

# Karakterizacija kromatinskih nestabilnosti u limfocitima čovjeka uslijed izloženosti niskim koncentracijama pesticida

---

Mladinić, Marin

Doctoral thesis / Doktorski rad

2012

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:217:009635>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-25**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

Marin Mladinić

**Karakterizacija kromatinskih  
nestabilnosti u limfocitima čovjeka  
uslijed izloženosti niskim  
koncentracijama pesticida**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2012.

Ovaj je doktorski rad izrađen u Jedinici za mutagenezu Instituta za medinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu, pod vodstvom dr.sc. Davora Želježića, znanstvenog savjetnika, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

## ZAHVALA

Želio bih zahvaliti svom mentoru dr. sc. Davoru Želježiću na vodstvu, nesebičnoj podršci, savjetima, trudu, potrošenim živcima i svemu čime mi je pomogao da završim ovu disertaciju. Bilo je puno uspona i padova i stvarno Veliko Hvala!!!

Zahvalio bi se voditeljici projekta dr. sc. Vileni Kašubi, predstojnici Jedinice dr. sc. Nevenki Kopjar, dr.sc. Mirti Milić, dr. sc. Ružici Rozgaj i Maji Nikolić za podršku i savjete.

Također, zahvaljujem i ravnateljici Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada dr.sc. Ani Lucić Vrdoljak na pruženoj podršci tijekom izrade ovog rada.

A sad onaj neformalniji dio....

hvala...mojim prijateljima (iz srednje, s fakulteta, padobrancima, girjašima...)  
mojoj obitelji što me trpila sve ove godine (mama,tata, brat i baka)  
I.Š. što me ohrabivala i uvijek bila potpora...

Zagreb,

Marin Mladinić

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Doktorska disertacija

### **Karakterizacija kromatinskih nestabilnosti u limfocitima čovjeka uslijed izloženosti niskim koncentracijama pesticida**

**MARIN MLADINIĆ**

Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Ksaverska c. 2, Zagreb

#### **SAŽETAK**

Dosadašnja istraživanja ukazala su da izloženost pesticidima može uzrokovati genetička oštećenja i povećati rizik od razvoja neoplazija. Istraživanje genotoksičnosti pesticida provedeno je u uvjetima *ex vivo* na primarnim i dugotrajnim kulturama limfocita čovjeka, te *in vivo* na limfocitima osoba profesionalno izloženih pesticidima glifosatu, terbutilazinu i karbofuranu. Terbutilazin i karbofuran s i bez metaboličke aktivacije pokazali su komet testom genotoksični učinak u 4-satnom izlaganju, dok to nije zapaženo za glifosat. Mikronukleus testom uz primjenu fluorescencijske hibridizacije *in situ* dokazano je da mikronukleusi sadrže i cijele kromosome čime ispoljavaju i aneugeni mehanizam djelovanja. Metabolički promijenjen terbutilazin pokazao je ograničeni specifičan aneugeni učinak na kromosome 1, 9, 15, 16 i Y. U 14-dnevnom izlaganju uočeni genotoksični potencijal pesticida bio je izraženiji u odnosu na kratkotrajno izlaganje. Primjenom komet-FISH-a, nakon dugotrajne izloženosti utvrđena je povećana strukturna nestabilnost gena *c-Myc* i *TP 53*. Formulacije pesticida pokazale su značajno veći rizik po stabilnost genetičkog materijala u odnosu na čiste aktivne tvari.

(91 stranica, 6 slike, 18 tablica, 148 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Središnjoj biološkoj knjižnici, Marulićev trg 20, Zagreb i u knjižnici Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada, Ksaverska c. 2, Zagreb.

Ključne riječi: pesticidi, komet test, mikronukleus test, FISH, komet-FISH, dugotrajna kultura limfocita, profesionalna izloženost

Mentor: Dr. sc. Davor Željezić, zn. savjetnik

Ocjenitelji:

Zamjena:

Rad prihvaćen:

---

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Division of Biology

Doctoral Thesis

### **Characterization of chromatin instabilities in human lymphocytes due to low concentration of pesticide exposure**

**MARIN MLADINIĆ**

Institute for Medical Research and Occupational Health, Ksaverska c. 2, Zagreb

#### **ABSTRACT**

Up to date research have shown an association between pesticide exposure and genome damage as well as elevated risk of cancer. Present genotoxicity research was performed on primary and long-term lymphocyte cultures *ex vivo* and will comprise occupationally exposed populations. Genotoxic effect of terbuthylazine and carbofuran exposure was observed with and without metabolic activation by comet assay, while this was not the case for glyphosate exposure. Fluorescent-in-situ-hybridization-coupled micronucleus test showed that micronuclei contain fragments and whole chromosomes indicating clastogenic but also aneugenic mechanism of action. Metabolically transformed terbuthylazine induced a limited specific aneugenic effect on chromosomes 1, 9, 15, 16 and Y. Increased structural instability of genes *c-Myc* and *TP 53* was observed using comet-FISH after prolonged pesticide exposure. Pesticide formulations proved to increase genome instability compared to pure active ingredients.

(91 pages, 6 figures, 18 tables, 148 references, original in Croatian)

Thesis deposited at the National and University Library, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, at the Central Biological Library, Marulićev trg 20, Zagreb and at the Library of the Institute for Medical Research and Occupational Health, Ksaverska c. 2, Zagreb.

Key words: pesticides, comet assay, micronucleus assay, FISH, comet-FISH, extended-term lymphocyte cultures, professional exposure

Mentor: Dr.sc. Davor Želježić, Scientific Advisor

Reviewers:

Substitute:

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Definicija pesticida</b> .....	<b>2</b>
<b>1.2. Potrošnja pesticida</b> .....	<b>2</b>
<b>1.3. Podjela pesticida</b> .....	<b>3</b>
<b>1.4. Štetni učinci biocida na ljudski genom</b> .....	<b>3</b>
<b>1.5. Citogenetičke metode za istraživanje štetnih učinaka</b> .....	<b>5</b>
1.5.1. Komet test.....	5
1.5.2. Mikronukleus test.....	7
<b>1.6. Svojstva korištenih pesticida</b> .....	<b>9</b>
1.6.1. Glifosat.....	9
1.6.2. Terbutilazin.....	9
1.6.3. Karbofuran.....	10
<b>1.7. Obrazloženje teme</b> .....	<b>11</b>
<b>2. REZULTATI IZVAN ZNANSTVENIH RADOVA</b> .....	<b>13</b>
<b>3. RASPRAVA</b> .....	<b>34</b>
<b>3.1. Primarne kulture limfocita u uvjetima <i>ex vivo</i></b> .....	<b>35</b>
3.1.1. Glifosat.....	35
3.1.2. Terbutilazin.....	37
3.1.3. Karbofuran.....	38
<b>3.2. Dugotrajne kulture limfocita u uvjetima <i>ex vivo</i></b> .....	<b>39</b>
<b>3.3. Citogenetički biomonitoring</b> .....	<b>46</b>
<b>4. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>49</b>
<b>5. POPIS LITERATURE</b> .....	<b>52</b>
<b>6. ZNANSTVENI RADOVI</b> .....	<b>65</b>

## **1. Uvod**



## 1.1 Definicija pesticida

Pojam pesticid definira se kao aktivne tvari i mješavine koji sadrže jednu ili više aktivnih tvari priređenih u obliku u kojem se isporučuju korisniku s namjerom uništavanja, suzbijanja, kontroliranja svih štetnih organizama kemijskim ili biološkim putem (98/8/EC). Ovaj pojam se prema regulativi Europske komisije i Republike Hrvatske razdjeljuje s obzirom na mjesto primjene na biocide i sredstva za zaštitu bilja. Biocidi su pesticidi koji se koriste u javnom zdravstvu za dezinfekciju, dezinsekciju, deratizaciju i deodorizaciju prema tumačenju Hrvatskog zavoda za toksikologiju. Nadalje, sredstva za zaštitu bilja su pesticidi koji se koriste u poljoprivredi i vrtlarstvu. Biocidi ili sredstva za zaštitu bilja sastoje se od dvije komponente. Primarna komponenta je djelatna tvar koja ima toksični učinak na odabrani organizam, te druga komponenta koju čine različiti dodaci kao što su otapala, razrijeđivači, emulgatori, raspršivači i potencijatori. Svrha dodataka je omogućiti učinkovitiju primjenu i djelovanje aktivne tvari, no ponekad ima za svrhu pojačavanje samog toksičnog učinka. Ovisno o dodacima, formulacija konačnog proizvoda može se razlikovati pa postoje koncentri za emulziju, suspenziju ili otopinu, močiva prašiva, vodotopive granule, prašiva, granule ili mikrogranule (Cox i Sorgan, 2006).

## 1.2. Potrošnja pesticida

Trenutno na svjetskom tržištu postoji oko 1500 aktivnih tvari s više od 2500 različitih pripravaka pesticida (BCPC, 2009). Službeni podaci Organizacije za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda (FAO) za 2001. godinu govore o potrošnji preko 1.100.000 tona aktivnih tvari na svjetskoj razini. Na herbicide se odnosilo 46% svjetske potrošnje, 26% na insekticide, 26% na fungicide i baktericide, a 2% na ostale skupine aktivnih tvari. U Europskoj Uniji utrošeno je preko 320.000 tona, za SAD i Kanadu ta potrošnja iznosila je 390.000 tona, Srednju i Južnu Ameriku 280.000 tona, u Aziji je potrošeno 180.000 tona, u Africi 44.000 tona, te u Australiji i Oceaniji 120.000 tona (FAOStat, 2010).

Podatke za potrošnju pesticida na području Republike Hrvatske teško je sakupiti. U Hrvatskoj u 2004. godini prema objavljenim podacima proizvedeno je 3.840 tona djelatne tvari (APO, 2010). Najnoviji podaci za Hrvatsku od strane FAOStata govore o godišnjem uvozu oko 1.500 tona aktivne tvari. Iz navedenih podataka može se procijeniti da godišnja potrošnja iznosi oko 4.500 tona djelatnih tvari. U procijenjenoj potrošnji 50% bi zauzimali herbicidi. Prikupljeni podaci za Hrvatsku ne mogu se smatrati pouzdanima zbog neadekvatnog sakupljanja podataka.

### 1.3. Podjela pesticida

Postoji nekoliko načina podjele pesticida. Jedna od podjela je s obzirom na djelovanje aktivne tvari na ciljnu skupinu organizama. Na taj način, pesticidi su razvrstani u skupine, a najznačajnije su: akaricidi: za suzbijanje grinja, algicidi: za suzbijanje rasta algi, avicidi: koriste se za odbijanje ptica od usjeva, baktericidi: sprječavanje rasta bakterija, fungicidi: sprječavanje rasta gljivica, herbicidi: za suzbijanje korova, insekticidi: za suzbijanje štetnih kukaca; rodenticidi: za suzbijanje glodavaca (BCPC, 2009).

S obzirom na kemijsku strukturu aktivne tvari postoji 40-tak skupina (Anwar, 1997) od čega su najbrojnije skupine aromatskih pesticida, fenoksi herbicida, karbamatnih pesticida, organosfosfornih pesticida, organoklorina, pesticida na bazu uree i triazinskih pesticida.

Unutar pesticida, biocidi, temeljem regulative 98/8/EC su razvrstani na 1) dezinficijense i biocidne pripravke opće namjene, 2) konzervanse, 3) pripravci za suzbijanje štetočinja, 4) ostali biocidni pripravci. Sredstva za zaštitu bilja koja su druga skupina spojeva unutar pesticida prema regulativi 91/414/EEC nemaju detaljnije razrađenu podjelu od one koja se odnosi na same pesticide.

### 1.4. Štetni učinci biocida na ljudski genom

Visoka potrošnja biocida povećava rizik izloženosti ljudske populacije jer štetno djelovanje nije ograničeno samo na ciljane organizme. Učinci se mogu uočiti i na nižim razinama organizacija tj. na sustavima organa, tkiva i stanica, no i na makromolekulama kao što je DNA. Primarna oštećenja koja nastaju izravno interakcijom genotoksičnih tvari s DNA su jednolančani lomovi, alkilirane baze, adukti, međulančane veze, kemijsko vezanje DNA s proteinima, abazična mjesta i oksidativne promjene baza. Dokazana je povezanost između povećanja razine primarnih lezija i izloženosti organofosfatima (Kisby i sur., 2009). Također, Bhalli i sur. (2009) ukazali su izloženost mješavinama pesticidnih formulacija povećava razinu primarnih oštećenja DNA. Castillo-Cadena i sur. (2006) utvrdili su da izloženost fungicidima i insekticidima iz skupina karbamata i organofosfata ispoljava jednak učinak na genom. Npopravljene primarne lezije (kao što su DNA adukti i međulančane veze) ometaju replikaciju što dovodi do pucanja lanaca DNA i nastanka kromatidnih lomova. Nadalje, uslijed dodatnog gubitka aktivnosti topoizomeraze II djelovanjem pesticida moguć je i nastanak sekundarnih oštećenja kao što su kromosomski lomovi (Maynard i sur., 2009). Post-replikacijski mehanizmi popravka preko specifičnog mehanizma koji je sklon pogreškama (engl. *error-prone repair*) prevode kromosomske lomove u kompleksnije rearanžmane kao

što su kromatidne izmjene, dicentrični kromosomi i translokacije (Obe i sur., 2002). Tako je utvrđeno da kao posljedica interakcije DNA s pesticidima mogu nastati mutacije gena, strukturne i numeričke promjene kromosoma, te promjene u organizaciji interfaznog kromatina (Hoffmann, 1996). Kourakis i sur. (1996) u limfocitima osoba izloženih organofosfatima, karbamatima i organoklorinima utvrdili su povećanu učestalost oligocentričnih i prstenastih kromosoma, a Steenland i sur. (1997) pružili su dokaze da ta oštećenja nastaju uslijed izloženosti fungicidima kaptanu i mankozebu, te organofosfatnom insekticidu klorpirifosu. Pojavu dicentričnih kromosoma uslijed izloženosti herbicidima atrazinu, alakloru, 2,4-D-u i insekticidu malationu dokazuju Zeljezic i Garaj Vrhovac (2001). Povećana učestalost stvaranja mikronukleusa kao manifestacije kromosomskih oštećenja povezana je s izloženosti piretroidima i organofosfatima (Kehdy i sur., 2007), organoklorinim pesticidima (Ennaceur i sur., 2008), te složenim mješavinama formulacija (Ali i sur., 2008). Značaj primarnih oštećenja u kancerogenezi proizlazi iz ranije napomenute mogućnosti njihovog prevođenja u sekundarna oštećenja. Jednolančani lomovi, alkilirane baze, abazična mjesta, oksidacijske lezije popravljaju se mehanizmom izrezivanja baze (BER), dok se međulančane veze i adukti DNA popravljaju mehanizmom izrezivanja nukleotida (NER). Maynard i sur. (2009) i Felix i sur. (2006) dokazali su da prolazni lomovi DNA prouzročeni enzimatskim djelovanjem unutar BER mehanizma i oksidacijske lezije uzrokovane reaktivnim vrstama kisika (ROS) dovode do gubitka funkcije topoizomerase II, te se mogu prevesti u trajne dvostruke lomove DNA (DSB). Postoje tri mehanizma DSB popravka i popravak spajanjem nehomolognih krajeva (NHEJ) koji mogu dovesti do nastanka translokacija kao kompleksnih oštećenja kromosoma. Također, Obe i sur. (2002) navode mogućnost prevođenja DSB u dicentrične kromosome preko NHEJ mehanizma popravka i ektopne homologne rekombinacije. Iz toga proizlazi da se visoka razina primarnih oštećenja DNA serijom mehanizama koji su skloni pogreškama prevode u kromosomske aberacije i translokacije tj. predstavljaju potencijalni rizik za integritet genoma.

Nadalje, u posljednjih par godina objavljeno je više studija koje povezuju povećan rizik od razvoja limfoma, leukemija, genitalnih karcinoma s izloženosti metribuzinu, butilatu, triazolnim fungicidima, organoklorinim pesticidima i fenoksi kiselinama (De Lancey i sur., 2009; Lynch i sur., 2009; Orsi i sur., 2009; Boers i sur., 2010). Djelovanje agenasa koji povećavaju rizik od razvoja novotvorina uočen je i uslijed dugotrajne izloženosti s-etil dipropiltiokarbamatu (EPTC), pendimetalinu, aldikarbu, alakloru, klorpirifosu, cijanazinu, karbofuranu i glifosatu (Dich i sur., 1997). Detaljniji prikaz studija koje su ukazale na povezanost pesticida i razvoja neoplastičnih oboljenja dan je u Tablici 1.

Tablica 1. Recentne studije koje povezuju izloženost pesticidima s razvojem različitih tipova karcinoma.

<b>Pesticid</b>	<b>Populacija</b>	<b>Tip / mjesto karcinoma</b>	<b>Referenca</b>
EPTC	poljoprivrednici	kolon	van Bommel i sur., 2008
Trifluralin	poljoprivrednici	kolon	Kang i sur., 2008
Fenoksi herbicidi	radnici u proizvodnji	mijeloidna leukemija	van Maele-Fabry i sur., 2008
EPTC	poljoprivrednici	gušterača	Andreotti i sur., 2009
Pendimetalin			
Metribuzin	poljoprivrednici	ne-Hodgkinov limfom (NHL)	DeLancey i sur., 2009
Butilat	poljoprivrednici	prostata	Lynch i sur., 2009
		NHL	
Triazolni fungicidi	poljoprivrednici	Hodgkinov limfom	Orsi i sur., 2009
Herbicidi na bazi uree			
Organoklorni pesticidi		leukemija vlasastih stanica	
Fenoksi herbicidi			
Organofosfati	opća populacija	akutna limfoblastična leukemija	Rull i sur., 2009
Triazini			
Permetrin	poljoprivrednici	multipli mijelom	Rusiecki i sur., 2009
Fenoksi herbicidi	radnici u proizvodnji	urinarni trakt	Boers i sur., 2010
		genitalni	
Terbufos	poljoprivrednici	leukemije	Bonner i sur., 2010
		NHL	
		pluća	

## 1.5. Citogenetičke metode za istraživanje štetnih učinaka

### 1.5.1. Komet test

Komet test su prvi put opisali Östling i Johanson 1984. godine. Pet godina kasnije, Olive (1989) te Singh i sur. (1988) objavili su dvije različite verzije izvorne metode, kojima je znatno povećana osjetljivost u detekciji oštećenja molekule DNA. Komet test koji se izvodi u alkalnim uvjetima omogućava detekciju velikog broja različitih tipova oštećenja genoma (jednolančani i dvolančani lomovi DNA, nepotpuni ekscizijski popravak, međulančane veze u molekuli DNA, adukti, apurinska i apirimidinska mjesta, kemijsko vezanje DNA s

proteinima, međulančane veze, oksidativna oštećenja baza). Stanice se uklapaju u agarozni gel na mikroskopskom preparatu i zatim se liziraju puferom koji sadrži etilendiamintetraoctenu kiselinu (EDTA) u svrhu keliranja dvovalentnih kationa metala važnih za stabilizaciju membrana i katalitičku aktivnost nukleaza, detergent Triton-X u svrhu razbijanja lipidnog dvosloja te visoku koncentraciju soli s ciljem uklanjanja histona i ostalih topivih proteina. Time u gelu zaostaje izolirana superzavijena DNA vezana uz jezgri matriks. U denaturacijskom puferu koji sadrži EDTA i NaOH sa svrhom postizanja visoke vrijednosti pH (~13) dolazi do denaturacije DNA. Vodikove veze između lanaca DNA pucaju, zbog negativnog naboja lanci se odbijaju, započinje rotacija i razmatanje molekule DNA. Zbog rigidnosti okosnice šećer-fosfat rotacija razvija velike tenzije u samim lancima te na mjestima lezija koje otežavaju razmatanje (međulančane veze u molekuli DNA, adukti, apurinska i apirimidinska mjesta, DNA-protein veze) dolazi do induciranja jednolančanih lomova. Lezije koje se na taj način prevode u jednolančane lomove zajedničkim imenom zovu se mjesta nestabilna u lužnatoj sredini (engl. *alkali labile sites*).

U području loma gubi se visoko organizirana struktura kromatina i negativna superzavijenost DNA te dolazi do opuštanja omči (engl. *loops*). Tijekom elektroforeze električno polje iz klupka genomske DNA izvlači opušteno omče i oslobođene krajeve/fragmente DNA prema pozitivno nabijenoj anodi. Uslijed putovanja kroz gel DNA stvara strukturu koja se nakon bojanja fluorescentnom bojom može vidjeti uz korištenje epifluorescentnog mikroskopa, a podsjeća na komet.

Dva su osnovna parametra koja se mjere ovom tehnikom u svrhu procjene stupnja oštećenja genomske DNA. To su a) dužina repa kometa koja se mjeri od sredine glave kometa do kraja repa i b) intenzitet fluorescencije repa. Dužina repa predstavlja udaljenost na koju je oštećena DNA otputovala u električnom polju. Što je više oštećenja, veći dio genoma nalazi se u obliku opuštenih omči i slobodnih fragmenata DNA te ih je moguće izvući iz genomske DNA na veću udaljenost. Intenzitet repa izravna je mjera za postotak molekule DNA koja je iz jezgre otputovala u rep kometa. Upravo zbog navedene teorije nastanka repa, Collins (2004) sugerira da je intenzitet repa relevantniji pokazatelj oštećenja DNA u odnosu na dužinu repa.

U svrhu bolje specifikacije oštećenja DNA koja se mogu detektirati komet testom uvedene su i modifikacije same metode. Nakon liziranja stanica, a prije denaturacije DNA mikroskopski preparat se inkubira endonukleazom sa specifičnim djelovanjem na pojedine lezije. U otkrivanju oksidacijskih lezija 8-okso-gvanina i formamidopirimidina koristi se 8-okso-gvanin DNA glikozilaza (OGG1). Glikozilaza kao enzim popravka oštećenja DNA, prepoznaje oksidativne lezije te ih uklanja ostavljajući abazična mjesta. Daljnjom

ekscizijskom aktivnosti AP endonukleaze abazična mjesta se uklanjaju te zaostaju lomovi DNA koji su zatim mjerljivi komet testom. Preparati se inkubiraju OGG1 glikozilazom nakon liziranja stanica, a prije denaturacije DNA. Uobičajena je praksa tretirati paralelno dva preparata, jednog samo s puferom, a drugog s enzimom. Parametri koji su izmjereni na preparatu inkubiranom samo s puferom predstavljaju bazično oštećenje DNA. Rezultati s drugog preparata inkubiranog s glikozilazom predstavljaju oštećenja DNA uvećana za oksidativne lezije. Razlika mjerenih parametara između ta dva preparata predstavlja oksidacijsko oštećenje DNA (Collins, 2009).

Također, još jedna modifikacija komet testa je i povezivanje s fluorescencijskom hibridizacijom *in situ* (FISH). FISH omogućava vizualizaciju i kvantifikaciju kromosoma, gena ili određene sekvence DNA. Kvantificiranjem FISH signala i određivanjem njegova pojavljivanja u glavi tako i/ili u repu kometa može se govoriti o nastanku primarnog oštećenja u određenim sekvencama. Za određivanje lokalizacije signala u kometu mora se izmjeriti vrijednost kumulativnog intenziteta fluorescencije svih točaka. Signal se može lokalizirati tek ako ukupni intenzitet svih točaka u glavi ili repu odgovara intenzitetu neoštećenog genskog lokusa (Iourov i sur., 2005).

### **1.5.2. Mikronukleus test**

U posljednjih 5 godina mikronukleus test je postao najpouzdanija citogenetička metoda za otkrivanje potencijalnih karcinogenih agenasa (Cavallo i sur., 2009). Štetni učinci kemijskih agenasa na genom koji su vidljivi u obliku mikronukleusa poznati su već 40 godina (Matter i Schmid, 1971). Mikronukleus je sitna kromatinska struktura vidljiva u citoplazmi interfaznih stanica s promjerom do 1/3 promjera jezgre. Despiralizacijom, dekondenzacijom i zaokruživanjem nepopravljenih ili krivo popravljenih kromosomskih oštećenja membranom nakon diobe stanice nastaje mikronukleus od:

- i. kromosomskih fragmenata koji nastaju kao posljedica indukcije DNA lomova te njihovog zaostajanja u anafazi zbog nedostatka centromere na koju bi se moglo vezati diobeno vreteno
- ii. cijelih kromosoma koji zaostaju u anafazi zbog oštećenja diobenog vretena ili kinetohornog proteina (Fenech, 2007).

Nakon završetka mitoze, jedna od stanica kćeri ima manjak, a druga stanica koja sadrži mikronukleus ima višak genetičke informacije. Dva različita mehanizma genotoksičnosti mogu se razlikovati korištenjem mikronukleus testa:

- i. klastogeni mehanizam - izravna interakcija agensa i DNA, većinom rezultira mikronukleusom koji sadržava kromosomske fragmente
- ii. aneugeni mehanizam - interakcija agensa s proteinima diobenog vretena dovodi do genomske nestabilnosti zbog aneuploidije. Uslijed djelovanja agensa ovakvim mehanizmom mikronukleus će sadržavati cijele kromosome (Muller i sur., 2008).

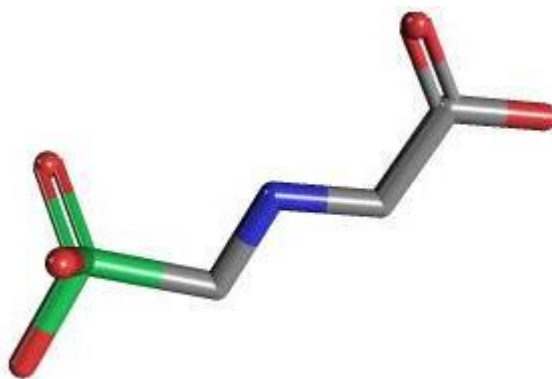
Bolja učinkovitost mikronukleus testa u otkrivanju genotoksičnih agenasa dobivena je uvođenjem dodatnih kriterija analize koju su predložili Fenech i sur. (2003). U evaluaciji genotoksičnog potencijala, pored mikronukleusa broje se i druge aberantne strukture kromatina kao što su jezgreni pupovi i nukleoplazmatski mostovi. Jezgreni pupovi su kromatinske strukture vidljive kao izdanci jezgre. Nastaju u procesu eliminacije: a) genomskih regija koje sadrže amplificirane gene povezane s metabolizmom ili rezistencijom na egzogene kemikalije zbog dugotrajne izloženosti, b) enzimatskih kompleksa koji sudjeluju u popravku DNA (engl. *DNA-repair complexes*). Nukleoplazmatski mostovi potiču od: a) dicentričnih kromosoma tijekom anafaze ukoliko dođe do povlačenja svake od centromera prema suprotnom polu stanice kromosom ostaje neraspoređen i povezuje dvije novonastale jezgre, b) kromosoma nastalih telomernom fuzijom. Uslijed opterećenosti stanice agensom dolazi do prekomjernog skraćivanja telomernih sekvenci TTAGGG koje ostaju nezavršene (engl. *uncapping*) te ih mehanizam popravka NHEJ prepoznaje kao DSB i uklanja dovodeći do formiranja nukleoplazmatskog mosta (Fenech, 2007).

Nadogradnja mikronukleus testa primjenom tehnike FISH daje detaljniju informaciju o porijeklu aberantnih kromatinskih struktura i dijelovima genoma koji ih tvore. Na taj način moguće je utvrditi koja je kromosomska regija ili specifični kromosom sadržan u mikronukleusu, jezgrenom pupu i mostu, sadrži li mikronukleus čitav kromosom te je li nukleoplazmatski most nastao telomernom fuzijom ili neraspoređivanjem dicentričnog kromosoma na polove (Norppa i Falck, 2003).

## **1.6. Svojstva korištenih pesticida**

### **1.6.1. Glifosat**

Glifosat pripada skupini organofosfornih herbicida. Puni naziv po IUPAC-u glasi N-(fosfometil) glicin, a molekulska formula mu je  $C_3H_8NO_5P$ .



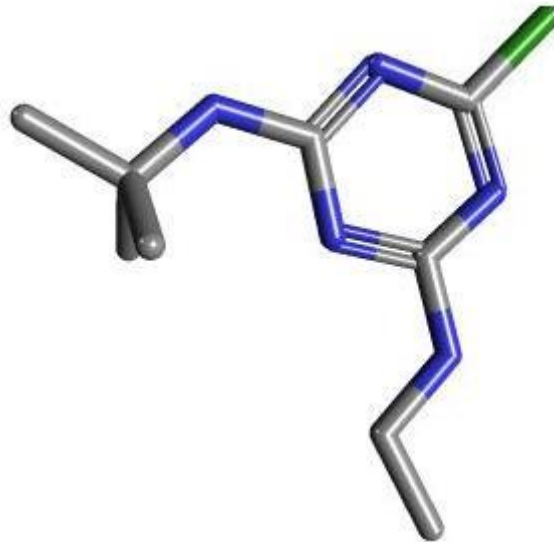
Slika 1. Strukturna formula N-(fosfonometil) glicina

Koristi se kao neselektivni postklijni organofosforni herbicid širokog spektra koji suzbija širokolisne korove (Smith i Oehme, 1992). U biljkama inhibira biosintezu aromatskih aminokiselina fenilalanina, tirozina i triptofana (Dimitrov i sur., 2006). Najviša koncentracija koja ne dovodi do patoloških promjena na organizmu (NOEL, engl. *No Observed Effect Level*) - za glifosat kod 3. generacije štakora iznosi 10 mg/kg/dan (EPA, 1993). Subkronična oralna razina izloženosti toksikantu koja se smatra sigurnom za zdravlje (RfD, engl. *Referent Dose*) - iznosi 0,1 mg/kg/dan (EPA, 1995a). Vrijednost ADI (engl. *Acceptable Daily Intake* - količina koja se može dnevno unositi cijeli život bez rizika za zdravlje) iznosi 0,3 mg/kg/dan (EPA, 1993). REL (engl. *Residential Exposure Level* - razina izloženosti toksikantu koja je dopuštena u mjestu stanovanja, uključuje skupno izloženost u vodi, hrani i zraku) iznosi 1,75 mg/kg/dan (EPA, 1996). OEL (engl. *Occupational Exposure Limit* - razina izloženosti koja je dopuštena za profesionalno izložene populacije) vrijednost nije uniformna i iznosi 0,0016-0,16 mg/kg/dan (Rubin, 1996). LD<sub>50</sub> glifosata pri oralnoj intoksikaciji štakora iznosi od 5600 mg/kg/dan (Rubin, 1996).

### 1.6.2. Terbutilazin

Terbutilazin pripada skupini klorotriazinskih herbicida. Puni naziv prema IUPAC-u glasi N<sup>2</sup>-tert-butil-6-klor-N<sup>4</sup>-etil-1,3,5-triazin-2,4-diamin, a molekulska formula mu je C<sub>9</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>5</sub>.





Slika 2. Strukturna formula N<sup>2</sup>-tert-butil-6-klor-N<sup>4</sup>-etil-1,3,5-triazin-2,4-diamin

Koristi se za suzbijanje korova u usjevima kukuruza, šećerne repe, maslina i ananasa. U biljkama inhibira protok elektrona u fotosustavu II u tilakoidnim membranama kloroplasta (Gebel i sur., 1997).

NOEL za terbutilazin iznosi 2,3 mg/kg/dan (EPA, 1995b). Vrijednosti RfD i ADI su jednake, te iznose 0,00035 mg/kg/dan (EPA, 1995b). REL iznosi 0,00048 mg/kg/dan (EPA, 1995b). Vrijednost za OEL iznosi 0,0048 mg/kg/dan (EPA, 1995b). LD<sub>50</sub> terbutilazina pri oralnoj intoksikaciji štakora iznosi najmanje 1503 mg/kg/dan (EPA, 1995b).

### 1.6.3. Karbofuran

Karbofuran pripada skupini karbamatnih insekticida. Puni naziv po IUPAC-u glasi 2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-il metilkarbamat, a molekulska formula mu je C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>.



Slika 2. Strukturna formula 2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-il metilkarbamat

Koristi se u suzbijanju insekata i nematoda koji se prehranjuju lišćem kukuruza, uljane repice, krumpira, soje, riže, kave, banane i drugih usjeva (BCPC, 2009). Karbofuran kod štetočinja inhibira razgradnju acetilkolinesteraze što dovodi do nakupljanja acetilkolina u sinapsama izloženih organizama i nefunkcioniranje živčanog sustava (Usmani i sur., 2004).

Subkronična oralna RfD iznosi 0,005 mg/kg/dan (EPA, 1994). ADI iznosi 0,01 mg/kg/dan (EPA, 1994). REL iznosi 0,000214 mg/kg/dan (EPA, 2006). OEL iznosi 0,013 mg/kg/dan (Hoover, 2007). LD<sub>50</sub> (koncentracija pesticida koja dovodi do smrtnosti 50% tretiranih životinja) karbofurana pri oralnoj intoksikaciji za štakore nije uniformna i iznosi od 5-13 mg/kg (Kidd i James, 1991).

## 1.7. Obrazloženje teme

Većina ljudske populacije u svakodnevnom životu je kroz hranu, vodu i zrak izložena niskim razinama pesticida pri kojima nema uočljivih akutnih simptoma toksičnosti. Dosadašnja istraživanja ukazala su da izloženost pesticidima može dovesti do štetnih utjecaja na razini genoma, do mutacije gena, strukturnih i numeričkih promjena kromosoma, te promjena u organizaciji kromatina. Povećanje količine oštećenja DNA uzrokuje genomsku nestabilnost što za posljedicu ima povišenje rizika od nastanka različitih tipova karcinoma. Realne niske razine izloženosti mogu se grupirati oko toksikoloških vrijednosti kao što su ADI koju susrećemo u svakodnevnoj (sigurnoj) izloženosti raznim agensima, REL (rezidencijalna izloženost ljudi kroz hranu, vodu i zrak), te OEL (izloženost osoba koje profesionalno sudjeluju u proizvodnji i/ili korištenju pesticida). Glavna ideja ovog istraživanja bila je provjeriti dolazi li do oštećenja DNA s navedenim toksikološkim vrijednostima za koje se smatra da nemaju štetni učinak na zdravlje ljudi. Istraživanje u uvjetima *ex vivo* provedeno je na primarnim i dugotrajnim kulturama limfocita čovjeka za procjenu nastanka primarnih oštećenja DNA. Odabrane aktivne tvari su glifosat, terbutilazin i karbofuran. U svijetu je vidljiv trend korištenja genetički modificiranih (GMO) biljaka, od kojih je veliki broj otporan na glifosat. Kao neželjena posljedica korištenja ove aktivne tvari pojavila se i otpornost korova na glifosat pa se predviđa i daljnje povećanje njegove potrošnje za suzbijanje korova. U europskim zemljama jedan od najkorištenijih herbicida do 2006. godine bio je atrazin. Zbog dugotrajnog zadržavanja u vodi i teratogenog učinka zabranjuje se korištenje atrazina, a kao njegova zamjena uvodi se terbutilazin. Posljednja aktivna tvar ispitivana u sklopu ovog istraživanja je karbofuran, a odabrana je jer se proizvodi i koristi u velikim količinama u Hrvatskoj. Budući da većina pesticida na tržište ne dolazi kao čista aktivna tvar već kao formulacija željeli smo ispitati postoji li razlika u učinku između njih. Većina tvari koja se

unese u organizam prolazi proces detoksikacije (metaboličke transformacije) pa smo zbog toga u uvjetima *ex vivo* koristili metabolički aktivator (S9).

Primarna oštećenja DNA su prvotne promjene u strukturi genoma uslijed izlaganja vanjskom agensu. Smatraju se biomarkerima izloženosti te ukazuju na izloženost jedinke štetnom agensu. S povećanjem razine primarnih oštećenja DNA dolazi do porasta vjerojatnosti njihovog prevođenja, mehanizmom koji je sklon pogreškama u sekundarna oštećenja koja su pokretači neoplastičnog rasta stanica. Ujedno, s obzirom da kao biomarkeri izloženosti pokazuju visoku korelaciju s dozom ksenobiotika pogodni su za procjenu genotoksičnog učinka pojedinih agenasa. Stoga smo, primjenom alkalnog komet testa pokušali procijeniti genotoksični potencijal glifosata, terbutilazina i karbofurana. Primjenom komet testa modificiranog enzimom hOGG1 željeli smo procijeniti dolazi li do nastanka specifičnih oksidativnih lezija te time razlikovati između mehanizama izravne i neizravne (epigenetičke) genotoksičnosti. Ujedno, s obzirom da primarna oštećenja DNA predstavljaju rezervoar potencijalnih lezija za nastanak sekundarnih oštećenja, rezultati alkalnog komet testa neizravno su doprinjeli inicijalnoj prosudbi moguće kancerogenosti.

Detaljniji doprinos procjeni kancerogenosti dan je nadogradnjom alkalnog komet testa tehnikom FISH-a. FISH-komet tehnikom ispitivali smo strukturnu stabilnost proto-onkogen *c-myc* i tumor supresor gena *TP 53* uslijed dugotrajne izloženosti pesticidima. Navedeni geni sudjeluju u regulaciji staničnog ciklusa, a njihove promjene u broju kopija, strukture i ekspresije utvrđene su u neoplazijama povezanim s izloženošću pesticidima.

Mikronukleus, kao manifestacija sekundarnih oštećenja, u biomonitoringu se smatra pouzdanim biomarkerom izloženosti za koji je pokazana značajna razina korelacije s rizikom razvoja neoplazija. Ponekad se mikronukleus svrstava i u biomarkere učinka. Analiziranjem sadržaja mikronukleusa primjenom pancentromernih sonda istražen je udio mikronukleusa koji potiču od cijelih kromosoma. Time smo željeli utvrditi razliku između aneugenog i klastogenog mehanizma djelovanja testiranih pesticida.

Saznanja koja smo dobili u uvjetima *ex vivo* željeli smo provjeriti i u uvjetima *in vivo*. Stoga smo kod radnika koji profesionalno koriste pesticide istražili utjecaj dugotrajne izloženosti primjenom pancentromernih sonda radi utvrđivanja aneugenog ili klastogenog mehanizma djelovanja. Specifično, primjenom sonda za kromosome X i Y željelo se procijeniti dolazi li do izraženijeg gubitka spolnih kromosoma za koje je otprije utvrđena učestala monosomija i asomija u stanicama limfoma.

## **2. Rezultati izvan znanstvenih radova**

Rezultati istraživanja ovog doktorata koji prelaze okvire 3 znanstvena rada, i nisu prikazani u spomenutim znanstvenim radovima, biti će prikazani u ovome poglavlju.

## **2.1. Kratkotrajno izlaganje leukocita aktivnim tvarima i formulacijama**

U Tablicama 2-4 prikazani su rezultati komet testa na leukocitima izlaganim aktivnim tvarima i formulacijama pesticida u trajanju od 4 sata. Statistički značajni porast vrijednosti parametara komet testa, u odnosu na kontrolu, uočen je nakon izlaganja formulaciji Mentor već pri koncentraciji koja odgovara ekvivalentu REL neovisno o dodatku S9 (Tablica 2). Nakon tretmana terbutilazinom i njegovom formulacijom Radazin razina primarnih oštećenja DNA značajno je porasla u ovisnosti o koncentraciji s i bez metaboličke aktivacije (Tablica 3). U Tablici 4 vidljiv je značajni porast % DNA u repu kometa već od ekvivalenta OEL uslijed tretmana karbofuranom i formulacijom Geocid.

Tablica 5 prikazuje značajno oksidacijsko oštećenje u leukocitima tretiranim formulacijom Mentor već od tretmana ekvivalentom REL, neovisno o dodatku mikrosomalne frakcije S9. Tretman terbutilazinom i formulacijom Radazin nije značajno povišio vrijednosti parametara komet testa modificiranog enzimom hOGG1 (Tablica 6), dok je u tretmanima karbofuranom i formulacijom Geocid značajan porast duljine repa i % DNA u repu kometa vidljiv samo nakon primjene najviših ekvivalenata 1/100 LD<sub>50</sub> i 1/16 LD<sub>50</sub> (Tablica 7).

## **2.2. Mikronukleus test i FISH na primarnim kulturama limfocita**

Slike 1-3 prikazuju ukupni broj mikronukleusa (MN), jezgrenih pupova (NB) i nukleoplazmatskih mostova (NPB) nastalih u primarnim kulturama limfocita uslijed 4 satnog izlaganja formulacijama s i bez dodatka metaboličke aktivacije. Također, na istim slikama prikazani su postoci centromernih i DAPI signala prisutnih u MN, NB i NPB.

Tretman formulacijom Mentor uzrokovao je značajno povećanje broja MN u limfocitima već kod koncentracije koja je odgovara ekvivalentu REL. Postotak centromernih signala u MN također raste ovisno o koncentraciji. Kod tretmana formulacijom Radazin značajni porast broja MN u limfocitima, kao i porast udjela MN koji sadrže centromerni signal, vidljiv je kod primjene ekvivalenta OEL. Formulacija Geocid nije utjecala na porast broja MN kao ni povećano izdvajanje centromernih signala u MN u odnosu na kontrolu (Slika 1). Sve tri

formulacije nisu značajno utjecale na porast broja NB i NPB u odnosu na kontrolu, kao ni povećano izdvajanje centromernih signala (Slike 2 i 3).

### **2.3. Dugotrajno izlaganje limfocita aktivnim tvarima i formulacijama**

Tablice 8-16 prikazuju rezultate izlaganja limfocita aktivnim tvarima i formulacijama u trajanju od 14 dana. U Tablici 8 jasno je vidljivo da su sve aktivne tvari i njihove formulacije značajno utjecale na porast vrijednosti % DNA u repu kometa, neovisno o dodatku metaboličke aktivacije.

Tretman glifosatom utjecao je na distribuciju signala za gen *c-Myc* pri izlaganju ekvivalentu OEL. U stanicama tretiranim ekvivalentom OEL utvrđeno je povećano strukturno oštećenje jedne ili obje kopije gena. Distribucija signala za centromeru kromosoma 8 (cen 8) u limfocitima nije se značajno promjenila u odnosu na kontrolu (Tablica 9). Nadalje, nakon tretmana ekvivalentom OEL uočen je porast udjela limfocita s fragmentacijom jednog, ali i oba signala za gen *TP 53*. Korištenjem metaboličke aktivacije zapaženo je značajno smanjenje udjela neoštećenih stanica, kao i porast broja stanica s jednim odnosno dva signala u repu. Ovdje je uočen i značajni učinak na migraciju signala za centromeru kromosoma 17 (cen 17) nakon 14-dnevnog tretmana (Tablica 10).

Nakon izlaganja formulaciji Mentor statistički značajno se povisio udio stanica s jednim, ali i oba signala za *c-Myc* u repu kometa, neovisno o dodatku S9. Što se tiče migracije signala za cen 8, također je uočeno značajno smanjenje broja neoštećenih stanica kao i udjela stanica s oba signala u repu, neovisno o metaboličkoj aktivaciji (Tablica 11). Udio neoštećenih stanica sa signalom za gen *TP 53* smanjuje se ovisno o dozi, a uočen je i porast udjela stanica s jednim ili oba signala u repu kometa neovisno o primjeni S9. Zapažen je i statistički značajno veći udio stanica u kojima je migrirao jedan, ali i oba signala za cen 17, u tretmanima s i bez S9 (Tablica 12).

Nakon tretmana formulacijom Radazin uočeno je značajno smanjenje udjela neoštećenih stanica za gen *c-Myc*, porast udjela stanica s jednim, ali i oba signala u repu kometa neovisno o dodatku S9 frakcije (Tablica 13). U pogledu distribucije signala za cen 8, utvrđen je značajno manji udio neoštećenih stanica, kao i porast broja stanica s jednim ili oba signala u repu kometa. Rezultati za gen *TP 53* prikazani su u Tablici 14 te je vidljivo da je tretman formulacijom značajno utjecao na smanjenje udjela neoštećenih stanica. Također, smanjio se

udio stanica s jednim i oba signala u repu kometa neovisno o dodatku S9. Jednaki rezultati dobiveni su i za dio kromosoma koji sadrži cen 17.

Nakon izlaganja formulaciji Geocid uočeno je smanjenje broja stanica s oba signala u glavi za gen *c-Myc*. Također, zapaženo je i značajno povišenje udjela stanica s jednim i oba signala u repu kometa, neovisno o primjeni S9. Rezultati za cen 8 upućuju na značajnu migraciju jednog ili oba signala u rep (Tablica 15). Tretman formulacijom utjecao je na smanjenje udjela neoštećenih stanica, kao i povećanu migraciju oba signala u rep kometa. Primjena S9 uzrokovala je značajnu migraciju jednog *TP 53* signala (Tablica 16). Rezultati za cen 17 upućuju na značajno smanjenje udjela neoštećenih stanica kao i porast udjela stanica s oba signala u repu.

## **2.4. Biomonitoring profesionalno izloženih populacija**

U Tablicama 17-18 prikazani su rezultati istraživanja na populaciji koja je profesionalno izložena različitim skupinama pesticida. U limfocitima periferne krvi profesionalno izloženih radnika utvrđen je značajno povišen broj MN, NB i NPB u odnosu na kontrolnu skupinu. Također, uočen je i značajni porast udjela MN koji sadrže centromerni i DAPI signal. Zapažena je i značajna pojava C+ signala u nukleoplazmatskim mostovima (Tablica 17). Izdvajanje signala za spolne kromosome u MN, NB i NPB nije bilo značajno (Tablica 18).

Tablica 2. Primarno oštećenje DNA u leukocitima tretiranim glifosatom (formulacija Mentor) s i bez dodatka metaboličke aktivacije (S9) u trajanju od 4 sata. Izmjerena oštećenja prikazana su kao srednje vrijednosti duljine i intenziteta repa.

Ekvivalenti koncentracija	Alkalni komet test	
	Duljina repa ( $\mu\text{m} \pm \text{S.D.}$ )	Intenzitet repa (% DNA $\pm \text{S.D.}$ )
ADI	19,0 $\pm$ 4,0	2,0 $\pm$ 3,0
ADI+S9	20,0 $\pm$ 3,0	2,0 $\pm$ 4,0
REL	21,0 $\pm$ 3,0*	3,0 $\pm$ 4,5**
REL+S9	21,5 $\pm$ 4,0**	4,5 $\pm$ 7,5**
OEL	21,5 $\pm$ 4,0**	4,0 $\pm$ 4,5**
OEL+S9	24,5 $\pm$ 7,0**##††	6,5 $\pm$ 9,0**##††‡‡
1/100 LD <sub>50</sub>	23,0 $\pm$ 5,5**‡‡	6,5 $\pm$ 4,5**††‡‡
1/100 LD <sub>50</sub> +S9	25,0 $\pm$ 5,0**#	8,5 $\pm$ 7,0**††‡‡
1/16 LD <sub>50</sub>	26,0 $\pm$ 7,5**††‡‡	8,0 $\pm$ 12,0**‡‡
1/16 LD <sub>50</sub> +S9	31,0 $\pm$ 12,5**##††‡‡	11,5 $\pm$ 11,0**##††‡‡
K	19,0 $\pm$ 2,0	1,0 $\pm$ 1,0
K <sub>poz</sub>	40,0 $\pm$ 21,5	28,5 $\pm$ 11,0
K+S9	19,5 $\pm$ 3,5	1,0 $\pm$ 1,0
K <sub>poz</sub> +S9	38,5 $\pm$ 19,0	30,5 $\pm$ 9,0

\*p<0,05; \*\*p<0,01 u odnosu na kontrolu; #p<0,05; ##p<0,01 u odnosu na tretman bez S9; †p<0,05; ††p<0,01; u odnosu na nižu koncentraciju; ‡p<0,05; ‡‡p<0,01 u odnosu na tretman s aktivnom tvari; ADI- dnevno dopušten unos; REL-rezidencijalna izloženost; OEL-profesionalna izloženost; LD<sub>50</sub>- letalna doza; K-negativna kontrola; K<sub>poz</sub>-pozitivna kontrola, stanice su uklopljene u gel, a pripremljeni preparati tretirani s 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u trajanju od 10 min na ledu;



Tablica 3. Primarno oštećenje DNA u leukocitima tretiranim terbutilazinom (aktivna tvar i formulacija) s i bez dodatka metaboličke aktivacije (S9) u trajanju od 4 sata. Izmjerena oštećenja prikazana su kao srednje vrijednosti duljine i intenziteta repa.

Ekvivalenti koncentracija	Alkalni komet test			
	Aktivna tvar		Formulacija	
	Duljina repa ( $\mu\text{m} \pm \text{S.D.}$ )	Intenzitet repa (% DNA $\pm \text{S.D.}$ )	Duljina repa ( $\mu\text{m} \pm \text{S.D.}$ )	Intenzitet repa (% DNA $\pm \text{S.D.}$ )
ADI	19,0 $\pm$ 3,5	7,5 $\pm$ 5,0**	21,0 $\pm$ 5,5	5,5 $\pm$ 3,5**
ADI+S9	21,5 $\pm$ 3,0	10,0 $\pm$ 4,5***##	21,0 $\pm$ 4,0	5,0 $\pm$ 4,0**
REL	26,0 $\pm$ 6,5**††	7,5 $\pm$ 5,0**	23,5 $\pm$ 6,0**	7,0 $\pm$ 5,0**
REL+S9	24,0 $\pm$ 3,0**	9,0 $\pm$ 5,0**#	28,5 $\pm$ 8,0**	8,0 $\pm$ 6,0**†
OEL	29,5 $\pm$ 6,0**††	10,0 $\pm$ 5,0**††	26,0 $\pm$ 5,5**††	6,0 $\pm$ 5,5**
OEL+S9	38,0 $\pm$ 10,5***##††	12,0 $\pm$ 5,0***##††	32,0 $\pm$ 9,5***##††	9,0 $\pm$ 6,5***##
1/100 LD <sub>50</sub>	35,5 $\pm$ 7,5**††	13,5 $\pm$ 5,5**††	28,5 $\pm$ 6,5**††	7,5 $\pm$ 6,0**
1/100 LD <sub>50</sub> +S9	39,0 $\pm$ 7,0***##††	15,5 $\pm$ 7,0***##††	34,5 $\pm$ 10,0**††	9,5 $\pm$ 6,5***##
1/16 LD <sub>50</sub>	60,5 $\pm$ 17,5**	18,0 $\pm$ 11,0**	33,0 $\pm$ 12,0**††	8,5 $\pm$ 6,5**
1/16 LD <sub>50</sub> +S9	51,5 $\pm$ 17,0	19,0 $\pm$ 10,5	36,0 $\pm$ 9,0**	9,5 $\pm$ 6,0**
Kont	18,0 $\pm$ 2,5	0,60 $\pm$ 1,0	19,0 $\pm$ 2,0	1,0 $\pm$ 1,0
K <sub>poz</sub>	41,0 $\pm$ 25,0	30,0 $\pm$ 9,50	40,0 $\pm$ 21,5	28,5 $\pm$ 11,0
Kont+S9	19,5 $\pm$ 2,5	1,0 $\pm$ 2,5	19,5 $\pm$ 3,5	1,0 $\pm$ 1,0
K <sub>poz</sub> +S9	36,0 $\pm$ 17,5	31,0 $\pm$ 10,5	38,5 $\pm$ 19,0	30,5 $\pm$ 9,0

\*p<0,05; \*\*p<0,01 u odnosu na kontrolu; #p<0,05; ##p<0,01 u odnosu na tretman bez S9; †p<0,05; ††p<0,01; u odnosu na nižu koncentraciju; ‡p<0,05; ‡‡p<0,01 u odnosu na tretman s aktivnom tvari; ADI-dnevno dopušten unos; REL-rezidencijalna izloženost; OEL-profesionalna izloženost; LD<sub>50</sub>- letalna doza; K-negativna kontrola; K<sub>poz</sub>-pozitivna kontrola, stanice su uklopljene u gel, a pripremljeni preparati tretirani s 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u trajanju od 10 min na ledu;

Tablica 4. Primarno oštećenje DNA u leukocitima tretiranim karbofuranom (aktivna tvar i formulacija) s i bez dodatka metaboličke aktivacije (S9) u trajanju od 4 sata. Izmjerena oštećenja prikazana su kao srednje vrijednosti duljine i intenziteta repa.

Ekvivalenti koncentracija	Alkalni komet test			
	Aktivna tvar		Formulacija	
	Duljina repa ( $\mu\text{m} \pm \text{S.D.}$ )	Intenzitet repa (% DNA $\pm \text{S.D.}$ )	Duljina repa ( $\mu\text{m} \pm \text{S.D.}$ )	Intenzitet repa (% DNA $\pm \text{S.D.}$ )
ADI	21,5 $\pm$ 3,0 <sup>**††</sup>	2,0 $\pm$ 2,5 <sup>**</sup>	20,5 $\pm$ 3,5 <sup>**</sup>	1,5 $\pm$ 2,0
ADI+S9	21,5 $\pm$ 3,0 <sup>**††</sup>	2,5 $\pm$ 3,0 <sup>**††</sup>	20,0 $\pm$ 3,0	1,5 $\pm$ 2,0
REL	19,5 $\pm$ 2,5 <sup>*</sup>	1,5 $\pm$ 2,0 <sup>**</sup>	20,0 $\pm$ 2,0	1,5 $\pm$ 1,5
REL+S9	20,0 $\pm$ 2,5 <sup>**</sup>	1,5 $\pm$ 2,0 <sup>**</sup>	20,0 $\pm$ 2,5	1,5 $\pm$ 2,0
OEL	24,0 $\pm$ 4,5 <sup>**††</sup>	3,5 $\pm$ 4,5 <sup>**††</sup>	22,5 $\pm$ 5,0 <sup>**††</sup>	2,0 $\pm$ 3,5 <sup>**††</sup>
OEL+S9	25,0 $\pm$ 5,0 <sup>**††#</sup>	4,0 $\pm$ 5,0 <sup>**††</sup>	23,0 $\pm$ 3,0 <sup>**††</sup>	2,5 $\pm$ 2,5 <sup>**††</sup>
1/100 LD <sub>50</sub>	25,5 $\pm$ 4,5 <sup>**†</sup>	4,0 $\pm$ 4,0 <sup>**</sup>	22,5 $\pm$ 5,0 <sup>**</sup>	2,0 $\pm$ 3,0 <sup>**</sup>
1/100 LD <sub>50</sub> +S9	27,0 $\pm$ 5,5 <sup>**</sup>	5,0 $\pm$ 4,5 <sup>**†#</sup>	24,5 $\pm$ 3,0 <sup>**††</sup>	3,5 $\pm$ 3,0 <sup>**††</sup>
1/16 LD <sub>50</sub>	24,0 $\pm$ 7,0 <sup>**</sup>	3,0 $\pm$ 4,5 <sup>**</sup>	22,5 $\pm$ 4,5 <sup>**</sup>	2,5 $\pm$ 3,0 <sup>**</sup>
1/16 LD <sub>50</sub> +S9	24,5 $\pm$ 5,5 <sup>**</sup>	3,0 $\pm$ 4,5 <sup>**</sup>	27,5 $\pm$ 4,5 <sup>**††##††</sup>	7,0 $\pm$ 7,0 <sup>**††##††</sup>
K	18,0 $\pm$ 2,5	0,60 $\pm$ 1,0	19,0 $\pm$ 2,0	1,0 $\pm$ 1,0
K <sub>poz</sub>	41,0 $\pm$ 25,0	30,0 $\pm$ 9,50	40,0 $\pm$ 21,5	28,5 $\pm$ 11,0
K+S9	19,5 $\pm$ 2,5	1,0 $\pm$ 2,5	19,5 $\pm$ 3,5	1,0 $\pm$ 1,0
K <sub>poz</sub> +S9	36,0 $\pm$ 17,5	31,0 $\pm$ 10,5	38,5 $\pm$ 19,0	30,5 $\pm$ 9,0

\*p<0,05; \*\*p<0,01 u odnosu na kontrolu; #p<0,05; ##p<0,01 u odnosu na tretman bez S9; †p<0,05; ††p<0,01; u odnosu na nižu koncentraciju; ‡p<0,05; ‡‡p<0,01 u odnosu na tretman s aktivnom tvari; ADI- dnevno dopušten unos; REL-rezidencijalna izloženost; OEL-profesionalna izloženost; LD<sub>50</sub>- letalna doza; K-negativna kontrola; K<sub>poz</sub>-pozitivna kontrola, stanice su uklopljene u gel, a pripremljeni preparati tretirani s 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u trajanju od 10 min na ledu;

Tablica 5. Oksidacijsko oštećenje leukocita tretiranim glifosatom (formulacija Mentor) s i bez dodatka metaboličke aktivacije (S9) u trajanju od 4 sata. Izmjerena oksidacijska oštećenja izračunata su kao razlika vrijednosti komet preparata tretiranih enzimom popravka hOGG1 i komet preparata tretiranih samo s puferom.

Ekvivalenti koncentracija	Modificirani komet test s enzimom popravka hOGG1	
	Duljina repa ( $\mu\text{m} \pm \text{S.D.}$ )	Intenzitet repa (% DNA $\pm \text{S.D.}$ )
ADI	1,1 $\pm$ 1,3	0,47 $\pm$ 0,6
ADI+S9	1,3 $\pm$ 0,7	0,5 $\pm$ 0,7
REL	2,3 $\pm$ 1,3 <sup>**††‡‡</sup>	1,5 $\pm$ 3,3 <sup>**††‡‡</sup>
REL+S9	3,0 $\pm$ 4,7 <sup>**††‡‡</sup>	3,0 $\pm$ 4,4 <sup>**††‡‡</sup>
OEL	3,1 $\pm$ 2,2 <sup>**††‡‡</sup>	2,7 $\pm$ 8,6 <sup>**††‡‡</sup>
OEL+S9	4,6 $\pm$ 3,4	3,1 $\pm$ 3,4 <sup>**††</sup>
1/100 LD <sub>50</sub>	4,9 $\pm$ 3,8 <sup>**††‡‡</sup>	3,7 $\pm$ 7,3 <sup>**</sup>
1/100 LD <sub>50</sub> +S9	5,0 $\pm$ 5,3 <sup>**††‡‡</sup>	4,1 $\pm$ 6,4 <sup>**</sup>
1/16 LD <sub>50</sub>	6,1 $\pm$ 4,0 <sup>**††</sup>	5,9 $\pm$ 4,8 <sup>**††‡‡</sup>
1/16 LD <sub>50</sub> +S9	6,3 $\pm$ 0,4 <sup>**††</sup>	10,7 $\pm$ 2,5 <sup>**††‡‡</sup>
K	0,4 $\pm$ 0,6	0,1 $\pm$ 0,1
K <sub>poz</sub>	10,7 $\pm$ 5,2	11,1 $\pm$ 7,0
K+S9	0,3 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,4
K <sub>poz</sub> +S9	12,0 $\pm$ 4,7	12,4 $\pm$ 6,2

\*p<0,05; \*\*p<0,01 u odnosu na kontrolu; #p<0,05; ##p<0,01 u odnosu na tretman bez S9; †p<0,05; ††p<0,01; u odnosu na nižu koncentraciju; ‡p<0,05; ‡‡p<0,01 u odnosu na tretman s aktivnom tvari; ADI- dnevno dopušten unos; REL-rezidencijalna izloženost; OEL-profesionalna izloženost; LD<sub>50</sub>- letalna doza; K-negativna kontrola; K<sub>poz</sub>-pozitivna kontrola, stanice su uklopljene u gel, a pripremljeni preparati tretirani s 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u trajanju od 10 min na ledu;

Tablica 6. Oksidacijsko oštećenje leukocita tretiranim terbutilazinom (aktivna tvar i formulacija) s i bez dodatka metaboličke aktivacije (S9) u trajanju od 4 sata. Izmjerena oksidacijska oštećenja izračunata su kao razlika vrijednosti komet preparata tretiranih enzimom popravka hOGG1 i komet preparata tretiranih samo s puferom.

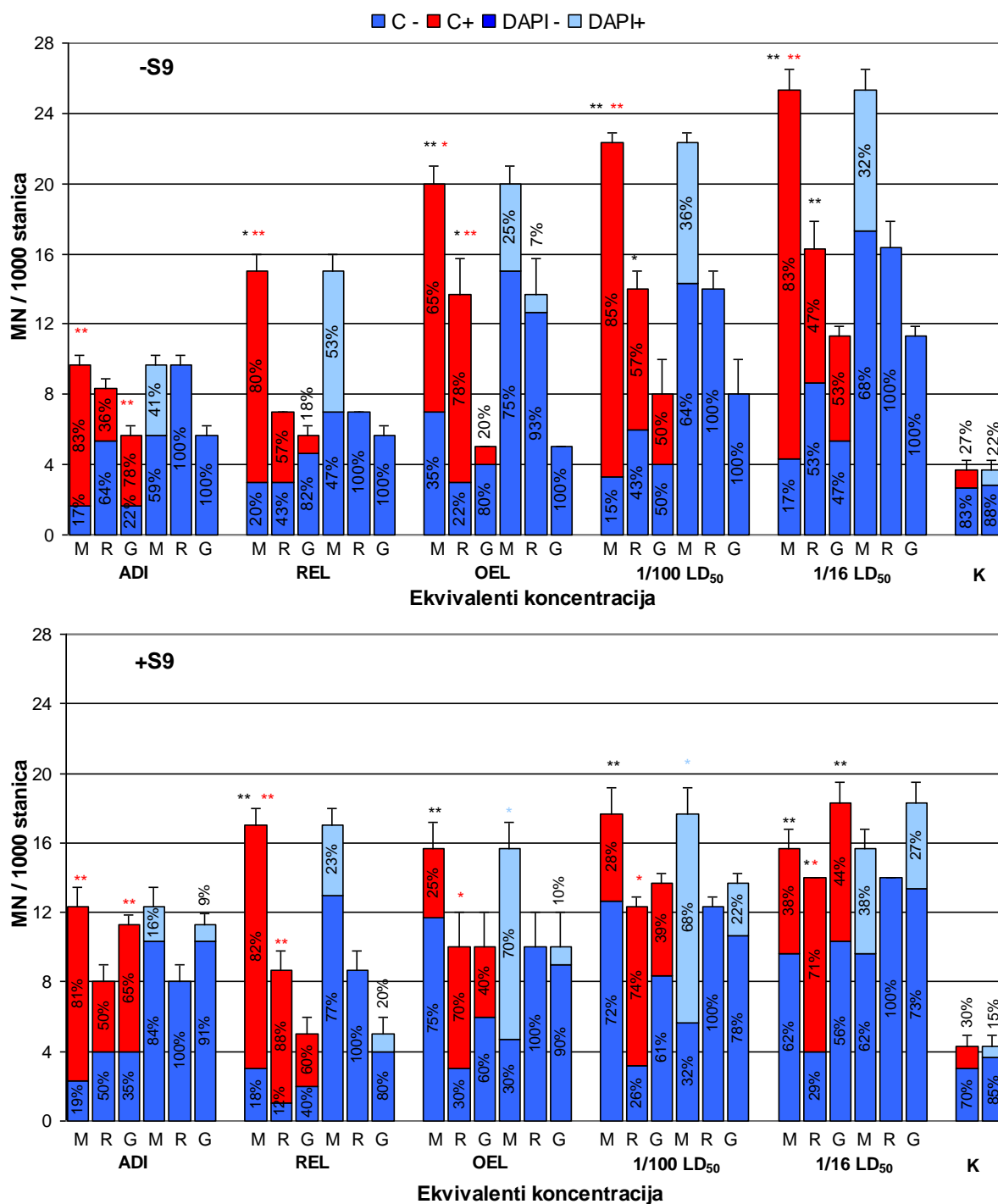
Ekvivalenti koncentracija	Modificirani komet test s enzimom popravka hOGG1			
	Aktivna tvar		Formulacija	
	Duljina repa ( $\mu\text{m} \pm \text{S.D.}$ )	Intenzitet repa (% DNA $\pm \text{S.D.}$ )	Duljina repa ( $\mu\text{m} \pm \text{S.D.}$ )	Intenzitet repa (% DNA $\pm \text{S.D.}$ )
ADI	1,8 $\pm$ 1,1	1,0 $\pm$ 0,2	4,4 $\pm$ 0,4 <sup>**†‡</sup>	3,5 $\pm$ 0,2 <sup>**†</sup>
ADI+S9	1,1 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 1,0	3,0 $\pm$ 0,2 <sup>**†</sup>
REL	2,0 $\pm$ 0,7 <sup>*</sup>	0,8 $\pm$ 0,3	1,2 $\pm$ 0,7	0,6 $\pm$ 0,5
REL+S9	1,6 $\pm$ 0,4 <sup>*</sup>	1,5 $\pm$ 0,3 <sup>*</sup>	2,3 $\pm$ 0,2 <sup>*#</sup>	1,2 $\pm$ 0,4
OEL	0,6 $\pm$ 1,2	1,2 $\pm$ 0,7	0,6 $\pm$ 0,8	0,8 $\pm$ 0,7
OEL+S9	1,3 $\pm$ 0,3	1,7 $\pm$ 0,2 <sup>*</sup>	0,4 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,3
1/100 LD <sub>50</sub>	0,6 $\pm$ 1,0	1,3 $\pm$ 0,9	0,8 $\pm$ 0,5	1,0 $\pm$ 1,1
1/100 LD <sub>50</sub> +S9	0,5 $\pm$ 0,7	1,6 $\pm$ 0,6	1,3 $\pm$ 1,2	1,9 $\pm$ 0,7 <sup>**</sup>
1/16 LD <sub>50</sub>	0,4 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,2	0,8 $\pm$ 0,7	1,3 $\pm$ 0,6
1/16 LD <sub>50</sub> +S9	3,3 $\pm$ 1,7	0,8 $\pm$ 1,1	3,5 $\pm$ 1,1	3,6 $\pm$ 0,4 <sup>**##‡</sup>
K	0,5 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,6	0,1 $\pm$ 0,1
K <sub>poz</sub>	11,0 $\pm$ 4,4	12,6 $\pm$ 7,6	10,7 $\pm$ 5,2	11,1 $\pm$ 7,0
K+S9	0,4 $\pm$ 0,6	0,2 $\pm$ 0,4	0,3 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,4
K <sub>poz</sub> +S9	11,1 $\pm$ 3,8	15,2 $\pm$ 8,1	12,0 $\pm$ 4,7	12,4 $\pm$ 6,2

\*p<0,05; \*\*p<0,01 u odnosu na kontrolu; #p<0,05; ##p<0,01 u odnosu na tretman bez S9; †p<0,05; ††p<0,01; u odnosu na nižu koncentraciju; ‡p<0,05; ‡‡p<0,01 u odnosu na tretman s aktivnom tvari; ADI- dnevno dopušten unos; REL-rezidencijalna izloženost; OEL-profesionalna izloženost; LD<sub>50</sub>- letalna doza; K-negativna kontrola; K<sub>poz</sub>-pozitivna kontrola, stanice su uklopljene u gel, a pripremljeni preparati tretirani s 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u trajanju od 10 min na ledu;

Tablica 7. Oksidacijsko oštećenje leukocita tretiranim karbofuranom (aktivna tvar i formulacija) s i bez dodatka metaboličke aktivacije (S9) u trajanju od 4 sata. Izmjerena oksidacijska oštećenja izračunata su kao razlika vrijednosti komet preparata tretiranih enzimom popravka hOGG1 i komet preparata tretiranih samo s puferom.

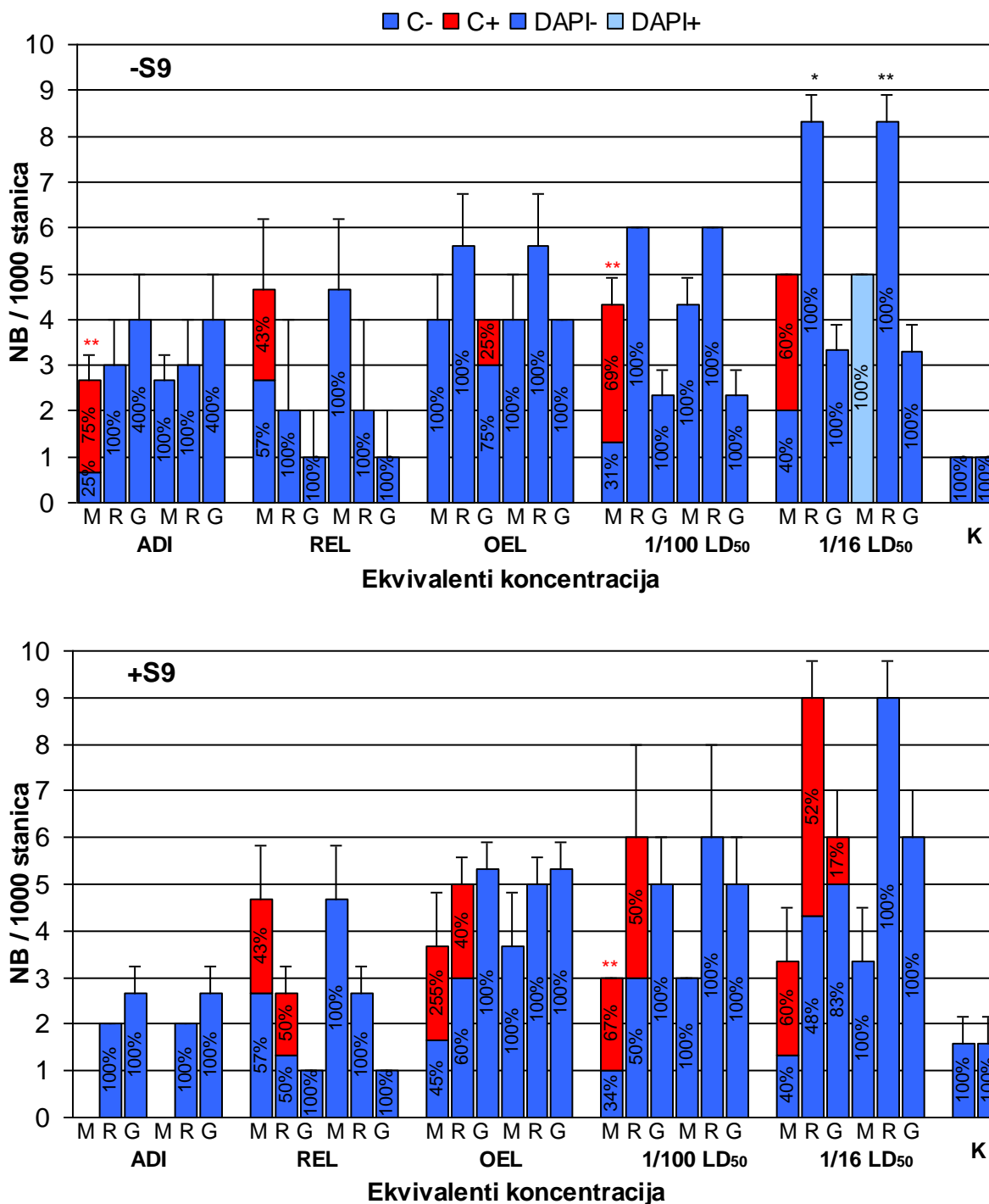
Ekvivalenti koncentracija	Modificirani komet test s enzimom popravka hOGG1			
	Aktivna tvar		Formulacija	
	Duljina repa ( $\mu\text{m} \pm \text{S.D.}$ )	Intenzitet repa (% DNA $\pm$ S.D.)	Duljina repa ( $\mu\text{m} \pm \text{S.D.}$ )	Intenzitet repa (% DNA $\pm$ S.D.)
ADI	0,9 $\pm$ 0,3	0,3 $\pm$ 0,4	0,8 $\pm$ 0,6	0,6 $\pm$ 1,0
ADI+S9	4,9 $\pm$ 0,1**	0,4 $\pm$ 0,5	1,3 $\pm$ 0,4	0,3 $\pm$ 1,0
REL	1,1 $\pm$ 0,4	0,1 $\pm$ 0,5	0,6 $\pm$ 0,5	0,7 $\pm$ 1,9
REL+S9	4,3 $\pm$ 1,3**	0,3 $\pm$ 0,8	0,9 $\pm$ 0,4	0,3 $\pm$ 0,5
OEL	0,9 $\pm$ 0,7	0,4 $\pm$ 0,7	2,0 $\pm$ 0,6***††	0,6 $\pm$ 1,3
OEL+S9	3,2 $\pm$ 0,6**	0,5 $\pm$ 0,6	1,7 $\pm$ 0,6**	0,5 $\pm$ 0,7
1/100 LD <sub>50</sub>	0,7 $\pm$ 0,8	0,6 $\pm$ 0,7	3,1 $\pm$ 1,8***††	1,2 $\pm$ 1,1***††††
1/100 LD <sub>50</sub> +S9	3,1 $\pm$ 0,5**	0,9 $\pm$ 0,9	2,6 $\pm$ 1,4***††	0,9 $\pm$ 0,7
1/16 LD <sub>50</sub>	0,5 $\pm$ 0,9	1,3 $\pm$ 3,1**	4,1 $\pm$ 1,7***††	2,7 $\pm$ 1,8***††††
1/16 LD <sub>50</sub> +S9	3,7 $\pm$ 1,0**	2,0 $\pm$ 1,0**	3,9 $\pm$ 2,0***††	1,7 $\pm$ 2,5***††
K	0,5 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,6	0,1 $\pm$ 0,1
K <sub>poz</sub>	11,0 $\pm$ 4,4	12,6 $\pm$ 7,6	10,7 $\pm$ 5,2	11,1 $\pm$ 7,0
K+S9	0,4 $\pm$ 0,6	0,2 $\pm$ 0,4	0,3 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,4
K <sub>poz</sub> +S9	11,1 $\pm$ 3,8	15,2 $\pm$ 8,1	12,0 $\pm$ 4,7	12,4 $\pm$ 6,2

\*p<0,05; \*\*p<0,01 u odnosu na kontrolu; #p<0,05; ##p<0,01 u odnosu na tretman bez S9; †p<0,05; ††p<0,01; u odnosu na nižu koncentraciju; ‡p<0,05; ‡‡p<0,01 u odnosu na tretman s aktivnom tvari; ADI- dnevno dopušten unos; REL-rezidencijalna izloženost; OEL-profesionalna izloženost; LD<sub>50</sub>- letalna doza; K-negativna kontrola; K<sub>poz</sub>-pozitivna kontrola, stanice su uklopljene u gel, a pripremljeni preparati tretirani s 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u trajanju od 10 min na ledu;



Slika 4. Prikaz postotka centromernih signala u ukupnom broju mikronukleusa u binuklearnim ljudskim limfocitima tretiranim formulacijama s i bez dodatka metaboličke aktivacije (S9) u trajanju od 4 sata. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija.

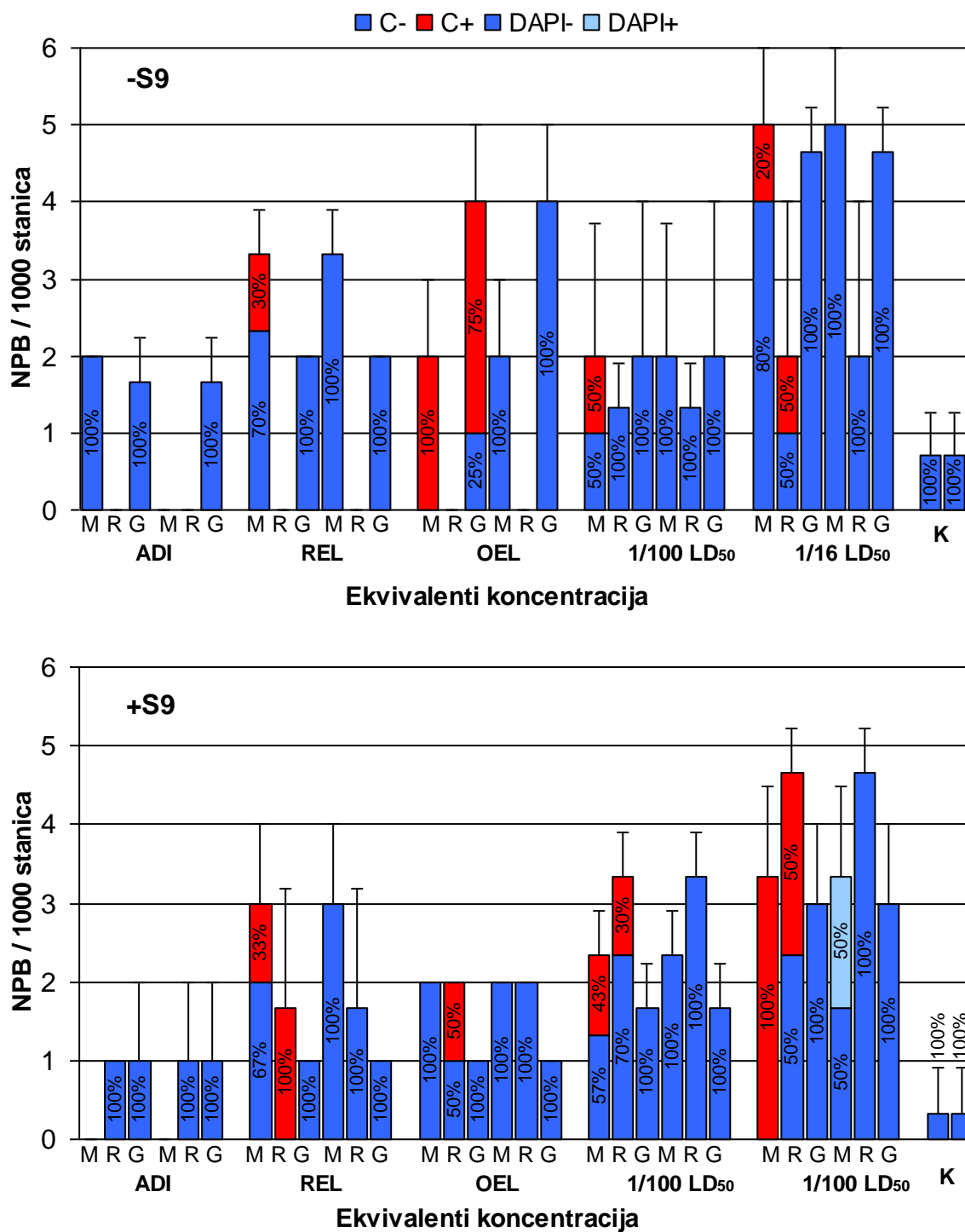
C- % mikronukleusa bez centromernog signala; C+ % mikronukleusa s centromernim signalom; DAPI- % mikronukleusa bez DAPI signala; DAPI+ % mikronukleusa s DAPI signalom;  
 \*p<0,05; \*\*p<0,01 u odnosu na kontrolu; \*p<0,05; \*\*p<0,01 u odnosu na kontrolu (C+); \*p<0,05 u odnosu na kontrolu (DAPI+); M- Mentor formulacija; R- Radazin formulacija; G- Geocid formulacija; ADI- dnevno dopušten unos; REL-rezidencijalna izloženost; OEL-profesionalna izloženost; LD<sub>50</sub>- letalna doza; K-negativna kontrola;



Slika 5. Prikaz postotka centromernih signala u ukupnom broju jezgrenih pupova u binuklearnim ljudskim limfocitima tretiranim formulacijama s i bez dodatka metaboličke aktivacije (S9) u trajanju od 4 sata. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija.

C- % mikronukleusa bez centromernog signala; C+ % mikronukleusa s centromernim signalom; DAPI- % mikronukleusa bez DAPI signala; DAPI+ % mikronukleusa s DAPI signalom;

\*p<0,05; \*\*p<0,01 u odnosu na kontrolu; \*p<0,05; \*\*p<0,01 u odnosu na kontrolu (C+); \*p<0,05 u odnosu na kontrolu (DAPI+); M- Mentor formulacija; R- Radazin formulacija; G- Geocid formulacija; ADI- dnevno dopušten unos; REL-rezidencijalna izloženost; OEL-profesionalna izloženost; LD<sub>50</sub>- letalna doza; K-negativna kontrola;



Slika 6. Prikaz postotka centromernih signala u ukupnom broju nukleoplazmatskih mostova u binuklearnim ljudskim limfocitima tretiranim formulacijama s i bez dodatka metaboličke aktivacije (S9) u trajanju od 4 sata. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija.

C- % mikronukleusa bez centromernog signala; C+ % mikronukleusa s centromernim signalom; DAPI- % mikronukleusa bez DAPI signala; DAPI+ % mikronukleusa s DAPI signalom;

\*p<0,05; \*\*p<0,01 u odnosu na kontrolu; \*p<0,05; \*\*p<0,01 u odnosu na kontrolu (C+); \*p<0,05 u odnosu na kontrolu (DAPI+); M- Mentor formulacija; R- Radazin formulacija; G- Geocid formulacija; ADI- dnevno dopušten unos; REL-rezidencijalna izloženost; OEL-profesionalna izloženost; LD<sub>50</sub>- letalna doza; K-negativna kontrola;



Tablica 8. Rezultati alkalnog komet testa u dugotrajnim kulturama limfocita tretiranim glifosatom, terbutilazinom i karbofuranom (aktivna tvar i formulacija) s i bez dodatka metaboličke aktivacije (S9) u trajanju od 14 dana.

Ekvivalenti koncentracija	Dužina repa ( $\mu\text{m}\pm\text{S.D.}$ )			Intenzitet repa (% DNA $\pm\text{S.D.}$ )		
	Glifosat	Terbutilazin	Karbofuran	Glifosat	Terbutilazin	Karbofuran
ADI	20,0 $\pm$ 11,5	21,5 $\pm$ 8,0	26,0 $\pm$ 13,0*	4,5 $\pm$ 12,0*	2,5 $\pm$ 5,0	7,0 $\pm$ 19,5*
OEL	20,5 $\pm$ 3,5	22,5 $\pm$ 13,0	24,5 $\pm$ 15,0	6,5 $\pm$ 8,0**	5,0 $\pm$ 13,0*	9,0 $\pm$ 20,5**
ADI+S9	24,0 $\pm$ 10,5#	17,5 $\pm$ 5,0**	17,5 $\pm$ 8,5*	7,0 $\pm$ 10,5**	2,5 $\pm$ 7,5	4,0 $\pm$ 12,0*
OEL+S9	24,5 $\pm$ 14,5#	20,0 $\pm$ 9,0**	26,0 $\pm$ 10,5**	9,5 $\pm$ 19,0**	4,5 $\pm$ 12,0*	7,0 $\pm$ 13,5**
Formulacija	Mentor	Radazin	Geocid	Mentor	Radazin	Geocid
ADI	21,5 $\pm$ 12,0	20,5 $\pm$ 13,0	21,5 $\pm$ 13,0	7,0 $\pm$ 14,5**	8,5 $\pm$ 21,0**‡‡	8,0 $\pm$ 20,0**
OEL	22,0 $\pm$ 15,0	25,0 $\pm$ 19,0‡‡	25,0 $\pm$ 15,5	8,5 $\pm$ 19,0**	14,5 $\pm$ 28,0**‡‡	14,0 $\pm$ 27,0**
ADI+S9	22,0 $\pm$ 9,5**	23,0 $\pm$ 14,5**‡‡	22,5 $\pm$ 14,5**‡‡	6,0 $\pm$ 14,0*	9,5 $\pm$ 20,5**‡‡	10,5 $\pm$ 24,0**‡‡
OEL+S9	23,0 $\pm$ 17,5**	27,0 $\pm$ 20,5**‡‡	32,0 $\pm$ 18,0**‡‡	9,5 $\pm$ 21,0**	14,0 $\pm$ 26,0**‡‡	21,5 $\pm$ 31,0**‡‡
K		22,0 $\pm$ 5,00			1,5 $\pm$ 3,0	
K <sub>poz</sub>		48,0 $\pm$ 6,5			35,0 $\pm$ 19,5	
K+S9		15,5 $\pm$ 2,0			1,0 $\pm$ 2,5	
K <sub>poz</sub> +S9		54,0 $\pm$ 8,0			46,5 $\pm$ 20,5	

\*p<0,05;\*\*p<0,01 u odnosu na kontrolu; # p<0,05 -S9 u odnosu na +S9; ‡‡p<0,05 aktivna tvar u odnosu na formulaciju; ADI- dnevno dopušten unos; OEL-profesionalna izloženost; K-negativna kontrola; K<sub>poz</sub>-pozitivna kontrola, stanice su uklopljene u gel, a pripremljeni preparati tretirani s 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u trajanju od 10 min na ledu;

Tablica 9. Migracija *c-Myc* signala u rep kometa nakon 14 dana izlaganja glifosatu u dugotrajnim kulturama limfocita s i bez dodatka metaboličke aktivacije (S9).

Ekvivalenti koncentracija	% ( $\pm$ S.D.) stanica ovisno o broju <i>c-Myc</i> (crvenih) signala u repu kometa			% ( $\pm$ S.D.) stanica ovisno o broju cen 8 (zelenih) signala u repu kometa		
	0 <sup>1</sup>	1	2	0 <sup>1</sup>	1	2
ADI	82,0 $\pm$ 7,0	14,5 $\pm$ 4,0	3,5 $\pm$ 3,5*	92,0 $\pm$ 2,0	8,0 $\pm$ 2,0	0,0 $\pm$ 0,0
OEL	63,5 $\pm$ 3,5**	30,0 $\pm$ 3,5***††	6,5 $\pm$ 3,5***†	89,0 $\pm$ 2,0	11,0 $\pm$ 2,0	0,0 $\pm$ 0,0
ADI+S9	75,5 $\pm$ 4,0*	16,5 $\pm$ 3,5	8,0 $\pm$ 2,0**	83,5 $\pm$ 3,5*#	14,5 $\pm$ 5,0	2,0 $\pm$ 2,0
OEL+S9	56,5 $\pm$ 3,5***††	24,5 $\pm$ 2,0***†	19,0 $\pm$ 2,0***#††	72,0 $\pm$ 7,0*†	18,0 $\pm$ 5,0	10,0 $\pm$ 3,5***††
K	88,0 $\pm$ 2,0	12,0 $\pm$ 2,0	0,0 $\pm$ 0,0	93,5 $\pm$ 3,5	6,5 $\pm$ 3,5	0,0 $\pm$ 0,0
K <sub>poz</sub>	21,0 $\pm$ 4,0	41,0 $\pm$ 7,0	38,0 $\pm$ 5,0	20,0 $\pm$ 6,5	41,0 $\pm$ 5,0	39,0 $\pm$ 7,0
K+S9	91,0 $\pm$ 5,0	9,0 $\pm$ 5,0	0,0 $\pm$ 0,0	92,0 $\pm$ 4,0	8,0 $\pm$ 4,0	0,0 $\pm$ 0,0
K <sub>poz</sub> +S9	14,5 $\pm$ 5,0	39,0 $\pm$ 5,0	46,5 $\pm$ 3,5	22,0 $\pm$ 1,5	43,5 $\pm$ 1,0	34,5 $\pm$ 1,5

<sup>1</sup>oba signala locirana su u glavi kometa (tri preparata s 30 stanica); \*p<0,05; \*\*p<0,01 u odnosu na kontrolu; #p<0,05; ##p<0,01 u odnosu na tretman bez S9; †p<0,05; ††p<0,01; u odnosu na nižu koncentraciju; ‡p<0,05; ‡‡p<0,01 u odnosu na tretman s aktivnom tvari; Zeleni signal je FITC obilježena proba za centromere kromosoma broj 8, dok je crveni signal Texas Red obilježena proba za *c-Myc* gen. Stupac s brojem 2 označava pojavu obje centromere/gena u repu kometa, a broj 1 pojavu samo jedne centromere/gena u repu kometa, dok druga zapostaje u glavi. ADI- dnevno dopušten unos; OEL-profesionalna izloženost; K-negativna kontrola; K<sub>poz</sub>-pozitivna kontrola, stanice su uklopljene u gel, a pripremljeni preparati tretirani s 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u trajanju od 10 min na ledu;

Tablica 10. Migracija *TP53* signala u rep kometa nakon 14 dana izlaganja glifosatu u dugotrajnim kulturama limfocita s i bez dodatka metaboličke aktivacije (S9).

Ekvivalenti koncentracija	% ( $\pm$ S.D.) stanica ovisno o broju <i>TP 53</i> (crvenih) signala u repu kometa			% ( $\pm$ S.D.) stanica ovisno o broju cen 17 (zelenih) signala u repu kometa		
	0 <sup>1</sup>	1	2	0 <sup>1</sup>	1	2
ADI	78,0 $\pm$ 5,0	11,0 $\pm$ 4,0	11,0 $\pm$ 2,0*	72,0 $\pm$ 5,0*	20,0 $\pm$ 3,5	8,0 $\pm$ 2,0*
OEL	61,0 $\pm$ 2,0**††	19,0 $\pm$ 2,0†	20,0 $\pm$ 3,5**†	64,5 $\pm$ 2,0**	19,0 $\pm$ 2,0*	15,5 $\pm$ 2,0**††
ADI+S9	74,5 $\pm$ 7,0*	20,0 $\pm$ 6,5*	5,5 $\pm$ 2,0#	79,0 $\pm$ 5,0*	12,0 $\pm$ 2,0#	9,0 $\pm$ 4,0
OEL+S9	70,0 $\pm$ 3,5**#	18,0 $\pm$ 2,0**	12,0 $\pm$ 2,0*†#	76,5 $\pm$ 3,5**##	18,0 $\pm$ 2,0	5,5 $\pm$ 2,0##
K	83,5 $\pm$ 3,5	12,0 $\pm$ 5,0	4,5 $\pm$ 2,0	88,0 $\pm$ 5,0	11,0 $\pm$ 4,0	1,0 $\pm$ 2,0
K <sub>poz</sub>	30,0 $\pm$ 0,0	34,5 $\pm$ 5,0	35,5 $\pm$ 5,0	49,0 $\pm$ 5,0	25,5 $\pm$ 4,0	25,5 $\pm$ 2,0
K+S9	86,5 $\pm$ 3,5	8,0 $\pm$ 2,0	5,5 $\pm$ 2,0	88,0 $\pm$ 2,0	10,0 $\pm$ 3,5	2,0 $\pm$ 2,0
K <sub>poz</sub> +S9	29,0 $\pm$ 4,0	24,5 $\pm$ 5,0	46,5 $\pm$ 3,5	38,0 $\pm$ 2,0	36,5 $\pm$ 3,5	25,5 $\pm$ 5,0

<sup>1</sup>oba signala locirana su u glavi kometa (tri preparata s 30 stanica); \*p<0,05; \*\*p<0,01 u odnosu na kontrolu; #p<0,05; ##p<0,01 u odnosu na tretman bez S9; †p<0,05; ††p<0,01; u odnosu na nižu koncentraciju; ‡p<0,05; ‡‡p<0,01 u odnosu na tretman s aktivnom tvari; Zeleni signal je FITC obilježena proba za centromere kromosoma broj 17, dok je crveni signal Texas Red obilježena proba za *TP53* gen. Stupac s brojem 2 označava pojavu obje centromere/gena u repu kometa, a broj 1 pojavu samo jedne centromere/gena u repu kometa, dok druga zapostaje u glavi. K-negativna kontrola; K<sub>poz</sub>-pozitivna kontrola, stanice su uklopljene u gel, a pripremljeni preparati tretirani s 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u trajanju od 10 min na ledu;

Tablica 11. Migracija *c-Myc* signala u rep kometa nakon 14 dana izlaganja formulaciji Mentor u dugotrajnim kulturama limfocita s i bez dodatka metaboličke aktivacije (S9).

Ekvivalenti koncentracija	% ( $\pm$ S.D.) stanica ovisno o broju <i>c-Myc</i> (crvenih) signala u repu kometa				% ( $\pm$ S.D.) stanica ovisno o broju cen 8 (zelenih) signala u repu kometa			
	0 <sup>1</sup>	1	2	Izgubljeni signali (% $\pm$ S.D.)	0 <sup>1</sup>	1	2	Izgubljeni signali (% $\pm$ S.D.)
ADI	60,0 $\pm$ 3,5 <sup>***††</sup>	29,0 $\pm$ 2,0 <sup>***††</sup>	9,0 $\pm$ 2,0 <sup>*</sup>	2,0 $\pm$ 2,0	70,0 $\pm$ 3,5 <sup>***††</sup>	16,5 $\pm$ 3,5 <sup>†</sup>	12,0 $\pm$ 2,0 <sup>***††</sup>	1,0 $\pm$ 2,0
OEL	51,0 $\pm$ 2,0 <sup>***†††</sup>	25,5 $\pm$ 2,0 <sup>*</sup>	23,5 $\pm$ 3,5 <sup>***†††</sup>	0,0 $\pm$ 0,0	68,0 $\pm$ 5,0 <sup>***††</sup>	16,5 $\pm$ 3,5	15,5 $\pm$ 2,0 <sup>***††</sup>	1,0 $\pm$ 2,0
ADI+S9	46,5 $\pm$ 3,5 <sup>***##††</sup>	33,5 $\pm$ 0,0 <sup>***##††</sup>	16,5 $\pm$ 3,5 <sup>***#†</sup>	3,5 $\pm$ 0,0	64,5 $\pm$ 2,0 <sup>***††</sup>	16,5 $\pm$ 3,5	19,0 $\pm$ 4,0 <sup>***##††</sup>	0,0 $\pm$ 0,0
OEL+S9	45,5 $\pm$ 5,0 <sup>***††</sup>	28,0 $\pm$ 2,0 <sup>***††</sup>	24,5 $\pm$ 4,0 <sup>**</sup>	2,0 $\pm$ 2,0	61,0 $\pm$ 2,0 <sup>**</sup>	19,0 $\pm$ 2,0 <sup>*</sup>	20,0 $\pm$ 3,5 <sup>***†</sup>	0,0 $\pm$ 0,0
K	88,0 $\pm$ 2,0	12,0 $\pm$ 2,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	93,5 $\pm$ 3,5	6,5 $\pm$ 3,5	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
K <sub>poz</sub>	21,0 $\pm$ 4,0	41,0 $\pm$ 7,0	38,0 $\pm$ 5,0	0,0 $\pm$ 0,0	20,0 $\pm$ 6,5	41,0 $\pm$ 5,0	39,0 $\pm$ 7,0	0,0 $\pm$ 0,0
K+S9	91,0 $\pm$ 5,0	9,0 $\pm$ 5,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	92,0 $\pm$ 4,0	8,0 $\pm$ 4,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
K <sub>poz</sub> +S9	14,5 $\pm$ 5,0	39,0 $\pm$ 5,0	46,5 $\pm$ 3,5	0,0 $\pm$ 0,0	22,0 $\pm$ 1,5	43,5 $\pm$ 1,0	34,5 $\pm$ 1,5	0,0 $\pm$ 0,0

<sup>1</sup>oba signala locirana su u glavi kometa (tri preparata s 30 stanica); \*p<0,05; \*\*p<0,01 u odnosu na kontrolu; #p<0,05; ##p<0,01 u odnosu na tretman bez S9; †p<0,05; ††p<0,01; u odnosu na nižu koncentraciju; ‡p<0,05; ‡‡p<0,01 u odnosu na tretman s aktivnom tvari; Zeleni signal je FITC obilježena proba za centromere kromosoma broj 8, dok je crveni signal Texas Red obilježena proba za *c-Myc* gen. Stupac s brojem 2 označava pojavu obje centromere/gena u repu kometa, a broj 1 pojavu samo jedne centromere/gena u repu kometa, dok druga zapostaje u glavi. K-negativna kontrola; K<sub>poz</sub>-pozitivna kontrola, stanice su uklopljene u gel, a pripremljeni preparati tretirani s 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u trajanju od 10 min na ledu;

Tablica 12. Migracija *TP53* signala u rep kometa nakon 14 dana izlaganja formulaciji Mentor u dugotrajnim kulturama limfocita s i bez dodatka metaboličke aktivacije (S9).

Ekvivalenti koncentracija	% ( $\pm$ S.D.) stanica ovisno o broju <i>TP 53</i> (crvenih) signala u repu kometa				% ( $\pm$ S.D.) stanica ovisno o broju cen 17 (zelenih) signala u repu kometa			
	0 <sup>1</sup>	1	2	Izgubljeni signali (% $\pm$ S.D.)	0 <sup>1</sup>	1	2	Izgubljeni signali (% $\pm$ S.D.)
ADI	45,5 $\pm$ 2,0 <sup>**‡‡</sup>	15,5 $\pm$ 4,0	11,0 $\pm$ 2,0 <sup>*</sup>	28,0 $\pm$ 5,0	68,0 $\pm$ 2,0 <sup>**</sup>	18,0 $\pm$ 2,0	11,0 $\pm$ 2,0 <sup>**</sup>	3,5 $\pm$ 3,5
OEL	40,0 $\pm$ 3,5 <sup>**‡‡</sup>	30,0 $\pm$ 3,5 <sup>**‡‡‡‡</sup>	11,0 $\pm$ 2,0 <sup>*‡</sup>	19,0 $\pm$ 2,0	71,0 $\pm$ 5,0 <sup>*</sup>	12,0 $\pm$ 2,0 <sup>‡‡</sup>	12,0 $\pm$ 2,0 <sup>**</sup>	4,5 $\pm$ 2,0
ADI+S9	52,0 $\pm$ 7,0 <sup>**‡</sup>	21,0 $\pm$ 2,0 <sup>**</sup>	9,0 $\pm$ 4,0	18,0 $\pm$ 4,0	60,0 $\pm$ 3,5 <sup>**#‡‡</sup>	20,0 $\pm$ 3,5 <sup>*‡</sup>	13,5 $\pm$ 3,5 <sup>**</sup>	6,5 $\pm$ 3,5
OEL+S9	38,0 $\pm$ 4,0 <sup>**#‡‡</sup>	26,5 $\pm$ 3,5 <sup>**‡</sup>	19,0 $\pm$ 5,0 <sup>*</sup>	16,5 $\pm$ 3,5	63,5 $\pm$ 3,5 <sup>**‡‡</sup>	18,0 $\pm$ 2,0 <sup>*#</sup>	14,5 $\pm$ 2,0 <sup>**‡‡</sup>	4,5 $\pm$ 4,0
K	83,5 $\pm$ 3,5	12,0 $\pm$ 5,0	4,5 $\pm$ 2,0	0,0 $\pm$ 0,0	88,0 $\pm$ 5,0	11,0 $\pm$ 4,0	1,0 $\pm$ 2,0	0,0 $\pm$ 0,0
K <sub>poz</sub>	30,0 $\pm$ 0,0	34,5 $\pm$ 5,0	35,5 $\pm$ 5,0	0,0 $\pm$ 0,0	49,0 $\pm$ 5,0	25,5 $\pm$ 4,0	25,5 $\pm$ 2,0	0,0 $\pm$ 0,0
K+S9	86,5 $\pm$ 3,5	8,0 $\pm$ 2,0	5,5 $\pm$ 2,0	0,0 $\pm$ 0,0	88,0 $\pm$ 2,0	10,0 $\pm$ 3,5	2,0 $\pm$ 2,0	0,0 $\pm$ 0,0
K <sub>poz</sub> +S9	29,0 $\pm$ 4,0	24,5 $\pm$ 5,0	46,5 $\pm$ 3,5	0,0 $\pm$ 0,0	38,0 $\pm$ 2,0	36,5 $\pm$ 3,5	25,5 $\pm$ 5,0	0,0 $\pm$ 0,0

<sup>1</sup>oba signala locirana su u glavi kometa (tri preparata s 30 stanica); \*p<0,05; \*\*p<0,01 u odnosu na kontrolu; #p<0,05; ##p<0,01 u odnosu na tretman bez S9; †p<0,05; ††p<0,01; u odnosu na nižu koncentraciju; ‡p<0,05; ‡‡p<0,01 u odnosu na tretman s aktivnom tvari; Zeleni signal je FITC obilježena proba za centromere kromosoma broj 17, dok je crveni signal Texas Red obilježena proba za *TP53* gen. Stupac s brojem 2 označava pojavu obje centromere/gena u repu kometa, a broj 1 pojavu samo jedne centromere/gena u repu kometa, dok druga zapostaje u glavi. K-negativna kontrola; K<sub>poz</sub>-pozitivna kontrola, stanice su uklopljene u gel, a pripremljeni preparati tretirani s 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u trajanju od 10 min na ledu;

Tablica 13. Migracija *c-Myc* signala u rep kometa nakon 14 dana izlaganja formulaciji Radazin u dugotrajnim kulturama limfocita s i bez dodatka metaboličke aktivacije (S9).

Ekvivalenti koncentracija	% ( $\pm$ S.D.) stanica ovisno o broju <i>c-Myc</i> (crvenih) signala u repu kometa				% ( $\pm$ S.D.) stanica ovisno o broju cen 8 (zelenih) signala u repu kometa			
	0 <sup>1</sup>	1	2	Izgubljeni signali (% $\pm$ S.D.)	0 <sup>1</sup>	1	2	Izgubljeni signali (% $\pm$ S.D.)
ADI	60,0 $\pm$ 0,0**	24,5 $\pm$ 5,0*	13,5 $\pm$ 5,0*†	2,0 $\pm$ 2,0	73,5 $\pm$ 3,5**	20,0 $\pm$ 3,5	6,5 $\pm$ 0,0**‡†	0,0 $\pm$ 0,0
OEL	45,5 $\pm$ 4,0**##‡	26,5 $\pm$ 3,5*	24,5 $\pm$ 2,0**##‡†	3,5 $\pm$ 3,5	71,0 $\pm$ 2,0**‡	15,5 $\pm$ 2,0	13,5 $\pm$ 0,0**##‡†	0,0 $\pm$ 0,0
ADI+S9	53,5 $\pm$ 6,0**	24,5 $\pm$ 2,0**	16,5 $\pm$ 3,5**	5,5 $\pm$ 2,0	71,0 $\pm$ 5,0**	18,0 $\pm$ 2,0*	11,0 $\pm$ 4,0*	0,0 $\pm$ 0,0
OEL+S9	50,0 $\pm$ 3,5**	20,0 $\pm$ 3,5**‡†	28,0 $\pm$ 2,0**††‡†	2,0 $\pm$ 4,0	59,0 $\pm$ 2,0**##††‡	23,5 $\pm$ 0,0**††##‡	18,0 $\pm$ 2,0**##‡	0,0 $\pm$ 0,0
K	88,0 $\pm$ 2,0	12,0 $\pm$ 2,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	93,5 $\pm$ 3,5	6,5 $\pm$ 3,5	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
K <sub>poz</sub>	21,0 $\pm$ 4,0	41,0 $\pm$ 7,0	38,0 $\pm$ 5,0	0,0 $\pm$ 0,0	20,0 $\pm$ 6,5	41,0 $\pm$ 5,0	39,0 $\pm$ 7,0	0,0 $\pm$ 0,0
K+S9	91,0 $\pm$ 5,0	9,0 $\pm$ 5,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	92,0 $\pm$ 4,0	8,0 $\pm$ 4,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
K <sub>poz</sub> +S9	14,5 $\pm$ 5,0	39,0 $\pm$ 5,0	46,5 $\pm$ 3,5	0,0 $\pm$ 0,0	22,0 $\pm$ 1,5	43,5 $\pm$ 1,0	34,5 $\pm$ 1,5	0,0 $\pm$ 0,0

<sup>1</sup>oba signala locirana su u glavi kometa (tri preparata s 30 stanica); \*p<0,05; \*\*p<0,01 u odnosu na kontrolu; #p<0,05; ##p<0,01 u odnosu na tretman bez S9; †p<0,05; ††p<0,01; u odnosu na nižu koncentraciju; ‡p<0,05; ‡‡p<0,01 u odnosu na tretman s aktivnom tvari; Zeleni signal je FITC obilježena proba za centromere kromosoma broj 8, dok je crveni signal Texas Red obilježena proba za *c-Myc* gen. Stupac s brojem 2 označava pojavu obje centromere/gena u repu kometa, a broj 1 pojavu samo jedne centromere/gena u repu kometa, dok druga zapostaje u glavi. K-negativna kontrola; K<sub>poz</sub>-pozitivna kontrola, stanice su uklopljene u gel, a pripremljeni preparati tretirani s 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u trajanju od 10 min na ledu;

Tablica 14. Migracija *TP53* signala u rep kometa nakon 14 dana izlaganja formulaciji Radazin u dugotrajnim kulturama limfocita s i bez dodatka metaboličke aktivacije (S9).

Ekvivalenti koncentracija	% ( $\pm$ S.D.) stanica ovisno o broju <i>TP 53</i> (crvenih) signala u repu kometa				% ( $\pm$ S.D.) stanica ovisno o broju cen 17 (zelenih) signala u repu kometa			
	0 <sup>1</sup>	1	2	Izgubljeni signali (% $\pm$ S.D.)	0 <sup>1</sup>	1	2	Izgubljeni signali (% $\pm$ S.D.)
ADI	43,5 $\pm$ 0,0 <sup>**††‡</sup>	33,5 $\pm$ 3,5 <sup>**††‡</sup>	8,0 $\pm$ 2,0	15,5 $\pm$ 2,0	68,0 $\pm$ 2,0 <sup>**††‡</sup>	15,5 $\pm$ 2,0	14,5 $\pm$ 2,0 <sup>**††‡</sup>	2,0 $\pm$ 2,0
OEL	39,0 $\pm$ 2,0 <sup>**††‡</sup>	20,0 $\pm$ 3,5 <sup>††</sup>	21,0 $\pm$ 2,0 <sup>**††‡</sup>	20,0 $\pm$ 0,0	53,5 $\pm$ 3,5 <sup>**††‡†</sup>	21,0 $\pm$ 2,0 <sup>*†‡</sup>	15,5 $\pm$ 2,0 <sup>**†</sup>	10,0 $\pm$ 3,5
ADI+S9	44,5 $\pm$ 7,0 <sup>**††‡</sup>	20,0 $\pm$ 3,5 <sup>**##†‡</sup>	18,0 $\pm$ 2,0 <sup>**##††‡</sup>	18,0 $\pm$ 2,0	64,5 $\pm$ 5,0 <sup>**††‡</sup>	18,0 $\pm$ 2,0 <sup>**††‡</sup>	16,5 $\pm$ 3,5 <sup>**††‡</sup>	1,0 $\pm$ 2,0
OEL+S9	35,5 $\pm$ 2,0 <sup>**††‡</sup>	21,0 $\pm$ 2,0 <sup>**</sup>	23,5 $\pm$ 3,5 <sup>**</sup>	20,0 $\pm$ 3,5	60,0 $\pm$ 3,5 <sup>**†</sup>	26,5 $\pm$ 3,5 <sup>**†††</sup>	11,0 $\pm$ 4,0 <sup>*</sup>	2,0 $\pm$ 2,0
K	83,5 $\pm$ 3,5	12,0 $\pm$ 5,0	4,5 $\pm$ 2,0	0,0 $\pm$ 0,0	88,0 $\pm$ 5,0	11,0 $\pm$ 4,0	1,0 $\pm$ 2,0	0,0 $\pm$ 0,0
K <sub>poz</sub>	30,0 $\pm$ 0,0	34,5 $\pm$ 5,0	35,5 $\pm$ 5,0	0,0 $\pm$ 0,0	49,0 $\pm$ 5,0	25,5 $\pm$ 4,0	25,5 $\pm$ 2,0	0,0 $\pm$ 0,0
K+S9	86,5 $\pm$ 3,5	8,0 $\pm$ 2,0	5,5 $\pm$ 2,0	0,0 $\pm$ 0,0	88,0 $\pm$ 2,0	10,0 $\pm$ 3,5	2,0 $\pm$ 2,0	0,0 $\pm$ 0,0
K <sub>poz</sub> +S9	29,0 $\pm$ 4,0	24,5 $\pm$ 5,0	46,5 $\pm$ 3,5	0,0 $\pm$ 0,0	38,0 $\pm$ 2,0	36,5 $\pm$ 3,5	25,5 $\pm$ 5,0	0,0 $\pm$ 0,0

<sup>1</sup>oba signala locirana su u glavi kometa (tri preparata s 30 stanica); \*p<0,05; \*\*p<0,01 u odnosu na kontrolu; #p<0,05; ##p<0,01 u odnosu na tretman bez S9; †p<0,05; ††p<0,01; u odnosu na nižu koncentraciju; ‡p<0,05; ‡‡p<0,01 u odnosu na tretman s aktivnom tvari; Zeleni signal je FITC obilježena proba za centromere kromosoma broj 17, dok je crveni signal Texas Red obilježena proba za *TP53* gen. Stupac s brojem 2 označava pojavu obje centromere/gena u repu kometa, a broj 1 pojavu samo jedne centromere/gena u repu kometa, dok druga zapostaje u glavi. K-negativna kontrola; K<sub>poz</sub>-pozitivna kontrola, stanice su uklopljene u gel, a pripremljeni preparati tretirani s 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u trajanju od 10 min na ledu;

Tablica 15. Migracija *c-Myc* signala u rep kometa nakon 14 dana izlaganja formulaciji Geocid u dugotrajnim kulturama limfocita s i bez dodatka metaboličke aktivacije (S9).

Ekvivalenti koncentracija	% ( $\pm$ S.D.) stanica ovisno o broju <i>c-Myc</i> (crvenih) signala u repu kometa				% ( $\pm$ S.D.) stanica ovisno o broju cen 8 (zelenih) signala u repu kometa			
	0 <sup>1</sup>	1	2	Izgubljeni signali (% $\pm$ S.D.)	0 <sup>1</sup>	1	2	Izgubljeni signali (% $\pm$ S.D.)
ADI	65,5 $\pm$ 7,0 <sup>*†</sup>	22,0 $\pm$ 5,0 <sup>††</sup>	10,0 $\pm$ 0,0 <sup>**††</sup>	2,0 $\pm$ 2,0	79,0 $\pm$ 4,0	13,5 $\pm$ 3,5	8,0 $\pm$ 2,0 <sup>*††</sup>	0,0 $\pm$ 0,0
OEL	56,5 $\pm$ 3,5 <sup>**†</sup>	13,5 $\pm$ 6,0 <sup>††</sup>	26,5 $\pm$ 3,5 <sup>**†††</sup>	3,5 $\pm$ 0,0	64,5 $\pm$ 2,0 <sup>**†††</sup>	23,5 $\pm$ 3,5 <sup>*†</sup>	12,0 $\pm$ 2,0 <sup>**†††</sup>	0,0 $\pm$ 0,0
ADI+S9	55,5 $\pm$ 5,0 <sup>**</sup>	20,0 $\pm$ 0,0 <sup>**††</sup>	23,5 $\pm$ 3,5 <sup>**##</sup>	1,0 $\pm$ 2,0	70,0 $\pm$ 3,5 <sup>**†††</sup>	15,5 $\pm$ 2,0	14,5 $\pm$ 2,0 <sup>**†††</sup>	0,0 $\pm$ 0,0
OEL+S9	48,0 $\pm$ 2,0 <sup>**#††</sup>	15,5 $\pm$ 5,0 <sup>*††</sup>	32,0 $\pm$ 5,0 <sup>**</sup>	4,5 $\pm$ 2,0	49,0 $\pm$ 5,0 <sup>**††##††</sup>	22,0 $\pm$ 2,0 <sup>**†</sup>	25,5 $\pm$ 7,0 <sup>**†††</sup>	3,5 $\pm$ 0,0
K	88,0 $\pm$ 2,0	12,0 $\pm$ 2,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	93,5 $\pm$ 3,5	6,5 $\pm$ 3,5	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
K <sub>poz</sub>	21,0 $\pm$ 4,0	41,0 $\pm$ 7,0	38,0 $\pm$ 5,0	0,0 $\pm$ 0,0	20,0 $\pm$ 6,5	41,0 $\pm$ 5,0	39,0 $\pm$ 7,0	0,0 $\pm$ 0,0
K+S9	91,0 $\pm$ 5,0	9,0 $\pm$ 5,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	92,0 $\pm$ 4,0	8,0 $\pm$ 4,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
K <sub>poz</sub> +S9	14,5 $\pm$ 5,0	39,0 $\pm$ 5,0	46,5 $\pm$ 3,5	0,0 $\pm$ 0,0	22,0 $\pm$ 1,5	43,5 $\pm$ 1,0	34,5 $\pm$ 1,5	0,0 $\pm$ 0,0

<sup>1</sup>oba signala locirana su u glavi kometa (tri preparata s 30 stanica); \*p<0,05; \*\*p<0,01 u odnosu na kontrolu; #p<0,05; ##p<0,01 u odnosu na tretman bez S9; †p<0,05; ††p<0,01; u odnosu na nižu koncentraciju; ‡p<0,05; ‡‡p<0,01 u odnosu na tretman s aktivnom tvari; Zeleni signal je FITC obilježena proba za centromere kromosoma broj 8, dok je crveni signal Texas Red obilježena proba za *c-Myc* gen. Stupac s brojem 2 označava pojavu obje centromere/gena u repu kometa, a broj 1 pojavu samo jedne centromere/gena u repu kometa, dok druga zapostaje u glavi. K-negativna kontrola; K<sub>poz</sub>-pozitivna kontrola, stanice su uklopljene u gel, a pripremljeni preparati tretirani s 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u trajanju od 10 min na ledu;



Tablica 16. Migracija *TP53* signala u rep kometa nakon 14 dana izlaganja formulaciji Geocid u dugotrajnim kulturama limfocita s i bez dodatka metaboličke aktivacije (S9).

Ekvivalenti koncentracija	% ( $\pm$ S.D.) stanica ovisno o broju <i>TP 53</i> (crvenih) signala u repu kometa				% ( $\pm$ S.D.) stanica ovisno o broju cen 17 (zelenih) signala u repu kometa			
	0 <sup>1</sup>	1	2	Izgubljeni signali (% $\pm$ S.D.)	0 <sup>1</sup>	1	2	Izgubljeni signali (% $\pm$ S.D.)
ADI	55,5 $\pm$ 4,0 <sup>**†</sup>	15,5 $\pm$ 2,0	14,5 $\pm$ 2,0	14,5 $\pm$ 2,0	69,0 $\pm$ 5,0 <sup>**</sup>	15,5 $\pm$ 2,0	12,0 $\pm$ 2,0 <sup>**</sup>	3,5 $\pm$ 3,5
OEL	46,5 $\pm$ 0,0 <sup>**†‡‡</sup>	14,5 $\pm$ 2,0	23,5 $\pm$ 3,5 <sup>**†</sup>	15,5 $\pm$ 2,0	70,0 $\pm$ 3,5 <sup>**‡‡</sup>	15,5 $\pm$ 2,0	12,0 $\pm$ 2,0 <sup>**†</sup>	2,0 $\pm$ 2,0
ADI+S9	51,0 $\pm$ 5,0 <sup>**</sup>	15,5 $\pm$ 2,0 <sup>**</sup>	16,5 $\pm$ 3,5 <sup>**</sup>	16,5 $\pm$ 0,0	74,5 $\pm$ 5,0 <sup>*</sup>	13,5 $\pm$ 3,5	12,0 $\pm$ 2,0 <sup>**</sup>	0,0 $\pm$ 0,0
OEL+S9	35,5 $\pm$ 2,0 <sup>**†‡‡###‡‡</sup>	28,0 $\pm$ 2,0 <sup>**†‡‡‡</sup>	23,5 $\pm$ 3,5 <sup>**</sup>	13,5 $\pm$ 3,5	63,5 $\pm$ 3,5 <sup>**†</sup>	22,0 $\pm$ 2,0 <sup>**†#</sup>	14,5 $\pm$ 4,0 <sup>**</sup>	0,0 $\pm$ 0,0
K	83,5 $\pm$ 3,5	12,0 $\pm$ 5,0	4,5 $\pm$ 2,0	0,0 $\pm$ 0,0	88,0 $\pm$ 5,0	11,0 $\pm$ 4,0	1,0 $\pm$ 2,0	0,0 $\pm$ 0,0
K <sub>poz</sub>	30,0 $\pm$ 0,0	34,5 $\pm$ 5,0	35,5 $\pm$ 5,0	0,0 $\pm$ 0,0	49,0 $\pm$ 5,0	25,5 $\pm$ 4,0	25,5 $\pm$ 2,0	0,0 $\pm$ 0,0
K+S9	86,5 $\pm$ 3,5	8,0 $\pm$ 2,0	5,5 $\pm$ 2,0	0,0 $\pm$ 0,0	88,0 $\pm$ 2,0	10,0 $\pm$ 3,5	2,0 $\pm$ 2,0	0,0 $\pm$ 0,0
K <sub>poz</sub> +S9	29,0 $\pm$ 4,0	24,5 $\pm$ 5,0	46,5 $\pm$ 3,5	0,0 $\pm$ 0,0	38,0 $\pm$ 2,0	36,5 $\pm$ 3,5	25,5 $\pm$ 5,0	0,0 $\pm$ 0,0

<sup>1</sup>oba signala locirana su u glavi kometa (tri preparata s 30 stanica); \*p<0,05; \*\*p<0,01 u odnosu na kontrolu; #p<0,05; ##p<0,01 u odnosu na tretman bez S9; †p<0,05; ††p<0,01; u odnosu na nižu koncentraciju; ‡p<0,05; ‡‡p<0,01 u odnosu na tretman s aktivnom tvari; Zeleni signal je FITC obilježena proba za centromere kromosoma broj 17, dok je crveni signal Texas Red obilježena proba za *TP53* gen. Stupac s brojem 2 označava pojavu obje centromere/gena u repu kometa, a broj 1 pojavu samo jedne centromere/gena u repu kometa, dok druga zapostaje u glavi. K-negativna kontrola; K<sub>poz</sub>-pozitivna kontrola, stanice su uklopljene u gel, a pripremljeni preparati tretirani s 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u trajanju od 10 min na ledu;

Tablica 17. Ukupni broj mikronukleusa, jezgrenih pupova, nukleoplazmatskih mostova s udjelom centromernih signala u limfocitima populacije profesionalno izložene karbamatima.

Grupa	Spol	Godine (±S.D.)	Godine izloženosti (±S.D.)	Ukupni broj MN	% C+MN	% DAPI+MN	Ukupni broj NB	% C+NB	Ukupni broj NPB	% C+NPB
izloženi	žene (n=10)	49,7±7,53	19,7±9,0	15,9±7,7	68,2±9,1	37,9±14,7	8,7±5,3	10,2±11,6	2,4±2,7	20,1±25,0
	muškarci (n=30)	38,9±11,76	15,8±12,4	13,1±4,6	66,9±12,9	35,2±16,2	8,5±4,3	11,2±10,6	2,3±1,9	9,5±18,1
	ukupno (n=40)	41,6±11,8	16,7±11,7	13,8±5,6**	67,3±11,9**	35,9±15,6*	8,6±4,5**	10,9±10,7	2,3±2,1*	12,3±20,3*
kontrola	žene (n=10)	49,5±8,2	/	6,3±1,5	48,5±9,1	17,3±14,3	3,1±1,6	6,5±13,0	0,3±0,7	0,0±0,0
	muškarci (n=30)	35,1±9,5	/	7,9±2,1	54,5±10,4	22,2±12,3	3,9±3,1	6,0±10,3	0,2±0,4	0,0±0,0
	ukupno (n=40)	39,4±11,2	/	7,4±2,0	52,7±10,3	20,7±12,9	3,6±2,7	6,1±11,0	0,3±0,5	0,0±0,0

\*p<0,05;\*\*p<0,01 u odnosu na kontrolu; C+ centromerni signal; DAPI+ DAPI signal;

Tablica 18. Ukupni broj mikronukleusa, jezgrenih pupova, nukleoplazmatskih mostova s udjelom centromernih signala za kromosome X i Y limfocitima populacije profesionalno izložene karbamatima.

Grupa	Spol	Godine (±S.D.)	Godine izloženosti (±S.D.)	% X+ MN	% Y+ MN	% X+ NB	% Y+ NB	Ukupni broj X+ NPB	Ukupni broj Y+NPB
izloženi	žene (n=10)	49,7±7,53	19,7±9,0	21,2±4,3	/	6,2±6,3	/	0,0±0,0	/
	muškarci (n=30)	38,9±11,76	15,8±12,4	10,5±8,8	19,2±13,1	12,5±12,4	7,6±5,5	9,4±18,6	0,0±0,0
	ukupno (n=40)	41,6±11,8	16,7±11,7	14,1±9,1	19,2±13,1	10,4±10,4	7,6±5,5	7,5±18,6	0,0±0,0
kontrola	žene (n=10)	49,5±8,2	/	20,9±3,8	/	4,2±3,6	/	0,0±0,0	/
	muškarci (n=30)	35,1±9,5	/	10,7±9,2	13,9±4,0	11,7±13,2	8,9±7,8	8,3±14,4	0,0±0,0
	ukupno (n=40)	39,4±11,2	/	13,6±9,2	13,9±4,0	7,9±9,6	8,9±7,8	5,0±11,2	0,0±0,0

\*p<0,05;\*\*p<0,01 u odnosu na kontrolu; C+ centromerni signal; DAPI+ DAPI signal;

## **3. Rasprava**

### **3.1. Primarne kulture limfocita u uvjetima ex vivo**

#### **3.1.1. Glifosat**

Dosadašnje procjene genotoksičnosti glifosata korištenjem različitih eksperimentalnih modela i citogenetičkih tehnika nisu dale jednoznačne rezultate. Značajni porast primarnih oštećenja u DNA stanica GM38 i stanica fibrosarkoma HT 1080 dokazao je Monroy i sur. (2005). Rezultati našeg istraživanja učinka aktivne tvari u uvjetima *ex vivo* djelomično se poklapaju s rezultatima Monroy i sur. (2005) jer je statistički značajan porast oštećenja DNA u primarnim kulturama limfocita čovjeka uočen tek pri visokim koncentracijama aktivne tvari (Mladinic i sur., 2009a). Niti s dodatkom metaboličkog aktivatora S9 nije došlo do porasta razine primarnih oštećenja. Ovakav rezultat u potpunosti je suprotan s rezultatima Mañas i sur. (2009a) dobivenim na stanicama Hep-G2 nakon tretmana aktivnom tvari. Za ove stanice dokazano je da mogu same provoditi metaboličku promjenu spojeva. Genotoksičnost najzastupljenijeg metabolita glifosata aminometil fosforne kiseline (AMPA) potvrđena je u drugom istraživanju istih autora (Mañas i sur., 2009b). Općenito, kao nusproizvod metaboličke transformacije dolazi do oslobađanja reaktivnih vrsta kisika (ROS) koje oštećuju DNA. Razlika između ovog istraživanja i istraživanja Mañas i sur. (2009b) leži u mjestu odvijanja metaboličke aktivacije. U ovom istraživanju metabolička aktivacija glifosata provedena je u izvanstaničnom modelu frakcijom S9, te se tako promjenjeni spoj mora transportirati preko membrane limfocita. Na taj način oslobođene ROS ostaju izvan stanice i ne stupaju u interakciju s DNA. U stanicama Hep-G2 metabolička aktivacija se odvija unutar stanice, te ukoliko dolazi do nastanka ROS-a tada oštećenje koje su zamjetili (Mañas i sur., 2009b) može proizlaziti iz djelovanja ROS-a, a ne samog metabolita.

Nadalje, djelovanje glifosata neovisno o metaboličkoj aktivaciji nije induciralo nastanak oksidativnih lezija DNA koje popravlja enzim hOGG1 (Mladinic i sur., 2009a). Iako za sada nije dokazano da glifosat pogoduje nastanku reaktivnih vrsta kisika Halliwell (1999) je pokazao nastanak reaktivnih skupina dušika (RNS) uslijed izlaganja glifosatu, no one ne dovode do nastanka oksidativnih oštećenja DNA.

Formulacija glifosata Mentor dovela je do značajnog porasta primarnih oštećenja DNA pri koncentracijama jednakim ili većim od ekvivalenta REL neovisno o S9 (Tablica 2). Pri višim koncentracijama ujedno je zamijećen značajan porast udjela oksidacijskih lezija DNA u ukupnim primarnim oštećenjima i bio je ovisan o dozi (Tablica 5). Na sposobnost formulacije glifosata da inducira oksidativni stres u stanicama ukazali su Modesto i Martinez (2010). Nadalje, naši rezultati su u suglasnosti s istraživanjem Benachour i Séralini (2009) koji su

dokazali da formulacija glifosata djeluje genotoksično u ljudskim embrionalnim stanicama bubrega i placentalnim staničnim linijama JEG3. Porast oštećenja DNA koji smo uočili primjenom S9 uz formulaciju Mentor posljedica je metaboličke aktivacije te je u skladu s istraživanjem kojeg su proveli Gasnier i sur. (2009) na stanicama Hep-G2, a koja su pokazala porast primarnih lezija DNA u ovisnosti o koncentraciji. Uspoređujući rezultate aktivne tvari i formulacije glifosata vidljivo je da u pogledu nastanka primarnih i oksidativnih oštećenja molekule DNA glifosat kao aktivna tvar ne djeluje genotoksično dok formulacija pokazuje izražen genotoksični učinak. Objašnjenje za ovakav rezultat može se naći u činjenici da aditivi koji su sastavni dio formulacije nisu biološki inertni već mogu remetiti stabilnost genetičkog materijala (Guilherme i sur., 2010).

Testovima indukcije reverznih mutacija na bakteriji *Escherichia coli* i stanicama CHO (engl. *Chinese hamster ovary*) kao ni rekombinacijskim testom na bakteriji *Bacillus subtilis* nije dokazana mutagena sposobnost glifosata (Li i Long, 1988). U ljudskim limfocitima Lioi i sur. (1998) nisu uočili povećanje broja kromosomskih aberacija (CA). Također, Mañas i sur. (2009a) nisu utvrdili povećanje broja kromosomskih aberacija u ljudskim limfocitima unatoč korištenju 10 puta viših koncentracija u odnosu na koncentracije testirane u okviru ovog doktorata. U stanicama koštane srži miševa Dimitrov i sur. (2006) nisu zapazili značajno povećanje CA i broja mikronuklusa (MN).

Slično navedenim istraživanjima, Mladinic i sur. (2009b) u uvjetima *ex vivo*, nisu uočili značajan porast broja MN, jezgrenih pupova (NB) i nukleoplazmatskih mostova (NPB) u limfocitima čovjeka neovisno o dodatku S9. Međutim, kao što je ranije naglašeno istraživanja genotoksičnosti glifosata nisu dala jednoznačne rezultate, tako da su u stanicama koštane srži miša tretiranih glifosatom kao aktivnom tvari, ali i u sastavu formulacije Mañas i sur. (2009a) uočili su porast učestalosti mikronukleusa, a Bolognesi i sur. (1997) porast učestalosti CA.

U ovom istraživanju, tretman niskim koncentracijama glifosata nije imao učinka na promjene broja mikronukleusa (MN), jezgrenih pupova (NB) i nukleoplazmatskih mostova (NPB) u tretiranim limfocitima u odnosu na kontrolu. No, samo kod najviše korištene koncentracije i samo u prisutnosti metaboličke aktivacije, porast broja MN, NB i NPB bio je značajan (Mladinic i sur., 2009b). Razlika u efektu za niske i visoke koncentracije s metaboličkom aktivacijom može ukazivati na postojanje efekta praga (engl. *threshold effect*) što podrazumijeva da toksin ispoljava štetne učinke tek kad njegova prisutnost prijeđe kritičnu koncentraciju praga (Kinoshita i sur., 2006). Također, u svrhu ispitivanja mehanizma genotoksičnog djelovanja pesticida, putem detekcije centromernih signala (C+) u MN, NB i NPB, pokušali smo utvrditi dolazi li do izdvajanja čitavih kromosoma i time ispoljavanja

aneugenog učinka. S obzirom da glifosat kao aktivna tvar nije imao učinka na pojavu aberantnih struktura kromatina nije bilo osnova za procjenu mehanizma genotoksičnog djelovanja.

Nakon tretmana limfocita formulacijom Mentor u koncentraciji ekvivalentnoj ili višoj od vrijednosti REL, s i bez metaboličke aktivacije, uočili smo značajno povišenje broja mikronukleusa (Slika 4). Udio MN koji sadrže C+ signal, i samim time čitave kromosome, bio je također značajno povišen u odnosu na kontrolu što ukazuje da formulacija djeluje genotoksično aneugenim mehanizmom. Specifičnost učinka na kromosome 1, 9, 15, 16 i Y koju smo utvrđivali praćenjem pojave (DAPI+) signala u MN, NB i NBP, a koji potiču od regija bogatih parovima baza A-T u tim kromosomima nije zapažena (Slika 4-6).

### **3.1.2. Terbutilazin**

Drugi pesticid čija je genotoksičnost istražena u okviru i ovog doktorata je terbutilazin. Nakon tretmana limfocita terbutilazinom i njegovom formulacijom Radazin, u prisutnosti mikrosomalne frakcije S9, ali i bez metaboličke aktivacije uočili smo značajan porast primarnih oštećenja DNA u odnosu na kontrolu (Tablica 3). Za sve ekvivalente koncentracija u kojima je testiran terbutilazin utvrđeno je povećanje razine oštećenja DNA u ovisnosti o koncentraciji. Izlaganje limfocita terbutilazinu i njegovoj formulaciji nije imalo učinka na udio oksidativnih lezija u primarnim oštećenjima neovisno o prisutnosti mikrosomalne frakcije S9 (Tablica 6). Dosad je uz istraživanje opisano u radu Mladinic i sur. (2009b) objavljena samo jedna studija o genotoksičnosti terbutilazina provedena na miševima akutno izloženima toj aktivnoj tvari (Gebel i sur., 1997). Autori nisu uočili povišenje broja mikronukleusa u polikromatskim eritrocitima miša. Za razliku od Gebela i sur. (1997), u našem istraživanju u uvjetima *ex vivo*, uočen je linearni porast broja mikronukleusa u limfocitima ljudi ovisno o koncentraciji aktivne tvari (Mladinic i sur., 2009b). Ujedno, zapažen je povećan broj mikronukleusa u kojima su sadržani čitavi kromosomi (C+ signal) za sve koncentracije s i bez dodatka frakcije S9 što upućuje na aneugeni mehanizam djelovanja terbutilazina. Također u prisustvu frakcije S9 došlo je do značajnog porasta broja mikronukleusa s DAPI+ signalom što upućuje na povećani afinitet metabolita terbutilazina prema kromosomima 1, 9, 15, 16, Y koji sadrže regije bogate A-T parovima baza koje se intenzivno boje DAPI-jem (Anderson i sur., 2006). U literaturi se spominje nastanak najmanje pet metabolita terbutilazina, a to su deizopropilhidroksiatrazin, deetilhidroksiterbutilazin, deizopropilatrazin, hidroksilterbutilazin i deilterbutilazin (Papadopoulos i sur., 2007), ali za koje ne postoje podaci o njihovoj genotoksičnosti.

Za formulaciju Radazin u odnosu na aktivnu tvar nisu uočeni izraženiji genotoksični učinci, kao niti značajnija specifičnost djelovanja na izdvajanje kromosoma 1, 9, 15, 16 i Y u mikronukleusima.

### **3.1.3. Karbofuran**

Posljednji pesticid testiran u sklopu ove disertacije je karbofuran. Karbamatni spojevi ispoljavaju svoj toksični učinak inhibicijom acetilkolinesteraze te time sprječavaju hidrolizu acetilkolina. Iako su neurotransmiteri odgovorni za prijenos sinaptičkih signala u živčanom tkivu, receptori za acetilkolin nalaze se na mebranama većine somatskih stanica. Sumnja se da je njihova stalna podraženost, zbog inhibicije razgradnje acetilkolina, zapravo okidač glavnog puta genotoksičnosti karbamata (Rull i sur., 2009). Mnogi autori procjenjivali su genotoksičnost karbofurana korištenjem različitih eksperimentalnih modela i tehnika bez jasnih rezultata o njegovom štetnom učinku. Naravaneni i Jamil (2005) dokazali su značajno povišenje primarnih oštećenja DNA u ljudskim limfocitima nakon tretmana aktivnom tvari. . U ovom istraživanju utvrđeno je da karbofuran inducira primarna oštećenja DNA neovisno o metaboličkoj aktivaciji (Tablica 4). Međutim, Zhou i sur. (2005) u istraživanju genotoksičnosti čistog karbofurana i njegovih metaboliti na miševima pokazali su da sam karbofuran ne povećava razinu primarnih oštećenja DNA u limfocitima. Međutim, metaboliti karbofurana 3-ketokarbofuran, 3-hidrokarbofuran i nitrozokarbofuran su značajno utjecali na povećanje parametara alkalnog komet testa. Razliku u djelovanju metabolita u odnosu na inicijalnu djelatnu tvar naši rezultati nisu pokazali. Specifični nastanak oksidativnih lezija u molekuli DNA uslijed izlaganja primarne kulture limfocita aktivnoj tvari (Tablica 7) detektirali smo samo za najvišu koncentraciju koja predstavlja ekvivalent 1/16 LD<sub>50</sub>. Nastanak okidacijskih oštećenja isključivo pri višim koncentracijama karbofurana zapažen je i od strane Milatovic i sur. (2005). Autori su detektirali povišenje razine oksidativnog stresa u stanicama poprečnoprugastih mišića štakora tek pri dozi karbofurana od 1/3 LD<sub>50</sub>. Nadalje, Soloneski i sur. (2008) dokazali su značajno povišenje broja mikronukleusa u stanicama CHO u ovisnosti o koncentraciji primijenjenog karbofurana kao aktivne tvari. Chauhan i sur. (2000) pokazali su da četverodnevno izlaganje miševa karbofuranu dovodi do povišenja broja mikronukleusa u stanicama koštane srži ovisno o dozi što je u skladu s našim istraživanjem (Mladinic i sur., 2009b).

U okviru procjene aneugenog učinka karbofurana uočili smo značajan porast broja mikronukleusa sa C<sup>+</sup> signalom u ovisnosti o koncentraciji. Učinak nije bio ovisan o metaboličkoj aktivaciji. Specifično djelovanje karbofurana i njegovih metabolita na



kromosome 1, 9, 15, 16 i Y nije zapaženo (Mladinic i sur., 2009b). Suprotno našim rezultatima, Zhou i sur. (2005) nisu dokazali porast broja mikronukleusa u stanicama koštane srži miša nakon izlaganja karbofuranu i metabolitu karbofuranfenolu usprkos 10 puta višim koncentracijama od onih koje smo koristili u ovom istraživanju. No, autori su zapazili porast broja mikronukleusa nakon tretmana s 3-hidrokarbofuranom i nitrozokarbofuranom. Nažalost, ovim istraživanjem nismo bili u mogućnosti jasno razlučiti koji od metabolita ispoljava genotoksični učinak.

Nakon tretmana limfocita formulacijom karbofurana Geocid nije uočen značajan nastanak MN, NB i NPB (Slika 4-6) što je u skladu s rezultatima Soloneski i sur. (2008) dobivenim na stanicama CHO. Nadalje, nije uočena ovisnost izdvajanja čitavih kromosoma mikronukleusima o koncentraciji Geocida, što ukazuje da formulaciju, za razliku od karbofurana u obliku čiste aktivne tvari ne posjeduje anuegeni učinak. Ova razlika između učinka formulacije i aktivne tvari može se objasniti na način da aditivi koji se nalaze u samoj formulaciji modificiraju i prevladavaju djelovanje samog karbofurana (Guilherme i sur., 2010).

### **3.2. Dugotrajne kulture limfocita u uvjetima ex vivo**

Sve ranije citirane studije o genotoksičnosti glifosata, terbutilazina i karbofurana temeljile su se na rezultatima akutnog izlaganja u uvjetima *ex vivo* ili *in vivo*. Takav pristup ne pruža relevantnu informaciju o štetnim učincima pesticida na genom čovjeka uslijed dugotrajne izloženosti. S ciljem što vjerodostojnije procjene rizika po zdravlje ljudi, u sklopu ovog doktorata uspostavili smo dugotrajnu kulturu ljudskih limfocita koja nam je omogućila praćenje učinka pesticida na strukturni integritet gena *TP 53* i *c-Myc* koji sudjeluju u regulaciji staničnog ciklusa pri 14-dnevnoj izloženosti.

Nakon 14-dnevnog tretmana glifosatom i formulacijom Mentor uočili smo povećanje primarnih oštećenja DNA u odnosu na negativnu kontrolu neovisno o dodatku S9 (Tablica 8). Terbutilazinu nije pokazivao značajno povišenje razine primarnih oštećenja u ovisnosti o koncentraciji dok je formulacija Radazin značajno povećala migraciju DNA pri svim testiranim koncentracijama. Statističkom usporedbom pokazan je jači utjecaj formulacije na genom u odnosu na samu aktivnu tvar (Tablica 8) što ponovno upućuje na činjenicu da aditivi sadržani u formulaciji mogu sinergistički djelovati na štetan učinak same aktivne tvari (Guilherme i sur., 2010). Nakon 14-dnevnog tretman karbofuranom i formulacijom Geocid uočili smo značajan porast oštećenja u ovisnosti o koncentraciji neovisno o dodatku S9 (Tablica 8).

Limfociti, za razliku od primarne kulture, u dugotrajnoj kulturi prolaze veliki broj dioba što zahtjeva učestaliju sintezu i replikaciju DNA. Za takve stanice koje kontinuirano prolaze stanični ciklus poznato je da posjeduju veću aktivnost popravka DNA od stanica u G<sub>0</sub> fazi (Bartosova i sur., 1996; Bohr i sur., 1989). Stoga Anderson i sur. (2007) smatraju da bi u tretmanu dugotrajnih kultura genotoksičnim agensima trebalo očekivati manje razlike u porastu % DNA u repu u odnosu na kontrolu, nego što bi to bio slučaj za tretman kratkotrajnih kultura. Međutim, naši rezultati pokazuju suprotno. Usprkos višoj aktivnosti popravka rezultati ukazuju da dugotrajna izloženost uzrokuje veće primarno oštećenje DNA u usporedbi s akutnom izloženošću. To je vidljivo iz rezultata za % DNA u repu kometa za sve aktivne tvari i formulacije osim za čistu aktivnu tvar terbutilazin (Mladinic i sur., 2009a; Tablica 2, 3, 4, 8). Komet test, osim što detektira primarne lezije u molekuli DNA, ujedno detektira i popravke oštećenja koji su u tijeku. Stoga pojačan intenzitet popravka doprinosi porastu parametara komet testa. Nadalje, tijekom 14-dnevnog tretmana dugotrajna kultura limfocita je čitavo vrijeme izložena istoj razini genotoksičnog agensa što dovodi do kontinuirane indukcije lezija koje, nadalje, dodatno doprinose povećanju migracije DNA u rep kometa. Kao treće objašnjenje za povećanje parametara komet testa u tretmanu dugotrajne kulture limfocita u odnosu na primarnu jest činjenica da je DNA u S fazi tijekom replikacije osjetljivija na djelovanje genotoksičnih spojeva. Za razliku od primarnih, u dugotrajnim kulturama limfociti opetovano prolaze kroz staničnu diobu.

Budući da je u 14-dnevnom tretmanu utvrđena izraženija primarna genotoksičnost aktivnih tvari i njihovih formulacija, sa ciljem detaljnije procjene biološkog značaja detektiranih oštećenja primijenili smo tehniku komet-FISH-a. Koristeći specifične sonde DNA za gene *c-Myc* i *TP 53* ispitali smo učinak dugotrajne izloženosti pesticidima u uvjetima *ex vivo* na strukturnu cjelovitost navedenih gena. Gene *c-Myc* i *TP 53* odabrali smo zbog njihove zadaće u regulaciji staničnog ciklusa i uočenih aberantnosti u njihovom broju, strukturi i, u konačnici, ekspresiji u malignim stanicama (Levin i sur., 1994). Gen *TP 53* pripada skupini tumor supresorskih gena. U zdravim, neoštećenim stanicama razine proteina p53 održavaju se na vrlo niskoj razini. Regulacija aktivnosti *TP53* odvija se putem proteina MDM2 koji se vezuje na p53 i sprječava njegov transport iz jezgre u citoplazmu. Također, MDM2 funkcionira kao ubikvitin ligaza koja veže ubikvitin na p53 protein čime ga označava za degradaciju (Hock i sur., 2011). Genotoksični stres koji može biti uzrokovan zračenjem, oštećenjem DNA ili aktivacijom onkogenih inhibira razgradnju proteina p53. Nadalje, u stanici protein p53 ima 3 vrlo važne funkcije. Sudjeluje u zaustavljanju staničnog ciklusa, popravku DNA i programiranoj staničnoj smrti (apoptozu). Zaustavljanje stanične diobe putem p53 događa se u

G<sub>1</sub>/S regulacijskoj točki čime se daje vremena mehanizmima popravka DNA da uklone oštećenja izazvana genotoksičnim stresom. Ukoliko je oštećenje DNA preveliko p53 sudjeluje u pokretanju mehanizma apoptoze u stanici (Teodoro i sur., 2007). Ukoliko su obje kopije gena oštećene, mutirane ili deletirane u genomu, stanični ciklus ne može se zaustaviti što dovodi do nekontrolirane diobe (Riley i sur., 2008; Yee i Vousden, 2005).

Gen *c-Myc* pripada skupini protoonkogeni i ima ulogu transkripcijskog faktora. Smatra se da utječe na regulaciju ekspresije više od 15 % svih gena u stanici čovjeka (Dang i sur., 2006). U stanicama koje se nalaze u fazi G<sub>0</sub> ekspresija *c-Myc* je na niskoj razini, dok u stanicama koje se u stanicama potaknutim na diobu značajno povećava njegova ekspresija. Povećanje ekspresije *c-Myc* stišava transkripciju gena *gas1*, *p15*, *p21*, *p27*, *gadd34*, *gadd45* i *gadd153* koji su odgovorni za ostanak stanice u fazi staničnog ciklusa G<sub>0</sub> (*engl. growth arrest genes*), čime inducira početak stanične diobe. Postoje dva različita mehanizma stišavanja transkripcije gena odgovornih za staničnu diobu. Prvi je vezanje *c-Myc* na promotorsku regiju gena koji koče diobu čime se supresira njihova transkripcija. Drugi način djelovanja je vezanje gena *c-Myc* na transkripcijski faktor koji je odgovoran za aktivnost ovih gena i njegova inaktivacija (Gartel i Shchors, 2003). Po završetku diobe, u stanicama kćerima ekspresija *c-Myc* se vraća na njegovu bazalnu nisku razinu. Prekomjerna ekspresija gena *c-Myc* dovodi do suzbijanja transkripcije gena koji koče diobu stanice te time može doprinjeti nekontroliranoj staničnoj diobi. Kao krajnja posljedica može biti razvitak novotvorenina (Gardner i sur., 2002). Zaštita stanice od prekomjerno eksprimiranog *c-Myc* leži u aktiviranju mehanizma apoptoze. Ukoliko stanica izbjegne ulazak u apoptozu dolazi do nekontrolirane diobe na način da *c-Myc* aktivira ekspresiju gena *hTERT* čiji je produkt enzim telomeraza. Također, dokazano je da *c-Myc* utječe na povećanje ekspresije gena koji sudjeluju u biosintezi nukleotida i metabolizmu DNA (Gartel i Shchors, 2003).

Prilikom određivanja lokalizacije signala za gene *TP53*, *c-Myc*, centromere kromosoma 8 (cen 8) i 17 (cen 17) u repu kometa mjeren je intenzitet fluorescencije signala za pojedinu regiju u repu i uspoređivan s fluorescencijom signala neoštećene regije u glavi kometa kontrolnih limfocita. Mjerenjem intenziteta signala FISH-a u glavi ili repu kometa može se utvrditi je li do migracije gena u rep došlo uslijed njegove fragmentacije uzrokovane oštećenjem DNA unutar genske sekvence ili uslijed migracije relaksirane omče koja sadrži gen dok on sam nije oštećen. U alkalnom kometu, nakon elektroforeze i neutralizacije preparata, DNA se ne zadržava u jednolančanom (ss) obliku jer je takav oblik entalpijski nepovoljan i energetski neodrživ. Jednolančana DNA ima tendenciju sljepljivanja s komplementarnim lancem u dvolančanu (ds) uzvojnici. Ako su komplementarni lanci unutar repa prostorno udaljeni pa

nije moguća rehibridizacija, doći će do sljepljivanja s malenom ektopičnom homolognom sekvencom i tako stvoriti ds ukosnice (Kumaravel i sur., 2009). Imajući na umu činjenicu da se rep kometa formira migracijom opuštenih omči DNA veličine 12-250 kb (Jackson i sur., 1990) i linearnih fragmenata DNA oslobođenih nakon indukcije loma unutar omče, pojava signala u repu nužno ne mora značiti fragmentaciju samog gena. Intenzitet fluorescencije za čitav (neoštećen) gen koji se određuje u glavi kometa kontrolnih limfocita smatra se referentom vrijednošću te možemo reći da iznosi 1 arbitrarnu jedinicu (AJ). Vrijednost signala u repu koja odgovara 1 AJ ili  $\frac{1}{2}$  AJ predstavlja migraciju cijelovitog gena kao dijela opuštene omče. Intenzitet koji odgovara 1 AJ ukazuje na uspješno sljepljivanje odabrane sekvence s komplementarnim lancem u obliku ds DNA omče. Ukoliko signal u repu iznosi  $\frac{1}{2}$  AJ vrijednosti to ukazuje na sljepljivanje FISH sekvence na ss gensku regiju koja zatim tvori ds ukosnicu. Intenzitet signala koji je jednak 1 AJ ili  $\frac{1}{2}$  AJ ukazuje na migraciju opuštene omče u rep kometa, a u kojoj se nalazi cjeloviti gen bilo u ds formi omče (1 AJ) ili ss formi ( $\frac{1}{2}$  AJ) te nema fragmentacije gena. Vrijednosti intenziteta jednake  $\frac{1}{2}$  i  $\frac{1}{4}$  AJ ne smatraju se fragmentacijom gena jer je mala vjerojatnost da se lom DNA dogodi na polovici gena. Ovakav način brojenja signala vrijedi isključivo za DNA sondu koja posjeduje oba lanca obilježena s flouorforima (Iourov i sur., 2005).

Do sada nije bilo objavljenih istraživanja u kojima bi tehnika komet-FISH bila primijenjena u procjeni učinka pesticida na strukturni integritet neke od genomskih regija. Međutim, u literaturi postoje istraživanja koja koriste ovu tehniku za procjenu integriteta gena *TP53* u istraživanjima *ex vivo* na različitim staničnim linijama. Tako su Kumaravel i Bristow (2005) izlagali različite stanične linije  $\gamma$ -zračenju. Autori su dokazali da je oštećenje gena *TP 53* značajno izraženije u staničnim linijama karcinoma dojke u odnosu na limfoblastoidnu liniju i liniju zdrave epitelne stanice dojke. Nadalje, Schaeferhenrich i sur. (2003) su u staničnoj liniji karcinoma debelog crijeva uočili značajnu migraciju gena *TP53* u rep kometa uslijed izlaganja produktu lipidne peroksidacije 4-hidroksi-2-nonenalu. U drugim istraživanjima, Knöbel i sur. (2007), te Park i sur. (2007) na leukocitima i staničnoj liniji debelog crijeva pokazali su štetan utjecaj željeza na strukturnu cjelovitost *TP53*. S obzirom da ne postoje studije o utjecaju pesticida na strukturni integritet gena *c-Myc* i *TP53* nismo bili u mogućnosti raspraviti svoje rezultate u svijetlu rezultata istraživanja drugih autora.

Glifosat i terbutilazin kao čiste aktivne tvari inducirali su značajnu migraciju oba promatrana gena *c-Myc* i *TP53* u rep kometa pri višoj od dvije testirane koncentracije. Iako ne postoje razlike u intenzitetu migracije između ta dva gena, 14-dnevni tretman glifosatom i terbutilazinom doveo je do značajnog izdvajanja cen 17 dok to za cen 8 nije bio slučaj

(Tablica 9, 10; Mladinic i sur., 2012). Terbutilazin pripada skupini triazina te pokazuje sličan toksikološki profil kao atrazin. Cantemir i sur. (1997) dokazali su da dugotrajna izloženost atrazinu značajno smanjuje razine proteina p53 u limfocitima štakora u ovisnosti o dozi. Autori objašnjavaju da smanjenje razine proteina proizlazi iz narušene funkcije gena *TP53* uslijed klastogenog mehanizma djelovanja pesticida. Navedena opažanja u skladu su s rezultatima našeg istraživanja koji upućuju na smanjeni strukturni integritet gena *TP53*. Metabolička aktivacija pojačala je učinak aktivnih tvari glifosata i terbutilazina na izdvajanje signala u rep za sve praćene regije. Ovakav rezultat bio je za očekivati uzevši u obzir rezultate alkalnog komet testa dobivene za kratkotrajno i dugotrajno izlaganje limfocita pesticidima s i bez S9. Budući da smo primjenom tih tehnika uočili značajan učinak metaboličke aktivacije na dodatno povećanje % DNA u repu kometa prilikom dugotrajnog izlaganja limfocita bilo je za očekivati da će se u migrirajućoj DNA naći i promatrani geni te da će porast migracije gena *c-Myc* i *TP53* u rep kometa pratiti porast ukupnog izdvajanja DNA u rep. To nam govori da genotoksični učinak aktivnih tvari i njihovih metabolita nije specifičnog karaktera za navedene gene.

Za razliku od tretmana aktivnim tvarima formulacije Mentor i Radazin, pri obje koncentracije, izazvale su pojačanu razinu migracije sve četiri promatrane regije (Tablica 11-14). Ponovno, ovo je logično jer usporedba s rezultatima komet testa ukazuje na sposobnost „inertnih“ tvari u formulaciji da djeluju aditivno na genotoksični potencijal aktivne tvari.

Tretman karbofuranom, u ovisnosti o koncentraciji, značajno je povećao izdvajanje gena *c-Myc* i *TP53* u rep kometa (Mladinic i sur., 2012). Jednako tretmanu s glifosatom i terbutilazinom, karbofuran je značajno utjecao na migraciju cen 17, ali ne i cen 8 u odnosu na kontrolu. U odnosu na aktivnu tvar, formulacija Geocid pozitivno je utjecala na migraciju gena *c-Myc* i *TP53* te regije cen 17, ali i cen 8 u rep kometa za koju nakon tretmana s aktivnim tvarima nije zabilježena migracija (Tablice 15 i 16).

Promatrajući skupno sve rezultate komet-FISH tehnike možemo reći da je kod tretmana aktivnim tvarima izraženija migracija gena *c-Myc* u odnosu na gen *TP53*, no ta razlika nije statistički značajna. Ovo zapažanje moguće je pokušati objasniti na dva načina. Prvo, Siwicki i sur. (2000) dokazali su da je u dugotrajnoj kulturi limfocita ekspresija gena *c-Myc* izraženija u odnosu na gen *TP53*. Do istog opažanja došli su i Levin i sur. (1994) radeći na stanicama karcinoma pluća. Utvrđeno je da geni koji su transkripcijski aktivni pokazuju veću podložnost oštećivanju djelovanjem genotoksičnih agensa za razliku od heterokromatinskih regija. Kao što je već rečeno komet test uz lezije detektira i mjesta aktivnih popravaka oštećenja DNA. Upravo ta povećana dinamika oštećivanja i popravka u području aktivnog gena *c-Myc* mogla

bi biti razlogom nešto učestalije migracije tog gena u rep kometa. Drugo, korištena sonda za *c-Myc* gen obuhvaća trostruko veću regiju od sonde za gen *TP53*. Zbog toga je moguće očekivati da će nasumično oštećenje DNA češće zahvatiti regiju genoma koja hibridizira sa sondom za *c-Myc*. Naravno, potrebno je naglasiti da razlika u intenzitetu migracije između *c-Myc* i *TP53* nije bila statistički značajna.

Od testiranih aktivnih tvari čak ni karbofuran za kojeg je utvrđena najizraženija sposobnost narušavanja strukturnog integriteta promatranih gena nije inducirao migraciju cen 8 u rep kometa. Poznato je da se DNA u području centromernih regija gusto pakira u vidu heterokromatina te je stoga teško za očekivati njenu migraciju u rep kometa. No zbog čega onda postoje razlike u utjecaju aktivnih tvari na cen 8 i cen 17? U znanstvenoj literaturi navodi se da kromosom 17 sadrži veliku gustoću gena koja iznosi 16,2 gena po mega bazi (Mb) DNA (Zody i sur., 2006), dok kromosom 8 sadrži samo 5,6 gena/Mb (Nusbaum i sur., 2006). Iz veće gustoće gena proizlazi povećana transkripcijska aktivnost, a time i povećana aktivnost popravka u slučaju oštećenja (Surrallés i sur., 1997). Na tim mjestima DNA se rjeđe pakira zbog svih aktivnih procesa. To za posljedicu može imati povećanu dostupnost molekule DNA za interakciju s genotoksičnim spojem, ali i olakšanu migraciju omči DNA iz tih regija u rep kometa tijekom elektroforeze. Što se tiče teritorija kromosoma 17 u interfaznoj jezgri on je značajno drugačije pozicioniran od teritorija koji zauzima kromosom 8 (Bolzer i sur., 2005). Nalazi se bliže središtu jezgre za koju je poznato da je rjeđe pakirana uslijed genske aktivnosti (Cremer i sur., 2003) što dodatno olakšava dostupnost tog dijela genoma genotoksičnom spoju kao i migraciju omče DNA koja bi sadržavala regiju cen 17 tijekom elektroforeze.

Postoje dvije objavljene studije koje povezuju izloženost pesticidima s numeričkim i funkcionalnim oštećenjima gena, jedna se odnosi na *c-Myc*, a druga na gen *TP53*, ali u njima nije korištena tehnika komet-FISH (Maire i sur., 2007; Calaf i sur., 2009). Niti jedna od navedenih studija ne uključuje procjenu učinka glifosata, terbutilazina i karbofurana ili njihovih formulacija. Prva studija ukazuje na činjenicu da organofosforni pesticidi induciraju oštećenje gena *TP53* (Calaf i sur., 2009). Autori su za organofosfate paration i malation dokazali da dovode do malignih promjena u stanicama imortalizirane linije epitela dojke koje se mogu pojasniti na dva načina. Jedan je da organofosfati izravno utječu na gubitak gena *TP53*. Drugi način djelovanja je putem induciranja mikrosatelitne nestabilnosti u kromosomu 17 koji sadrži taj gen. Nestabilnost ima za posljedicu povećanu učestalost pogrešnog popravka DNA, a s obzirom da tumor-supresor *TP53* aktivira mehanizame popravka za očekivati je

povećanu genomsku nestabilnost zbog narušenog strukturnog integriteta ovog gena (Calaf i sur., 2009).

Profesionalna izloženost pesticidima povezana je s povećanim mutacijama gena *TP53* koje su utvrđene u stanicama karcinoma pluća (Bumroongkit i sur., 2008) i mozga (Loyant i sur., 2005) pacijenata s dokumentiranom izloženosti pesticidima. Na žalost autori nisu razlučili utjecaj pojedinih skupina pesticida, već su pokazali općeniti štetni utjecaj pesticida na gen *TP53*. Høyer i sur. (2002) dokazali su kod pacijentica s karcinomom dojke da izloženost organoklornim pesticidima povećava stopu mutacija gena *TP53*. Nekoliko epidemioloških studija ukazalo je na moguću vezu između profesionalne izloženosti karbofuranu i rizika od razvitka ne-Hodgkinovog limfoma i karcinoma pluća (Bonner i sur., 2005; Hardell i sur., 2002; Zheng i sur., 2001). Također, povećan rizik razvitka ne-Hodgkinovog limfoma povezan je s izlaganjem triazinskim herbicidima (Hoar Zahm i sur., 1993). Budući da su različiti tipovi mutacije gena *TP53* prisutni u vidu uobičajenih mutacija svojstvenih za ne-Hodgkinov limfom (Harris i Hollstein, 1993; Hosny i sur., 2009; Kamata i sur., 2007) i karcinom pluća (Gao i sur., 2009; Miller i sur., 1992) temeljem rezultata navedenih studija indirektno se može zaključiti da izloženost pesticidima oštećuje ovaj tumor supresorski gen. Štetan učinak na strukturni integritet gena *TP53* uočen je u i ovom istraživanju uslijed dugotrajnog izlaganja limfocita glifosatu, terbutilazinu i karbofuranu samo u uvjetima *ex vivo*.

Za utjecaj pesticida na gen *c-Myc* postoji jedna objavljena studija, no ona nije istraživala pesticide iz skupina koje su istraživane unutar ovog doktorata. Maire i sur. (2007) dokazali su da izravno izlaganje 2,4-D povećava oštećenje DNA kao i povećanu ekspresiju gena *c-Myc* u stanicama SHE (engl. *Syrian hamster embryo*). Kao objašnjenje povećanja ekspresije autori navode hipometilaciju DNA u genskoj regiji. Jednostavnije rečeno, 2,4-D vrlo vjerojatno uzrokuje primarna oštećenja DNA na mjestima koja sadrže sekvence CCGG, a na koje se vežu metiltransferaze. Na taj način onemogućeno je stišavanje ekspresije gena *c-Myc*. Isto je pokazano i radom kojeg su objavili Tao i sur. (2002), a kojim su dokazali hipometilaciju gena *c-Myc* u tumorskim stanicama pluća štakora.

Međutim, dvije studije osoba oboljelih od ne-Hodgkinovom limfomu pokazale su postojanje strukturnih oštećenja lokusa *c-Myc* (Barrans i sur., 2010; Klapper i sur., 2008). Tako Barrans i sur. (2010) ukazuju da u 14% oboljelih postoji rearanžman ovog protoonkogen, dok su Klapper i sur. (2008) dokazali strukturna oštećenja gena u 8% populacije oboljelih. Izloženost triazinima (Hoar Zahm i sur., 1993) i karbamatima (Hardell i sur., 2002) povezana je s povećanim rizikom od razvitka ne-Hodgkinovog limfoma. Nadalje, kod određenih skupina ljudi sa specifičnim SNP (engl. *single nucleotide polymorphism*) u genu *c-Myc* izlaganje

organofosfatima značajno povećava rizik od razvitka raka prostate (Koutros i sur., 2010). Na temelju toga možemo reći da je gen *c-Myc* bitan za osjetljivost pri izlaganju pesticidima, ali i značajan faktor u riziku od razvitka novotvorina kod profesionalne izloženosti. Gledajući zajedno rezultate navedenih studija, ali i našeg istraživanja, u uvjetima *ex vivo*, indirektno se može reći da genotoksična aktivnost ovih skupina pesticida može štetno utjecati na strukturni integritet protoonkogen *c-Myc*.

### **3.3. Citogenetički biomonitoring**

S povećanjem razine primarnih oštećenja DNA dolazi i do porasta sekundarnih oštećenja, a koja su glavni pokretači neoplastičnog rasta stanica. Na tom tragu je i Direktiva 2009/128/EC Europske komisije u kojoj se preporučuje provođenje periodičkog nadzora stanovništva izloženog agrokemikalijama. Naša ideja bila je istražiti utječu li pesticidi na povećanje oštećenja genoma kod populacije koja je dugotrajno profesionalno izložena pesticidima iz skupina organofosfata, karbamata, ftalamidnih i nikotinoidnih pesticida. U našem istraživanju uočili smo statistički značajnu razliku u broju mikronukleusa, jezgrenih pupova i nukleoplazmatskih mostova između profesionalno izložene populacije i kontrolne skupine (Tablica 17). Zapažili smo značajan udio mikronukleusa koji sadrže C<sup>+</sup> i DAPI<sup>+</sup> signale. Prema tim rezultatima možemo reći da pesticidi, kojima su izloženi radnici, uz klastogeni ispoljavaju i anuegeni mehanizam genotoksičnosti čime dovode do značajnog izdvajanja cijelih kromosoma. Važno je napomenuti da izloženost navedenim skupinama utječe specifično na izdvajanje kromosoma 1, 9, 15, 16 i Y. Nadalje, detaljnije smo željeli istražiti dovodi li dugotrajna profesionalna izloženost pesticidima do izraženije aneuploidije za spolne kromosome nego što je to utvrđeno za opću populaciju.

Za kromosome X i Y izdvajanje u MN, NB i NPB nije bilo statistički u odnosu na kontrolnu populaciju (Tablica 18). Usporedbom s drugim studijama možemo reći da postoji vrlo malo razlika u rezultatima za izdvajanje spolnih kromosoma u MN. Tako Surrallés i sur. (1996a) za izdvajanje kromosoma X u MN kod žena navode brojku od 42%. Isti autori u drugom istraživanju navode postotak od 24,4% MN koji sadrže kromosom X (Surrallés i sur., 1996b). Nadalje, Hando i sur. (1994), ponovno kod žena, uočavaju izdvajanje kromosoma X u MN u iznosu od 62,3%, a Catalán i sur. (1998) u iznosu 41,8%. Vrlo važno je ovdje napomenuti da sve ove studije navode postotke izdvajanja za oba kromosoma X. Razlika u odnosu na naše rezultate je u tome što smo mi izračunali vrijednosti izdvajanja samo za jedan kromosom X da bismo bili u mogućnosti usporediti ih s vrijednostima izdvajanja kromosoma X u MN kod muškaraca. Ukoliko podijelimo vrijednosti iz navedenih studija s 2 da bismo ih sveli kao u



našem primjeru na jedan kromosom možemo reći da je zapažena vrijednost u našoj studiji izdvajanja kromosoma X u MN u skladu s normalnim vrijednostima. Što se tiče udjela kromosoma Y u MN u našem istraživanju on je u skladu s rezultatima istraživanja drugih autora kod kojih izdvajanje Y iznosi 10,7% (Catalán i sur., 1998) i 13,5% (Nath i sur., 1995). Prema našim rezultatima ne možemo reći da pesticidi kojima je profesionalno izložena populacija iz ovog istraživanja ima specifično djelovanje na spolne kromosome. Jezgreni pupovi kao i nukleoplazmatski mostovi također se bilježe jer s tim podacima možemo potpunije karakterizirati mehanizme nastanka kromatinskih nestabilnosti u limfocitima. O porijeklu jezgrenih pupova postoji nekoliko teorija. Tako oni nastaju zbog eliminacije genomskih regija koje sadrže amplificirane gene povezane s metabolizmom ili rezistencijom na egzogene kemikalije zbog dugotrajne izloženosti (Lindberg i sur., 2007; Prody i sur., 1989). Nadalje, NB mogu nastati mehanizmom zvanim „*aneusomy rescue mechanism*“ gdje se višak kromosoma izdvaja pupanjem (Wang i sur., 2004), od ostataka anafaznih mostova (Gisselsson i sur., 2000) ili retrakcijom mikronukleusa (Lindberg i sur., 2007). U ovom istraživanju, udio kromosoma X i Y nije bio značajan u NB (Tablica 18), pa jedino logično objašnjenje za porijeklo pupova bilo bi da nastaju retrakcijom mikronukleusa. Što se tiče nukleoplazmatskih mostova oni potječu od dicentričnih kromosoma tijekom anafaze ukoliko dođe do povlačenja svake od centromera prema suprotnom polu stanice ili od kromosoma nastalih telomernom fuzijom (Fenech, 2006). Budući da su u ovom istraživanju korištene centromerne probe, a udio mostova s kromosomom X nije bio značajan, nismo u mogućnosti razlučiti nastanak NPB.

U posljednjem desetljeću objavljena je nekolicina studija o štetnom učinku pesticida na genom profesionalno izloženih populacija u poljoprivredi (staklenici/otvorene površine) i proizvodnji pesticida sa potpuno različitim rezultatima. Više različitih skupina autora navode statistički značajno povećanje broja mikronukleusa uslijed profesionalne izloženosti različitim skupinama pesticida u odnosu na kontrolu što je slično našim rezultatima. Tako su Garaj Vrhovac i Zeljezic (2002) dokazali značajno povećanje broja mikronukleusa kod radnika u proizvodnji koji su bili izloženi mješavini kloroacetanilida, triazinskih, organofosfatnih i fenoksi pesticida. Kod radnika u proizvodnji cvijeća Bolognesi i sur. (2002) uočili su također povećanje broja mikronukleusa. Testirana populacija bila je izložena mješavini pesticida koji spadaju u skupine organofosfata, karbamata, benzimidazola, piretroida, organoklorina, tioftalimida itd. Bhalli i sur. (2006) zapažaju povećanje broja mikronukleusa kod radnika u proizvodnji organofosfata i piretroida. Nadalje, Kehdy i sur. (2007) potvrđuju povećanje broja mikronukleusa i nukleoplazmatskih mostova kod sanitacijskih radnika koji koriste piretroide,

organofosfate i hidrosikumarinske pesticide. Za berače pamuka izloženih karbamatima, piretroidima i organofosfatima dokazano je povećanje broja mikronukleusa (Ali i sur. 2008). Također, kod radnika koji zaprašuju usjeve, a izloženi su pesticidima iz skupina ditiokarbamata, organofosfata, piretroidatioftalamida, karbamata Costa i sur. (2011) ukazali su na povećanje broja mikronukleusa. Coskun i sur. (2011) potvrdili su povećanje broja mikronukleusa i jezgrenih pupova kod poljoprivrednika koji koriste pesticide, ali bez klasifikacije po skupinama izloženosti. Međutim, suprotno našim rezultatima Lucero i sur. (2000) nisu uočili povećanje mikronukleusa kod populacije koja radi u staklenicima, a koja je izložena organoklorinima, organofosfatima, karbamatima i piretroidima. Također, Pastor i sur. (2002) ne detektiraju povećanje mikronukleusa u 2 različita doba zaprašivanja, no ni ovdje nisu navedeni podaci vezani za korištene skupine pesticida. U velikoj europskoj studiji koja je obuhvaćala poljoprivrednike iz više zemalja Pastor i sur. (2003) nisu uočili povećanje broja mikronukleusa za izloženost organofosfatima, karbamatima i piretroidima. Nadalje, Bolognesi i sur. (2004) nisu dokazali porast broja mikronukleusa za cvijećare koji su bili izloženi organofosfatima, karbamatima, benzimidazolima, piretroidima tioftalimidima, organokloridnim pesticidima, amidima i drugim skupinama pesticida. Važno je ovdje napomenuti da autori nisu zapazili niti povećanje udjela C+ signala u mikronukleusima za tu profesionalno izloženu populaciju. Bolognesi i sur. (2009) u studiji na poljoprivrednicima koji koriste glifosat dokazali su porast broja mikronukleusa. Taj porast mikronukleusa bio je prolazan te se smanjio nakon 4 mjeseca od zadnjeg dana korištenja. U najnovijoj studiji na poljoprivrednicima Jonnalagadda i sur. (2011) nisu uočili značajno povišenje frekvencije mikronukleusa, no točni podaci o korištenim pesticidima nisu navedeni.

## **4. Zaključci**

1. U uvjetima 4-satnog izlaganja *ex vivo*, glifosat nije pokazao genotoksični učinak u leukocitima; razina primarnih oštećenja DNA, učestalost MN, NB i NPB nisu značajno povećane u odnosu na kontrolnu kulturu limfocita.
2. Nakon 14-dnevnog izlaganja kulture limfocita glifosatu došlo je do ispoljavanja ograničenog genotoksičnog djelovanja u vidu indukcije primarnih oštećenja.
3. Tijekom 14-dnevnog izlaganja kulture ljudskih limfocita, glifosat je narušio strukturni integritet gena *c-Myc* i *TP53* što je izravna posljedica njegove ograničene sposobnosti indukcije primarnih oštećenja molekule DNA.
4. Za razliku od glifosata kao aktivne tvari, formulacija Mentor pokazala je značajnu sposobnost indukcije primarnih i oksidativnih oštećenja DNA te mikronukleusa već nakon 4-satnog izlaganja.
5. Osim klastogenog, za Mentor je uočeno i aneugeno djelovanje izdvajanjem cijelih kromosoma.
6. Nakon 14-dnevnog izlaganja Mentor je, u odnosu na glifosat, pokazao značajno veći genotoksični potencijal putem indukcije primarnih oštećenja i narušavanja strukturnog integriteta gena *TP53* i *c-Myc*.
7. Formulacija Mentor predstavlja značajno veći rizik po stabilnost genetičkog materijala ljudskih stanica u odnosu na čistu aktivnu tvar glifosat.
8. Nakon 4-satnog tretmana, u uvjetima *ex vivo*, terbutilazin je pokazao genotoksični učinak u leukocitima inducirajući značajan porast razine primarnih oštećenja DNA, broja mikronukleusa i jezgrenih pupova.
9. Osim klastogenog učinka terbutilazin pokazuje i aneugeno djelovanje povećavajući udio mikronukleusa kojima sadrže čitave kromosome..
10. Za metabolički promijenjen terbutilazin utvrđen je ograničen specifičan aneugeni učinak na kromosome 1, 9, 15, 16 i Y.
11. Nakon 14-dnevnog izlaganja kulture ljudskih limfocita zapaženo je genotoksično djelovanje terbutilazina u obliku povećanja primarnih oštećenja kao i narušavanja strukturnog integriteta gena *c-Myc* i *TP 53*.
12. U 4-satnom izlaganju formulacija Radazin pokazala je jednak genotoksični učinak kao i aktivna tvar terbutilazin, dok je nakon 14-dnevnog izlaganja Radazin pokazao značajno veći genotoksični potencijal.
13. U uvjetima 4-satnog izlaganja *ex vivo*, karbofuran je pokazao genotoksični učinak na leukocitima; inducira značajan porast primarnih oštećenja, među njima i oksidativnih

- lezija kao i učestalost MN. Osim klastogenog, predominantni aneugeni mehanizam djelovanja karbofurana vidljiv je iz značajno povišenog izdvajanja cijelih kromosoma.
14. Nakon 14-dnevnog izlaganja, karbofuran je doveo do povećanja primarnih lezija DNA i do narušavanja strukturnog integriteta gena *c-Myc* i *TP53*.
  15. U 14-dnevnom tretmanu formulacija Geocid pokazala je izraženiji genotoksični učinak u odnosu na čistu tvar karbofuran.
  16. Općenito, razina primarnih oštećenja DNA u limfocitima bila je značajno povišena nakon 14-dnevnog izlaganja svim ispitivanim pesticidima u odnosu na razinu oštećenja nakon 4-satnog izlaganja.
  17. Nakon dugotrajnog izlaganja kulture limfocita niskim koncentracijama pesticida uočeno je da aktivne tvari izraženije utječu na strukturni integritet gena *c-Myc*, dok testirane formulacije utječu na strukturni integritet gena *TP53*.
  18. Kod osoba profesionalno izloženih pesticidima potvrđeno je značajno povećanje broja MN, NB i NPB u odnosu na kontrolnu skupinu.
  19. Ovo istraživanje ukazalo je na povećanje udjela aberantnih struktura kromatina koje sadrže centromernu regiju kod izložene populacije što upućuje na zaključak da korištene skupine pesticida uz klastogeno ispoljavaju i aneugeno djelovanje.
  20. Iako su za limfocite populacije profesionalno izložene pesticidima uočene nepravilnosti u segregaciji spolnih kromosoma tijekom anafaze, kao i njihovo sudjelovanje u tvorbi MN broj aneuploidnih stanica s obzirom na kromosome X i Y nije se značajno razlikovao u odnosu na referentne vrijednosti za opću populaciju.

## **5. Popis literature**

- Ali T, Bhalli JA, Rana SM, Khan QM (2008) Cytogenetic damage in female Pakistani agricultural workers exposed to pesticides. *Environ Mol Mutagen* 49: 374-380
- Andersson MA, Hellman BE (2007) Evaluation of catechol-induced DNA damage in human lymphocytes: a comparison between freshly isolated lymphocytes and T-lymphocytes from extended-term cultures. *Toxicol In Vitro* 21: 716-722
- Anderson RM, Sumption ND, Papworth DG, Goodhead DT (2006) Chromosome breakpoint distribution of damage induced in peripheral blood lymphocytes by densely ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 82: 49–58
- Andreotti G, Beane Freeman LE, Hou L, Coble J, Rusiecki J, Hoppin, JA, Silverman DT, Alavanja MCR (2009) Agricultural pesticide use and pancreatic cancer risk in the Agricultural Health Study. *Int J Cancer* 124: 2495–2500
- Anwar WA (1997) Biomarkers of human exposure to pesticides. *Environ Health Perspect* 105: 801-806
- AZO - Agencija za zaštitu okoliša, dostupno na: <http://www.azo.hr/Default.aspx?art=579&sec=58> posljednji puta pristupljeno 14. studenog 2011.
- BCPC - The British Crop Protection Council (2009) The pesticide Manual (Incorporating the Agrochemicals Handbook) a world compendium. U: Tomlin, C. (ed.), 15th edition, Datix International, Bungay
- Bartosova Z, Pirsal M, Reinhold W, Stetler-Stevenson M, Zajac-Kaye M, May A, Horak ID, Bohr VA (1996) Gene-specific repair in human CD4+ lymphocytes reflects transcription and proliferation. *Mutat Res* 363: 191–199
- Benachour N, Seralini GE (2009) Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells. *Chem Res Toxicol* 22: 97-105
- Bhalli JA, Ali T, Asi MR, Khalid ZM, Ceppi M, Khan QM (2009) DNA damage in Pakistani agricultural workers exposed to mixture of pesticides. *Environ Mol Mutag* 50: 37-45
- Barrans S, Crouch S, Smith A, Turner K, Owen R, Patmore R, Roman E, Jack A (2010) Rearrangement of MYC is associated with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the era of rituximab. *J Clin Oncol* 28: 3360-3365
- Boers D, Portengen L, Bueno-de-Mesquita HB, Heederik D, Vermeulen R (2010) Cause-specific mortality of Dutch chlorophenoxy herbicide manufacturing workers. *Occup Environ Med* 67: 24-31
- Boxer LM, Dang CV (2001) Translocations involving c-myc and c-myc function. *Oncogene* 20: 5595-5610.

- Bhalli JA, Khan QM, Haq MA, Khalid AM, Nasim A. (2006) Cytogenetic analysis of Pakistani individuals occupationally exposed to pesticides in a pesticide production industry. *Mutagenesis* 21: 143–148
- Bohr VA, Evans MK, Fornace Jr AJ (1989) DNA repair and its pathogenetic implications. *Lab Invest* 61: 143–161
- Bolognesi C, Bonatti S, Degan P, Gallerani E, Peluso M, Rabboni R, Roggieri P, Abbondandolo A (1997) Genotoxic activity of glyphosate and its technical formulation roundup. *J Agric Food Chem* 45: 1957–1962
- Bolognesi C, Perrone E, Landini E (2002) Micronucleus monitoring of a floriculturist population from western Liguria, Italy. *Mutagenesis* 17: 391-397
- Bolognesi C, Landini E, Perrone E, Roggieri P (2004) Cytogenetic biomonitoring of a floriculturist population in Italy: micronucleus analysis by fluorescence in situ hybridization (FISH) with an all-chromosome centromeric probe. *Mutat Res* 557: 109-117
- Bolognesi C, Carrasquilla G, Volpi S, Solomon KR, Marshall EJ (2009) Biomonitoring of genotoxic risk in agricultural workers from five colombian regions: association to occupational exposure to glyphosate. *J Toxicol Environ Health A* 72: 986-997.
- Bolzer A, Kreth G, Solovei I, Koehler D, Saracoglu K, Fauth C, Müller S, Eils R, Cremer C, Speicher MR, Cremer T (2005) Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. *PLoS Biol* 3: e157
- Bonner MR, Lee WJ, Sandler DP, Hoppin JA, Dosemeci M, Alavanja MCR (2005) Occupational exposure to carbofuran and the incidence of cancer in the agricultural health study. *Environ Health Persp* 113: 285–289
- Bonner MR, Williams BA, Rusiecki JA, Blair A, Beane Freeman LE, Hoppin JA, Dosemeci M, Lubin J, Sandler DP, Alavanja MCR (2010) Occupational exposure to terbufos and the incidence of cancer in the Agricultural Health Study. *Cancer Causes Control* 6: 871-877
- Bumroongkit K, Rannala B, Traisathit P, Srikummool M, Wongchai Y, Kangwanpong D, (2008) TP53 gene mutations of lung cancer patients in upper northern Thailand and environmental risk factors. *Cancer Genet Cytogenet* 185: 20-27
- Calaf GM, Chau CE, Roy D (2009) Organophosphorous pesticides and estrogen induce transformation of breast cells affecting *p53* and *c-Ha-ras* genes. *Int J Oncol* 35: 1061-1068
- Cantemir C, Cozmei C, Scutaru B, Nicoara S, Carasevici E (1997) p53 protein expression in peripheral lymphocytes from atrazine chronically intoxicated rats. *Toxicol Lett* 93: 87-94



- Catalán J, Autio K, Kuosma E, Norppa H (1998) Age-dependent inclusion of sex chromosomes in lymphocyte micronuclei of man. *Am J Hum Genet* 63: 1464–1472
- Cavallo D, Ursini CL, Rondinone B, Iavicoli S (2009) Evaluation of a suitable DNA damage biomarker for human biomonitoring of exposed workers. *Environ Mol Mutagen* 9: 781-790
- Castillo-Cadena J, Tenorio-Vieyra LE, Quintana-Carabia AI, García-Fabila MM, Juan ER, Madrigal-Bujaidar E (2006) Determination of DNA damage in floriculturists exposed to mixtures of pesticides. *J Biomed Biotechnol* 2006: 1-12
- Chauhan LKS, Pant N, Gupta SK, Srivastava SP (2000) Induction of chromosome aberrations, micronucleus formation and sperm abnormalities in mouse following carbofuran exposure. *Mutat Res* 465: 123–129
- Collins AR (2004) The comet assay for DNA damage and repair (principles, application and limitations). *Mol Biol* 26: 249–261
- Collins AR (2009) Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. *Mutat Res* 681: 24-32
- Cremer M, Küpper K, Wagler B, Wizelman L, von Hase J, Weiland Y, Kreja L, Diebold J, Speicher MR, Cremer T (2003) Inheritance of gene density–related higher order chromatin arrangements in normal and tumor cell nuclei. *J Cell Biol* 162: 809-820
- Council Directive 91/414/EEC of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the market, *Official Journal of the European Union*, L 230, 19.8.1991. (Last amended 1.8.2011)
- Coskun M, Coskun M, Cayir A, Ozdemir O (2011) Frequencies of micronuclei (MNi), nucleoplasmic bridges (NPBs), and nuclear buds (NBUDs) in farmers exposed to pesticides in Çanakkale, Turkey. *Environ Int* 37: 93–96
- Costa C, Silva S, Neves J, Coelho P, Costa S, Laffon B, Snawder J, Teixeira JP (2011) Micronucleus Frequencies in Lymphocytes and Reticulocytes in a Pesticide-Exposed Population in Portugal. *J Toxicol Environ Health A* 74: 960-970
- Cox C, Sorgan M (2006) Unidentified Inert Ingredients in Pesticides: Implications for Human and Environmental Health, *Environ Health Perspec* 114: 1803-1806
- El-Zein RA, Fenech M, Lopez MS, Spitz MR, Etzel CJ (2008) Cytokinesis-blocked micronucleus cytome assay biomarkers identify lung cancer cases amongst smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17: 1111-1119
- Dang CV, O'Donnell KA, Zeller KI, Nguyen T, Osthus RC, Li F (2006) The c-myc target gene network. *Semin Cancer Biol* 16: 253-264

- DeLancey JL, Alavanja MCR, Coble J, Blair A, Hoppin JA, Austin HD, Beane Freeman LE (2009) Occupational exposure to metribuzin and the incidence of cancer in the Agricultural Health Study. *Ann Epidemiol* 19: 388-395
- Dich J, Hoar Zahm S, Hanberg A, Adami H-O (1997) Pesticides and cancer. *Cancer Causes Control* 8: 420-443
- Directive 2009/128/ec of the european parliament and of the council establishing a framework for Community action to achieve the sustainable use of pesticides Official Journal of the European Union, L 309/71, 24.11.2009.
- Dimitrov BD, Gadeva PG, Benova DK, Bineva MV (2006) Comparative genotoxicity of the herbicides Roundup, Stomp, and Reglone in plant and mammalian test systems. *Mutagenesis* 21: 375–382
- Environmental Protection Agency (1993) Glyphosate (CASRN 1071-83-6).
- Environmental Protection Agency (1996) Glyphosate - Tolerance Petition 12/96. 61: 248
- Environmental Protection Agency (2006) Interim Reregistration Eligibility Decision Carbofuran. 1-44
- Environmental Protection Agency (1995a) Integrated Risk Information System Database Glyhosate. 10-14
- Environmental Protection Agency (1995b) Reregistration Eligibility Decision (RED): Terbutylazine 738-R-95-005
- Ennaceur S, Ridha D, Marcos R (2008) Genotoxicity of the organochlorine pesticides 1,1-dichloro-2,2- bis(p-chlorophenyl)ethylene (DDE) and hexachlorobenzene (HCB) in cultured human lymphocytes. *Chemosphere* 71: 1335-1339
- FAOStat, dostupno na:<http://faostat.fao.org/site/424/DesktopDefault.aspx?PageID=424#ancor> zadnji puta pristupljeno 14. studenog 2011.
- Felix CA, Kolaris CP, Osheroff N (2006) Topoisomerase II and the ethiology of chromosomal translocations. *DNA Repair* 5: 1093–1108
- Fenech M (2006) Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutat Res* 600: 58–66
- Fenech M (2007) Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc* 2: 1084-1104
- Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E (2003) HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res* 534: 65–75

- Gao W, Mady HH, Melhem MF, Keohavong P (2009) Analysis of p53 mutations in histologically normal lung tissues and lung tumors from non-small cell lung cancer patients. *Mol Carcinog* 48: 633-641
- Garaj-Vrhovac V, Zeljezic D (2002) Assessment of genome damage in a population of Croatian workers employed in pesticide production by chromosomal aberration analysis, micronucleus assay and Comet assay. *J Appl Toxicol* 22: 249-255
- Gardner L, Lee L, Dang C (2002) c-Myc protooncogene. *U: Bertino JR (ed.) Encyclopedia of Cancer*. Elsevier Science, Maryland, 555-561
- Gartel AL, Shchors K (2003) Mechanisms of c-myc-mediated transcriptional repression of growth arrest genes. *Exp Cell Res* 283: 17-21
- Gasnier C, Dumont C, Benachour N, Clair E, Chagnon MC, Séralini GE (2009) Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology* 262: 184-191
- Gebel T, Kevekordes S, Pav K, Edenharder R, Dunkelberg H (1997) In vivo genotoxicity of selected herbicides in the mouse bone-marrow micronucleus test. *Arch. Toxicol* 71: 193–197
- Gisselsson D, Pettersson L, Hoglund M, Heidenbland M, Gorunova L, Wiegant J, Mertens F, Dal Cin P, Mitelman F, Mandahl M (2000) Chromosomal breakagefusion-bridge events cause genetic intratumor heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 5357–5362
- Guilherme S, Gaivão I, Santos MA, Pacheco M (2010) European eel (*Anguilla anguilla*) genotoxic and pro-oxidant responses following short-term exposure to Roundup-- a glyphosate-based herbicide. *Mutagenesis* 25: 523-530
- Halliwell B (1999) Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. *Mutat Res* 443: 37-52.
- Hando JC, Nath J, Tucker JD (1994) Sex chromosomes, micronuclei and aging in women. *Chromosoma* 103: 186–192
- Hardell L, Eriksson M, Nordstrom M (2002) Exposure to pesticides as risk factor for non-Hodgkin's lymphoma and hairy cell leukemia: pooled analysis of two Swedish case-control studies. *Leuk Lymphoma* 43: 1043–1049
- Harris CC, Hollstein M (1993) Clinical implications of the p53 tumor suppressor gene. *N Engl J Med* 329: 1318-1327

- Hoar Zahm S, Weisenburger DD, Cantor KP, Holmes FF, Blair A (1993) Role of the herbicide atrazine in the development of non-Hodgkin's lymphoma. *Scand J Work Environ Health* 19: 108–114
- Hock AK, Vigneron AM, Carter S, Ludwig RL, Vousden KH (2011) Regulation of p53 stability and function by the deubiquitinating enzyme USP42. *EMBO J.* 30: 4921-4930
- Hoffman GR (1996) Genetic toxicology. U: Klaasen CD, Doull J, Admur MO (eds), Casaret and Doull's Toxicology-The Basic Science of Poisons. McGraw-Hill, New York, 269-300
- Hoover S (2007) Occupational Health Hazard Risk Assessment Project For California: Identification of Chemicals of Concern, Possible Risk Assessment Methods, and Examples of Health Protective Occupational Air Concentrations. Californian Environmental Health Agency 130
- Hosny G, Farahat N, Hainaut P (2009) TP53 mutations in circulating free DNA from Egyptian patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Lett* 275: 234-239
- Høyer AP, Gerdes AM, Jørgensen T, Rank F, Hartvig HB (2002) Organochlorines, p53 mutations in relation to breast cancer risk and survival. A Danish cohort-nested case-controls study. *Breast Cancer Res Treat* 71: 59-65
- Iourov IY, Soloviev IV, Vorsanova SG, Monakhov VV, Yurov YB (2005) An Approach for Quantitative Assessment of Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Signals for Applied Human Molecular Cytogenetics. *J Histochem Cytochem* 53: 401–408
- Jackson DA, Dickinson P, Cook PR (1990) The size of chromatin loops in HeLa cells. *EMBO J.* 9: 567-571
- Jonnalagadda PR, Jahan P, Venkatasubramanian S, Khan I, Prasad A, Reddy K, Rao M, Venkaiah K, Hassan Q (2011) Genotoxicity in agricultural farmers from Guntur district of South India--A case study. *Hum Exp Toxicol* DOI: 10.1177/0960327111408151 u tisku.
- Kamata H, Mitani S, Fujiwara M, Aoki N, Okada S, Mori S (2007) Mutation of the p53 tumour suppressor gene and overexpression of its protein in 62 Japanese non-Hodgkin's lymphomas. *Clin Exp Med* 7: 39-46
- Kang D, Park SK, Beane-Freeman LE, Lynch CF, Knott CE, Sandler DP, Hoppin JA, Dosemeci M, Coble J, Lubin J, Blair A, Alavanja M (2008) Cancer incidence among pesticide applicators exposed to trifluralin in the Agricultural Health Study. *Environ Res* 107: 271–276
- Kehdy FS, Cerqueira EM, Bonjardim MB, Camelo RM, Castro MC (2007) Study of the cytogenetic effects of occupational exposure to pesticides on sanitation workers in Belo Horizonte, Brazil. *Genet Mol Res* 6: 581-593

- Kidd H, James DR (1991) *The Agrochemicals Handbook*. 3<sup>rd</sup> edn. Royal Society of Chemistry Information Services, Cambridge, UK
- Kinoshita A, Wanibuchi H, Wei M, Fukushima S (2006) Hormesis in Carcinogenicity of Non-genotoxic Carcinogens. *J Toxicol Pathol* 19: 111-122
- Kisby GE, Muniz JF, Scherer J, Lasarev MR, Koshy M, Kow YW, McCauley L (2009) Oxidative stress and DNA damage in agricultural workers. *J Agromedicine* 14: 206-214
- Klapper W, Stoecklein H, Zeynalova S, Ott G, Kosari F, Rosenwald A, Loeffler M, Trumper L, Pfreundschuh M, Siebert R (2008) Structural aberrations affecting the MYC locus indicate a poor prognosis independent of clinical risk factors in diffuse large B-cell lymphomas treated within randomized trials of the German High-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma Study Group (DSHNHL). *Leukemia* 22: 2226–2229
- Knöbel Y, Weise A, Gleis M, Sendt W, Claussen U, Pool-Zobel BL (2007) Ferric iron is genotoxic in non-transformed and preneoplastic human colon cells. *Food Chem Toxicol* 45: 804-811
- Kourakis A, Mouratidou M, Barbouti A, Dimikiotou M (1996) Cytogenetic effects of occupational exposure in the peripheral blood lymphocytes of pesticide sprayers. *Carcinogenesis* 17: 99-101
- Koutros S, Beane Freeman LE, Berndt SI, Andreotti G, Lubin JH, Sandler DP, Hoppin JA, Yu K, Li Q, Burdette LA, Yuenger J, Yeager M, Alavanja MC (2010) Pesticide use modifies the association between genetic variants on chromosome 8q24 and prostate cancer. *Cancer Res* 70: 9224-9233
- Kumaravel TS, Bristow RG (2005) Detection of genetic instability at HER-2/neu and p53 loci in breast cancer cells using Comet-FISH. *Breast Cancer Res Treat* 91: 89-93
- Kumaravel TS, Vilhar B, Faux SP, Jha AN (2009) Comet Assay measurements: a perspective. *Cell Biol Toxicol* 25: 53-64
- Levin NA, Brzoska P, Gupta N, Minna JD, Gray JW, Christman MF (1994) Identification of Frequent Novel Genetic Alterations in Small Cell Lung Carcinoma. *Cancer Res* 54: 5086-5091
- Lindberg HK, Wang X, Järventus H, Falck GCM, Norppa H, Fenech M (2007) Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. *Mutat Res* 617: 33–45
- Loyant V, Jaffré A, Breton J, Baldi I, Vital A, Chapon F, Dutoit S, Lecluse Y, Loiseau H, Lebailly P, Gauduchon P (2005) Screening of TP53 mutations by DHPLC and

- sequencing in brain tumours from patients with an occupational exposure to pesticides or organic solvents. *Mutagenesis* 20: 365–373
- Li AP, Long TJ (1988) An evaluation of the genotoxic potential of glyphosate. *Fundam Appl Toxicol* 10: 537–546
- Lioi MB, Scarfi MR, Santoro A, Barbieri R, Zeni O, Salvemini F, Di Berardino D, Ursini MV (1998) Cytogenetic damage and induction of pro-oxidant state in human lymphocytes exposed in vitro to glyphosate, vinclozolin, atrazine and DPX-E9636. *Environ Mol Mutagen* 32: 39–46
- Lynch SM, Mahajan R, Beane Freeman LE, Hoppin JA, Alavanja MCR (2009) Cancer incidence among pesticide applicators exposed to butylate in the Agricultural Health Study. *Environ Res* 109: 860-868
- Lucero L, Pastor S, Suárez S, Durbán R, Gómez C, Parrón T, Creus A, Marcos R. (2000) Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells. *Mutat Res* 464: 255–262
- Maire MA, Rast C, Landkocz Y, Vasseur P (2007) 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid: effects on Syrian hamster embryo (SHE) cell transformation, c-Myc expression, DNA damage and apoptosis. *Mutat Res* 631: 124-136
- Mañas F, Peralta L, Raviolo J, Ovando HG, Weyers A, Ugnia L, Cid MG, Larripa I, Gorla N (2009a) Genotoxicity of glyphosate assessed by the comet assay and cytogenetic tests. *Environ Toxicol Pharmacol* 28: 37-41
- Mañas F, Peralta L, Raviolo J, Ovando HG, Weyers A, Ugnia L, Cid MG, Larripa I, Gorla N (2009b) Genotoxicity of AMPA, the environmental metabolite of glyphosate, assessed by the Comet assay and cytogenetic tests. *Ecotoxicol Environ Saf* 72: 834–837
- Maynard S, Schurman SH, Harboe C, de Souza-Pinto NC, Bohr VA (2009) Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. *Carcinogenesis* 30: 2–10
- Matter B, Schmid W (1971) Trenimon-induced chromosomal damage in bone-marrow cells of six mammalian species, evaluated by the micronucleus test. *Mutat Res* 12: 417-425
- Milatovic D, Gupta RC, Dekundy A, Montine TJ, Dettbarn WD (2005) Carbofuran-induced oxidative stress in slow and fast skeletal muscles: prevention by memantine and atropine. *Toxicology* 208: 13–24
- Miller CW, Simon K, Aslo A, Kok K, Yokota J, Buys CH (1992) p53 mutations in human lung tumors. *Cancer Res* 52: 1695–1698

- Mladinic M, Berend S, Lucic Vrdoljak A, Kopjar N, Radic B, Zeljezic D (2009a) Evaluation of genome damage and its relation to oxidative stress induced by glyphosate in human lymphocytes in vitro. *Environ Mol Mutagen* 50: 800-807
- Mladinic M, Perkovic P, Zeljezic D (2009b) Characterization of chromatin instabilities induced by glyphosate, terbuthylazine and carbofuran using cytome FISH assay. *Toxicol Lett* 189: 130-137
- Mladinic M, Zeljezic D, Shaposhnikov, SA, Collins, AR (2012) The use of FISH-comet to detect *c-Myc* and *TP 53* damage in extended-term lymphocyte cultures treated with terbuthylazine and carbofuran. *Toxicol Lett* 211: 62-69
- Modesto KA, Martinez CBR (2010) Roundup causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* 78: 294–299
- Monroy CM, Cortés AC, Sicard DM, de Restrepo HG (2005) Cytotoxicity and genotoxicity of human cells exposed in vitro to glyphosate. *Biomedica* 25: 335–345
- Muller J, Decordier I, Hoet PH, Lombaert N, Thomassen L, Huaux F, Linson D, Kirsh-Volders M (2008) Clastogenic and aneugenic effects of multi-wall carbon nanotubes in epithelial cells. *Carcinogenesis* 29: 427-433
- Naravaneni R, Jamil K (2005) Cytogenetic biomarkers of carbofuran toxicity utilizing human lymphocyte cultures in vitro. *Drug Chem Toxicol* 28: 359–372
- Norppa H, Falck GCM (2003) What do human micronuclei contain? *Mutagenesis* 18:221–233
- Obe G, Pfeiffer P, Savage JRK, Johannes C, Gödecke W, Jeppesen P, Natarajan AT, Martínez-López W, Folle GA, Drets ME (2002). Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. *Mutat Res* 504: 17–36
- Nath J, Tucker JD, Hando JC (1995) Y chromosome aneuploidy, micronuclei, kinetochores and aging in men. *Chromosoma* 103: 725–731
- Nusbaum C, Mikkelsen TS, Zody MC, Asakawa S, Taudien S, Garber M, Kodira CD, Schueler MG, Shimizu A, Whittaker CA, Chang JL, Cuomo CA, Dewar K, FitzGerald MG, Yang X, Allen NR, Anderson S, Asakawa T, Blechschmidt K, Bloom T, Borowsky ML, Butler J, Cook A, Corum B, DeArellano K, DeCaprio D, Dooley KT, Dorris L 3rd, Engels R, Glöckner G, Hafez N, Hagopian DS, Hall JL, Ishikawa SK, Jaffe DB, Kamat A, Kudoh J, Lehmann R, Lokitsang T, Macdonald P, Major JE, Matthews CD, Mauceli E, Menzel U, Mihalev AH, Minoshima S, Murayama Y, Naylor JW, Nicol R, Nguyen C, O'Leary SB, O'Neill K, Parker SC, Polley A, Raymond CK, Reichwald K, Rodriguez J, Sasaki T, Schilhabel M, Siddiqui R, Smith CL, Sneddon TP, Talamas JA, Tenzin

- P, Topham K, Venkataraman V, Wen G, Yamazaki S, Young SK, Zeng Q, Zimmer AR, Rosenthal A, Birren BW, Platzer M, Shimizu N, Lander ES (2006) DNA sequence and analysis of human chromosome 8. *Nature* 439: 331-335
- Olive PL (1989) Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in Chinese hamster V79 spheroids. *Radiat Res* 117: 79-92
- Orsi L, Delabre L, Monnereau A, Delval P, Berthou C, Fenaux P, Marit G, Soubeyran P, Huguet F, Milpied N, Leporrier M, Hemon D, Troussard X, Clavel J (2009) Occupational exposure to pesticides and lymphoid neoplasms among men: results of a French case-control study. *Occup Environ Med* 66: 291-298
- Östling O, Johanson KJ (1984) Microelectric study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123: 291-298
- Papadopoulos N, Gikas E, Zalidis G, Tsarbopoulos A (2007) Simultaneous determination of terbuthylazine and its major hydroxy and dealkylated metabolites in wetland water samples using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *J Agric Food Chem* 55: 7270–7277
- Park E, Glei M, Knöbel Y, Pool-Zobel BL (2007) Blood mononucleocytes are sensitive to DNA damaging effects of iron overload - in vitro and ex vivo results with human and rat cells. *Mutat Res* 619: 59-67
- Pastor S, Creus A, Parrón T, Cebulska-Wasilewska A, Siffel C, Piperakis S, Marcos R (2003) Biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides: use of micronuclei as biomarkers. *Mutagenesis* 18: 249–258
- Pastor S, Lucero L, Gutiérrez S, Durbán R, Gómez C, Parrón T, Creus A, Marcos R. (2002) A follow-up study on micronucleus frequency in Spanish agricultural workers exposed to pesticides. *Mutagenesis* 17: 79-82
- Prody C, Dreyfus P, Zamir R, Zakut H, Soreq H (1989) Denovoamplification within a ‘silent’ human cholinesterase gene in a family subjected to prolonged exposure to organophosphorous insecticides. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 690–694
- Raap AK (1998) Advances in fluorescence in situ hybridization. *Mutat Res* 400: 287-298
- Riley T, Sontag E, Chen P, Levine A (2008) Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 402–412
- Rubin L (1996) Selected commercial formulations of glyphosate - ACCORD, RODEO, ROUNDUP and ROUNDUP PRO Risk Assessment Final report. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, 1-159



- Rull RP, Gunier R, Von Behren J, Hertz A, Crouse V, Buffler PA, Reynolds P (2009) Residential proximity to agricultural pesticide applications and childhood acute lymphoblastic leukemia. *Environ Res* 109: 891–899
- Rusiecki JA, Hou L, Lee WJ, Blair A, Dosemeci M, Lubin JH, Bonner M, Samanic C, Hoppin JA, Sandler DP, Alavanja MCR (2009) Cancer incidence among pesticide applicators exposed to metolachlor in the Agricultural Health Study. *Int J Cancer* 118: 3118–3123
- Schaeferhenrich A, Beyer-Sehlmeyer G, Festag G, Kuechler A, Haag N, Weise A, Liehr T, Claussen U, Marian B, Sendt W, Scheele J, Pool-Zobel BL (2003) Human adenoma cells are highly susceptible to the genotoxic action of 4-hydroxy-2-nonenal. *Mutat Res* 526: 19-32
- Human adenoma cells are highly susceptible to the genotoxic action of 4-hydroxy-2-nonenal. *Mutat Res* 526: 19-32
- Shaposhnikov S, Frengen E, Collins AR (2009) Increasing the resolution of the comet assay using fluorescent in situ hybridization--a review. *Mutagenesis* 24: 383-389
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175: 184-191
- Siwicki JK, Hedberg Y, Nowak R, Lodén M, Zhao J, Landberg G, Roos G (2000) Long-term cultured IL-2-dependent T cell lines demonstrate p16(INK4a) overexpression, normal pRb/p53, and upregulation of cyclins E or D2. *Exp Gerontol* 35: 375-388
- Smith EA, Oehme FW (1992) The biological activity of glyphosate to plants and animals; a literature review. *Vet Hum Toxicol* 34: 531–543
- Soloneski S, Reigosa MA, Molinari G, González NV, Larramendy ML (2008) Genotoxic and cytotoxic effects of carbofuran and furadan on Chinese hamster ovary (CHOK1) cells. *Mutat Res* 656: 68–73
- Steenland K, Cedillo L, Tucker J, Hines C, Sorensen K, Deddens J, Cruz V (1997) Thyroid hormones and cytogenetic outcomes in backpack sprayers using ethylenebis (dithiocarbamate) (EBDC) fungicides in Mexico. *Environ Health Perspect* 105: 1126-1130
- Surrallés J, Falck G, Norppa H (1996a) In vivo cytogenetic damage revealed by FISH analysis of micronuclei in uncultured human T lymphocytes. *Cytogenet Cell Genet* 75: 151–154
- Surrallés J, Jeppesen P, Morrison H, Natarajan AT (1996b) Analysis of loss of inactive X chromosomes in interphase cells. *Am J Hum Genet* 59: 1091–1096
- Surrallés J, Sebastian S, Natarajan AT (1997) Chromosomes with high gene density are preferentially repaired in human cells. *Mutagenesis* 12: 437-442

- Tao L, Li Y, Wang W, Kramer PM, Gunning WT, Lubet RA, Steele VE, Pereira MA (2002) Effect of budesonide on the methylation and mRNA expression of the insulin-like growth factor 2 and c-myc genes in mouse lung tumors. *Mol Carcinog* 35: 93-102
- Teodoro JG, Evans SK, Green MR (2007) Inhibition of tumor angiogenesis by p53: a new role for the guardian of the genome. *J Mol Med (Berl)* 85: 1175-1186
- Usmani KA, Hodgson E, Rose RL (2004) In vitro metabolism of carbofuran by human, mouse, and rat cytochrome P450 and interactions with chlorpyrifos, testosterone, and estradiol. *Chem Biol Interact* 150: 221–232
- Van Bemmelen DM, Visvanathan K, Beane Freeman LE, Coble J, Hoppin JA, Alavanja MCR (2008) S-ethyl-N,N-dipropylthiocarbamate exposure and cancer incidence among male pesticide applicators in the agricultural health study. *Environ Health Perspect* 116: 1541-1556
- Van Maele-Fabry G, Duhayon S, Mertens C, Lison D (2008) Risk of leukaemia among pesticide manufacturing workers: A review and meta-analysis of cohort studies. *Environ Res* 106: 121–137
- Wang X, Thomas P, Xue J, Fenech M (2004) Folate deficiency induces aneuploidy in human lymphocytes in vitro-evidence using cytokinesis-blocked cells and probes specific for chromosomes 17 and 21. *Mutat Res* 551: 167–180
- Yee KS, Vousden KH (2005) Complicating the complexity of p53. *Carcinogenesis* 26: 1317–1322
- Zeljezic D, Garaj Vrhovac V (2001) Chromosomal aberration and single-cell gel electrophoresis (comet) assay in longitudinal risk assessment of occupational exposure to pesticides. *Mutagenesis* 16: 359-363
- Zheng T, Zahm SH, Cantor KP, Weisenburger DD, Zhang Y, Blair A (2001) Agricultural exposure to carbamate pesticides and risk of non-hodgkin lymphoma. *Occup Environ Med* 43: 641-649
- Zhou P, Liu B, Lu Y (2005) DNA damaging effects of carbofuran and its main metabolites on mice by micronucleus test and single cell gel electrophoresis. *Sci China C Life Sci* 48 Suppl. 1: 40–47
- Zody MC, Garber M, Adams DJ, Sharpe T, Harrow J, Lupski JR, Nicholson C, Searle SM, Wilming L, Young SK, Abouelleil A, Allen NR, Bi W, Bloom T, Borowsky ML, Bugalter BE, Butler J, Chang JL, Chen CK, Cook A, Corum B, Cuomo CA, de Jong PJ, DeCaprio D, Dewar K, FitzGerald M, Gilbert J, Gibson R, Gnerre S, Goldstein S, Grafham DV, Grocock R, Hafez N, Hagopian DS, Hart E, Norman CH, Humphray

S, Jaffe DB, Jones M, Kamal M, Khodiyar VK, LaButti K, Laird G, Lehoczky J, Liu X, Lokyitsang T, Loveland J, Lui A, Macdonald P, Major JE, Matthews L, Mauceli E, McCarroll SA, Mihalev AH, Mudge J, Nguyen C, Nicol R, O'Leary SB, Osoegawa K, Schwartz DC, Shaw-Smith C, Stankiewicz P, Steward C, Swarbreck D, Venkataraman V, Whittaker CA, Yang X, Zimmer AR, Bradley A, Hubbard T, Birren BW, Rogers J, Lander ES, Nusbaum C (2006) DNA sequence of human chromosome 17 and analysis of rearrangement in the human lineage. *Nature* 440: 1045-1049

## **6. Znanstveni radovi**

## **7. ŽIVOTOPIS**

**EUROPEAN  
CURRICULUM VITAE  
FORMAT**



**OSOBNİ PODACI**

Ime i prezime	<b>Marin Mladinić</b>
Adresa	Palčiči 2, 10257 Brezovica
Telefon	01 4682 500
Telefaks	01 4673 303
Elektronička pošta, Web adresa	mmladinic@imi.hr
Državljanstvo	Hrvatsko
Datum rođenja	22.06.1983.
Matični broj iz Upisnika znanstvenika	296725

**RADNO ISKUSTVO**

• Datumi (od – do)	20.07.2007 -
Ustanova zaposlenja	Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada
Naziv radnog mjesta	Znanstveni novak, asistent
Funkcija	Suradnik na projektu
Područje rada	Humana genetička toksikologija, biomonitoring populacija profesionalno izloženih, pesticidima i ionizirajućem zračenju, istraživanje genotoksičnog učinka pesticida, citostatika u uvjetima <i>ex vivo</i> na limfocitima čovjeka te u uvjetima <i>in vivo</i> na različitim organima miševa.
Metode rada	Fluorescencijska <i>in situ</i> hibridizacija, vitalna bojanja stanica, analiza strukturnih oštećenja kromosoma, analiza izmjena sestrinskih kromatida, mikronukleus test, komet tehnika, dugotrajne kulture limfocita, FISH-komet

**ŠKOLOVANJE**

Datum	2001-2006.
Mjesto	Zagreb
Ustanova	Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Zvanje	Diplomirani inženjer biologije
Datum	2007-
Mjesto	Zagreb
Ustanova	Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Zvanje:	student doktorskog studija

**USAVRŠAVANJE**

Godina	2008.
Mjesto	Stockholm, Švedska
Ustanova	Karolinska Institutet
Područje	Procjena rizika na zdravlje

Godina	2009.
Mjesto	Barcelona, Španjolska
Ustanova	Department of Genetics and Microbiology, Universitat Autònoma de Barcelona
Područje	Mjerenje DNK oštećenja i poravka u ljudskim populacijama i uzgojenim stanicama

Godina	2010.
Mjesto	Oslo, Norveška
Ustanova	School of Medicine, University of Oslo
Područje	Flourescencijska in situ hibridizacija spojena s komet testom

#### NASTAVNA DJELATNOST

Godina	2011.
Kolegij	Praktična nastava iz kolegija "Metode molekularne biologije u medicini"
Ustanova	Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Studij	Doktorski

#### SURADNJA NA ZNANSTVENIM PROJEKTIMA

Godina	2007-
Financijer	Ministarstvo znanosti, obrazovanja i športa RH
Projekt	Genotoksičnost fizikalnih i kemijskih agensa prirodnog i antropogenog podrijetla
Svojstvo	Suradnik

Godina	2009-
Financijer	Bilateralna suradnja s Republikom Srbijom
Projekt	Aneugeni učinci i pojava aneuploidnosti u limfocitima periferne krvi kao posljedica profesionalne izloženosti pesticidima
Svojstvo	Suradnik

#### OSOBNE VJEŠTINE I KOMPETENCIJE

Materinji jezik	Hrvatski
-----------------	----------

#### Strani jezici

Jezik	<b>Engleski</b>
Govori	Izvršno
Piše	Izvršno
Čita	Izvršno

Jezik	<b>Njemački</b>
Govori	Dobro
Piše	Dobro
Čita	Dobro

ORGANIZACIJSKE VJEŠTINE I KOMPETENCIJE	Član Organizacijskoj odbora 4. hrvatski toksikološki kongres s međunarodnom sudjelovanjem
---	---

**NAGRADE I PRIZNANJA**

2009 - Godišnja nagrada mladim znanstvenicima i umjetnicima za znanstveni doprinos iz područja biologije Društva sveučilišnih profesora i drugih znanstvenika

**RECENZENTSKA AKTIVNOST**

Časopisi u CC: Regulatory Pharmacology and Toxicology, Journal of Soils and Sediments

**POPIS PUBLIKACIJA**

## 1. Poglavlja u knjizi s međunarodnom recenzijom:

1. Zeljezic D., Mladinic M., Novel approaches in genetic toxicology of pesticides applying fluorescence in situ hybridization technique, In: Pesticides: the impact of pesticide exposure, Stoycheva M. (Ed.), InTech, Rijeka-Wien, pp. 277-302, 2011.

2. Izvorni znanstveni radovi u znanstvenim časopisima s međunarodnom recenzijom koji se referiraju u selektivnim tercijarnim publikacijama **Current Contents (CC)**:

1. Petek M.J., Berend S., Kopjar N., Zeljezic D., Mladinic M., Radic B., Lucic Vrdoljak A., Tenocyclidine treatment in soman-poisoned rats - intriguing results on genotoxicity versus protection, *Acta Biochimica Polonica*, 55(1), 97-105, 2008.
2. Lucić Vrdoljak A., Berend S., Želježić D., Žegarac-Piljac J., Pleština S., Kuča K., Radić B., Mladinić M., Kopjar N., Irinotecan side effects relieved by the use of hi-6 oxime: in vivo experimental approach, *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 105(6), 401-409, 2009.
3. Brzovic V., Miletic I., Zeljezic D., Mladinic M., Kasuba V., Ramic S., Anic I., In vitro genotoxicity of root canal sealers, *International Endodontic Journal*, 42, 253-263, 2009.
4. Mladinic M., Perkovic P., Zeljezic D., Characterization of chromatin instabilities induced by glyphosate, terbuthylazine and carbofuran using cytome FISH assay, *Toxicology Letters*, 189, 130-137, 2009.
5. Mladinic M., Berend S., Lucic Vrdoljak A., Kopjar N., Radic B., Zeljezic D., Evaluation of genome damage and its relation to oxidative stress induced by glyphosate in human lymphocytes in vitro, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 50, 800-807, 2009.
6. Zeljezic D., Lucic Vrdoljak A., Lucas J.N., Lasan R., Fucic A., Kopjar N., Katic J., Mladinic M., Radic B., Effect of occupational exposure to multiple pesticides on translocation yield and chromosomal aberrations in lymphocytes of plant workers, *Environmental Science & Technology*, 43, 6370-6377, 2009.
7. Mladinic M., Kopjar N., Milic M., Buljevic Dasovic A., Huzak M., Zeljezic D., Genomic instability in a healthy elderly population: a pilot study of possible cytogenetic markers related to ageing, *Mutagenesis*, 25(5), 455-462, 2010.
8. Leljak-Levanić D., Ježić M., Cesar V., Ludwig-Müller J., Lepeduš H., Mladinić M., Katić M., Curković-Perica M., Biochemical and epigenetic changes in phytoplasma-recovered periwinkle after indole-3-butyric acid treatment. *Journal of Applied Microbiology*, 109 (6), 2069-2078, 2010.
9. Pavlica M., Stambuk A., Malović L., Mladinić M., Klobučar GI., DNA integrity of chub erythrocytes (*Squalius cephalus* L.) as an indicator of pollution-related genotoxicity in the River Sava. *Environmental Monitoring and Assessment*, 177(1-4), 85-94, 2011.



10. Baraba A., Zelježić D., Kopjar N., Mladinić M., Anić I., Miletić I., Evaluation of cytotoxic and genotoxic effects of two resin-based root-canal sealers and their components on human leucocytes in vitro. *International Endodontic Journal* 44, 652-661, 2011.
  11. Mihaljević Z., Ternjej I., Stanković I., Ivković M., Zelježić D., Mladinić M., Kopjar N., Assessment of genotoxic potency of sulfate-rich surface waters on medicinal leech and human leukocytes using different versions of the Comet assay. *Ecotoxicol and Environmental Safety*, 74, 1416-1426, 2011.
  12. Trosic I., Pavicic I., Milkovic-Kraus S., Mladinic M., Zeljezic D., Effect of electromagnetic radiofrequency radiation on the rats' brain, liver and kidney cells measured by comet assay. *Collegium Antropologicum* 35, 1259-1264, 2011.
  13. Rogulj D., Konjevoda P., Milić M., Mladinić M., Domijan AM., Fatty liver index as an indicator of metabolic syndrome. *Clinical Biochemistry*, 45, 68-71, 2012.
  14. Baričević M., Ratkaj I., Mladinić M., Zelježić D., Kraljević SP., Lončar B., Stipetić MM., In vivo assessment of DNA damage induced in oral mucosa cells by fixed and removable metal prosthodontic appliances. *Clinical Oral Investigations*, 16, 325-331, 2012.
  15. Mladinic M., Zeljezic D., Shaposhnikov SA., Collins AR., The use of FISH-comet to detect *c-Myc* and *TP 53* damage in extended-term lymphocyte cultures treated with terbuthylazine and carbofuran. *Toxicology Letters*, DOI: 10.1016/j.toxlet.2012.03.001, u tisku.
3. Izvorni **znanstveni radovi** u znanstvenom časopisu s međunarodnom recenzijom koji se referira u **WOS - Science Citation Index Expanded (SCIE)**:
1. Bogović A., Nižetić J., Galić N., Zelježić D., Micek V., Mladinić M., The effects of hyaluronic acid, calcium hydroxide, and dentin adhesive on rat odontoblasts and fibroblasts. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 62, 155-161, 2011.
4. Izvorni znanstveni rad objavljen u **zborniku radova**:
1. Veber D., Prejac J., Želježić D., Mladinić M., Terzić D., Ivičić N., Kopjar N., Momčilović B., Training induced oxidative damage in professional soccer players, *Proceedings Book, 5<sup>th</sup> International Scientific Conference on Kinesiology*, Hrvatska, Zagreb, 10-14, 2008.
5. Sažeci objavljeni u časopisima s međunarodnom recenzijom koji se referiraju u **Current Contents (CC)**:
1. Berend S., Vrdoljak-Lucić A., Radić B., Piljac-Žegarac J., Mladinić M., Želježić D., Kopjar N., Is an oxidative capacity of HI-6 oxime a key factor to improve the therapy with irinotecan?, *Toxicol Lett*, 180S, S151, 2008.
  2. Mladinić M., Želježić D., Assessment of oxidative DNA damage by glyphosate applying hOGG1 modified comet and micronucleus assay, *Toxicol Lett*, 180S, S170, 2008.

3. Želježić D., Vrdoljak-Lucić A., Fučić A., Mladinić M., Berend S., Radić B., Kopjar N., Frequencies of stable and unstable chromosomal aberrations in lymphocytes of workers employed in carbamate production, *Toxicol Lett*, 180S, S177, 2008.
  4. Mladinić M., Kopjar N., Milić M., Dasović D., Želježić D., Translocation yield and its distribution among chromosomes 1, 2 and 4 in healthy elderly population, *Chromosome Research*, 17 (Suppl 1), S100, 2009.
  5. Flajs D., Zeljezic D., Mladinic M., Peraica M., Effects of citrinin treatment on oxidative stress in rat kidney, *Toxicology Letters*, 196S, S239, 2010.
  6. Mladinic M., Zeljezic D., Effect of terbuthylazine on human chromatin integrity evaluated by cytome fish assay in vitro, *Toxicology Letters*, 196S, S316, 2010.
  7. Peraica M., Flajs D., Mladinic M., Zeljezic D., Eror DB., Koepsell H., Sabolic I., Oxidative stress and Na(+)-glucose cotransporters Sgl1 and Sgl2 in kidneys of ochratoxin A-treated rats, *Toxicology Letters*, 205S, S275, 2011.
  8. Flajs D., Mladinic M., Zeljezic D., Peraica M., Citrinin potentiates ochratoxin A toxicity, *Toxicology Letters*, 205S, S220-S221, 2011.
  9. Mladinic M., Zeljezic D., Shaposhnikov SA., Collins AR., Effect of carbofuran on C-Myc gene in extended-term cultures of human lymphocytes evaluated by comet-FISH, *Toxicology Letters*, 205S, S232, 2011.
6. Stručni rad u časopisu s recenzijom, koji se referira u selektivnim tercijarnim publikacijama **(WOS - Science Citation Indeks Expanded)**:
1. Kopjar N., Kašuba V., Milić M., Rozgaj R., Želježić D., Gajski G., Mladinić M., Garaj-Vrhovac V., Normalne i granične vrijednosti mikronukleus-testa na limfocitima periferne krvi u ispitanika opće populacije republike hrvatske, *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 61(2), 219-234, 2010.
7. Sažeci objavljeni u **zborniku sažetaka s međunarodnog** znanstvenog skupa:
1. Pavlica M., Štambuk A., Mladinić M., Malović L., Klobučar GIV., DNA integrity of chub erythrocytes (*Leuciscus cephalus* L.) as an indicator of pollution-related genotoxicity in river Sava. 38th Annual Meeting, Environmental mutagens and human health, Abstract Book, Cavtat, Croatia, 117, 2008.
  2. Jezic M., Leljak-Levanić D., Ludwig-Müller J., Mladinić M., Katić M., Čurković Perica M., Differential host DNA methylation might be the cause of phytoplasma elimination upon the treatment with auxins. 21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops, Book of Abstracts, Neustadt,

Germany, 84, 2009.

3. Milic M., Angelini S., Rozgaj R., Kopjar N., Zeljezic D., Mladinic M., Kasuba V., Lyzbicky B., Hrelia P., Influence of vitamin B12, folic acid and polymorphysm in folic acid methabolic pathway on DNA stability in lymphocytes from workers occupationally exposed to low levels of ionizing radiation, 10<sup>th</sup> International Conference on Environmental Mutagens, Program and Abstracts, Florence, Italy, 155, 2009.
  4. Berend S., Lucić Vrdoljak A., Mladinić M., Želježić D., Radić B., Evaluation of glyphosate's ability to induce oxidative stress, 7th Congress of the Toxicology in Developing Countries, Book of Abstracts, Sun City, South Africa, 119, 2009.
  5. Lucić Vrdoljak A., Berend S., Kopjar N., Mladinić M., Želježić D., Lovrić J., The assessment of genotoxicity of a newly synthesized atropine-4-oxime on human lymphocytes in vitro, 7th Congress of the Toxicology in Developing Countries, Book of Abstracts, Sun City, South Africa, 142, 2009.
  6. Trosic I., Pavicic I., Milkovic-Kraus S., Mladinic M., Zeljezic D., Extent of DNA damage in rat's kidney, liver and brain after GSM electromagnetic radiation, 6th International Workshop on Biological Effects of Electromagnetic Fields, Abstract Book, Bodrum, Turkey, 105, 2010.
8. Sažeci objavljeni u **zborniku sažetaka s domaćeg** znanstvenog skupa:
1. Kopjar N., Lucić Vrdoljak A., Želježić D., Berend S., Mladinić M., Radić B., Evaluation of photogrnotoxic potency of dicarbazine in vitro., 10th Croatian Biological Congress with International Participation, Proceeding of Abstracts, Hrvatska, Osijek, 273, 2009.
  2. Jezic M., Leljak-Levanić D., Ludwig-Müller J., Mladinić M., Katić M., Čurković Perica M., Differential DNA methylation of the host genome might be the cause of phytoplasma elimination in periwinkle shoots grown in vitro upon the treatment with auxins. 10<sup>th</sup> Croatian Biological Congress, Proceeding of Abstracts, Osijek, Hrvatska, 32, 2009.