenog (neuro)toksičnog djelovanja na ljude i sisavce³⁹.

2.2.3. Toksičnost organofosfornih herbicida

2.2.3.1. Glifosat

Glifosat i herbicidi na bazi glifosata su daleko najkorišteniji herbicidi zadnjih nekoliko desetljeća³⁹. Glifosat, 2-(fosfometilamino)glicin je neselektivni sistemski herbicid koji se koristi za suzbijanje korova na poljoprivrednim i nepoljoprivrednim zemljištima i za kontrolu i suzbijanje nepotrebne vegetacije u područjima interesa. Vrlo dobro je topljiv u vodi, relativno hlapljiv te se ne zadržava i ne prodire u tretirano zemljište⁵⁴.

Prema HRAC/WSSA klasifikaciji pripada G/9 klasi jer u korovima inhibira enzim 5-enolpiruvilšikimat-3-fosfat sintazu (EPSP) što dovodi do smetnji u sintezi aromatskih aminokiselina fenilalanina, tirozina i triptofana i zaustavlja sintezu proteina³³. Glifosat je aktivni sastojak Roundup® jednog od najraširenijih herbicida diljem svijeta. Većina studija pokazale su slabu ili nikakvu reproduktivnu toksičnost glifosata⁵⁵, a neke studije su pokazale toksičnost herbicida na reproduktivnu funkciju mužjaka glodavaca⁵⁶. Anifandis i sur. istraživali su djelovanje glifosata na pokretljivost ljudskih spermija i izazivanje DNA fragmentacije te su pokazali da glifosat izaziva *in vitro* toksične efekte progresivno smanjujući pokretljivost spermija muškaraca, ali ne utječe strukturu DNA nakon 1 sat izlaganja sjemena glifosatu pri visokoj koncentraciji⁵⁷.

Eriksson i sur. su u svojoj studiji pokazali povezanost između profesionalnog izlaganja glifosatu i povećanim rizikom od obolijevanja od non-Hodgkinovog limfoma⁵⁸. Djelovanje glifosata je opaženo i u slučaju bubrežnih oboljenja nepoznate etiologije u Šri Lanki gdje se pokazalo da glifosat ima sposobnost uništiti bubrežno tkivo nakon stvaranja kompleksa s nefrotoksičnim metalima u geološki specifičnom području⁵⁹. Također, glifosat je uzrokovao poremećaje u razvoju živčanog sustava kod djece nakon izlaganja trudnica i novorođenčadi okolišnim utjecajima glifosata⁶⁰.

Dugi niz godina glifosat se smatrao relativno slabo toksična aktivna tvar zbog visoke LD₅₀ vrijednosti kod štakora (5,6 gkg⁻¹) i miša (10 gkg⁻¹). Slaba akutna toksičnost glifosata potvrđena je rezultatima nedavnih studija koje pokazuju da su smjese herbicida toksičnije od

pojedinačnog djelovanja glifosata⁶¹⁻⁶². Studije o vrednovanju neurotoksičnosti kod glifosata (ili komercijalne smjese) bile su zanemarene i slabo dokumentirane. Neke studije su pokazale da glifosat inhibira AChE⁶³, a izmjerena IC₅₀ vrijednost u ljudskom serumu bila je 714 mmol dm⁻³ što je mnogo veća koncentracija od koncentracije izmjerene u serumu nakon kroničnog izlaganja (< 0,05 mmol dm⁻³) i akutnog otrovanja glifosatom (0,05-5 mmol dm⁻³)⁶⁴, što dovodi do promišljanja da ovo nije mehanizam neurotoksičnog djelovanja glifosata. Druge studije pokazale su abnormalni razvoj mozga u modelu zebrice (*Danio rerio*) djelovanjem herbicida na bazi glifosata⁶⁵⁻⁶⁶ što se može povezati s ekcitoloksičnosti (prekomjerna aktivacija neuronskih receptora za aminokiseline) glutamata koja je opažena i u štakora u razvoju nakon izlaganja glifosatu⁶⁷⁻⁶⁸. Nedavna istraživanja pokazala su povećanu anksioznost i depresiju u ponašanju kod štakora izloženih herbicidima na bazi glifosata te promjene u broju i raznolikosti crijevne mikrobiote⁶⁹. Šikimatski put važan je za bakterije jer im omogućuje sintezu aromatskih aminokiselina, a njegovom inhibicijom hipotetski se usporava katabolizam triptofana. Usporavanje ovog procesa može biti značajno jer je triptofan prekursor za sintezu serotonina koji je važan kod anksioznosti i depresije. Znanstveni naponi trebaju se usmjeriti u daljnje istraživanje neurotoksičnosti herbicida na bazi glifosata³⁹.

2.2.3.2. Anilofos

Anilofos, *N*-(4-klorofenil)-2-dimetoksifosfinotioilsulfanil-*N*-propan-2-il-acetamid je selektivni organofosforni herbicid koji se primjenjuje prije klijanja biljke (engl. *pre-emergence*) ili nešto prije nego što biljka iznikne na površinu (engl. *post-emergence*), a selektivno djeluje na jednogodišnje trave i šaši u poljima riže. Ovaj α -tioacetamid slabo je hlapljiv i topljiv u vodi, a može biti postojan u tlu ovisno o uvjetima i vrsti zemljišta na kojem se primjenjuje^{54,70}. Anilofos je bezbojna ili svjetlo smeđa kristalinična tvar bez mirisa koja se absorbira kroz korijenje biljke i djeluje kao inhibitor biosinteze vrlo dugačkih lanaca masnih kiselina (VLCFAs) te pripada K3/15, HRAC/WSSA klasi herbicida^{36,37,54}.

Toksičan je za ptice, a u manjoj mjeri za pčele, ribe i vodene beskralješnjake⁵⁴. Umjereno je toksičan za ljude izazivajući iritaciju kože i respiratorne smetnje te inhibira AChE⁵⁴. Studija Hazarike i sur. pokazala je akutnu toksičnost anilofosa koja izaziva promjene u ponašanju i naglašenu kolinergičku hiperaktivnost⁷¹. S druge strane, dugotrajno izlaganje anilofosu uzrokovalo je povećanje težine organa jetre, srca, slezene i bubrega u mužjaka

štakora. Također, anilofos je inhibirao aktivnost kolinesteraza u eritrocitima (41-67 %), plazmi (36 %), krvi (37-64 %), mozgu (63-73 %) i jetri (28-48 %) ⁷¹. Druga studija Hazarike i sur. pokazala je da anilofos izaziva neuronalne/stanične disfunkcije smanjujući razinu reduciranog oblika glutationa (GSH) i aktivnost enzima glutation-S-transferaze (GST) i adenzintrifosfataze (ATP) odnosno inhibirajući prijenos iona kroz staničnu membranu u stanicama jetre i u eritrocitima i oslobađajući određene neurotransmitere ⁷². Istraživanje Bagrija i sur. pokazalo je da anilofos izaziva mutagene učinke na albino miševe kroz pojavu kromosomskih aberacija i abnormalnosti sjemene tekućine ⁷³. Aggarwal i sur. pokazali su da anilofos izaziva razvojnu toksičnost kod gravidnih štakorica ²⁰.

2.2.3.3. Benzulid

Benzulid, *N*-[2-di(propan-2-iloksi)fosfinitioilsulfaniletil]benzensulfonamid organofosfatni herbicid, koristi se u poljoprivredi povrća, mahunarki i češnjaka kao inhibitor sinteze lipida i stanične diobe iako prema HRAC/WSSA klasifikaciji pripada Z/0 klasi spojeva kojima mjesto djelovanja nije točno određeno. Benzulid koji je do 2020. godine pripadao N klasi prebačen je u klasu Z jer nije bilo jedinstvenih eksperimentalnih dokaza o njegovom mehanizmu djelovanja na korove ³⁵. S obzirom na intezivnu uporabu, njegovo postojanje u površinskim vodama i visoko zadržavanje rezultati studija sugeriraju da može dovesti do izlaganja neciljanim organizmima, uzrokujući različite toksične učinke uključujući reproduktivnu toksičnost u ptica, riba i sisavaca ⁷⁴.

Nedavna studija Kim i sur. pokazala je da benzulid aktivira signalne puteve ERK1/2 i JNK i da izaziva poremećaj potencijala mitohondrijske membrane dvije vrste stanica svinjskog uterusa (pTr i pLE) što dovodi do porasta mitohondrijske koncentracije Ca²⁺, a smanjenja citoplazmatske koncentracije Ca²⁺. Zaključuju da benzulid izaziva poremećaj u regulaciji različitih unutarstaničnih procesa što dovodi do zaustavljanja ciklusa stanične diobe i apoptozu ⁷⁴.

2.2.3.4. Butamifos

Butamifos, *N*-[etoksi-(5-metil-2-nitrofenoksi)fosfinotioil]butan-2-amin je organofosforni herbicid koji je namijenjen za kontrolu godišnjih trava i korova, a inhibira združivanje mikrotubula i time sprečava staničnu diobu. Mehanizam djelovanja u biljkama klasificira ga u K1/3 klasu prema HRAC/WSSA klasifikaciji.

Kojima i sur. proveli su istraživanje za 200 različitih pesticida uspoređujući njihovu aktivnost kao agonista za nuklearni X receptor (engl. *pregnane X receptor*, PXR) čovjeka i miša koristeći *in vitro* pristup pomoću reporter gena⁷⁵. Među 200 pesticida piperofos i butamifos pokazali su se kao vrlo dobri agonisti za ljudski nuklearni X receptor, a butamifos i za mišji nuklearni X receptor pri vrlo malim koncentracijama. Nedavne studije pokazale su i da su PXR uključeni u proces prijenosa energije jer djeluju na metabolizam masnih kiselina, lipida i glukoze, što zahtjeva dodatna testiranja spojeva iz okoliša na PXR zbog mogućih štetnih učinaka tih spojeva na metabolički prijenos energije i endokrini imunološki sustav u organizmu⁷⁵.

2.2.3.5. Piperofos

Piperofos, 2-dipropoksifosfinotioilsulfanil-1-(2-metilpiperidin-1-il)etanon je organofosforni herbicid koji je namijenjen za kontrolu godišnjih trava na poljima riže, a inhibira sintezu dugih lanaca masnih kiselina (engl. *very long-chain fatty acids*, VLCFAs) te pripada K3/15 HRAC/WSSA klasi herbicida.

Piperofos se pokazao kao vrlo dobar agonist za nuklearni X receptor⁷⁵. Viswanath i sur. su u svom istraživanju o anti-androgenskim aktivnostima piperofosa pokazali da piperofos utječe na reproduktivnu funkciju odraslih štakora smanjujući biosintezu testosterona pomoću Leydigovih stanica⁷⁶.

2.2.4. Herbicidi na bazi parakvata

Podaci o neurotoksičnosti parakvata (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridinijev diklorid) vjerojatno su najpouzdaniji od svih ostalih herbicida. Izlaganje parakvatu povezano je s pojačanim rizikom od pojave Parkinsonove bolesti (PD)⁷⁷, te je korišten kod životinja s ciljem modeliranja aspekata patologije Parkinsonove bolesti, uključujući gubitak dopamina i gomilanja

sinukleinskog proteina kroz iniciranje oksidacijskog stresa i neuroloških upalnih procesa⁷⁸⁻⁸⁰. Također, parakvat izaziva fosforilaciju tirozina na Parkin proteinu u SH-SY5Y staničnim linijama⁸¹ što inhibira funkciju proteina i omogućava napredovanje bolesti. Dulje izlaganje stanica modela Parkinsonove bolesti parakvatu izazvalo je hiperacetilaciju u stanicama iz čega se može zaključiti da uz dulju izloženost stanica parakvatu može doći do epigenetičkog reprogramiranja⁸². Nedavna istraživanja pluripotentnih ljudskih matičnih stanica tretiranih parakvatom pokazala su povećanje proupalnog citokina interleukina IL-6, koji je dio sekrecijskog fenotipa povezanog sa starenjem u astrocitima i fibroblastima⁸³. Daljnji napori trebaju biti usmjereni na istraživanje na koji način parakvat i drugi herbicidi moduliraju upalne procese i iniciraju procese povezane s neurodegeneracijom stanica³⁹.

2.2.5. Toksičnost karbamatnih herbicida i oksiacetanilida

2.2.5.1. Desmedifam

Desmedifam, [3-(etoksikarbonilamino)fenil]-N-fenilkarbamat, je karbamatni kontaktni herbicid koji se primjenjuje poslije klijanja korova, a koristi se za suzbijanje i uništavanje širokolisnih korova i trava. Slabo je hlapljiv i slabo topljiv u vodi⁵⁴. Desmedifam dolazi u obliku bezbojnih kristalica te je prema predviđanjima toksičan prema većini vodenih organizama, relativno toksičan prema pticama, pčelama i crvima. Ovaj herbicid pokazuje relativno slabu toksičnost prema ljudima, ali može izazvati iritacije kože i oka⁵⁴.

Desmedifam inhibira fotosintezu te ga HRAC/WSSA klasifikacija klasificira u C1/5 klasu herbicida. S ciljem poboljšanja djelovanja herbicida na ciljane organizme nova generacija herbicida često se na tržištu pojavljuje kao smjesa više aktivnih tvari. Jedan od njih je Betanal[®] herbicid odnosno smjesa herbicida: fenmedifama, desmedifama i etofumesata. Iako ovakve smjese herbicida imaju jače herbicidalno djelovanje na svoje mete također se mogu povećati i toksični utjecaji na ne ciljane organizme.

Vidal i sur. istraživali su akutnu (48 h) i kroničnu toksičnost (21 dan) Betanal[®] Expert herbicida i njegovih aktivnih tvari na različite skupine vodenih organizama⁸⁴. Rezultati su pokazali da desmedifam izaziva akutnu i kroničnu toksičnost na mikroalgu (*P. subcapitata*) i vodene račice (*D. magna* i *D. longispina*)⁸⁴. Vidal i sur. istraživali su i mogućnost izazivanja reproduktivne i razvojne toksičnosti kod *Daphnia spp.* djelovanjem Betanal[®] Expert herbicida i njegovih aktivnih tvari¹⁹. Od tri aktivne tvari desmedifam se pokazao kao najtoksičnija aktivna

tvar izazivajući pojačano oslobađanje nesazrijelih jajašaca kod *D. magna* i nesazrijelih jajašaca i nerazvijenih embrija kod *D. longispina*¹⁹.

2.2.5.2. Fenmedifam

Fenmedifam, [3-metoksikarbonilamino)fenil]-N-(3-metilfenil)karbamat, je karbamatni kontaktni herbicid odobren za suzbijanje jednogodišnjih širokolisnih korova u mlađem razvojnom stadiju⁵⁴. Najčešće su to bezbojni kristalići ili bijeli prah koji je slabo topljiv u vodi, slabo hlapljiv i nepostojan u tlu i vodenim sustavima⁵⁴. Slabo je toksičan za ljude, ali se povezuje sa mogućnošću razvoja nekih vrsta karcinoma te izaziva srednje toksične učinke na vodenu i kopnenu floru i faunu⁵⁴. Prema mjestu djelovanja fenmedifam kao i desmedifam pripada C1/5 HRAC/WSSA klasi herbicida.

Howcroft i sur. su u svom istraživanju pokazali da fenmedifam inhibira AChE kod bijelog crva (*Enchytraeus albidus*) u *in vivo* i *in vitro* uvjetima i da upravo inhibicija kolinesteraza može biti marker za prisutnost fenmedifama u *Enchytraeus albidus* organizmu⁸⁵. Prilikom istraživanja akutne i kronične toksičnosti aktivnih tvari Betanal[®] Expert herbicida, fenmedifam je pokazao akutnu (48 h) i kroničnu toksičnost (21 dan) na bakteriju (*V. fischeri*) i makrofit (*L. minor*)⁸⁴ te reproduktivnu i razvojnu toksičnost na organizam *Daphnia magna*¹⁹.

2.2.5.3. Flufenacet

Flufenacet, N-(4-fluorfenil)-N-propan-2-il-2-[[5-triflurometil)-1,3,4-tiadiazol-2-il]oksi] acetamid, je selektivni herbicid koji se koristi za suzbijanje uskolisnih i širokolisnih trava i korova, a primjenjuje se nakon klijanja korova. Ovaj herbicid je bijela krutina specifičnog mirisa koji podsjeća na merkaptan, a pripada skupini oksiacetamida. HRAC/WSSA klasifikacija ga klasificira u K3/15 klasu, a djeluje kao inhibitor biosinteze dugačkih lanaca masnih kiselina. U višim biljkama vrlo dugački lanci masnih kiselina (VLCFAs) sastavni su dio staničnih membrana koje osiguravaju stabilnost i normalno funkcioniranje stanice. Djelovanjem herbicida na enzime elongaze koje sudjeluju u biosintezi VLCFA dolazi do prekida njihove sinteze te se narušava integritet staničnih membrana, selektivnost i postaju propusne uzrokujući smrt tretirane biljke⁸⁶.

Istraživanja o djelovanju flufenaceta na mužjake štakora pokazala su da flufenacet izaziva smanjenu razinu T4 hormona (hormona štitnjače), a izaziva i pojačani metabolizam jetre

koji indirektnim putem biotransformacije i pojačane ekstrakcije T4 hormona u jetri dovodi do povećanja razine istoga i pojačanog rada jetre⁸⁷.

2.2.6. Toksičnost oksadiazolona, triketona i triazina

2.2.6.1. Oksadiazon

Oksadiazon, 5-*tert*-butil-3-(2,4-dikloro-5-propan-2-iloksifenil)-1,3,4-oksadiazol-2-on, bezbojna je kristalinična tvar koja pripada skupini oksadiazolona, a može se primijeniti prije ili nakon klijanja korova i koristi se za kontrolu raznih godišnjih širokolisnih korova i trava. Oksadiazon pripada E/14 HRAC/WSSA klasi herbicida koji djeluju kao inhibitori enzima protoporfirinogen oksidaze (PPO) koji je važan za sintezu klorofila i citokroma³.

Oksadiazon je slabo topljiv u vodi, ali ima veliki biokoncentracijski faktor te predstavlja opasnost za vodene organizme (npr. alge, ribe)⁵⁴. Huang i sur. istraživali su toksičnost herbicida oksadiazon-butaklor (OB) na modelu embrija zebrice⁸⁸. Rezultati su pokazali da oksadiazon uzrokuje oštećenje srčanog mišića kod embrija zebrice izazivajući oksidativni stres koji vodi do zatajenja srca i apoptoze⁸⁸. Usprkos niskoj toksičnosti za ljude, oksadiazon može izazvati oštećenje jetre, štetne utjecaje na reproduktivnu funkciju i endokrine funkcije kod glodavaca⁸⁹. Degl'Innocenti i sur. proveli su istraživanje o djelovanju oksadiazona na primarne neuronske prekursorske stanice izolirane iz ljudskog stratijalnog primordijuma te su pratili što se događa s ekspresijom i aktivacijom mitohondrijske aldehyd-dehidrogenaze 2 (ALDH2) i acilfosfataze (ACYP)⁹⁰. Rezultati su pokazali da OB može inhibirati migraciju neuronskih stratijalnih stanica, inhibirati ekspresiju i aktivaciju ALDH2, a povećati ekspresiju i aktivaciju ACYP enzima te se moglo zaključiti da OB može izazvati neurotoksično djelovanje, a da su ALDH2 i ACYP2 mete njegovog neurotoksičnog djelovanja na organizam⁹⁰. Lemaire i sur. pokazali su da OB ima afinitet kao potencijalni hPXR ligand što može biti indikacija za njegovo djelovanje na endokrini sustav i imunološki sustav⁹¹.

2.2.6.2. Tembotrion

Tembotrion, 2-[2-klor-4-metilsulfonil-3-(2,2,2-trifluoroetoksimetil)benzoil]cikloheksan-1-3-dion, selektivni je herbicid koji se primjenjuje nakon klijanja korova, a koristi se za uništavanje širokolisnih korova i trava kod kukuruza i još nekih drugih poljoprivrednih kultura. Prema kemijskoj strukturi pripada skupini triketonskih herbicida, a prema HRAC/WSSA klasifikaciji

pripada u F2/27 klasu jer inhibira enzim 4-HPPD (4-hidroksifenil-piruvat-dioksigenazu) koji sudjeluje u sintezi plastokinona i α -tokoferola (vitamin E)⁵⁴. Plastokinoni su sastavni dio fotosistema II i prenose elektrone kroz tilakoidne membrane kloroplasta čime se omogućava sinteza ATP-a. Vitamin E je dio staničnih membrana u kojima doprinosi njihovoj stabilnosti i djeluje kao antioksidans sprječavajući oštećenja stanice uslijed oksidacijskog stresa⁹².

Više studija je pokazalo da izaziva oštećenje DNA i oksidacijski stres u stanicama krvi i mozga odraslih *Wister* štakora i toksične efekte na jetru i bubrege odraslih mužjaka *Wistar* štakora nakon njihovog 28-dnevnog izlaganja tembotrionu⁹³⁻⁹⁵.

2.2.6.3. Terbutilazin

Terbutilazin, 2-*N*-*tert*-butil-6-kloro-4-*N*-etil-1,3,5-triazin-2,4-diamin je bijela kristalinična tvar koja se koristi za suzbijanje širokolisnih korova i trava na šumovitom području te za uništavanje korova u vodenom okolišu⁵⁴. Prema mehanizmu djelovanja pripada C1/5 HRAC/WSSA klasi herbicida i inhibira fotosintezu na fotosustavu II kao i desmedifam.

Dokazana je njegova toksičnost na vodene organizme, npr. na ribi zebrici, *Danio rerio* izazivajući toksične efekte na jetri⁹⁶. Istraživanja su pokazali da je terbutilazin endokrini disruptor te da djeluje na reproduktivnu funkciju odraslih *Wistar* štakora⁹⁷⁻⁹⁸.

2.2.7. ECHA regulativa

S obzirom na moguću štetnost kemijskih spojeva Europska agencija za kemikalije (engl. *European Chemical Agency*, ECHA) ima misiju osigurati sigurnu uporabu kemijskih spojeva. ECHA određuje propise i zakone u EU o primjeni kemijskih spojeva s ciljem očuvanja zdravlja ljudi, očuvanja okoliša te razvijanja inovacija i konkurentnosti u Europi⁹⁹.

REACH (engl. *Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*)¹⁰⁰ je regulativa Europske unije (EU) usvojena 2007. godine s ciljem poboljšanja zaštite ljudskog zdravlja i zaštite okoliša od utjecaja raznih kemijskih spojeva koji se proizvode, prodaju i koriste u EU. REACH propisuje procedure o prikupljanju i procjeni informacija o svojstvima i opasnostima promatranog kemijskog spoja.

ECHA prima zahtjeve za registraciju kemijskih spojeva, te predstavnici zemalja članica EU procjenjuju potencijalnu opasnost za ljudsko zdravlje i okoliš. Ukoliko se procjeni da je rizik štetnosti velik i da ga nije moguće kontrolirati, ECHA može odbaciti zahtjev za registraciju

ili ograničiti uporabu određenog spoja. Za nove kemikalije prilikom stavljanja na tržište, krajnji korisnici trebaju biti informirani o mogućoj štetnosti spoja i mjerama zaštite prilikom uporabe istog.

2.2.8. Primjena QSAR modela za predviđanje toksičnih ishoda

Kvalitativni i kvantitativni modeli odnosa struktura-aktivnost (engl. (Quantitative) Structure Activity Relationship (Q)SAR) su matematički modeli koji se koriste za predviđanje fizikalno-kemijskih svojstava te bioloških i ekoloških aktivnosti na temelju znanja o njihovoj kemijskoj strukturi. Regulatorne agencije kao što je ECHA preporučuju upotrebu QSAR modela za procjenu ciljnog svojstva/aktivnosti posebno u slučajevima kad model predstavlja pouzdanu zamjenu za *in vivo* rezultate¹⁰¹⁻¹⁰². Zapravo, uredba ECHA REACH, koja regulira upotrebu, uvoz i komercijalizaciju kemijskih tvari na području Europske unije, ne samo da prihvaća, već i promiče korištenje ove vrste računalnih modela, s ciljem smanjenja broja životinja korištenih u pokusima¹⁰³.

Da bi se (Q)SAR model primijenio u regulatorne svrhe potrebno je zadovoljiti neke uvjete:

- i) parametar točka završetka (engl. *endpoint*) koji se predviđa treba biti precizno definiran i pripadni eksperimentalni podaci korišteni za izgradnju modela trebaju biti određeni pod identičnim uvjetima,
- ii) algoritam s kojim je model izgrađen treba biti opisan budući da treba biti reproducibilan,
- iii) domena primjene (engl. *applicability domain*) mora biti određena (definirana i validirana) budući da se QSAR model može pouzdano primijeniti na kemijske spojeve koji su slični onima uporabljenim za izgradnju modela,
- iv) statistički parametri, uspješnost modela (engl. (*goodness of fit*)), robusnost i prediktivna moć za valjanost modela trebaju biti dani,
- v) kada je moguće, potrebno je dati interpretaciju preko (bioloških, toksikoloških) mehanizama djelovanja istraživanih spojeva.

Komercijalni računalni program ADMET Predictor™ (Simulations Plus Inc.) koristi se u farmaceutskoj industriji kao i u regulatorne svrhe za procjenu raznih fizikalno-kemijskih svojstava i bioloških aktivnosti tj. ADMET svojstava¹⁰⁴⁻¹⁰⁵. Program ADMET Predictor™ upotrebljen je za izračun ADMET svojstava herbicida u okviru ove doktorske disertacije.

Korišteni su klasifikacijski i kontinuirani/regresijski modeli za razne vrste toksičnosti s obzirom na ciljane organizme: a) toksičnost kod ljudi, b) toksičnost kod glodavaca i c) ekotoksičnost integrirani u programu ADMET Predictor™ (Simulations Plus Inc.).

2.3. Kolinesteraze

2.3.1. Uloga i struktura kolinesteraza

Acetilkinesteraza (AChE; E.C. 3.1.1.7) i butirilkolinesteraza (BChE; E.C. 3.1.1.8) su kolinesteraze koje hidroliziraju acetilkolin (ACh) na kolin i octenu kiselinu što omogućuje kolinergičkom neuronu vraćanje u osnovno energetska stanje nakon aktivacije u prijenosu živčanog impulsa^{106,107}. AChE i BChE strukturno su homologni enzimi, ali se razlikuju prema katalitičkoj aktivnosti, različitim specifičnostima prema supstratima koje mogu hidrolizirati te selektivnosti za vezanje mnogih liganada i inhibitora¹⁰⁶.

Acetilkinesteraza (AChE) ili prava (specifična) kolinesteraza smatra se jednim od najučinkovitijih enzima u prirodi¹⁰⁶ zbog brze hidrolize njezinog fiziološkog supstrata, acetilkolina (ACh) jednog od prijenosnika živčanih impulsa¹⁰⁸. Njegovom brzom hidrolizom AChE kontrolira prijenos živčanih impulsa u kolinergičkoj sinapsi središnjeg i perifernog živčanog sustava te time pomaže očuvanju homeostaze u organizmu¹⁰⁶. AChE nalazi se u mnogim različitim vezivnim tkivima kao što su živci, mišići, središnja i periferna vezivna tkiva, motorička i senzorska vlakna, kolinergička i nekolinergička vlakna i na površini membrana crvenih krvnih stanica.

Butirilkolinesteraza (BChE) ili pseudokolinesteraza je u višoj koncentraciji prisutna u središnjem i perifernom živčanom sustavu, cerebrospinalnoj tekućini te crijevima, plućima, gušterači i jetri, a najviše je ima u krvnoj plazmi^{47,50}. Za razliku od AChE, za BChE ne postoji specifični fiziološki supstrat te njezina fiziološka uloga nije esencijalna. BChE hidrolizira butirilkolin i veće kolinske estere s obzirom na acilnu skupinu te velike neutralne estere ili čak i negativne estere jednako učinkovito kao i butirilkolin⁴⁷.

AChE i BChE povezuju se s pojavom nekoliko neurodegenerativnih bolesti kao što su Alzheimerova bolest, Parkinsonova bolest i mijastenija gravis (lat. *myasthenia gravis*) te su i ciljane mete kod medicinskog tretmana istih^{50,109}.

Osnovnu strukturu AChE i BChE čini 12 β -nabranih ploča okruženih s 14 α -uzvojnica što obje kolinesteraze klasificira u skupinu hidrolaza α/β strukture^{50,110}. Kristalna struktura AChE određena 1991. godine iz raže *Torpedo Californica* omogućila je nove spoznaje i nove smjerove istraživanja¹¹¹. Prostor interakcije sa supstratima i drugim ligandima kod ljudske AChE određen je s 14 aromatskih aminokiselina raspoređenih kroz aktivno mjesto enzima^{106,107}. U svojoj strukturi ljudska AChE ima tri *N*-glikozilacijska mjesta Asn-X-Ser/Thr,

čijom promjenom prema dosadašnjim spoznajama nema utjecaja na katalitičku aktivnost enzima. No, nedostatak glikana utječe na biosintezu i stabilnost samog proteina te utječe na afinitet vezanja AChE prema određenim inhibitorima^{106,112}.

Određivanje kristalne strukture ljudske BChE bilo je otežano zbog velikog broja glikozilacijskih mjesta u BChE pa je kristalna struktura ljudske BChE određena 15-ak godina kasnije. Glikozilacija ima ulogu u smatanju, izlučivanju i stabilnosti BChE te promjena glikozilacijskih mjesta utječe na izlučivanje BChE u izvanstanični prostor i njegovu stabilnost. Smatra se da visoki stupanj glikozilacije omogućava BChE dugotrajnu stabilnost u plazmi, tj. u cirkulaciji krvi gdje je njezina aktivnost najizraženija.

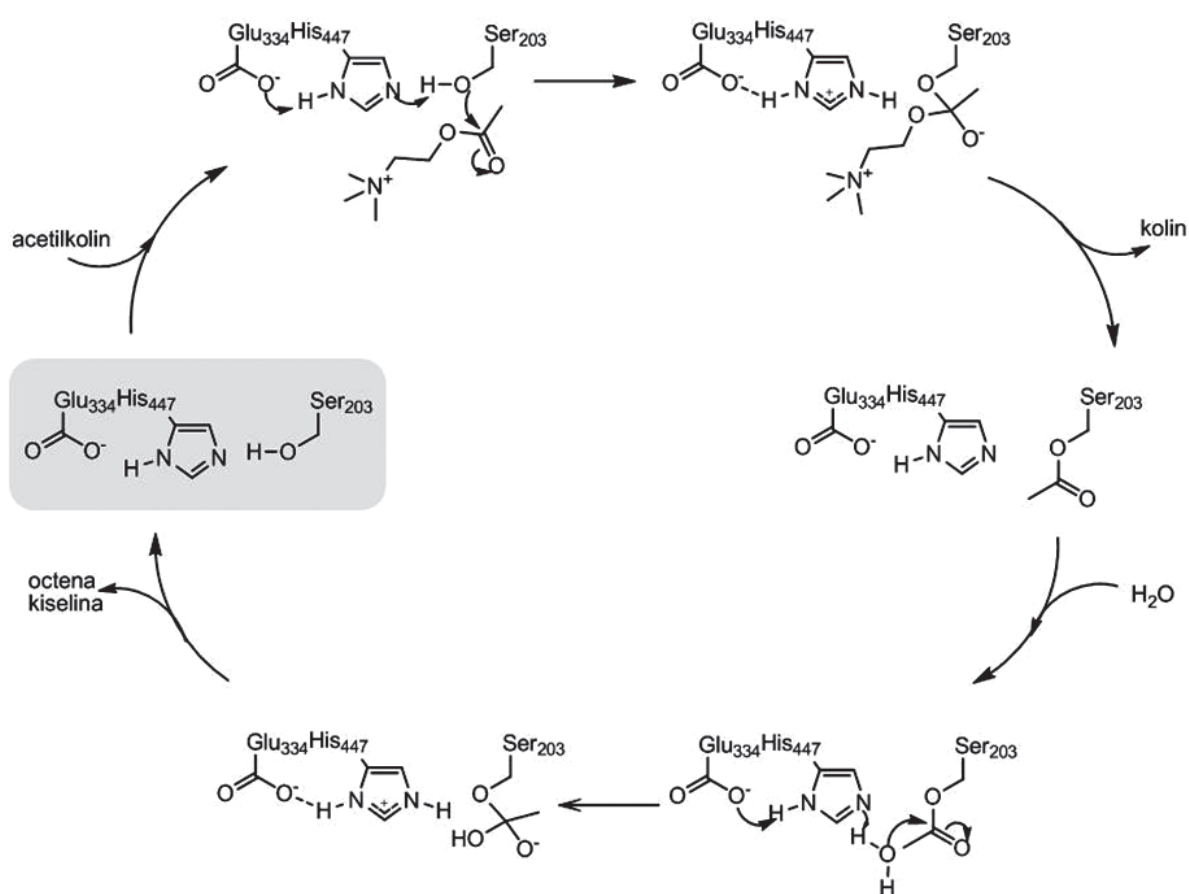
Aktivno mjesto AChE i BChE imaju oblik ždrijela koje je 20 Å duboko, a 5 Å široko¹¹³. Aktivno mjesto oba enzima čine četiri domene: katalitičko mjesto, kolinsko mjesto, acilni džep i periferno mjesto^{106,113}. Katalitičko mjesto koje direktno sudjeluje u katalizi, sastoji se od katalitičke trijade, Ser203, His447 i Glu334 (položaji u AChE) s oksianionskom šupljinom koja je simetrično smještena na dnu ždrijela aktivnog mjesta. Osim katalitičkog mjesta razlikuje se i kolinsko mjesto važno za stabilizaciju pozitivno nabijenog kvaternog dijela kolinskih supstrata¹⁰⁶. Periferno mjesto koje se nalazi bliže otvoru aktivnog mjesta važno je za alosterički mehanizam inhibicije AChE pri visokim koncentracijama acetilkolina. U perifernom mjestu BChE nalaze se alifatske aminokiseline koje stvaraju veći otvor u aktivno mjesto što smanjuje afinitet BChE prema specifičnim inhibitorima AChE poput propidija i fascikulina¹⁰⁶.

Unatoč visokoj strukturnoj homologiji između AChE i BChE volumen aktivnog mjesta ljudske BChE je veći oko 200 Å od volumena aktivnog mjesta ljudske AChE¹⁰⁶. Razlika je u vrsti aminokiselina koje tvore aktivno mjesto pojedinog enzima jer od 14 aromatskih aminokiselina koje tvore aktivno mjesto AChE, njih 6 na odgovarajućim mjestima su alifatske aminokiseline u aktivnom mjestu BChE, a preostalih 8 su aromatske aminokiseline. Upravo ova strukturna razlika smatra se odgovornom za različita kinetička svojstva opisanih enzima¹⁰⁶.

Daljnja istraživanja su usmjerena na istraživanje i pronalazak selektivnih inhibitora pojedinih kolinesteraza jer zbog već navedenih specifičnosti aktivnog mjesta pojedinih enzima njihova inhibicija istim spojem može se značajno razlikovati, a upravo selektivni inhibitori pojedinih kolinesteraza imaju ključnu ulogu u terapiji, dijagnostici bolesti i razvoju specifičnih lijekova¹⁰⁶.

2.3.2. *Mehanizam djelovanja kolinesteraza*

Unatoč razlikama u sastavu aminokiselina u pojedinim domenama aktivnog mjesta AChE i BChE mehanizam hidrolize supstrata je jednak^{106,107,114}. Hidroliza kolinskih supstrata kolinesterazama odvija se kroz tri koraka koji obuhvaćaju nastajanje Michaelis-Menten-ovog kompleksa, aciliranje enzima i njegovo deaciliranje vodom (**slika 2.2**). Procesi aciliranja i deaciliranja odvijaju se preko tetraedarskog prijelaznog stanja koje čine katalitički aktivni serin i supstrat. Reakcijski stupnjevi u hidrolizi uključuju stvaranje međuprodukta u kojem se acilna skupina supstrata prenosi na serinski ostatak enzima¹⁰⁶.



Slika 2.2. Reakcijski mehanizam hidrolize acetilkolina kataliziran kolinesterazama. Broj uz aminokiseline odnosi se na njihove položaje u ljudskoj AChE. Slika preuzeta iz ref.¹⁰⁶ i modificirana.

2.4. Inhibitori kolinesteraza

Inhibicijom acetilkolinesteraze (AChE) zaustavlja se hidroliza neurotransmitera acetilkolina (ACh), dolazi do akumuliranja ACh i nemogućnosti prijenosa živčanog impulsa u stanicama. Inhibitori acetilkolinesteraze dijele se na ireverzibilne (progresivne) i reverzibilne inhibitore. Reverzibilni inhibitori stvaraju nekovalentne interakcije s pobočnim lancima u aktivnom mjestu kolinesteraza, dok ireverzibilni inhibitori stvaraju konjugate na katalitičkom serinu. Zajedničko je inhibitorima kolinesteraza da njihova toksičnost ovisi o ruti izlaganja, organizmu i primijenjenoj dozi¹⁰⁷.

2.4.1. Reverzibilni inhibitori

Reverzibilni inhibitori inhibiraju kolinesteraze nekovalentnim interakcijama. Mnogi reverzibilni inhibitori prirodnog su podrijetla i izolirani su iz biljaka, kao npr. alkaloid (huperzin A) i flavonoid (galangin)¹⁰⁶. Ovi spojevi sadrže razne funkcionalne skupine kao što su tercijarne ili kvaterne amonijeve skupine te se koriste u dijagnostici ili medicinskom tretmanu različitih bolesti kao što je mijastenija gravis, Alzheimerova bolest (AD), post-operativni ileus, distenzija mjehura i glaukom¹⁰⁷.

Reverzibilni inhibitori vežu se ili u aktivno mjesto (takrin, huperzin A) ili na periferno mjesto (propidij, galantamin, fascikulin) ili istodobno na oba mjesta (dekametonij). Inhibicija kolinesteraza može biti posljedica: a) konformacijske promjene enzima uzrokovane vezanjem inhibitora, b) elektrostatskih interakcija pozitivno nabijenih inhibitora s kationskim dijelom supstrata tijekom katalitičke reakcije ili c) steričkih i/ili elektrostatskih smetnji ulasku supstrata u aktivni centar enzima¹⁰⁶. Zajedničko strukturno obilježje svih potentnih inhibitora kolinesteraza je prisutnost pozitivnog naboja i/ili aromatskih ili hidrofobnih supstituenata što olakšava ulazak i smještanje inhibitora u aktivno mjesto enzima. Dugački i tanki ligandi koji imaju dva aromatska prstena mogu se istodobno vezati u kolinsko i periferno mjesto enzima kao donepezil. Do uspostavljanja ravnoteže između asocijacije i disocijacije inhibitora i enzima kod reverzibilnih inhibitora s konstantama disocijacije manjima od 1 nmol dm^{-3} dolazi unutar nekoliko mikro- do milisekundi, a kod inhibitora s konstantama disocijacije većim od 1 nmol dm^{-3} , odnosno inhibitora visokog afiniteta ravnoteža se postiže polagano u rasponu vremena od minuta pa do i nekoliko dana^{106,107}.

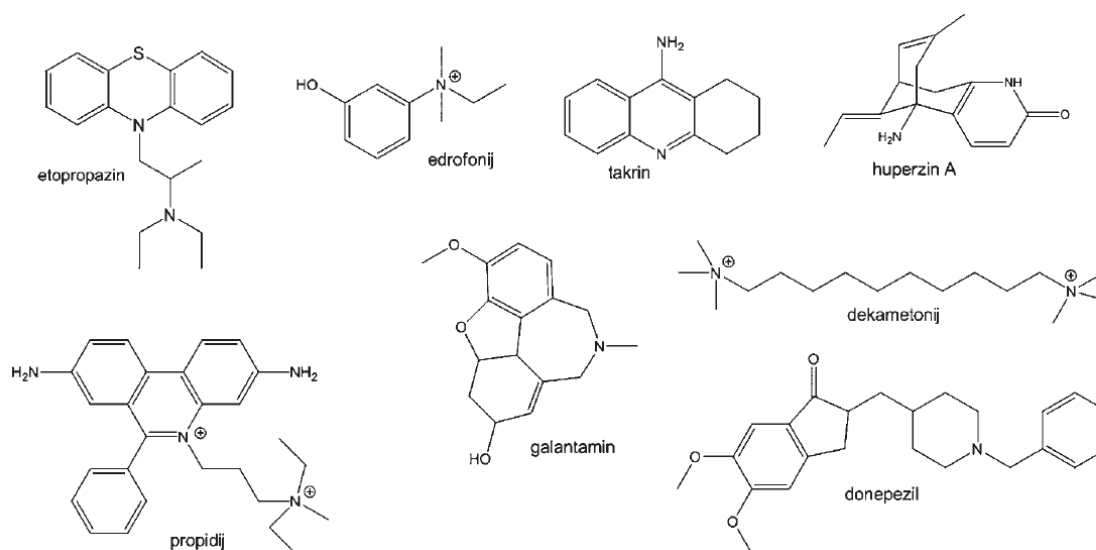
Reverzibilni inhibitori AChE (slika 2.3) dio su terapijskog pristupa djelujući na simptome bolesti kao što je pamćenje, razmišljanje, govor, rasuđivanje i druge misaone procese. Kolinesterazni inhibitori kao lijekovi inhibiraju AChE, održavaju razinu ACh te time uspijevaju povećati kolinergički prijenos živčanih impulsa u regijama prednjeg mozga i nadoknaditi gubitak funkcionalnih stanica mozga. Međutim, dosada nijedan lijek na tržištu nije uspio usporiti ili zaustaviti progresiju ove agresivne bolesti¹⁰⁷. Lijekovi koje je odobrila Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *U.S. Food and Drug Administration*, FDA) i Europska agencija za lijekove (engl. *European Medicines Agency*, EMA) za liječenje kognitivnih poremećaja uzorkovanih Alzheimerovom bolešću i poboljšanja kvalitete oboljelih su donepezil, rivastigmin i galantamin koji su ujedno i inhibitori acetilkolinesteraze^{107,115}. Takrin je prvi AChE inhibitor, 1993. godine odobren za upotrebu u terapiji Alzheimerove bolesti, ali uskoro povučen zbog brojnih nuspojava, od kojih je i pojava hepatotoksičnosti¹¹⁶.

Donepezil je selektivni, reverzibilni AChE inhibitor koji se veže na periferno anionsko mjesto enzima i djeluje ne samo na simptome bolesti već i usporava nastajanje amiloidnih nakupina u mozgu^{107,117}. Lijek lako prolazi kroz krvno-moždanu barijeru, biodostupan je, sporo se razgrađuje, a uzimanjem većih doza moguće je poboljšanje nekih kognitivnih funkcija. Međutim, donepezil izaziva gastrointestinalne probleme: mučninu, dijareju, anoreksiju, bolove u trbuhu i bradikardiju¹⁰⁷.

Galantamin je alkaloid visibabe *Galanthus woronowii* koji se koristi kod srednjeg stupnja razvoja bolesti. Ovaj spoj je selektivni, kompetitivni AChE inhibitor koji stvara interakciju sa anionskim mjestom i drugim aromatskim aminokiselinama aktivnog mjesta enzima kao i brojni drugi inhibitori kolinesteraza¹⁰⁷. Također, galantamin je alosterički ligand koji se veže na nikotinske kolinergičke receptore na mjestima različitim od onih gdje se vežu ACh i nikotinski agonisti čime pojačava aktivnost (osjetljivost) nikotinskih receptora na prisutnosti acetilkolina, povećava se broj funkcionalnih nikotinskih receptora i ublažavaju simptomi Alzheimerove bolesti^{107,119}. Galantamin se brzo i potpuno absorbira i oralno je potpuno biodostupan u organizmu¹⁰⁷. Nuspojave su gastrointestinalne prirode, slične kao i kod drugih lijekova koji su inhibitori AChE. S obzirom na alosteričke efekte prema nikotinskim kolinergičkim receptorima, galantamin djeluje i na druge, monoamine, glutamat, GABA (γ -aminobutanska kiselina) neurotransmisijske sustave. Ovaj mehanizam djelovanja galantamina može imati pozitivne učinke u poboljšanju kognitivnih funkcija kod oboljelih od Alzheimerove

bolesti i kod psihičkih bolesti kao što je šizofrenija, depresija, bipolarni poremećaj i ovisnosti o alkoholu^{107,120}.

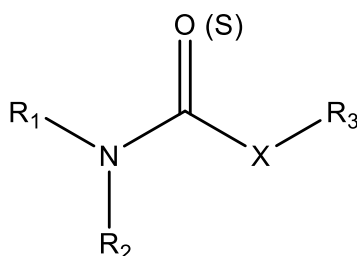
Osim navedenih, sintetizirani su i testirani AChE inhibitori, 7-metoksitakrin i huperzin A, koji je alkaloid dobiven iz biljke *Huperzia serrata*. Studije su pokazale manje toksične efekte 7-metoksitakrina, dok je huperzin A jači inhibitor AChE od rivastigmina, galantamina i takrina, ali slabiji od donepezila¹⁰⁷. Huperzin A pokazuje bolju penetraciju u krvno-moždanu barijeru, visoku oralnu biodostupnost i dulju inhibiciju AChE. Kliničke studije pokazale su poboljšanja u kognitivnim sposobnostima kod oboljelih od Alzheimerove bolesti, šizofrenije i poboljšanja memorije kod starijih osoba¹⁰⁷. Inhibitori na bazi kumarina i huperzin A imaju sposobnost simultanog vezanja na periferno i katalitičko mjesto AChE te je pokazano da time omogućuju jači inhibicijski potencijal pa su temelj za stvaranje novih i učinkovitijih lijekova za liječenje Alzheimerove bolesti i ostalih neuroloških bolesti. Simetrični bispiridinijevi i karbamatni anti-AChE spojevi su se pokazali kao dobri inhibitori AChE¹⁰⁷. Međutim unatoč relativno skromnoj i vremenski kratkotrajnoj učinkovitosti reverzibilnih AChE inhibitora u liječenju Alzheimerove bolesti ovi spojevi su i dalje glavni lijekovi u terapiji liječenja^{107,121}.



Slika 2.3. Kemijske strukture nekih od reverzibilnih inhibitora kolinesteraza. Slika preuzeta iz ref.¹⁰⁶

2.4.2. Progresivni inhibitori

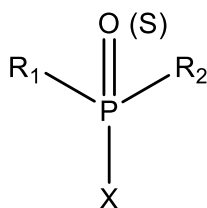
Progresivni inhibitori kolinesteraza su po svojoj kemijskoj strukturi karbamati odnosno organofosforni spojevi. Karbamati su organski spojevi nastali iz karbaminske kiseline (NH₂COOH). Struktura biološki aktivnih karbamata prikazana je na **slici 2.4** gdje X može biti kisik ili sumpor (tiokarbamati), R₁ i R₂ su najčešće organski ili alkilni supstituenti, ali na ta mjesta se mogu vezati i atomi vodika, a R₃ je najčešće neki organski supstituent, a ponekad i metal. Karbamati su progresivni inhibitori, ali radi brze dekarbamilacije često se u literaturi opisuju i kao reverzibilni AChE inhibitori koji se koriste u medicini za liječenje raznih bolesti (Alzheimerova bolest, mijastenija gravis, Parkinsonova bolest, glaukom i Levy body demencija)¹⁰⁷, ali nalaze primjenu i kao pesticidi i sredstva protiv parazita u veterini¹²².



Slika 2.4. Struktura biološki aktivnih karbamata

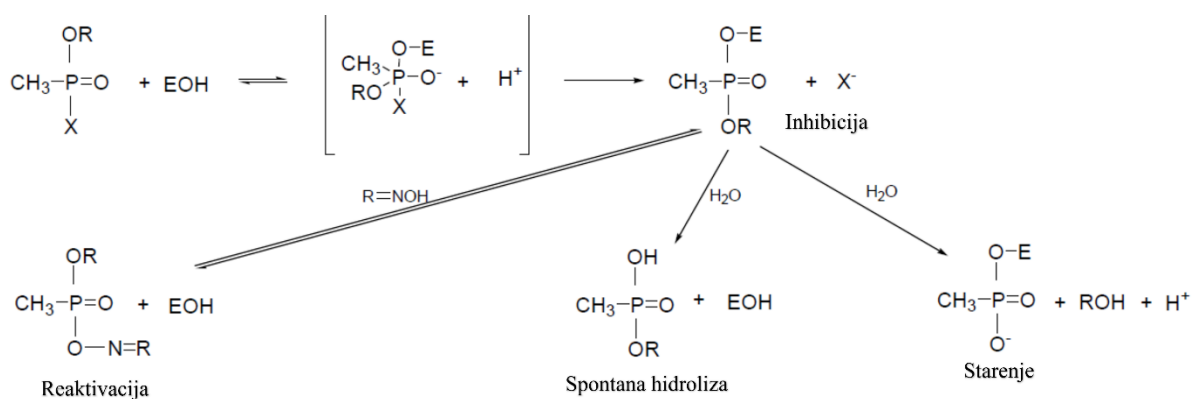
Rivastigmin je karbamat koji za razliku od donepezila inhibira i AChE i BChE, dobro se absorbira, biodostupan je i eliminira se urinom. Rani i kontinuirani unos rivastigmina smanjuje simptome Alzheimerove bolesti poboljšavajući neke kognitivne funkcije, memoriju i koncentraciju. Štetne nuspojave su slične kao i kod uzimanja drugih lijekova, moguća je mučnina, povraćanje, dijareja, anoreksija, glavobolja, sinkopa, bol u abdomenu i vrtoglavica¹⁰⁷. Rivastigmin se može koristiti i za liječenje Levy body demencije i Parkinsonove bolesti¹¹⁸.

Organofosforni spojevi, esteri ili tioli derivirani iz fosforne, fosfonske, fosfinske ili fosforoamidne kiseline (**slika 2.5**). R₁ i R₂ su aril- ili alkil- grupe koje se vežu na atom fosfora direktno (nastaju fosfinati) ili preko atoma kisika ili sumpora (nastaju fosfati ili fosfotioati). U strukturi fosfoamidata, R₁ ili R₂ je -NH₂ skupina, a atom vezan na fosfor dvostrukom vezom je kisik ili sumpor. Supstituent X kao izlazna skupina veže se na atom fosfora preko kisika ili sumpora i to mogu biti halogeni, alifatske, aromatske ili heterocikličke grupe.



Slika 2.5. Strukturna formula organofosfatnih spojeva

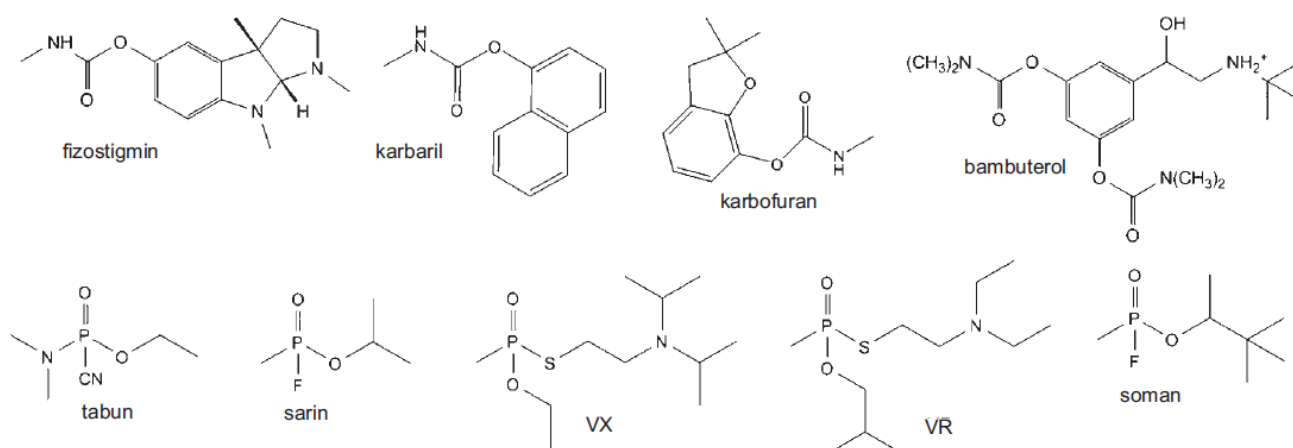
Karbamati i organofosforini spojevi inhibiraju AChE i izazivaju akutnu toksičnost i simptome prouzrokovane izlaganjem organizma. Organofosforini spojevi fosforiliraju serinski ostatak AChE stvarajući stabilniji konjugat nego karbamati jer defosforilacija je spora ($t_{1/2}$ su dani), za razliku od karbamata koji se može odvojiti od ostatka serina spontanom hidrolizom (vrijeme dekarbamilacije je 30-40 min)⁵⁰ pa se često karbamati smatraju pseudo-reverzibilnim inhibitorima AChE. Karbamati, za razliku od organofosfata ne mogu dealkilirati inhibirane esterase (starenje enzima) (slika 2.6), pa se koristi piridostigmin za profilaksu¹⁰⁷.

Slika 2.6. Mehanizam AChE inhibicije organofosforinim spojevima; reaktivacija, spontana hidroliza i starenje (engl. „aging“) fosforiliranog enzima. Slika preuzeta iz ref.¹⁰⁷ i prilagođena.

Karbamati koji u svojoj strukturi na mjestima R1 i R2 imaju metilnu skupinu, odnosno vodik pokazuju (slika 2.4) insekticidno djelovanje (npr. insekticid malation koji se koristi za kontrolu i uništavanje komaraca)¹⁰⁷. Također je zanimljiva spoznaja da stresni uvjeti mogu potaknuti prodor karbamata u središnji živčani sustav, a u normalnim uvjetima, kod zdravog čovjeka prolazak kroz krvno-moždanu barijeru je spriječen, preveniran¹²³. Karbamati koji se koriste kao

herbicidi su butilat, molinat, vernolat i iako se smatra da imaju nisku akutnu toksičnost prema ljudima, izazivaju ozbiljne iritacije očiju, kože, respiratornog trakta, kašljanje i kihanje^{107,122}. Fizostigmin, prirodni karbamatni alkaloid u biljci *Physostigma venenosum*, koristi se u liječenju mijastenije gravis. Fizostigmin inhibira AChE, povećava se akumulacija ACh u neurosinaptičkim šupljinama pojačavajući prijenos živčanih impulsa¹⁰⁷.

Progresivni inhibitori AChE (karbamati i organofosforni spojevi) (slika 2.7) nakon formiranja Michaelisovog tipa kompleksa s katalitičkim serinom (Ser203), kovalentno se veže na njega preko prijelaznog stanja koje se stabilizira vodikovim vezama s aminokiselinama u oksianionskoj šupljini. Prijelazno stanje koje nastaje kod vezanja progresivnih inhibitora analogno je onome kod hidrolize supstrata, ali reakcija dekarbamilacije odnosno posebice defosforilacije katalitičkog serina je puno sporija u usporedbi s reakcijom deacilacije¹⁰⁶.



Slika 2.7. Kemijske strukture nekih od progresivnih inhibitora kolinesteraza (karbamati i organofosforni spojevi). Slika preuzeta iz ref.¹⁰⁶

Glavni mehanizam toksičnosti organofosfornih spojeva je inhibicija AChE u sinapsama¹⁰⁷. Posljedica inhibicije enzima je akumulacija ACh u sinaptičkoj šupljini, stvaranje izrazito stabilnog konjugata (OP-Ser-Enzim) (slika 2.6) za čiju reaktivaciju je potreban oksimski spoj koji je jači nukleofil od vode, prekomjerna stimulacija muskarinskih i nikotinskih kolinergičkih receptora i zaustavljena neurotransmisija. Tipični simptomi akutnog otrovanja organofosfatima je uznemirenost, mišićna slabost i fascikulacija, mioze, prekomjerno slinjenje i znojenje. U

slučaju izloženosti većim koncentracijama otrovnih spojeva dolazi do pojave respiratnog kolapsa, nesvjestice, zbunjenosti, grčenja mišića i smrti^{106,107}.

Organofosforni spojevi izazivaju i kroničnu toksičnost izazivajući probleme s memorijom i koncentracijom, dezorijentacijom, depresijom, iritabilnošću, zbunjenosti, glavoboljom, problemima s govorom, nesanicom, noćnim morama, slabost organizma i zakašnjelim reakcijama¹⁰⁷. Kronična izloženost malim dozama izaziva različite neurološke bolesti i bolesti imunološkog sustava^{107,124}. Organofosforni spojevi mogu izazvati zakašnjele neurotoksične efekte na ljude i kokoši, nazvanu OP induciranu zakašnjele neuropatiju. Ovaj neurotoksični poremećaj vezan je uz fosforilaciju i daljnju dealkilaciju („starenje“, engl. „aging“) enzima u neuronima nazvanu neuropatsko ciljna esteraza što dovodi do nastanka sindroma. Simptomi zakašnjele neuropatije je paraliza i ataksija koji se javljaju između 14 i 24 dana nakon otrovanja organofosforinim spojevima¹²².

Produkti oksidacije i izomerizacije tioorganofosforinih spojeva ($P=S \rightarrow P=O$) pokazali su se kao puno potentniji inhibitori AChE u odnosu na početni tioorganofosforin spoj pa su se stoga malation i paration smatrali sigurnijim oblikom insekticida nego malaokson i paraokson s obzirom na inhibiciju AChE.

Živčani bojni otrovi (VX, sarin, tabun, novičok i dr.) smatraju se oružjem za masovno uništenje te su korišteni u ratovima i terorističkim napadima širom svijeta. Njihova proizvodnja, uporaba i širenje je zabranjeno Konvencijom o zabrani korištenja kemijskog oružja. Akutno otrovanje živčanim bojnim otrovima izaziva kontrakciju skeletnih i glatkih mišića, pretjerano slinjenje i nekontrolirano grčenje. Trovanje može dovesti do kome i smrti zbog zatajenja respiratornog sustava i kolapsa cjelokupnog organizma. U slučaju preživljavanja nakon izlaganja živčanim bojnim otrovima nastradali se susreću s kroničnim neurološkim tegobama što može dovesti i do dugotrajnih psihičkih poremećaja^{107,125}.

Mnoge studije zaključuju da akutna i kronična toksičnost organofosforinih spojeva remeti aktivnost antioksidacijskih enzima uzrokujući pojačanu lipidnu peroksidaciju u raznim organima, a da je mala korelacija između nastalog oštećenja organa i inhibicije AChE¹⁰⁷. Postoje dokazi da organofosforni spojevi djeluju na jetru, bubrege, mišiće, imunitet i hematološki sustav što ima za posljedicu pojavu raznih bolesti^{107,126}. Neki rezultati sugeriraju da je oksidacijski stres patološki mehanizam kod neuroloških poremećaja kao što su Alzheimerova bolest i Parkinsonova bolest¹⁰⁷. Oksidacijski stres izazvan djelovanjem organofosforinih spojeva dovodi do oksidacije lipida, DNA i proteina, oštećenja membrana,

inaktivacije enzima i smrt stanice^{107,127}. Neke studije govore o citogenetskom djelovanju organofosfata kroz kromosomske aberacije, pri čemu oštećenje DNA može izazvati mutagenost i kancerogenost u organizmu¹⁰⁷.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. *In silico* metode

3.1.1. Predviđanje toksičnosti herbicida pomoću programa ADMET Predictor™

Kako bi se provela *in silico* analiza toksičnosti herbicida prikupljeni su skupovi od 346 komercijalna i 163 napuštena herbicida. Skup od 346 herbicida prikupljen je iz dostupne internetske HRAC/WSSA baze podataka^{34,35}, a skup od 163 herbicida sakupljen je iz otvorenih internetskih baza podataka^{70,128-130} i literaturnih izvora^{36,131}. Prikupljeni skupovi su pročišćeni (uklonjeni su soli i duplikati), te su strukture herbicida prikazane u kanonskom SMILES formatu. Spojevi su klasificirani prema HRAC/WSSA klasifikaciji koja grupira herbicide prema mjestu i mehanizmu djelovanja herbicida u korovu (**slika 2.1**)³⁷.

In silico analiza toksičnosti herbicida napravljena je pomoću modela toksičnosti integriranih u programu ADMET Predictor™ verzija 9.0 (Simulations Plus Inc.). Toksičnost herbicida predviđena je kroz četiri skupine modela: modeli za reproduktivnu/razvojnu toksičnost i genotoksičnost, modeli za toksičnost kod glodavaca, modeli za toksičnost kod ljudi i modeli za ekotoksičnost¹⁰⁵. Modeli u programu ADMET Predictor™ su klasifikacijski ili kontinuirani modeli. Rezultati klasifikacijskih modela predviđaju toksične ili netoksične spojeve. Toksičnosti spojeva predviđene pomoću kontinuiranih/regresijskih modela analizirane su prelaskom na klase/kategorije preko postavljanja graničnih vrijednosti tj. raspona vrijednosti za (ne)toksičnost za svaki pojedini model. Za većinu kontinuiranih/regresijskih modela granične vrijednosti koje su omogućile klasifikaciju bile su dane u priručniku programa ADMET Predictor™ verzija 9.0¹⁰⁵. Za modele iz skupine ekotoksičnosti, za potrebe analize granične vrijednosti su definirane u okviru ovog istraživanja.

Analiza rezultata o potencijalnoj toksičnosti herbicida napravljena je u Excelu programu posebno za svaki testirani skup herbicida kao i upotrebom odgovarajućih R-paketa¹³².

3.1.2. Predviđanje fizikalno-kemijskih svojstava herbicida

Predviđene vrijednosti za fizikalno-kemijska svojstva herbicida upotrijebljena su za procjenu sposobnosti prolaska herbicida kroz krvno-moždanu barijeru i time izazivanja neurotoksičnih učinaka i simptoma kolinergičke krize u središnjem živčanom sustavu (SŽS). Fizikalno kemijska svojstva izračunata su za 346 komercijalna herbicida plus 163 herbicida napuštena u upotrebi te analizirana prema različitim mehanizmima djelovanja u korovima sukladno HRAC/WSSA klasifikaciji herbicida. Program ADMET Predictor™ verzija 9.0 korišten je za predviđanje sljedećih fizikalno-kemijskih svojstava herbicida: relativna molekulska masa (MW), topološka polarna površina molekule (TPSA), broj donora vodikovih veza (HBD), broj akceptora vodikovih veza (HBA), broj rotirajućih veza (RB), logaritam koeficijenta particije između *n*-oktanol i vode, tj. koeficijent lipofilnosti (logP), koeficijent distribucije pri pH 7,4 (log D), sposobnost prolaska kroz krvno-moždanu barijeru (BBB_Filter) i logaritam particije između mozga i krvi ($\log(C_{\text{mozak}}/C_{\text{krv}})$, označen kao logBB).

3.1.3. Odabir herbicida za in vitro analizu

Herbicidi su za *in vitro* istraživanje odabrani na temelju analize toksikološkog i fizikalno-kemijskog¹³³ profila 346 + 163 herbicida i usporedbe strukture 346 komercijalnih herbicida s poznatim inhibitorima kolinesteraza.

U svrhu analize strukturne sličnosti, prikupljen je skup od 68 poznatih inhibitora kolinesteraza (ChI) sa internetske baze podataka PubChem. Analiza strukturne sličnosti provedena je korištenjem prikaza herbicida i ChI u ECFP6 zapisu (engl. „*fingerprint*“) ¹³⁴. Uključeni su samo oni 2D deskriptori /strukturni motivi iz ECFP6 zapisa koji su bili prisutni u više od četiri spoja. Analiza strukturne sličnosti je provedena pomoću dvije multivarijatne statističke metode: analiza glavnih komponenata PCA (engl. *Principal component analysis*) i t-SNE (engl. *t-distributed stochastic neighbour embedding*). t-SNE analiza provedena je pomoću sljedećih vrijednosti parametara algoritma: *perplexity* 30, eta (stopa učenja) 300 i broj iteracija 5000. ECFP6 strukturni *fingerprint* i Jaccard-ov indeks (=1-Tanimoto koeficijent) kao strukturna mjera sličnosti, te statističke analize PCA i t-SNE izračunati su pomoću R-paketa *rdck*, *stats* (funkcija *prcomp*) i *Rtsne*.

Uz ChI kao kontrolni spojevi za predviđanje toksikoloških parametara upotrebljen je i skup lijekova sakupljen sa baza DrugBank¹³⁵ i ChEMBL¹³⁶. Za vizualizaciju/grafički prikaz sličnosti

odnosno različitosti toksikoloških profila herbicida iz različitih HRAC/WSSA klasa, ChI i lijekova upotrebljene su toplinske mape (engl. *heatmap*) izračunate pomoću R-paketa ggplot2. Računalna analiza napravljena je pomoću programa RStudio (R version 3.6.3)¹³².

Sveukupni *in silico* profil toksičnosti pojedinačnih klasa herbicida prikazan za oba skupa herbicida, predviđene vrijednosti fizikalno-kemijskih svojstava relevantnih za prolazak kroz biološke membrane, posebno prolaska kroz krvno-moždanu barijeru i sposobnosti za izazivanje neurotoksičnih i razvojnih oštećenja te uočena strukturna sličnost s poznatim kolinesteraznim inhibitorima ChI prvenstveno sličnost s AChE-inhibitorima korišteni su za odabir 11 herbicida za *in vitro* analizu.

3.2. Inhibicija kolinesteraza

3.2.1. *Herbicidi, kemikalije i enzimi*

Svi odabrani herbicidi: anilofos, benzulid, butamifos, desmedifam, fenmedifam, flufenacet, glifosat, oksadiazon, piperofos, tembotrion i terbutilazin analitički su vrednovani s deklaracijom čistoće od 98,3 % i 99,9 %, a kupljeni od Sigma Aldrich, SAD. Glifosat, tembotrion i terbutilazin ljubazno su ustupili dr. sc. Davor Želježić i dr. sc. Vilena Kašuba, Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb, Hrvatska. Izvorne otopine 10 odabranih herbicida (10^{-2} mol dm^{-3}) pripremljene su otapanjem u 100 % izopropanolu (*Kemika*, Zagreb) i čuvane pri 4 °C. Daljnja razrjeđenja pripremljena su otapanjem u 20 % izopropanolu neposredno prije pokusa za određivanja IC_{50} vrijednosti i metanolu za pokuse progresivne (ireverzibilne) inhibicije. Izvorna otopina glifosata pripremljena je otapanjem u destiliranoj vodi i čuvana pri 4 °C, a daljnja razrjeđenja pripremljena su otapanjem u destiliranoj vodi neposredno prije pokusa.

Acetiltiokolin jodid (ATCh), tiolni reagens, 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzojeva kiselina) (DTNB) i albumin goveđeg seruma (BSA) kupljeni su od Sigma-Aldrich, SAD. Izvorna otopina ATCh priređena je kao 1 mmol dm^{-3} otopina supstrata u destiliranoj vodi. Izvorna otopina DTNB priređena je kao 0,3 mmol dm^{-3} otopina u natrijevom fosfatnom puferu (0,1 mol dm^{-3} , pH = 7,4) koja je čuvana pri 4 °C. Natrijev fosfatni pufer (0,1 mol dm^{-3} , pH = 7,4) pripremljen je titracijom 0,1 mol dm^{-3} otopina soli Na_2HPO_4 i NaH_2PO_4 do pH 7,4 pri temperaturi 25 °C. Pritom je korišten pH-metar *SevenEasy pH s InLab® Expert Pro* elektrodom (Mettler-Toledo GmbH, Švicarska) baždaren standardnim otopinama pufera pH $4,01 \pm 0,02$, pH $7,00 \pm 0,02$ i pH $9,21 \pm 0,02$ (Mettler-Toledo GmbH, Švicarska).

Ljudsku rekombinantnu AChE i pročišćenu ljudsku BChE dobivenu iz plazme ljubazno je darovao dr. sc. Florian Nachon, *Département de Toxicologie et Risques Chimiques, Institut de Recherche Biomédicale des Armées*, Brétigny-sur-Orge, Francuska. Enzimi su čuvani pri 4 °C. Za potrebe pokusa, izvorna otopina AChE (1000 puta razrijeđena) pripravljena je u 1 % otopini albumin goveđeg seruma (BSA), a daljnja razrjeđenja pripremana su neposredno prije pokusa u 0,01 % otopini BSA u fosfatnom puferu. Izvorna otopina BChE (100 puta razrijeđena) pripravljena je u fosfatnom puferu, a daljnja razrjeđenja pripremana su neposredno prije pokusa u fosfatnom puferu.

3.2.2. Inhibicija kolinesteraza odabranim herbicidima

Aktivnost AChE i BChE mjerena je uz prisutnost herbicida u koncentracijskom rasponu od $0,1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ do 1mmol dm^{-3} . Reakcijska smjesa za određivanje IC_{50} vrijednosti herbicida inhibicijom AChE sadržavala je $0,3 \text{mmol dm}^{-3}$ DTNB pripremljen u fosfatnom puferu ($0,1 \text{mol dm}^{-3}$, $\text{pH} = 7,4$), $0,01 \%$ otopina BSA otopljen u fosfatnom puferu, enzim u finalnom razrjeđenju i herbicid željene koncentracije (otopljen u 20% izopropanolu). Reakcijska smjesa za određivanje IC_{50} vrijednosti herbicida inhibicijom BChE bila je istog sastava osim što ova smjesa nije sadržavala albumin. Nakon 30 minuta inkubacije preostala aktivnost enzima izmjerena je nakon dodatka ATCh koristeći metodu po Ellmanu¹³⁷ pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$ i 412 nm na CARY 300 spektrofotometru (Varian Inc., Australija) s termostatskim kućištem. Mjerenja porasti apsorbancije provedena su unutar dvije minute, a korištene su kivete s optičkim putem od 1 cm . Zbog slabe topljivosti u fosfatnom puferu, herbicidi otopljeni u izopropanolu testirani su do koncentracije od $100 \mu\text{mol dm}^{-3}$. Također, izopropanol je značajno inhibirao aktivnost enzima kada je bio više od 5% v/v. IC_{50} vrijednosti određene su iz najmanje tri provedena pokusa koristeći nelinearnu regresiju prikazom odnosa logaritamske vrijednosti koncentracije herbicida ($\log c / \text{nmol dm}^{-3}$) i $\%$ preostale aktivnosti enzima ($\%$ aktivnosti) u Prism 9 programu (GraphPad, San Diego, SAD).

Za progresivnu inhibiciju, AChE i BChE bili su inkubirani do 7 sati s organofosfatnim herbicidima anilofosom, benzulidom, butamifosom i piperofosom u koncentracijskom rasponu od $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ do $150 \mu\text{mol dm}^{-3}$ u smjesi s puferom i DTNB reagensom. Enzimska aktivnost mjerena je u različitim vremenima nakon dodatka ATCh koristeći Ellman-ovu metodu¹³⁷. Kontrolni uzorci sadržavali su otopinu izopropanola i metanola umjesto otopine herbicida. Metanol se pokazao kao bolje otapalo, manje potentan inhibitor enzima, posebno za AChE za razliku od izopropanola. U finalnoj inhibicijskoj smjesi, metanol je bio $8,5 - 9,9 \%$ v/v, a izopropanol $0,01 - 1,5 \%$ v/v. Konstante brzine inhibicije (k_{obs}) pri određenoj koncentraciji herbicida određene su linearnom regresijom prema studiji¹³⁸ ili pomoću jednadžbe raspada u dvije faze¹³⁹. Kod inhibicije BChE butamifosom procijenjene su konstanta inhibicije prvog reda (k_{max}), ravnotežna konstanta disocijacije kompleksa enzim-inhibitor (K_i) i ukupna konstanta inhibicije drugog reda (k_i) prema studiji¹⁴⁰ koristeći Prism 9 program (GraphPad, San Diego, SAD).

3.2.3. Molekulsko modeliranje interakcija kolinesteraza s herbicidima

Trodimenzionalne strukture herbicida za molekulske uklapanje određene su optimizacijom s MMFF94 poljem sila pomoću programa ChemBio3D Ultra12.0 (PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, SAD). Modul *Dock Ligands* (CDOCKER) programa Discovery Studio 20.1 (BioVia, San Diego, SAD) s CHARMM poljem sila korišten je za provođenje molekuskog uklapanja herbicida u aktivnom mjestu ljudskih AChE i BChE^{141,142}.

Molekulsko uklapanje provedeno je korištenjem kristalnih struktura ljudske AChE s PDB kodom 4PQE¹⁴³ i BChE s PDB kodom 2PM8¹⁴⁴. Vezno mjesto unutar AChE i BChE enzima definirano je kao najveća šupljina unutar strukture enzima okružena prostorom radijusa 13 Å te je korištena kao rigidni receptor¹⁴⁵. Detalji oko uklapanja liganda pomoću CDOCKER protokola i ocjene predviđenih položaja liganada unutar aktivnih mjesta (pomoću Charmm energije) opisani su u radovima^{145,146}.

3.3. Citotoksičnost

3.3.1. Stanične kulture

Za ispitivanje citotoksičnosti herbicida korištene su certificirane kulture: ljudske živčane stanice SH-SY5Y (ECACC 94030304; *European Collection of Authenticated Cell Cultures*, Vel. Britanija) i ljudske stanice jetre HepG2 (ECACC 85011430; *European Collection of Authenticated Cell Cultures*, Vel. Britanija). Sve stanice uzgajane su kao adherentne kulture pri kontroliranim uvjetima (5 % pCO₂ i temperaturi 37 °C) i u odgovarajućim medijima uz dodatak 1 % otopine antibiotika penicilin-streptomicina (Pen-Strep, Sigma-Aldrich, Njemačka).

SH-SY5Y stanična linija uzgajana je u *Dulbecco's Modified Eagle F12* mediju (DMEM F12, Sigma-Aldrich, Njemačka) uz dodatak 15 % (v/v) fetalnog goveđeg seruma (FBS) (Sigma-Aldrich, Njemačka), 2 mmol dm⁻³ glutamina (Sigma-Aldrich, Njemačka) i 1 % neesencijalnih aminokiselina (Sigma-Aldrich, Njemačka). HepG2 stanična linija uzgajana je u *Eagle's Minimum Essential* mediju s Earlovim solima i natrijevim bikarbonatom bez L-glutamina (EMEM, Sigma-Aldrich, Njemačka) uz dodatak 2 mmol dm⁻³ glutamina, 10 % (v/v) FBS (Sigma-Aldrich, Njemačka) i 1 % neesencijalnih aminokiselina.

Stanice su uzgajane u posudama za uzgoj, a za odvajanje stanica od podloge korištena je otopina tripsina i EDTA (Sigma-Aldrich, Njemačka), nakon čega su stanice re-suspendirane u odgovarajućem mediju (uz prisustvo FBS-a) i nasađene u odgovarajućem broju na pločice za provedbu pokusa.

3.3.2. Korištene kemikalije

Za pripremu pufera korištene su sljedeće kemikalije: bromfenol plavo (Sigma-Aldrich, Njemačka), dinatrijev hidrogenfosfat (Na₂HPO₄, Kemika, Zagreb), dinatrijeva sol etilendiamintetraoctene kiseline-dihidrat (EDTA, Sigma Aldrich, Njemačka), fenilmetansulfonil-fluorid (PMSF, Sigma Aldrich, Njemačka), kalcijev klorid (CaCl₂, Kemika, Zagreb), kalijev dihidrogenfosfat (KH₂PO₄, Kemika, Zagreb), kalijev klorid (KCl, Kemika, Zagreb), natrijev klorid (NaCl, Kemika, Zagreb) i magnezijev klorid (MgCl₂, Kemika, Zagreb).

Izopropanol (99,9 % v/v) (CH₃)₂CHOH, Sigma Aldrich, Njemačka) korišten je za pripremu otopina herbicida.

Staurosporin (otopina 1 mmol dm⁻³ u DMSO SS, *Abcam*, Vel. Britanija) korišten je kao kontrolni spoj poznatog djelovanja pri testiranju citotoksičnosti. Izvorna otopina koncentracije 1 mmol dm⁻³ u DMSO čuvana je na 4 °C.

Otopina boje tripan plavo (0,4 % (v/v), *Sigma Aldrich*, Njemačka) korištena je za određivanje broja živih i broja mrtvih stanica.

Za određivanje učinaka testiranih spojeva na razini stanica korišten je komercijalno dostupan kit: *CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay Kit* (MTS test, *Promega*, SAD) za određivanje vijabilnosti stanica, tj. citotoksičnosti spoja.

U pokusima sa stanicama korišten je fosfatni pufer (PBS, pH 7,4) koji je pripremljen kao deset puta veća koncentrirana otopina otapanjem 80,1 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na₂HPO₄ i 2,7 g KH₂PO₄ u 800 mL deionizirane vode, pH je podešen na 7,4 otopinom HCl (1 mol dm⁻³) te nadopunjeno do 1 L. Pufer je autoklaviran i čuvan u sterilnim uvjetima do korištenja. Prije korištenja pripremljena je otopina PBS razrjeđenjem sterilnom deioniziranom vodom. Za određivanje pH vrijednosti pufera, korišten je pH-metar *SevenEasy pH s InLab® 413* elektrodom (*Mettler-Toledo GmbH*, Švicarska).

3.3.3. *Određivanje broja stanica u uzorku za daljnju analizu toksičnosti*

Broj živih/mrtvih stanica u uzorku određen je pomoću diferencijalnog bojanja tripan plavim. Naime, ova boja ne ulazi u žive stanice zbog negativnog naboja membrane, već samo u stanice s oštećenom membranom (mrtve stanice) gdje boji jezgru ili citoplazmu¹⁴⁷. Diferencijalno bojanje je provedeno prema protokolu proizvođača uređaja za brojanje stanica TC20™. U mikroepreveti je pomiješano 20 µL nerazrijeđene suspenzije stanica (dobivene nakon odvajanja stanica od podloge) i 20 µL otopine tripan plavo. Potom, otpipetirano je 10 µL smjese u komoricu pločice za brojanje (*Cell Counting Slides*, *BioRad*, SAD) i postavljeno u uređaj. Uređaj automatski broji stanice i rezultat prikazuje kao ukupan broj stanica po mililitru, kao i postotak živih stanica u uzorku.

3.3.4. *Određivanje citotoksičnosti herbicida praćenjem promjene vijabilnosti stanica*

Citotoksični profil testiranih herbicida određen je mjerenjem aktivnosti sukcinat-dehidrogenaze, mitohondijskog enzima kod stanica izloženih herbicidima¹⁴⁸. Vijabilnost stanica izloženih odabranim herbicidima praćena je MTS testom. MTS (ili Owenov reagens) je

tetrazolijeva sol žute boje koja se u određenim uvjetima pod djelovanjem staničnih enzima reducira u obojani formazanski produkt (smeđe-ljubičaste boje) topljiv u mediju. Sam proces je potaknut redukcijom/oksidacijom NADPH i/ili NADH enzimima dehidrogenazama u metabolički aktivnim stanicama. Porast koncentracije formazanskog produkta, proporcionalan broju metabolički aktivnih stanica, praćen je spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 490 nm na čitaču mikrotitarskih pločica. Od dobivenih vrijednosti izračunat je postotak inhibicije vijabilnosti stanica izloženih testiranim herbicidima u odnosu na netretirane kontrolne stanice. Iz nelinearne ovisnosti postotka inhibicije u odnosu na koncentraciju herbicida određena je koncentracija pri kojoj je 50 % stanica živih, odnosno, koncentracija testiranog herbicida koja inhibira rast 50 % stanica, IC_{50} (engl. *inhibitory concentration*). IC_{50} vrijednost je procijenjena pomoću Prism 9 programa (GraphPad, San Diego, SAD) analizom podataka o apsorbanciji dobivenih iz najmanje dva eksperimenta (duplikati ili triplikati). Izopropanol u koncentraciji 1 % (v/v) kao otapalo za ispitivane herbicide u pokusu nije uzrokovalo promjenu vijabilnosti.

Ispitana je toksičnost herbicida tijekom izloženosti stanica HepG2 u trajanju od 1, 4, 24 i 48 sati i stanica SH-SY5Y u trajanju od 24 i 48 sati. Odabrani herbicidi testirani su u rasponu koncentracija od 0,01 - 100 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ zbog ograničene topljivosti u izopropanolu.

Za provedbu eksperimenta nasadeno je 20 000 stanica po jažici na mikrotitarske pločice s 96 jažica, dan prije eksperimenta. Sljedeći dan nakon aspiracije staničnog medija, u jažice su dodane otopine herbicida u staničnom mediju u odabranom rasponu koncentracija (0,01-100 $\mu\text{mol dm}^{-3}$) ukupnog volumena 120 μL po jažici. Spojevi su testirani u serijskom razrjeđenju po 5 koncentracija. Stanice su zatim inkubirane tijekom 24 sata pri kontroliranim uvjetima (5 % $p\text{CO}_2$ i temperaturi 37 °C). Nakon inkubacije, stanice su isprane PBS puferom kako bi se uklonili testirani spojevi te je dodano 100 μL čistog medija i 20 μL MTS reagensa te su vraćene u inkubator. Nakon 1 sata do 4 sata inkubacije očitana je apsorbancija pri 490 nm.

TC20™ Automated Cell Counter (BioRad, SAD) korišten je za određivanje broja živih i mrtvih stanica u uzorku.

Za određivanje pH vrijednosti pufera, korišten je pH-metar SevenEasy pH s InLab® 413 elektrodom (Mettler-Toledo GmbH, Švicarska).

3.3.5. Određivanje markera oksidacijskog stresa

Indukcija stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) herbicidima određena je posredno korištenjem specifične boje 2',7'-diklorofluorescein-diacetat (DCFDA, Sigma Aldrich, Njemačka) koja se prilikom prolaska (pasivno) kroz membrane deacetilira staničnim esterazama u nefluorescentni 2',7'-diklorofluorescein (H₂DCF). H₂DCF se oksidira u prisutnosti reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) u DCF čiji se fluorescentni signal određuje pri valnim duljinama eksitacije od 495 nm i emisije od 529 nm i proporcionalan je koncentraciji ROS-ova u stanici. Nakon inkubacije stanica s herbicidima, stanice su isprane PBS puferom kako bi se uklonili testirani spojevi te je u svaku jažicu dodano 100 µL DCFDA boje finalne koncentracije 50 µmol dm⁻³ te je nakon 30 minuta izmjeren porast fluorescencije pomoću čitača mikrotitarskih pločica. Vodikov peroksid (H₂O₂, Sigma-Aldrich, Njemačka), finalne koncentracije 100 µmol dm⁻³ korišten je kao pozitivna kontrola. Rezultat je prikazan kao omjer izmjerenih vrijednosti tretiranih u odnosu na netretirane stanice.

Kvantifikacija prisutnog glutationa (GSH) je određena posredno korištenjem specifične boje monoklorobimana (MCB, Sigma-Aldrich, Njemačka). Monoklorobiman pasivno ulazi u stanicu gdje formira adukt glutation–monoklorobiman (GSH – MCB) pomoću enzima glutation S transferaze. GSH-MCB specifična membranska pumpa uz utrošak energije izbacuje adukt van iz stanice u stanični medij te se prisutnost istog određuje na osnovi njegovog fluorescentnog signala pri valnim duljinama eksitacije od 355 nm i emisije od 460 nm na čitaču mikrotitarskih pločica. Signal je proporcionalan koncentraciji utrošenog GSH u stanici. Nakon inkubacije, stanice su isprane PBS puferom kako bi se uklonili testirani spojevi te je u svaku jažicu dodano 100 µL monoklorobimana finalne koncentracije 40 µmol dm⁻³ te je nakon 40 minuta izmjeren porast fluorescencije pomoću čitača za mikrotitarske pločice. *Tert*-butilvodikov peroksid (tBOOH, Sigma-Aldrich, Njemačka), finalne koncentracije 100 µmol dm⁻³ je korišten kao pozitivna kontrola. Rezultat je prikazan kao omjer izmjerenih vrijednosti tretiranih u odnosu na netretirane stanice.

Fluorescencijska mjerenja provedena su na čitaču mikrotitarskih pločica Infinite M200PRO (Tecan Group Ltd., Švicarska).

Provedena su dva nezavisna eksperimenta u duplikatu, koristeći program Prism 9 (GraphPad, San Diego, SAD). Rezultat je prikazan kao omjer uzorka u odnosu na netretirane stanice.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. *In silico* analiza toksičnosti herbicida

4.1.1. Procjena toksičnosti prikupljenih skupova herbicida

Kvalitativni toksični profil herbicida određen je odvojeno za 346 komercijalnih herbicida i 163 herbicida koji nisu više službeno u upotrebi (**tablice 4.1 i 4.2**). *In silico* analiza toksičnosti herbicida napravljena je na temelju vrijednosti parametara izračunatih pomoću modela toksičnosti u programu ADMET Predictor™. Toksičnost herbicida predviđena je kroz četiri skupine modela: modeli za reproduktivnu/razvojnu toksičnost i genotoksičnost, modeli za toksičnost kod glodavaca, modeli za toksičnost kod ljudi i modeli za ekotoksičnost (**tablice 4.1 i 4.2**).

Herbicidi su spojevi slični lijekovima. Herbicidi imaju slična fizikalno-kemijska kao i lijekovi i strukturno su im slični¹⁴⁹⁻¹⁵⁰. Stoga su modeli koji su općenito izgrađeni za kemijske spojeve slične lijekovima primjenjivi za predviđanje svojstava i aktivnosti herbicida. Analogno, u ovom istraživanju predviđanja dobivena na herbicidima uspoređena su s predviđanjima na lijekovima i ChI kao kontrolnim spojevima. Kako bi se dobila pouzdanija procjena toksikološke aktivnosti, kombinirano je više parametara za procjenu toksičnog djelovanja. Kako ECHA preporuča upotrebu klasifikacijskih modela u slučaju kada se mjereni parametar može tako promatrati/izraziti¹⁰¹, u ovom radu su korištene klase/kategorije za analizu predviđenih vrijednosti toksičnosti klasa/kategorija (tablice 4.1 - 4.3).

Tablica 4.1. Klasifikacijski modeli toksičnosti dostupni u programu ADMET Predictor™. Uz naziv modela i vrstu ispitivanog organizma na kojem je izgrađen model opisana je i krajnja točka modeliranja.

KLASIFIKACIJSKI MODELI		
MODEL	VRSTA ORGANIZMA	KRAJNJA TOČKA MODELIRANJA
MODELI TOKSIČNOSTI KOD LJUDI		
Reproduktivna toksičnost (<i>Repro_Tox</i>)	Kulture stanica sisavaca (čovjek i životinje)	pitanje: može li spoj izazvati reproduktivnu toksičnost? Kriterij: <i>Toksičan (DA)</i> ili <i>netoksičan (NE)</i>
Hepatotoksičnost (<i>HEP_Tox</i>)	Čovjek	pitanje: može li spoj izazvati hepatotoksičnost? <i>Kriterij: Hepatotoksičnost</i> - povišene vrijednosti triju serumskih enzima: <i>Ser_ALT, Ser_AST, Ser_LDH</i> <i>Jako hepatotoksično djelovanje:</i> - povišene vrijednosti pet serumskih enzima: <i>Ser_ALT, Ser_AST, Ser_LDH, Ser_GGT, Ser_AlkPhos</i>
Kromosomske aberacije (<i>Chrom_Aberr</i>)	Kulture stanica sisavaca (čovjek i životinje)	pitanje: može li spoj izazvati kromosomske aberacije? Kriterij: <i>Toksičan (DA)</i> ili <i>netoksičan (NE)</i>
Mutagenost (<i>MUT_Risk</i>)	Štakor	pitanje: koliki je rizik od pojave mutagenosti? Kriterij: <i>MUT_Risk</i> $\geq 1,5$ za potencijalno mutagen spoj Model za procjenu rizika od pojave mutagenosti sastoji se od 10 <i>in silico Ames test</i> modela na 5 sojeva bakterije <i>Salmonella typhimurium</i> . Svaki od tih <i>in silico</i> modela vrijedi 0,5 boda, a za postojanje potencijalnog rizika od pojave mutagenosti ukupan zbroj bodova individualnih modela mora biti veći od 1,5
Kardiotoksičnost (<i>hERG_Filter</i>)	Čovjek	pitanje: može li spoj izazvati kardiotoksičnost blokadom aktivnosti <i>hERG K+</i> kanala? Kriterij: <i>hERG- blokatore (DA)</i> ili <i>hERG- blokatore (NE)</i>
Maksimalna preporučena terapijska doza (<i>Max_RTD</i>)	Čovjek	pitanje: koja je minimalna preporučena terapijska doza lijeka dnevno (mg/kg-bw/dan) koja neće izazvati negativne nuspojave u organizmu? Kriterij: <i>Max_RTD</i> $> 3,16$ mg/kg/bw/dan Doza lijeka mora biti veća od 3,16 mg/kg/bw/dan
Fosfolipidoza (<i>PLipidosis</i>)	Čovjek	pitanje: može li spoj izazvati fosfolipidozu? Kriterij: <i>Toksičan (DA)</i> ili <i>netoksičan (NE)</i>
MODELI TOKSIČNOSTI KOD GLODAVACA		
Osjetljivost kože (<i>Sens_Skin</i>)	Miš	pitanje: može li spoj izazvati osjetljivost kože? Kriterij: <i>Senzibilizator (DA)</i> ili <i>ne-senzibilizator (NE)</i> Kožni alergeni koji izazivaju reakciju na lokalnom limfnom čvoru
Respiratorna osjetljivost (<i>Sens_Resp</i>)	Štakor	pitanje: može li spoj izazvati osjetljivost respiratornog sustava? Kriterij: <i>Senzibilizator (DA)</i> ili <i>ne-senzibilizator (NE)</i> Respiratorni alergeni koji izazivaju reakciju
EKOTOKSIČNOST		
Biorazgradivost (<i>Biodegradn</i>)		pitanje: da li je spoj lako biorazgradiv? Kriterij: <i>Biorazgradiv (DA)</i> ili <i>nije biorazgradiv (NE)</i> Uvjeti: spoj je lako biorazgradiv u uvjetima relativne biološke potrebe za kisikom $BOD \geq 60$ %
<i>Andro_Filter</i> (<i>Andro_Filter</i>)	Štakor	pitanje: da li spoj ima afinitet za vezanje na androgenski receptor? Kriterij: <i>Toksičan (DA)</i> ili <i>netoksičan (NE)</i>
<i>Estro_Filter</i> (<i>Estro_Filter</i>)	Štakor	pitanje: da li spoj ima afiniteta za vezanje na estrogenski receptor? Kriterij: <i>Toksičan (DA)</i> ili <i>netoksičan (NE)</i>

Tablica 4.2. Kontinuirani/regresijski modeli toksičnosti u programu ADMET Predictor™. Uz naziv modela i vrstu ispitivanog organizma na kojem je izgrađen model prikazana je krajnja točka modeliranja i te granične vrijednosti za toksičnost dostupne u priručniku za program ADMET Predictor™ koje su upotrijebljene za definiranje klasa.

KONTINUIRANI MODELI			
MODEL	VRSTA ORGANIZMA	KRAJNJA TOČKA MODELIRANJA	GRANIČNE VRIJEDNOSTI („donja meka“/ „gornja meka“ granica) ^a
MODEL TOKSIČNOST KOD LJUDI			
Kardiotoksičnost (<i>hERG_pIC50</i>)	Čovjek	pIC ₅₀ (mol/L)	hERG_pIC ₅₀ > [5.5, 6]
MODELI TOKSIČNOSTI KOD GLODAVACA			
Akutna toksičnost (<i>Rat_Acute</i>)	Štakor	LD ₅₀ (mg/kg)	LD ₅₀ < [200, 320]
Kronična toksičnost (kancerogenost) (<i>Rat_TD50</i>)	Štakor	TD ₅₀ (mg/kg/dan)	TD ₅₀ < [4, 6.5]
Kronična toksičnost (kancerogenost) (<i>Mouse_TD50</i>)	Miš	TD ₅₀ (mg/kg/dan)	TD ₅₀ < [20, 35]
EKOTOKSIČNOST			
Biokoncentracijski faktor (BCF) (<i>Bioconcn</i>)	Ribe		Tablica 4.3
Akutna toksičnost kod algi (<i>Tyr_pyriiformis</i>)	Alga- <i>Tetrahymena</i> <i>Pyriiformis</i> <i>protozoa</i>	pIGC ₅₀ (mmol/L)	Tablica 4.3
Toksičnost kod vodenbuhe (<i>Daphnia magna</i>)	Rak- <i>Water Fleas</i> (<i>Daphnia Magna</i>)	LC ₅₀ (mg/L)	Tablica 4.3
Toksičnost kod slatkovodne ribe (<i>Fathead minnow</i>)	Riba - <i>Fathead minnow</i>	LC ₅₀ (mg/L)	Tablica 4.3

^a U uglatim zagradama su dani tzv. meki rasponi pragova/graničnih vrijednosti tako da približno 85% spojeva u skupu podataka za treniranje ih u potpunosti zadovoljava, a oko 10% ih potpuno krši¹⁰⁵. Donja “meka” granična vrijednost korištena je kao najniža vrijednost za definiranje toksičnosti herbicida. Krajnja točka modeliranja za svaki model je prikazana kao vrijednost specifičnog parametra toksičnosti: hERG_pIC₅₀ (mol/L) – negativna logaritamska vrijednost koncentracije ispitivanog spoja koja je potrebna za inhibiciju 50 % aktivnosti hERG K⁺ kanala, odnosno mjera afiniteta spoja za blokiranje hERG K⁺ kanala i potencijala za izazivanja kardiotoksičnosti; LD₅₀ (mg/kg) – vrijednost doze toksikanta koja je potrebna da se ubije 50 % izložene populacije štakora; TD₅₀ (mg/kg/dan) – vrijednost doze spoja koja će uzrokovati toksične efekte na 50% izložene populacije štakora odnosno miša dnevno.

Granične vrijednosti za neke kontinuirane modele dane su u priručniku programa ADMET Predictor™ (**tablica 4.2**)¹⁰⁵, dok su za parametre ekotoksičnosti kontinuirani rezultati prevedeni u klase u okviru ovog istraživanja (**tablica 4.3**). U tu svrhu za kontinuirane modele iz skupine ekotoksičnosti definirane su granične vrijednosti tj. rasponi vrijednosti kojima je omogućeno klasificiranje u umjerenu i jaku toksičnost (**tablica 4.3**). Granične vrijednosti za pojedine klase određene su korištenjem grafičkih prikaza uspješnosti predviđanja modela za svaki pojedini model, koji su dani u priručniku programa ADMET Predictor™ verzija 9.0.

Tablica 4.3. Granične vrijednosti za stupnjeve parametara ekotoksičnosti definirane u ovom radu za klasifikacijski prikaz rezultata.

Model za ekotoksičnost	Stupnjevi toksičnosti		
	3-visoka toksičnost	2-umjerena toksičnost	1- niska toksičnost
Biokonzentracijski faktor (BCF) (<i>Bioconcn</i>)	$BCF \geq 25$	$10 \leq BCF < 25$	$BCF < 10$
<i>Daphnia magna</i> pLC ₅₀	$pLC_{50} \geq 7$	$6 \leq pLC_{50} < 7$	$pLC_{50} < 6$
<i>Fathead minnow</i> pLC ₅₀	$pLC_{50} \geq 7$	$6 \leq pLC_{50} < 7$	$pLC_{50} < 6$
<i>Tetrahymena pyriformis</i> pIGC ₅₀	$pIGC_{50} \geq 2$	$1 \leq pLC_{50} < 2$	$pIGC_{50} < 1$

Ekotoksičnost je prikazana kroz vrijednosti parametara toksičnosti koje su vrednovane kroz stupnjeve/razine toksičnosti. Parametri za ekotoksičnost su sljedeći: BCF (biokonzentracijski faktor) koji govori koji je ravnotežni omjer kemijske koncentracija toksikanta u vodenom organizmu i u vodenom okolišu; pLC₅₀ (mg/L)- negativna logaritamska vrijednost koncentracije ispitivanog spoja koja je potrebna da se ubije 50 % populacije organizma *Daphnia magna* nakon 48 sati izlaganja odnosno *Fathead minnow* nakon 96 sati izlaganja; pIGC₅₀ (mmol/L) - negativna logaritamska vrijednost koncentracije ispitivanog spoja koja će uzrokovati inhibiciju 50 % rasta organizma *Tetrahymena pyriformis*.

Stupnjevi toksičnosti označeni su kao 1- niska toksičnost, oznaka 2- umjerena toksičnost i oznaka 3-visoka toksičnost spoja. Prikaz rezultata u obliku klasa omogućio je prikladnu grafičku vizualizaciju (toplinske mape, **slika 4.1** za komercijalne herbicide i **slika 4.2** za napuštene herbicide) i time lakšu interpretaciju rezultata toksičnosti herbicida.

4.1.1.1. Toksikološki profil komercijalnih herbicida

Toksikološki profil herbicida određen je upotrebom ADMET Predictor™ modela prikazanih u tablicama 4.1 i 4.2 uz upotrebu graničnih vrijednosti za klasifikaciju rezultata kontinuiranih/regresijskih modela (tablice 4.2 i 4.3) kao što je prethodno objašnjeno. Postotak toksičnih spojeva za svaki toksikološki parametar analiziran je s obzirom na način djelovanja na korov tj. HRAC/WSSA klase (tablica 4.4). Na toplinskoj mapi (slika 4.1) prikazan je postotak toksičnih spojeva po HRAC klasama za odabrane parametre uključujući i antiestrogenski i antiandrogenski učinak. Toksikološki profil herbicida je uspoređen s profilima izračunatim na analogan način za kontrolne grupe - ChI i lijekove.

Tablica 4.4. Parametri toksičnosti predviđeni za 346 komercijalna herbicida klasificiranih prema HRAC klasifikaciji. Za svaku HRAC klasu herbicida prikazan je udio toksičnih spojeva (%) za svaku vrstu toksičnosti.

Modeli	Reproduktivna/razvojna toksičnost i genotoksičnost (%)			Toksičnost kod ljudi (%)			
	Reproduktivna/razvojna toksičnost (Repro_Tox)	Kromosomske aberacije (Chrom_Aberr)	Mutagenost (MUT_Risk)	Kardiotoksičnost (hERG_Filter)	Hepatotoksičnost (HEP_Tox)	Maksimalna preporučena terapijska doza (Max_RTD)	Fosfolipidoza
HRAC (2020) klase ^a							
A (1) [21]	19,1	33,3	9,52	38,1	0	42,9	4,76
B (2) [57]	52,6	0	1,75	0	1,75	45,6	1,75
C1 (5) [42]	64,3	28,6	7,14	2,38	23,8	2,38	0
C2 (5) [29]	65,5	20,7	20,7	10,3	44,8	3,45	17,2
C3 (6) [5]	60,0	60,0	40,0	0	60,0	0	0
D (22) [4]	0	75,0	25,0	100	0	25,0	100
E (14) [28]	39,3	35,7	17,9	21,4	39,3	82,1	17,9
F1 (12) [7]	57,1	0	0	42,9	28,6	100	14,3
F2 (27) [14]	50,0	28,6	14,3	0	7,14	57,1	7,14
K1 (3) [18]	66,7	22,2	50,0	0	0	55,6	0
K2 (23) [6]	83,3	0	0	16,7	33,3	16,7	0
K3 (15) [29]	58,6	58,6	10,3	6,9	24,1	24,1	6,90
L (29) [6]	16,7	16,7	0	0	33,3	50,0	16,7
M (24) [6]	0	100	100	0	66,7	0	0
N (15) [18]	66,7	11,1	11,1	0	50,0	0	0
O (4) [24]	4,17	62,5	0	4,2	37,5	20,8	0
Z (0) [19]	68,4	5,26	5,26	52,6	10,5	15,8	21,1

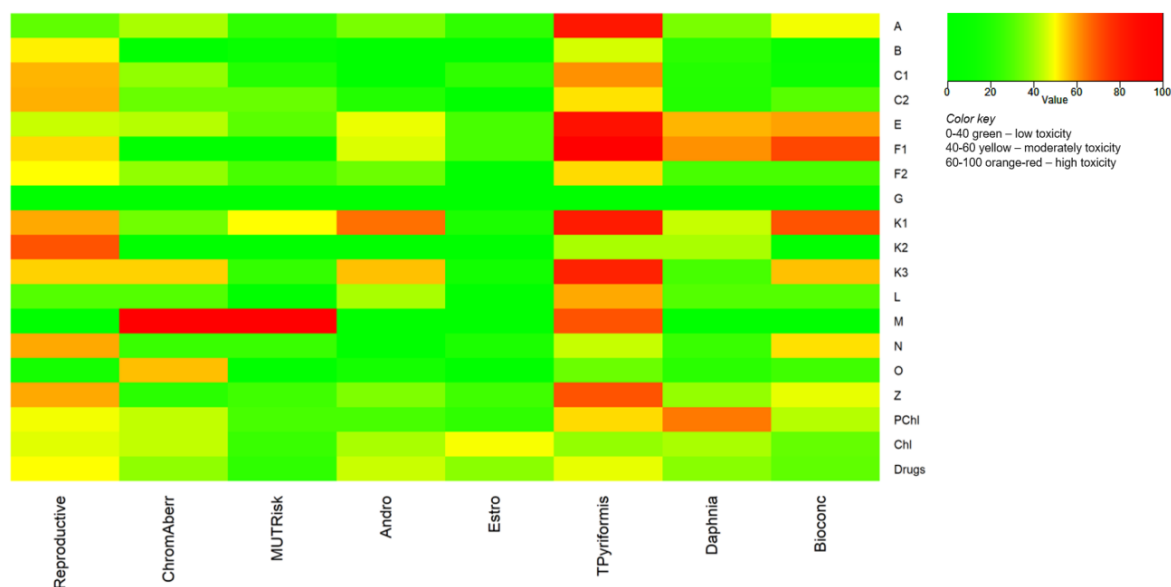
Modeli	Toksičnost kod štakora (%)		Toksičnost kod glodavaca (%)				
	Androgenski receptor (Andro_Filter)	Estrogenski receptor (Estro_Filter)	Osjetljivost kože (Sens_Skin)	Osjetljivost respiratornog sustava (Sens_Resp)	Akutna toksičnost (štakor) (Rat_Acute)	Kronična toksičnost (štakor) (Rat_TD ₅₀)	Kronična toksičnost (miš) (Mouse_TD ₅₀)
HRAC (2020) klase ^a							
A (1) [21]	23,8	9,52	61,9	47,6	4,76	4,76	4,76
B (2) [57]	0	0	42,1	49,1	0	1,75	15,8
C1 (5) [42]	0	9,52	73,8	78,6	4,76	2,38	59,5
C2 (5) [29]	6,89	0	75,9	96,6	6,90	31,0	13,8

C3 (6) [5]	20,0	20,0	60,0	40,0	20,0	0	20,0
D (22) [4]	0	100	100	100	75,0	0	0
E (14) [28]	46,4	14,3	85,7	60,7	7,14	3,57	28,6
F1 (12) [7]	42,9	14,3	71,4	85,7	14,3	28,6	14,3
F2 (27) [14]	21,4	0	21,4	78,6	50,0	0	35,7
K1 (3) [18]	77,8	5,56	83,3	22,2	16,7	0	5,56
K2 (23) [6]	0	0	0	100	0	16,7	0
K3 (15) [29]	62,1	3,45	58,6	48,3	20,7	13,8	20,7
L (29) [6]	33,3	0	50,0	83,3	0	50,0	33,3
M (24) [6]	0	0	100	0	100	0	0
N (15) [18]	0	5,56	77,8	44,4	5,55	0	33,3
O (4) [24]	4,17	0	33,3	50	0	0	0
Z (0) [19]	21,1	10,5	52,6	52,6	5,26	5,26	5,26

Ekotoksičnost (%)

Modeli	Biorazgradnja	Biokonzentracijski faktor (Bioconcn)			Toksičnost kod račića, vodenbuhe, <i>pDaphnia_magna</i>			Toksičnost kod ribe, <i>pMinnow_fathead</i>			Toksičnost kod alge, <i>Tpyrifomis_pIGC₅₀</i>			
		ukupno	3	2	1	ukupno	2	1	ukupno	2	1	ukupno	2	1
HRAC														
klase ^a														
A (1) [21]	0	100	47,6	28,6	23,8	23,8	9,52	14,3	57,1	19,0	38,1	95,2	23,8	71,4
B (2) [57]	0	59,6	1,75	3,51	54,4	8,77	0	8,77	1,75	0	1,75	42,1	8,77	33,3
C1 (5) [42]	0	97,6	2,38	9,52	85,7	7,14	0	7,14	2,38	0	2,38	71,4	0,0	71,4
C2 (5) [29]	0	100	17,2	34,5	48,3	6,90	3,45	3,45	6,90	0	6,90	55,1	10,3	44,8
C3 (6) [5]	0	100	20,0	80,0	0	20,0	20,0	0	40,0	20,0	20,0	80,0	40,0	40,0
D (22) [4]	0	75,0	0	25,0	50,0	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100	0,0	100
E (14) [28]	0	100	67,9	10,7	21,4	64,3	25,0	39,3	32,1	3,57	28,6	96,4	60,7	35,7
F1 (12) [7]	0	100	85,7	14,3	0	71,4	57,1	14,3	0,0	0,0	0,0	100	71,4	28,6
F2 (27) [14]	0	100	14,3	28,6	57,1	14,3	0	14,3	21,4	7,14	14,3	57,1	21,4	35,7
K1 (3) [18]	0	100	83,3	11,1	5,56	38,9	11,1	27,8	0	0	0	94,4	61,1	33,3
K2 (23) [6]	33,3	100	0	66,7	33,3	33,3	0	33,3	0	0	0	33,3	0	33,3
K3 (15) [29]	0	100	62,1	20,7	17,2	13,8	0	13,8	10,3	0	10,3	93,1	20,7	72,4
L (29) [6]	0	100	16,7	50,0	33,3	16,7	0	16,6	0	0	0	66,7	50,0	16,7
M (24) [6]	0	100	0	50,0	50,0	0	0	0	0	0	0	83,3	0	83,3
N (15) [18]	27,8	100	55,6	16,7	27,8	11,1	0	11,1	0	0	0	38,9	0	38,9
O (4) [24]	0	100	12,5	20,8	66,7	8,33	0	8,33	0	0	0	20,8	4,17	16,7
Z (0) [19]	10,5	94,7	36,8	42,1	15,8	42,1	0	42,1	10,5	0	10,5	84,2	26,3	57,9

^aSlova označavaju HRAC2020 klasifikacijski sustav, brojevi u zagradama HRAC2022 klasifikaciju herbicida gdje je N klasa spojena sa K3 klasom, a brojevi u uglatim zagradama označavaju broj spojeva u pojedinoj HRAC klasi. U tablici nisu prikazani rezultati analize za klase s dva ili manje spojeva (F3 [1], F4 [1], G [1], H [2], I [1], P [2]). Stupac ukupno – označava postotak (%) svih potencijalno toksičnih spojeva za svaku pojedinu klasu, a ostatak postotka do 100% su spojevi za koje nije predviđeno toksično djelovanje. Brojevi označavaju stupanj/kategoriju toksičnosti, 3-visoka, 2-umjerena i 1-niska toksičnost u slučaju 3 klase. Vrijednosti u stupcima 3, 2 i 1 prikazuju postotak (%) potencijalno toksičnih spojeva za svaki stupanj toksičnosti.



Slika 4.1. Toplinska karta parametara toksičnosti za 346 komercijalna herbicida s prikazom udjela predviđenih toksičnih spojeva unutar svake pojedine HRAC klase herbicida. Herbicidi su grupirani u klase (Y-os) prema mehanizmu djelovanja na korov, a na X-osi su predviđene toksičnosti kod ljudi: reproduktivna/razvojna toksičnost (*Reproductive*), kromosomske aberacije (*Chrom_Aberr*), mutagenost (*Ames test*) (*MUT_Risk*), afinitet za vezanje na androgenski receptor štakora (*Andro*), afinitet za vezanje na estrogenski receptor štakora (*Estro*), neurotoksičnost (*Tetrahymena pyriformis* inhibicija rasta *Tpyrifomis*) i biokonzentracijski faktor (*Bioconc*). Legenda prikazuje stupanj toksičnosti od slabe do visoke toksičnosti prezentiran kroz spektar boja (zeleno – žuta – crvena) s obzirom na broj tj. % toksičnih spojeva u danoj skupini na Y-osi.

Za većinu komercijalnih herbicida predviđen je slab potencijal za genotoksičnost kako kroz nastanak kromosomskih aberacija (*Chrom_Aberr*) tako i izazivanje mutagenih promjena (*MUTRisk*) (**slika 4.1**). Prema ADMET Predictor™ klasifikacijskim modelima za predviđanje vezanja spoja na receptore hormona estrogena (*Estro_Filter*) i androgena (*Andro_Filter*) štakora, za većinu komercijalnih herbicida je predviđena nikakva ili slaba aktivnost endokrinog disruptora vezivanjem na receptor estrogena. Međutim za klase herbicida K1 i K3 predviđena je moguća antiandrogena endokrina aktivnost (**slika 4.1** i **tablica 4.4**).

In silico analiza pokazala je visoki potencijal za izazivanje reproduktivne/razvojne toksičnosti (*Repro_Tox*) i toksičnost inibicijom 50 % rasta organizma *Tetrahymena pyriformis* (*Tpyrifomis_pIGC₅₀*) posebno za herbicide koji djeluju na sljedeće biološke procese u korovu: inhibicija sinteze masnih kiselina–klase A i K3, inhibicija sinteze hema (za klorofil) –klasa E, inhibicija sinteze karotenoida–klasa F1 i inhibicija formiranja mikrotubula–klasa K1, te za herbicide s raznim ili nepoznatim mehanizmom djelovanja–klasa Z. Također, za većinu komercijalnih herbicida predviđen je rizik za izazivanje osjetljivosti kože i respiratorne osjetljivosti na temelju modela izgrađenih na podacima sakupljenih kod glodavaca (miša i štakora). U toksikološko profiliranje uključen je i parametar bioakumulacije koji ukazuje na moguće učinke nagomilavanja ispitivane kemikalije. Bioakumulacija se definira kao omjer

kemijske koncentracije spoja u organizmu (ribe) i koncentracije u okolišu (vodenom okolišu) te služi kao parametar za procjenu unosa spoja u organizam i za predviđanje njegove akumulacije i izazivanja kronične toksičnosti u organizmu. Posebno jaka bioakumulacija (Biokoncentracijski faktor > 25) predviđena je za herbicide klase F1 (85,7 %), K1 (83,3 %), E (67,9 %) i K3 (62,1 %).

4.1.1.2. Toksikološki profil napuštenih herbicida

In silico analiza 163 herbicida koji se više ne upotrebljavaju u ratarstvu (tablica 4.5) pokazala je sličan toksikološki profil kao i za komercijalne herbicide. (slika 4.2).

Tablica 4.5. Parametri toksičnosti predviđeni za 163 napuštena herbicida klasificirana prema HRAC klasifikaciji. Za svaku HRAC klasu herbicida predviđene toksičnosti izražene su kao udio toksičnih spojeva (%) u svakoj pojedinoj klasi.

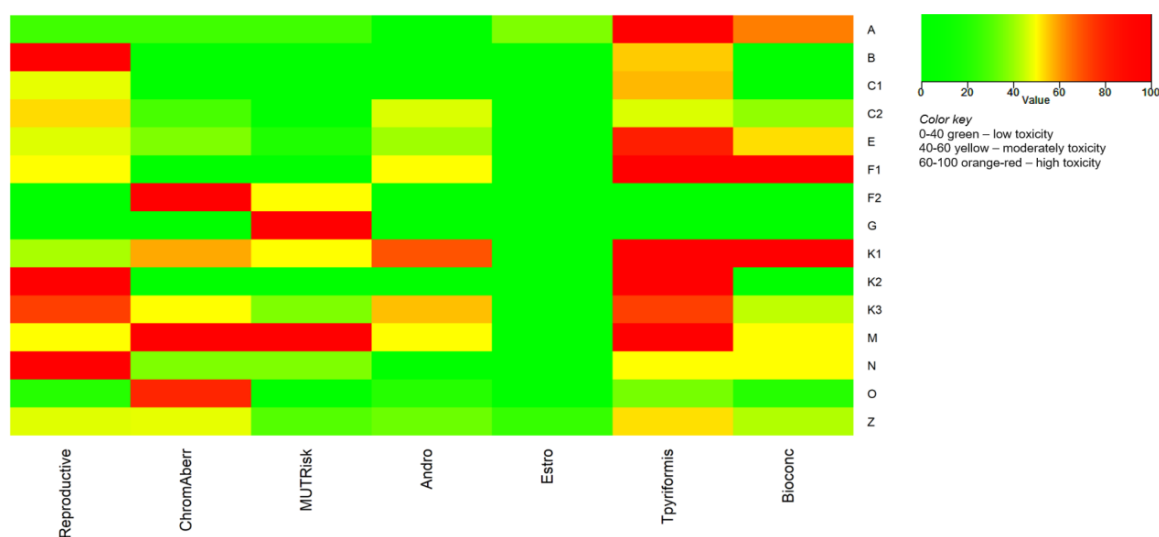
Reproduktivna/razvojna toksičnost i genotoksičnost (%)				Toksičnost kod ljudi (%)			
Modeli	Reproduktivna/razvojna toksičnost (Repro_Tox)	Kromosomske aberacije (Chrom_Aberr)	Mutagenost (MUT_Risk)	Kardiotoksično (hERG_Filter)	Hepatotoksičnost (HEP_Tox)	Maksimalna preporučena terapijska doza (Max_RTD)	Fosfolipidoza
HRAC2020 klase ^a							
A (1) [8]	12,5	12,5	12,5	75,0	0	50,0	0
B (2) [5]	100	0	0	0	0	20,0	0
C1 (5) [11]	45,5	0	0	9,09	18,2	0	0
C2 (5) [7]	57,1	14,3	0	14,3	14,3	0	14,3
C3 (6) [4]	50,0	75,0	25,0	0	50,0	50,0	0
E (14) [16]	43,8	25,0	6,25	18,8	50,0	81,3	25,0
K1 (3) [6]	33,3	66,7	50,0	0	0	16,7	0
K2 (23) [3]	100	0	0	0	66,7	0	0
K3 (15) [8]	87,5	50,0	25,0	12,5	12,5	0	0
N (15) [4]	100	25,0	25,0	0	50,0	0	0
O (4) [13]	7,70	92,3	0	0	46,2	0	0
Z (0) [66]	43,9	45,5	16,7	7,58	36,4	21,2	6,06

Toksičnost kod štakora (%)			Toksičnost kod glodavaca (%)				
Modeli	Androgenski receptor (Andro_Filter)	Estrogenski receptor (Estro_Filter)	Osjetljivost kože (Sens_Skin)	Osjetljivost respiratornog sustava (Sens_Resp)	Akutna toksičnost (štakor) (Rat_Acute)	Kronična toksičnost (štakor) (Rat_TD ₅₀)	Kronična toksičnost (miš) (Mouse_TD ₅₀)
HRAC2020 klase ^a							
A (1) [8]	0	25,0	75,0	25,0	25,0	25,0	0
B (2) [5]	0	0	20,0	60,0	0	0	0
C1 (5) [11]	0	0	72,7	72,7	0	0	72,7
C2 (5) [7]	42,9	0	57,1	85,7	0	42,9	14,3
C3 (6) [4]	0	25,0	50,0	100	0	0	25,0
E (14) [16]	31,3	0	81,3	56,3	25,0	6,25	18,8
K1 (3) [6]	83,3	0	100	16,7	50,0	0	0
K2 (23) [3]	0	0	0	100	0	0	0
K3 (15) [8]	62,5	0	50,0	25,0	12,5	12,5	12,5
N (15) [4]	0	0	75,0	25,0	0	0	25,0

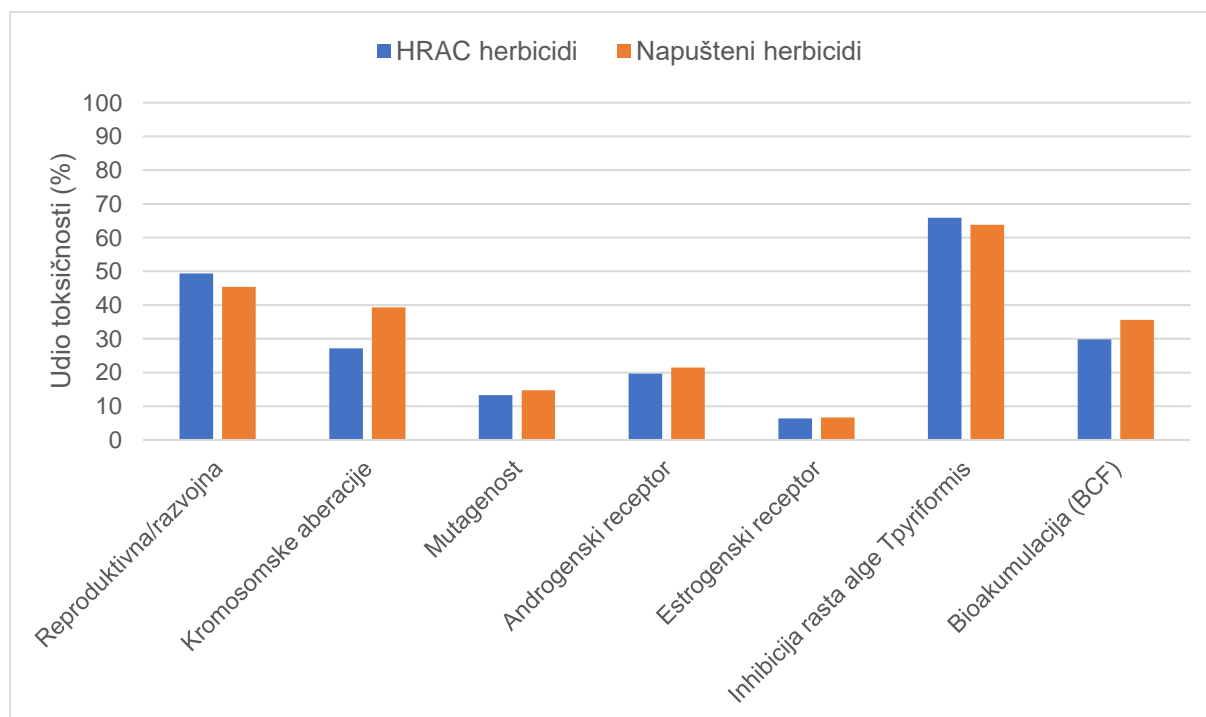
O (4) [13]	7,69	0	0	38,5	0	0	0
Z (0) [66]	21,2	10,6	51,5	66,7	22,7	12,1	7,58

Modeli	Biorazgradnja	Ekotoksičnost (%)												
		Biokonzentracijski faktor (Bioconcn)			Toksičnost kod račića, vodenbuhe, <i>pDaphnia magna</i>			Toksičnost kod ribe, <i>pMinnow fathead</i>			Toksičnost kod alge, <i>Tpyrifomis_pIGC₅₀</i>			
		ukupno	3	2	1	ukupno	2	1	ukupno	2	1	ukupno	2	1
HRAC klase ^a														
A (1) [8]	12,5	100	75,0	25,0	0	37,5	12,5	25,0	25,0	0	25,0	100	25,0	75,0
B (2) [5]	0	60,0	0	0	60,0	40,0	0	40,0	20,0	0	20,0	60,0	20,0	40,0
C1 (5) [11]	0	100	0	9,10	90,9	9,10	0	9,10	0	0	0	63,6	9,10	54,5
C2 (5) [7]	0	100	28,6	42,9	28,6	14,3	0	14,3	0	0	0	42,9	0	42,9
C3 (6) [4]	25,0	100	50,0	25,0	25,0	0	0	0	25,0	0	25,0	100	50,0	50,0
E (14) [16]	0	100	56,3	31,3	12,5	62,5	6,25	56,25	12,5	0	12,5	93,8	56,3	37,5
K1 (3) [6]	0	100	100	0	0	33,3	33,3	0	0	0	0	100	50,0	50,0
K2 (23) [3]	0	100	0	100	0	0	0	0	0	0	0	100	0	100
K3 (15) [8]	0	100	37,5	37,5	25,0	0	0	0	0	0	0	87,5	12,5	75,0
N (15) [4]	25,0	100	50,0	25,0	25,0	0	0	0	0	0	0	50,0	0	50,0
O (4) [13]	7,69	100	7,70	38,5	53,8	7,69	7,69	0	0	0	0	23,1	0	23,1
Z (0) [66]	9,10	95,5	34,8	19,7	40,9	19,7	7,57	12,1	6,10	4,5	1,52	56,1	13,6	42,4

^aSlova označavaju HRAC2020 klasifikacijski sustav, brojevi u zagradama HRAC2022 klasifikaciju herbicida, a brojevi u uglatim zagradama broj spojeva u pojedinoj HRAC klasi. U tablici nisu prikazani rezultati analize za klase s dva ili manje spojeva (D [1], F1 [2], F2 [2], F3 [0], F4 [0], G [1], H [2], I [2], L [0], M [2], P [0]). Stupac ukupno – označava postotak (%) svih potencijalno toksičnih spojeva za svaku pojedinu klasu, a ostatak postotka do 100% su spojevi za koje nije predviđeno toksično djelovanje. Brojevi označavaju stupanj/kategoriju toksičnosti, 3-visoka, 2-umjerena i 1-niska toksičnost u slučaju 3 klase. Vrijednosti u stupcima 3, 2 i 1 prikazuju postotak (%) potencijalno toksičnih spojeva za svaki stupanj toksičnosti.



Slika 4.2. Toplinska karta parametara toksičnosti za 163 napuštena herbicida s prikazom udjela predviđenih toksičnih spojeva unutar svake pojedine HRAC klase herbicida. Herbicidi su grupirani u klase (Y-os) prema mehanizmu djelovanja na korov, a na X-osi su predviđene toksičnosti kod ljudi: reproduktivna/razvojna toksičnost (*Reproductive*), kromosomske aberacije (*Chrom_Aber*), mutagenost (*Ames test*) (*MUT_Risk*), afinitet za vezanje na androgenski receptor štakora (*Andro*), afinitet za vezanje na estrogenski receptor štakora (*Estro*), neurotoksičnost (*Tetrahymana pyrifomis* inhibicija rasta *Tpyrifomis*) i biokonzentracijski faktor (*Bioconc*). Legenda prikazuje stupanj toksičnosti od slabe do visoke toksičnosti prezentiran kroz spektar boja (zeleno – žuto – crveno).



Slika 4.3. Usporedba parametara toksičnosti za 346 komercijalna herbicida i 163 napuštena herbicida.

Napušteni herbicidi pokazali su statistički značajniji potencijal za pojavu kromosomskih aberacija i za bioakumulacijom u odnosu na komercijalne herbicide (**slika 4.3**).

Sveukupna *in silico* analiza pokazala je veliki potencijal herbicida za razvoj reproduktivne/razvojne toksičnosti i inhibicije rasta *Tetrahymena pyriformis* organizma. Za svaku klasu herbicida predviđena je najmanje jedna vrsta toksičnosti, a klase s više vrsta potencijalnih toksičnosti su klase K1, K3, M, F1, E i C1 (**tablice 4.4 i 4.5**).

4.1.2. Analiza fizikalno-kemijskih svojstava prikupljenih skupova herbicida

Za 346 komercijalna herbicida i 163 napuštena herbicida provedena je *in silico* analiza fizikalno-kemijskih svojstava važnih za procjenu sposobnosti prolaska spoja kroz krvno-moždanu barijeru i veću mogućnost izazivanja neurotoksičnosti¹³³ (tablica 4.6 i tablica 4.7).

Tablica 4.6. Fizikalno-kemijska svojstva^a važna za prolazak kroz biološke membrane, posebno KMB i potencijalnu neurotoksičnost izračunata za 346 komercijalna herbicida klasificirana prema različitim mehanizmima djelovanja na korove (prema ref.¹³¹). Granične vrijednosti parametara prikazane su u zadnjem redu tablice (prema ref.¹³³). MW, TPSA, logP, logD i logBB parametri prikazani su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. HBD/HBA i RB parametri prikazani su kao medijan vrijednost.

HRAC klase ^b	MW	TPSA / Å ²	HBD	HBA	RB	logP	logD	BBB_ Filter/ %	logBB
A (1) [21]	353 ± 44	65,8 ± 9,3	1	5	6	3,67 ± 0,71	2,27 ± 1,53	62	-0,60 ± 0,38
B (2) [57]	403 ± 64	136 ± 30	1	10	7	1,70 ± 0,79	-0,55 ± 1,33	30	-0,97 ± 0,32
C1 (5) [42]	242 ± 29	68,6 ± 13,2	2	5	5	2,56 ± 0,91	2,41 ± 1,29	57	0,14 ± 0,40
C2 (5) [29]	247 ± 47	43,7 ± 16,0	1	4	4	2,64 ± 0,90	2,64 ± 0,90	100	0,15 ± 0,35
C3 (6) [5]	346 ± 88	67,3 ± 36,2	1	4	1	3,52 ± 1,74	2,20 ± 2,49	80	-0,12 ± 0,68
D (22) [4]	252 ± 144	21,6 ± 30,2	0	0	0	-4,80 ± 1,92	-4,80 ± 1,92	75	-1,19 ± 0,22
E (14) [28]	366 ± 56	74,7 ± 22,3	0	5	3	3,60 ± 1,00	2,92 ± 1,66	86	0,10 ± 0,69
F1 (12) [7]	344 ± 33	38,3 ± 12,9	1	3	3	3,91 ± 0,79	3,92 ± 0,79	100	0,51 ± 0,19
F2 (27) [14]	405 ± 47	91,0 ± 22,5	0	5.5	3	2,45 ± 1,39	1,65 ± 1,94	79	-0,68 ± 0,73
K1 (3) [18]	331 ± 36	89,5 ± 33,5	0.5	5	6	4,10 ± 0,73	3,85 ± 1,46	100	0,66 ± 0,30
K2 (23) [6]	222 ± 26	43,2 ± 11,9	1	3	4.5	2,78 ± 0,69	2,78 ± 0,69	100	0,31 ± 0,20
K3 (15) [29]	306 ± 55	39,0 ± 19,1	0	3	6	3,22 ± 0,96	3,10 ± 1,25	97	0,11 ± 0,37
L (29) [6]	301 ± 103	61,5 ± 28,7	1	5	4	3,38 ± 0,78	3,38 ± 0,78	67	-0,21 ± 0,46
M (24) [6]	238 ± 21	113 ± 4	1	5	1.5	3,16 ± 0,74	0,64 ± 1,13	100	-0,05 ± 0,12
N (15) [18]	232 ± 61	29,7 ± 15,4	0	2	6	3,10 ± 0,96	2,61 ± 2,00	100	0,05 ± 0,59
O (4) [24]	243 ± 41	56,8 ± 16,8	1	3	2.5	2,55 ± 0,88	-0,04 ± 1,12	58	-0,58 ± 0,32
Z (0) [19]	277 ± 63	42,2 ± 21,5	1	3	5	3,12 ± 1,58	2,51 ± 2,02	100	0,01 ± 0,50
Granične vrijednosti	< 450	< 60-70	< 3	< 7	< 8	< 5	< 5		> 0

^aRelativna molekulska masa (MW), topološka polarna površina molekule (TPSA), broj donora vodikovih veza (HBD), broj akceptora vodikovih veza (HBA), broj rotirajućih veza (RB), koeficijent lipofilnosti (n-oktanol/voda) (logP), koeficijent distribucije pri pH 7,4 (log D), % spojeva u pojedinoj HRAC klasi za koje je predviđena sposobnost prolaska kroz krvno-moždanu barijeru (BBB_Filter), i log (C_{mozak}/C_{krv}) (logBB). ^bSlova označavaju HRAC2020 klasifikacijski sustav, brojevi u zagradama HRAC2022 klasifikaciju herbicida gdje je N klasa spojena s K3 klasom, a brojevi u uglatim zagradama broj spojeva u pojedinoj HRAC klasi. U tablici nisu prikazani rezultati analize za klase s dva ili manje spojeva, ali njihovi rezultati ne utječu na rezultat ukupne analize.

Tablica 4.7. Fizikalno-kemijska svojstva^a važna za prolazak kroz biološke membrane i potencijalnu neurotoksičnost procijenjena *in silico* analizom za 163 napuštena herbicida klasificirana prema različitim mehanizmima djelovanja na korove (prema ref.¹³¹). Granične vrijednosti parametara prikazane su u zadnjem redu tablice (prema ref.¹³³).

HRAC klase ^b	MW	TPSA / Å ²	HBD	HBA	RB	log P	log D	BBB_Filter/ %	logBB
A (1) [8]	356 ± 41	71,8 ± 12,6	1	5	6	3,93 ± 0,44	1,75 ± 1,77	25	-0,61 ± 0,58
B (2) [5]	414 ± 45	131 ± 25	2	9	6	2,08 ± 1,24	-0,14 ± 2,54	0	-0,91 ± 0,35
C1 (5) [11]	252 ± 51	76,1 ± 14,1	2	6	5	2,27 ± 0,97	2,12 ± 1,18	55	-0,05 ± 0,52
C2 (5) [7]	262 ± 60	48,1 ± 25,3	1	4	5	2,60 ± 1,20	2,60 ± 1,20	100	0,08 ± 0,59
C3 (6) [4]	314 ± 136	54,4 ± 11,6	0,5	3	2,5	2,98 ± 0,62	2,24 ± 1,59	100	-0,22 ± 0,23
E (14) [16]	394 ± 70	77,9 ± 24,6	0	5	4	3,65 ± 1,24	3,11 ± 1,64	88	0,18 ± 0,60
K1 (3) [6]	330 ± 43	96,4 ± 23,8	0	5	5,5	3,90 ± 0,41	3,88 ± 0,42	83	0,46 ± 0,32
K2 (23) [3]	237 ± 10	237 ± 10	1	3	5	3,44 ± 0,23	3,44 ± 0,23	100	0,47 ± 0,03
K3 (15) [8]	261 ± 52	34,2 ± 21,0	0	3	6,5	2,66 ± 1,29	2,66 ± 1,29	100	0,12 ± 0,34
N (15) [4]	222 ± 50	22,6 ± 4,6	0	2	5,5	2,95 ± 0,82	2,95 ± 0,82	100	0,37 ± 0,14
O (4) [13]	226 ± 26	43,7 ± 8,0	1	3	3	2,84 ± 0,51	0,15 ± 0,80	100	-0,53 ± 0,41
Z (0) [66]	262 ± 104	45,2 ± 28,5	1	3	3	2,60 ± 1,65	2,00 ± 2,02	95	-0,03 ± 0,54
Granične vrijednosti	< 450	< 60-70	< 3	< 7	< 8	< 5	< 5		> 0

^aRelativna molekulska masa (MW), topološka polarna površina molekule (TPSA), broj donora vodikovih veza (HBD), broj akceptora vodikovih veza (HBA), broj rotirajućih veza (RB), koeficijent lipofilnosti (n-oktanoll/voda) (logP), koeficijent distribucije pri pH 7,4 (log D), % spojeva u pojedinoj HRAC klasi za koje je predviđena sposobnost prolaska kroz krvno-moždanu barijeru (BBB_Filter) i log ($C_{\text{mozak}}/C_{\text{krv}}$) (logBB). MW, TPSA, logP, logD i logBB parametri prikazani su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. HBD/HBA i RB parametri prikazani su kao medijan vrijednost. ^bSlova označavaju HRAC2020 klasifikacijski sustav, brojevi u zagradama HRAC2022 klasifikaciju herbicida gdje je N klasa spojena s K3 klasom, a brojevi u uglatim zagradama broj spojeva u pojedinoj HRAC klasi. U tablici nisu prikazani rezultati analize za klase s dva ili manje spojeva, ali njihovi rezultati ne utječu na rezultat ukupne analize.

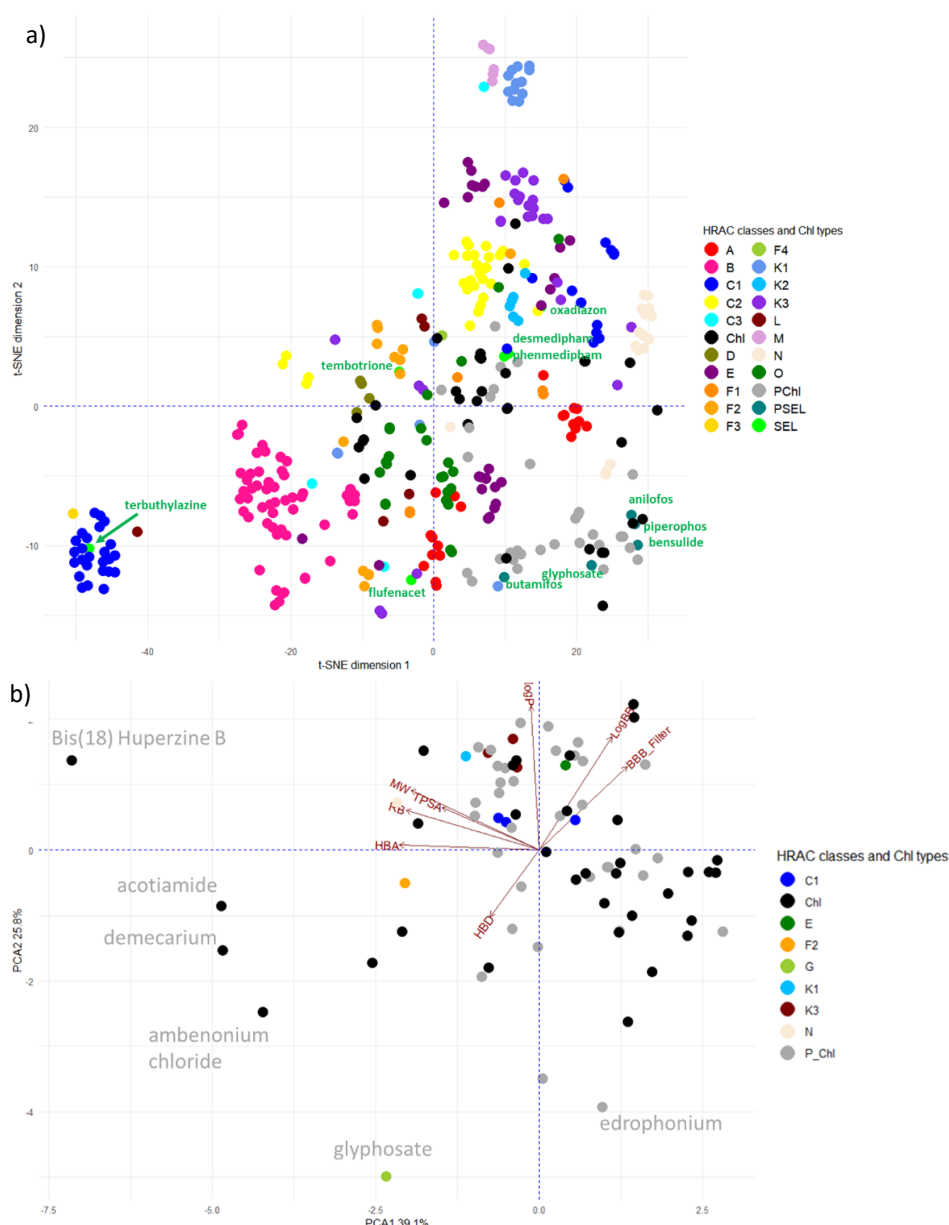
Za klase komercijalnih herbicida za koje je predviđeno toksično djelovanje na ljude (**tablica 4.6**), posebno za spojeve iz klasa F1 i K3, predviđene vrijednosti za fizikalno-kemijska svojstva su također relevantna za prolazak kroz KMB što podržava hipotezu o njihovoj neurotoksičnosti (**tablica 4.6**). Herbicidi iz klasa F1 i K3 kao i spojevi iz klase N (koja je spojena s klasom K3 u HRAC klasifikaciji od 2020. godine) većinom su nepolarni spojevi (niska TPSA), male neionizirajuće molekule s vrijednostima logP između 3–5 i malim brojem HBD atoma. Srednje vrijednosti i medijani fizikalno-kemijskih parametara za navedene klase uglavnom zadovoljavaju granične vrijednosti za svaki pojedinačni parametar relevantan za aktivnost spojeva u mozgu navedene u zadnjem redu **tablice 4.6**¹³³. Za većinu herbicida koji pripadaju tim klasama procijenjeno je da mogu proći kroz krvno-moždanu barijeru (*BBB_Filter*) i zadržati se u mozgu (pozitivna *logBB* vrijednost). Herbicidi koji pripadaju klasi C1 su nešto polarniji (veće vrijednosti TPSA) i imaju nešto više HBA atoma, a klasa B sadrži polarne spojeve sa izrazito velikim brojem atoma-akceptora vodikovih veza (HBA). Prema predviđenom fizikalno-kemijskom profilu većina herbicida iz klase B nema potencijal pasivnog prelaska iz krvi u mozak kroz krvno-moždanu barijeru i njegova zadržavanja u njemu (negativna *logBB*).

Za skup napuštenih herbicida procijenjeni su analogni trendovi fizikalno-kemijskih svojstava s obzirom na HRAC klase kao za komercijalne herbicide (**tablica 4.7**). Napušteni herbicidi iz klasa K3 i N predviđeni su kao najriskantniji s obzirom na izazivanje reproduktivne toksičnosti, osjetljivosti na kožu i respiratorni sustav, veliki potencijal za bioakumulacijom i toksičnost na organizam *Tetrahymena pyriformis*.

4.1.3. Analiza herbicida za odabir potencijalnih inhibitora kolinesteraza

Organofosforni herbicidi izabrani su za *in vitro* analizu obzirom na njihovu strukturnu sličnost s poznatim inhibitorima kolinesteraza (ChI) na temelju analize provedene metodom t-SNE (**slika 4.4 a**) i na temelju povoljnih fizikalno-kemijskih svojstava za aktivnost u mozgu (**slika 4.4 b**). t-SNE dijagram je generiran pomoću deskriptora – 2D strukturnih fragmenta za 346 komercijalnih herbicida i 68 poznatih inhibitora kolinesteraza (ChI). Bliže točke na dijagramu označavaju strukturno sličnije spojeve (**slika 4.4a**). Što imaju više zajedničkih strukturnih fragmenata/motiva to su herbicidi bliži na t-SNE grafičkom prikazu¹³¹. Sukladno strukturnoj sličnosti vidljivo je da su se neki inhibitori (ChI) grupirali u isti klaster sa nekim od odabranih herbicida kao npr. anilofos, benzulid i butamifos. Organofosforni inhibitori kolinesteraza (OP ChI) (PChI, sive točke) podijeljeni su u dvije skupine. Pet OP herbicida iz klasa K1, K3 i N (**slika 4.4a**) pozicionirani su zajedno sa PChI klasterom u donjem desnom dijelu t-SNE dijagrama. Dva karbamatna herbicida, desmedifam i fenmedifam (C1) svrstani su unutar klastera PChI i drugih ChI (crne točke) u središnjem dijelu t-SNE dijagrama, što je i očekivano jer su karbamati poznati inhibitori kolinesteraza^{107,151}. S druge strane, terbutilazin (C1), tembotrion (F2), flufenacet (K3) i oksadiazon (E) grupirali su se u klastere sa strukturno sličnim herbicidima, zasebno od ChI klastera.

PCA dijagram (**slika 4.4b**) prikazuje odnos fizikalno-kemijskih karakteristika odabranih herbicida i poznatih inhibitora ChI. Na PCA dijagramu može se vidjeti da su ChI raspršeni kroz cijeli prostor dijagrama zbog razlika u logP, TPSA i HBA vrijednostima što ukazuje na njihova različita fizikalno-kemijska svojstva i ADME profil. Spojevi koji ne pokazuju potencijal za aktivnost u mozgu pozicionirani su u donjem lijevom kvadrantu. Za te ChI nije predviđeno da imaju potencijal pasivnog prolaska kroz krvno-moždanu barijeru zbog neodgovarajuće i nepoželjne veličine, polarnosti i velikog broja atoma za stvaranje vodikovih veza (HBA).



Slika 4.4. a) t-SNE dijagram prikazuje grupiranje 346 herbicida i 68 poznatih inhibitora kolinesteraza (ChI) prema njihovoj strukturalnoj sličnosti. Blíže točke označavaju strukturalno sličnije spojeve. SEL predstavlja SElektirane herbicide, a PSEL i PChI predstavljaju organofosforne (OP) spojeve za svaku prikazanu kategoriju. Ostali herbicidi su obojani i označeni sukladno njihovim pripadajućim HRAC klasama. b) PCA bi-dijagram predstavlja distribuciju 11 odabranih herbicida i 68 poznatih ChI obzirom na fizikalno-kemijske karakteristike poželjne za aktivnost u mozgu koje su prikazane crvenim strelicama (dulje strelice označavaju važnije parametre za objašnjenje varijance unutar analizirane skupine spojeva). ChI označava strukturalno različite inhibitore kolinesteraze, P_ChI označava organofosforne inhibitore kolinesteraze, a odabrani herbicidi obojani su sukladno njihovim pripadajućim HRAC klasama.

Općenito, od 11 odabranih herbicida, osim glifosata i tembotriona za njih devet su procijenjena fizikalno-kemijska svojstva karakteristična za potencijalnu aktivnost u središnjem živčanom sustavu odnosno mogućnost pasivnog ulaska u mozak i dostizanja koncentracije koja može izazvati fiziološke učinke na mozak.

4.1.4. Analiza fizikalno-kemijskih svojstava odabranih herbicida

Općenito, herbicidi su spojevi male molekulske mase sa najviše dva atoma donora vodikove veze ($HBD \leq 2$) i koeficijentom lipofilnosti $\log P$ u rasponu od 0,5 do 4,5^{131,152}. Analiza fizikalno-kemijskih svojstava za 11 odabranih herbicida (**tablica 4.8** i **slika 4.4b**) pokazuje da je glifosat spoj koji najviše odskaka od ostalih spojeva (**slika 4.4b**). Glifosat je polarna molekula sa značajnim brojem atoma donora vodikovih veza (HBD), a vrijednosti predviđenih fizikalno-kemijskih svojstava pokazuju da glifosat nema potencijal za pasivan prolazak kroz krvno-moždanu barijeru (negativna vrijednost BBB_Filter) i za aktivnost u središnjem živčanom sustavu (**tablica 4.8** i **slika 4.4b**). Osim glifosata, i za tembotrion je predviđena vrijednost TPSA parametra koja je izrazito nepovoljna za prolazak KMB i aktivnost u mozgu. Za organofosfat butamifos i karbamate desmedifam i fenmedifam predviđene TPSA vrijednosti blago prelaze graničnu vrijednost.

Tablica 4.8. Fizikalno-kemijska svojstva za 11 herbicida odabranih za *in vitro* analizu. ^aGranične vrijednosti za analizirane parametre važne za CNS-aktivnost prikazane su u zadnjem redu tablice (prema ref.¹³³).

HRAC klase ^b	Herbicid	MW	TPSA / Å ²	HBD	HBA	RB	log P	log D	BBB-Filter	logBB
K3 (15)	Anilofos	368	38,8	0	4	8	4,18	4,18	1	0,33
Z (0)	Benzulid	398	64,6	1	5	10	4,14	4,15	1	-0,67
K1 (3)	Butamifos	332	76,3	1	5	7	4,13	4,10	1	0,37
G (9)	Glifosat	169	107	4	6	4	-3,36	-3,66	0	-1,14
K3 (15)	Piperofos	354	38,8	0	4	10	4,39	4,39	1	0,01
C1 (5)	Desmedifam	300	76,7	2	6	8	3,46	3,46	1	0,30
C1 (5)	Fenmedifam	314	76,7	2	6	8	3,76	3,76	1	0,30
K3 (15)	Flufenacet	363	55,3	0	5	7	3,62	3,62	1	0,24
E (14)	Oksadiazon	345	57,3	0	4	3	4,41	4,41	1	0,36
F2 (27)	Tembotrion	441	94,6	0	6	6	1,54	0,44	1	-1,22
C1 (5)	Terbutilazin	230	62,7	2	5	4	3,38	3,38	1	0,63
Granične vrijednosti		< 450	< 60-70	< 3	< 7	< 8	< 5	< 5	1	> 0

^aRelativna molekulska masa (MW), topološka polarna površina molekule (TPSA), broj donora vodikovih veza (HBD), broj akceptora vodikovih veza (HBA), broj rotirajućih veza (RB), koeficijent lipofilnosti (n -oktanol/voda) ($\log P$), koeficijent distribucije pri pH 7,4 ($\log D$), potencijalna sposobnost prolaska spoja kroz krvno-moždanu barijeru (BBB_Filter) i $\log (C_{mozak}/C_{krv})$ ($\log BB$). Vrijednosti 1 i 0 za BBB_Filter parametar označavaju visoki (1) odnosno niski (0) potencijal spoja za prolazak kroz krvno-moždanu barijeru. ^bSlova označavaju HRAC2020 klasifikacijski sustav, a brojevi u zagradama HRAC2022 klasifikaciju herbicida gdje je N klasa spojena s K3 klasom.

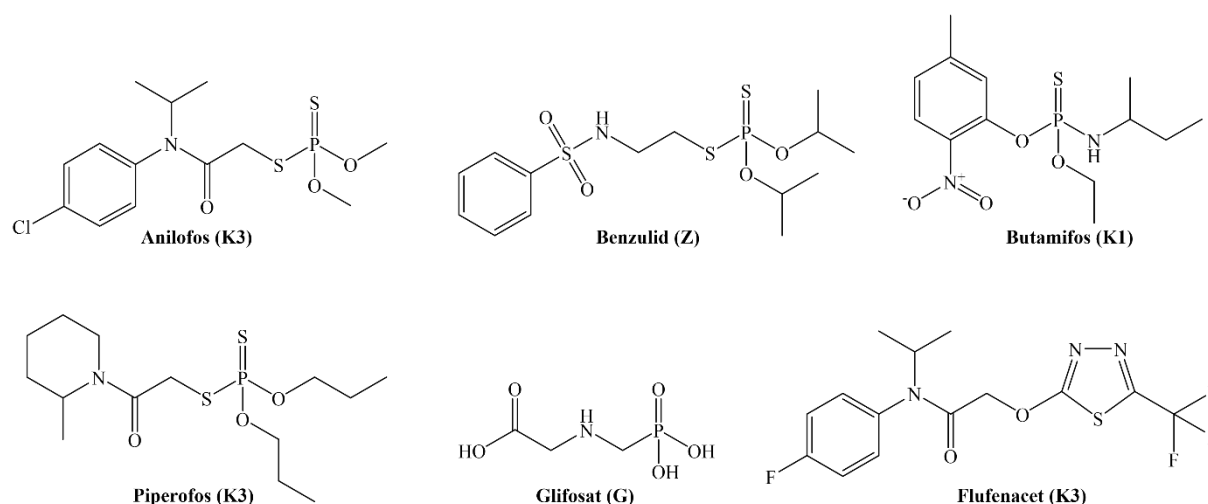
Za herbicide iz klase K3 – anilofos, piperofos i flufenacet, predviđena fizikalno-kemijska svojstva pokazuju veliki potencijal za prolazak kroz KMB, njihov ostanak u mozgu i izazivanja neurotoksičnosti. Anilofos, piperofos i flufenacet su nepolarne i lipofilne molekule bez atoma donora vodikove veze te je predviđena značajnija izloženost i utjecaj na mozak. U PCA prikazu vidljivo je da su smješteni u gornjem dijelu dijagrama zajedno sa ostalih šest odabranih herbicida iz klase C1, E i K1 (**slika 4.4b**) za koje su predviđena fizikalno-kemijska svojstva koja ukazuju na moguće neurotoksično djelovanje u središnjem živčanom sustavu (**tablica 4.8**).

Iako nema povoljan profil za izazivanje neurotoksičnosti, glifosat je odabran za *in vitro* analizu jer je najčešće korišten organofosforni herbicid na svijetu za kojeg se vežu kontroverzne/oprečne znanstvene studije o njegovoj inhibitornoj aktivnosti prema AChE i BChE enzimima^{63,64,153}. Također, nedavna studija o tembotrionu, pokazala je inhibitorno djelovanje na metabolički put tirozina koji je važan u mnogim vrstama organizama¹⁵⁴. Neurotoksični efekti oksadiazona primijećeni su u znanstvenoj studiji⁹⁰ kao i za atrazin, strukturni analog terbutilazina²⁶ čije djelovanje potencijalno može voditi do neurodegenerativnog stanja organizma. Za odabrane herbicide predviđena su toksična svojstva prema *Tetrahymena pyriformis* i *Daphnia magna*, organizmima koji se često koriste kao modeli za predviđanje mogućih neuromodulatornih djelovanja^{140,152,155}.

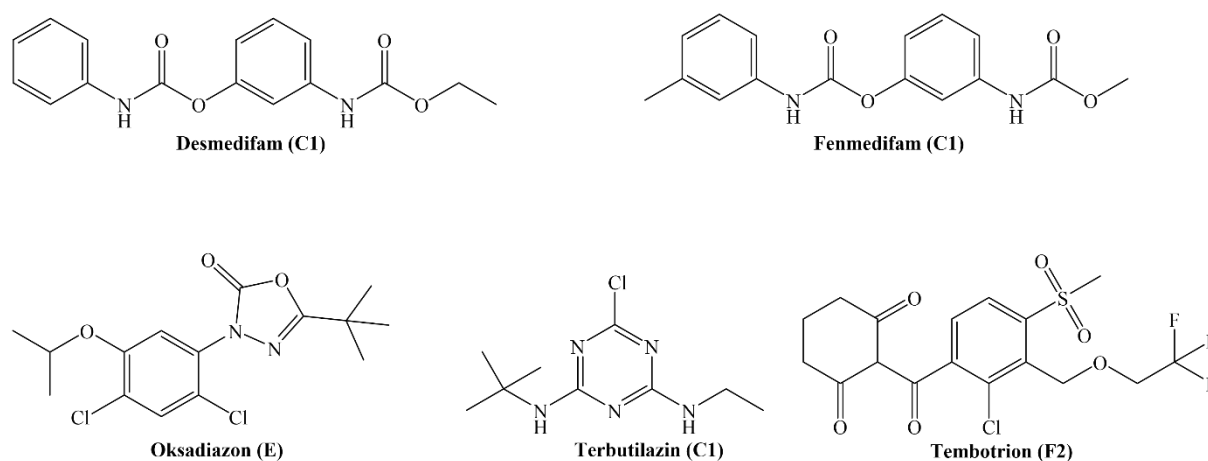
4.2. Interakcije herbicida s kolinesterazama

4.2.1. Određivanje inhibicije aktivnosti kolinesteraza

Za *in vitro* analizu toksičnosti odabrano je 11 herbicida koji imaju različite mehanizme djelovanja na korov i pripadaju u nekoliko različitih HRAC klasa, a strukturno pripadaju u više različitih kemijskih obitelji: organofosforni spojevi (anilofos, benzulid, butamifos, piperofos i glifosat), oksiacetanilid (flufenacet) (**slika 4.5**), karbamati (desmedifam i fenmedifam), oksadiazolon (oksadiazon), triketon (tembotrion) i triazin (terbutilazin) (**slika 4.6**).



Slika 4.5. Kemijske strukture i pripadajuće HRAC klase za pet komercijalnih organofosfatnih herbicida i oksiacetanilid flufenacet.



Slika 4.6. Kemijske strukture i pripadajuće HRAC klase za dva karbamatna herbicida, oksadiazolona, triazina i triketona.

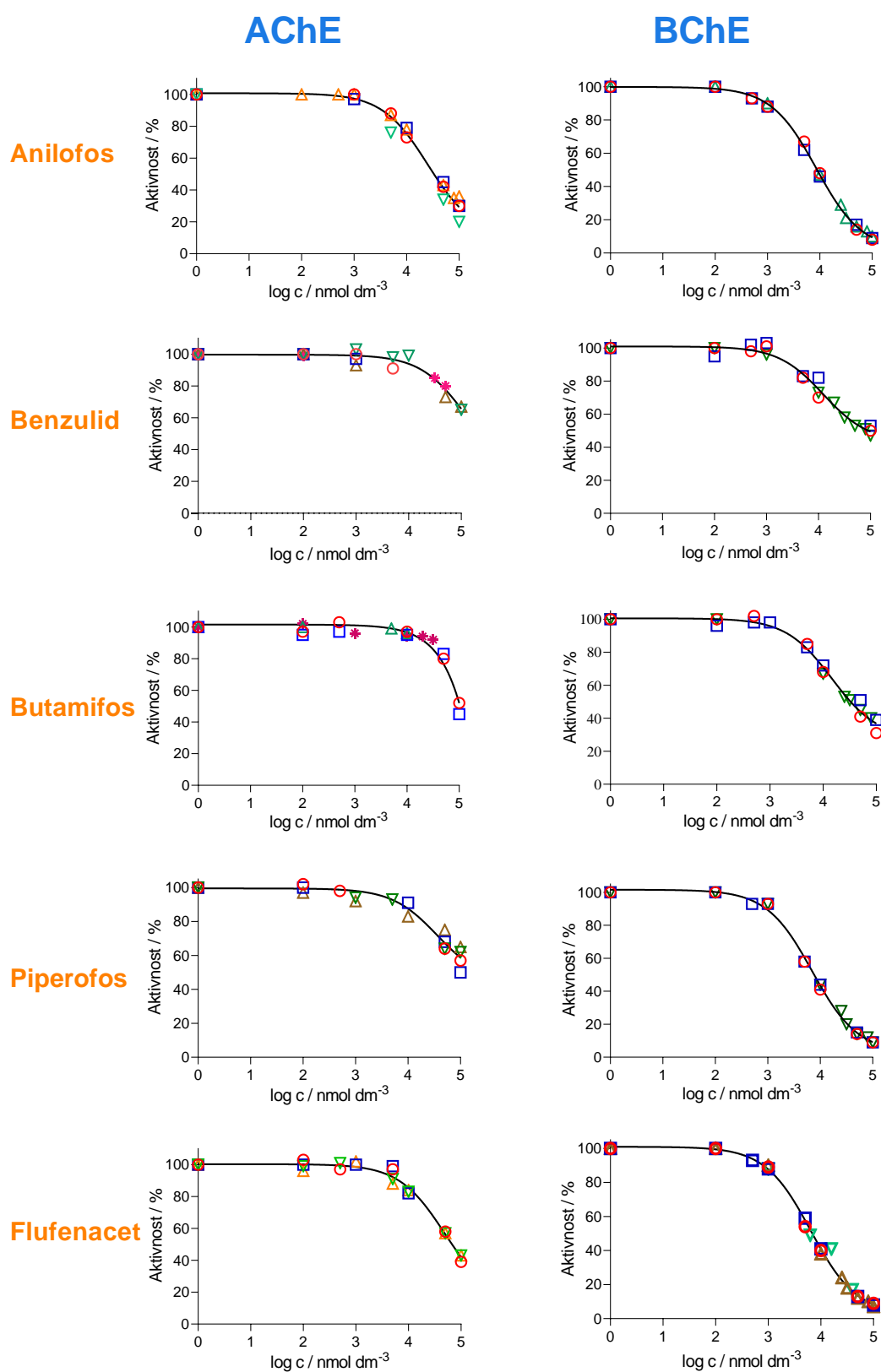
Aktivnosti ljudske AChE i BChE mjerene su u prisutnosti herbicida (**slike 4.5 i 4.6**) kako bi se odredio njihov inhibitory učinak (**tablica 4.9**). S obzirom na dosadašnja saznanja da neki od

herbicida (organofosforni spojevi i karbamati) mogu djelovati kao progresivni inhibitori kolinesteraza, aktivnost enzima mjerena je nakon 30 minuta inkubacije. Stoga je ovim pristupom uz široki raspon koncentracija omogućena dobra usporedba inhibitornog učinka odabranih strukturno različitih herbicida (organofosforni spojevi, karbamati, oksiacetanilid, oksadiazolon, triketon i triazin) prema ljudskim kolinesterazama.

Viša koncentracija herbicida nije se mogla koristiti radi netopljivosti odnosno radi utjecaja otapala na aktivnost enzima. Tako je za AChE iz prikazanih sumarnih grafova organofosfornih herbicida (**slika 4.7**) jedino za anilofos dobiven potpuni profil krivulje i time je određena preciznija vrijednost IC_{50} . Stoga za butamifos, benzulid i piperofos vrijednosti IC_{50} procijenjene su iz nepotpune sigmoidalne krivulje, a IC_{50} vrijednosti nalaze se u bliskom koncentracijskom području malo većem od 10^{-4} mol dm⁻³.

Tablica 4.9. Inhibicija ljudskih AChE i BChE odabranim herbicidima. IC_{50} vrijednost izražena je kao srednja vrijednost (\pm standardna pogreška) i određena iz najmanje tri pokusa mjerena nakon 30 minuta inkubacije pri 25 °C.

Herbicid	IC_{50} / $\mu\text{mol dm}^{-3}$	
	AChE	BChE
Anilofos	25 ± 10	$8,6 \pm 0,7$
Benzulid	120 ± 80	13 ± 5
Butamifos	≈ 100	15 ± 4
Glifosat	$> 1,000$	$> 1,000$
Piperofos	> 100	$7,0 \pm 0,8$
Desmedifam	138 ± 85	26 ± 5
Fenmedifam	41 ± 18	30 ± 6
Flufenacet	48 ± 20	$6,4 \pm 0,8$
Oksadiazon	$\gg 100$	$\gg 100$
Tembotrion	$\gg 100$	$\gg 100$
Terbutilazin	$\gg 100$	$\gg 100$



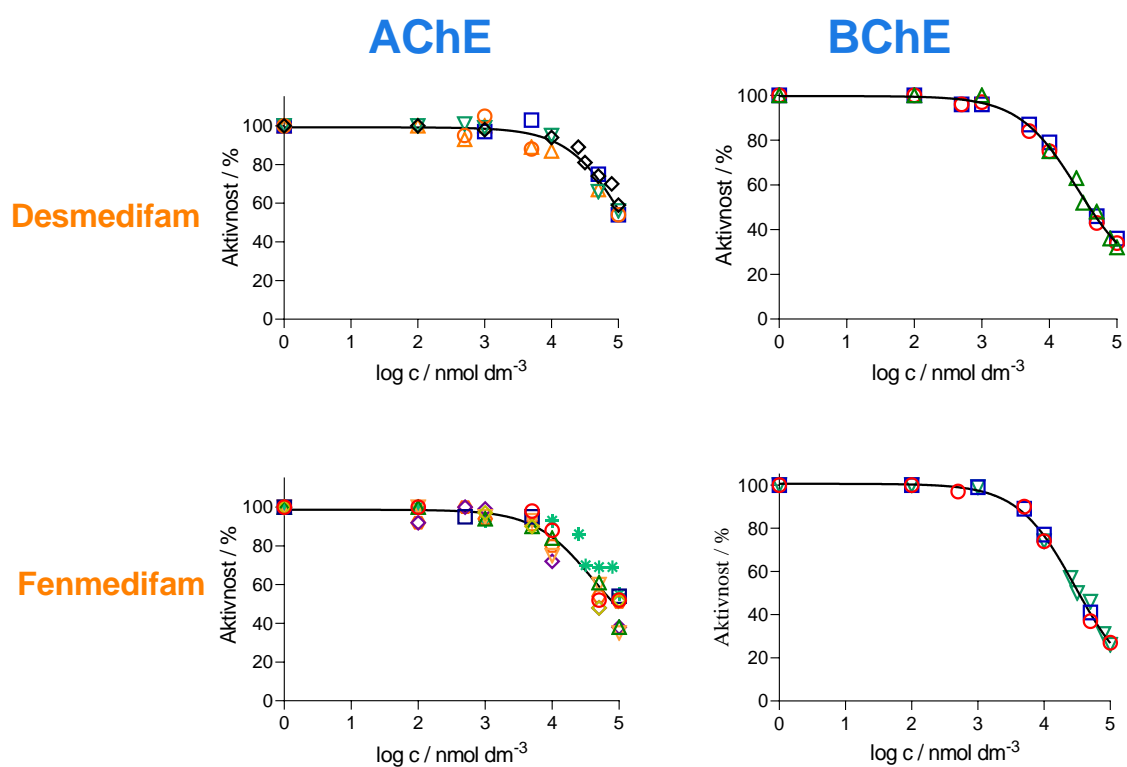
Slika 4.7. Aktivnosti (%) hAChE i hBChE u ovisnosti o koncentraciji organofosforinih herbicida: anilofosa, benzulida, butamifosa i piperofosa te oksiacetanilida flufenaceta. Mjerenja su provedena u koncentracijskom rasponu od 10^{-4} - 10^{-7} mol dm⁻³ nakon 30 min inkubacije u najmanje tri pokusa pri 25°C.

Stoga, anilofos, flufenacet i fenmedifam pokazali su se kao učinkoviti inhibitori AChE i BChE sa određenim IC_{50} vrijednostima u nižem mikromolarnom rasponu ($6-50 \mu\text{mol dm}^{-3}$). Za oksiacetanilid, flufenacet bilo je moguće odrediti točne vrijednosti IC_{50} parametra iz rezultata provedenih eksperimenata i dobivenih grafičkih prikaza (**tablica 4.9** i **slika 4.7**).

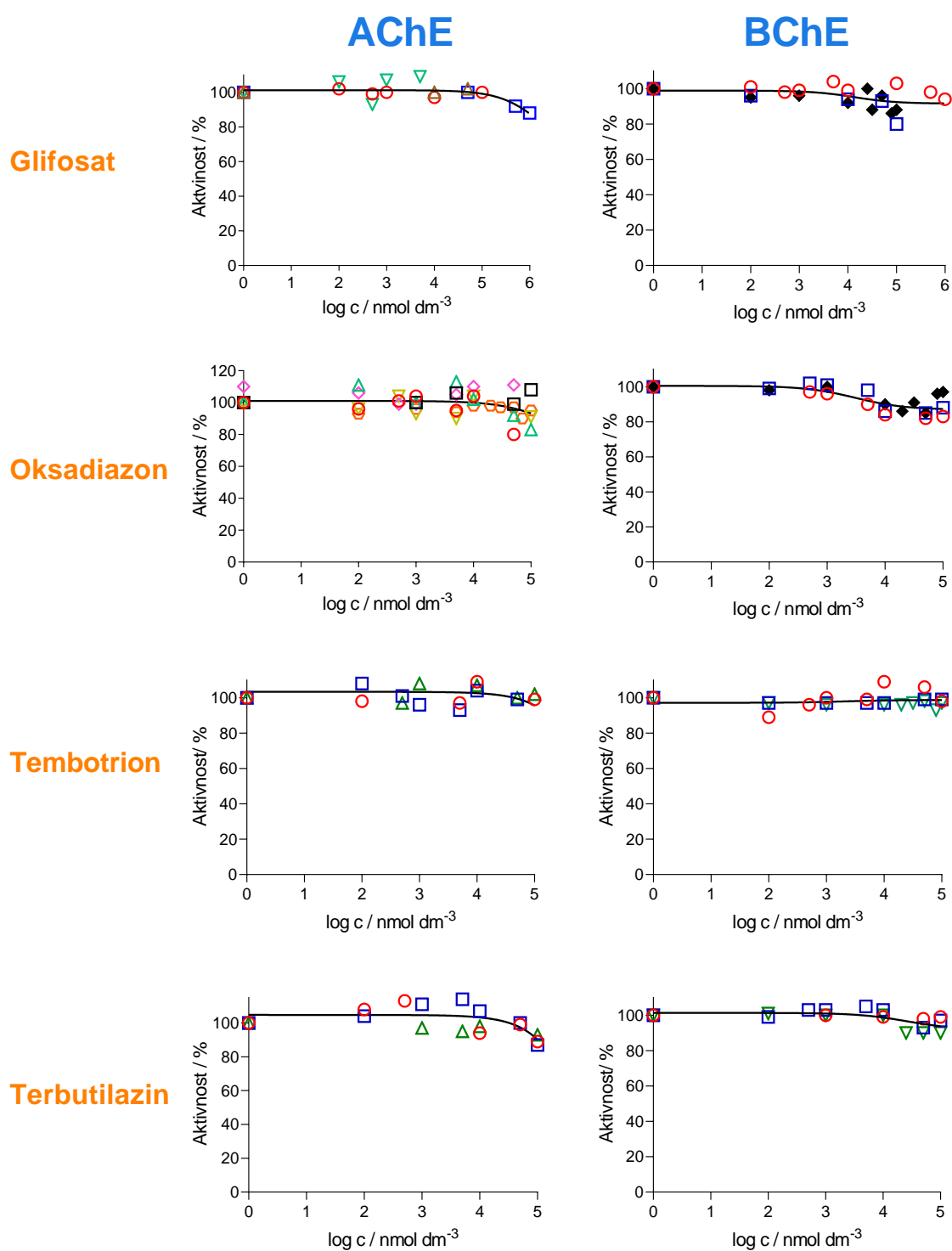
Za AChE iz prikazanih sumarnih grafova za karbamatne herbicide (**slika 4.8**) moguće je primijetiti da s najvišom koncentracijom herbicida od $0,1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ za desmedifam dobivena aktivnost od oko 50 % pa se može procijeniti da je IC_{50} za AChE za karbamate oko $100 \mu\text{mol dm}^{-3}$.

Preostala aktivnost BChE s najvišom koncentracijom herbicida, $10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ bila je oko 20 % pa je vrijednost IC_{50} određena za sve testirane karbamatne herbicide unutar $10^{-4}-10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ koncentracijskom rasponu (**tablica 4.9** i **slika 4.8**). Stoga kao i u slučaju OP herbicida, karbamatni herbicidi bolje inhibiraju BChE nego AChE.

Desmedifam, karbamatni herbicid i četiri organofosfatna herbicida, anilofos, benzulid, butamifos i piperofos više su potentni inhibitori BChE nego AChE enzima. Navedene herbicide može se smatrati selektivnim inhibitorima BChE, a najveća selektivnost, skoro 10 puta veća opažena je kod piperofosa i butamifosa jer je njihova IC_{50} vrijednost za AChE izmjerena u koncentracijskom rasponu većem od najveće testirane koncentracije $100 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (**tablica 4.9**).



Slika 4.8. Aktivnosti (%) hAChE i hBChE u ovisnosti o koncentraciji karbamatnih herbicida: a) desmedifama i b) fenmedifama. Mjerenja su provedena u koncentracijskom rasponu od 10^{-4} - 10^{-7} mol dm⁻³ nakon 30 min inkubacije u najmanje tri pokusa pri 25 °C.



Slika 4.9. Aktivnosti (%) hAChE i hBChE u ovisnosti o koncentraciji sljedećih herbicida: glifosata, oksadiazona, tembotriona i terbutilazina. Mjerenja su provedena u koncentracijskom rasponu od 10^{-4} - 10^{-7} mol dm⁻³, odnosno za glifosat u koncentracijskom rasponu od 10^{-3} - 10^{-7} mol dm⁻³ nakon 30 min inkubacije u najmanje tri pokusa pri 25 °C.

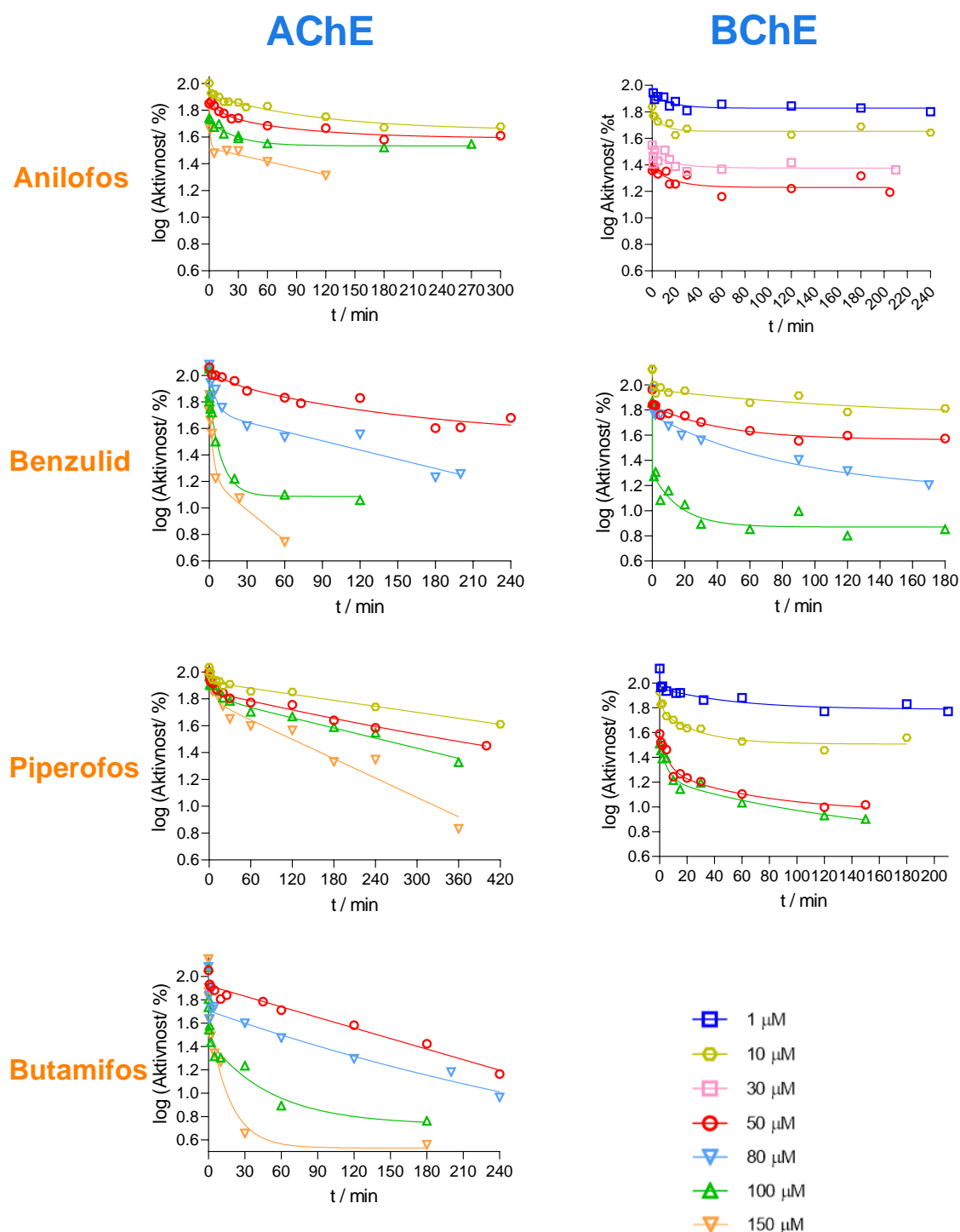
Glifosat, oksadiazon, tembotrion i terbutilazin pokazali su slabi inhibicijski potencijal za obje kolinesteraze, AChE i BChE (**slika 4.9**). Inhibicija oba enzima s najvišim testiranim koncentracijama ovih spojeva bila je manja od 10-20 % te su njihove IC₅₀ vrijednosti procijenjene većima od 100 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ ili od 1 mmol dm^{-3} za glifosat. Dobiveni rezultat za glifosat odgovara rezultatima studije gdje je ljudska eritrocitna AChE inhibirana 10-20 % glifosatom koncentracija 0,1 mmol dm^{-3} i 5 mmol dm^{-3} .⁶³

Stoga, organofosforni spojevi i karbamati koji pripadaju HRAC klasama C1, K1, N i K3 potvrdili su se kao potentni inhibitori ljudskih kolinesteraza podupirući rezultate predviđanja i t-SNE analize. Zanimljivo je da herbicidi K3 klase, anilofos i flufenacet, kao najpotentniji inhibitori obje kolinesteraze sadrže *N*-(4-halofenil)-*N*-propan-2-il acetamid, isti strukturni fragment. Prema t-SNE dijagramu flufenacet je lociran u donjem desnom kutu blizu PChI klastera gdje se nalazi i anilofos, ali ipak su ova dva herbicida dosta udaljena unatoč strukturnim sličnostima (**slika 4.4a**). Za ove spojeve predviđena je dobra mogućnost za prolazak kroz KMB, zadržavanja i aktivnosti u mozgu te postoji potencijalna opasnost u slučaju akutnog ili kroničnog trovanja istima. Rezultati dobiveni *in vitro* analizom pokazali su da svi aktivni herbicidi imaju veći inhibični učinak za BChE što predstavlja dobru indikaciju za njihovu metaboličku degradaciju pomoću BChE iz plazme prije nego stignu do središnjeg živčanog sustava.

4.2.2. *Progresivna inhibicija kolinesteraza odabranim herbicidima*

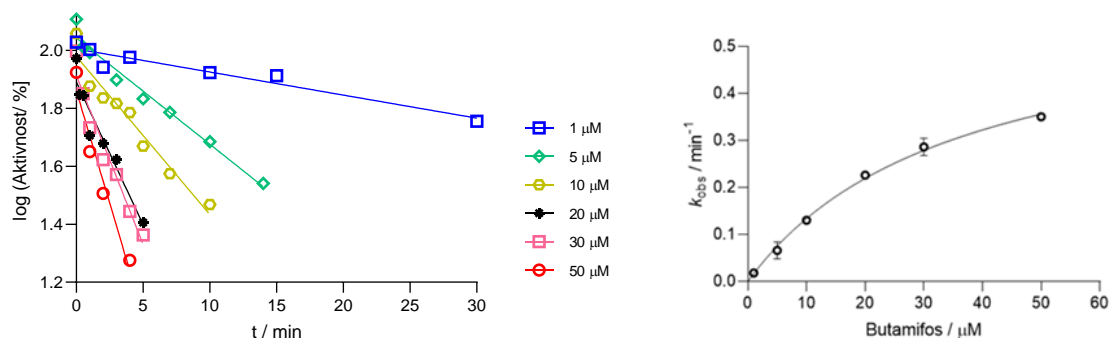
S obzirom da su organofosforni spojevi po mehanizmu reakcije sa serinskim esterazama analozi supstrata, za organofosforne herbicide se pratila inhibicija u odnosu na trajanje inkubacije. Progresivna inhibicija ispitana je za anilofos, benzulid, butamifos i piperofos (**slika 4.10**).

Od izabranih herbicida uz butamifos kao progresivni inhibitor BChE, aktivnost enzima je padala proporcionalno vremenu inkubacije (**slika 4.10 i 4.11**). Slijedom akumulacije Michaelis-Menten-ovog kompleksa, opažena je krivulja zasićenja što je omogućilo određivanje konstante fosforilacije (k_i) drugog reda, konstantu inhibicije (k_{max}) prvog reda i ravnotežnu konstantu disocijacije enzim-inhibitor kompleksa (K_i)¹⁴⁰. Ukupna konstanta inhibicije ($k_i = 17,170 \pm 1,522 \text{ min}^{-1}\text{M}^{-1}$) svrstava fosfoamidotioat, butamifos u isti rang sa okso-fosfatnim insekticidima koji inhibiraju BChE u sličnim koncentracijskim rasponima¹⁵⁶. Ovako velika inhibicija nije bila očekivana jer su fosfotioati inače manje potentni inhibitori nego fosfatni pesticidi sa P=O vezom u svojoj strukturi^{45,107,157}.



Slika 4.10. Eksperimenti vremenski ovisne inhibicije ljudske AChE i BChE sa organofosfatnim herbicidima, anilofosom, benzulidom, piperofosom i butamifosom. Mjerena su provedena u najmanje dva eksperimenta pri 25 °C.

Dodatna usporedba rezultata inhibicije sa strukturno sličnim insekticidom fenamifosom pokazuje da butamifos samo zbog svog slabog afiniteta nije i jači inhibitor BChE jer njegova konstanta inhibicije ($k_{\max} = 0,61 \pm 0,06 \text{ min}^{-1}$) je gotovo četiri puta veća od fenamifosa¹⁵⁶.



Slika 4.11. Progresivna inhibicija BChE iz ljudske plazme. a) Reprezentativni prikaz vremenski ovisne inhibicije BChE iz ljudske plazme inhibirane butamifosom: nagib pravca određuje opaženu konstantu inhibicije prvog reda, k_{obs} , b) konstante k_{obs} prikazane su kao funkcije ovisne o koncentraciji butamifosa iz čega su određeni kinetički parametri fosforilacije BChE: konstanta inhibicije prvog reda, $k_{\max} = 0,61 \pm 0,06 \text{ min}^{-1}$, ravnotežna konstanta disocijacije kompleksa enzim-inhibitor, $K_i = 35 \pm 6 \text{ µM}$ i ukupna konstanta inhibicije drugog reda, $k_i = 17,200 \pm 1,500 \text{ min}^{-1}\text{M}^{-1}$.

Vremenski ovisne inhibicije AChE i BChE drugih organofosforinih herbicida su nešto drugačijeg tijeka nego inhibicija BChE butamifosom (**slika 4.11**). Tako je nakon inicijalne (i kratke) kinetike prvog reda, inhibicija AChE i BChE s anilofosom postigla ravnotežu dok se inhibicija s drugim herbicidima može procijeniti kao sporija reakcija prvog reda. Aktivnost enzima se smanjila na manje od 5% kod inhibicije herbicidima kod najviše testirane koncentracije. Prema drugim provedenim studijama moguća interpretacija dobivenih krivulja je spontana reaktivacija i moguća reakcija „starenja“ kao što je pokazano za trialkilfosfotiolate^{158,159}.

Nadalje, svi organofosforini herbicidi generirali su značajne količine reverzibilnog kompleksa što je vidljivo iz y-odsječka prikazanih grafova¹³⁵ što znači da su obje, progresivna i reverzibilna inhibicija posljedica simultanih kovalentnih i ne-kovalentnih enzim-inhibitor interakcija i vjerojatni alosterički efekt što je predloženo već od strane Aldridge i Reiner E. (1972)¹⁵⁸. Ovi autori predlažu da uz progresivnu fosforilaciju aktivnog mjesta, vezanje spoja na periferno mjesto enzima izaziva reverzibilnu inhibiciju što smanjuje hidrolizu supstrata na sličan način fenomenu alosteričke inhibicije AChE supstratom¹⁵⁸.

4.2.3. Odnos strukture herbicida i inhibicije kolinesteraza

Molekulsko modeliranje Michaelis-Mentenova kompleksa odabranih herbicida unutar aktivnih mjesta dviju ljudskih kolinesteraza omogućilo je identificiranje interakcija između molekula herbicida i aminokiselinskih ostataka koje čine ždrijelo aktivnog mjesta. U slučaju organofosfata i karbamata, glavni kriterij odabira mjesta vezanja herbicida unutar AChE i BChE katalitičkih mjesta bila je orijentacija odlazeće skupine molekule herbicida koja je orijentirana nasuprot atoma kisika (O) katalitičkog serina oponašajući orijentaciju povoljnu za nukleofilni napad katalitičkog serina tijekom progresivne inhibicije enzima uz stvaranje aciliranog konjugata. Lista nevezanih interakcija između odabranih herbicida i AChE i BChE prikazana je u **tablici 4.10**.

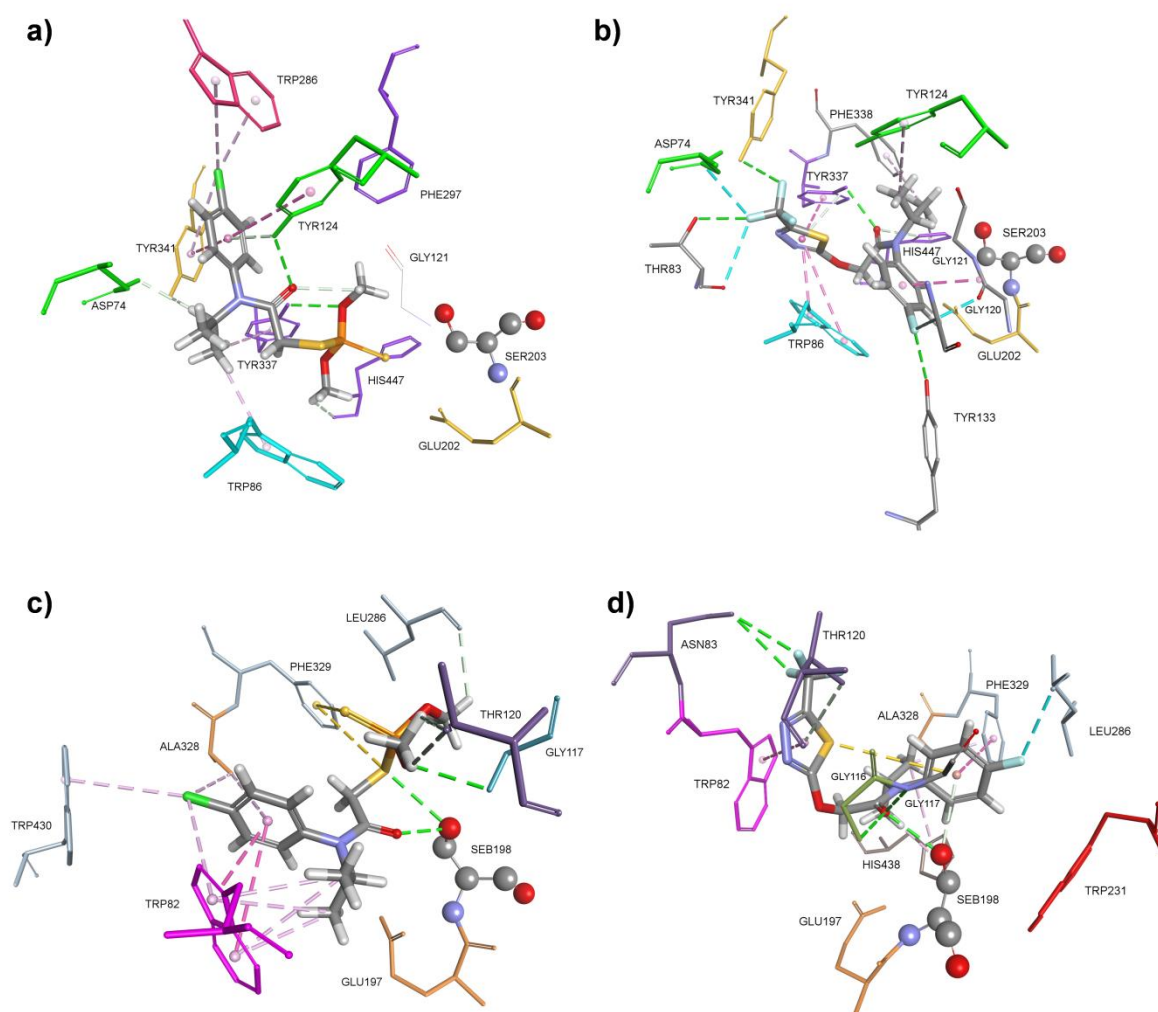
Slika 4.12. prikazuje rezultate molekulskog uklapanja za anilofos i flufenacet kao najdjelotvornije inhibitore AChE i BChE. Iako ovi spojevi dijele uobičajeni farmakofor, značajku u strukturi, tercijarni amin sa susjednom karbonilnom, izopropilnom i halogen fenilnom skupinom uključujući i atom klora ili fluora njihove interakcije s aminokiselinskim ostacima u aktivnom mjestu AChE razlikovale su se jedna od druge. Anilofos je stabiliziran u oba, kolinskom veznom mjestu i perifernom anionskom mjestu stvarajući hidrofobne interakcije sa Trp86 i Tyr337 u kolinskom veznom mjestu i sa Tyr124 i Trp286 u perifernom anionskom mjestu (**slika 4.12a**). Dodatna stabilizacija kompleksa je osigurana jer klorofenilna skupina je bila dobro pozicionirana između Tyr341 i već navedenih Tyr124 i Trp286

Tablica 4.10. Lista nevezanih interakcija formiranih između herbicida i acetilkolinesteraze (AChE) i butirilkolinesteraze (BChE) u obliku Michaelis-Mentenova načina vezanja. Crvena slova označavaju aminokiseline pronađene unutar katalitičke trijade kod oba enzima.

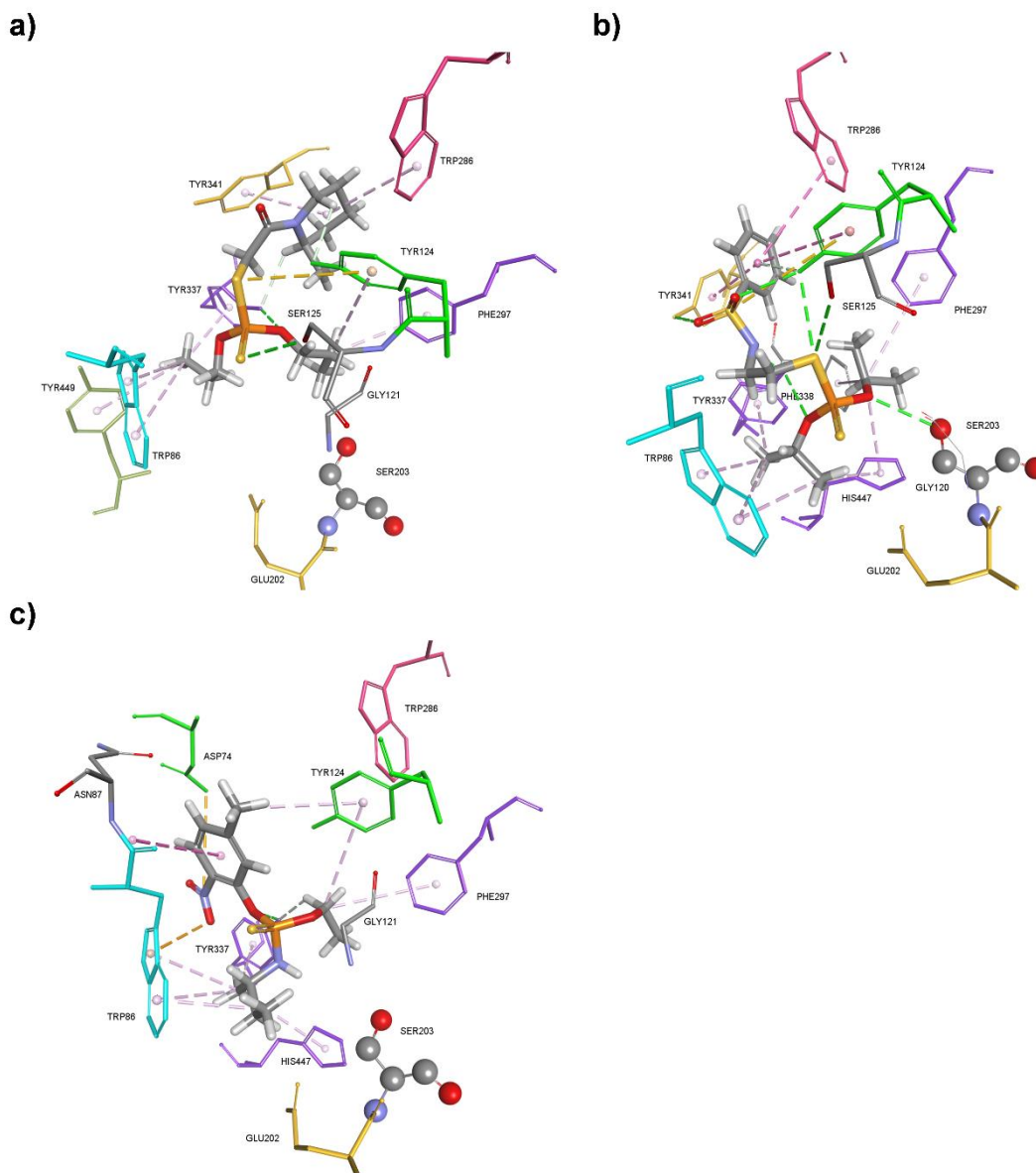
Enzim	Herbicid	H Donor	π - π interakcije ili π -alkil interakcije	Halogen
AChE	Anilofos	Asp74, Tyr124, Tyr337, Tyr341, His447	Trp86, Tyr124, Trp286, Tyr337, Tyr341	
	Piperofos	Ser125, Tyr337	Trp86, Tyr124, Trp286, Phe297, Tyr337, Tyr341, Tyr449	
	Benzulid	Tyr124, Ser125, Ser203 , Tyr337, Tyr341	Trp86, Tyr124, Trp286, Phe297, Phe338, Tyr337, Tyr341, His447	
	Butamifos	Asp74, Tyr337	Trp86, Tyr124, Phe297, Tyr337, His447	
	Flufenacet	Thr83, Gly126, Tyr133, Tyr337, Tyr341, His447	Trp86, Gly120, Tyr124, Tyr337, Phe338, His447	Asp74, Thr83, Gly120
BChE	Anilofos	Gyl117, Thr120, Ser198 , Leu286	Trp82, Ala238, Phe329, Trp430	
	Piperofos	Glu197, Ser198	Trp82, Ala238, Phe329, Tyr332	
	Benzulid	Thr120, Ser198 , Pro285, Phe329, Tyr332	Ala328, Phe329, Tyr332, His438	
	Butamifos	Thr120, Ser198	Trp82, Phe329, His438	
	Desmedifam	Gly116, Gly117, Ser198 , Leu286	Trp231, Leu286, Phe329	
	Fenmedifam	Gly116, Gly117, Ser198 , Pro285, Leu286	Trp231, Leu286, Phe329	
	Flufenacet	Asn83, Gly116, Gly117, Thr120, Ser198	Trp82, Ala328, Phe329, His438	Leu286

iz perifernog anionskog mjesta. Iz slikovnog prikaza može se vidjeti da katalitički aktivni Ser203 može reagirati nukleofilnim napadom na elektrofilni atom fosfora u anilofosu. Položaj flufenaceta otkriva drugačiju orijentaciju izopropilne skupine, dalje od Trp86, formirajući hidrofobne interakcije s Tyr124 i Phe338 (**slika 4.12b**). Osim toga, trifluorometil tiadiazolni prsten koji je pozicioniran u kolinskom veznom mjestu formirao je hidrofobne interakcije sa Trp86 i Tyr337 i vodikove veze s Asp74, Thr83 i Tyr341.

Uspoređujući pozicije flufenaceta i anilofosa (**slika 4.12**), može se vidjeti niže pozicioniranje flufenaceta u aktivnom mjestu AChE što je onemogućilo interakciju flufenaceta s Trp286 iz perifernog anionskog mjesta.



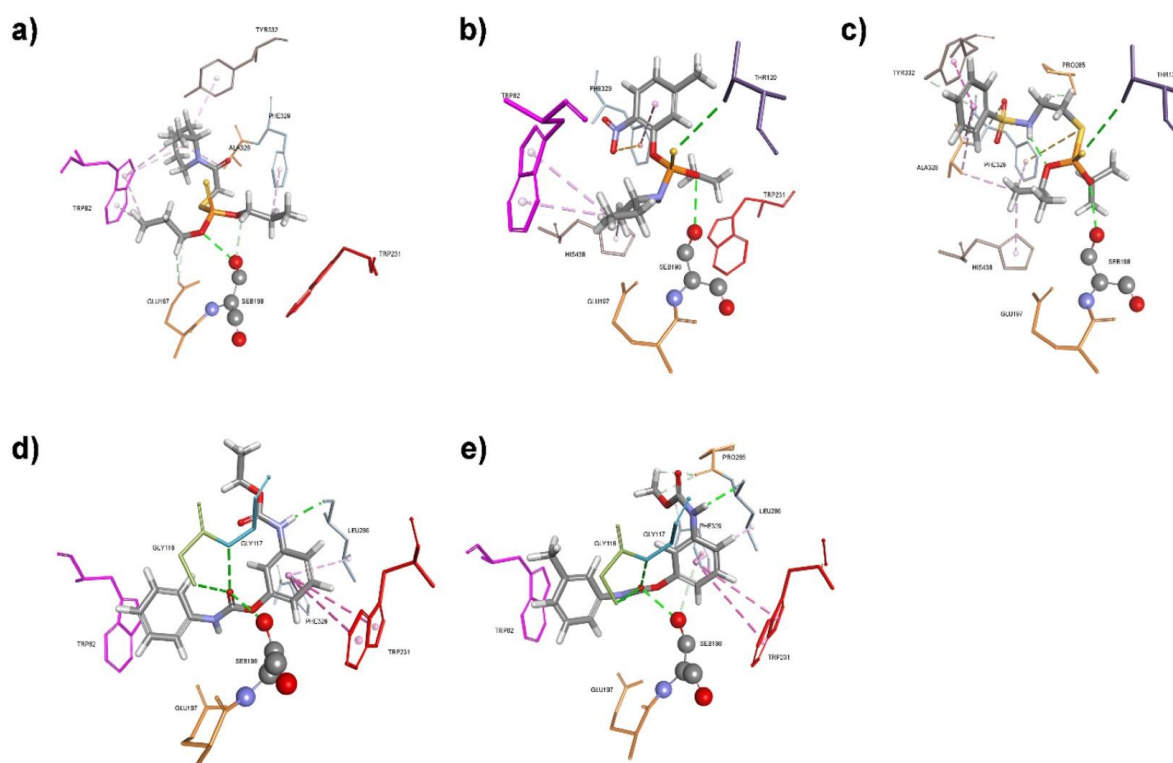
Slika 4.12. Model Michaelis-Mentenova kompleksa herbicida: anilofos (a) i flufenacet (b) unutar aktivnog mjesta ljudske AChE (PDB: 4PQE) (prema Dym i sur.¹⁴³) i anilofos (c) i flufenacet (d) unutar aktivnog mjesta ljudske BChE (PDB: 2PM8) (prema Ngamelue i sur.¹⁴⁴). Položaji su izabrani na osnovu kriterija gdje je izlazna skupina herbicida orijentirana nasuprot atoma kisika (O) katalitički aktivnog serina (AChE – Ser203, BChE – Ser198). Interakcije su prikazane isprekidanim linijama: hidrofobne (ružičasta), vodikove veze (zelena) i elektrostatske (narančasta).



Slika 4.13. Model Michaelis-Mentena kompleksa herbicida: piperofos (a), benzulid (b) i butamifos (c) umutar aktivnog mjesta ljudske AChE (PDB: 4PQE) (prema Dym i sur.¹⁴³). Položaji su odabrani na osnovu kriterija gdje je odlazna skupina herbicida orijentirana nasuprot kisika (O) katalitičkog serina (Ser 203). Interakcije su prikazane isprekidanim linijama: hidrofobne (ružičasta), vodikove veze (zelena) i elektrostatske (narančasta).

Molekulsko modeliranje herbicid-BChE kompleksa otkrilo je interakcije s aminokiselinским ostacima koje stabiliziraju anilofos u povoljni položaj za kovalentnu vezu katalitičkog serina gdje je odlazeća skupina bila u suprotnom smjeru od Ser 198. Oba herbicida, anilofos i flufenacet bila su pozicionirana blizu katalitičkog Ser 198 formirajući vodikove veze s njim (**slike 4.12c i 4.12d**) prvenstveno zbog razlike u strukturi ždrijela aktivnog mjesta AChE i BChE. Anilofos stvara mnogobrojne hidrofobne interakcije s Trp 82 iz kolinskog veznog mjesta s njegovom klorofenilnom i izopropilnom skupinom (**4.12c**). Klorofenilna skupina je

dotatno stabilizirana s Ala 328 i Trp 430. Fluorofenilna skupina flufenaceta pozicionirana je u acilnom džepu i stabilizirana je vodikovom vezom s Leu 286 i hidrofobnom vezom s Phe 329 (slika 4.12d) te dodatnu vodikovu vezu sa Ser 198. Kisik amidne skupine u flufenacetu stabiliziran je u oksianionskoj šupljini stvarajući vodikove veze s istim aminokiselinskim ostacima kao i karbamati, dok je njegova trifluorometil tiadiazolna skupina pozicionirana u kolinskom veznom mjestu stvarajući hidrofobne interakcije s Trp 82 i vodikove veze s Asn 83 i Thr 120. Rezultati molekuskog uklapanja za komplekse ostalih odabranih herbicida s AChE i BChE su prikazani na slikama 4.13 i 4.14. Na osnovu seta opaženih interakcija između herbicida i aminokiselinskih ostataka unutar ždrijela, može se postaviti hipoteza da testirani herbicidi mogu djelovati kao “glomazni” blokatori ulaska supstrata u ždrijelo aktivnog mjesta.



Slika 4.14. Model Michaelis-Mentenova kompleksa herbicida: piperofos (a), benzulid (b), butamifos (c), desmedifam (d) i fenmedifam (e) unutar aktivnog mjesta ljudske BChE (PDB: 2PM8) (prema Ngamelue i sur.¹⁴⁴). Položaji su odabrani na osnovu kriterija gdje je odlazna skupina herbicida orijentirana nasuprot kisika (O) katalitičkog serina (Ser198). Interakcije su prikazane isprekidanim linijama: hidrofobne (ružičasta), vodikove veze (zelena) i elektrostatske (narančasta).

4.3. Citotoksičnost herbicida

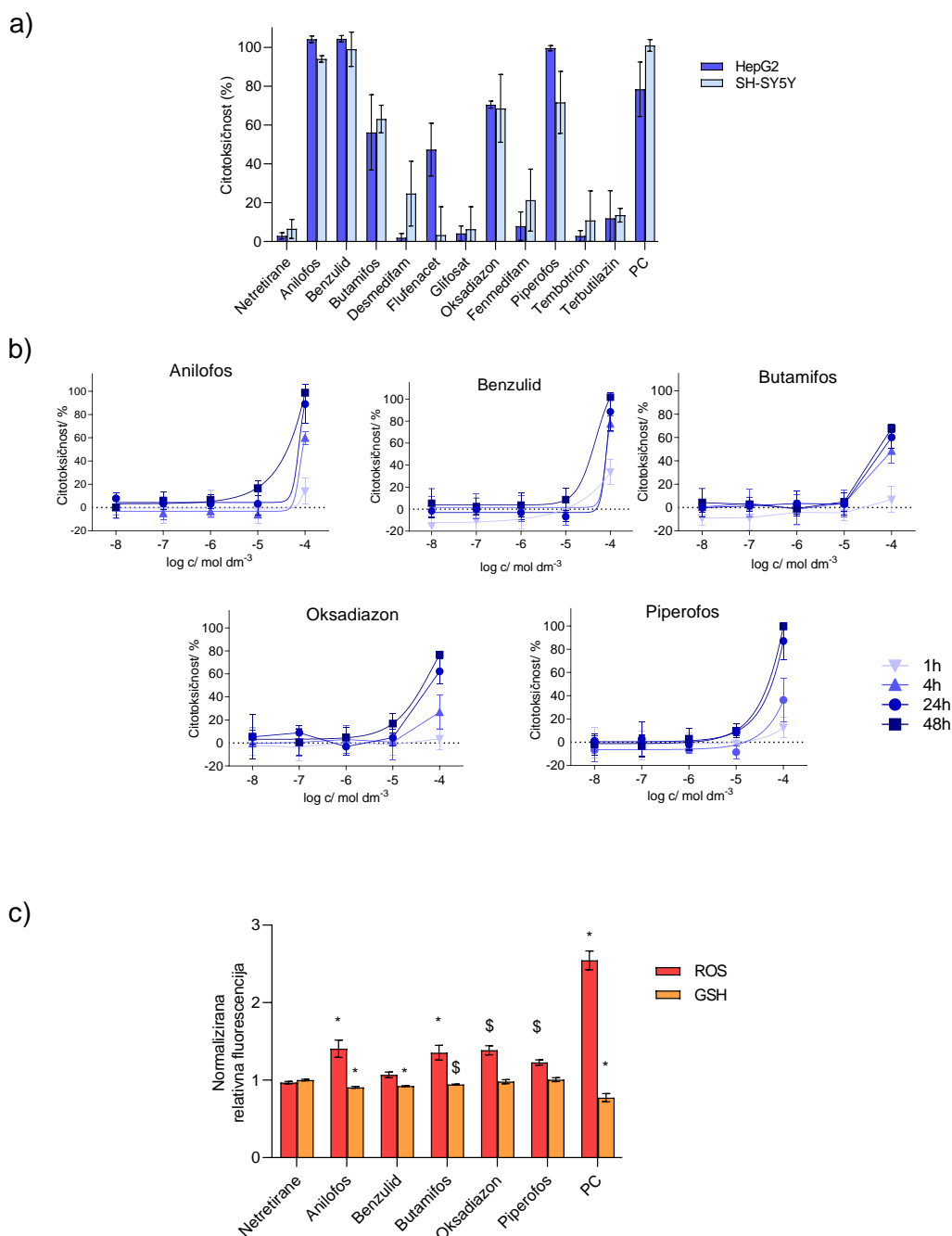
Citotoksičnost odabranih herbicida ispitana je na ljudskim živčanim (SH-SY5Y) i jetrenim (HepG2) staničnim linijama nakon 24 sata izlaganja istima. Za probir odabrana je $100 \mu\text{mol dm}^{-3}$ koncentracija herbicida. Od 11 testiranih herbicida četiri fosfotioata (anilofos, benzulid, butamifos, piperofos) i oksadiazon pokazali su visoku citotoksičnost na obje stanične linije, a desmedifam, fenmedifam i flufenacet citotoksični efekt na SH-SY5Y ili na HepG2 (**slika 4.15a**). Važno je naglasiti da u provedenim eksperimentima glifosat, tembotrion, terbutilazin, desmedifam i fenmedifam nisu pokazali značajnije toksično djelovanje.

Nadalje, testirana je koncentracijski i vremenski ovisna citotoksičnost odabranih herbicida na HepG2 stanicama kao modelu. S obzirom da HepG2 stanice iskazuju veliku metaboličku aktivnost, opaženi toksični efekti mogu biti posljedica nastanka metaboličkih produkata herbicida. Kao što su i rezultati pokazali odabrani herbicidi nisu citotoksični kod koncentracija nižih od $10 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ni u jednom vremenski testiranom periodu (**slika 4.15b**). Međutim, kod koncentracije od $100 \mu\text{mol dm}^{-3}$, citotoksični efekt je opažen već nakon jednog sata izlaganja, ukazujući na brzu smrt stanice vjerojatno uzrokovana samim spojem, herbicidom.

Provedeni su eksperimenti kako bi se istražilo da li poremećaji oksidacijsko/antioksidacijske ravnoteže mogu biti okidač za opaženu brzu citotoksičnost. Na SH-SY5Y staničnoj liniji mjerena je količina generiranih kisikovih vrsta (ROS) i razina glutationa (GSH) nakon 1 sata izlaganja herbicidima koncentracije $100 \mu\text{mol dm}^{-3}$. Kako se može vidjeti na **slici 4.15c** svi testirani herbicidi su povećali razinu ROS osim benzulida. Međutim, benzulid, anilofos i butamifos su reducirali unutarstaničnu razinu GSH i iako na grafičkom prikazu (**slika 4.15c**) vrijednosti za benzulid, anilofos i butamifos izgledaju gotovo jednako kao kontrola, pokazalo se da statistički značajno reduciraju unutarstaničnu razinu GSH. Povećanje ROS i smanjenje razine GSH je indikativno za oštećenje/poremećaj u antioksidacijskom sustavu i nastanka oksidacijskog stresa što može rezultirati smrću stanice i razvojem bolesti¹⁶⁰.

Također, važno je istaknuti da su herbicidi iz klase K3 (anilofos i piperofos) i klase Z (benzulid) bili citotoksični i za živčane i jetrene stanice, ali kod najviših koncentracija koje se ne mogu očekivati da budu prisutne u organizmu čak i u slučaju njihove akumulacije¹⁶¹. Ovisno o strukturi odabranih herbicida, fosfotioati su bili najtoksičniji, što je bilo predviđeno i *in silico* analizom. Iznenadujuće, nije opažena nikakva vremenski ovisna citotoksičnost, što može

značiti da je smrt stanice uzrokovana aktivacijom nekontroliranog puknuća membrane



Slika 4.15. Citotoksičnost i oksidacijski stres izazivan odabranim herbicidima (100 μM): a) citotoksičnost procjenjena na HepG2 i SH-SY5Y stanicama MTS testom nakon 24 sata izlaganja i b) citotoksičnost procijenjena na HepG2 stanicama nakon izlaganja 1, 4, 24 i 48 sati. Staurosporin (3 μM) je korišten kao pozitivna kontrola (PC). Rezultati su prikazani kao postotak citotoksičnosti testiranih herbicida u odnosu na netretirane stanice i c) intenzitet fluorescencije proporcionalan razini ROS i GSH u SH-SY5Y stanicama nakon izlaganja od 1h. Pozitivne kontrole (PC) bile su: H_2O_2 (100 μM) za iniciranje ROS-a i tBOOH (100 μM) za određivanje GSH. Statistička značajnost: Ordinary one-way ANOVA -Dunett's test ($\#p < 0.01$; $\$p < 0.01$; $*p < 0.0001$) u usporedbi s netretiranim stanicama.

pomoću laktat dehidrogenaze povezane sa staničnim stresom^{149,162}. Drugim riječima, opažena citotoksičnost nije bila direktna posljedica vezanja na AChE nego vjerojatnije rezultat nekakvog drugog mehanizma. Također, postoji jaka indikacija da obje, AChE i BChE imaju ne-katalitičku ulogu u neurobiologiji i da njihova inhibicija može imati moguće efekte u neurološkom razvoju gdje imaju „morfo-genetsku“ ulogu u sustavu kralježnjaka^{163,164}.

Treba napomenuti da neiskazana citotoksičnost odabranih herbicida ne isključuje njihovu moguću toksičnost nakon višekratnog/kroničnog izlaganja organizma. Naprimjer, piperofos uzrokuje značajno smanjenje biosinteze testosterona kod Leydigovih stanica prijeteći zdravlju reproduktivnog sustava⁷⁶ dok je oksadiazon izazvao reproduktivnu toksičnost i aktivnost kao endokrini disruptor⁹¹. Glifosat i njegov metabolit aminometilfosfonska kiselina induciraju značajniju citotoksičnost i neurotoksičnost u SH-SY5Y stanicama kroz povećanje ROS-a i mijenjajući ekspresiju gena povezanih s neurološkim razvojem, apoptozom i autofagijom¹⁶⁵. Štoviše, za glifosat je određena $IC_{50} = 5,36 \pm 1,12 \text{ mmol dm}^{-3}$ na SH-SY5Y stanicama¹⁶⁵. Dobiveni rezultati za karbamate, desmedifam i fenemedifam bili su u skladu s izvješćima EFSA i dostupnim podacima te nisu izazivali neurotoksičnost i imunotoksičnost¹⁶⁵⁻¹⁶⁸. Također, potrebno je spomenuti moguće toksične efekte komercijalne smjese herbicida. Za komercijalnu smjesu desmedifama i fenmedifam zajedno s etofumesatom (N/K3) otkrivena je opasnost od reproduktivne i razvojne toksičnosti na *Daphnia spp.* organizmu¹⁹.

4.4. Odabrani herbicidi i neurotoksičnost

Herbicidi su vrsta pesticida koja se uglavnom smatrala slabom ili netoksičnom skupinom spojeva. Istraživanje mehanizama toksičnosti herbicida općenito ili neurotoksičnosti u ljudima i drugim sisavcima dugo je bilo podcijenjeno. Glavni razlog tome je što većina herbicida u korovima djeluju mehanizmima koji nisu pronađeni u ljudskom organizmu i drugim sisavcima^{39,52}.

Provedeno istraživanje pokazalo je da su organofosforni spoj anilofos, oksiacetanilid flufenacet i karbamat fenmedifam učinkoviti inhibitori AChE i BChE sa određenim IC₅₀ vrijednostima u nižem mikromolarnom rasponu (8-25 μmol dm⁻³). *In silico* analizom za anilofos su predviđena fizikalno-kemijska svojstva koja omogućuju prolazak kroz krvno-moždanu barijeru i djelovanje u središnjem živčanom sustavu. U studiji Hazarike i sur. primijećene su promjene u ponašanju i naglašena kolinergička aktivnost u štakora nakon akutnog izlaganja anilofosu⁷¹ i inhibicija aktivnosti acetilkolinesteraze u mozgu i jetri mužjaka štakora⁷¹, što može upućivati na neurotoksično djelovanje anilofosa i izazivanja simptoma kolinergičke krize u organizmu.

Oksiacetanilid, flufenacet se uz anilofos pokazao kao najpotentniji inhibitor AChE i BChE, a fizikalno-kemijska svojstva omogućuju mu prolazak kroz krvno-moždanu barijeru i djelovanje u središnjem živčanom sustavu. Istraživanja su pokazala da flufenacet reducira razinu T4 hormona jetre, a izlučivanje hormona štitnjače utječe na razne procese u mozgu, štitnoj žlijezdi i hipofizi⁸⁷ što indirektno može sugerirati na djelovanje flufenaceta na mozak.

Karbamat fenmedifam, osim anilofosa i flufenaceta, pokazao se kao učinkovit inhibitor kolinesteraza što se može povezati sa dosadašnjim saznanjima da su mnogi karbamati poznati inhibitori kolinesteraza^{107,151}. *In silico* predviđena su fizikalno-kemijska svojstva fenmedifama za prolazak kroz krvno-moždanu barijeru i ostanak u mozgu. Također, t-SNE analiza herbicida s poznatim inhibitorima kolinesteraza na temelju strukturne sličnosti pozicionirali su karbamate fenmedifam i desmedifam unutar klastera poznatih organofosfornih i karbamatnih inhibitora.

Za organofosforne herbicide anilofos, benzulid, butamifos i piperofos te karbamat desmedifam predviđena su fizikalno-kemijska svojstva za prolazak kroz krvno-moždanu barijeru (pozitivna vrijednost *BBB_Filter*) i njihov ostanak u mozgu (pozitivna vrijednost *logBB*) i potencijalno neurotoksično djelovanje u mozgu. Međutim, odabrani herbicidi su se pokazali kao potentniji inhibitori BChE što predstavlja dobru indicaciju za njihovu metaboličku

degradaciju pomoću BChE iz plazme prije nego stignu do središnjeg živčanog sustava i izazovu simptome kolinergičke krize.

Glifosat, oksadiazon, tembotrion i terbutilazin imaju vrlo slabi inhibitorni učinak za obje kolinesteraze, AChE i BChE gdje je inhibicija s oba enzima s najvišim testiranim koncentracijama za ove spojeve bila manja od 10-20 % aktivnosti enzima. Ovi rezultati odgovaraju rezultatima studije o glifosatu gdje je ljudska eritrocitna AChE inhibirana 10-20 % glifosatom⁶³ sličnim koncentracijama herbicida.

Oksadiazon inhibira ljudske kolinesteraze u koncentracijskom rasponu većem od najveće testirane koncentracije od 100 $\mu\text{mol dm}^{-3}$. Degl`Innocenti i sur.⁹⁰ pokazali su da oksadiazon ima potencijal za neurotoksično djelovanje, ali potrebna su dodatna istraživanja kako bi se objasnio točan mehanizam neurotoksičnog djelovanja na organizam. Za tembotrion i terbutilazin nisu pronađeni podaci koji bi govorili o njihovoj potencijalnoj neurotoksičnosti unatoč atrazinu²⁶, strukturnom analogu terbutilazina čije djelovanje može voditi do neurodegenerativnog stanja organizma.

Za odabrane herbicide predviđena su toksična svojstva prema *Tetrahymena pyriformis* i *Daphnia magna*, organizmima koji se često koriste za predviđanje mogućih neuromodulatornih djelovanja organizama^{140,152,155} što može biti dobra indikacija prilikom probira potencijalnih neurotoksičnih spojeva za daljnja *in vitro* i *in vivo* istraživanja.

Zanimljivo je da herbicidi K3 klase, anilofos i flufenacet kao najpotentniji inhibitori obje kolinesteraze imaju isti strukturni fragment, ali su prema t-SNE dijagramu dosta udaljeni unatoč strukturnoj sličnosti što se može povezati s rezultatima molekuskog uklapanja gdje su se njihove interakcije s aminokiselinskim ostacima u aktivnom mjestu AChE razlikovale jedna od druge.

Butamifos je progresivni inhibitor BChE što bi se moglo objasniti orijentacijom izlazne skupine koja je orijentirana nasuprot atomu kisika (O) katalitički aktivnog serina (Ser198) koji može reagirati nukleofilnim napadom na elektrofilni atom fosfora u butamifosu.

Od 11 testiranih herbicida četiri fosfotioata (anilofos, benzulid, butamifos i piperofos) i oksadiazon bili su citotoksični za živčane i jetrene stanice. U studiji Kojime i sur. pokazano je da su butamifos i piperofos vrlo dobri agonisti za ljudski nuklearni X receptor, a butamifos i za mišji što može imati indikacije za njihovo djelovanje na metabolizam i endokrini sustav organizma⁷⁵. S druge strane, Li i sur. su pokazali da se inhibicija s benzulidom nije povećala u jetrenim mikrosomima štakora što ukazuje da benzulid nije podložan biotransformaciji na

citokromima P450 u okso derivat za koje se smatra da su jači inhibitori AChE od tioorganofosfornih spojeva.¹⁶⁹ Lemaire i sur. su pokazali da oksadiazon ima afinitet kao potencijalni hPXR ligand što može biti indikacija za djelovanje na endokrini sustav⁹¹. Svi ovi poznati rezultati mogu se povezati s opaženim citotoksičnim efektima na testiranim staničnim linijama jer herbicidi kao ksenobiotici ulaze u organizam, vežu se na nuklearni X ligand te djeluju na metaboličke procese, endokrini i imunološki sustav u organizmu^{74,75,91} što dovodi do promišljanja da opažena citotoksičnost nije bila direktna posljedica vezanja na AChE nego vjerojatnije rezultat nekog drugog mehanizma.

Istraživanje provedeno u okviru ove doktorske disertacije iznjedrilo je nova saznanja o različitim vrstama toksičnosti herbicida, njihovim potencijalom za inhibicijom AChE i BChE, razvojem neurotoksičnosti i citotoksičnosti na određenim staničnim linijama. *In silico* analiza toksičnosti herbicida identificirala je koje vrste toksičnosti nastaju djelovanjem herbicida i najtoksičnije klase herbicida. *In vitro* istraživanja pokazala su koji herbicidi su potencijalni inhibitori AChE i BChE te da su selektivniji inhibitori BChE. Citotoksičnost herbicida je uočena kod najviših primijenjenih koncentracija herbicida koje je teško očekivati da budu prisutne u organizmu čak i u slučaju njihove akumulacije¹⁶¹. Međutim, studije koje su istraživale specifične urođene mane pokazale su povezanost rada na poljoprivrednim površinama i pojave urođenih malformacija uključujući i blago povećani rizik za oštećenjem središnjeg živčanog sustava¹⁵.

Daljnji naponi u istraživanjima toksičnosti i mehanizama djelovanja herbicida trebaju ići prema dizajnu i sintezi novih, selektivnijih i učinkovitijih komercijalnih herbicida, a manje štetnih za zdravlje i okoliš. Također, treba provoditi odgovarajuće mjere zaštite, sanacije i skladištenja herbicida koji nisu više u upotrebi. Zaštitu poljoprivrednika i korisnika herbicidnih proizvoda potrebno je provoditi kroz edukaciju o zaštitnim mjerama i procedurama odnosno sigurnom rukovanju i uporabi istih. Sve navedeno je u potpori Nacionalnom programu održive upotrebe pesticida kroz osiguranje visoke razine zaštite zdravlja ljudi i životinja te zaštite okoliša i očuvanja bioraznolikosti.

§ 5. ZAKLJUČAK

- Računalna analiza predviđanja raznih vrsta toksičnosti za 346 komercijalno dostupna herbicida, provedena pomoću modela toksičnosti pokazala je njihov dominantni potencijal za reproduktivnu/razvojnu toksičnost, posebno za herbicide iz klase A, E, F1, K1, K3 i Z. Za herbicide iz klase F1 i K3 predviđena fizikalno-kemijska svojstva otkrila su njihov potencijal za prolazak kroz krvno-moždanu barijeru i njihovo zadržavanje u mozgu što podržava hipotezu o njihovoj neurotoksičnosti. Za herbicide iz klase F1 (85,7 %), K1 (83,3 %), E (67,9 %) i K3 (62,1 %) predviđena su fizikalno-kemijska svojstva za bioakumulaciju što može biti indikacija za izazivanje kronične toksičnosti u organizmu.
- Računalna analiza predviđanja raznih vrsta toksičnosti za 163 herbicida van upotrebe ukazala je na povećanu mogućnost razvoja kromosomskih aberacija i veći potencijal za bioakumulaciju herbicida za razliku od komercijalnih herbicida. Potencijalno najtoksičniji pokazali su se herbicidi iz klase K3 i N. Njihova predviđena fizikalno-kemijska svojstva pokazala su mogućnost prolaska kroz krvno-moždanu barijeru, zadržavanje u mozgu i neurotoksično djelovanje.
- Sveukupna računalna analiza je pokazala da za svaku klasu herbicida postoji opasnost od barem jedne vrste toksičnosti, a posebno potencijalno toksični s više predviđenih mogućih toksičnih ishoda su herbicidi iz klasa K1, K3, M, F1 i E (HRAC klasifikacija)
- *In vitro* istraživanja provedena na ljudskim kolinesterazama dokazala su da kemijska struktura herbicida određuje ne samo njihov mehanizam djelovanja i njihovu toksičnost nego utječe na vezanje u enzime, njihovu inhibiciju i selektivnost. Organofosforni spoj anilofos (K3), karbamat fenmedifam (C1) i oksiacetanilid flufenacet (K3) bili su učinkoviti inhibitori AChE i BChE s IC_{50} vrijednostima u nižem mikromolarnom koncentracijskom rasponu od 6 do 50 $\mu\text{mol dm}^{-3}$. Iz IC_{50} vrijednosti može se zaključiti da organofosforni spojevi, anilofos, benzulid (Z), butamifos (K1) i piperofos (K3) te karbamat desmedifam (C1) bolje inhibiraju BChE nego AChE te ih se može smatrati selektivnim inhibitorima BChE. Butamifos i piperofos su najselektivniji inhibitori

BChE jer je njihova IC₅₀ vrijednost za AChE izmjerena u koncentracijskom rasponu većem od najveće testirane koncentracije 100 μmol dm⁻³. Organofosforni spojevi i karbamati koji pripadaju HRAC klasama C1, K1, N i K3 potvrdili su se kao potentni inhibitori ljudskih kolinesteraza podupirući rezultate računalne analize predviđanja i t-SNE analize.

- Organofosforni herbicidi – anilofos, benzulid i piperofos inhibiraju obje kolinesteraze kroz mrežu ne-kovalentnih i kovalentnih interakcija, dok butamifos inhibira jedino kroz kovalentno vezanje na katalitički aktivan serin. Iz dobivenih rezultata inhibicije vidljivo je da su svi organofosforni herbicidi generirali značajne količine reverzibilnog kompleksa što znači da su obje, progresivna i reverzibilna inhibicija posljedica simultanih kovalentnih i ne-kovalentnih enzim-inhibitor interakcija i vjerojatni alosterički efekt gdje se progresivno fosforilira aktivno mjesto, a vezanje inhibitora na periferno mjesto izaziva reverzibilnu inhibiciju. Fosfoamidotioat, butamifos progresivno inhibira BChE te ga se može svrstati u isti rang s okso-fosfatnim insekticidima, jakim inhibitorima BChE.
- Glifosat nije inhibirao AChE, niti BChE što ukazuje da mehanizam izazivanja toksičnosti ne uključuje kolinergični sustav.
- Anilofos, benzulid, butamifos, piperofos i oksadiazon pokazali su visoku citotoksičnost i na ljudskim živčanim (SH-SY5Y) i na jetrenim stanicama (HepG2), a desmedifam, fenmedifam i flufenacet imali su citotoksični efekt na jednoj od ovih staničnih linijaili na. Odabrani herbicidi nisu bili citotoksični kod koncentracija nižih od 10 μmol dm⁻³ ni u jednom vremenski testiranom periodu. Međutim, smrt stanice je opažena već nakon 1 sata izlaganja kod koncentracije herbicida od 100 μmol dm⁻³. Svi testirani herbicidi, osim benzulida su povećali razinu ROS nakon 1 sata izlaganja pri koncentraciji od 100 μmol dm⁻³ na SH-SY5Y staničnoj liniji, a benzulid, anilofos i butamifos su reducirali unutarstaničnu razinu GSH što može stvoriti uvjete za nastanak oksidacijskog stresa. S obzirom da nije opažena vremenski ovisna citotoksičnost može se promišljati da opažena citotoksičnost nije bila direktna posljedica vezanja sa AChE nego vjerojatnije nekakvog drugog mehanizma.

- Ova saznanja kao i opažena citotoksičnost na ljudskim živčanim i jetrenim stanicama ukazuju na potencijalne toksične učinke komercijalno dostupnih herbicida i mogu se koristiti za razvoj novih herbicida s manje štetnih učinaka za ljude i okoliš.

§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ (prema potrebi)

Kratica	Značenje
ACh	Acetilolin
AChE	Acetilolinesteraza
ADMET	Apsorpcija, distribucija, metabolizam, ekskrecija i toksikologija (engl. <i>Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicity</i>)
BBB	Krvno-moždana barijera (engl. <i>Blood-brain barrier</i>)
BChE	Butirilkolinesteraza
ChI	Inhibitor kolinesteraze
CNS	Središnji živčani sustav (engl. <i>Central nervous system</i>)
DNOC	2,4-dinitro- <i>o</i> -krezol
2,4-D	2,4-diklorofenoksiacetatna kiselina
ECHA	Europska agencija za kemikalije
EMA	Europska agencija za lijekove (engl. <i>European Medicines Agency</i>)
EPSP	5-enolpiruvilšikimat-3-fosfat
FDA	Američka agencija za hranu i lijekove (engl. <i>U.S. Food and Drug Administration</i>)
GABA	γ -aminobutanska kiselina
HBD	engl. <i>hydrogen bond donor</i>
HRAC	Odbor za borbu protiv otpornosti korova na herbicide (engl. <i>Herbicide Resistance Action Committee</i>)
IC ₅₀	Koncentracija koja uzrokuje 50 %-tnu inhibiciju danog parametra
OP	Organofosfatni spoj
PŽS	Periferni živčani sustav
PXR	Nuklearni X receptor (engl. <i>Pregnane X receptor</i>)
QSAR	Kvantitativni odnos strukture i aktivnosti
REACH	Registracija, evaluacija, autorizacija i restrikcija kemikalija (engl. <i>Registration, Evaluation, aAuthorization and Restiction of Chemicals</i>)
ROS	Reaktivne kisikove vrste (engl. <i>Reactive oxygen species</i>)

VLCA	Vrlo dugački lanci masnih kiselina (engl. <i>Very long-chain fatty acids</i>)
WSSA	Američko društvo za znanost o korovima (engl. <i>Weed Science Society of America</i>)

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. FAOSTAT Analytical Brief Series No. 16. F. Pesticides use. Global, regional and country trends, 1990-2018, FAO, Rome, 16, 2021.
2. A. S. Jurado, M. A. S. Fernandes, R. A. Videira, F. P. Peixoto i J. A. F. Vicente, Herbicides: the Face and the Reverse of the Coin. An in Vitro Approach to the Toxicity of Herbicides in Non-Target Organisms, u A. Kortekamp (ur.), *Herbicides and Environment*, IntechOpen, London, 2011, str. 3–44.
3. P. K. Gupta, Toxicity of herbicides u P. K. Gupta (ur.), *Veterinary Toxicology*, Elsevier Inc., 2018, str. 553–567.
4. S. Vats, Herbicides: History, classification and genetic manipulation of plants for herbicide resistance, u E. Lichtfouse (ur.), *Sustainable Agriculture Reviews*, Springer Inc., 2015, str. 153–192.
5. R. Judson, A. Richard, D. J. Dix, K. Houck, M. Martin, R. Kavlock, V. Dellarco, T. Henry, T. Holderman, P. Sayre, S. Tan, T. Carpenter i E. Smith, The toxicity data landscape for environmental chemicals, *Environ. Health Perspect.* **117** (2009) 685–695.
6. H. Yang, L. Sun, W. Li, G. Liu i Y. Tang, *In Silico* Prediction of Chemical Toxicity for Drug Design Using Machine Learning Methods and Structural Alerts, *Front. Chem.* **6** (2018) 1–12.
7. P. K. Gupta, Toxicological testing: *in vitro* models, u P.K. Gupta (ur.), *Fundamentals of Toxicology*, Academic Press, Elsevier Inc., 2016, 123–130.
8. P. K. Gupta, Toxicological testing: *in vivo* systems u P.K. Gupta (ur.), *Fundamentals of Toxicology*, Academic Press, Elsevier Inc., 2016, 131–150.
9. M. D. Barratt i R. A. Rodford, The computational prediction of toxicity, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5** (2001) 383–388.
10. V. I. Lushchak, T. M. Matviishyn, V. V. Husak, J. M. Storey i K. B. Storey, Pesticide toxicity: A mechanistic approach. *EXCLI J.* **17** (2018), 1101–1136.

11. M. Z. Khan i F. C. P. Law, Adverse effects of pesticides and related chemicals on enzyme and hormone systems of fish, amphibians and reptiles: a review. *Proc. Pakistan Acad. Sci.* **42** (2005) 315–323.
12. L. Yang, H. Li, Y. Zhang i N. Jiao, Environmental risk assessment of triazine herbicides in the Bohai Sea and the Yellow Sea and their toxicity to phytoplankton at environmental concentrations. *Environ. Int.* **133** (2019), 105–175.
13. I. G. Dubus, J. M. Hollis i C. D. Brown, Pesticides in rainfall in Europe, *Environ. Pollut.* **110** (2000) 331–344.
14. S. Babić, J. Barišić, D. Stipaničev, S. Repec, M. Lovrić, O. Malev, D. Martinović-Weigelt, R. Čož-Rakovac i G. Klobučar, Assessment of river sediment toxicity: Combining empirical zebrafish embryotoxicity testing with in silico toxicity characterization, *Sci. Total Environ.* **643** (2018) 435–450.
15. C. Bolognesi i F. D. Merlo, Pesticides: Human Health Effects, u J. O. Nriagu (ur.), *Encyclopedia of Environmental Health*, Elsevier, Burlington, 2011, str. 438–453.
16. T. Katagi, Bioconcentration, bioaccumulation and metabolism of pesticides in aquatic organisms, u D. M. Whitacre (ur.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Springer Science+Business Media, 2010, str. 1–103.
17. R. van der Oost, J. Beyer i N. P. E. Vermeulen, Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **13** (2003), 57–149.
18. S. Mostafalou, M. Abdollahi, Pesticides: an update of human exposure and toxicity, *Arch. Toxicol.* **91** (2017) 549–599.
19. T. Vidal, J. L. Pereira, N. Abrantes, A. M. V. M. Soares i F. Gonçalves, Reproductive and developmental toxicity of the herbicide Betanal® Expert and corresponding active ingredients to *Daphnia spp.*, *Environ. Sci. Pollut. Res.* **23** (2016) 13276–87.
20. M. Aggarwal, P. B. Wangikar, S.N. Sarkar, G. S. Rao, D. Kumar, P. Dwivedi i J. K. Malik, Effects of low-level arsenic exposure on the developmental toxicity of anilofos in rats, *J. Appl. Toxicol.* **27** (2007) 255–61.

21. F. Zhao, H. Li, F. Chao, X. Chen, Y. Liang i L. Qiu, Short-term developmental toxicity and potential mechanisms of the herbicide metamifop to zebrafish (*Danio rerio*) embryos, *Chemosphere* **236** (2019) 124590.
22. E. A. Lock, Inhibition of rat brain and human red cell acetylcholinesterase by thiocarbamate herbicides, *Toxicol. Res. (Camb.)* **9** (2020) 591–600.
23. P. Iyer i S. Makris, Developmental and reproductive toxicology of pesticides, u R. I. Krieger i W. C. Krieger (ur.), *Handbook of Pesticide Toxicology*, Vol.1: Principles, Elsevier Inc. , 2001, str. 375–423.
24. P. K. Gupta, Herbicides and fungicides, u R. C. Gupta (ur.), *Reproductive and Developmental Toxicology*, Academic Press, 2017, str. 657–679.
25. H. Ding, W. Zheng, H. Han, X. Hu, B. Hu, F. Wang, L. Su, H. Li i Y. Li, Reproductive toxicity of linuron following gestational exposure in rats and underlying mechanisms, *Toxicol. Lett.* **266** (2017) 49–55.
26. K. Ma, H.-Y. Wu, B. Zhang, X. He i B.-X. Li, Neurotoxicity effects of atrazine-induced SH-SY5Y human dopaminergic neuroblastoma cells *via* microglial activation, *Mol. BioSyst.* **11** (2015) 2915–24.
27. R. X. Martins, L. Vieira, J. Alves Costa Ribeiro Souza, M. G. F. Silva, M. S. Muniz, T. Souza, F. Ramos Quieroga, M. Rodrigues Ferreira Machado, P. M. da Silva i D. Farias, Exposure to 2,4-D herbicide induces hepatotoxicity in zebrafish larvae, *Comp. Biochem. Physiol. Part – C: Toxicol. Pharmacol.* **248** (2021) 109110.
28. Y. Hao, Y. Zhang, H. Ni, J. Gao, Y. Yang, W. Xu i L. Tao, Evaluation of the cytotoxic effects of glyphosate herbicides in human liver, lung and nerve, *J. Environ. Sci. Health B* **54** (2019) 737–744.
29. M. Ravlić i R. Baličević, Biološka kontrola korova biljnim patogenima, *Poljoprivreda* **20** (2014) 34–40.
30. G. Forget, Pesticides and third world, *J. Toxicol. Environ. Health* **32** (1991) 11-31.
31. H. Frumkin, Agent Orange and cancer: an overview for clinicians, *CA Cancer J. Clin.* **53** (2003) 245–55.

32. D. L. Shaner, Herbicides safety relative to common targets in plants and mammals, *Pest Manag. Sci.* **60** (2003) 17–24.
33. I. Jablonkai, Molecular mechanism of action of herbicides, u M. Nagib Hasaneen (ur.), *Herbicides - Mechanisms and Mode of Action*, IntechOpen, 2011, str. 3–24.
34. <http://wssa.net/wssa/weed/herbicides/> (preuzeto 23. studenog 2019. god.)
35. <https://hracglobal.com/tools/classification-lookup> (preuzeto 17. travnja 2017. god.)
36. A. Forouzesh, E. Zand, S. Soufizadeh i S. Samadi Foroushani, Classification of herbicides according to chemical family for weed resistance management strategies – an update, *Weed Res.* **5** (2015) 334–358.
37. <https://hracglobal.com/tools/hrac-mode-of-action-classification-2022-map> (preuzeto 15. ožujka 2022. god.)
38. C. Délye, M. Jasieniuk i V. Le Corre, Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds, *Trends Genet.* **29** (2013) 649–658.
39. J. R. Richardson, V. Fitsanakis, R. H. S. Westerink i A. G. Kanthasamy, Neurotoxicity of pesticides, *Acta Neuropathol.* **138** (2019) 343–362.
40. R. Maurya i A. K. Pandey, Importance of protozoa *Tetrahymena* in toxicological studies: a review, *Sci. Total Environ.* **741** (2020) 140058.
41. J.-L. Bonnet, F. Bonnemoy, M. Dusser i J. Bohatier, Assesment of the potential toxicity of herbicides and their degradation products to nontarget cells using two microorganisms, the bacteria *Vibrio fischeri* i ciliate *Tetrahymena pyriformis*, *Environ. Toxicol.* **22** (2007) 78–91.
42. I.V. Maksymiv, V. V. Husak, N. M. Mosiichuk, T. M. Matviishyn, I. Y. Sluchyk, J. M. Storey, K. B. Storey i V. I. Lushchak, Hepatotoxicity of herbicide *Sencor* in goldfish may result from induction of mild oxidative stress, *Pestic. Biochem. Physiol.* **122** (2015) 67–75.
43. N. M. Mosiichuk, V. V. Husak, I. V. Maksymiv, O. Y. Hlodan, J. M. Storey, K. B. Storey i V. I. Lushchak, Toxicity of environmental Gesagard to goldfish may be connected with

- induction of low intensity oxidative stress in concentration and tissue related manners, *Aquat.* **165** (2015) 249–258.
44. T. Cavas, In vivo genotoxicity evaluation of atrazine and atrazine-based herbicide on fish *Carassius auratus* using the micronucleus test and the comet assay, *Food Chem. Toxicol.* **49** (2011) 1431–1435.
 45. T. C. Kwong, Organophosphate pesticides: biochemistry and clinical toxicology, *Ther. Drug Monit.* **24** (2002) 144–9.
 46. M. Abdollahi, S. Karami-Mohajeri, A comprehensive review on experimental and clinical findings in intermediate syndrom caused by organophosphate poisoning, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **258** (2012) 309–314.
 47. A. Chatonnet i O. Lockridge, Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase, *Biochem J.* **260** (1989) 625–634.
 48. T. Petreski, B. Kit, M. Strnad, D. Grnec i F. Svenšek, Cholinergic syndrome: a case report of acute organophosphate and carbamate poisoning, *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **71** (2020) 163-166.
 49. Y. Yurumez, P. Durukan, Y. Yavuz, I. Ikizceli, L. Avsarogullari, S. Ozkan, O. Akdur i C. Ozdemir, Acute organophosphate poisoning in university hospital emergency room patients, *Intern. Med.* **46** (2007) 965-9.
 50. S. Darvesh, D. A. Hopkins i C. Geula, Neurobiology of butyrylcholinesterase, *Nat. Rev. Neurosci.* **4** (2003) 131-8.
 51. T. Čadež, Z. Kovarik, Advancements in recombinant technology for production of butyrylcholinesterase, a bioscavenger of nerve agents, *Period. Biol.* **1-2** (2020) 55-63.
 52. C. M. Benbrook, Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally, *Environ. Sci. Eur.* **28** (2016) 1-15.
 53. J. M. Green i G. B. Beestman, Recently patented and commercialized formulation and adjuvant technology, *Crop Prot.* **26** (2007) 320-327.
 54. Pesticide Properties DataBase (PPDB), <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/> (preuzeto 8. siječnja 2017. god.)

55. G. M. Williams, R. Kroes i I. C. Munro, Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **31** (2000) 117–165.
56. W. Cai, Y. Ji, X. Song, H. Guo, L. Han, F. Zhang, X. Liu, H. Zhang, B. Zhu i M. Xu, Effects of glyphosate exposure on sperm concentration in rodents: A systematic review and meta-analysis, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **55** (2017) 148–155.
57. G. Anifandis, K. Katsanaki, G. Lagodonti, C. Messini, M. Simopoulou, K. Dafopoulos i A. Daponte, The effect of glyphosate on human sperm motility and sperm DNA fragmentation, *Int. J. Environ. Res. Public Health* **15** (2018) 1117.
58. M. Eriksson, L. Hardell, M. Carlberg i M. Åkerman, Pesticide exposure as risk factor for non-Hodgkin lymphoma including histopathological subgroup analysis, *Int. J. Cancer* **123** (2008) 1657–1663.
59. C. Jayasumana, S. Gunatilake i P. Senanayake, Glyphosate, Hard Water and Nephrotoxic Metals: Are They the Culprits Behind the Epidemic of Chronic Kidney Disease of Unknown Etiology in Sri Lanka?, *Int. J. Environ. Res. Public Health* **11** (2014) 2125–2147.
60. O. S. von Ehrenstein, C. Ling, X. Cui, M. Cockburn, A. S. Park, F. Yu, J. Wu i B. Ritz, Prenatal and infant exposure to ambient pesticides and autism spectrum disorder in children: population based case-control study, *BMJ* **364** (2019) 1962.
61. N. Defarge, J. Spiroux de Vendômois i G. E. Séralini, Toxicity of formulants and heavy metals in glyphosate-based herbicides and other pesticides, *Toxicol. Rep.* **5** (2018) 156–163.
62. F. Peixoto, Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation, *Chemosphere* **61** (2005) 1115–1122.
63. M. Kwiatkowska, H. Nowacka-Krukowska i B. Bukowska, The effect of glyphosate, its metabolites and impurities on erythrocyte acetylcholinesterase activity, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **37** (2014) 1101–1108.

64. F. M. El-Demerdash, M. I. Yousef i E. I. Elagamy, Influence of paraquat, glyphosate, and cadmium on the activity of some serum enzymes and protein electrophoretic behavior (in vitro), *J. Environ. Sci. Health B.* **36** (2001) 29-42.
65. D. Bridi, S. Altenhofen, J. B. Gonzalez, G. Kellermann Reolon i C. D. Bonan, Glyphosate and Roundup® alter morphology and behavior in zebrafish, *Toxicol.* **392** (2017) 32-39.
66. N. M. Roy, B. Carniero i J. Ochs, Glyphosate induces neurotoxicity in zebrafish, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **42** (2016) 45-54.
67. D. Cattani, P. Acordi Cesconetto, M. Kruger Tavares, E. Benedetti Parisotto, P. A. De Oliveira, C. E. Heinz Rieg, M. Concli Leite, R. D. Schröder Prediger, N. Cubas Wendt, G. Razzera, D. W. Filho i A. Zamoner, Developmental exposure to glyphosate-based herbicide and depressive-like behavior in adult offspring: Implication of glutamate excitotoxicity and oxidative stress, *Toxicol.* **387** (2017) 67-80.
68. D. Cattani, V. L. de Liz Oliveira Cavalli, C. E. Heinz Rieg, J. Tonietto Domingues, T. Dal-Cim, C. I. Tasca, F. R. M. Barreto Silva i A. Zamoner, Mechanisms underlying the neurotoxicity induced by glyphosate-based herbicide in immature rat hippocampus: Involvement of glutamate excitotoxicity, *Toxicol.* **320** (2014) 34-45.
69. Y. Aitbali, S. Ba-M'hamed, N. Elhidar, A. Nafis, N. Soraa i M. Bennis, Glyphosate based-herbicide exposure affects gut microbiota, anxiety and depression-like behaviors in mice, *Neurotoxicol. Teratol.* **67** (2018) 44-49.
70. PubChem database, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (preuzeto 15. prosinca 2015. god.)
71. A. Hazarika i S. N. Sarkar, Subacute toxicity of anilofos, a new organophosphorus herbicide, in male rats: effect on some physical attributes and acetylcholinesterase activity, *Indian J. Exp. Biol.* **39** (11) (2001) 1107-1112.
72. A. Hazarika, S. N. Sarkar i M. Kataria, Subacute toxicity of anilofos, a new organophosphorus herbicide in male rats: effect on lipid peroxidation and ATPase activity, *Indian J. Exp. Biol.* **39** (11) (2001) 1113-7.
73. P. Bagri i V. Kumar, Acute oral toxicity study of anilofos in swiss albino male mice, *Haryana Vet.* **59** (2020) 10-12.

74. M. Kim, J. Park, H. Lee, W. Lim, G. Song. Bensulide exposure causes cell division cycle arrest and apoptosis in porcine trophectoderm and uterine luminal epithelial cells. *Pestic. Biochem. Physiol.* **193** (2023) 105460.
75. H. Kojima, F. Sata, S. Takeuchi, T. Sueyoshi i T. Nagai, Comparative study of human and mouse pregnane X receptor agonistic activity in 200 pesticides using *in vitro* reporter gene assays, *Toxicol.* **280** (2011) 77-87.
76. G. Viswanath, S. Chatterjee, S. Dabral, S. R. Nanguneri, G. Divya i P. Roy, Anti-androgenic endocrine disrupting activities of chlorpyrifos and piperophos, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **120** (2010) 22–29.
77. C. M. Tanner, F. Kamel, G. Webster Ross, J. A. Hoppin, S. M. Goldman, M. Korell, C. Marras, G. S. Bhudhikanok, M. Kasten, A. R. Chade, K. Comyns, M. Barber Richards, C. Meng, B. Priestley, H. H. Fernandez, F. Cambi, D. M. Umbach, A. Blair, D. P. Sandler i J. W. Langston, Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease, *Environ. Health Perspect.* **119** (2011) 866-72.
78. A. B. Manning-Bog, A. L. McCormack, J. Li, V. N. Uversky, A. L. Fink i D. A. Di Monte, The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein, *J. Biol. Chem.* **277** (2002) 1641-4.
79. A. L. McCormack, J. G. Atienza, L. C. Johnston, J. K. Andersen, S. Vu i D. A. Di Monte, Role of oxidative stress in paraquat-induced dopaminergic cell degeneration, *J. Neurochem.* **93** (2005) 1030-1037.
80. A. L. McCormack, M. Thiruchelvam, A. B. Manning-Bog, C. Thiffault, J. W. Langston, D. A. Cory-Slechta i D. A. Di Monte, Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat, *Neurobiol. Dis.* **10** (2002)119-127.
81. S. F. Ali, Z. K. Binienda i S. Z. Imam, Molecular Aspects of Dopaminergic Neurodegeneration: Gene-Environment Interaction in Parkin Dysfunction, *Int. J. Environ. Res. Public Health* **8** (2011) 4702-4713.

82. C. Song, a. Kanthasamy, H. Jin, V. Anantharam i A. G. Kanthasamy, Paraquat induces epigenetic changes by promoting histone acetylation in cell culture models of dopaminergic degeneration, *Neurotoxicol.* **32** (2011) 586-95.
83. S. J. Chinta, G. Woods, M. Demaria, A. Rane, Y. Zou, A. McQuade, S. Rajagopalan, C. Limbad, D. T. Madden, J. Campisi i J. K. Andersen, Cellular Senescence Is Induced by the Environmental Neurotoxin Paraquat and Contributes to Neuropathology Linked to Parkinson's Disease, *Cell Rep.* **22** (2018) 930-940.
84. T. Vidal, N. Abrantes, A. M. M. Gonçalves i F. Gonçalves, Acute and chronic toxicity of Betanal®Expert and its active ingredients on nontarget aquatic organisms from different trophic levels, *Environ. Toxicol.* **27** (2011) 537–548.
85. C. F. Howcroft, C. Gravato, M. J. .B. Amorim, S. C. Novais, A. M. V. M. Soares, i L. Guilhermino, Biochemical characterization of cholinesterases in *Enchytraeus albidus* and assessment of in vivo and in vitro effects of different soil properties, copper and phenmedipham, *Ecotoxicol.* **20** (2010) 119–130.
86. M. Batsale, D. Bahammou, L. Fouillen, S. Mongrand, J. Joubès i F. Domergue, Biosynthesis and Functions of Very-Long-Chain Fatty Acids in the Responses of Plants to Abiotic and Biotic Stresses, *Cells* **10** (2021) 1284.
87. W. Christenson, B. D. Becker, B. S. Wahle, K. D. Moore, P. D. Dass, S. G. Lake, D. L. von Goethem, B. P. Stuart, G. K. Sangha i J. H. Thyssen, Evidence of Chemical Stimulation of Hepatic Metabolism by an Experimental Acetanilide (FOE 5043) Indirectly Mediating Reductions in Circulating Thyroid Hormone Levels in the Male Rat, *Fundam. Appl. Toxicol.* **29** (1996) 251–259.
88. Y. Huang, J. Ma, Y. Meng, Y. Wei, S. Xie, P. Jiang, Z. Wang, X. Chen, Z. Liu, K. Zhong, Z. Cao, X. Liao, J. Xiao i H. Lu, Exposure to Oxadiazon-Butachlor causes cardiac toxicity in zebrafish embryos, *Environ. Pollut.* **265** (2020) 114775.
89. J. Krijt, I. van Holsteijn, I. Hassing, M. Vokurka i B.J. Blaauboer, Effect of diphenyl ether herbicides and oxadiazon on porphyrin biosynthesis in mouse liver, rat primary hepatocyte culture and HepG2 cells, *Arch. Toxicol.* **67** (1993) 255–261.

90. D. Degl'Innocenti, M. Ramazzotti, E. Sarchielli, D. Monti, M. Chevanne, G. B. Vannelli i E. Barletta, Oxadiazon affects the expression and activity of aldehyde dehydrogenase and acylphosphatase in human striatal precursor cells: a possible role in neurotoxicity, *Toxicol.* **411** (2019) 110-121.
91. G. Lemaire, W. Mnif, J.-M. Pascussi, A. Pillon, F. Rabenoelina, H. Fenet, E. Gomez, C. Casellas, J.-C. Nicolas, V. Cavailès, M.-J. Duchesne i P. Balaguer, Identification of New Human Pregnane X Receptor Ligands among Pesticides Using a Stable Reporter Cell System, *Toxicol. Sci.* **91** (2006) 501–509.
92. A. Küpper, F. Peter, P. Zöllner, L. Lorentz, P.J. Tranel, R. Beffa i T. A. Gaines, Tembotrione detoxification in 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD) inhibitor-resistant Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri* S. Wats.), *Pest Manag. Sci.* **74** (2018) 2325-2334.
93. B. Tariba Lovaković, V. Kašuba, A. Katić, N. Kopjar, A. M. Marjanović Čermak, V. Micek, M. Milić, I. Pavičić, A. Pizent, S. Žunec i D. Želježić, Evaluation of oxidative stress responses and primary DNA damage in blood and brain of rats exposed to low levels of tembotrione, *Chemosphere* **253** (2020) 126643.
94. V. Kašuba, V. Micek, A. Pizent, B. T. Lovaković, D. Želježić, M. Milić i N. Kopjar, DNA damage in kidney and parenchymal and non-parenchymal liver cells of adult Wistar rats after subchronic oral treatment with tembotrione, *Environ. Sci. Pollut. Res.* **27** (2019).
95. S. Žunec, V. Kašuba, I. Pavičić, A. M. Marjanović, B. Tariba, M. Milić, N. Kopjar, A. Pizent, A. Lucić Vrdoljak, R. Rozgaj i D. Želježić, Assessment of oxidative stress responses and the cytotoxic and genotoxic potential of the herbicide tembotrione in HepG2 cells, *Food Chem. Toxicol.* **94** (2016) 64–74.
96. L. Plhalova, S. Stepanova, J. Blahová, E. Praskova, M. Hostovsky, M. Skoric, L. Zelnickova, Z. Svobodova i I. Bedanova, The effects of subchronic exposure to terbuthylazine on zebrafish, *Neuroendocrinol. Lett.* **33** (2012) 113–119.
97. B. Tariba Lovaković, A. Pizent, V. Kašuba, N. Kopjar, V. Micek, G. Mendaš, M. Dvorščak, A. Mikolić, M. Milić, S. Žunec, A. Lucić Vrdoljak i D. Želježić, Effects of sub-chronic exposure to terbuthylazine on DNA damage, oxidative stress and parent compound/metabolite levels in adult male rats, *Food Chem. Toxicol.* **108** (2017) 93–103.

98. T. Živković Semren, S. Žunec i A. Pizent, Oxidative stress in triazine pesticide toxicity: a review of the main biomarker findings, *Arch Hyg Rada Toksikol* **69** (2018) 109–125.
99. https://europa.eu/european-union/about-eu/agencies/echa_hr (preuzeto 13. rujna 2019. god.)
100. <https://echa.europa.eu/hr/regulations/reach/understanding-reach> (preuzeto 17. rujna 2019. god.)
101. <https://echa.europa.eu/support/registration/how-to-avoid-unnecessary-testing-on-animals/qsar-models> (preuzeto 30. travnja 2023. god.)
102. R. Gozalbes i J. Vicente de Julián-Ortiz, Applications of chemoinformatics in predictive toxicology for regulatory purposes, especially in the context of the EU REACH legislation, *Int. J. Quant. Struct. Prop. Relatsh.* **3** (2018) 1–24.
103. <https://reachonline.eu/reach/en/> (preuzeto 3. svibnja 2023. god.)
104. <https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/16129/7/2/2> (preuzeto 15. ožujka 2022. god.)
105. <https://www.simulations-plus.com/software/admetpredictor/toxicity/> (preuzeto 9. prosinca 2018. god.)
106. A. Bosak, M. Katalinić i Z. Kovarik, Cholinesterases: Structure, Role, and Inhibition, *Arch Hyg Rada Toksikol* **62** (2011)175-190.
107. M. B. Čolović, D. Z. Krstić, T. D. Lazarević-Pašti, A. M. Bondžić i V. M. Vasić, Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology, *Curr. Neuropharmacol.* **11** (2013) 315-355.
108. H. Soreq i S. Seidman, Acetylcholinesterase – new roles for and old actor. *Nat. Rev. Neurosci.* **2** (2001) 294-302.
109. W. Poewe, S. Gauthier, D. Aarsland, J. B. Leverenz, P. Barone, D. Weintraub, E. Tolosa i B. Dubois, Diagnosis and management of Parkinson’s disease dementia. *Int. J. Clin. Pract.* **62** (2008) 1581–1587.
110. I. Silman i J. L. Sussman, Recent developments in structural studies on acetylcholinesterase, *J. Neurochem.* **142** (2017) 19–25.

111. J. L. Sussman, M. Harel, F. Frolow, C. Oefner, A. Goldman, L. Toker, i I. Silman, Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein, *Sci.* **253** (1991) 872–879.
112. B. Velan, C. Kronman, A. Ordentlich, Y. Flashner, M. Leitner, S. Cohen i A. Shafferman, N-glycosylation of human acetylcholinesterase: effects on activity, stability and biosynthesis, *Biochem. J.* **296** (1993) 649-656.
113. T. L. Rosenberry, X. Brazzolotto, I. R. Macdonald, M. Wandhammer, M. Trovaslet-Leroy, S. Darvesh i F. Nachon, Comparison of the binding of reversible inhibitors to human butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase: a crystallographic, kinetic and calorimetric study, *Molecules* **22** (2017) 2098.
114. M. Bajda, A. Więckowska, M. Hebda, N. Guzior, C. A. Sottriffer i B. Malawska, Structure-based search for new inhibitors of cholinesterases, *Int. J. Mol. Sci.* **14** (2013) 5608-5632
115. S. M. Stahl, The new cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease, Part 2, Illustrating their mechanisms of action, *J. Clin. Psychiatry*, **61** (2000) 813-814.
116. P. B. Watkins, H. J. Zimmerman, M. J. Knapp, S. I. Gracon i K. W. Lewis, Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease, *Clin. Trial -JAMA*, **271** (1994) 992-8.
117. A. Castro i A. Martinez, Targeting Beta-amyloid pathogenesis through acetylcholinesterase inhibitors, *Curr. Pharm. Des.* **12** (2006) 4377-4387.
118. S. Chitnis i J. Rao, Rivastigmine in Parkinson' disease dementia, *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* **5** (2009) 941-55.
119. M. Pohanka, Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology, *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* **155** (2011) 219-29.
120. Y. Ago, K. Koda, K. Takuma i T. Matsuda, Pharmacological aspects of the acetylcholinesterase inhibitor Galantamine, *J. Pharmacol. Sci.* **116** (2011) 6-17.
121. H. O. Tayeb, H. D. Yang, B. H. Price i F. I. Tarazi, Pharmacotherapies for Alzheimer's disease: beyond cholinesterase inhibitors, *Pharmacol. Ther.* **134** (2012) 8-25.

122. R. C. Gupta (ur.), *Toxicology of Organophosphate and Carbamate Compounds*, Academic Press/Elsevier, Amsterdam, 2006.
123. A. Friedman, D. Kaufer, J. Shemer, I. Hendler, H. Soreq, i I. Tur-Kaspa, Pyridostigmine brain penetration under stress enhances neuronal excitability and induces early immediate transcriptional response, *Nat. Med.* **2** (1996) 1382–1385.
124. D. E. Ray i P. G. Richards, The potential for toxic effects of chronic, low-dose exposure to organophosphates, *Toxicol. Lett.* **120** (2001) 343-351.
125. F. R. Sidell, Soman and Sarin: Clinical Manifestations and Treatment of Accident of Accidental Poisoning by Organophosphates, *Clin. Toxicol.* **7** (1974) 1-17.
126. S. Karami-Mohajeri, A. Ahmadipour, H.-R. Rahimi i M. Abdollahi, Adverse effects of organophosphorus pesticides on the liver: a brief summary of four decades of research, *Arh Hig Rada Toksikol.* **68** (2017) 261-275.
127. M. Valko, M. Izaković, M. Mazur, C. J. Rhodes i J. Telser, Role of oxgen radicals in DNA damage and cancer incidence, *Mol. Cell. Biochem.* **266** (2004) 37-56.
128. M. N. Gandy, M.G. Corral, J.S. Mylne i K. A. Stubbs, An interactive database to explore herbicide physicochemical properties, *Org. Biomol. Chem.* **13** (2015) 5586–5590.
129. J. Gong X. Liu, X. Cao, Y. Diao, D. Gao, H. Li i X. Qian, PTID: an integrated web resource and computational tool for agrochemical discovery, *Bioinformatics* **29** (2013) 292–4.
130. Compendium of Pesticide Common Names, <http://www.bcpcepesticidecompendium.org/> (preuzeto 15. svibnja 2018. god.)
131. D. Oršolić, V. Pehar, T. Šmuc i V. Stepanić, Comprehensive machine learning based study of the chemical space of herbicides, *Sci Rep.* **11** (2021) 11479.
132. RStudio, <http://www.rstudio.com/> (preuzeto 11. studenoga 2022. god.)
133. H. Pajouhesh i G. R. Lenz, Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs. *NeuroRX.* **2** (2005) 541–53.
134. D. Rogers i M. Hahn, Extended-connectivity fingerprints. *J. Chem. Inf. Model.* **50** (2010) 742-54.

135. S. Kim, J. Chen, T. Cheng, A. Gindulyte, J. He, S. He, Q. Li, B. A. Shoemaker, P. A. Thiessen, B. Yu, L. Zaslavsky, J. Zhang i E. E. Bolton, PubChem 2023 update. *Nucleic Acids Res.* **51** (D1) (2023) D373–D80.
136. A. Gaulton, A. Hersey, M. Nowotka, A. P. Bento, J. Chambers, D. Mendez, P. Mutowo, F. Atkins, L. J. Bellis, E. Cibrián-Uhalte, M. Davies, N. Dedman, A. Karlsson, M. P. Magariños, J. P. Overington, G. Papadatos, I. Smit i A. R. Leach, The ChEMBL database in 2017. *Nucleic Acids Res.* **45** (D1) (2017) D945–54.
137. G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres i R. M. Featherstone, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharmacol.* **7** (1961) 88–95.
138. Z. Kovarik, A. Bosak, G. Šinko, T. Latas, Exploring the active sites of cholinesterases by inhibition with bambuterol and haloxon, *Croat. Chem. Acta* **76** (2003) 63–7.
139. H. J. Motulsky, GraphPad Prism 8 Curve Fitting Guide - Equation: Two phase decay. GraphPad Prism 9.
140. Z. Kovarik, Z. Radić, H. A. Berman, V. Simeon-Rudolf, E. Reiner, P. Taylor, Acetylcholinesterase active centre and gorge conformations analysed by combinatorial mutations and enantiomeric phosphonates, *Biochem. J.* **373** (2003) 33–40.
141. F. A. Momany i R. Rone, Validation of the general purpose QUANTA[®] 3.2/CHARMm[®] force field, *J. Comput. Chem.* **13** (1992) 888–900.
142. B. R. Brooks, R. E. Bruccoleri, B. D. Olafson, D. J. States, S. Swaminathan i M. Karplus, CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations, *J. Comput. Chem.* **4** (1983) 187–217.
143. O. Dym, T. Unger, L. Toker, I. Silman, J. L. Sussman, Israel Structural Proteomics Center (ISPC). Crystal Structure of Human Acetylcholinesterase, 2015. https://www.wwpdb.org/pdb?id=pdb_00004pqe (preuzeto 8. siječnja 2023. god.)
144. M. N. Ngamelue, K. Homma, O. Lockridge, O. A. Asojo, Crystallization and X-ray structure of fulllength recombinant human butyrylcholinesterase, *Acta Cryst.* **63** (2007) 723–7.

145. N. Maraković, A. Knežević, V. Vinković, Z. Kovarik i G. Šinko, Design and synthesis of N-substituted-2-hydroxyiminoacetamides and interactions with cholinesterases. *Chem Biol. Interact.* **259** (2016):122–32.
146. N. Maraković, A. Knežević, I. Rončević, X. Brazzolotto, Z. Kovarik i G. Šinko, Enantioseparation, in vitro testing, and structural characterization of triple-binding reactivators of organophosphate-inhibited cholinesterases. *Biochem J.* **477** (2020) 12771–90.
147. W. Strober, *Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. Current Protocols in Immunology*, (2015) A3.B.1–A3.B.3.
148. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* **65** (1983) 55–63.
149. A. Matošević i A. Bosak, Carbamate group as structural motif in drugs: a review of carbamate derivatives used as therapeutic agents, *Arh Hig Rada Toksikol.* **71** (2020) 285–99.
150. V. Pehar, D. Oršolić i V. Stepanić, Drug-likeness, herbicide-likeness and toxicity of herbicidal compounds-in silico analysis, *Zbornik radova 17. Ružičkini dani „Danas znanost – sutra industrija”*. (2019) 112-123.
151. M. Milić, S. Žunec, V. Micek, V. Kašuba, A. Mikolić, B. T. Lovaković, T. Živković Semren, I. Pavičić, A. M. Marjanović Čermak, A. Pizent, A. Lucić Vrdoljak, R. Valencia-Quintana, J. Sánchez-Alarcón i D. Želježić, Oxidative stress, cholinesterase activity, and DNA damage in the liver, whole blood, and plasma of Wistar rats following a 28-day exposure to glyphosate, *Arh Hig Rada Toksikol.* **69** (2018) 154–68.
152. A. Ud-Daula, G. Pfister i K. W. Schramm, Growth inhibition and biodegradation of catecholamines in the ciliated protozoan *Tetrahymena pyriformis*, *J. Environ. Sci. Health A, Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.* **43** (2008) 1610–7.
153. C. Martins-Gomes, T. L. Silva, T. Andreani i A. M. Silva, Glyphosate vs. glyphosate-based herbicides exposure: a review on their toxicity, *J. Xenobiot.* **12** (2022) 21–40.
154. C. Thiour-Mauprivez, F. E. Dayan, H. Terol, M. Devers, C. Calvayrac, F. Martin-Laurent, L. Barthelmebs, Assessing the effects of β -triketone herbicides on HPPD from

- environmental bacteria using a combination of *in silico* and microbiological approaches, *Environ. Sci. Pollut. Res Int.* **30** (2022) 9932–44.
155. A. Tziakouri, E. Lajkó i L. Kohidai, The phylogenetic background of neurotransmitters in the unicellular organism *Tetrahymena pyriformis*, *Ann Behav. Neurosci.* **1** (2018) 108–18.
156. T. Čadež, D. Kolić, G. Šinko i Z. Kovarik, Assessment of four organophosphorus pesticides as inhibitors of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, *Sci Rep.* **11** (2021) 1–11.
157. G. Kaur, A. K. Jain i S. Singh, CYP/PON genetic variations as determinant of organophosphate pesticides toxicity. *J Genet.* **96** (2017) 187–201.
158. W. N. Aldridge i E. Reiner, Enzyme inhibitors as substrates. Interactions of esterases with esters of organophosphorus and carbamic acids. Amsterdam: North-Holland Pub. Co; 1972.
159. B. Clothier, M. K. Johnson i E. Reiner, Interaction of some trialkyl phosphorothiolates with acetylcholinesterase Characterization of inhibition, aging and reactivation. *Biochim. Biophys. Acta.* **660** (1981) 306–16.
160. J. Egea, I. Fabregat, Y. M. Frapart, P. Ghezzi, A. Görlach, T. Kietzmann T, et al., European contribution to the study of ROS: A summary of the findings and prospects for the future from the COST action. BM1203 (EU-ROS). *Redox Biol.* **13** (2017) 94–162.
161. V. P. Kalyabina, E. N. Esimbekova, K. V. Kopylova i V. A. Kratasyuk, Pesticides: formulants, distribution pathways and effects on human health – a review. *Toxicol Rep.* **8** (2021) 1179–92.
162. A. Zandona, N. Maraković, P. Mišetić, J. Madunić, K. Miš, J. Padovan, S. Pirkmajer i M. Katalinić, Activation of (un)regulated cell death as a new perspective for bispyridinium and imidazolium oximes, *Arch Toxicol.* **95** (2021) 2737–54.
163. P. Rytczak, A. Drzazga, E. Gendaszewska-Darmach i A. Okruszek, The chemical synthesis and cytotoxicity of new sulfur analogues of 2-methoxylysophosphatidylcholine. *Bioorg Med Chem Lett.* **23** (2013) 6794–8.

164. P. G. Layer, Cholinesterases preceding major tracts in vertebrate neurogenesis. *BioEssays*. **12** (1990) 415–20.
165. C. N. Pope i S. Brimijoin, Cholinesterases and the fine line between poison and remedy. *Biochem Pharmacol*. **153** (2018) 205–16.
166. M. A. Martínez, J. L. Rodríguez, B. Lopez-Torres, M. Martínez, M. R. Martínez-Larrañaga, J. E. Maximiliano, A. Anadón i I. Ares, Use of human neuroblastoma SH-SY5Y cells to evaluate glyphosateinduced effects on oxidative stress, neuronal development and cell death signaling pathways. *Environ Int*. **135** (2020) 105414.
167. M. Arena, D. Auteri, S. Barmaz, G. Bellisai, A. Brancato, D. Brocca L. Bura, H. Byers, A. Chiusolo, D. Court Marques, F. Crivellente, C. De Lentdecker, M. Egsmose, Z. Erdos, G. Fait, L. Ferreira, M. Goumenou, L. Greco, A. Ippolito, F. Istace, S. Jarrah, D. Kardassi, R. Leuschner, C. Lythgo, J. Oriol Magrans, P. Medina, I. Miron, T. Molnar, A. Nougadere, L. Padovani, J. M. Parra Morte, R. Pedersen, H. Reich, A. Sacchi, M. Santos, R. Serafimova, R. Sharp, A. Stanek, F. Streissl, J. Sturma, C. Szentos, J. Tarazona, A. Terron, A. Theobald, B. Vagenende, A. Verani, i L. Villamar-BouzaPeer review of the pesticide risk assessment of the active substance phenmedipham. *EFSA Journal*. **16** (2018) e05151.
168. M. Arena, D. Auteri, S. Barmaz, G. Bellisai, A. Brancato, D. Brocca L. Bura, H. Byers, A. Chiusolo, D. Court Marques, F. Crivellente, C. De Lentdecker, M. Egsmose, Z. Erdos, G. Fait, L. Ferreira, M. Goumenou, L. Greco, A. Ippolito, F. Istace, S. Jarrah, D. Kardassi, R. Leuschner, C. Lythgo, J. Oriol Magrans, P. Medina, I. Miron, T. Molnar, A. Nougadere, L. Padovani, J. M. Parra Morte, R. Pedersen, H. Reich, A. Sacchi, M. Santos, R. Serafimova, R. Sharp, A. Stanek, F. Streissl, J. Sturma, C. Szentos, J. Tarazona, A. Terron, A. Theobald, B. Vagenende, A. Verani, i L. Villamar-Bouza, Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance desmedipham. *EFSA Journal*. **16** (2018) e05150.

-
169. S. Li, J. Zhao, R. Huang, M. F. Santillo, K. A. Houck i M. Xia, Use of high-throughput enzyme-based assay with xenobiotic metabolic capability to evaluate the inhibition of acetylcholinesterase activity by organophosphorous pesticides, *Toxicol. In Vitro* **56** (2019) 93-100.

§ 8. ŽIVOTOPIS

Vesna Pehar rođena je 1. rujna 1977. godine u Slavanskom Brodu. Osnovnu i srednju školu završila je u rodnom gradu. Nakon završetka srednje škole upisuje Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Kemijski odsjek, smjer dipl.ing. kemije gdje je 2004. godine diplomirala stekavši titulu diplomiranog inženjera kemije, odnosno titulu magistra struke kemije. Završni diplomski rad izradila je na Zavodu za organsku kemiju pod mentorstvom prof. dr. sc. Srđanke Tomić-Pisarović na temu: „Priprava i kinetička rezolucija kinuklidin-3-il-butanoata“. Tijekom apsolvantske godine je upisala, odslušala i položila kolegije iz pedagoško-psihološke skupine predmeta. Nakon završetka fakulteta radila je kao stručni suradnik u prodaji i marketingu medicinske opreme u MEDiLAB d.o.o. u Zagrebu, a zatim kao profesor kemije u Privatnoj jezičnoj gimnaziji „Linigra“ u Zagrebu.

Oružanim snagama RH pristupila je u prosincu 2005. godine. Nakon završetka Temeljne časničke izobrazbe u srpnju 2006. godine dodijeljena joj je prva časnička dužnost u Bojni nuklearno-biološko-kemijske obrane (BNBKO). Sljedećih godina obnašala je više voditeljskih i zapovjednih dužnosti u istoj postrojbi. Naprednu časničku izobrazbu, *CBRN Captains Career Course*, Fort Leonard Wood, Missouri, SAD završila je tijekom 2013. godine. Od ožujka 2017. radi na ustrojbenom mjestu časnika za biološku zaštitu u NBK laboratoriju koji se nalazi u sklopu Centra za obrambene i strateške studije „Janko Bobetko“ na Hrvatskom vojnom učilištu „Dr. Franjo Tuđman“ u Zagrebu. Od rujna 2019. godine predavač je na preddiplomskom studiju Vojno inženjerstvo na HVU, smjer Nuklearno-biološko-kemijska obrana i predaje na Temeljnoj časničkoj izobrazbi. U akademskoj 2022/23. godini uspješno je diplomirala na Zapovjedno-stožernoj školi „Blago Zadro, trećoj razini slijedno rastuće vojne izobrazbe. Od 1. srpnja 2023. godine obnaša dužnost časnika za nuklearnu zaštitu NBK laboratorija koji se nalazi u sklopu Centra za obrambene i strateške studije „Janko Bobetko“ na Hrvatskom vojnom učilištu „Dr. Franjo Tuđman“. Tijekom karijere sudjelovala je na više stručnih tečajeva u zemlji i inozemstvu i na više domaćih i međunarodnih vježbi.

Tijekom 2015/2016. godine upisala je poslijediplomski studij kemije, smjer biokemija na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu gdje je pod mentorstvom izv. nasl. prof. dr. sc. Zrinke Kovarik i dr. sc. Višnje Štepanić izradila doktorsku disertaciju. Područje interesa i istraživanja je toksičnost spojeva i njihov utjecaj na ljudsko zdravlje, s

naglaskom na neurotoksičnost i kemijska i biološka zaštita. Koautorica je tri znanstvena rada iz područja istraživanja.

Znanstvene publikacije u CC časopisima:

1. **V. Pehar**, D. Kolić, A. Zandona, G. Šinko, M. Katalinić, V. Stepanić i Z. Kovarik, Selected herbicides screened for toxicity and analysed as inhibitors of both cholinesterases, *Chemico-Biological Interactions*, **379** (2023) 110506.
2. D. Oršolić, **V. Pehar**, T. Šmuc, V. Stepanić, Comprehensive machine learning based study of the chemical space of herbicides, *Scientific Reports*, **11** (2021) 11479.

Znanstvene publikacije u ostalim časopisima i zbornicima radova:

1. D. Tušek, I. Cetina, **V. Pehar**, Suvremena sredstva za dekontaminaciju bojnih otrova- II. dio – metalni oksidi, *Kemija u industriji*, **69** (2020) 1-2, 25-35.
2. D. Tušek, I. Cetina, **V. Pehar**, Suvremena sredstva za dekontaminaciju bojnih otrova- I. dio – zeoliti i metal-organske mreže, *Kemija u industriji*, **68** (2019) 11-12.
3. **V. Pehar**, D. Oršolić, V. Stepanić, Drug-likeness, herbicide-likeness and toxicity of herbicidal compounds-in silico analysis, Zbornik radova 17. Ružičkini dani „Danas znanost – sutra industrija”, (2019) 112-123.

Priopćenja na znanstvenim skupovima

1. Z. Kovarik, **V. Pehar**, T. Čadež, D. Kolić, A. Zandona, A.-M. Lulić, G. Šinko, M. Katalinić, Biological assessment of selected herbicides and pesticides in use as inhibitors of human cholinesterases and on HepG2 and SH-SY5Y cell lines// *FEBS Open Bio*, 12 (Suppl. S1), Lisabon, Portugal: FEBS Press, 2022. str. 129 doi:10.1002/2211-5463.13440 (poster)
2. **V. Pehar**, V. Stepanić, Z. Kovarik, Commercial herbicides screened for toxicity in silico and examined as inhibitors of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, *17th International Symposium on Cholinergic Mechanisms (ISCM 2022)*, Dubrovnik, Hrvatska, 2022., Programme and Abstracts, str. 69. (poster)
3. **V. Pehar**, D. Oršolić, V. Stepanić, Application of machine learning for herbicide characterization, *Computational Chemistry Day 2019*, Zagreb, 2019., *Knjiga sažetaka*, str. 33. (pozvano predavanje)
4. **V. Pehar**, D. Oršolić, V. Stepanić, *In silico* analysis of herbicides – impact on human health, *26th Croatian Meeting of Chemists and Chemical Engineers with international participation*, Šibenik, 2019., *Book of abstracts*, str. 181. (poster)

5. **V. Pehar**, D. Oršolić, M. Jadrijević-Mladar Takač, **V. Stepanić**, Application of machine learning approaches for design of more selective herbicides, *The 3rd COST-sponsored ARBRE- MOBIEU plenary meeting*, Zagreb, 2019., *Book of Abstracts*, str.113-114. (poster)
6. **V. Pehar**, D. Oršolić, **V. Stepanić**, Structure-Activity Relationships for Herbicides, *17th Ružička Days "Today Science - Tomorrow Industry"*, Vukovar, 2018., *Book of abstracts*, str. 101. (poster)
7. **V. Stepanić**, D. Oršolić, **V. Pehar**, T. Šmuc, Development of phytotoxic natural molecules as complementary herbicidal agents is supported by machine learning study// *Book of Abstracts of 1st international conference "Food & Climate Change"* / Šamec, Dunja ; Šarkanj, Bojan ; Sviličić Petrić, Ines (ur.). Koprivnica, 2021., str. 39. (pozvano predavanje)
8. **V. Pehar**, Biosigurnost i biozaštita- novi izazovi za vojno-civilnu suradnju// *2nd Croatian Congress on Biosecurity and Biosafety with international participation*, CROBiB 2023, Zagreb, 2023., *Book of abstracts*, str.76. (pozvano predavanje)

Znanstvene radionice:

1. „Adverse outcome pathways (AOP): The How and Why of Development & Application“, Zagreb, Hrvatska, 2018.
2. „Elektronički izvori znanstvenih i stručnih informacija“, Zagreb, Hrvatska, 2018.
3. „Uvod u molekulsko modeliranje“, Zagreb, Hrvatska, 2017.

Znanstveno - stručni skupovi i konferencije:

1. Znanstvena škola „Sveobuhvatni pristup istraživanju antropogenih pritisaka na okoliš“, IRB, Zagreb, 2021.
2. NATO Biological Warfare Awareness Course, NATO School, Oberammergau, R Njemačka, 2020.
3. HAZU, Hrvatsko društvo za biosigurnost i biozaštitu hrvatskoga liječničkoga zbora, 4. Među Akademijski znanstveni simpozij, *Zoonoze i bolesti koje se prenose vektorima-principi biosigurnosti i biozaštite*, HAZU, Zagreb, 2018.
4. *18th International Chromatography School (ICS)*, Zagreb, Hrvatska, 2018.
5. *Computational Chemistry Day 2018*, Zagreb, 2018.
6. *17th International Chromatography School (ICS)*, Zagreb, Hrvatska, 2017.
7. Labtim Adria d.o.o, Waters seminar: Science & Technology for your everyday work, Zagreb, 2017.