

Genotoksični učinci insekticida klorpirifosa, imidakloprida i α -cipermetrina i herbicida terbutilazina, glifosata i tembotriona u uvjetima in vitro i in vivo

Mužinić, Vedran

Doctoral thesis / Disertacija

2021

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:461703>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Vedran Mužinić

**GENOTOKSIČNI UČINCI INSEKTICIDA
KLORPIRIFOSA, IMIDAKLOPRIDA I α -
CIPERMETRINA I HERBICIDA
TERBUTILAZINA, GLIFOSATA I
TEMBOTRIONA U UVJETIMA *IN VITRO* I
*IN VIVO***

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2020.



University of Zagreb

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

Vedran Mužinić

**GENOTOKSIČNI UČINCI INSEKTICIDA
KLORPIRIFOSA, IMIDAKLOPRIDA I α -
CIPERMETRINA I HERBICIDA
TERBUTILAZINA, GLIFOSATA I
TEMBOTRIONA U UVJETIMA *IN VITRO* I
*IN VIVO***

DOKTORSKI RAD

Mentori:

Davor Želježić, Vilena Kašuba

Zagreb, 2020.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Vedran Mužinić

**GENOTOXIC EFFECTS OF
INSECTICIDES CHLORPYRIFOS,
IMIDACLOPRID AND α -CYPERMETHRIN
AND HERBICIDES TERBUTHYLAZINE,
GLYPHOSATE AND TEMBOTRIONE *IN
VITRO AND IN VIVO***

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:

Davor Želježić, Vilena Kašuba

Zagreb, 2020.

Ovaj je doktorski rad izrađen u Jedinici za mutagenezu Instituta za Medicinska istraživanja i medicinu rada, pod vodstvom dr. sc. Davora Želježića, znan. savj. tr. zv. i dr. sc. Vilene Kašube, znan. savj. tr. zv., u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Prof.dr.sc. Davor Želježić, dipl.inž.biologije, znanstveni svjetnik u trajnom zvanju bavi se istraživanjima u području genetičke toksikologije kemijskih spojeva iz životnog i radnog okoliša, te na unaprijeđenje postojećih citogenetičkih i molekularnih metoda. Područja istraživanja mu uključuju mehanizme djelovanja genotoksičnih spojeva kao što su pesticidi, stomatološki kompoziti, korjenski ispuni i stakleni monomeri, djelovanje teških metala i ionizirajućeg zračenja na staničnom nivou, kao i genotoksičnost različitih agensa u profesionalno izloženoj populaciji. Istraživanja provodi u uvjetima *in vitro* na različitim vrstama stanica, te u uvjetima *in vivo* na krvi i tkivima laboratorijskih životinja.

Prof. Želježić bio je voditelj i/ili su-voditelj u izradi doktorata i diplomskih radova; u svojstvu predavača sudjeluje u nastavi na Odjelu za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci i na Stomatološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Od 2011-2014.godine sudjelovao je u svojstvu savjetnika na međunarodnom znanstvenom projektu “Cell cycle aberrations and effect of oxidative stress on neurodegenerative processes and malignant transformation” Sveučilišta u Beogradu, Srbija. Od 2014 -2018. godine bio je voditelj HRZZ projekta OPENTOX (Broj: 8366). Od 2014.godine suradnik je na HRZZ projektu “Adverse effects of single and combined mycotoxins produced by Aspergilli” voditeljice Prof. dr.sc. Maje Šegvić Klarić, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Član je stručne radne grupe za metode testiranja toksičnosti Odbora zemalja članica europske agencije za kemikalije (ECHA) i Stručne radne skupine za enzime u hrani Europske agencije za sigurnost hrane (EFSA).

Član je Uredničkog odbora časopisa BioMed Research International i dopredsjednik Hrvatskog toksikološkog društva. Do sada je **kao autor i/ili ko-autor objavio 208 znanstvenih radova, od toga 121 citiran u CC.**

Dr.sc. Vilena Kašuba, dipl.inž.biologije, znanstvena savjetnica u trajnom zvanju aktivno se bavi znanstveno istraživačkim i stručnim radom u području genetičke toksikologije na projektima MZOS RH, a u razdoblju od 2002-2005. i od 2007-2013.godine bila je voditeljica projekata (“Genotoksičnost prirodnih i antropogenih agensa” i “Genotoksičnost kemijskih i fizikalnih agensa prirodnog i antropogenog podrijetla”). Od 2014-2018.godine bila je suradnica na HRZZ projektu OPENTOX (Broj:8366), voditelja Prof.dr.sc. Davora Želježića.

Istraživački rad dr. Kašuba uključuje istraživanje mehanizama djelovanja i učinaka na genom različitih genotoksičnih spojeva, anestetika, citostatika, teških metala (kadmij, olovo, živa), pesticida, stomatoloških kompozita i korjenskih ispuna, i ionizirajućeg zračenja na staničnom nivou, kao i učinaka dugotrajne izloženosti genotoksičnim agensima kod profesionalno izložene populacije,

Do sada je **kao autor i/ili ko-autor objavila 104 znanstvena rada, od toga je 57 rad citiran u CC.**

Ovaj doktorski rad ne bi bio izrađen bez pomoći mnogih dragih ljudi

Hvala od srca...

Davoru, na sistematičnom pristupu provjeri svakog detalja znanstvenog rada, na pomoći u izradi rada, ali i na iskazanom povjerenju u mene i uvijek dobrodošlom bodrenju i ohrabrivanju u radu

Vileni, na beskrajnoj i nesebičnoj pomoći, provjeri, podršci, susretljivosti i dobroj volji u svakom trenutku :)

Nevenki, na nesebičnoj pomoći u uređivanju teksta

Anji i mojem imenjaku, na pomoći sa pokusima in vivo i dobroj volji

ostalim zaposlenicima Jedinice za mutagenezu i Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada

mojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci, pogotovo Dariji

mojoj prijateljici Maji na moralnoj podršci i uvijek dobroj volji :)

te ostalim prijateljima i prijateljicama na vječnoj prisutnosti uz mene i pitanjima o konačnoj obrani koja su definitivno ubrzala proces nastanka ove disertacije :D

Sveučilište u Zagrebu

Doktorski rad

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

GENOTOKSIČNI UČINCI INSEKTICIDA KLORPIRIFOSA, IMIDAKLOPRIDA I α -CIPERMETRINA I HERBICIDA TERBUTILAZINA, GLIFOSATA I TEMBOTRIONA U UVJETIMA *IN VITRO* I *IN VIVO*

VEDRAN MUŽINIĆ

Jedinica za mutagenezu, Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada

Ksaverska cesta 2, 10 000 Zagreb

Pesticidi su iznimno važni kemijski spojevi, međutim, odavno je poznato da štetno djeluju i na ne ciljane organizme, uključujući i čovjeka. Genotoksičnost se očituje remećenjem strukture i funkcije DNA te je povezana s razvojem malignih bolesti. Stoga smo odlučili istražiti genotoksični učinak često korištenih pesticida u niskim razinama od značaja za ljudsku izloženost. Genotoksičnost insekticida klorpirifosa, imidakloprida i α -cipermetrina te herbicida glifosata, terbutilazina i tembotriona u uvjetima *in vitro* smo ispitali alkalnim komet testom, mikronukleus testom i analizom razdiobe kromosoma 18, 9, X i Y. Genotoksičnost α -cipermetrina i tembotriona u uvjetima *in vivo* ispitali smo alkalnim komet testom na gravidnim i doječim štakoricama soja Wistar i njihovim neizravno izloženim mladuncima. Pesticidi su u uvjetima *in vitro* djelovali izraženije aneugenim mehanizmom. Tembotrion je pokazao izraženiji genotoksični učinak u odnosu na α -cipermetrin u odraslim štakoricama. Povišenje oštećenja DNA u mladuncima upućuje na mogući prijelaz oba pesticida preko placente, te tembotriona preko majčinog mlijeka.

104 stanice, 32 slike, 9 tablica, 250 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: ne-ciljana toksičnost, klastogenost, aneugenost, biopesticidi, transplacentarno, translaktacijski

Mentori: dr. sc. Davor Želježić znan. savj. tr. zv., dr. sc. Vilena Kašuba, znan. savj. tr. zv.

Ocjenjivači: prof. dr. sc. Vesna Benković, znan. savj.

prof. dr. sc. Mirjana Pavlica, znan. savj.

izv. prof. dr. sc. Feodora Stipoljev, viši znan. surad.

University of Zagreb

Doctoral thesis

Faculty of Science

Department of Biology

**GENOTOXIC EFFECTS OF INSECTICIDES CHLORPYRIFOS, IMIDACLOPRID
AND α -CYPERMETHRIN AND HERBICIDES TERBUTHYLAZINE, GLYPHOSATE
AND TEMBOTRIONE *IN VITRO* AND *IN VIVO***

VEDRAN MUŽINIĆ

Mutagenesis unit, Institute for medical research and occupational medicine

Ksaverska cesta 2, 10 000 Zagreb

Pesticides are exceptionally important chemical compounds, however, it has been known they can have harmful effects on non-target species, including humans. Genotoxicity is manifested by disruption of structure and function of DNA, and is associated with development of malign diseases. Therefore, we decided to examine the genotoxic effect of commonly used pesticides at low levels of importance to human exposure. We analyzed the *in vitro* genotoxicity of insecticides chlorpyrifos, imidacloprid, α -cypermethrin and herbicides glyphosate, terbuthylazine and tembotrione via alkaline comet assay, micronucleus assay as well as chromosome 18, 9, X, and Y segregation analysis. We analyzed the genotoxicity of α -cypermethrin and tembotrione *in vivo* by alkaline comet assay in gestating and lactating Wistar rat dams as well as their indirectly exposed offspring. The pesticides have effected mostly by aneugenic mechanism *in vitro*. Tembotrione showed more pronounced genotoxic effect compared to α -cypermethrin in dams. Elevation of DNA damage in offspring suggests possible transplacental transfer for both pesticides, as well as translactational transfer for tembotrione.

104 pages, 32 figures, 9 tables, 250 references, original in Croatian

Keywords: non-target toxicity, clastogenicity, aneugenicity, biopesticides, transplacental, translactational

Supervisors: Davor Želježić, Ph.D., Vilena Kašuba, Ph.D.

Reviewers: professor Vesna Benković, Ph.D.

professor Mirjana Pavlica, Ph.D.

associate professor Feodora Stipoljev, Ph.D.

SADRŽAJ

1.UVOD	1
1.1. Definicija pesticida.....	1
1.2. Potrošnja pesticida.....	1
1.3. Podjela pesticida.....	1
1.4. Povijest primjene pesticida.....	2
1.5. Štetni učinci pesticida po okoliš.....	4
1.6. Održiva poljoprivreda i biopesticidi.....	5
1.7. Svojstva ispitivanih pesticida.....	7
1.7.1. Klorpirifos.....	7
1.7.2. Imidaklopid.....	9
1.7.3. α -cipermetrin.....	11
1.7.4. Glifosat.....	13
1.7.5. Terbutilazin.....	14
1.7.6. Tembotrion.....	16
1.8. Genetička toksikologija i genotoksičnost.....	18
1.9. Metode detekcije genotoksičnosti.....	19
1.9.1. Alkalni komet test.....	19
1.9.2. Mikronukleus test.....	21
1.9.3. Fluorescencijska hibridizacija <i>in situ</i>	25
1.10. Primjeri povezanosti izloženosti pesticidima i pojave oštećenja DNA.....	26
2. OBRAZLOŽENJE TEME I CILJEVI ISTRAŽIVANJA	28
3. MATERIJALI, ISPITANICI, ŽIVOTINJE I METODE	31
3.1. Istraživanja u uvjetima <i>in vitro</i>	31

3.1.1. Materijali.....	31
3.1.2. Ispitanici.....	36
3.1.3. Metode.....	36
3.1.3.1. Tretmani pune krvi pesticidima.....	36
3.1.3.2. Alkalni komet test u uvjetima <i>in vitro</i>	37
3.1.3.3. Mikronukleus test.....	39
3.1.3.4. FISH.....	40
3.2. Istraživanja u uvjetima <i>in vivo</i>	42
3.2.1. Materijali.....	42
3.2.2. Laboratorijske životinje.....	43
3.2.2.1. Podrijetlo i uzgoj životinja.....	43
3.2.2.2. Oplodnja ženki i raspodjela u skupine.....	44
3.2.3. Metode.....	44
3.2.3.1. Doze pesticida.....	44
3.2.3.2. Tretmani životinja.....	45
3.2.3.3. Alkalni komet test u uvjetima <i>in vivo</i>	46
3.3. Statističke metode.....	48
4. REZULTATI.....	50
4.1. Istraživanja u uvjetima <i>in vitro</i>	50
4.1.1. Alkalni komet test.....	50
4.1.2. Mikronukleus test.....	56
4.1.3. FISH analiza razdiobe kromosoma.....	63
4.2. Istraživanja u uvjetima <i>in vivo</i>	70
4.2.1. Alkalni komet test na odraslim štakoricama.....	70

4.2.2. Alkalni komet test na mladuncima.....	78
5. RASPRAVA.....	91
6. ZAKLJUČCI.....	103
7. POPIS LITERATURE.....	105
Životopis autora.....	130

1. UVOD

1.1. Definicija pesticida

Pesticidi su spojevi ili mješavine spojeva koji se koriste za suzbijanje ili odvrćanje štetnika od biljaka i životinja koje se uzgajaju u prehrambene svrhe tijekom proizvodnje, prerade, prijevoza i skladištenja istih, u prehrambene svrhe te suzbijanje štetnika u kućanstvu i na domaćim životinjama (Anwar, 1997; WHO, 2020). Na razini Europske unije (EU) postoji podjela s obzirom na mjesto primjene na sredstva za zaštitu bilja (engl. *plant protection products* - PPP), te na biocidne proizvode (engl. *biocidal products* - BP). Proizvodi za zaštitu bilja se koriste u poljoprivredi i vrtlarstvu, dok se biocidi koriste u javnom zdravstvu za dezinfekciju, dezinfekciju i deratizaciju. Obje skupine sadržavaju i spojeve drugačijeg djelovanja poput biljnih hormona, te sredstava za zaštitu površine, drva, vlakana, kože, gume, polimeriziranih materijala, građevinskih materijala i druge (EU, 2012). Pesticidi kao konačni proizvodi koji se nalaze na tržištu i primjenjuju u poljoprivredi i kućanstvu sastoje se od dviju glavnih komponenata; djelatne i inertne. Djelatnu komponentu čine jedna ili više kemijskih tvari odgovornih za toksični učinak po neželjene organizme, dok inertnu komponentu čine tvari koje pospješuju stabilnost i djelovanje aktivne komponente prvenstveno čineći je topivom u vodi, olakšavajući njezin ulazak u organizam, prijenos na mjesto djelovanja u organizmu pa i pojačavajući sinergistički njezin toksični učinak (Cox i Sorgan, 2006).

1.2 Potrošnja pesticida

Prema podacima FAOStata na globalnoj razini je 2017. utrošeno oko 4 milijuna tona djelatnih tvari pesticidnog djelovanja, od čega najviše u Kini, SAD-u i Brazilu. Na razini EU najviše pesticida utrošeno je u Francuskoj, Španjolskoj i Italiji. U Hrvatskoj je 2017. godine utrošeno oko 1500 tona pesticida, od čega najviše čine fungicidi i baktericidi (oko 46%), potom herbicidi (oko 43%), insekticidi (oko 7%), dok ostatak čine regulatori rasta biljaka i rodenticidi. Na tržištu EU se nalazi oko 500 različitih odobrenih djelatnih tvari (EK, 2020).

1.3. Podjela pesticida

Najjednostavnija podjela pesticida je s obzirom na ciljane štetne organizme. Tako se razlikuju insekticidi koji djeluju protiv štetnih kukaca, miticidi i akaricidi protiv paučnjaka i uši, baktericidi protiv bakterija, virucidi protiv virusa, fungicidi protiv gljivica, herbicidi protiv korova, nematicidi protiv oblića, moluscidi protiv mekušaca, piskicidi protiv riba, avicidi protiv ptica, te rodenticidi protiv glodavaca (Sharma i sur., 2019).

Pesticide je također moguće podijeliti i po kemijskoj strukturi na elementarne tvari, anorganske spojeve, organoklorine, organofosfate, karbamate, triazole, triazine, piretroide, formamidine, neonikotinoide, derivate ureje i sulfonilureje, fenoksi spojeve, aromatske kiseline, aniline ili anilide, piridine, kvaterne spojeve, triketone i druge (Gonçalves i sur., 2020).

Nadalje je pesticide moguće podijeliti i prema mehanizmu djelovanja. Tako insekticidi mogu djelovati kao inhibitori acetilkolinesteraze, agonisti i antagonisti nikotinskih receptora, agonisti i antagonisti receptora γ -aminomaslačne kiseline (GABA), regulatori natrijevih kanala, antagonisti oktopaminskih receptora, inhibitori respiracije, inhibitori rasta i želučani otrovi (Sanchez-Bayo, 2012). Herbicidi mogu djelovati kao inhibitori biosinteze masnih kiselina, aminokiselina, karotenoida, klorofila, celuloze, mitoze, fotosistema I ili II te kao mimetici auksina (Duke, 1990), dok fungicidi mogu djelovati kao inhibitori biosinteze membrana, masnih kiselina i aminokiselina, nukleinskih kiselina, respiracije, prijenosa signala i inhibitori mitoze (Yang i sur., 2011).

1.4. Povijest primjene pesticida

S prelaskom čovječanstva s nomadskog na sjedilački način života pojavom poljoprivrede pojavila se i potreba kontrole štetnika radi očuvanja prinosa i prevencije gladi. Kroz većinu vremena postojanja ljudske civilizacije metode kontrole štetnika oslanjale su se na lako dostupne prirodne tvari mineralnog, biljnog ili životinjskog podrijetla. Tako su drevni Sumerani koristili sumpor za suzbijanje kukaca, a u drevnoj Kini su korišteni živa i arsen protiv uši. Za odbijanje plijesni i kukaca od kultivara korišten je i dim spaljene slame, riba, rakova ili balege. Natrijev klorid i morska voda su korišteni za suzbijanje korova, iako su korovi uglavnom kontrolirani ručnim pljevenjem. Podanak kukurijeka (*Helleborus niger*) u antičkoj Grčkoj i Rimu je korišten kao rodenticid, ali i emetik, abortiv te u terapiji mentalnih poremećaja (Johnson, 1999). Tijekom srednjeg vijeka križari su u Europu donijeli ekstrakt osušenih cvjetnih glavica buhača (*Pyrethrum Cinerariaefolium*) koji se u Perziji od davnina koristio za zaštitu uskladištenog žita (Unsworth, 2010). Nikotin kao glavni sastojak ekstrakta duhana od 1690. godine se koristio kao insekticid (Tomizawa i Casida, 2005). Nakon Drugog svjetskog rata počinju se koristiti sintetski pesticidi čije strukture su proizvod laboratorijskih istraživanja i sintetske organske kemije. Diklorodifeniltrikloroetan (DDT), izvorno nastao kao nusprodukt u proizvodnji azo boja se od 1940ih godina koristio kao insekticid. Zahvaljujući značajnom doprinosu u suzbijanju širenja malarije upotrebom DDT-a, Paul Muller, koji je otkrio njegovo

insekticidno djelovanje nagrađen je Nobelovom nagradom 1948 (Jarman i Ballschmiter, 2012). Ubrzo nakon otkrića i primjene DDT-a, započelo je korištenje i drugih organoklornih pesticida poput aldrina, dieldrina, endrina, toksafena, klordana, lindana, mireksa i klordekona. Također na tržište u upotrebu ulaze i organofosforni (npr. paration, malation, fention, dimetoat, klorpirifos) i karbamatni insekticidi (karbaril, karbofuran, aldikarb) koji djeluju kao inhibitori kolinesteraza. Prvi herbicidi selektivnog djelovanja na širokolisne korove bili su derivati fenoksi kiselina koji djeluju kao mimetici auksina, poput 2,4-dikloro- i 2,4,5-triklorofenoksioktene kiseline (2,4-D odnosno 2,4,5-T). Ubrzo je uslijedio razvitak i pojava na tržištu triazinskih (atrazin, simazin, terbutilazin, terbutrin, prometon) i bipiridinskih herbicida (parakvat i dikvat). Usporedno na tržište ulaze ditiokarbamatni (tiram, maneb, zineb), ftalimidni (kaptan, folpet, kaptofol), ftalonitrilni (klorotalonil) i benzimidazolni fungicidi (tiabendazol) (Morton i Staub, 2008). Zahvaljujući svojoj niskoj cijeni, povećanoj učinkovitosti i djelovanju protiv širokog spektra štetnika dolazi do dotada neviđenog povećanja potrošnje pesticida; npr. u SAD-u je između 1945. i 1955. godišnja proizvodnja sintetskih pesticida porasla s približno 15 tisuća tona na približno 230 tisuća tona (Ridgway i sur., 1978), dok je do 2012. taj broj porastao do približno 3 milijuna tona (USEPA, 2017). Od 1970-ih godina, djelom zbog zabrana primjene organoklornih insekticida na globalnoj razini, dolazi do razvoja pesticida selektivnijeg djelovanja i smanjene učestalosti primjene. Tako su razvijeni piretroidni (aletrin, resmetrin, permetrin, cipermetrin, ciflutrin) i neonikotinoidni insekticidi (imidakloprid, tiametoksam, acetamiprid). Među herbicidima u upotrebu ulaze glifosat, glufosinat, dinitroanilini (pendimetalin) sulfonilureje i imidazolinoni, a kod fungicida vodeću ulogu preuzimaju inhibitori sinteze biosterola (propikonazol, fenarimol, fenpropimorf, triflumizol) uz druge fungicide (metalaksil, karbendazim, cimoksanil) (Morton i Staub, 2008). U najnovije vrijeme pristupa se korištenju pesticida na kultivarima koji su genetski modificirani da pokazuju rezistenciju na pesticid, te razvoju novih aktivnih tvari temeljenima na prirodno prisutnim spojevima poput tirketonskih herbicida (sulkotrion, mesotrion, tembotrion).

1.5. Štetni učinci pesticida po okoliš

Iako je već tijekom sredine 20. stoljeća bio poznat određeni rizik štetnih učinaka na zdravlje pri rukovanju insekticidima, uslijed gospodarskog uspjeha i izobilja hrane šira javnost nije razmišljala o pesticidima kao o štetnim tvarima. Međutim, ubrzo se pojavljuju dokazi da pesticidi mogu imati dalekosežnije nepovoljne učinke na okoliš i ne-ciljane vrste uključujući i čovjeka. Američka biologinja Rachel Carson izdala je 1962. godine knjigu *Silent Spring* u kojoj upozorava na brojne štetne učinke organoklornih, ali i organofosfornih insekticida kao posljedica njihovog pretjeranog korištenja. Navedeni štetni učinci su uključivali postojanost u okolišu, pokretljivost daleko od mjesta primjene, toksičnost na ne-ciljanim životinjskim vrstama poput najupečatljivije smanjenja populacija ptica uslijed feminizacije mužjaka, ali i na čovjeku. Kao rezultat osvješćivanja i senzibilizacije javnosti na štetne učinke pesticida početkom 1970ih godina zabranjena je upotreba DDT-a, a kasnije i ostalih organoklornih insekticida, što je doprinijelo razvoju kasnijih pesticida. Organoklorini insekticidi vrlo se sporo razgrađuju i mogu ostati prisutni u tlu i sedimentu (Burns i sur., 1975) desecima i više godina nakon primjene zbog čega se smatraju postojanim organskim onečišćivačima. Studijama je potvrđeno da DDT, lindan i njemu srodni izomeri heksaklorocikloheksana (HCH) mogu biti nošeni vjetrom, vodom daleko od mjesta primjene (Zhulidov i sur., 2000) i kišom (Pearce i sur., 1978), čak i do arktičkih područja (Jin i sur., 2017). Za DDT (Portmann, 1975), metil paration (De La Vega Salazar i sur., 1997), lindan, HCH i heptaklor (Lu i Wang, 2002) dokazano je svojstvo bioakumulacije, odnosno nakupljanja u organizmu iz okoliša. Metaboliti pojedinih pesticida pokazuju veću postojanost u odnosu na izvorni spoj, poput karbofurana nastalog biotransformacijom karbosulfana u zebrici (*Danio rerio*) (Cui i sur., 2019). Također, pojedini pesticidi, poput α - i β -endosulfana pokazuju svojstvo biomagnifikacije nakupljajući se kroz hranidbeni lanac u svakoj sljedećoj karici u većoj koncentraciji (Morris i sur., 2016) te u posljednjoj od karika prehrambenog lanca, a to je često čovjek, mogu izazvati i akutni toksični učinak (Chakraborty i Das, 2016). Zbog izrazite lipofilnosti organoklorini insekticidi završavaju u masnom tkivu viših kralježnjaka (Mrema i sur., 2013). Toksično djelovanje pesticida zabilježeno je na raznim životinjskim vrstama. Bifentrin, ciflutrin, permetrin i klorpirifos smanjuju preživljenje i ometaju rast i pokretljivost beskralježnjaka (Hasenbein i sur., 2015). Insekticid lufenuron, derivat ureje, djeluje štetno po ribe (Soares i sur., 2016). Organoklorini insekticidi su poznati i po stanjenju ljuske jajeta ptica grabljivica čime ugrožavaju njihov opstanak kao vrste (Hickey i Anderson, 1968). Pesticidi, poput 2,4-D, deltametrina, acefata i atrazina mogu djelovati kao hormonski otrovi, ometajući sintezu, izlučivanje i djelovanje

hormona (Mnif i sur., 2011). Naposljetku, mnogi pesticidi pokazuju sposobnost prijenosa preko posteljice i majčinog mlijeka, negativno djelujući na razvoj i razvitak ploda, tako iskazujući svojstvo reproduktivne toksičnosti i teratogenosti (Mamane i sur., 2015; von Ehrenstein i sur., 2019).

1.6. Održiva poljoprivreda i biopesticidi

Unatoč štetnim učincima, značajna gospodarska važnost pesticida na globalnoj razini je glavni razlog zbog kojeg ih ne možemo u potpunosti izuzeti iz upotrebe. Ta gospodarska važnost očituje se u dva segmenta. Prvi je socioekonomski koji proizlazi iz proizvodnje i prodaje pesticida kao gospodarske grane koja osigurava veliki broj radnih mjesta i stvara ekonomsku dobit. Drugi se očituje u mogućnosti proizvodnje većeg prinosa biljnih i životinjskih proizvoda koji se koriste u prehrani, a kroz što se ponovno osigurava otvaranje novih radnih mjesta i prihod od prodaje sirovih ili obrađenih proizvoda. Kako bi se spriječilo da toksične aktivne tvari budu korištene u proizvodnji, preradi i skladištenju poljoprivrednih proizvoda stavljanje aktivnih tvari na tržište je na razini EU regulirano uredbom 528/2012 za biocidne tvari te uredbom 2009/128/EC za tvari za zaštitu bilja. Ujedno, Europski parlament (EP) je usvojio tematsku strategiju o održivoj upotrebi pesticida (EP 2009), čiji je cilj maksimalno smanjenje štetnih učinaka pesticida na ljudsko zdravlje i okoliš uz istovremenu upotrebu što je niže moguće količina pesticida nužnih za potrebnu zaštitu kultivara. Jedna od mjera kojima se to želi postići je poticanje na zamjenu starijih aktivnih pesticidnih tvari sigurnijim tvarima manje štetnima za ljudsko zdravlje i okoliš.

Biopesticidi su aktivne pesticidne tvari koje su sekundarni metaboliti mikroorganizmima i/ili odvedenijih biljaka, a koje biljke sintetiziraju kako bi se štitile od štetnika te za sebe osigurale prednost u crpljenju nutrijenata iz tla te dopiranje sunčeve svjetlosti pa čak i kočenjem rasta okolnih biljaka iz drugih porodica (Chandler i sur., 2011). Primjer su insekticidni piretrini iz ekstrakta buhača (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) te leptospermon iz ekstrakta četkovca (*Callistemon citrinus*). Međutim, nedostatak većine prirodno prisutnih tvari su preuzak spektar djelovanja na štetnike i nestabilnost pod utjecajem sunčeve svjetlosti. Zbog toga se pristupa razvoju polusintetskih tvari poboljšane stabilnosti i šireg spektra djelovanja. Primjeri takvih tvari su piretroidi, neonikotinoidi te triketonski herbicidi. Međutim, u zemljama slabijeg standarda, toksični učinci uslijed izlaganja starijim vrstama pesticida poput organofosfornih predstavljaju značajan rizik za zdravlje ljudi (Jaga i Dharmani, 2006).

Održiva i konzervacijska poljoprivreda su skupovi smjernica u poljoprivredi čiji je cilj održavanje prirodnih procesa zaslužnih za dugoročno dovoljan prinos hrane i njegovu ekonomsku isplativost. Jedna od tih smjernica je održavanje bioraznolikosti populacija poljoprivredno korisnih kukaca i bilja. Sukladno tome nije dozvoljena upotreba starijih vrsta pesticida širokog spektra djelovanja i toksičnih učinaka na okoliš i zdravlje ljudi (SAN, 2011). Biopesticidi se zbog svojeg prirodnog podrijetla smatraju manje štetnima za okoliš i neciljane vrste uključujući i čovjeka (Sullivan, 2015). Stoga je za kontrolu štetnika u sklopu održive i konzervacijske poljoprivrede dozvoljena upotreba novijih vrsta pesticida poput biopesticida ili zelenih pesticida koji mogu biti sintetske odvedenice biopesticida, i to u točno određenim niskim količinama radi prevencije razvijanja rezistencije štetnika.

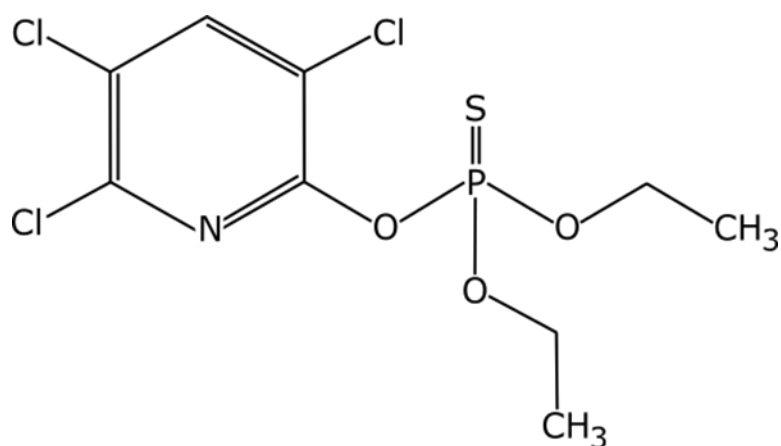
U okviru izrade doktorske disertacije odlučili smo istražiti i usporediti genotoksični učinak po tri insekticida i herbicida, od onih starije generacije koji se koriste dugi niz godina (klorpirifos kao insekticid i terbutilazin kao herbicid) do onih novijih koji su sami biocidi poput herbicida tembotriona ili odvedenica biocida poput insekticida α -cipermetrina. O djelatnim tvarima koje su tema ove disertacije više će biti govora u nastavku.

1.7. Svojstva ispitivanih pesticida

1.7.1. Klorpirifos

Dietoksi-sulfaniliden(3,5,6-trikloropiridin-2-il)-oksi- λ 5-fosfan (klorpirifos) (Slika 1) pripada skupini organofosforinih insekticida. Uveden je na tržište 1965. godine (Eaton i sur., 2008), a na razini EU je zabranjen od 2015. godine, sa očekivanim povlačenjem iz upotrebe po pojedinim zemljama članicama do 2020. Zbog svoje lipofilnosti se u okolišu pretežno adsorbira na čestice tla i sedimenta i ne smatra se vodenim onečišćivalom. Zbog umjerene hlapljivosti nakon primjene odlazi u atmosferu kojom može putovati umjereno daleko od mjesta primjene (60-120 km). Podliježe reakcijama fotolize, hidrolize i reakcijama sa slobodnim radikalima prisutnima u atmosferi, zbog čijih kratkih poluvremena se ne smatra postojanim onečišćivalom (Solomon i sur., 2014). Apsorbira se brzo i potpuno iz probavnog trakta sisavaca (Abdel-Gawad i Tata, 2011). Metabolička razgradnja događa se brzo nakon apsorpcije i uključuje oksidaciju u klorpirifos-okson, hidrolizu na 3,5,6-trikloro-2-piridinol (TCP) i dietilfosfat, te nepromijenjenog dijela klorpirifosa na TCP i dietilditiofosfat. U štakorima je poluvrijeme eliminacije iz organizma izvornog spoja i metabolita između 8 i 17 h. Izlučuje se pretežno urinom u obliku metabolita i manjim dijelom fecesom. Dermalna bioraspoloživost u ljudi je izrazito manja od oralne, sa sporijom eliminacijom urinom što ukazuje na zadržavanje u koži ili je odraz manje bioraspoloživosti (Meuling i sur., 2005). Mehanizam djelovanja u štetnicima, ali i ne-ciljanim organizmima očituje se u inhibiciji enzima acetilkolinesteraze. Taj enzim je nužan za razgradnju neurotransmitora acetilkolina. Njegovom inhibicijom dolazi do nakupljanja acetilkolina u živčanim sinapsama i trajnog podraživanja neurona. Kao posljedica istog razvija se kolinergični sindrom karakteriziran povećanom salivacijom, lakrimacijom, bronhokonstrikcijom, paralizom i smrću. Receptori za acetilkolin, osim na neuronima postoje i na mnogim drugim stanicama poput limfocita (Fujii i sur., 2017; Wessler i Kirkpatrick, 2009). Limfociti nakon stimulacije antigenima sintetiziraju i otpuštaju acetilkolin koji se potom veže na receptore na drugim limfocitima gdje sudjeluje u imunom odgovoru (Kawashima i Fujii, 2003). Vežanje acetilkolina uzrokuje povećanje intracelularne koncentracije kalcija i promjene u genskoj ekspresiji (Kawashima i Fujii, 2003). Smatra se da receptori za acetilkolin sudjeluju u diferencijaciji i citotoksičnosti efektorskih limfocita (Fujii i sur., 2017). Inervacija limfnih čvorova, timusa i slezene omogućuje komunikaciju između živčanog i imunološkog sustava i posljedičnu prilagodbu imunološkog sustava na podražaje vanjskog okoliša (Kerage i sur., 2019). Klorpirifos uzrokuje poremećaj u kognitivnom razvoju izraženo kao smanjenje kvocijenta inteligencije djece izložene prenatalno (Rauh i sur., 2011). Istraživanja u uvjetima

in vivo na mužjacima štakora upućuju na reproduktivnu toksičnost poput smanjenja razine testosterona u serumu i broja spermija (Li i sur., 2019), te smanjenja razine testosterona, luteinizirajućeg hormona (LH) i folikularno stimulirajućeg hormona (FSH) u serumu sa smanjenom pokretljivošću i brojem spermija (Peiris i Dhanushka, 2017). Profesionalna izloženost klorpirifosu povezuje se sa smetnjom disanja (Hoppin i sur., 2006). Kod štakora akutna oralna smrtna doza pri kojoj umire 50% životinja (LD_{50} , engl. lethal dose) iznosi između 96 i 475 mg/kg tj.m., dok razina pri kojoj ne dolazi do štetnih učinaka (NOAEL, engl. *no observed adverse effect level*) iznosi 0,1 mg/kg tj.m./dan (FAO i sur., 1999). Prihvatljivi dnevni unos (ADI, engl. *acceptable daily intake*) iznosi 0,01 mg/kg tj.m./dan, prihvatljiva razina izloženost radnika (AOEL, engl. *acceptable operator exposure level*) 0,01572 mg/kg tj.m./dan, a procijenjena razina izloženosti stanovništva (REL, engl. *residential exposure level*) 0,374 μ g/kg tj.m./dan (USEPA, 2011).

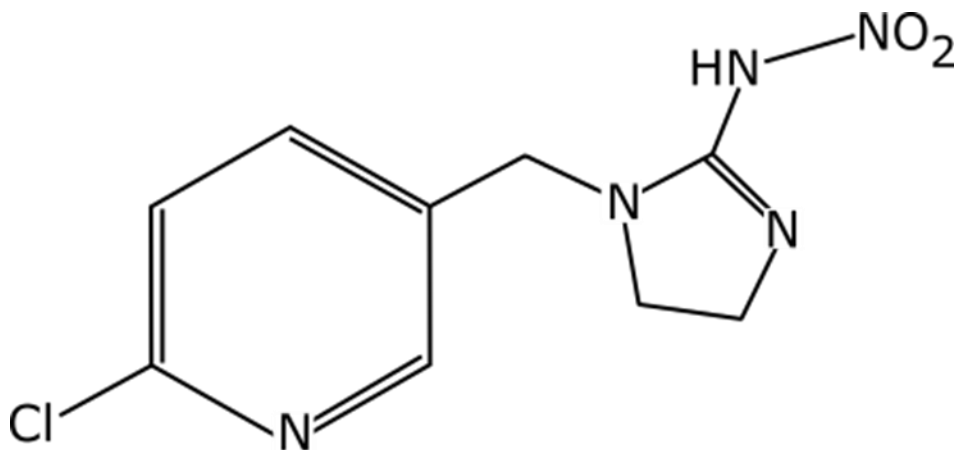


Slika 1. Kemijska struktura dietoksi-sulfaniliden(3,5,6-trikloropiridin-2-il)-oksi- λ 5-fosfana ($C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$).

1.7.2. Imidaklopid

N-[1-[(6-kloropiridin-3-il)metil]imidazolidin-2-iliden]nitramid (imidaklopid) (Slika 2) pripada skupini neonikotinoidnih insekticida. U prometu se nalazi od 1992. godine (Mikolić i Brčić-Karačunji, 2018). Poput ostalih neonikotinoida imidaklopid je sintetska izvedenica nikotina prirodno prisutnog u duhanu. Na razini EU mu je odobrena primjena isključivo u trajnim staklenicima. Na površini tla i u dubljim slojevima je umjereno postojan s poluvremenom fotolize i hidrolize oko mjesec dana i dulje pogotovo u uvjetima niske sunčeve svjetlosti. Iako posjeduje potencijal pokretljivosti iz tla u vode, podliježe brzom fotolizi i hidrolizi te nije postojan u vodenim odjeljcima. Slabo je hlapljiv i nije pokretljiv zrakom (Bacey, 2002). U štetnicima djeluje kao agonist nikotinskih receptora. Nikotinski receptori za acetilkolin su glavni ekscitatorni receptori u živčanom sustavu kukaca. Nalaze se na postsinaptičkim membranama neurona u mozgu, ganglijima, leđnoj moždini i neuromuskularnoj spojnici (Sanchez-Bayo, 2012). Vezanjem acetilkolina otvara se ionski kanal za ulazak iona natrija i izlazak iona kalija čime se prenose živčani impulsi (Casida, 2018). Vezanje imidakloprida sprječava zatvaranje ionskog kanala, onemogućavajući depolarizaciju membrane (Costa i sur., 2008). Nemogućnost provođenja akcijskih potencijala uslijed paralize receptora dovodi do hiperaktivnosti izloženog kukca i posljedične smrti. U štakorima je apsorpcija iz probavnog trakta brza i potpuna, nakon čega se raspoređuje po svim tkivima osim masnog tkiva i mineralnog dijela kosti. Izlučuje se iz organizma u potpunosti unutar 48 h nakon apsorpcije (FAO i sur., 2001). Glavni metaboliti su 6-kloronikotinska kiselina, 6-hidroksinikotinska kiselina te 4- i 5-hidroksiimidaklopid i imidaklopid-olefin. Eliminacija u sisavaca se odvija pretežno urinom u obliku metabolita te manjim dijelom fecesom (FAO i sur., 2001). Upotreba neonikotinoidnih insekticida pa tako i imidakloprida kao glavnog predstavnika je porasla nakon razvijanja otpornosti štetnika na organofosforne insekticide. U posljednje vrijeme se smatraju jednim od glavnih čimbenika pomora populacija pčela (Alaux i sur., 2010; Blacquièrè i sur., 2012). U mozgu štakora uzrokuje oksidativna oštećenja u neuronima uz smanjenje razine neurotransmitera dopamina, serotonina i gamaaminomaslačne kiseline (GABA) (Abd-Elhakim i sur., 2018). Djeluje imunotoksično smanjujujući reaktivnost T-limfocita na fitohemaglutinin i ometajući stanično posredovanu imunost u BALB/c miševima (Badgular i sur., 2013), te imunosupresivno na humoralno i stanično posredovane reakcije i fagocitnu aktivnost u mladuncima štakora (Gawade i sur., 2013). Reproduktivna toksičnost imidakloprida se očituje u smanjenju pokretljivosti i koncentracije spermija u epididimisu zajedno sa smanjenjem razine testosterona u serumu štakora (Bal i sur., 2012) te smanjenju

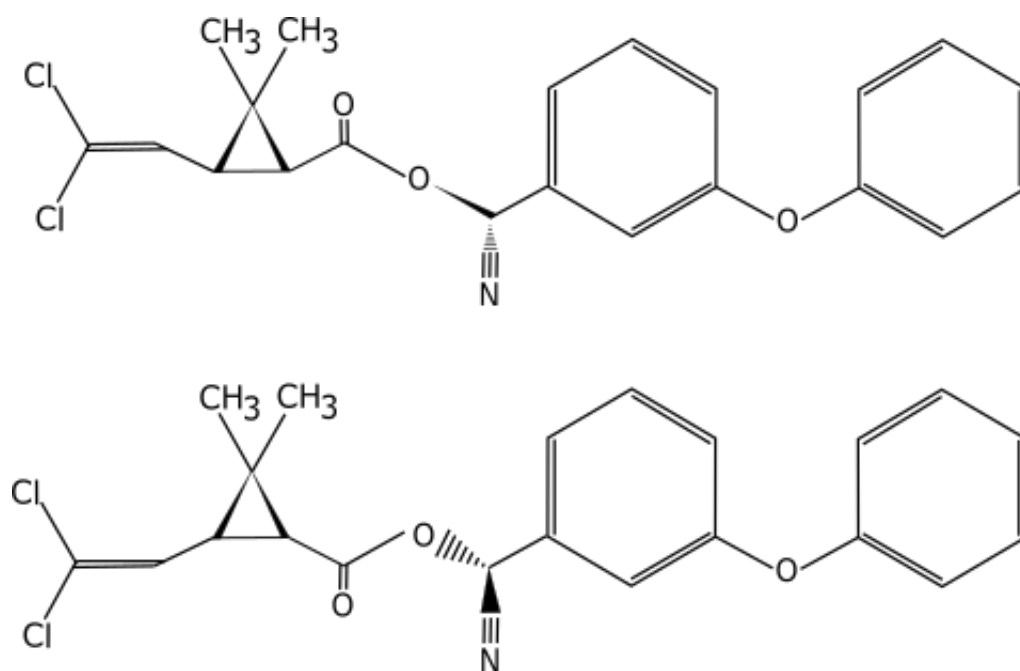
plodnosti štakorica (Burke i sur., 2018). Akutna doza LD₅₀ u štakorima oralnim putem iznosi između 380 i 650 mg/kg tj.m., dok NOAEL iznosi 14 mg/kg tj.m./dan (FAO i sur., 2001). ADI iznosi 0,06 mg/kg tj.m./dan, AOEL 0,08 mg/kg tj.m./dan, a REL 205 µg/kg tj.m./dan (EK, 2008).



Slika 2. Kemijska struktura *N*-[1-[(6-kloropiridin-3-il)metil]imidazolidin-2-iliden]nitramida (C₉H₁₀ClN₅O₂).

1.7.3. α -cipermetrin

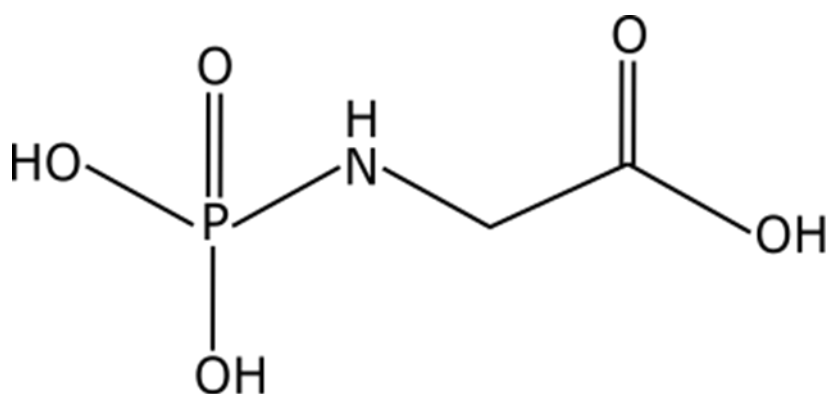
α -cijano-3-fenoksibenzil-3-(2,2-diklorovinil)-2,2-dimetilciklopropankarboksilna kiselina je kiralni piretroidni spoj sa osam mogućih enantiomera, od kojih dva koji posjeduju najizraženiji insekticidni učinak: ((*S*)- α -cijano-3 fenoksibenzil-(1*R*)-cis-3-(2,2-diklorovinil)-2,2-dimetilciklopropankarboksilna kiselina, te (*R*)- α -cijano-3 fenoksibenzil-(1*S*)-cis-3-(2,2-diklorovinil)-2,2-dimetilciklopropankarboksilna kiselina) tvore racemičnu smjesu skraćenog naziva α -cipermetrin (Slika 3). Na tržištu se nalazi od 1983. godine (WHO, 1992). U okolišu podliježe procesima hidrolize koji se odvijaju brzo u prisutnosti mikroba. Nije postojan ni u tlu ni vodi. Zbog slabe hlapljivosti nije pokretljiv zrakom (EK, 2004). U štetnicima se veže na natrijeve kanale regulirane naponom na membranama neurona. Njegovo vezanje dovodi do usporavanja otvaranja i zatvaranja kanala za prolaz iona natrija. Kao posljedica membrana neurona postaje trajno depolarizirana što dovodi do paralize (Costa i sur., 2008). Apsorbira se polagano iz probavnog trakta i široko raspodjeljuje po tkivima, najviše u masnom tkivu i koži gdje pokazuje potencijal nakupljanja. Glavnina apsorbiranog spoja se izlučuje iz organizma unutar 24 h, dok se preostali dio sporije izlučuje iz masnog tkiva, s poluvremenom eliminacije u štakora između 17 i 26 dana (IPCS, 1992). Izlučuje se podjednako urinom u obliku metabolita i fecesom pretežno kao nepromijenjen spoj. Metabolizam uključuje hidrolizu esterske veze i daljnju hidroksilaciju i konjugaciju pri čemu nastaju 3-(2,2-diklorovinil)-2,2-dimetilciklopropankarboksilna kiselina, 3-(4-hidroksifenoksi)benzojeva kiselina i 3-fenoksibenzojeva kiselina (IPCS, 1992). Toksični učinci u sisavcima ispoljavaju se na živčanom i imunološkom sustavu. Izloženost radnika u staklenicima α -cipermetrinu povezana je sa smanjenjem razine proupalnih citokina interleukina IL-2, IL-8, IL-12p70 te gama-interferona (INF- γ) važnih za obranu organizma od infekcije i malignih oboljenja (Costa i sur., 2013). Radnici na plantažama duhana izloženi formulaciji α -cipermetrina kao glavnog sastojka pokazuju smanjenu brzinu provođenja senzornog živca u podlaktici (Kimura i sur., 2005). Ujedno, pretpostavlja se da bi mogao djelovati kao hormonski otrov jer je pokazano da smanjuje odgovor izloženih riba na feromone (Moore i Waring, 2001). Akutni LD₅₀ u štakora oralnim putem iznosi 57 mg/kg tj.m., NOAEL u miševima iznosi 3,0 mg/kg tj.m./dan, ADI iznosi 0,015 mg/kg tj.m./dan, AOEL 0,1572 mg/kg tj.m./dan, te REL 2,186 μ g/kg tj.m./dan (EK, 2004).



Slika 3. Kemijska struktura (*S*)- α -cijano-3 fenoksibenzil-(1*R*)-cis-3-(2,2-diklorovinil)-2,2-dimetilciklopropankarboksilne kiseline (gore) i (*R*)- α -cijano-3 fenoksibenzil-(1*S*)-cis-3-(2,2-diklorovinil)-2,2-dimetilciklopropankarboksilna kiseline (dolje) ($C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$).

1.7.4. Glifosat

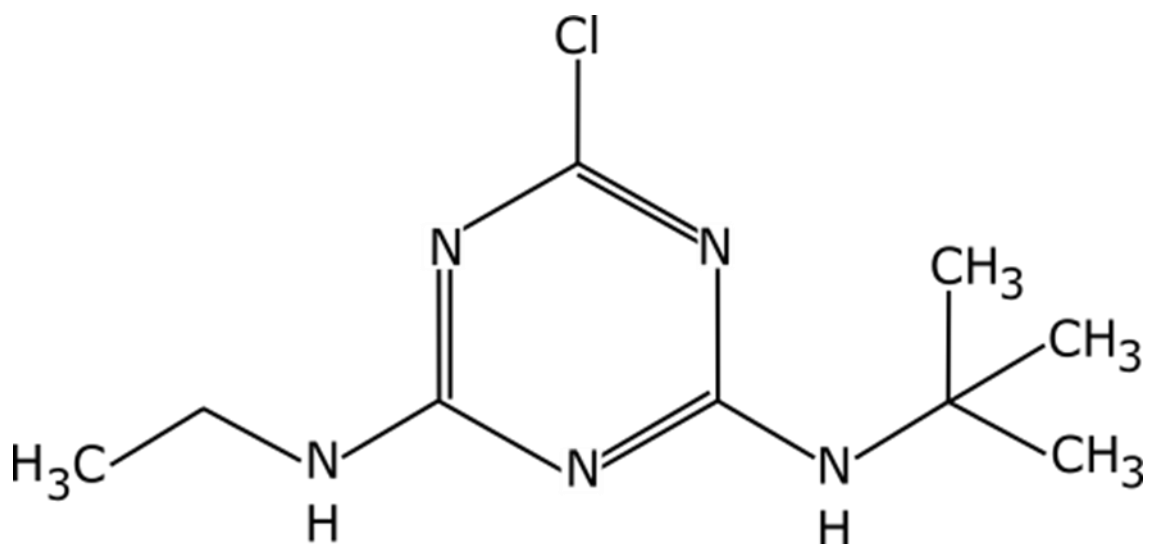
2-fosfonometilaminoocetna kiselina (glifosat) (Slika 4) pripada skupini organofosfornih herbicida. Od 1974. je uveden na tržište kao herbicid. Nakon uvođenja genetski modificiranih kultura otpornih na njegov neselektivni herbicidni učinak sredinom 1990-ih godina postaje najkorišteniji herbicid na globalnoj razini. U okolišu se čvrsto adsorbira na čestice tla i sedimenta gdje se brzo metabolizira pod utjecajem mikroba na aminometilfosfornu kiselinu (AMPA). Slabo je hlapljiv i ne pokazuje potencijal isparavanja. Mehanizam djelovanja u korovima očituje se inhibicijom enzima 5-enolpiruvilšikimat-3-fosfat sintaze, čime dovodi do zastoja u sintezi aromatskih aminokiselina fenilalanina, tirozina i triptofana. Time koči sintezu proteina (Anifandis i sur., 2018). U štakorima se nepotpuno apsorbira iz probavnog trakta. Apsorbirani glifosat se brzo raspodjeljuje i izlučuje iz organizma s poluvremenom eliminacije oko 15 h (Anadón i sur., 2009). Izlučuje se pretežno fecesom i manjim dijelom urinom. U organizmu mogu nastati male količine AMPA-e pod utjecajem crijevnih mikroba (IARC, 2017). Studije su pokazale da bi se profesionalno izlaganje glifosatu moglo povezati s povećanim rizikom od obolijevanja od non-Hodgkinovog limfoma (Eriksson i sur., 2008; Schinasi i Leon, 2014), endemskih kroničnih bubrežnih oboljenja nepoznate etiologije u Šri Lanki (Jayasumana i sur., 2014), te poremećajima u živčanom razvoju djece izloženih majki (von Ehrenstein i sur., 2019). U štakora akutna LD₅₀ doza oralno iznosi 5600 mg/kg tj.m. (BCPC, 1994), NOAEL iznosi 100 mg/kg tj.m./dan u dvogodišnjoj studiji (FAO i sur., 2004). ADI iznosi 0,3 mg/kg tj.m./dan (BCPC 1994), AOEL 2,1 mg/kg tj.m./dan, te REL 1,746 mg/kg tj.m./dan (USEPA, 2004).



Slika 4. Kemijska struktura 2-fosfonometilaminoocetne kiseline (C₃H₈NO₅P).

1.7.5. Terbutilazin

2-*N-tert*-butil-6-kloro-4-*N*-etil-1,3,5-triazin-2,4-diamin (terbutilazin) (Slika 5) pripada skupini triazinskih herbicida. Otkriven je 1950-ih godina u laboratorijima Ciba-Geigy u Švicarskoj (Müller, 2008). Uveden je na tržište 1975. godine. U korovima se veže na D1 podjedinicu fotosistema II u tilakoidnim membranama kloroplasta. Mehanizam djelovanja mu je inhibicija protoka elektrona (Gebel i sur., 1997). Posljedica te inhibicije je nemogućnost sinteze adenozin trifosfata (ATP). Koristi se kao zamjena za atrazin nakon njegove zabrane. Uzrok tome je postojanost atrazina u okolišu, posebice njegova kumulacija u površinskim i podzemnim vodama (Tasca i sur., 2018). Međutim i sam terbutilazin se smatra postojanim organskim onečišćivalom. Također se zadržava u vodama te je tako pronađen u uzorcima vode iz fontana (Mansilha i sur., 2011). Umjereno je postojan i pokretljiv u tlu. U sisavaca se brzo apsorbira iz probavnog trakta i široko raspodjeljuje s poluvremenom eliminacije iz organizma između 16 i 17 h. Izlučuje se podjednako urinom i fecesom u muških te pretežno urinom u ženskim štakoricama (USEPA, 1995). Metabolizam uključuje oksidativnu deklorinaciju te dealkilaciju postranih lanaca sa posljedičnom konjugacijom sa glukuronskom ili sulfatnom kiselinom (WHO, 1998). Dokazana je njegova toksičnost za vodene organizme; uzrokuje povećanje stanica i odvajanje epitela u škrgama grgeča (Manera i sur., 2016), nakupljanje masti (steatozu) u jajašcima šarana (Velisek i sur., 2016), morfološke promjene strukturnih stanica mramornog raka (*Procambarus fallax f. virginalis*) (Velisek i sur., 2017) te se nakuplja u masnom tkivu i ometa jetrenu detoksikaciju kalifornijske pastrve (Tarja i sur., 2003). Također ometa plivanje ličinki zebrica (*Danio rerio*) (Pérez i sur., 2013), te inhibira rast mikroalgi klorele i *Raphidocelis subcapitata*, te vodene leće (Queirós i sur., 2018). U uvjetima *in vitro* terbutilazin povećava aktivnost enzima aromataze u JEG-3 stanicama ljudskog koriokarcinoma. Također se veže na citoplazmatski estrogenski receptor inducirajući njegovu transkripcijsku aktivnost u MLVN stanicama ljudskog karcinoma dojke (Kjeldsen i sur., 2013). Budući da je aromataza enzim koji katalizira posljednji korak u biosintezi estrogena, spolnog hormona važnog za sazrijevanje i razvitak ženskog spolnog sustava, terbutilazin bi mogao djelovati proestrogeno kao hormonski otrov (Kjeldsen i sur., 2013). Kronična izloženost laboratorijskih životinja povećava incidenciju nekancerogenih lezija u jetri, plućima, štitnoj žlijezdi i testisima (WHO, 1998). Akutna oralna vrijednost LD₅₀ u štakora mu iznosi 1503 mg/kg tj.m. (USEPA, 1995). Vrijednost NOAEL u štakora iznosi 2,0 mg/kg tj.m./dan (ECHA, 2014), dok mu vrijednosti ADI, REL i AOEL iznose redom 0,00035, 0,00048 i 0,0048 mg/kg tj.m./dan (USEPA, 1995).



Slika 5. Kemijska struktura 2-*N*-*tert*-butil-6-kloro-4-*N*-etil-1,3,5-triazin-2,4-diamina (C₉H₁₆ClN₅).

1.7.6. Tembotrion

2-[2-kloro-4-metilsulfonil-3-(2,2,2-trifluoroetoksimetil)benzoil]cikloheksan-1,3-dion (tembotrion) (Slika 6) pripada skupini triketonskih herbicida. Razvijen je po uzoru na leptospermon, prirodni alelopatski herbicid. Alelopatija je pojava pri kojoj sekundarni metaboliti u nižim koncentracijama djeluju toksično na okolne biljke osiguravajući dostupnost hranjivih tvari i svjetlosti biljkama koje ih sintetiziraju, dok u višim koncentracijama djeluju autotoksično po biljku producenta. Na tržištu je prisutan od 2007. godine (Dumas i sur., 2017). Otporan je na kemijsku hidrolizu i fotolizu, te je pokretljiv u tlu prema vodenim odjeljcima gdje se metabolizira pod utjecajem mikroba. Metaboliti u okolišu nastaju hidrolizom cikloheksandionskog prstena i redukcijom u fenolni derivat. Zbog vrlo niske hlapljivosti ne prelazi u zrak (ECHA, 2012). Mehanizam djelovanja mu je inhibicija enzima 4-hidroksipiruvat dioksidaze, enzima koji sudjeluje u biosintezi plastokinona i tokoferola. Plastokinoni kao sastavni dio fotosistema II prenose elektrone kroz tilakoidne membrane kloroplasta čime se omogućava sinteza ATP-a. Tokoferol je važna sastavnica staničnih membrana u kojima doprinosi njihovoj stabilnosti, ali djeluje i kao antioksidans sprječavajući oštećenja stanice uslijed oksidativnog stresa (Küpper i sur., 2018). Tembotrion se apsorbira i raspodjeljuje brzo po mnogim tkivima, najviše u jetri i bubrezima, te koži i krznu štakora pri višim dozama unutar 3 h. Glavnina spoja se izlučuje iz organizma unutar 14 h. Eliminacija se u mužjacima štakora odvija pretežno fecesom i manje urinom pri nižim, te pretežno urinom pri višim dozama. Kod ženki pri svim dozama prevladava izlučivanje urinom (ECHA, 2012). Metabolizam je pretežno hidroksilacija cikloheksandionskog prstena, te pri višim dozama u manjoj mjeri hidroliza istog prstena ili trifluoroetoksi skupine (ECHA, 2012). Vrlo je toksičan za vodene organizme (Dumas i sur., 2017), dok u gujavicama inducira oksidativni stres (Hackenberger i sur., 2018). Također djeluje izrazito fungistatski na entomopatogenu gljivicu *Beauveria bassiana* (Kos i Celar, 2013). Pri produljenoj izloženosti glavni organi na kojima se ispoljava toksični učinak su jetra, oko i krv. U miševa, štakora i pasa dolazi do povećanja jetre uz histopatološke promjene i povišenje enzima alanin aminotransferaze (ALT). U štakorima i psima djeluje toksično na oči uzrokujući zamućenje i neovaskularizaciju rožnice. Štetno djelovanje na krv očituje se u porastu broja retikulocita u dermalno izloženim štakoricama, te eritrocitozi i smanjenju hematoloških parametara MCV i MCH u oralno izloženim psima. Prenatalna i postnatalna izloženost mladunaca štakora i zečeva tembotrionu ima za posljedicu usporen razvitak koštanog sustava mladunaca. U studijama reproduktivne toksičnosti mladunci pokazuju toksično djelovanje na oko slično odraslim životinjama uz odgođeno odvajanje prepucija i smanjenje težine mozga

1.8. Genetička toksikologija i genotoksičnost

Genetička toksikologija je grana toksikologije koja izučava štetne učinke kemijskih, bioloških i fizikalnih agensa na kemijsku strukturu DNA, ustrojstvo kromatina u više stupnjeve organizacije, do razine kromosoma, te, u širem smislu genotoksičnu i epigenetičku promjenu ekspresije gena. Značaj genetičke toksikologije očituje se u činjenici da kumulacijom navedenih oštećenja i fiksacijom u vidu mutacija, kroz duži vremenski period, može doći do razvoja karcinoma. Stoga je najvažnija zadaća genetičke toksikologije da iznalazi nove pouzdane biomarkere, odnosno, tipove oštećenja, koji istovremeno koreliraju s razinom izloženosti genetičkom agensu, ali i rizikom od razvoja karcinoma (Preston i Hoffman, 2013). Genotoksičnost je svojstvo nekog agensa da oštećuje genetički materijal na bilo kojoj od razina njegove organizacije, interferira s fiziologijom DNA i kromosoma ili epigenetički mijenja ekspresiju gena (Ren i sur., 2017).

Promjene u strukturi DNA mogu se podijeliti u primarne i sekundarne.

Primarne promjene nastaju u izravnom kontaktu genotoksičnog agensa i genetičkog materijala. To su prvi biomarkeri oštećenja genoma i ubrajaju se u biomarkere izloženosti, a podrazumijevaju jednolančane i dvolančane lomovi lanaca DNA, alkilacije baza, adukate, oksidativna oštećenja baza, purinske i pirimidinske dimere, kovalentne veze između komplementarnih lanaca te između DNA i proteina i abazična mjesta. U načelu, primarna oštećenja se uspješno popravljaju unutar nekoliko sati od njihovog nastanka. Dva su osnovna mehanizma popravka primarnih oštećenja; popravak izrezivanjem baze (BER, engl. *base excision repair*) koji popravlja jednolančane lomove, oksidativna oštećenja i alkilacije baza, dok se veća oštećenja poput adukata i kovalentnih povezivanja komplementarnih lanaca („*cross-linking*“) popravljaju izrezivanjem nukleotida (NER, engl. *nucleotide excision repair*). Tu su još popravci supstituiranih baza (metiltransferaze i dioksigenaze), popravak „*missmatch*“ kojim se popravljaju pogrešno umetnute baze u novosintetizirani lanac tijekom replikacije (Chatterjee i Walker, 2017).

Ukoliko se primarna oštećenja poput alkilacija i adukata ne poprave tijekom replikacije ona se fiksiraju u vidu mutacija. Alkilacije su najčešće u vidu supstitucija (transverzije i tranzicije), a adukti u vidu insercija ili delecija što dovodi do promjene okvira čitanja (Helleday i sur., 2014; Lambert i sur., 1992; Ren i sur., 2017).

Međutim, nepopravljena primarna oštećenja poput adukata, jednolančanih i dvolančanih lomova mogu dovesti i do nastanka drugih oblika sekundarnih oštećenja. Tijekom replikacije

one ometaju sintezu novonastalih lanaca dovodeći do nastanka usjeka (malih lomova) u novim lancima. Sličan učinak imaju i pojedini organski spojevi i adukti na enzim topoizomerazu II te se jednim imenom zovu otrovi topoizomeraze II. Tijekom popravaka nastaju prolazni lomovi u polinukleotidnim lancima koji također mogu inhibirati topoizomerazu II i dovesti do nastanka sekundarnih oštećenja DNA (Maynard i sur., 2008). Sekundarna oštećenja dijele se na oštećenja na razini interfaznog kromatina (mikronukleus, pupovi, mostovi), na oštećenja na razini metafaznih kromosoma (kromatidni lom, kromosomski lom, acentrik, dicentrični kromosom) te na razini genoma (aneuploidije).

1.9. Metode detekcije genotoksičnosti

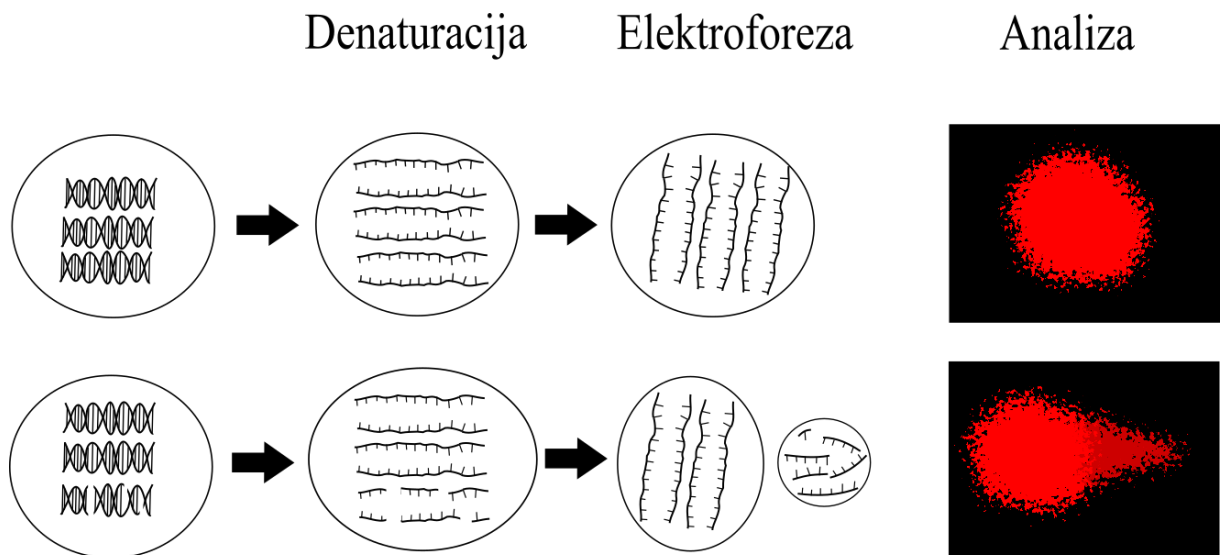
1.9.1 Alkalni komet test

Alkalni komet test je tehnika koja omogućava brzo i osjetljivo određivanje primarnih oštećenja DNA (jedno- i dvolančanih lomova, alkilacija baza, nepotpunog popravka izrezivanjem, adukata, unakrsnog povezivanja komplementarnih lanaca (engl. *cross-linking*), purinskih i pirimidinskih dimera, kovalentnog vezanja DNA i proteina, abazičnih mjesta) na razini pojedine stanice. Tijekom izvedbe tehnike, stanice u kojima se određuje razina primarnih oštećenja DNA se uklapaju u agarozni gel te nanose na staklo koje je prethodno obloženo gelom veće gustoće i osušeno. Preparat se stavlja na led do polimerizacije gela sa stanicama, a potom uranja u otopinu za lizu koja sadrži deterdžent triton-X pomoću kojeg se liziraju membrane, dimetilsulfoksid (DMSO) koji hvata slobodne radikale nastale djelovanjem željeza otpuštenog iz krvi i životinjskih tkiva i etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA) koja kelira dvovalentne katione metala koji stabiliziraju staničnu membranu. Time EDTA olakšava lizu stanica i inhibira endogene endonukleaze, za čiju katalitičku aktivnost je potreban Ca^{2+} . Visoka koncentracija NaCl u otopini za lizu odvaja većinu proteina od DNA, poglavito histone, dok proteini jezgrenog matriksa (engl. *nuclear scaffold proteins*) ostaju vezani. Nakon lize tako zaostala DNA se podvrgava denaturaciji u alkalnim uvjetima (pH=13), pri čemu dolazi do pucanja vodikovih veza i rotacije lanaca uslijed njihova odmatanja. Zbog rigidnosti okosnice rotacija izaziva tenzije u vezama u lancima. Na mjestima gdje se nalaze lezije rotacija je dodatno otežana te dolazi do pucanja lanaca i nastanka lomova. Stoga se ti oblici primarnih oštećenja nazivaju oštećenjima osjetljivima na lužinu (engl. *alkali labile sites*). Lomovi dovode do relaksacije superuzvijenih omči DNA koje pri elektroforezi u alkalnim uvjetima putuju prema anodi. Pri bojanju fluorescentnim bojama i mikroskopskoj analizi DNA pojedinačne

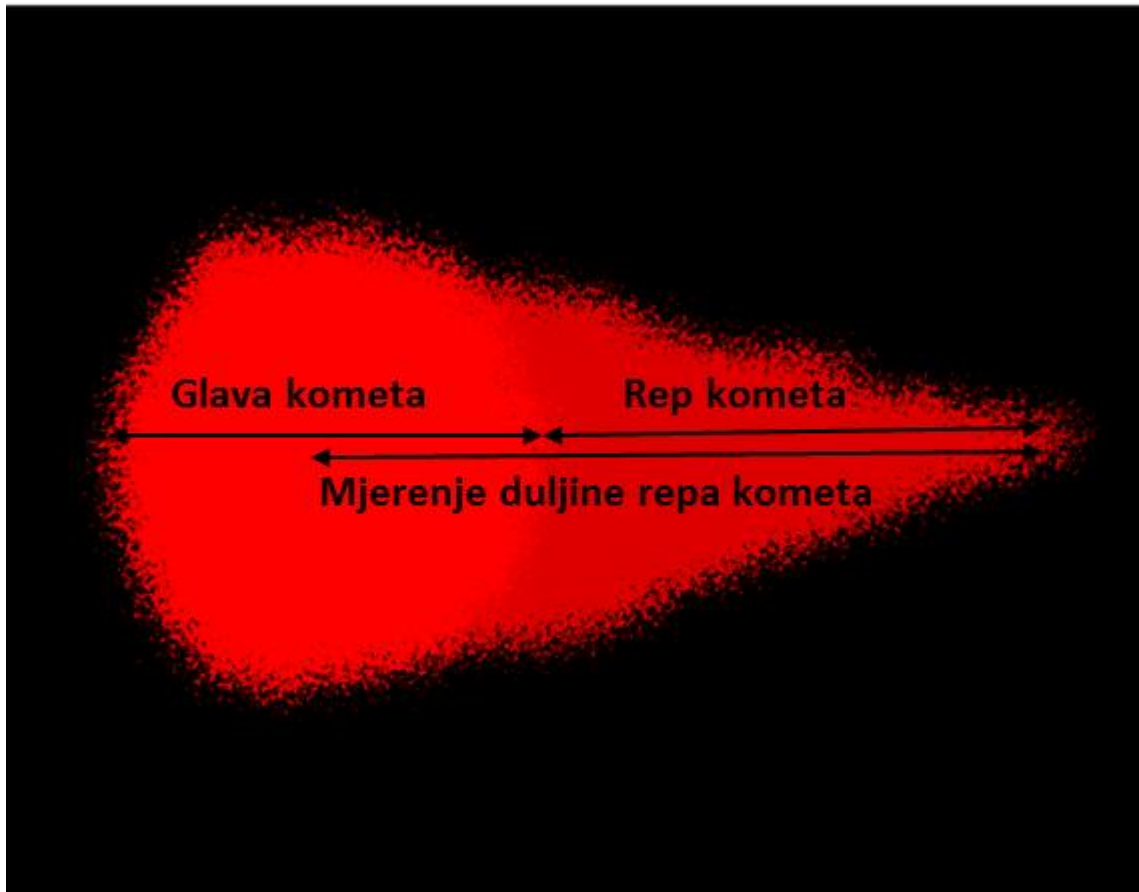
stanice sliči kometu, te s povećanjem oštećenja dolazi do povećanja postotka količine DNA u repu što se bilježi kao porast duljine repa i repnog intenziteta. Ukoliko u genomu nisu postojala primarna oštećenja, zbog visoke razine organizacije interfaznog kromatina i višestruke negativne superuzvijenosti, u uvjetima elektroforeze napon između elektroda neće biti dovoljno snažan da izvuče DNA iz organiziranog nukleoida. Duljina repa korelira s razinom primarnih oštećenja do određene granice kada prestaje rasti, dok intenzitet koji je postotak DNA u repu korelira s razinom primarnih oštećenja kroz širi raspon (Collins, 2004).

Alkalni komet test se široko primjenjuje u biomonitoringu populacija izloženih pesticidima, za proučavanje kinetike popravka oštećenja DNA, ali i kod istraživanja mehanizma djelovanja kemijskih tvari na genom. Alkalni komet test ne zahtijeva da se stanice aktivno dijele te se može obavljati na svim tipovima stanica. Također, analiza na razini pojedinačne stanice omogućava određivanje međustanične heterogenosti u nastanku primarnih oštećenja. Međutim, oštećenja koja se mjere u sklopu ove tehnike su kratkog vijeka; većina se popravljaju unutar nekoliko sekundi od nastajanja.

Slika 7 shematski prikazuje nastanak kometa. Slikom 8 prikazani su osnovni parametri koji se mjere u sklopu alkalnog komet testa.



Slika 7. Shematski prikaz nastanka kometa na primjeru stanice sa neoštećenom (gore) i oštećenom DNA (dolje).

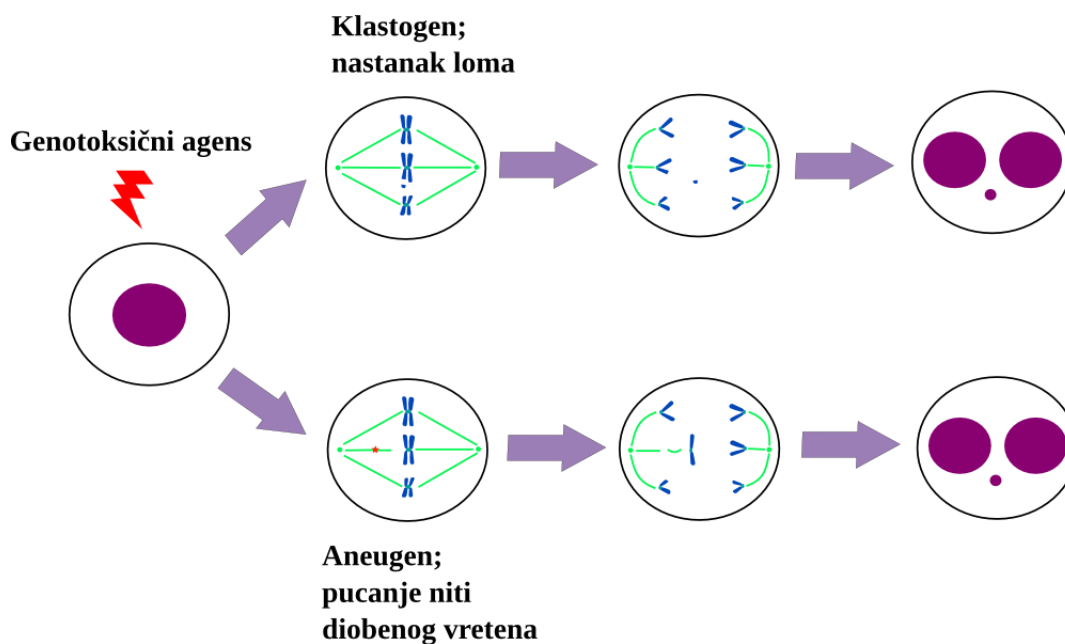


Slika 8. Shematski prikaz osnovnih parametara komet testa.

1.9.2. Mikronukleus test

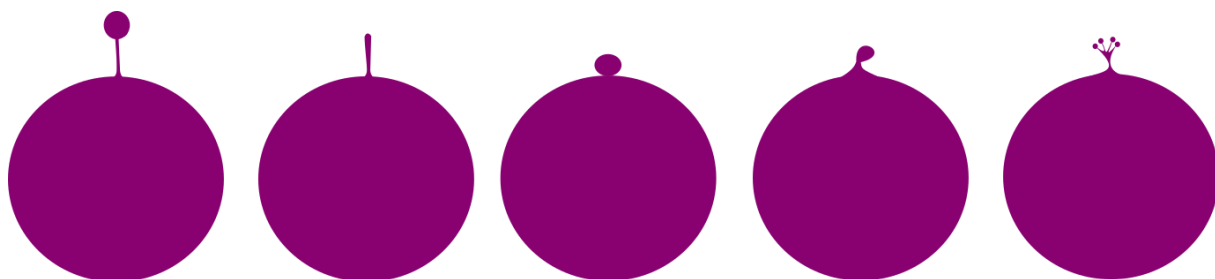
Mikronukleus test je tehnika koja omogućava analizu širokog raspona genomskih oštećenja u vidu promjena u organizaciji interfaznog kromatina (mikronukleusi, jezgri pupovi te nukleoplazmatski mostovi). Za razliku od primarnih oštećenja, mikronukleusi su i biomarkeri izloženosti i učinka jer dobro koreliraju sa izlaganjem ksenobioticima te kancerogenezom (Bonassi i sur., 2011). Sama tehnika provodi se na način da se puna krv ili limfociti unose u medij za uzgoj stanica uz dodatak 20 % fetalnog telećeg seruma i antibiotika. Dioba limfocita potiče se dodatkom fitohemaglutinina te se nakon završetka jednog kruga staničnog ciklusa dodatkom citohalazina-B inhibira citokineza. Tako se dobivaju binuklearni limfociti zaustavljeni u telofazi kao stanice s dvije jezgre, u kojima se određuje udio genomskih oštećenja. Mikronukleusi (MN) su kromatinske samostalne strukture smještene u stanici vidljivo odvojene od jezgre, te se sastoje od: 1) kromosomskih fragmenata nastalih kromosomskim lomovima ili acentričnih kromosoma, te 2) cijelih kromosoma koji u anafazi nisu otputovali na suprotne polove stanice, već su zaostali oko ravnine metafazne ploče. Za

razliku od komet testa koji detektira samo klastogene genotoksine, odnosno one genotoksične spojeve koji oštećuju DNA izravnom interakcijom s njom, mikronukleus test osim klastogena omogućava i detekciju aneugeničnih genotoksičnih spojeva. Aneugeni ne ulaze u izravnu interakciju s DNA, već oštećuju proteine vezane za pravilnu razdiobu kromosoma, posebice mikrotubula diobenog vretena (α - i β -tubulin). Kao posljedica u zaostajanju ili pogreškama u razdvajanju kromosoma u anafazi dolazi do tercijskih genotoksičnih oštećenja, onih na razini genoma, odnosno aneuploidije. U stanicama većine organizama svaki kromosom je prisutan u dvije kopije što se naziva disomijom za pojedini kromosom odnosno diploidijom na razini genoma. Aneuploidija je stanje odstupanja broja pojedinih kromosoma od disomije. Prema stupnju odstupanja razlikujemo nulisomije (izostanak kromosoma), monosomije (jedna kopija kromosoma), trisomije (tri kopije kromosoma), tetrasomije (četiri kopije) i druge. Najpoznatiji poremećaj u ljudi koji nastaje kao aneuploidija jest Downov sindrom karakteriziran trisomijom kromosoma 21. Trisomije kromosoma 18 i 13 su poznate kao Edwardsov odnosno Patau sindrom. Navedeni poremećaji se manifestiraju karakterističnim crtama lica, usporenim kognitivnim razvojem, psihomotornim poremećajima i dodatnim komorbiditetima poput hipotireoidizma i Alzheimerove bolesti (Cereda i Carey, 2012; Roizen i Patterson, 2003; Williams i Brady, 2020). Nastanak MN shematski je prikazan na Slici 9.



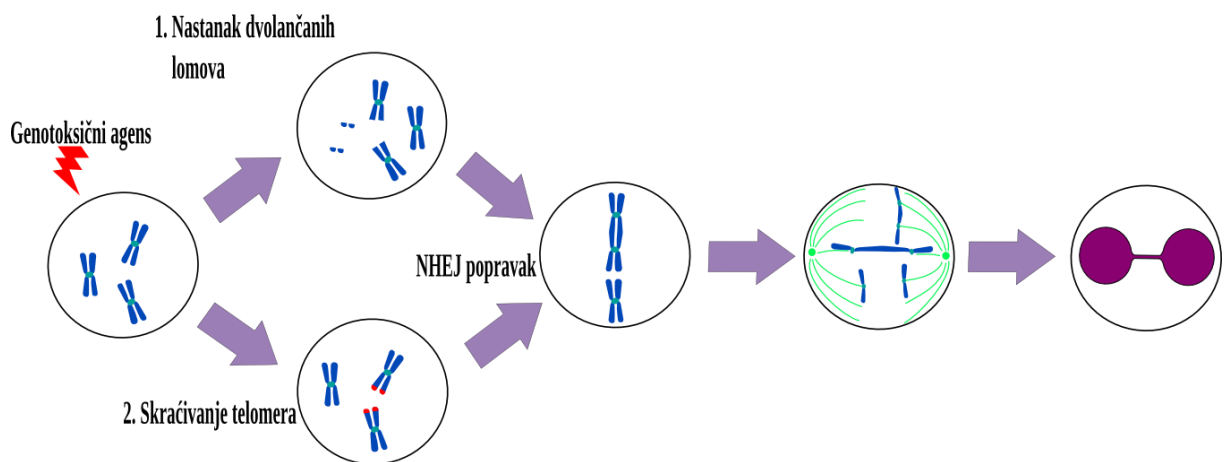
Slika 9. Shematski prikaz nastanka mikronukleusa u binuklearnim stanicama uslijed izlaganja genotoksičnom agensu klastogenim (gore) i aneugenim mehanizmom (dolje). Radi jednostavnosti su prikazana tri kromosoma po jezgri.

Jezgreni pupovi (NB, engl. *nuclear buds*) su vidljivi kao izdanci jezgre. Nastaju izdvajanjem iz jezgre 1) amplificiranih gena uslijed intenzivnih metaboličkih procesa ili dugotrajne izloženosti vanjskim kemikalijama ili 2) enzimatskih kompleksa koji sudjeluju u popravku DNA (engl. *DNA repair complexes*) i same DNA i to u slučaju kada se na maloj udaljenosti na DNA nađe više oštećenja koja se istovremeno popravljaju. Jezgra u tom slučaju radije pokreće mehanizme izdvajanja tih dijelova pupanjem nego da riskira pogreške u popravku koje su vrlo vjerojatne zbog prostorne prekapacitiranosti tog lokaliteta u jezgri višestrukim kompleksima popravka (Fenech i sur., 2011; Lindberg i sur., 2007). Različite vrste NB prikazane su Slikom 10.



Slika 10. Shematski prikaz jezgara sa različitim vrstama jezgrenih pupova.

Nukleoplazmatski mostovi (NPB, engl. *nucleoplasmic bridges*) predstavljaju tanke spojeve između jezgara te nastaju 1) istovremenim putovanjem dicentričnih kromosoma prema suprotnim polovima. Naime za područje kinetohore jedne centromere vežu se niti diobenog vretena s jednog pola, a za drugu centromeru sa suprotnog pola. Kromosom ostane razvučen između dviju novonastalih jezgara ili 2) skraćivanja telomera uslijed preopterećenosti stanice genotoksičnom agensu koji počinje utjecati na telomerazu i skeletin, bilo izravno, bilo putem izazivanja oksidacijskog stresa. Pri tome telomerne sekvence TTAGGG ostaju nezavršene (engl. *uncapped*) te ih mehanizam popravka nehomolognim sparivanjem krajeva (NHEJ, engl. *non-homologous end joining*) prepoznaje kao dvolančane lomove i povezuje u jedan kromosom (Hou i sur., 2013; Ibáñez-Cabellos i sur., 2018; Kahl i sur., 2016). Nastanak NPB prikazan je shematski na Slici 11.



Slika 11. Prikaz nastanka nukleoplazmatskog mosta uslijed izlaganja genotoksičnom agensu preko nastanka dvolančanih lomova (gore) ili skraćivanja telomera (dolje). Radi jednostavnosti su prikazana tri kromosoma po jezgri.

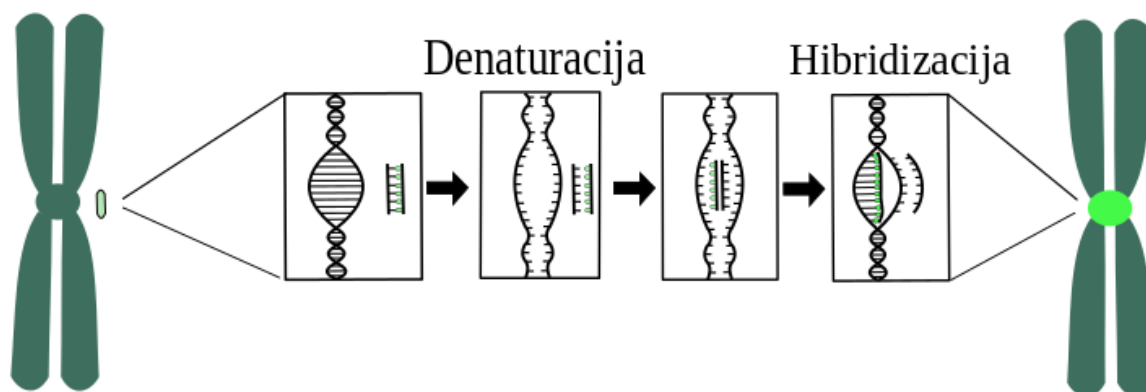
U uvjetima mikronukleus testa u prisutnosti mitogena svi limfociti ne dijele se jednakom brzinom. Tako će se u istom vremenu neki podijeliti više od jedanput, a neki ni jednom. Te stanice se vide kao mono-, tri-, i tetranuklearne, te se praćenjem njihovog udjela može pratiti dolazi li do citostatskog ili proliferativnog učinka ksenobiotika. Pri korištenju citohalazina-B računa se indeks proliferacije pod blokadom citokineze (engl. *cytokinesis-block proliferation index*, CBPI) koji ukoliko je niži od kontrole (povećani udio nepodijeljenih mononuklearnih stanica) upućuje na citostatski učinak, odnosno u slučaju povećane vrijednosti u odnosu na kontrolu (povećani udio tri- i tetranuklearnih stanica) ukazuje na proliferativni učinak (Kirsch-Volders i sur., 2003).

Kod aneugenog učinka ksenobiotika nepravilnim razdvajanjem kromatida tijekom anafaze jedna stanica kćer sadrži višak, dok druga sadrži manjak genetičke informacije sadržane na kromosomu.

1.9.3. Fluorescencijska hibridizacija *in situ*

Fluorescencijska hibridizacija *in situ* (engl. *fluorescence in situ hybridization*, FISH) je metoda koja omogućava detekciju pojedinačnih gena, mutacija (delecija, translokacija, inverzija) ili cijelih kromosoma unutar citoloških i tkivnih uzoraka. Temelj metode je primjena sonde; fluorescentno obilježenih molekula DNA koje su komplementarne ciljanim genima, kromosomskim regijama ili čitavim kromosomima. Pri visokim temperaturama (otprilike 80 stupnjeva Celzijevih) dolazi do denaturacije molekula DNA čime se oslobađa prostor za komplementarno vezanje, odnosno hibridizaciju sonde pri uvjetima niže temperature i visoke vlažnosti. Ukoliko je došlo do hibridizacije sonde s ciljanim dijelovima genoma, pod fluorescentnim mikroskopom se u kontekstu stanica i tkiva mogu vidjeti signali na mjestima hibridizacije. Obratno, u slučaju odsutnosti ciljanog dijela genoma neće doći do hibridizacije pa tako ni fluorescencije (Ferguson-Smith, 2001). Učinkovitost samog procesa hibridizacije ovisi o temperaturi i ionskoj jakosti otopine. Povećanjem temperature i smanjenjem ionske jakosti (smanjenjem koncentracije iona) dolazi do slabljenja vodikovih veza, a time i smanjenja mogućnosti hibridizacije; u obratnom slučaju, smanjenje temperature i povećanje ionske jakosti stabilizira vodikove veze i pogoduje hibridizaciji. Nakon hibridizacije koja se odvija pod uvjetima niske specifičnosti vezanja pri čemu dolazi do vezivanja sonde za mjesta u genomu koja nisu potpuno komplementarna s njima i nisu regije od našeg interesa, provodi se ispiranje pod uvjetima više specifičnosti vezanja (npr. povišenjem temperature) pri kojima dolazi do odvajanja sonde vezanih nespecifično (Unger i sur., 2010). Po potrebi je moguće provesti i pripremu uzorka prije denaturacije permeabilizacijom kiselinom ili proteazama u svrhu olakšanog pristupa sondi. Za detekciju kromosoma koriste se sonde komplementarne satelitnoj DNA na centromerama pojedinih kromosoma (Savic i Bubendorf, 2016). Primjenom tehnike FISH moguće je dodatno povećati rezoluciju mikronukleus testa karakterizacijom jezgara prema prisutnosti ili odsutnosti određenog kromosoma. Budući da će aneugeni agensi za razliku od klastogenih dovesti do nepravilnosti u broju i razdiobi kromosoma, ujedno je moguće razlučiti aneugeni od klastogenog mehanizma djelovanja određenog genotoksičnog agensa (Decordier i Kirsch-Volders, 2013).

Hibridizacija sonde na centromere kromosoma prikazana je shematski na Slici 12.



Slika 12. Pojednostavljeni prikaz osnovnih procesa hibridizacije sonde na centromeru kromosoma.

1.10. Primjeri povezanosti izloženosti pesticidima i pojave oštećenja DNA

Kao što smo rekli primarna oštećenja su biomarkeri izloženosti stoga je u radovima dokazana korelacija njihove razine sa izloženosti pesticidima. U uvjetima *in vitro* dolazi do povećanja primarnih oštećenja DNA stanica HeLa i HEK293 izloženih klorpirifosu (Li i sur., 2015). Profesionalna izloženost piretroidu fenvaleratu povezana je sa povećanjem oštećenja DNA u spermijima radnika (Bian, 2004). Dokazana je i korelacija primarnih oštećenja s koncentracijom urinarnih metabolita kao biomarkera izloženosti organofosforim insekticidima (Sutris i sur., 2016). Izloženost mješavinama pesticida također dovodi do povećanja oštećenja DNA kao u slučaju organofosfata primifos-metila, klorpirifosa, temefosa i malationa (Singh i sur., 2011).

Istraživanja koja su pokazala da su izlaganje organofosforim pesticidima je u poljoprivrednika povezano s porastom oštećenja manifestiranih u obliku kromosomskih aberacija (Paz-y-Miño i sur., 2002), mikronukleusa (Webster i sur., 2002), dok je povećanje genetičkih oštećenja zamijećeno i u djece koja su boravila u blizini tretiranih površina (How i sur., 2014) ukazuju na činjenicu da bi pesticidi mogli djelovati kao otrovi topoizomeraze II ili dovesti do primarnih oštećenja koja će remetiti funkciju tog enzima. Nepopravljena i/ili pogrešno popravljena oštećenja DNA doprinose nastanku i rastu tumora i malignih bolesti (Jackson i Bartek, 2009; Nik-Zainal, 2019).

Vanjski čimbenici mogu utjecati i na stanične strukture diobenog vretena i/ili regulatorne mehanizme važne za pravilno razdvajanje kromatida tijekom anafaze (Mishima,

2017). Među njima su i neki pesticidi poput benzimidazolnog nematicida flubendazola (Tweats i sur., 2016). Nepravilnim razdvajanjem kromatida nastaje aneuploidija, stanje neuravnoteženog broja kromosoma u stanici, zamijećena u velikom broju solidnih i krvotvornih tumora (Santaguida i Amon, 2015). Smatra se da aneuploidija doprinosi razvitku malignih bolesti uzrokujući gubitak heterozigotnosti tumor supresorskih gena (Kirsch-Volders i sur., 2019). U ljudskim limfocitima periferne krvi starenjem donora dolazi do povećanog gubitka spolnih kromosoma (Weng i sur., 2016)

Krajem 1960ih godina pojavljuju se prvi dokazi o povezanosti izlaganja arsenskim insekticidima i raka pluća i melanoma među europskim vinogradarima (Jungmann, 1966) te o povećanoj incidenciji karcinoma u radnika u staklenicima izloženim malationu i lindanu (Klayman, 1968). Povezanost profesionalne, rezidentalne izloženosti te izloženosti djece preko roditelja pesticidima sa različitim vrstama malignih bolesti potvrđena je brojnim kasnijim studijama (Lee, 2005; Lerro i sur., 2015; Greenop i sur., 2013; Mostafalou i Abdollahi, 2017; Shim i sur., 2009).

2. OBRAZLOŽENJE TEME I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

U današnjem svijetu pesticidi su socioekonomski iznimno važna skupina kemijskih spojeva. Njihova upotreba, osim što stvara radna mjesta i doprinosi ekonomskom razvitku, omogućuje zadovoljavanje neprestano rastućih potreba za hranom, ali je i uništavanjem prijenosnika, doprinijela suzbijanju niza zaraznih bolesti i nametnika. Međutim, odavno je razvidno da pesticidi ne djeluju štetno samo po ciljne organizme, već nanose štetu okolišu zadržavajući se u njemu, remeteći ravnotežu djelovanjem na različitim razinama te, ujedno, ispoljavaju štetne učinke po zdravlje čovjeka. Zabilježeni su povećana incidencija malignih bolesti te poremećaj živčanog i imunološkog sustava. U svrhu postizanja ravnoteže između dobrobiti koju pružaju pesticidi i njihovog štetnog učinka, neprestano se radi na razvoju i sintezi novih, manje toksičnih i, u okolišu postojanih djelatnih tvari. Na tom tragu Europski parlament (EP) je 2009. godine izdao smjernice o održivoj upotrebi pesticida (EP, 2009).

U okviru održive poljoprivrede upotreba pesticida svodi se na najnižu nužnu razinu te se, ujedno, preporuča korištenje pojedinih sekundarnih metabolita koji štetno djeluju po insekte i biljke drugih porodica pa su nazvani biopesticidi i njihovih sintetskih izvedenica koje se još uvijek mogu smatrati „zelenim“ pesticidima. Direktiva (EP, 2009) se odnosi na zemlje Europske unije, no u većini zemalja u razvoju i dalje se koriste pesticidi koji su zabranjeni u razvijenim zemljama. Međutim, o kojem god pestocidu bilo govora, znanstvena istraživanja toksičnosti često su puna oprečnih rezultata. Za pojedine novije djelatne tvari postoji i manjak znanstvenih istraživanja toksičnosti. Također, mnoge studije, kako potencijalni štetni učinak pesticida ne bi prošao nezapažen zbog nemogućnosti dugog trajanja izlaganja, pribjegavaju testiranju visokih koncentracija ili doza djelatnih tvari, viših od onih s kojima se ljudi susreću u svakodnevnom životu.

Stoga smo se u izradi ove doktorske disertacije htjeli dotaknuti nekoliko, za ljudsku populaciju, bitnih aspekata primjene pesticida. Odlučili smo testirati po tri pesticida iz skupina koje se najčešće koriste: herbicida i insekticida. Iz svake skupine odabrali smo po tri pesticida od kojih jedan pripada „starijoj“ generaciji, jedan „srednjoj“, a jedan „novijoj“ generaciji i ubraja se u biopesticide. U slučaju herbicida tako smo odlučili istražiti terbutilazin, glifosat i tembotrion, a od insekticida klorpirifos, imidaklopid i α -cipermetrin.

Istraživanje smo podijelili na dio u uvjetima *in vitro* i dio u uvjetima *in vivo*. U uvjetima *in vitro* koristili smo niske koncentracije pesticida koje su ekvivalenti niskim dozama pesticida koje smo istražili u uvjetima *in vivo*. Odabrane doze odražavaju realnu izloženost ljudske

populacije i temelje se na toksikološkim referentnim vrijednostima izračunatim od strane regulatornih agencija EFSA, USEPA i WHO. Unatoč postojanju tih referentnih doza, EFSA procjenjuje, primjerice za tembotrion da su realne razine izloženosti i do 50-ak puta više.

Odluka da testiramo niske doze također se temelji i na obrascu zavisnosti doze i odgovora koji je kod viših doza linearan ili eksponencijalan, dok je kod nižih doza često ispoljen kao nemonotoni odnos doze i učinka (engl. *non-monotomic dose response*) kojeg karakterizira da i najmanja odstupanja od pravilnosti doze i učinka, čak i ako su statistički neznačajna u odnosu na negativnu kontrolu, ali konzistentna, upućuju na pozitivan rezultat, odnosno mogući štetan učinak.

Budući da se izloženost pesticidima povezuje s učestalošću oboljenja od ne-Hodgkinovog limfoma u uvjetima *in vitro* odlučili smo pratiti utječu li odabrani pesticidi na pravilnost u razdvajanju kromosoma 9 i 18 u limfocitima ženskih i muških dobrovoljaca. Za kromosom 9 odlučili smo se jer sadrži gen *JAK-2* čiji gubitak heterozigotnosti je povezan s razvojem limfoma. Kromosom 18 odabrali smo jer sadrži gene za različite citokrome P450 (*CYP450*) koji sudjeluju u metabolizmu pesticida. Željeli smo vidjeti dovodi li pojačana ekspresija tih gena do disbalansa u broju kromosoma 18 na genomskoj razini i nastanka aneuploidije. U leukemijama i non-Hodgkinovom limfomu česte su translokacije između kromosoma 14 i 18, dok je u Hodgkinovom limfomu zapažena hiperploidija (Re i sur., 2002), amplifikacije na kromosomu 9 (Weniger i sur., 2006), te ciklusi nastajanja i lomova nukleoplazmatskih mostova (Guffei i sur., 2010). Kao referentne kromosome prema kojima smo računali intenzitet pogrešaka u razdvajanju koristili smo X i Y jer su vrijednosti razdvajanja za njih poznate i validirane.

Treći fokus istraživanja provedenog u okviru ove disertacije u uvjetima *in vivo* je usmjeren na moguće genotoksične učinke pesticida u najranjivijoj populaciji modelne životinje štakora. Pod time podrazumijevamo zametak/embrij, novorođenčad, mladunčad i pubertetske životinje. To je vrijeme intenzivnog razvoja zametnih listića, organa, organskih sustava i signalnih i regulacijskih putova i njihovo sazrijevanje te je u tom periodu organizam najosjetljiviji na toksično djelovanje. Međutim, u to doba mladunčad nije izravno izložena pesticidima, već se izlaganje odvija preko posteljice ili mlijeka izloženih majki. Stoga smo u tom dijelu istraživanja tijekom graviditeta i dojenja majke tretirali pesticidima i u pojedinim točkama razvoja određivali razinu primarnih oštećenja DNA u limfocitima i stanicama jetre. Konačno, željeli smo vidjeti dolazi li do zadržavanja primarnih oštećenja u mladuncima do ulaska u pubertet. Stoga smo prekinuli izlaganje pesticidima pri odbijanju od majki te određivali

razinu primarnih oštećenja DNA u majkama i njihovim mladuncima nakon njihovog potvrđenog ulaska u pubertet.

Stoga su ciljevi ovog istraživanja:

- istražiti genotoksični učinak izlaganja niskim koncentracijama djelatnih pesticidnih tvari u uvjetima *in vitro* na ljudskoj perifernoj venskoj krvi primjenom alkalnog komet testa i mikronukleus testa

- karakterizirati mehanizam genotoksičnog učinka u uvjetima *in vitro* primjenom tehnike FISH za kromosome 18 i 9 koji su često uključeni u limfoidne malignosti povezane sa izlaganjem pesticidima, te za kromosome X i Y kao biomarkere gubitka kromosoma

- istražiti genotoksični učinak izlaganja niskim dozama aktivnih pesticidnih tvari u uvjetima *in vivo* na gravidnim i doječim štakoricama soja Wistar

- istražiti mogući genotoksični učinak u mladuncima štakora soja Wistar oba spola čije su majke bile izložene niskim dozama pesticidnih aktivnih tvari tijekom gestacije i laktacije kao najosjetljivijih faza razvoja ploda

- usporediti učinak različitih aktivnih tvari insekticidnog i herbicidnog djelovanja koje se koriste u sklopu konvencionalne i održive poljoprivrede s kojima u dozama i koncentracijama koje su od značaja i u okvirima za ljudsku izloženost

3. MATERIJALI, ISPITANICI, ŽIVOTINJE I METODE

3.1. Istraživanja u uvjetima *in vitro*

U uvjetima *in vitro* ispitali smo mogući genotoksičan učinak tri herbicida i tri insekticida različitih generacija na nastanak primarnih oštećenja u DNA leukocita ispitanika oba spola primjenom alkalnog komet testa. Potencijalnu klastogenost i aneugenost u limfocitima čovjeka oba spola ispitali smo mikronukleus testom prateći pojavu mikronukleusa, jezgrenih pupova i mostova. Rezolucija testa smo dodatno povećali primjenom centromernih proba u tehnici FISH za kromosome 9, 18, X i Y. Time smo ujedno dodatno istražili aneugeni učinak pesticida.

3.1.1 Materijali

Pesticidi (Pestanal, Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt, Njemačka), $\geq 98\%$

- klorpirifos
- imidakloprid
- α -cipermetrin
- glifosat
- terbutilazin
- tembotrion

Pozitivna kontrola za alkalni komet test

- vodikov peroksid (H_2O_2), matična otopina 30 %, Kemika, Zagreb, Hrvatska

Pozitivna kontrola za mikronukleus test

- mitomicin C, Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt, Njemačka

Alkalni komet test

- agaroz normalne temperature tališta (NMP, *engl. normal melting point*), Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt, Njemačka
- agaroz niske temperature tališta (LMP, *engl. low melting point*), Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt, Njemačka
- NaCl, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- fiziološka otopina, Zavod za transfuzijsku medicinu, Zagreb, Hrvatska
- redestilirana voda, Yasenka, Vukovar, Hrvatska
- KCl, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Na_2HPO_4 , Kemika, Zagreb, Hrvatska

- KH_2PO_4 , Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Na_2EDTA dihidrat, Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt, Njemačka
- tri(hidroksimetil)aminometan (Tris), Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt, Njemačka
- natrijev laurilsarkozinat, Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt, Njemačka
- dimetilsulfoksid (DMSO) 99 %, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- NaOH, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- HCl, 36,5 %, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Triton X-100, 99 %, Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt, Njemačka
- etanol v/v 96 %, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- etidijev bromid, Kemika, Zagreb, Hrvatska

Mikronukleustest

- medij za uzgoj staničnih kultura RPMI (engl. *Roswell Park Memorial Institute*) 1640, Gibco, Paisley, UK
- fetalni goveđi serum, Gibco, Paisley, UK
- fitohemaglutinin, Remel, Dartford, UK
- otopina penicilin (10 000 IU/mL) + streptomycin (10 mg/mL), Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt, Njemačka
- citohalazin-B, izoliran iz *Helminthosporium dematioideum*, Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt, Njemačka
- metanol, 99,8 %, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- ledena octena kiselina, 99,5 %, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Giemsa, matična otopina, Merck, Darmstadt, Njemačka

FISH

- NaCl, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- natrijev citrat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- redestilirana voda, Yassenka, Vukovar, Hrvatska
- etanol v/v 70 %
- etanol v/v 96 %, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- apsolutni etanol 100 %, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- centromerne sonde, Cytocell, Cambridge, UK
 - LPE 018G za kromosom 18 izravno obilježena fluorescein izotiocijanatom (FITC)

- LPE 009R za kromosom 9 izravno obilježena TexasRed-om
- LPE 0XYq za kromosom X, izravno obilježena FITC-om, i za kromosom Y, izravno obilježena TexasRed-om
- hibridizacijska otopina za kromosome 18 i 9 sastav: (proizvođač ne navodi koncentracijske udjele) dekstran sulfat, formamid, SSC (izotočni natrijev citrat: eng. *saline-sodium citrate*), Cytocell, Cambridge, UK
- Tween 20 (polioksietilensorbitanmonolaurat), Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt, Njemačka
- DAPI, Invitrogen, Eugene, Oregon, SAD

Otopine za alkalni komet test

- PBS pufer

Pufer je izrađen otapanjem 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g Na₂HPO₄ i 0,2 g KH₂PO₄ u 800 mL redestilirane vode.

- Otopina agaroze NMP 1 %

1 g agaroze NMP otopljeno je u 100 mL redestilirane vode zagrijavanjem iznad 90 °C.

- Otopina agaroze NMP 0,6 %

0,6 g agaroze NMP otopljeno je u 100 mL redestilirane vode zagrijavanjem iznad 90 °C.

- Otopina agaroze LMP 0,5%

0,5 g agaroze LMP otopljeno je u 100 mL pufera PBS zagrijavanjem iznad 90 °C.

- Otopina H₂O₂ za pozitivnu kontrolu

11,5 µL matične otopine vodikovog peroksida razrijeđeno je s 1 mL redestilirane vode. 10 µL te otopine razrijeđeno je s 1 mL pufera PBS čime je dobivena radna otopina (1 mM) H₂O₂.

- Otopina za lizu stanica

Matična otopina za lizu stanica izrađena je otapanjem 146,4 g NaCl, 37,2 g Na₂EDTA dihidrata i 1,2 g Trisa u 500 mL destilirane vode. Otopinom NaOH 10 M podešena je vrijednosti pH na 10 te je dodavano 10 g Na-laurilsarkozina. Po njegovom otapanju volumen matične otopine podešen je na 890mL dodavanjem destilirane vode.

Radna otopina za lizu izrađena je dodavanjem 10 mL DMSO-a i 1 mL Tritona-X 100 u 89 mL matične otopine za lizu. Otopina se priprema svježa i pohranjuje na temperaturu +4 °C

- Matična otopina Na₂EDTA (200 mM)

37.5 g Na₂EDTA dihidrata je otopljeno u 900 mL destilirane vode.

- Matična otopina NaOH (10 M)

400 g NaOH je otopljeno u 1 L destilirane vode.

- Pufer za denaturaciju i elektroforezu

U 965 mL ohlađene destilirane vode dodano je 30 mL otopine NaOH i 5 mL otopine Na₂EDTA. Otopina se priprema svježa i rashlađuje na +4 °C.

- Otopina etidijevog bromida

Matična otopina etidijevog bromida izrađena je otapanjem 20 mg etidijevog bromida u 100 mL destilirane vode i pohranjena na sobnoj temperaturi u mraku.

Radna otopina etidijevog bromida je izrađena razrjeđivanjem 1 mL matične otopine s 9 mL destilirane vode.

Otopine za mikronukleus test

- Priprema otopine mitomicina C

Matična otopina mitomicina C izrađena je otapanjem 2 mg MMC u 5 mL PBS pufera, podijeljena u manje volumene (100 µL) u Eppendorf kivete, zamotana alu-folijom i pohranjena na -20°C.

Radna otopina mitomicina C je izrađena razrjeđivanjem matične otopine s hranjivim medijem RPMI 1640.

- Priprema matične otopine s antibiotikom 1 %

1 mL otopine penicilina i streptomicina je dodano u 100 mL medija RPMI 1640. Otopina se pohranjuje na +4 °C.

- Priprema matične otopine fitohemaglutinina

5 mL medija RPMI 1640 je dodano u izvornu bočicu fitohemaglutinina. Otopina se pohranjuje na +4 °C.

- Priprema otopine citohalazina-B

Matična otopina citohalazina-B je izrađena otapanjem 10 mg citohalazina-B u 2 mL DMSO. Radna otopina je izrađena razrjeđenjem 1 mL matične otopine sa 9 mL medija RPMI 1640. Otopina se pohranjuje na -20 °C.

- Fiksir

Fiksir je izrađen miješanjem 300 mL metanola i 100 mL ledene octene kiseline. Pohranjuje se na +4 °C.

- Otopina Giemse 5,0%

Otopina Giemse je dobija se razrjeđivanjem 5 mL matične otopine s 95 mL destilirane vode.

Otopine za FISH

- 2X SSC

otopina 20X SSC je izrađena otapanjem 175,2 g NaCl i 88,2 g Na-citrata u 800 mL destilirane vode, podešavanjem pH na 7,4 dodatkom koncentrirane HCl i nadopunjavanjem destiliranom vodom do 1 L.

Otopina 2X SSC je izrađena razrjeđivanjem 1 mL 20X SSC otopine sa 9 mL destilirane vode. Otopina se pohranjuje na +4 °C.

- otopina 2X SSC s 0,1 % Tween-a 20

Otopina 2X SSC s 0,1 % Tween-a 20 je izrađena na jednak način kao i otopina 2X SSC uz dodatak 100 µL Tween-a 20.

- Smjesa za hibridizaciju kromosoma 18 i 9

Smjesa za hibridizaciju sondi na kromosome 18 i 9 je izrađena miješanjem po 2,3 µL sondi LPE018G i LPE009R s 3 µL hibridizacijske otopine, sukladno naputcima proizvođača.

3.1.2. Ispitanici

Za istraživanja u uvjetima *in vitro* korištena je puna venska krv dvaju odraslih dobrovoljnih ispitanika muškog i ženskog spola. Ispitanici pripadaju istoj dobnoj skupini, ne puše, ne konzumiraju alkohol, ne pate od kroničnih bolesti, te u zadnjih 12 mjeseci prije uzimanja krvi nisu uzimali lijekove niti prolazili medicinske dijagnostičke pretrage u skladu s međunarodnim preporukama za ovu vrstu istraživanja (Albertini i sur, 2000) te nisu prethodno izlagani ispitivanim pesticidima. Ispitanici su prije davanja pristanka za sudjelovanje u istraživanju upoznati s problematikom i svrhom istraživanja te da u svakoj etapi istraživanja mogu svojevoljno odustati i uskratiti pristanak na korištenje njihovog biološkog materijala u istraživanju bez ikakvih mogućih posljedica po njih. Ispitanici koji su pristali sudjelovati potpisali su informirani pristanak. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada, ur.br. 100-21/14-5, klasa 01-18/14-02-2/6 od 11. lipnja 2014. godine i Medicinskog fakulteta ur. br. 380-59-10106-19-111/105, klasa 641/01/19-02/01 od 25. travnja 2019. godine. Puna krv je izvađena iz antekubitalne vene u heparinizirane spremnike i neposredno nakon toga korištena za istraživanja.

3.1.3. Metode

3.1.3.1. Tretmani pune krvi pesticidima

Matične otopine klorpirifosa, imidakloprida, α -cipermetrina, terbutilazina te tembotriona izrađene su otapanjem pesticidnih djelatnih tvari u DMSO, dok je izvorna otopina glifosata izrađena otapanjem u redestiliranoj vodi. Radne otopine pesticida izrađene su razrjeđivanjem matičnih otopina pesticida otapalima korištenima za izradu matičnih otopina. Pri izradi matičnih i radnih otopina nije došlo do precipitacije spoja.

1 mL pune krvi je tretirano u prisutnosti 1 mL medija RPMI 1640 pojedinačno otopinama pesticida u konačnim koncentracijama prikazanim u Tablici 1.

Tablica 1. Koncentracije pesticida korištene u tretmanima pune krvi u uvjetima *in vitro*

Pesticid	Koncentracije ($\mu\text{g/mL}$)		
	REL	ADI	AOEL
Klorpirifos ^a	0,000623	0,01666	0,0262
Imidakloprid ^b	0,3146	0,1	0,13
α -cipermetrin ^c	0,003643	0,025	0,262
Glifosat ^d	2,91	0,5	3,5
Terbutilazin ^e	0,0008	0,000583	0,008
Tembotrion ^f	0,0012	0,17	0,002

a - USEPA (2011) REL – prihvatljiva razina izloženosti pučanstva

b – EK (2008) ADI– prihvatljiv dnevni unos

c – EK (2004) AOEL- prihvatljiva izloženost operatera

d – USEPA (2004)

e – USEPA (1995)

f – EFSA (2013)

Koncentracije pesticida su ekvivalenti referentnih toksikoloških doza REL, ADI i AOEL izračunati uz pretpostavku mase odraslog čovjeka od 70 kg i volumena tjelesne tekućine 42 L (Guyton i sur, 1996). Kao negativna kontrola krv je tretirana suviškom medija ($V = 20 \mu\text{L}$), dok je kao pozitivna kontrola u mikronukleus testu krv tretirana otopinom mitomicina C u konačnoj koncentraciji $1 \mu\text{g/mL}$. Za kontrolu otapala je krv tretirana DMSO-om. Svi tretirani uzorci su rađeni u triplikatu. Krv je izlagana pesticidima inkubacijom 24 sata (Fenech, 2007) na temperaturi od $37 \text{ }^\circ\text{C}$, te 5 % CO_2 u zraku.

Po završetku tretmana krv je centrifugirana na 1000 okretaja 4 min, nakon čega je vakuum sisaljkom uklonjen supernatant. Krv je isprana fiziološkom otopinom i ponovno centrifugirana. Nakon uklanjanja supernatanta, sedimentirane krvne stanice korištene su za izradu preparata za alkalni komet test te inicijaciju kultura za mikronukleus test.

3.1.3.2. Alkalni komet test u uvjetima *in vitro*

Alkalni komet test za određivanje primarnih oštećenja DNA je rađen prema standardnom protokolu (Lin i sur, 2013; Olive i Banath, 2006).

Na histološka predmetna stakalca (Vitrognost Ultra) je dodano $300 \mu\text{L}$ otopine agaroze NMP 1 % te pokriveno pokrovnicom $24 \times 40 \text{ mm}$ (Vitrognost) na 10 minuta. Pokrovnica je

uklonjena, a stakalca s gelom dalje su sušena 20 minuta na 50 °C, a potom na sobnoj temperaturi preko noći. Na osušeni sloj agaroze dodano je 100 µL otopine agaroze NMP 0,6 %, pokriveno pokrovnicom te ostavljeno na ledu 10 minuta kako bi gel polimerizirao prije skidanja pokrovnice.

Svi preparati (kontrola i svaka tretirana koncentracija svakog pesticida) su izrađeni u triplikatu. 3 µL krvi iz tretmana je suspendirano u 300 µL otopine agaroze LMP 0,5 % temperature 37 °C. 100 µL dobivene suspenzije stanica dodano je na sloj 0,6 % agaroze NMP te pokriveno pokrovnicom i ostavljeno na ledu 10 minuta u svrhu brže polimerizacije gela i inhibicije enzima u stanici. Pokrovnica je uklonjena i na preparate je dodan posljednji sloj od 100 µL agaroze LMP 0,5 % te pokriven pokrovnicom i ponovno ostavljen na ledu 10 minuta.

Pozitivna kontrola u alkalnom komet testu dobivena je dodatkom 50 µL radne otopine H₂O₂ na sloj suspenzije krvi prethodno tretirane kao negativna kontrola, te pokrivanjem pokrovnicom i držanjem 5 minuta na ledu. Nakon tretmana pokrovnica je uklonjena, preparat ispran redestiliranom vodom te ocijeđen postavljanjem ukoso. Na preparat je stavljen posljednji sloj agaroze LMP kako je opisano u prethodnom odlomku.

Preparatima su skinute pokrovnice te su uronjeni u svježe pripremljenu i ohlađenu na +4 °C otopinu za lizu. Preparati su držani u otopini preko noći na +4 °C. Preparati su potom prebačeni u uspravni košić s ohlađenim (+4 °C) puferom za denaturaciju na 20 minuta.

Preparati su potom vodoravno položeni u kadicu za elektroforezu (Horizon 11.14, Whatman, Florham Park, NJ, USA) koja je sadržavala svježe pripremljen i rashlađen (+4 °C) pufer za elektroforezu. Elektroforeza je provedena na sobnoj temperaturi u trajanju od 20 minuta pri uvjetima konstantnog napona 1 V/cm i jakosti struje 300 mA podešene promjenom volumena pufera.

Po završetku elektroforeze preparati su isprani tri puta po 5 minuta redestiliranom vodom. Dehidriranje preparata je provedeno njihovim ispiranjem Pasteurovom pipetom 70 %-tnim pa 96 %-tnim etanolom, nakon čega su sušeni na zraku.

Neposredno prije mikroskopske analize preparati su obojani dodavanjem 100 µL radne otopine etidijevog bromida, pokriveni pokrovnicom i ostavljeni u mraku 10 minuta.

Analiza preparata alkalnog komet testa provedena je epifluorescencijskim mikroskopom Olympus BX50 (Tokio, Japan). Pod objektivom povećanja 20X primjenom računalnog programa Comet Assay IV (InStem, Bangalore, Indija) analizirano je 100 nukleoida

u triplicatu za svaki tretman. Duljina repa (μm) i intenzitet repa (% DNA) su izmjereni prema shemi (Slika 8) te zabilježeni kao Excel tablica. Slike kometa dobivene su primjenom kamere AVT Marlin F046B IRF (Allied vision, Stadtroda, Germany).

3.1.3.3. Mikronukleus test

Mikronukleus test je izvođen prema smjernicama OECD-a (2016a).

Nakon posljednjeg ispiranja krvi tretirane pesticidima i uklanjanja supernatanta, talog u kojem se uz ostale krvne stanice, eritrocite i trombocite nalaze i limfociti je resuspendiran. 0,5 mL te suspenzije dodano je u 6 mL medija RPMI 1640 obogaćenog s 1 mL fetalnog goveđeg seruma te dodatkom 1 % (v/v) otopine penicilina i streptomcina, te 100 μL otopine fitohemaglutinina. 44 h nakon početka kulture dodana je otopina citohalazina B u konačnoj koncentraciji 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ i nastavljena je inkubacija sljedećih 28 sati. Uzgoj staničnih kultura proveden je u triplicatu za sve kontrole i tretmane. Inkubacija je provedena u aerobnim uvjetima pri temperaturi 37 °C i 5 % CO_2 .

Nakon 72 h inkubacije, kultura krvnih stanica je centrifugirana pri 800 okretaja 8 minuta, te je vakuum sisaljkom uklonjen supernatant. Talog je resuspendiran i ispran fiziološkom otopinom. Ponovljeno je centrifugiranje, odsisavanje supernatanta i resuspendiranje taloga. Fiksacija limfocita je provedena dodatkom hladnog fiksira (+4 °C). Po resuspendiranju, nastavilo se s centrifugiranjem pri istim uvjetima i uklanjanjem supernatanta. Postupak fiksacije je ponavljan sve do dobivanja bistrog supernatanta i bijelog taloga limfocita. Talog je resuspendiran u fiksiru te nakapan na predmetna stakalca. Preparati su sušeni na sobnoj temperaturi.

Neposredno prije analize preparati su obojani 5,0%-tnom otopinom Giemse u trajanju od 10 minuta. Analiza obojanih preparata je provedena na svjetlosnom mikroskopu Olympus CX51 (Tokio, Japan). Pri ukupnom povećanju 1000X po 1000 binuklearnih stanica je analizirano na prisutnost ili odsutnost MN, NB ili NPB. Pri ukupnom povećanju 100X izbrojano je 500 limfocita te je zabilježen udio mono-, bi-, tri- i tetranuklearnih limfocita radi određivanja kinetike proliferacije pomoću CBPI prema formuli (Fenech, 2007):

$$\text{CBPI} = \frac{M1+2XM2+3X(M3+M4)}{N}$$

gdje je: M1 = broj mononuklearnih limfocita

M2 = broj binuklearnih limfocita

M3 = broj trinuklearnih limfocita

M4 = broj tetranuklearnih limfocita

N = ukupan broj izbrojanih stanica po preparatu

Analize preparata kontrola i tretmana su napravljene u triplikatu.

3.1.3.4. FISH

FISH je proveden na preparatima dobivenim tehnikom mikronukleustesta za negativne kontrole, te krv tretiranu najnižom koncentracijom svakog pesticida.

Za uspješnost hibridizacije potrebno je osigurati dovoljnu udaljenost između stanica na preparatu. Zbog toga su preparati za FISH, nakon posljednjeg centrifugiranja i otklanjanja supernatanta te resuspendiranja taloga izrađeni nanošenjem suspenzije limfocita na mikroskopska stakla iznad vodene kupelji pri 50 °C, gdje su ostavljeni 10 minuta te potom osušeni na zraku.

Postupak hibridizacije je rađen prema preporukama proizvođača sonde. Preparati su uronjeni na 5 min u otopini 2XSSC pri sobnoj temperaturi, nakon čega su dehidrirani u nizu otopina etanola 70%, 96% te 100% po 5 min uz kružno gibanje na laboratorijskoj tresilici te sušeni na zraku.

Hibridizacija je provedena na način da je prva polovica preparata hibridizirana za autosome (18 i 9) te druga polovica za gonosome (X i Y).

Preparati su pripremljeni za hibridizaciju predzagrijavanjem na 37 °C 10 minuta u termostatiranoj komori. Istovremeno su pripremljene sonde za hibridizaciju držanjem u vodenoj kupelji pri 37 °C 10 minuta. 7,6 µL hibridizacijske otopine (sonde za 2 kromosoma i medij za hibridizaciju) je nanoseno na preparat te odmah pokriveno sa pokrovnicom.

Denaturacija je provedena na grijaćoj ploči 4 minute na 82 °C. Pokrovnice su potom zalijepljene fotografskim ljepljivom te su preparati premješteni u vlažnu komoru. Hibridizacija je provedena inkubacijom na 37 °C preko noći.

Nakon pažljivog skidanja pokrovnice provedeno je ispiranje dva puta po 3 minute u otopini 2X SSC na 60 °C, te jednom po 2 minute u otopini 2X SSC s Tween-om 0,1 % na sobnoj temperaturi. Preparati su dehidrirani u otopinama etanola 70 %, 96 % te 100 %, osušeni, te obojeni sa 20 µL DAPI-ja sa sredstvom protiv gašenja fluorescencije, pokriveni pokrovnicom i zalijepljeni. Preparati su držani 10 minuta u mraku prije analize.

Analiza preparata za FISH provedena je epifluorescencijskim mikroskopom Olympus AX70 (Tokio, Japan). Pod objektivom povećanja 40X analizirano je 1000 jezgara binuklearnih limfocita. Fotografije binuklearnih stanica dobivene su primjenom kamere Applied Imaging ER-3339 i računalnog programa Cytovision v3.0 (Applied Imaging, Hampshire, UK). Aneuploidne stanice su s obzirom na odstupanja od diploidnog stanja razvrstane u skupine prema shemi prikazanoj na slici 13.

Vrsta numeričke aberacije kromosoma	Manjak kromosoma (zeleno)	Višak kromosoma (zeleno)	Manjak/višak kromosoma (zeleno)	Pogrešna razdioba (malsegregacija) kromosoma (zeleno)
Autosomi muškog i ženskog donora/ gonosomi ženskog donora	A 	B 	C 	D
Gonosomi muškog donora	E 	F 	G 	H

Slika 13. Shematski prikaz binuklearnih stanica s različitim vrstama numeričkih aberacija kromosoma $n=2$ nevezano o kojem se kromosomu radi [autosomi 9 ili 18 muškog i ženskog te gonosom X ženskog donora (A-D)] odnosno kromosoma $n=1$ [gonosomi X i Y muškog donora (E-H)]. Zeleno su prikazani signali za aneuploidni, a crveno za euploidni kromosom (prilagođeno iz Mužinić i sur (2019)).

3.2. Istraživanja u uvjetima *in vivo*

U uvjetima *in vivo* istražili smo mogući genotoksični učinak insekticida α -cipermetrina i herbicida tembotriona na gravidnim i doječim štakoricama soja Wistar. Također smo istražili i mogući genotoksični učinak u njihovim mladuncima oba spola na indukciju primarnih oštećenja DNA.

3.2.1. Materijali

Pesticidi (Pestanal Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt, Njemačka), $\geq 98\%$

- α -cipermetrin
- tembotrion

Pozitivna kontrola

- ciklofosfamid, Pestanal Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt, Njemačka, $\geq 98\%$

Anestetici

- Narketan, djelatna tvar ketamin, otopina 10 %, Vetoquinol, UK
- Xylapan, djelatna tvar ksilazin, otopina 2 %, Vetoquinol, UK

Uzorkovanje krvi i jetre

- heparin 25 000 IU/5 mL ampule, Belupo, Koprivnica, Hrvatska
- NaCl, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Na₂EDTA dihidrat, Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt, Njemačka

Alkalni komet test

- agaroz normalne temperature tališta (NMP, engl. *normal melting point*), Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt, Njemačka
- agaroz niske temperature tališta (LMP, engl. *low melting point*), Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt, Njemačka
- NaCl, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- redestilirana voda, Yasenka, Vukovar, Hrvatska
- KCl, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Na₂HPO₄, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- KH₂PO₄, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Na₂EDTA dihidrat, Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt, Njemačka
- tri(hidroksimetil)aminometan (Tris), Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt, Njemačka

- natrijev laurilsarkozinat, Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt, Njemačka
- DMSO, 99 %, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- NaOH, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- HCl, 36,5 %, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Triton X-100, 99 %, Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt, Njemačka
- etanol v/v 70 %
- etanol v/v 96 %, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- etidijev bromid, Kemika, Zagreb, Hrvatska

Pufer za homogenizaciju tkiva

0,44 g NaCl i 0,89 g Na₂EDTA dihidrata je otopljeno u 80 mL redestilirane vode. Vrijednost pH je podešena na 7,5 dodatkom otopine NaOH, te je volumen pufera nadopunjen redestiliranom vodom do 100 mL. Pufer se priprema svjež i pohranjuje na +4 °C.

Otopine za alkalni komet test

Otopine za alkalni komet test u uvjetima in vivo su izrađene kako je opisano u potpoglavlju 3.1.

- pufer PBS
- Otopina agaroze NMP 1 %
- Otopina agaroze NMP 0,6 %
- Otopina agaroze LMP 0,5 %
- Otopina za lizu stanica
- Matična otopina Na₂EDTA (200 mM)
- Matična otopina NaOH (10 M)
- Pufer za denaturaciju i elektroforezu
- Otopina etidijevog bromida

3.2.2. Laboratorijske životinje

3.2.2.1. Podrijetlo i uzgoj životinja

U pokusima su korištene odrasle spolno zrele štakorice (N=96) soja Wistar HsdBrlHan starosti oko 90 dana i prosječne mase 200 g na početku pokusa, i njihova mladunčad oba spola od okota do ulaska u pubertet (N=320). Životinje su uzgojene u Jedinici za uzgoj laboratorijskih životinja Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada. Sve životinje tijekom pokusa su držane u nastambi za pokusne životinje s nadziranom mikroklimatskim uvjetima sukladno

optimalnim uvjetima uzgoja: temperatura 20 – 22 °C, vlažnost zraka 40 – 60 % i odgovarajuće osvjetljenje (12-satna izmjenjena svjetla i mraka). Životinje su hranjene standardnom prehranom (4RF21 Complete feed for mice and rats, Mucedola, Settimo Milanese, Italija) te su imale neograničen pristup vodi. Štakorice su vagane tijekom prva dva tjedna skotnosti dva puta tjedno, a nakon toga svakog dana do kraja skotnosti i dva puta tjedno tijekom laktacije. Svi postupci sa životinjama tijekom pokusa odobreni su od strane Etičkog povjerenstva Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada, Ur. br. 100-21/14-6, klasa 01-18/14-02-2/6 od 11. lipnja 2014. godine, Ministarstva poljoprivrede, Uprave za veterinarstvo i sigurnost hrane, Ur. br. 525-10/0255-14-2, klasa UP/I-322-01/14-01/75 od 12. rujna 2014. godine, te Etičkog povjerenstva Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Ur. br. 251-58-10617-19-178, klasa 643-02/19-01/3 od 11. veljače 2019. godine.

3.2.2.2. Oplodnja ženki i raspodjela u skupine

Spolno zreli mužjaci pareni su sa ženkama u kavezima u omjeru 1:2 tijekom 1 dana i noći. Ženke kojima je idućeg dana utvrđena prisutnost spermija u ispirku rodnice smatraju se oplodjenima (spermij-pozitivnima) te je taj dan označen kao prvi dan skotnosti (G1).

Skotne ženke su raspoređene u tri pokusne, negativnu i pozitivnu kontrolnu skupinu od po tri ženke približno jednake po prosječnoj početnoj masi. U svakoj pokusnoj skupini ženke su tretirane oralno gavažom.

3.2.3. Metode

3.2.3.1. Doze pesticida

Matična otopina insekticida α -cipermetrina pripremljena je otapanjem u destiliranoj vodi s dodatkom etanola u volumnom postotku 0,2%. Matična otopina tembotriona pripremljena je otapanjem u destiliranoj vodi. Radne otopine za tretman štakorica pripravljene su razrjeđivanjem matičnih otopina do odgovarajuće koncentracije istim otapalom kojim su pripravljene. Udio matične otopine u otapalu prilagođavao se u ovisnosti o promjenama mase štakorica i to na način da životinje uvijek prime dozu volumena 1 mL.

Za tretman α -cipermetrinom štakorice su izlagane dozama koje predstavljaju referentne toksikološke doze i relevantne su za izloženost ljudske populacije (EK, 2004):

- 1) ADI = 0,001 mg/kg tj.m./dan
- 2) AOEL = 0,0015 mg/kg tj.m./dan
- 3) 1/100 LD₅₀ = 0,57 mg/kg/tj.m./dan

Za tretman tembotrionom štakorice su izlagane dozama koje predstavljaju referentne toksikološke doze i relevantne su za izloženost ljudske populacije (EFSA, 2013):

- 1) ADI = 0,0004 mg/kg tj.m./dan
- 2) AOEL = 0,0007 mg/kg tj.m./dan
- 3) 1/500 LD₅₀ = 20 mg/kg tj.m./dan

Ženke iz skupine negativne kontrole tretirane su destiliranom vodom, dok su ženke iz skupine pozitivne kontrole tretirane otopinom ciklofosfamida u redestiliranoj vodi u dozi 5 mg/kg tj.t./dan od 16. dana gestacije kako bismo smanjili toksičnost na mladunce (Torres-Mendoza i sur., 2014).

3.2.3.2. Tretmani životinja

Žrtvovanje i utvrđivanje genotoksičnosti za mladunčad koja je indirektno, preko placente ili majčinog mlijeka tretiranih majki eventualno bila izložena pesticidima izvedeno je u vremenskim točkama po završetku tri faze razvoja: okot, završetak laktacije, pubertet. Nakon dojenja, po uspostavi estrusnog ciklusa ispitivanje je učinjeno i na tretiranim majkama. Kada je to bilo moguće pet muških i pet ženskih mladunaca žrtvovano je iz istog legla. Ukoliko u leglu nije bio dovoljan broj mladunaca, nadopunjen je mladuncima iz što je moguće sličnijeg legla i sličnijih karakteristika (morfoloških i bihevioralnih).

Točke žrtvovanja i mjerenja razine primarnih oštećenja DNA u jetri i leukocitima mladunaca tretiranih majki:

1. točka – završetak gestacije

Skotne ženke su tretirane svakodnevno u isto vrijeme od prvog dana gestacije do okota (\pm 21 dan), s iznimkom pozitivne kontrole u kojem slučaju su ženke tretirane od 16. dana gestacije. Unutar 24 sata nakon okota majke su anestetizirane intraperitonealnom primjenom doza 0,8 mL/kg tj.m. ketamina-narketana i 0,6 mL/kg tj.m. ksilazina-ksilapana, potom iskrvarene presijecanjem karotida kako bi se skupili uzorci krvi iz vratne vene, a nakon čega je uzorkovana jetra, isprana fiziološkom otopinom i osušena staničevinom. Uzorkovan je dio jetre koji je uronjen u pufer za homogenizaciju tkiva (+4 °C) u masenoj koncentraciji 19 mg jetre / 1 mL pufera. Žrtvovanje pet muških i pet ženskih mladunaca provedeno je dekapitacijom.

2. točka – gestacija i laktacija do obijanja

Skotne ženke koje su tretirane svakodnevno u isto vrijeme od prvog dana gestacije nastavile su primati pesticide gavažom do obijanja mladunaca od majki 21. dana nakon okota,

s iznimkom pozitivne kontrole u kojoj su ženke tretirane od 16. dana gestacije. Žrtvovanje ženki, pet mladunaca ženki i pet mladunaca mužjaka provedeno je 21 dan nakon okota i nakon odbijanja mladunaca od majki (ukupan tretman \pm 42 dana). Sve životinje u ovoj točki su žrtvovane na način kojim su žrtvovane majke iz 1. točke opisane u prethodnom odlomku. Uzimanje uzoraka krvi i jetre provedeno je na identičan način.

3. točka – gestacija i laktacija s prekidom tretmana do puberteta

Skotne ženke su tretirane svakodnevno u isto vrijeme od prvog dana gestacije do odbijanja mladunaca od majki 21. dana nakon okota, s iznimkom pozitivne kontrole u kojoj su ženke tretirane od 16. dana gestacije.

Nakon odbijanja mladunci iz svakog legla su odvojeni po spolu i prestalo se s tretmanom pesticidima. Praćenje ulaska mladunaca u pubertet provedeno je od 35. dana starosti vizualnim pregledom vanjskih znakova spolnog razvoja; odvajanja prepucija kod mužjaka i otvaranja rodnice kod ženki. Nakon utvrđenog otvaranja rodnice ženkama su mikroskopski pregledani ispirci rodnice da se utvrdi početak estrusa. Žrtvovanje je provedeno nakon utvrđenog ulaska u pubertet i to po pet mužjaka i pet ženki. Žrtvovanje i uzorkovanje krvi i jetre provedeni su na jednak način kao i u prethodnom slučaju. U ovom slučaju mladunci štakora su indirektno preko posteljice i majčinog mlijeka mogli biti izloženi pesticidima kojima su tretirane majke u trajanju \pm 42 dana, nakon čega je uslijedilo vrijeme bez tretmana od petnaestak dana.

4. točka – laktacija

Za razliku od prijašnjih tretmana, da bi se odredilo samo moguće posljedično translaktacijsko djelovanje pesticida, majke smo počeli tretirati tek nakon okota do odbijanja mladunaca od majki 21. dana starosti. Žrtvovanje majki, pet ženki mladunaca i pet mužjaka mladunaca i uzorkovanje tkiva provedeno je na jednak način kao što je ranije opisano.

Krv je skupljena iz vratne vene u spremnike s heparinom, dok su komadići jetre isprani u hladnom PBS puferu i stavljeni u svježe priređeni i ohlađeni pufer za homogenizaciju tkiva (+4 °C). Uzorci su odmah iskorišteni za izradu preparata alkalnog komet testa.

3.2.3.3. Alkalni komet test u uvjetima *in vivo*

Alkalni komet test u uvjetima *in vivo* rađen je prema standardom protokolu OECD-a (2016b).

Prije izrade preparata alkalnog komet testa komadi jetre su usitnjeni laboratorijskim škalicama te staklenim štapićem kako bi se dobila suspenzija stanica jetre. Usitnjavanje smo radili u puferu za homogenizaciju tkiva, uronivši pritom kivetu u posudu s usitnjenim ledom.

Predmetna stakalca su pripremljena na način kako je opisano u potpoglavlju 3.1.

Svi uzorci tkiva rađeni su u triplikatu. Preparate na kojima smo utvrđivali razinu primarnih oštećenja DNA izradili smo suspendirajući 3 μL krvi u 300 μL otopine agaroze LMP 0,5%. Preparate za analizu razine primarnih oštećenja DNA u stanicama jetre počeli smo izrađivati suspendiranjem 30 μL homogenizirane suspenzije stanica jetre u 300 μL agaroze LMP 0,5%. Preparate objiju vrsti tkiva dalje smo obrađivali na jednak način, i to kako je opisano u potpoglavlju 3.1.

Postupak lize i denturacije preparata proveden je kao u potpoglavlju 3.1.

Za uzorke krvi elektroforezu smo proveli pri uvjetima konstantnog napona 1 V/cm, a za uzorke jetre 0,75 V/cm. U oba slučaja jakost struje bila je 300 mA što smo podesili podešavanjem volumena pufera.

Postupak neutralizacije, dehidriranja, sušenja i bojanja preparata je napravljen kako je opisano u potpoglavlju 3.1.

Analiza preparata alkalnog komet testa provedena je epifluorescencijskim mikroskopom Olympus BX50 (Tokio, Japan). Pod objektivom povećanja 20X primjenom računalnog programa Comet Assay IV (InStem, Bangalore, Indija) analizirano je 150 nukleoida u triplikatu za svaki tretman. Duljina repa (μm) i intenzitet repa (% DNA) su izmjereni prema shemi (Slika 8) te zabilježeni kao Excel tablica. Slike kometa dobivene su primjenom kamere AVT Marlin F046B IRF (Allied vision, Stadtroda, Germany).

3.3. Statističke metode

Podaci o duljini repa i repnom intenzitetu iz alkalnog komet testa *in vitro* su obrađeni metodama deskriptivne statistike (srednja vrijednost, medijan, standardna devijacija). Podaci nisu bili normalno raspodjeljeni (Kolmogorov Smirnov test). Podaci o duljini repa su transformirani logaritmiranjem po bazi 10. Podaci o repnom intenzitetu su uvećani za 1 te potom logaritmirani po bazi 10. Podaci za oba parametra nisu bili normalno distribuirani niti nakon normalizacije podataka. Stoga smo za uspoređivanje značajnosti razlike između kontrola (negativna kontrola, pozitivna kontrola, kontrola otapala) koristili Mann-Witney U-test. Za uspoređivanje značajnosti razlike između negativne kontrole i tretiranih skupina koristili smo Mann-Witney U-test.

Podatke o učestalosti MN, NPB i NB te o CBPI smo obradili primjenom deskriptivne statistike (srednja vrijednost, medijan, standardna devijacija). Za određivanje značajnosti razlike u učestalosti MN, NPB i NB između kontrola (negativna kontrola, pozitivna kontrola i kontrola otapala) te između negativne kontrole i tretmana koristili smo hi kvadrat test. U sklopu određivanja CBPI značajnost razlike u udjelu izbrojanih binuklearnih stanica između kontrole i tretmana smo odredili primjenom istog testa. Ukoliko je uočena značajna razlika, uspoređen je udio mononuklearnih odnosno multinuklearnih (zbroj tri- i tetranuklearnih) stanica.

Značajnost razlike u udjelu euploidnih stanica između negativne kontrole i tretmana po svakom kromosomu smo odredili hi kvadrat testom. Ukoliko je uočena statistička značajnost, primjenom istog testa odredili smo značajnost razlike u udjelu stanica s manjkom, viškom, manjkom-viškom i/ili pogrešnom razdiobom kromosoma. Za prag statističke značajnosti određen je $p < 0,05$. Statistička obrada provedena je u računalnom programu Statistica v13.5.0.17 (Statsoft, Tulsa, Oklahoma, SAD).

Za istraživanja u uvjetima *in vivo* veličina uzorka izračunata je prema sljedećim hipotezama:

- H1. U mladunaca neovisno o dobi ne očekuje se značajan genotoksični učinak.
- H2. Nešto izraženiji učinak mogao bi biti zabilježen u novorođenim mladuncima majki tretiranih pesticidima tijekom skotnosti.
- H3. Po ulasku u pubertet ne očekuje se više nikakav učinak tretmana majki pesticidima tijekom graviditeta i laktacije na leukocite i stanice jetre mladunčadi.

Uz pretpostavke 1) jednakog učinka u prve tri podskupine (negativna kontrola, doza ADI i doza AOEL) i povišenog učinka u podskupini najviše izloženosti te 2) log-normalne

distribucije podataka, minimalno povećanje učinka koje će se moći detektirati u najvišoj dozi je 7 - 9 % za duljinu repa te 22 - 42 % za intenzitet repa u logaritmiranim vrijednostima.

U izvornim vrijednostima, ove bi vrijednosti odgovarale porastu od 4,6 do 6,0 μm za duljinu repa, pretpostavljajući prosječne vrijednosti u rasponu od 16 - 21 μm za prve tri skupine 1. dijela pokusa (novorođeni mladunci), te porastu od 3,3 do 4,6 μm u odnosu na očekivane prosječne vrijednosti od 11 - 16 μm za ostale dijelove pokusa (pubertet i laktacija). Za intenzitet repa, minimalni porast u originalnim vrijednostima koji će se moći detektirati u skupini najviše izloženosti (doze temeljene na LD_{50}) bit će u rasponu od 1,7 % do 2,9 % pri očekivanim prosječnim vrijednostima od 1 - 3 % za 1. dio pokusa (novorođeni mladunci), odnosno 0,6 % do 0,7 % pri očekivanim prosječnim vrijednostima 0,2 % - 0,8 % za ostale dijelove pokusa (pubertet i laktacija). Očekivane prosječne vrijednosti duljine i intenziteta repa po skupinama te prosječne vrijednosti i standardne devijacije pripadnih logaritmiranih podataka izračunate su iz prethodnih neobjavljenih podataka za iste skupine životinja. Svi izračuni provedeni su koristeći standardne parametre za razinu značajnosti ($\alpha = 0,05$) i minimalnu snagu ($\beta = 0,80$). Za izračun je korišten program G*Power, verzija 3.1 (Faul i sur., 2007).

Podaci o duljini repa i repnom intenzitetu u alkalnom komet testu *in vivo* su obrađeni na način kako je opisano u prvom odlomku ovog potpoglavlja za alkalni komet test *in vitro*.

U svim navedenim analizama za prag statističke značajnosti postavljen je $p < 0,05$. Statistička obrada provedena je u računalnom programu Statistica v13.5.0.17 (Statsoft, Tulsa, Oklahoma, SAD).

4. REZULTATI

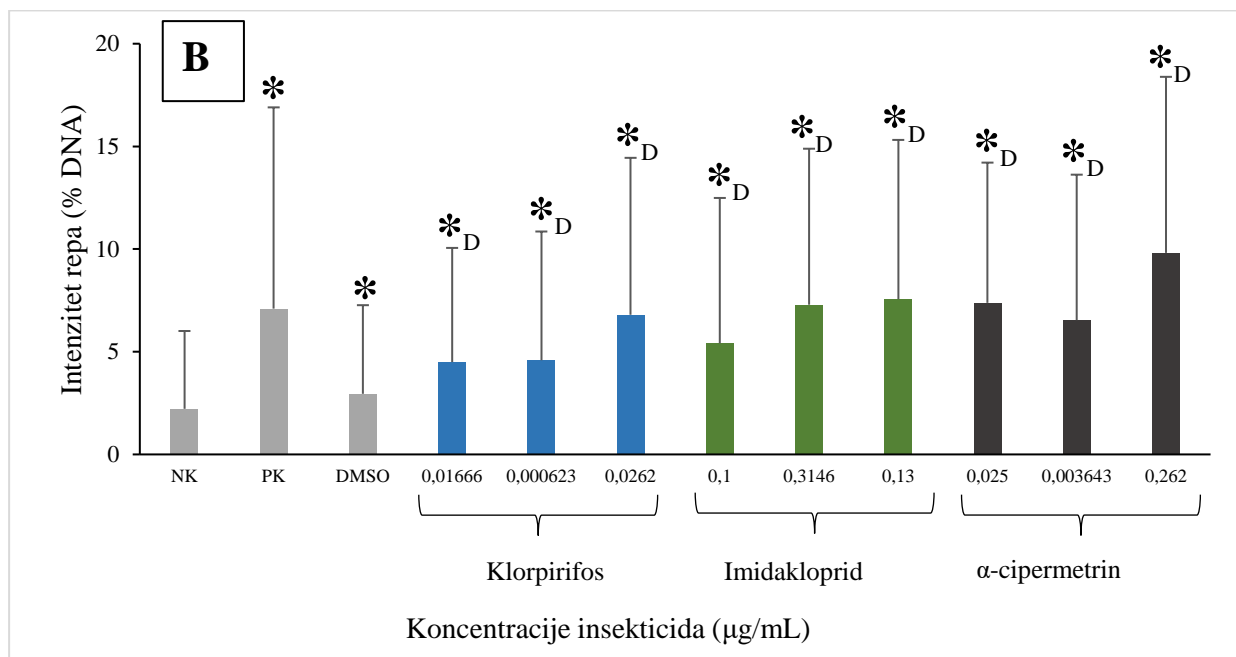
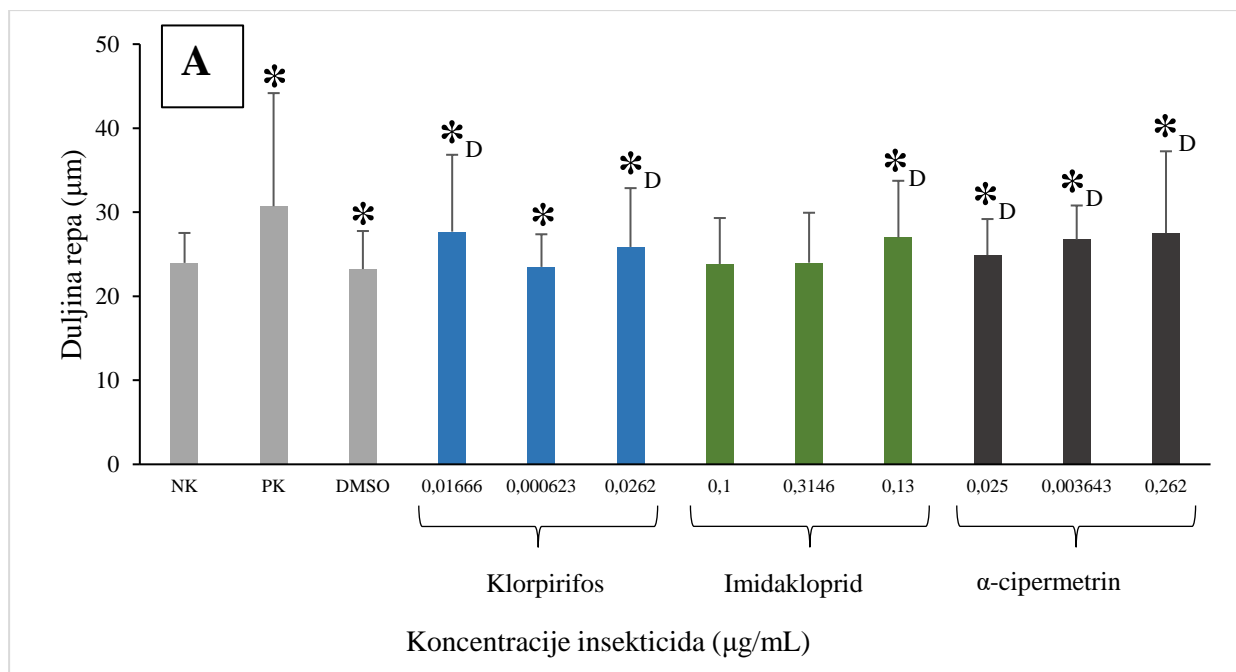
4.1. Istraživanja u uvjetima *in vitro*

4.1.1. Alkalni komet test

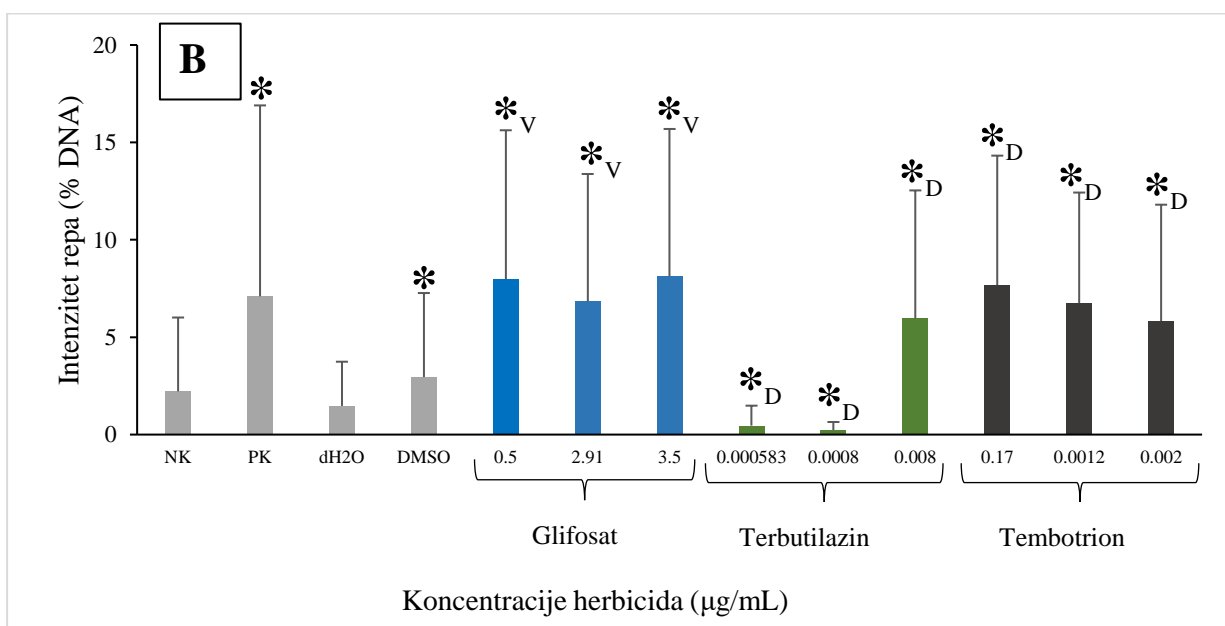
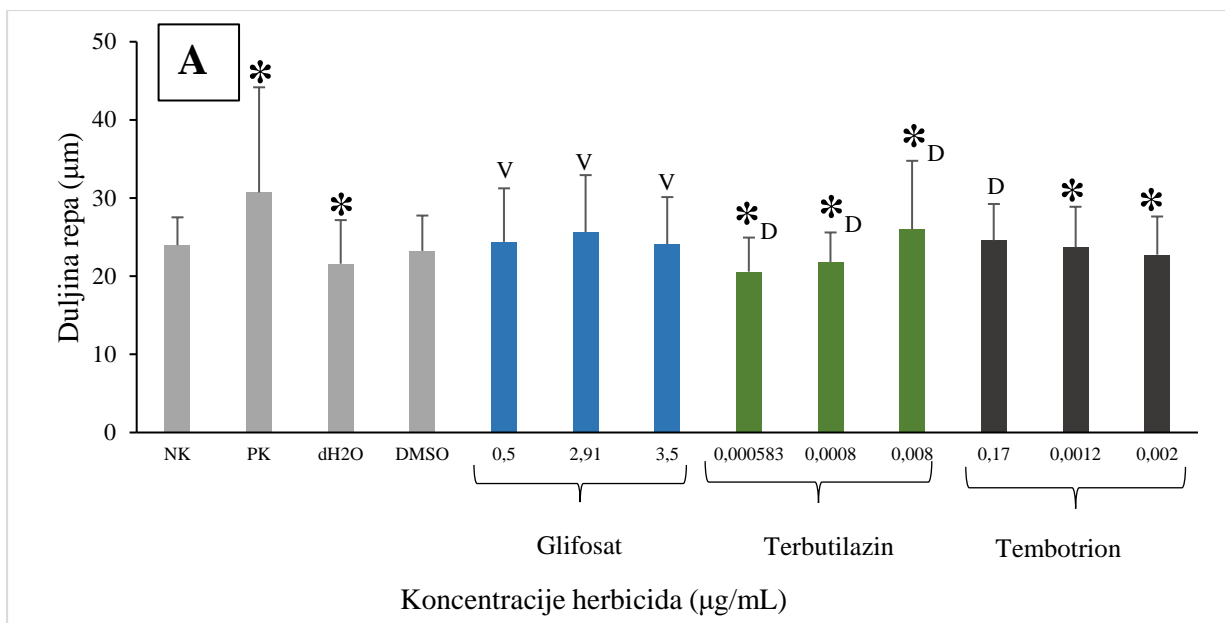
Rezultati alkalnog komet testa *in vitro* na leukocitima periferne krvi muškog donora izlagane insekticidima i herbicidima 24 sata su prikazani na slici 14, odnosno slici 15.

Izlaganje klorpirifosu je dovelo do značajnog povećanja duljine repa u odnosu na negativnu kontrolu kod svih koncentracija, a ujedno i u odnosu na DMSO kao kontrolu otapala pri dvije više koncentracije (Slika 14A). Izlaganje krvi imidaklopridu dovelo je do značajnog povećanja vrijednosti duljine repa samo pri koncentraciji od 0,13 µg/mL (AOEL) (Slika 14A), dok je učinak izlaganja α -cipermetrinu rezultirao značajnim povećanjem duljine repa kometa u odnosu na negativnu kontrolu pri svim primijenjenim koncentracijama (Slika 14A). Svi primijenjeni insekticidi pri svim primijenjenim koncentracijama uzrokuju značajno povećanje primarnih oštećenja DNA iskazano parametrom intenziteta fluorescencije repa kometa (% DNA u repu) u odnosu na negativnu kontrolu i kontrolu otapala (Slika 14B).

Izlaganje leukocita muškog donora glifosatu dovodi do povećanja intenziteta repa bez učinka na duljinu repa pri svim koncentracijama (Slika 15(A-B)). Kod triazinskog herbicida terbutilazina pri višoj koncentraciji uočeno je značajno povećanje oba parametara komet testa (Slika 15(A-B)). Izlaganje krvi tembotrionu dovodi do povećanja vrijednosti intenziteta fluorescencije repa pri svim primijenjenim koncentracijama (Slika 15B). Istovremeno duljina repa pri nižim koncentracijama značajno opada u odnosu na negativnu kontrolu, dok je pri najvišoj koncentraciji značajno povećana u odnosu na kontrolu otapala (Slika 15A).



Slika 14. Prikaz rezultata alkalnog komet testa na leukocitima muškog donora čija je krv tretirana insekticidima 24 sata u uvjetima *in vitro*; duljina (A) i intenziteta repa (B). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija mjerenja na po 100 nukleoida u triplikatu. NK – negativna kontrola medij RPMI 1640, PK – pozitivna kontrola H₂O₂ 0,1 µM, DMSO - dimetilsulfoksid, * - statistički značajno u odnosu na negativnu kontrolu, D – statistički značajno u odnosu na DMSO (Mann-Witney U-test, p < 0,05).

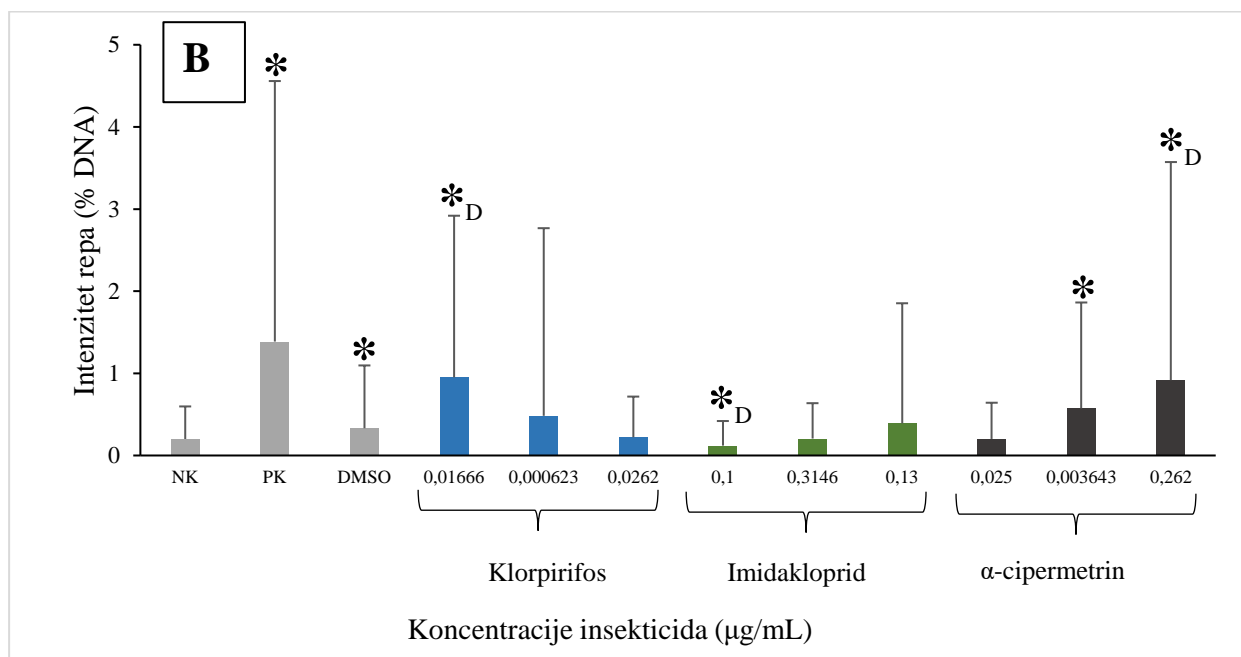
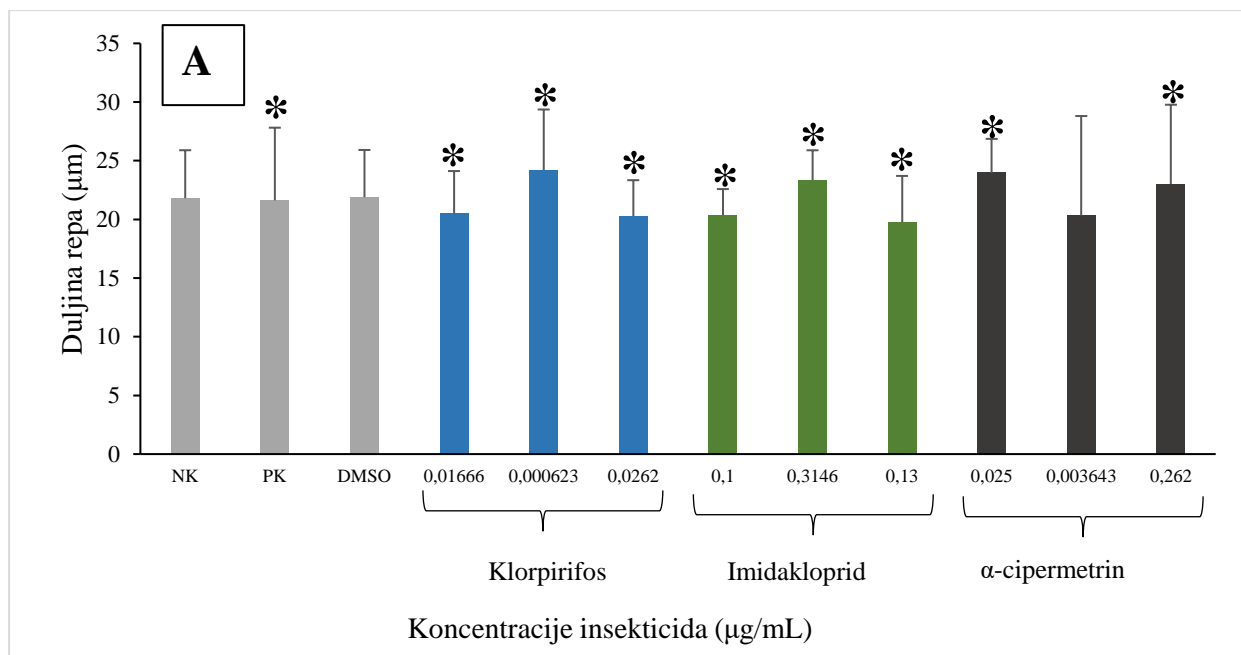


Slika 15. Prikaz rezultata alkalnog komet testa na leukocitima muškog donora čija je krv tretirana herbicidima 24 sata u uvjetima *in vitro*: duljina (A) i intenziteta repa (B) herbicida. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija mjerenja na po 100 nukleoida u triplikatu. NK – negativna kontrola medij RPMI 1640, PK – pozitivna kontrola H₂O₂ 0,1 µM, dH₂O – redestilirana voda, DMSO – dimetilsulfoksid, * - statistički značajno u odnosu na negativnu kontrolu, V – statistički značajno u odnosu na redestiliranu vodu, D – statistički značajno u odnosu na DMSO (Mann-Witney U-test, p < 0,05).

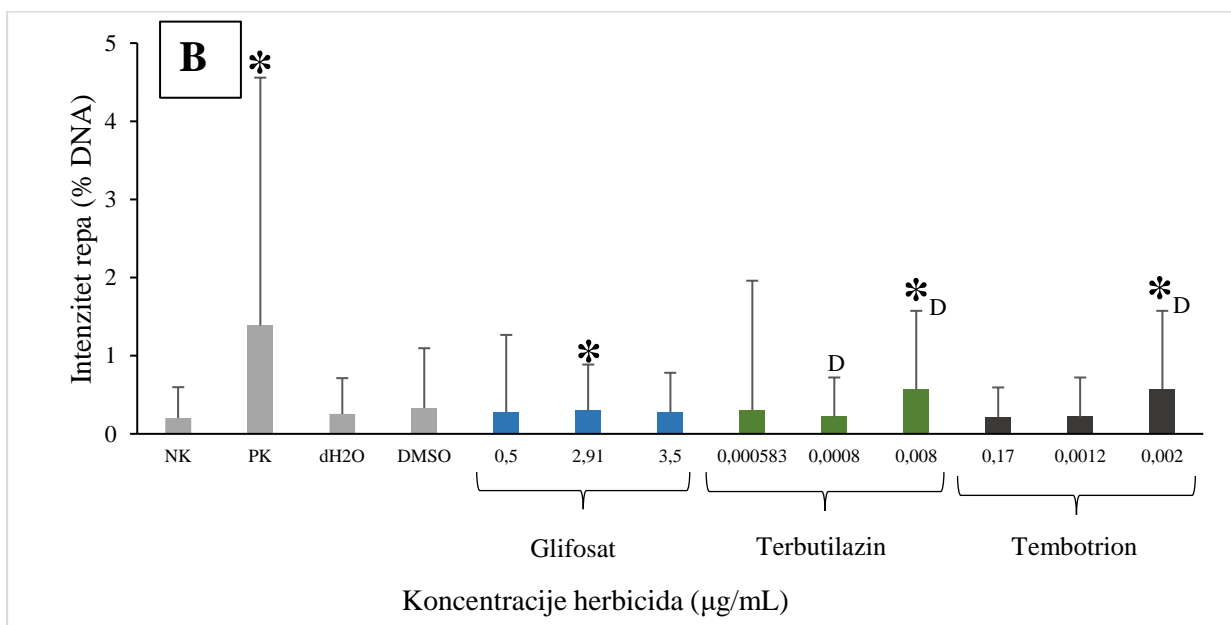
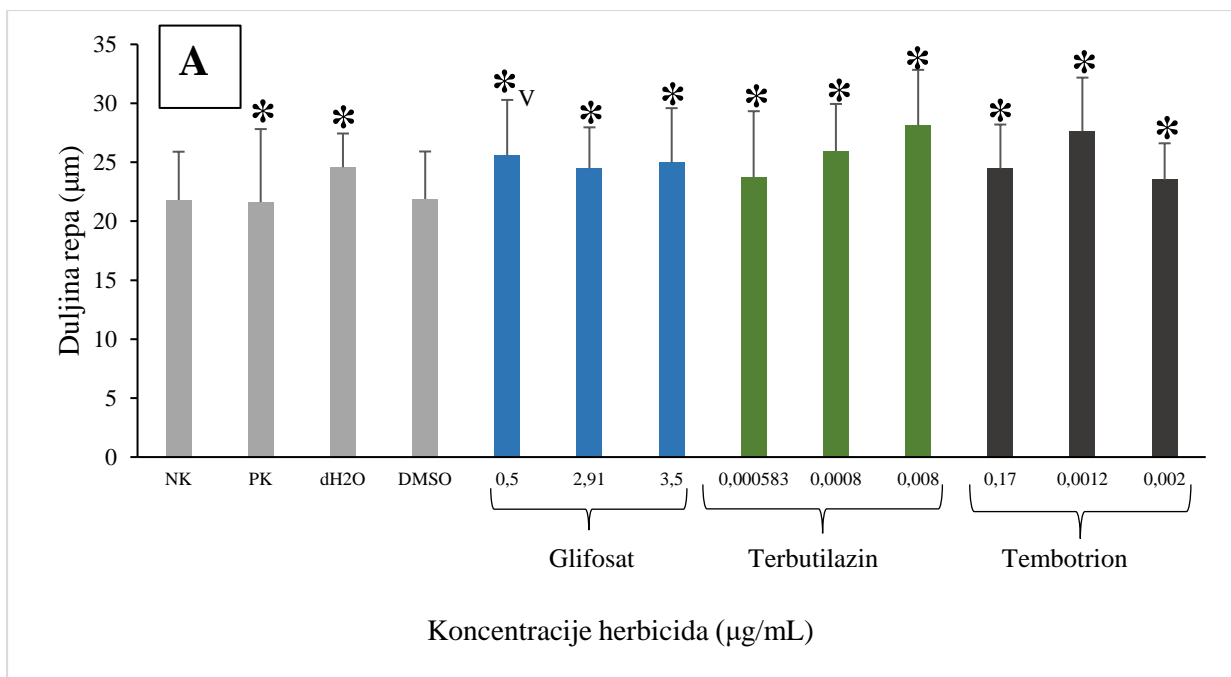
Rezultati alkalnog komet testa *in vitro* na leukocitima ženskog donora, čiji uzorci periferne krvi su izlagani insekticidima i herbicidima 24 sata prikazani su na slici 16, odnosno slici 17.

Izlaganje leukocita ženskog donora klorpirifosu značajno povećava duljinu repa pri koncentraciji 0,000623 µg/mL (REL), dok pri ostalim koncentracijama dolazi do značajnog smanjenja navedenog parametra (Slika 16A). Značajno povećanje intenziteta fluorescencije repa zamjećuje se jedino pri koncentraciji 0,01666 µg/mL (ADI) (Slika 16B). Imidakloprid je doveo do značajnog opadanja vrijednosti duljine repa pri koncentracijama 0,1 µg/mL (ADI) i 0,13 µg/mL (AOEL), te značajnog porasta pri koncentraciji 0,3146 µg/mL (REL) (Slika 16A). Pri koncentraciji 0,1 µg/mL (ADI) dolazi i do značajnog smanjenja intenziteta repa (Slika 16B). Tretman krvi otopinom α -cipermetrina doveo je do povećanja intenziteta repa pri koncentracijama koje predstavljaju doze REL i AOEL, pri čemu je samo kod druge to povećanje značajno u odnosu na DMSO kao otapalo (Slika 16B). Pri koncentracijama koje predstavljaju doze ADI i AOEL dolazi do značajnog povećanja duljine repa (Slika 16A).

Tretman krvi ženskog donora otopinama glifosata u redestiliranoj vodi dovodi do značajnog povećanja duljine repa pri koncentraciji 0,5 µg/mL (ADI) (Slika 17A). Značajno, ali blago povećanje intenziteta zamjećuje se pri koncentraciji od 2,91 µg/mL (REL) (Slika 17B). Pri svim primijenjenim koncentracijama terbutilazin i tembotrion značajno su povećali razinu primarnih oštećenja DNA u vidu duljinerepa kao parametra komet testa (Slika 17A). Međutim, spomenuto povećanje oštećenja DNA je praćeno povećanjem intenziteta samo pri koncentracijama koje predstavljaju ekvivalent dozama AOEL za svaki spomenuti herbicid (Slika 17B).



Slika 16. Prikaz rezultata alkalnog komet testa na leukocitima ženskog donora čija je krv tretirana insekticidima 24 sata u uvjetima in vitro: duljina (A) i intenziteta repa (B) insekticida. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija mjerenja na po 100 nukleoida u triplikatu. NK – negativna kontrola medij RPMI 1640, PK – pozitivna kontrola H_2O_2 0,1 μM , DMSO – dimetilsulfoksid, * - statistički značajno u odnosu na negativnu kontrolu, D – statistički značajno u odnosu na DMSO (Mann-Witney U-test, $p < 0,05$).



Slika 17. Prikaz rezultata alkalnog komet testa na leukocitima ženskog donora čija je krv tretirana herbicidima 24 sata u uvjetima in vitro: duljina (A) i intenziteta repa (B) herbicida. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija mjerenja na 100 nukleoida u triplikatu. NK – negativna kontrola medij RPMI 1640, PK – pozitivna kontrola H₂O₂ 0,1 µM, DMSO – dimetilsulfoksid, * - statistički značajno u odnosu na negativnu kontrolu, V – statistički značajno u odnosu na redestiliranu vodu, D – statistički značajno u odnosu na DMSO (Mann-Witney U-test, p < 0,05).

4.1.2. Mikronukleus test

U mikronukleus testu izlaganje pune krvi muškog donora trima različitim koncentracijama insekticida (Tablica 2), kao ni herbicida terbutilazina (Tablica 3), nije dovelo do povećanja razine sekundarnih oštećenja DNA niti do remećenja kinetike proliferacije limfocita stimuliranih na diobu mitogenom fitohemaglutininom.

Tretman pune krvi muškog donora glifosatom i tembotrionom pokazao je mogući citotoksičan i genotoksičan učinak zabilježen parametrima mikronukleus testa (Tablica 3). Izlaganje pune krvi muškog donora otopini glifosata pri koncentraciji 2,91 µg/mL (REL) dovelo je do povećanja CBPI sugerirajući ubrzano dijeljenje stanica (Tablica 3). Pri koncentraciji 3,5 µg/mL (AOEL) zamjećuje se suprotan učinak na kinetiku proliferacije, usporavanje diobe stanica (Tablica 3). Tembotrion pri svim primijenjenim koncentracijama uzrokuje povećanje učestalosti binuklearnih limfocita s mikronukleusima, pri čemu, pri dvije više koncentracije AOEL i ADI, ujedno djeluje citostatski smanjenjem vrijednosti CBPI (Tablica 3).

Tablica 2. Rezultati mikronukleus testa na limfocitima muškog donora. Puna krv izložena je insekticidima u uvjetima *in vitro* 24 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija, te medijan mjerenja za po 1000 binuklearnih limfocita s kromatinskim oštećenjima u triplikatu, odnosno mjerenja za po 500 limfocita u triplikatu za određivanje kinetike proliferacije.

Tretmani i koncentracije (µg/mL)		Binuklearni limfociti s kromatinskim oštećenjima (Srednja vrijednost ± standardna devijacija Medijan)			Kinetika proliferacije
		MN	NB	NPB	CBPI
Negativna kontrola		3,00 ± 1,00 3,00	1,67 ± 2,89 0,00	0,33 ± 0,58 0,00	1,99 ± 0,22 1,87
DMSO		2,67 ± 1,15 2,00	2,00 ± 1,00 2,00	1,00 ± 1,00 1,00	1,91 ± 0,05 1,90
Pozitivna kontrola		50,00 ± 3,00* 50,00	34,50 ± 10,50* 34,50	5,00 ± 5,00* 5,00	1,51 ± 1,15* 1,51
Klorpirifos	0,01666	1,00 ± 0,00 1,00	3,50 ± 2,12 3,50	0,00 ± 0,00 0,00	2,09 ± 0,15 2,09
	0,000623	2,50 ± 3,54 2,50	1,00 ± 1,41 1,00	0,50 ± 0,71 0,50	2,09 ± 0,13 2,09
	0,0262	1,00 ± 1,00 1,00	4,00 ± 2,00 4,00	0,00 ± 0,00 0,00	1,97 ± 0,21 1,97
Imidakloprid	0,1	4,50 ± 3,54 4,50	2,50 ± 3,54 2,50	0,50 ± 0,71 0,50	2,06 ± 0,08 2,06
	0,3146	1,50 ± 1,50 1,50	0,00 ± 0,00 0,00	0,00 ± 0,00 0,00	2,03 ± 0,14 2,03
	0,13	0,50 ± 0,50 0,50	0,00 ± 0,00 0,00	0,00 ± 0,00 0,00	2,13 ± 0,08 2,13
α-cipermetrin	0,025	1,50 ± 1,50 1,50	1,50 ± 1,50 1,50	0,00 ± 0,00 0,00	2,14 ± 0,10 2,14
	0,003643	2,50 ± 0,50 2,50	1,00 ± 0,00 1,00	0,50 ± 0,50 0,50	2,12 ± 0,09 2,12
	0,262	0,00 ± 0,00 0,00	0,00 ± 0,00 0,00	0,00 ± 0,00 0,00	2,13 ± 0,13 2,13

Negativna kontrola je tretman suviškom medija RPMI 1640 (V = 20 µL) a pozitivna kontrola je tretman mitomicinom C u koncentraciji 1 µg/mL 24 sata. DMSO – dimetilsulfoksid, MN – binuklearne stanice s mikronukleusima, NB – binuklearne stanice s jezgrenim pupovima, NPB – binuklearne stanice s nukleoplazmatskim mostovima, CBPI – indeks proliferacije stanica pod blokadom citokineze.

Tablica 3. Rezultati mikronukleus testa na limfocitima muškog donora. Puna krv izložena je i herbicidima u uvjetima *in vitro* 24 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija, te medijan mjerenja za po 1000 binuklearnih limfocita s kromatinskim oštećenjima u triplikatu, odnosno mjerenja za po 500 limfocita u triplikatu za određivanje kinetike proliferacije.

Tretmani i koncentracije (µg/mL)		Binuklearni limfociti s kromatinskim oštećenjima (Srednja vrijednost ± standardna devijacija Medijan)			Kinetika proliferacije
		MN	NB	NPB	CBPI
Negativna kontrola		3,00 ± 1,00 3,00	1,67 ± 2,89 0,00	0,33 ± 0,58 0,00	1,99 ± 0,22 1,87
DMSO		2,67 ± 1,15 2,00	2,00 ± 1,00 2,00	1,00 ± 1,00 1,00	1,91 ± 0,05 1,90
Pozitivna kontrola		50,00 ± 3,00* 50,00	34,50 ± 10,50* 34,50	5,00 ± 5,00* 5,00	1,51 ± 1,15* 1,51
Glifosat	0,5	5,33 ± 1,15 6,00	1,33 ± 0,58 1,00	0,33 ± 0,58 0,00	2,04 ± 0,05 2,06
	2,91	3,00 ± 2,00 3,00	0,00 ± 0,00 0,00	0,00 ± 0,00 0,00	2,30 ± 0,06* 2,27
	3,5	5,67 ± 0,58 6,00	1,33 ± 1,53 1,00	0,33 ± 0,58 0,00	1,73 ± 0,07* 1,74
Terbutilazin	0,000583	3,00 ± 2,65 4,00	0,00 ± 0,00 0,00	0,00 ± 0,00 0,00	1,96 ± 0,07 1,93
	0,0008	2,00 ± 1,00 2,00	0,00 ± 0,00 0,00	0,33 ± 0,58 0,00	2,00 ± 0,04 2,01
	0,008	4,00 ± 4,00 4,00	0,00 ± 0,00 0,00	0,33 ± 0,58 0,00	2,04 ± 0,06 2,03
Tembotriion	0,17	13,00 ± 5,00* 13,00	0,33 ± 0,58 0,00	0,67 ± 0,58 1,00	1,57 ± 0,05* 1,55
	0,0012	7,00 ± 1,73* 8,00	0,67 ± 0,58 1,00	0,33 ± 0,58 0,00	1,98 ± 0,03 1,98
	0,002	12,33 ± 6,51* 12,00	0,33 ± 0,58 0,00	0,00 ± 0,00 0,00	1,56 ± 0,07* 1,57

Negativna kontrola je tretman suviškom medija RPMI 1640 (V = 20 µL), a pozitivna kontrola je tretman mitomicinom C u koncentraciji 1 µg/mL 24 sata. DMSO – dimetilsulfoksid, MN – binuklearne stanice s mikronukleusima, NB – binuklearne stanice s jezgrenim pupovima, NPB – binuklearne stanice s nukleoplazmatskim mostovima, CBPI – indeks proliferacije stanica pod blokadom citokineze, * - statistički značajno u odnosu na negativnu kontrolu (p<0,05, hi kvadrat test).

U limfocitima periferne krvi ženskog donora izlagane trima koncentracijama insekticida, i trima koncentracijama herbicida terbutilazina u trajanju 24 h u uvjetima *in vitro* nije zapažen genotoksični učinak u vidu pojave sekundarnih oštećenja kromatina, niti citostatski ili proliferacijski u vidu promjene vrijednosti CBPI (Tablica 4 i 5). Ne zamjećuje se ni učinak na učestalost sekundarnih oštećenja DNA niti kinetiku proliferacije niti u izlaganju pune krvi glifosatu odnosno tembotrionu neovisno o primjenjenoj koncentraciji (Tablica 5).

Tablica 4. Rezultati mikronukleus testa na limfocitima ženskog donora. Puna krv izložena je insekticidima u uvjetima *in vitro* 24 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija, te medijan mjerenja za po 1000 binuklearnih limfocita s kromatinskim oštećenjima u triplikatu, odnosno mjerenja za po 500 limfocita u triplikatu za određivanje kinetike proliferacije.

Tretmani i koncentracije (µg/mL)		Binuklearni limfociti s kromatinskim oštećenjima (Srednja vrijednost ± standardna devijacija Medijan)			Kinetika proliferacije
		MN	NB	NPB	CBPI
Negativna kontrola		8,67 ± 1,15 8,00	0,33 ± 0,58 0,33	0,33 ± 0,58 0,33	1,95 ± 0,03 1,96
DMSO		8,33 ± 2,08 9,00	0,33 ± 0,58 0,33	0,00 ± 0,00 0,00	2,10 ± 0,08 2,11
Pozitivna kontrola		53,00 ± 3,50* 53,00	37,80 ± 11,00* 37,80	8,00 ± 3,00* 8,00	1,35 ± 1,15* 1,35
Klorpirifos	0,01666	11,33 ± 3,21 10,00	0,67 ± 1,15 0,00	0,00 ± 0,00 0,00	2,01 ± 0,01 2,01
	0,000623	6,67 ± 2,52 7,00	0,67 ± 0,58 1,00	0,00 ± 0,00 0,00	2,00 ± 0,03 2,01
	0,0262	7,33 ± 1,53 7,00	0,33 ± 0,58 0,00	0,00 ± 0,00 0,00	1,97 ± 0,07 1,93
Imidakloprid	0,10	10,67 ± 4,16 12,00	0,00 ± 0,00 0,00	0,00 ± 0,00 0,00	2,03 ± 0,03 2,03
	0,3146	8,33 ± 1,53 8,00	0,67 ± 0,58 1,00	0,00 ± 0,00 0,00	1,94 ± 0,05 1,95
	0,13	7,33 ± 1,53 7,00	0,00 ± 0,00 0,00	0,00 ± 0,00 0,00	2,04 ± 0,03 2,03
α-cipermetrin	0,025	8,67 ± 3,79 9,00	0,33 ± 0,58 0,00	0,33 ± 0,58 0,00	2,05 ± 0,05 2,05
	0,003643	7,67 ± 2,52 8,00	1,33 ± 1,15 2,00	0,67 ± 1,15 0,00	1,96 ± 0,02 1,95
	0,262	11,33 ± 3,21 10,00	0,67 ± 0,58 1,00	1,00 ± 0,00 1,00	1,98 ± 0,02 1,97

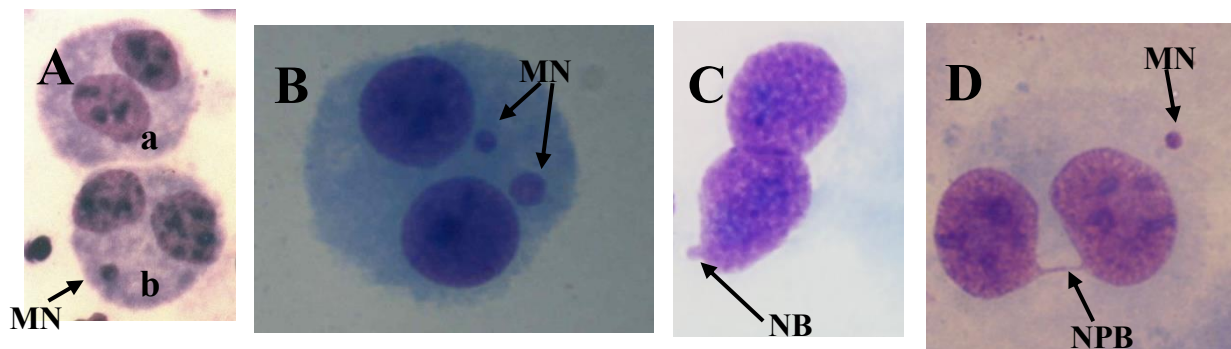
Negativna kontrola je tretman suviškom medija RPMI 1640 (V = 20 µL), a pozitivna kontrola je tretman mitomicinom C u koncentraciji 1 µg/mL 24 sata. DMSO – dimetilsulfoksid, MN – binuklearne stanice s mikronukleusima, NB – binuklearne stanice s jezgrenim pupovima, NPB – binuklearne stanice s nukleoplazmatskim mostovima, CBPI – indeks proliferacije stanica pod blokadom citokineze.

Tablica 5. Rezultati mikronukleus testa na limfocitima ženskog donora. Puna krv izložena je herbicidima u uvjetima *in vitro* 24 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija, te medijan mjerenja za po 1000 binuklearnih limfocita s kromatinskim oštećenjima u triplikatu, odnosno mjerenja za po 500 limfocita u triplikatu za određivanje kinetike proliferacije.

Tretmani i koncentracije (µg/mL)		Binuklearni limfociti s kromatinskim oštećenjima (Srednja vrijednost ± standardna devijacija Medijan)			Kinetika proliferacije
		MN	NB	NPB	CBPI
Negativna kontrola		8,67 ± 1,15 8,00	0,33 ± 0,58 0,33	0,33 ± 0,58 0,33	1,95 ± 0,03 1,96
DMSO		8,33 ± 2,08 9,00	0,33 ± 0,58 0,33	0,00 ± 0,00 0,00	2,10 ± 0,08 2,11
Pozitivna kontrola		53,00 ± 3,50* 53,00	37,80 ± 11,00* 37,80	8,00 ± 3,00* 8,00	1,35 ± 1,15* 1,35
Glifosat	0,5	8,67 ± 5,51 6,00	1,00 ± 1,73 0,00	0,67 ± 1,15 0,00	1,96 ± 0,02 1,95
	2,91	7,00 ± 3,00 7,00	0,00 ± 0,00 0,00	0,33 ± 0,58 0,00	2,01 ± 0,02 2,02
	3,5	9,67 ± 3,21 11,00	1,00 ± 1,00 1,00	1,00 ± 1,00 1,00	2,07 ± 0,04 2,06
Terbutilazin	0,000583	10,33 ± 1,53 10,00	0,33 ± 0,58 0,00	0,00 ± 0,00 0,00	1,90 ± 0,02 1,90
	0,0008	7,67 ± 2,08 7,00	0,00 ± 0,00 0,00	0,33 ± 0,58 0,00	1,93 ± 0,04 1,95
	0,008	8,33 ± 2,08 9,00	0,33 ± 0,58 0,00	0,33 ± 0,58 0,00	1,91 ± 0,00 1,91
Tembotrion	0,17	12,33 ± 3,06 13,00	2,33 ± 1,15 3,00	0,33 ± 0,58 0,00	2,04 ± 0,02 2,04
	0,0012	11,67 ± 1,53 12,00	0,67 ± 0,58 1,00	1,33 ± 1,53 1,00	2,00 ± 0,03 2,01
	0,002	8,33 ± 0,58 8,00	2,33 ± 1,53 2,00	0,67 ± 1,15 0,00	1,97 ± 0,07 1,97

Negativna kontrola je tretman suviškom medija RPMI 1640 (V = 20 µL), a pozitivna kontrola je tretman mitomicinom C u koncentraciji 1 µg/mL 24 sata. DMSO – dimetilsulfoksid, MN – binuklearne stanice s mikronukleusima, NB – binuklearne stanice s jezgrenim pupovima, NPB – binuklearne stanice s nukleoplazmatskim mostovima, CBPI – indeks proliferacije stanica pod blokadom citokineze.

Primjeri binuklearnih stanica sa različitim vrstama kromatinskih oštećenja su prikazani na slici 18.



Slika 18. Fotografije binuklearnih limfocita sa i bez kromatinskih oštećenja vidljivih mikronukleus testom bojanjem Giemsom. Na slici A prikazani su binuklearni limfociti iz pune krvi muškog donora tretirane glifosatom koncentracije 2,91 $\mu\text{g/mL}$. Limfocit a) ne sadrži kromatinsko oštećenje, a limfocit b) sadrži mikronukleus. Na slici B je prikazan binuklearni limfocit s dva mikronukleusa iz krvi muškog donora tretirane terbutilazinom u koncentraciji 0,000583 $\mu\text{g/mL}$. Na slici C nalazi se binuklearni limfocit s jezgrenim pupom iz pune krvi muškog donora tretirane terbutilazinom u koncentraciji 0,000583 $\mu\text{g/mL}$. Slika D prikazuje binuklearni limfocit s mikronukleusom i nukleoplazmatskim mostom iz krvi ženskog donora tretirane klorpirifosom u koncentraciji 0,01666 $\mu\text{g/mL}$.

4.1.3. FISH analiza razdiobe kromosoma

Unatoč izostanku genotoksičnog učinka u mikronukleus testu na stanicama muškog donora, svi insekticidi su remetili pravilnu razdiobu kromosoma 18, 9, X i Y na preparatima binuklearnih limfocita hibridiziranim fluorescentnim sondama za pancentromerne dijelove kromosoma (Tablica 6). Klorpirifos je pokazao najintenzivniji aneugeni učinak povećavajući učestalost pogrešaka u razdvajanju i gubitak svih ispitivanih kromosoma. Ujedno, doveo je do povećanog broja stanica s viškom kromosoma Y (Tablica 6). Slično djelovanje zabilježili smo i za imidakloprid. Njegovo aneugeno djelovanje rezultiralo je gubitkom svih praćenih kromosoma bez učinka na pogreške u razdvajanju kromosoma (Tablica 6). α -cipermetrin nije remenio pravilnu razdiobu kromosoma 18, međutim doveo je do gubitka ostalih kromosoma te pogrešaka u pravilnom razdvajanju kromosoma 9 (Tablica 6).

Tablica 7 prikazuje rezultate analize razdiobe kromosoma 18, 9, X i Y u limfocitima muškog donora, tretiranima herbicidima glifosatom, terbutilazinom i tembotrionom. Svi ispitivani herbicidi pokazali su aneugenu aktivnost remeteći pravilnu razdiobu kromosoma 18 i 9. Najizraženiji aneugeni učinak po oba kromosoma pokazao je glifosat (Tablica 7). Svi ispitivani herbicidi uzrokovali su povećanje gubitka kromosoma Y (Tablica 7). Tembotrion je, ujedno, povećao i udio stanica s istovremenom nulisolomijom i bisomijom za kromosom Y (Tablica 7). Nismo zabilježili značajan utjecaj herbicida na pravilnost razdiobe kromosoma X u limfocitima muškog donora (Tablica 7).

Tablica 6. Rezultati analize razdiobe kromosoma 18, 9, X i Y u binuklearnim limfocitima muškog donora nakon 24-satne izloženosti uzoraka krvi insekticidima. Analizirano je 1000 binuklearnih limfocita. Praćene kategorije objašnjene su na Slici 12.

Kromosom	Tretman i koncentracija ($\mu\text{g/mL}$)	Postotak binuklearnih limfocita s poremećajima u broju i razdiobi kromosoma			
		Manjak kromosoma	Višak kromosoma	Manjak/višak kromosoma	Pogrešna razdioba kromosoma
18	Negativna kontrola	8,40	2,96	1,40	2,20
	Klorpirifos 0,000623	11,60*	2,40	0,40	4,20*
	Imidakloprid 0,10	11,80*	1,20	1,20	2,00
	α -cipermetrin 0,003643	7,80	1,40	1,20	3,80
9	Negativna kontrola	4,00	7,20	1,20	4,20
	Klorpirifos 0,000623	15,60*	7,40	0,60	6,30*
	Imidakloprid 0,10	11,20*	6,40	1,40	3,40
	α -cipermetrin 0,003643	6,00*	7,00	1,20	5,60*
X	Negativna kontrola	1,60	9,20	0,00	2,60
	Klorpirifos 0,000623	6,20*	9,00	0,00	5,00*
	Imidakloprid 0,10	18,40*	8,20	0,00	1,80
	α -cipermetrin 0,003643	1,20*	2,80	0,00	1,60
Y	Negativna kontrola	4,80	7,20	0,00	2,40
	Klorpirifos 0,000623	17,80*	9,00*	0,00	4,90*
	Imidakloprid 0,10	9,00*	2,00	0,00	1,40
	α -cipermetrin 0,003643	6,80*	5,20	0,20	3,00

* - statistički značajno u odnosu na negativnu kontrolu ($p < 0,05$, hi kvadrat test).

Tablica 7. Rezultati analize razdiobe kromosoma 18, 9, X i Y u binuklearnim limfocitima muškog donora nakon 24-satne izloženosti uzoraka krvi herbicidima. Analizirano je 1000 binuklearnih limfocita. Praćene kategorije objašnjene su na Slici 12.

Kromosom	Koncentracija ($\mu\text{g/mL}$)	Postotak binuklearnih limfocita sa poremećajima u broju i razdiobi kromosoma			
		Manjak kromosoma	Višak kromosoma	Manjak/višak kromosoma	Pogrešna razdioba kromosoma
18	Negativna kontrola	8,40	2,96	1,40	2,20
	Glifosat 0,5	6,37	16,28*	2,45	7,70*
	Terbutilazin 0,000583	10,88	6,34*	0,40	3,30
	Tembotrion 0,0012	15,41*	0,00*	0,00*	0,00*
9	Negativna kontrola	4,00	7,20	1,20	4,20
	Glifosat 0,5	7,54*	12,60*	0,60	19,95*
	Terbutilazin 0,000583	5,90*	7,20	1,80	5,25
	Tembotrion 0,0012	13,76*	0,60*	1,80	5,25
X	Negativna kontrola	1,60	9,20	0,00	2,60
	Glifosat 0,5	2,90	0,38*	0,00	0,22*
	Terbutilazin 0,000583	2,76	0,35*	0,29	1,66
	Tembotrion 0,0012	2,94	1,97*	0,54	1,08
Y	Negativna kontrola	4,80	7,20	0,00	2,40
	Glifosat 0,5	34,25*	0,91*	0,00	1,85
	Terbutilazin 0,000583	5,90*	2,22*	0,41	1,48
	Tembotrion 0,0012	61,58*	0,16*	1,84*	1,00

* - statistički značajno u odnosu na negativnu kontrolu ($p < 0,05$, hi kvadrat test).

Ispitivani insekticidi djelovali su aneugeno i na limfocite ženskog donora (Tablica 8). Klorpirifos djeluje na kromosome 9 i X značajno povećavajući udio hipoploidnih i hiperploidnih binuklearnih limfocita (Tablica 8). Ujedno uzrokuje i pogreške u razdiobi kromosoma X (Tablica 8). Imidaklopid djeluje povećavajući hipo- i hiperploidiju kromosoma 9 (Tablica 8). Također značajno povećava hipoploidiju kromosoma X (Tablica 8). α -cipermetrin je značajno povećao hipoploidiju kromosoma 18 i X (Tablica 8).

Svi herbicidi su u limfocitima ženskog donora povećali učestalost gubitka kromosoma X (Tablica 9). Terbutilazin je smanjio učestalost gubitka kromosoma 18, te povećao učestalost gubitka kromosoma 9 (Tablica 9). Pored značajnog smanjenja hipoploidije tembotrion uzrokuje i značajno povećanje hiperploidije kromosoma 18 (Tablica 9).

Tablica 8. Rezultati analize razdiobe kromosoma 18, 9 i X u binuklearnim limfocitima ženskog donora nakon 24-satne izloženosti uzoraka krvi insekticidima. Analizirano je 1000 binuklearnih limfocita. Praćene kategorije objašnjene su na Slici 12.

Kromosom	Koncentracija ($\mu\text{g/mL}$)	Postotak binuklearnih limfocita sa poremećajima u broju i razdiobi kromosoma			
		Manjak kromosoma	Višak kromosoma	Manjak/višak kromosoma	Pogrešna razdioba kromosoma
18	Negativna kontrola	28,26	4,41	0,80	2,40
	Klorpirifos 0,000623	28,83	6,96	0,20	1,00
	Imidakloprid 0,10	24,40	4,40	0,00	0,80
	α -cipermetrin 0,003643	37,47*	3,41	0,80	1,60
9	Negativna kontrola	22,24	5,81	0,40	2,40
	Klorpirifos 0,000623	33,80*	9,94*	0,20	2,19
	Imidakloprid 0,10	42,94*	14,72*	1,00	4,03
	α -cipermetrin 0,003643	26,40	4,00	0,40	1,60
X	Negativna kontrola	13,37	10,00	0,60	1,60
	Klorpirifos 0,000623	19,60*	15,40*	0,80	4,40*
	Imidakloprid 0,10	70,20*	0,60*	0,00	0,20*
	α -cipermetrin 0,003643	87,28*	0,40*	0,20	0,60

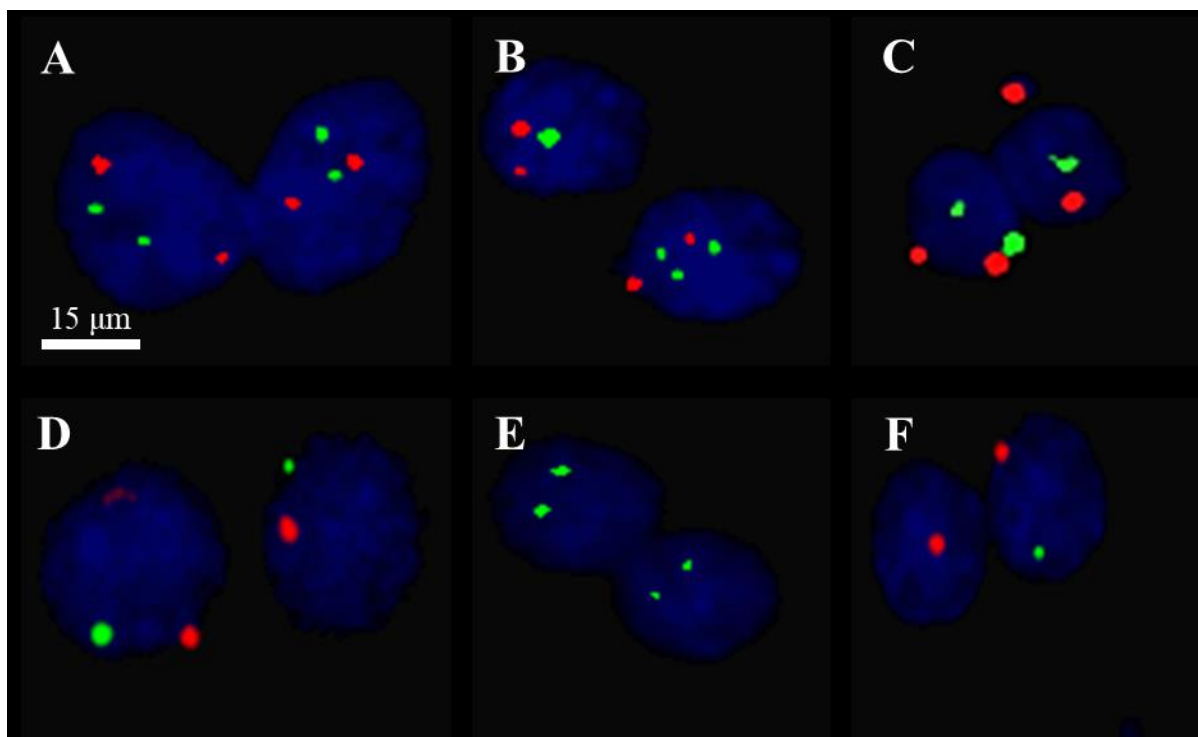
* - statistički značajno u odnosu na negativnu kontrolu ($p < 0,05$, hi kvadrat)

Tablica 9. Rezultati analize razdiobe kromosoma 18, 9 i X u binuklearnim limfocitima ženskog donora nakon 24-satne izloženosti uzoraka krvi herbicidima. Analizirano je 1000 binuklearnih limfocita. Praćene kategorije objašnjene su na Slici 12.

Kromosom	Koncentracija (µg/mL)	Postotak binuklearnih limfocita sa poremećajima u broju i razdiobi kromosoma			
		Manjak kromosoma	Višak kromosoma	Manjak/višak kromosoma	Pogrešna razdioba kromosoma
18	Negativna kontrola	28,26	4,41	0,80	2,40
	Glifosat 0,5	23,86	3,78	0,00	1,79
	Terbutilazin 0,000583	19,52*	4,58	0,20	1,00
	Tembotrion 0,0012	18,20*	11,40*	1,60	1,60
9	Negativna kontrola	22,24	5,81	0,40	2,40
	Glifosat 0,5	18,49	3,18	0,00	1,19
	Terbutilazin 0,000583	38,84*	4,58	0,20	2,60
	Tembotrion 0,0012	19,40	7,40	0,80	2,20
X	Negativna kontrola	13,37	10,00	0,60	1,60
	Glifosat 0,5	71,00*	2,00*	0,60	1,20
	Terbutilazin 0,000583	31,86*	1,60*	1,00	1,00
	Tembotrion 0,0012	77,40*	1,00*	0,20	0,80

* - statistički značajno u odnosu na negativnu kontrolu ($p < 0,05$, hi kvadrat test).

Primjeri fotografija jezgara binuklearnih limfocita s različitim stanjima ploidijske prikazani su na slici 19.

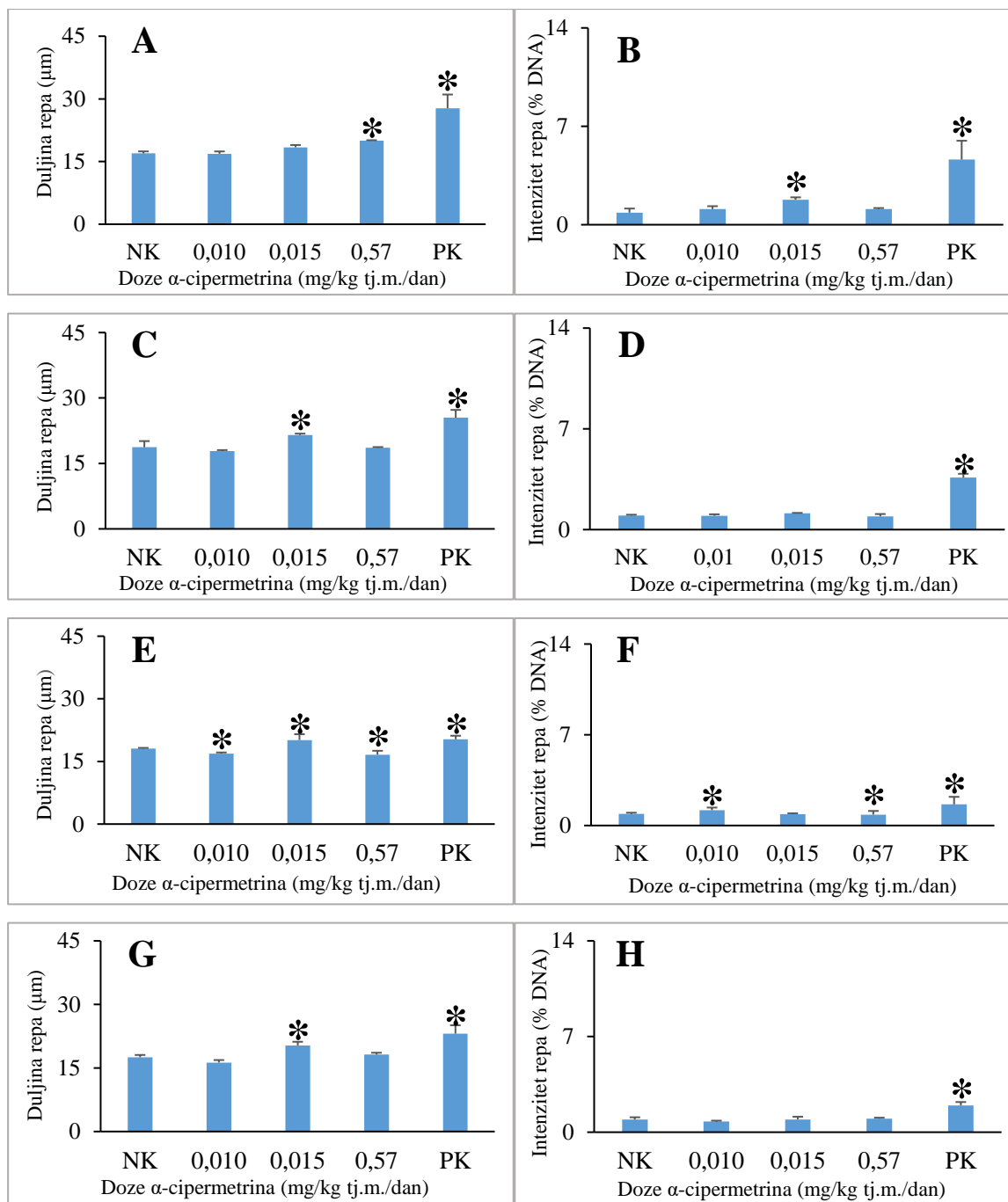


Slika 19. Fotografije jezgara binuklearnih limfocita iz uzoraka krvi tretiranih pesticidima s različitim oblicima ploidije. Zeleni signali predstavljaju centromere kromosoma 18 (A-C), te kromosoma X (D-F). Crveni signali predstavljaju centromere kromosoma 9 (A-C), te kromosoma Y (D i F). Jezgre su obojane DAPI-jem. (A) euploidna stanica iz krvi ženskog donora tretirane terbutilazinom u koncentraciji 0,000583 $\mu\text{g}/\text{mL}$ s uobičajenom raspodjelom kromosoma 18 i 9, (B) stanica iz krvi ženskog donora tretirane α -cipermetrinom u koncentraciji 0,003643 $\mu\text{g}/\text{mL}$ s pogrešnom razdiobom jednog kromosoma 18, (C) stanica iz krvi ženskog donora tretirane klorpirifosom u koncentraciji 0,000623 $\mu\text{g}/\text{mL}$ s gubitkom jednog kromosoma 18 i s dodatnim gubitkom jednog kromosoma 9 u mikronukleusu, (D) euploidna stanica iz krvi muškog donora negativne kontrole s uobičajenom raspodjelom kromosoma X i Y u muškog donora, (E) euploidna stanica iz krvi ženskog donora tretirane klorpirifosom u koncentraciji 0,000623 $\mu\text{g}/\text{mL}$ s uobičajenom raspodjelom kromosoma X, (F) stanica iz krvi muškog donora tretirane imidaklopridom u dozi 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ s gubitkom jednog kromosoma X i uobičajenom raspodjelom kromosoma Y.

4.2. Istraživanja u uvjetima *in vivo*

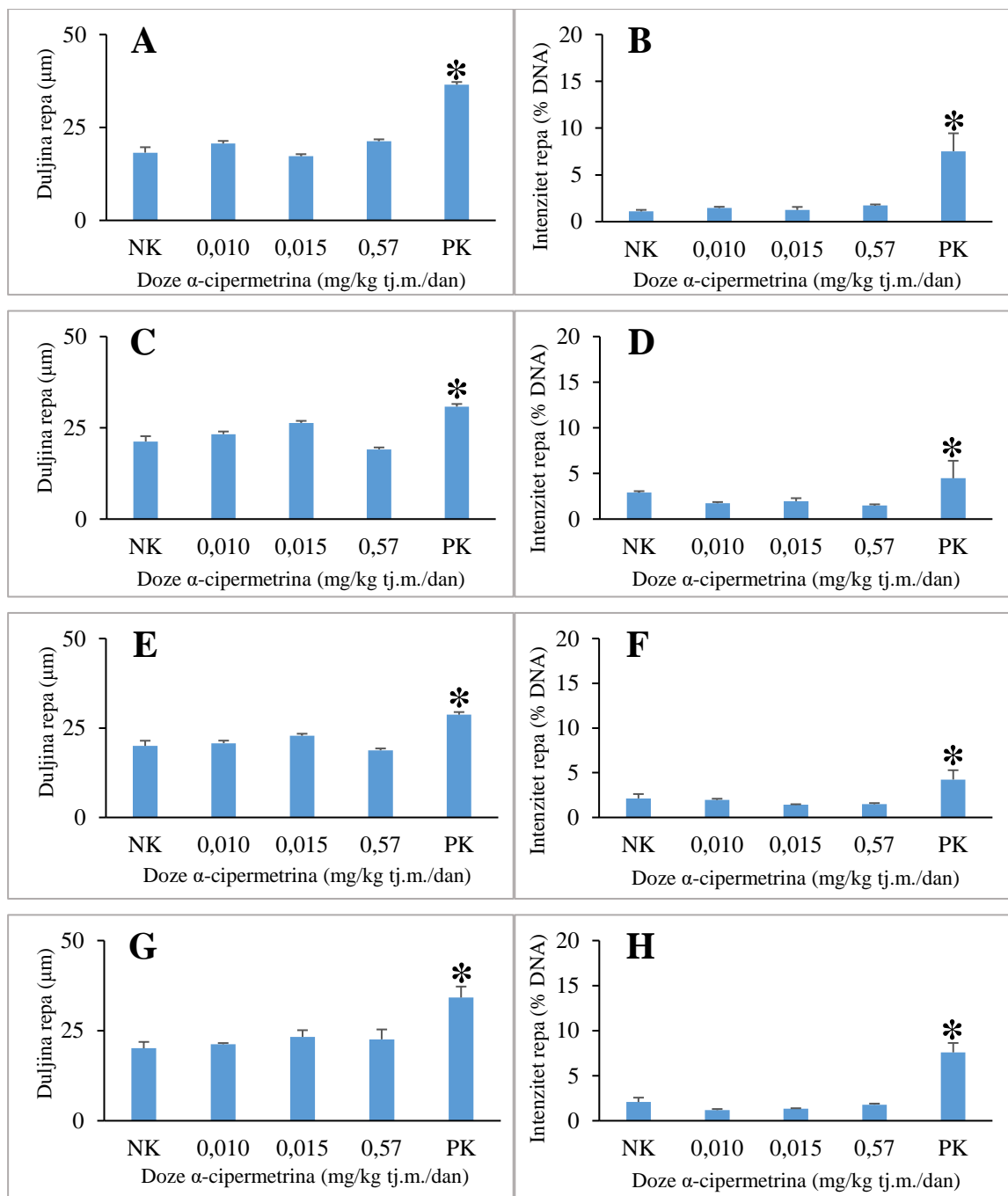
4.2.1. Alkalni komet test na odraslim štakoricama

Rezultati alkalnog komet testa u uvjetima *in vivo* na leukocitima gravidnih i/ili dojećih štakorica soja Wistar izlaganima trima dozama α -cipermetrina su prikazani na Slici 20.. U štakorica žrtvovanih unutar 24 h nakon okota dolazi do značajnog povećanja duljine repa u odnosu na negativnu kontrolu pri dozi 0,57 mg/kg tj.m./dan (1/100 LD₅₀) (Slika 20A), odnosno značajnog povećanja intenziteta repa pri dozi 0,015 mg/kg tj.m./dan (AOEL) (Slika 20B). Kod štakorica žrtvovanih nakon odbijanja od mladunaca jedini značajni učinak na indukciju primarnih oštećenja zamijećen je u vidu povećanja vrijednosti duljine repa u leukocitima pri dozi 0,015 mg/kg tj.m./dan (AOEL) (Slika 20C i 20G). Kod štakorica žrtvovanih nakon ulaska njihovih mladunaca u pubertet dolazi do značajnog povećanja duljine repa pri dozi 0,015 mg/kg tj.m./dan (AOEL) (Slika 20E), odnosno značajnog povećanja intenziteta repa pri dozi 0,010 mg/kg tj.m./dan (ADI) (Slika 20F).



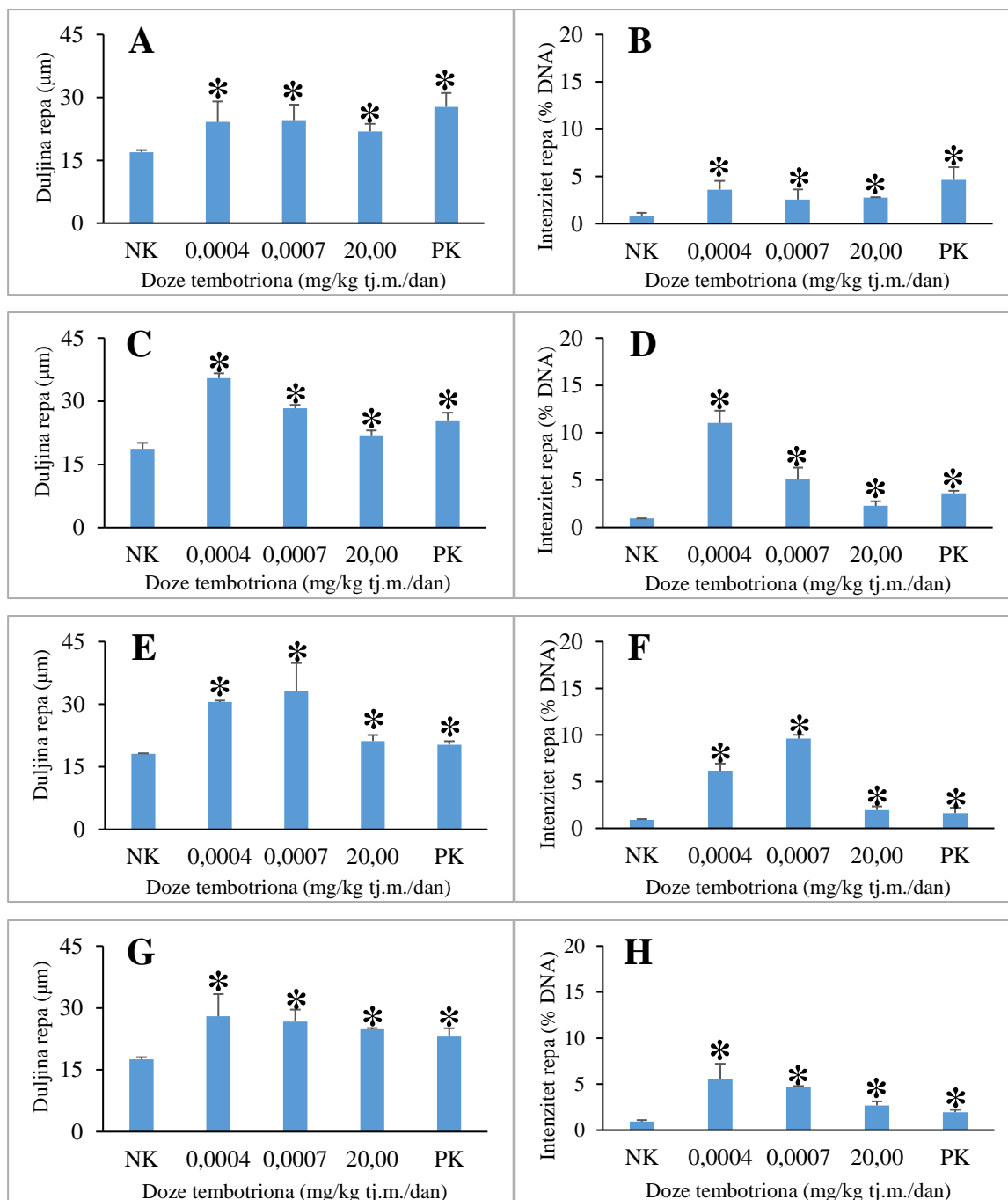
Slika 20. Rezultati alkalnog komet testa *in vivo* na leukocitima majki izloženih α -cipermetrinu. Prikazani su duljina i intenzitet repa tretmana nakon gestacije (A,B), nakon tretmana tijekom gestacije i laktacije sa žrtvovanjem nakon odbijanja (C, D), nakon ulaska mladunaca u pubertet (E, F), te nakon tretmana isključivo tijekom laktacije (G, H). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD mjerenja na 3 životinje po dozi. Analizirano je 150 nukleoida u triplicatu. NK – negativna kontrola (redestilirana voda), PK – pozitivna kontrola (ciklofosfamid u dozi 5 mg/kg t.j.m./dan). * - statistički značajno u odnosu na NK ($p < 0,05$, Mann-Witney U test).

Rezultati alkalnog komet testa u uvjetima *in vivo* na stanicama jetre gravidnih i/ili dojećih štakorica soja Wistar izlaganima trima dozama α -cipermetrina su prikazani na Slici 21. Ni u jednoj skupini niti u bilo kojoj točki žrtvovanja nismo zamijetili značajnu indukciju primarnih oštećenja DNA u odnosu na negativnu kontrolu.



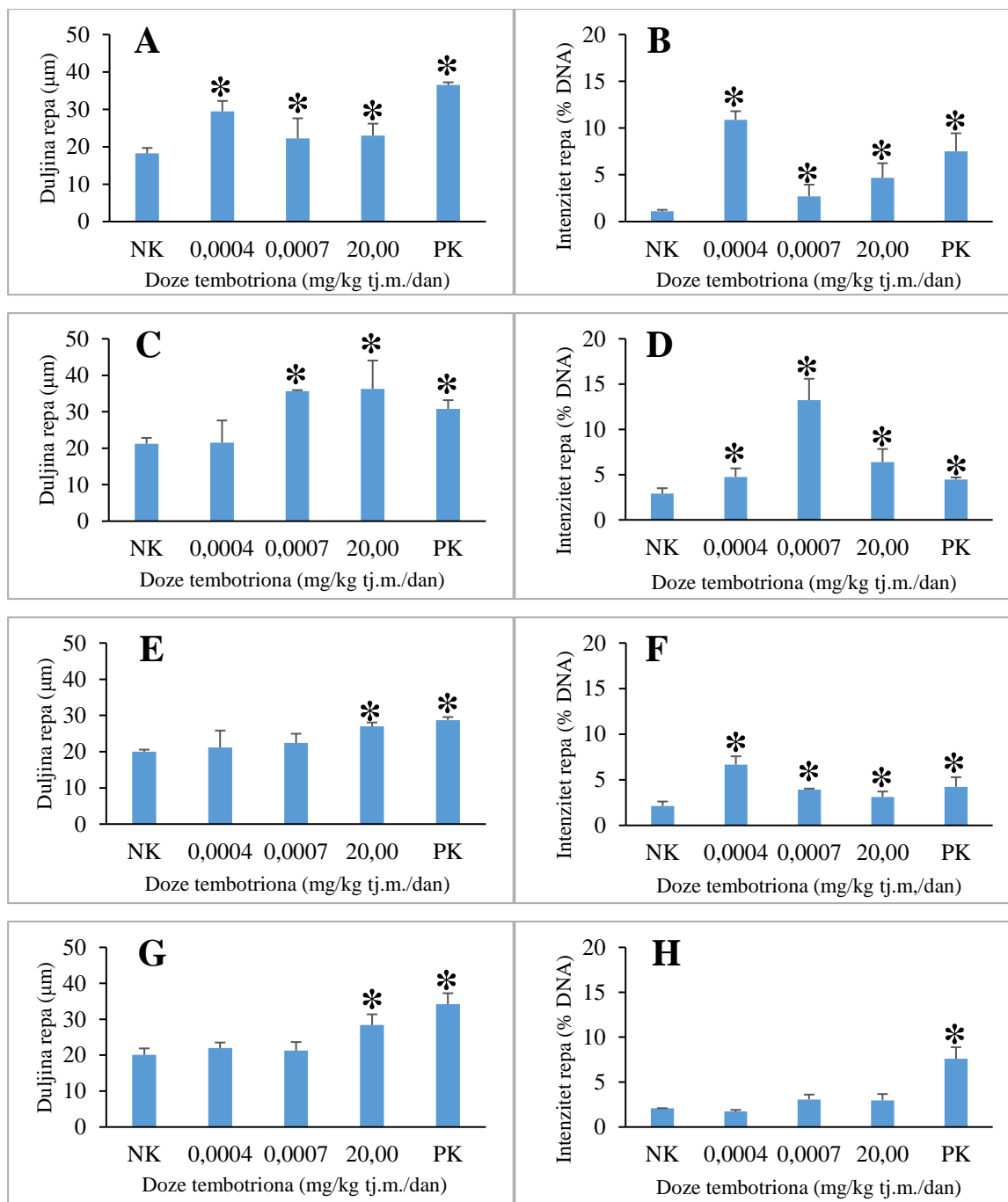
Slika 21. Rezultati alkalnog komet testa *in vivo* na stanicama jetre majki izloženih α -cipermetrinu. Prikazani su duljina odnosno intenzitet repa tretmana tijekom gestacije (A,B), nakon tretmana tijekom gestacije i laktacije sa žrtvovanjem nakon odbijanja (C, D), nakon ulaska mladunaca u pubertet (E, F), te nakon tretmana tretmana isključivo tijekom laktacije (G, H). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD mjerenja na 3 životinje po dozi. Analizirano je 150 nukleoida u triplicatu. NK – negativna kontrola (redestilirana voda), PK – pozitivna kontrola (ciklofosfamid u dozi 5 mg/kg tj.m./dan) * - statistički značajno u odnosu na NK ($p < 0,05$, Mann-Witney U test).

Rezultati alkalnog komet testa u uvjetima *in vivo* na leukocitima gravidnih i/ili doječih štakorica soja Wistar izlaganima trima dozama tembotriona prikazani su na Slici 22. Pri izlaganju štakorica tembotrionu došlo je do značajnog genotoksičnog učinka u vidu povećanja razine primarnih oštećenja DNA.. Značajno su povećane vrijednosti obaju parametara komet testa u odnosu na negativnu kontrolu u svim tretmanima i svim točkama žrtvovanja (Slika 22(A-H)).



Slika 22. Rezultati alkalnog komet testa u uvjetima *in vivo* na leukocitima majki izloženih tembotrionu. Prikazani su duljina i intenzitet repa nakon tretmana tijekom gestacije (A, B), tretmana tijekom gestacije i laktacije sa žrtvovanjem nakon odbijanja (C, D), majki žrtvovanih nakon ulaska mladunaca u pubertet (E, F), te nakon tretmana isključivo tijekom laktacije (G, H). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD mjerenja na 3 životinje po dozi. Analizirano je 150 nukleoida u triplikatu. NK – negativna kontrola (redestilirana voda), PK – pozitivna kontrola (ciklofosamid u dozi 5 mg/kg tj.m./dan) * - statistički značajno u odnosu na NK ($p < 0,05$, Mann-Witney U test).

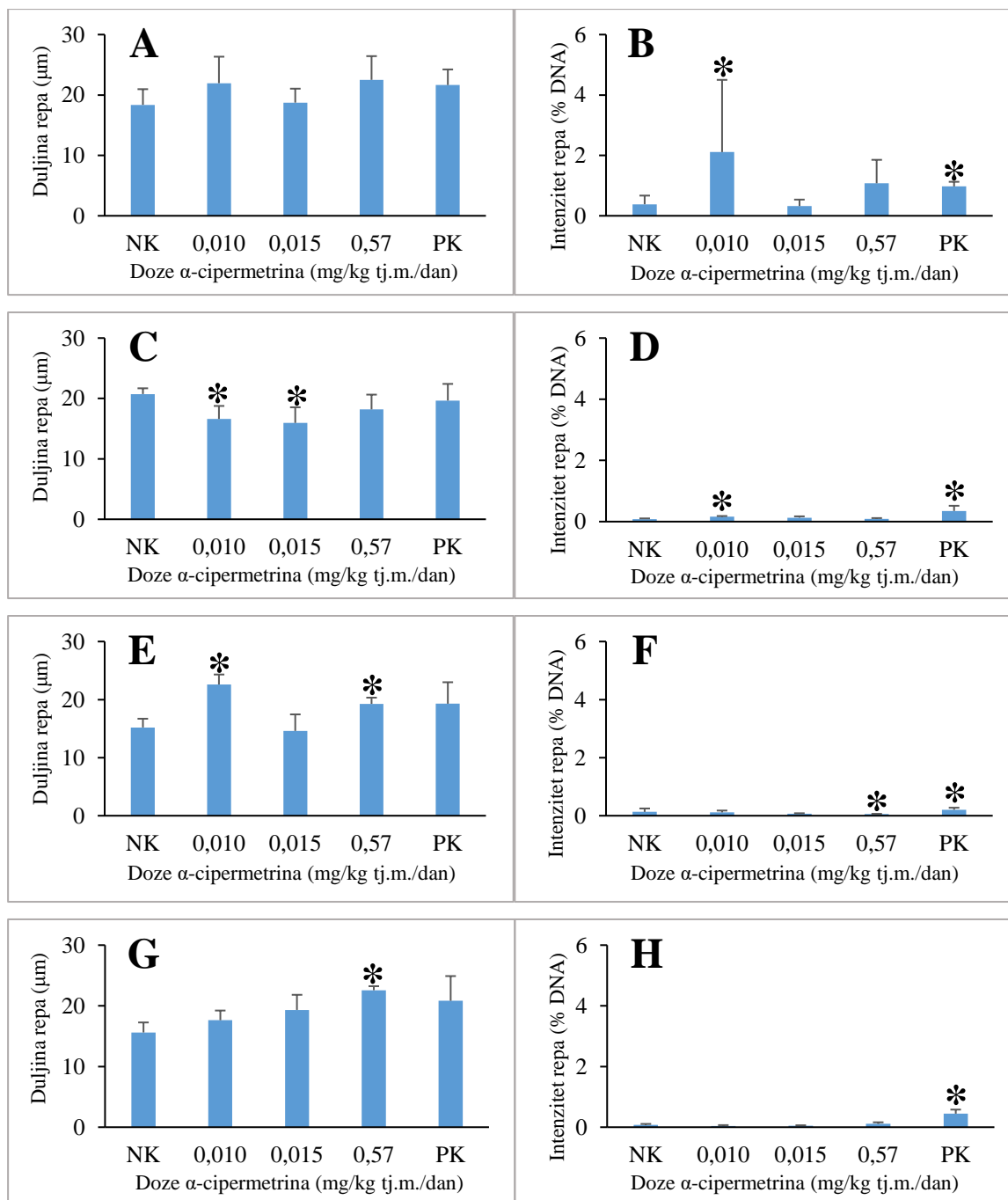
Rezultati alkalnog komet testa u uvjetima *in vivo* na stanicama jetre gravidnih i/ili dojećih štakorica soja Wistar izlaganima trima dozama tembotriona prikazani su na Slici 23. Kao i kod leukocita, u jetri štakorica žrtvovanih 24 h nakon okota dolazi do značajnog porasta duljine i intenziteta repa u odnosu na negativnu kontrolu (Slika 23(A-B)). U štakorica tretiranih isključivo tijekom laktacije i žrtvovanim nakon odbijanja od mladunaca zamijetili smo značajan porast duljine repa u odnosu na negativnu kontrolu pri dozi 20 mg/kg tj.m./dan (Slika 23G). Kod štakorica tretiranih tijekom gestacije i laktacije te žrtvovanih nakon odbijanja došlo je do značajnog porasta duljine repa pri dozama 0,0007 i 20 mg/kg tj.m./dan (Slika 23C) te intenziteta repa pri svim dozama (Slika 23D). Nakon prestanka tretmana i ulaska mladunaca u pubertet još uvijek dolazi do značajnog povećanja intenziteta repa pri svim dozama u odnosu na negativnu kontrolu (Slika 23F), dok je duljina repa značajno povećana tek pri dozi od 20 mg/kg tj.m./dan (Slika 23E).



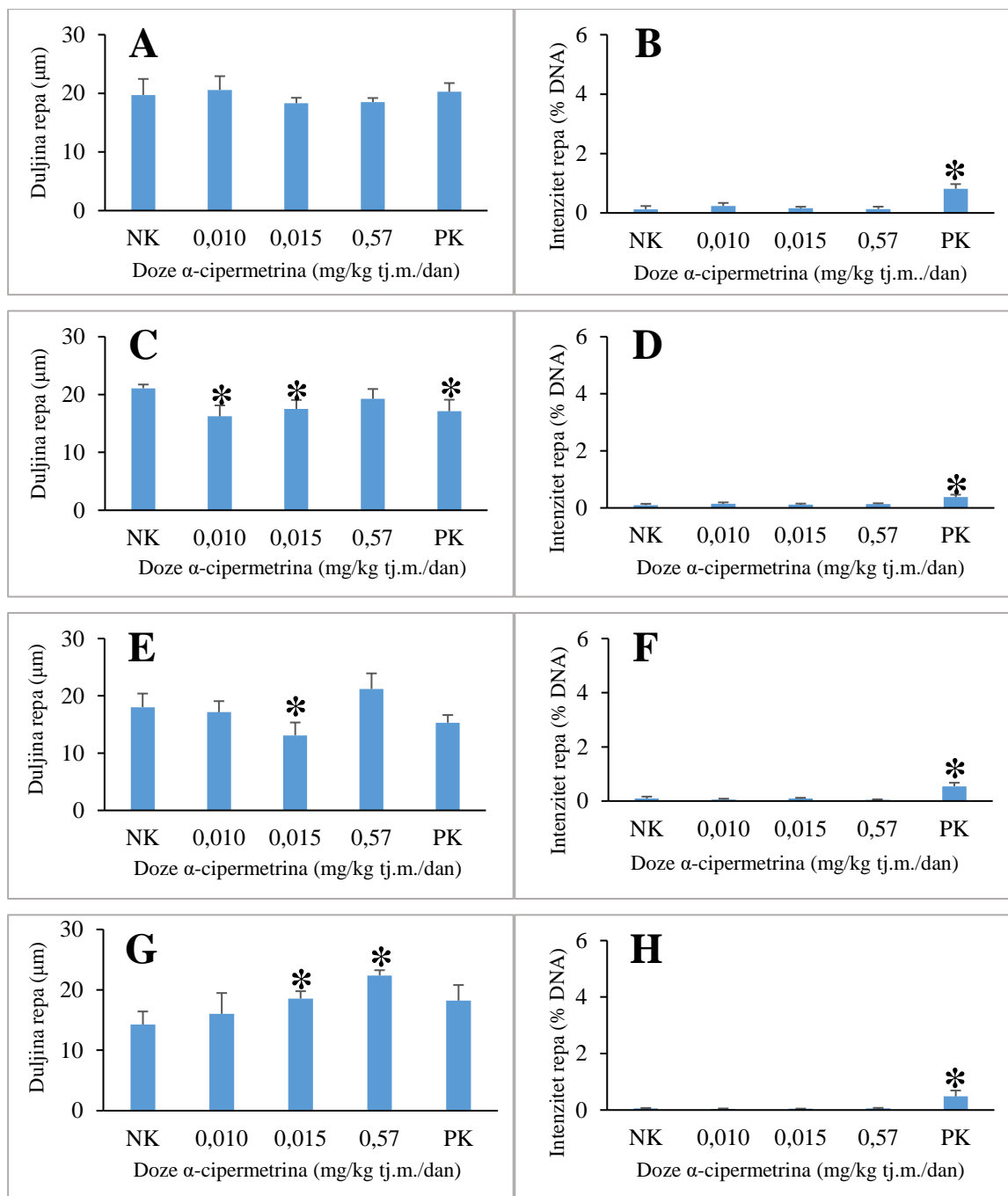
Slika 23. Rezultati alkalnog komet testa u uvjetima in vivo na stanicama jetre majki izloženih tembotrionu. Prikazani su duljina i intenzitet repa nakon tretmana tijekom gestacije (A, B), tretmana dodatno tijekom gestacije i laktacije sa žrtvovanjem nakon odbijanja (C, D), majki žrtvovanih nakon ulaska mladunaca u pubertet (E, F), te nakon tretmana isključivo tijekom laktacije (G, H). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD mjerenja na 3 životinje po dozi. Analizirano je 150 nukleoida u triplikatu. NK – negativna kontrola (redestilirana voda), PK – pozitivna kontrola (ciklofosamid u dozi 5 mg/kg tj.m./dan) * - statistički značajno u odnosu na NK ($p < 0,05$, Mann-Witney U test).

4.2.2. Alkalni komet test na mladuncima

Slike 24 i 25 prikazuju rezultate alkalnog komet testa u uvjetima *in vivo* na leukocitima mladunaca muškog i ženskog spola čije su majke izlagane α -cipermetrinu. Najizraženije povećanje primarnih oštećenja DNA zabilježeno je nakon tretmana ženki tijekom gestacije i to u vidu povećanja vrijednosti intenziteta fluorescencije repa u muških mladunaca pri dozi 0,010 mg/kg tj.m./dan (Slika 24B). Kod ženskih mladunaca nije utvrđen genotoksičan učinak ni u vidu povećanja vrijednosti duljine repa ni intenziteta (Slika 25(A-B)). Kod mladunaca majki izlaganih isključivo tijekom perioda laktacije, doza od 0,57 mg/kg tj.m./dan (1/100 LD₅₀) uzrokovala je značajan porast duljine repa u odnosu na negativnu kontrolu u mladunaca obaju spolova (Slike 24G i 25G). U mladunaca žrtvovanih nakon odbijanja od majki izlaganih tijekom gestacije i laktacije utvrdili smo povećanja intenziteta repa kod muških mladunaca pri dozi 0,010 mg/kg tj.m./dan (ADI) (Slika 24D). Nakon ulaska mladunaca u pubertet zabilježili smo značajna povećanja duljine repa u odnosu na negativnu kontrolu pri dozama 0,010 mg/kg tj.m./dan (ADI) i 0,57 mg/kg tj.m./dan (1/100 LD₅₀) u mladunaca muškog spola (Slika 24E).

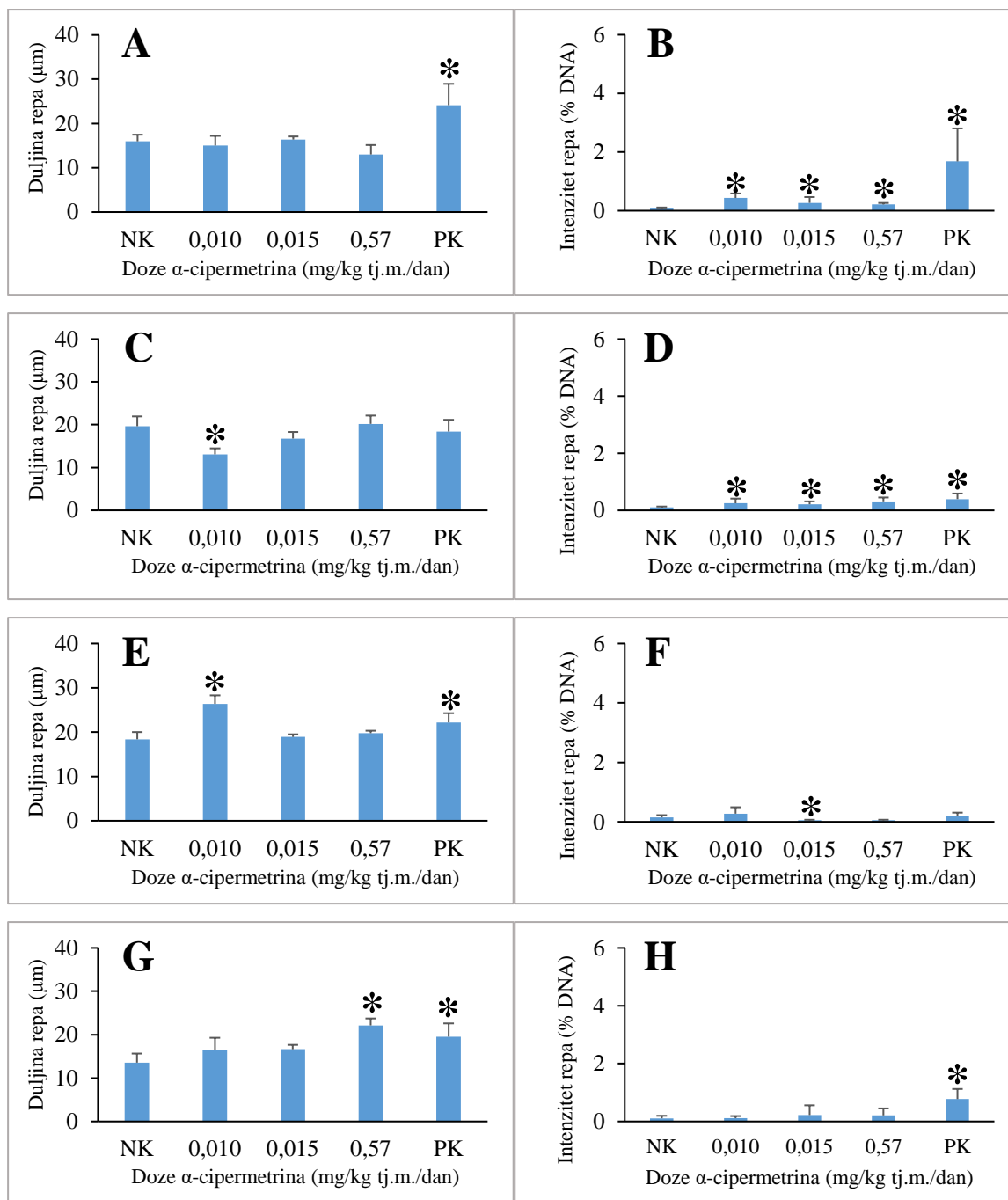


Slika 24. Rezultati alkalnog komet testa (duljina i intenzitet repa) u uvjetima *in vivo* na leukocitima muških mladunaca majki svakodnevno izloženih α -cipermetrinu tijekom: gestacije i žrtvovanja nakon okota (A,B); gestacije i laktacije i žrtvovanja nakon odbijanja (C, D); gestacije i laktacije i žrtvovanja nakon ulaska mladunaca u pubertet (E, F), laktacije i žrtvovanja nakon odbijanja (G, H). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD mjerenja na 5 životinja po dozi. Analizirano je 150 nukleoida u triplikatu. NK – negativna kontrola (redestilirana voda), PK – pozitivna kontrola (ciklofosamid u dozi 5 mg/kg tj.m./dan). * - statistički značajno u odnosu na NK ($p < 0,05$, Mann-Witney U test).

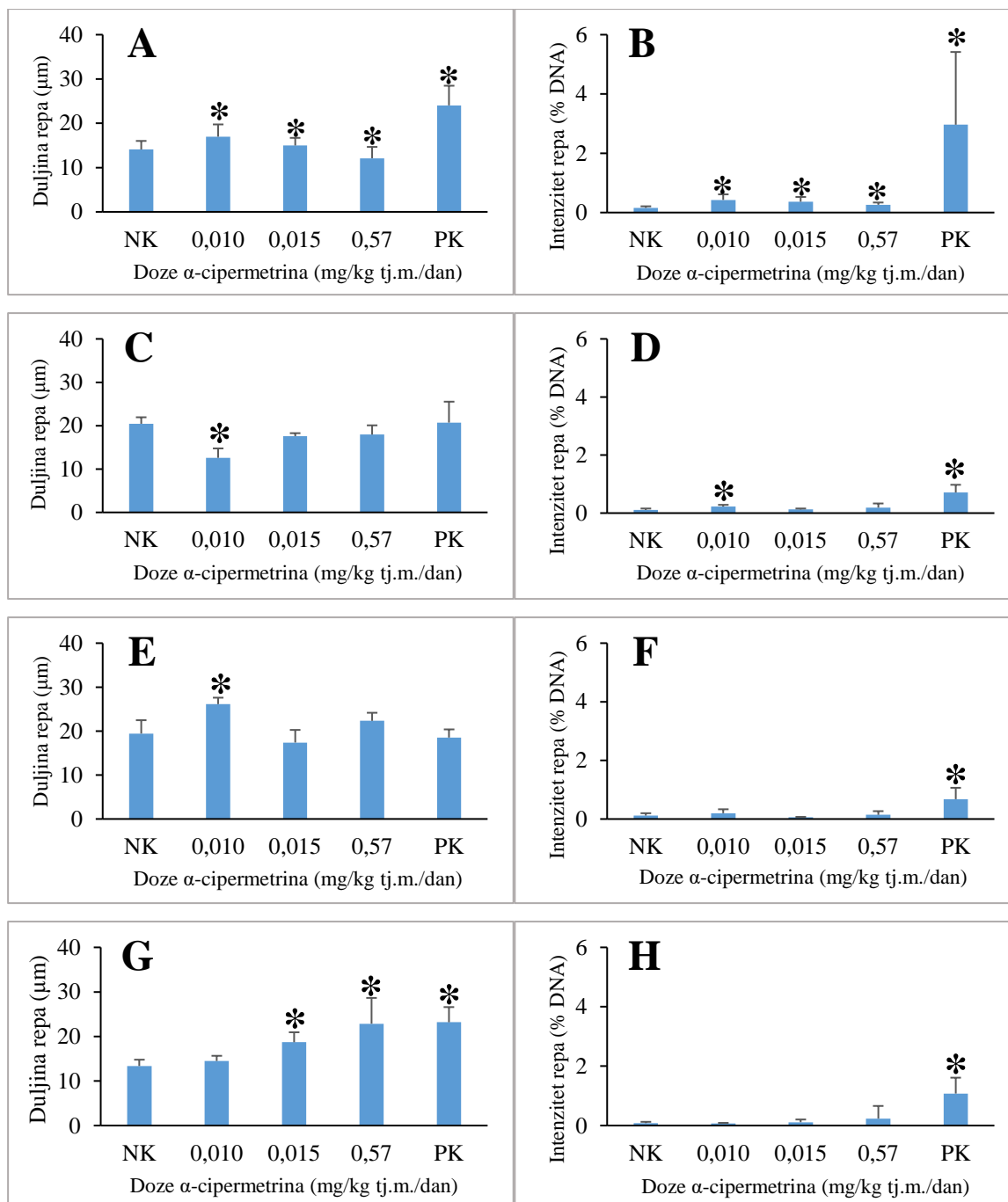


Slika 25. Rezultati alkalnog komet testa (duljina i intenzitet repa) u uvjetima *in vivo* na leukocitima ženskih mladunaca majki svakodnevno izloženih α -cipermetrinu tijekom: gestacije i žrtvovanja nakon okota (A,B); gestacije i laktacije i žrtvovanja nakon odbijanja (C, D); gestacije i laktacije i žrtvovanja nakon ulaska mladunaca u pubertet (E, F), laktacije i žrtvovanja nakon odbijanja (G, H). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD mjerenja na 5 životinja po dozi. Analizirano je 150 nukleoida u triplikatu. NK – negativna kontrola (redestilirana voda), PK – pozitivna kontrola (ciklofosamid u dozi 5 mg/kg tj.m./dan). * - statistički značajno u odnosu na NK ($p < 0,05$, Mann-Witney U test).

Slike 26 i 27 prikazuju rezultate alkalnog komet testa u uvjetima *in vivo* na stanicama jetre mladunaca muškog i ženskog spola majki tretiranih α -cipermetrinom. U stanicama jetre najizraženiji genotoksični učinak u vidu nastanka primarnih oštećenja zamijetili smo u mladuncima majki tretiranih tijekom gestacije do okota (Slika 26B odnosno 27B). Tretman štakorica tijekom laktacije doveo je do značajnog povećanja vrijednosti duljine repa u odnosu na negativnu kontrolu pri dozi 0,57 mg/kg tj.m./dan (1/100 LD₅₀) u mladunaca oba spola, te dodatno pri dozi 0,015 mg/kg tj.m./dan (AOEL) u ženskih mladunaca (Slike 26G i 27G). U muškim mladuncima žrtvovanim nakon odbijanja čije su majke tretirane tijekom gestacije i laktacije zabilježili smo značajan porast vrijednosti intenziteta repa u odnosu na negativnu kontrolu pri svim dozama (Slika 26D), dok je kod ženskih mladunaca tako značajan porast intenziteta repa bio vidljiv samo pri dozi 0,010 mg/kg tj.m./dan (ADI) (Slika 27D). Nakon ulaska mladunaca u pubertet dolazi do značajnog povećanja duljine repa u odnosu na negativnu kontrolu pri dozi 0,010 mg/kg tj.m./dan (ADI) (Slike 26E i 27E).

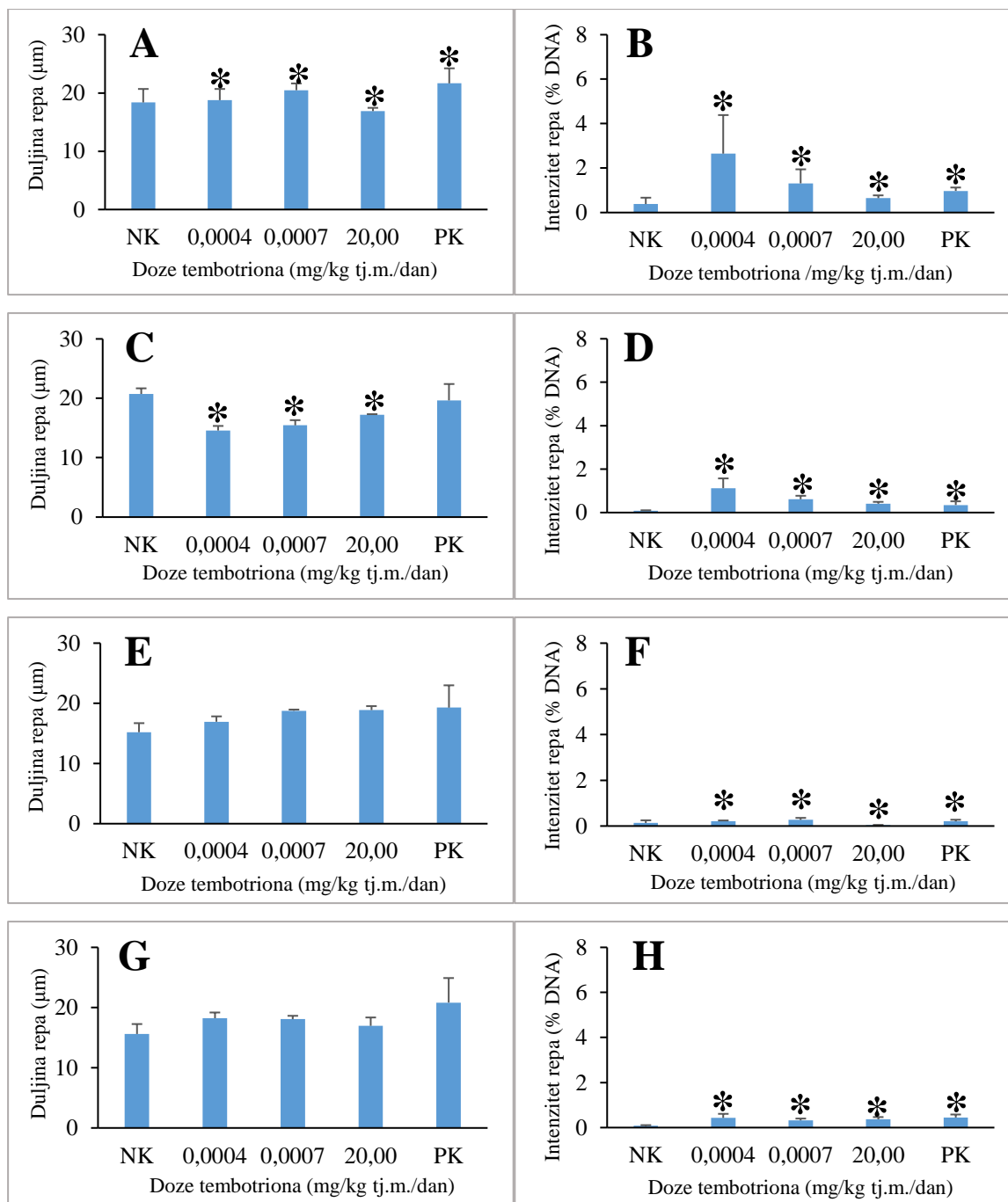


Slika 26. Rezultati alkalnog komet testa (duljina i intenzitet repa) u uvjetima *in vivo* na stanicama jetre muških mladunaca majki svakodnevno izloženih α -cipermetrinu tijekom: gestacije i žrtvovanja nakon okota (A,B); gestacije i laktacije i žrtvovanja nakon odbijanja (C, D); gestacije i laktacije i žrtvovanja nakon ulaska mladunaca u pubertet (E, F), laktacije i žrtvovanja nakon odbijanja (G, H). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD mjerenja na 5 životinja po dozi. Analizirano je 150 nukleoida u triplikatu. NK – negativna kontrola (redestilirana voda), PK – pozitivna kontrola (ciklofosfamid u dozi 5 mg/kg tj.m./dan). * - statistički značajno u odnosu na NK ($p < 0,05$, Mann-Witney U test).

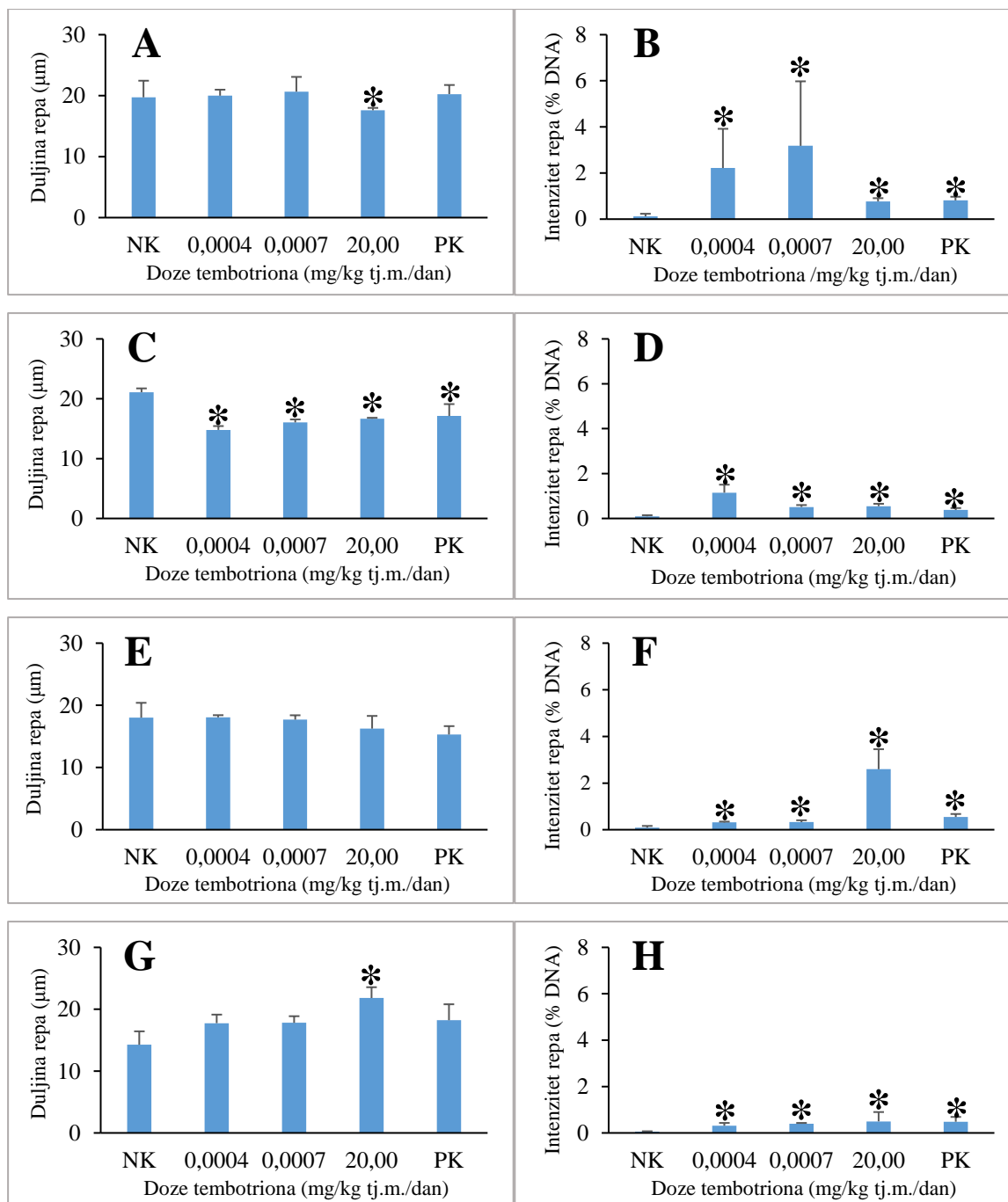


Slika 27. Rezultati alkalnog komet testa (duljina i intenzitet repa) u uvjetima *in vivo* na stanicama jetre ženskih mladunaca majki svakodnevno izloženih α -cipermetrinu tijekom: gestacije i žrtvovanja nakon okota (A, B); gestacije i laktacije i žrtvovanja nakon odbijanja (C, D); gestacije i laktacije i žrtvovanja nakon ulaska mladunaca u pubertet (E, F), laktacije i žrtvovanja nakon odbijanja (G, H). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD mjerenja na 5 životinja po dozi. Analizirano je 150 nukleoida u triplikatu. NK – negativna kontrola (redestilirana voda), PK – pozitivna kontrola (ciklofosamid u dozi 5 mg/kg tj.m./dan). * - statistički značajno u odnosu na NK ($p < 0,05$, Mann-Witney U test).

Rezultati alkalnog komet testa u uvjetima *in vivo* na leukocitima mladunaca majki izlaganih tembotrionu prikazani su na Slici 28 za mladunce muškog i Slici 29 za mladunce ženskog spola. Najizraženiji genotoksični učinak u vidu značajnog porasta vrijednosti intenziteta repa u odnosu na negativnu kontrolu zamijetili smo u mladuncima oba spola žrtvovanim nakon okota (Slike 28B i 29B). Značajan porast vrijednosti intenziteta repa u odnosu na negativnu kontrolu vidljiv je i u mladunaca oba spola majki tretiranih tijekom laktacije (Slika 28H i 29H). Dodatno kod ženskih mladunaca dolazi do značajnog porasta duljine repa u odnosu na negativnu kontrolu pri dozi 20 mg/kg tj.m./dan (1/500 LD₅₀) (Slika 29G). Porast intenziteta repa je značajan u odnosu na negativnu kontrolu i u mladunaca žrtvovanih nakon odbijanja od majki tretiranih tijekom gestacije i laktacije (Slike 28D i 29D). Nakon ulaska muških mladunaca u pubertet zabilježili smo značajno povećanje vrijednosti intenziteta repa pri dozama 0,0004 i 0,0007 mg/kg tj.m./dan (ADI i AOEL) (Slika 28F), dok smo kod ženskih mladunaca uočili značajno povećanje vrijednosti intenziteta repa u odnosu na negativnu kontrolu pri svim dozama (Slika 29F).

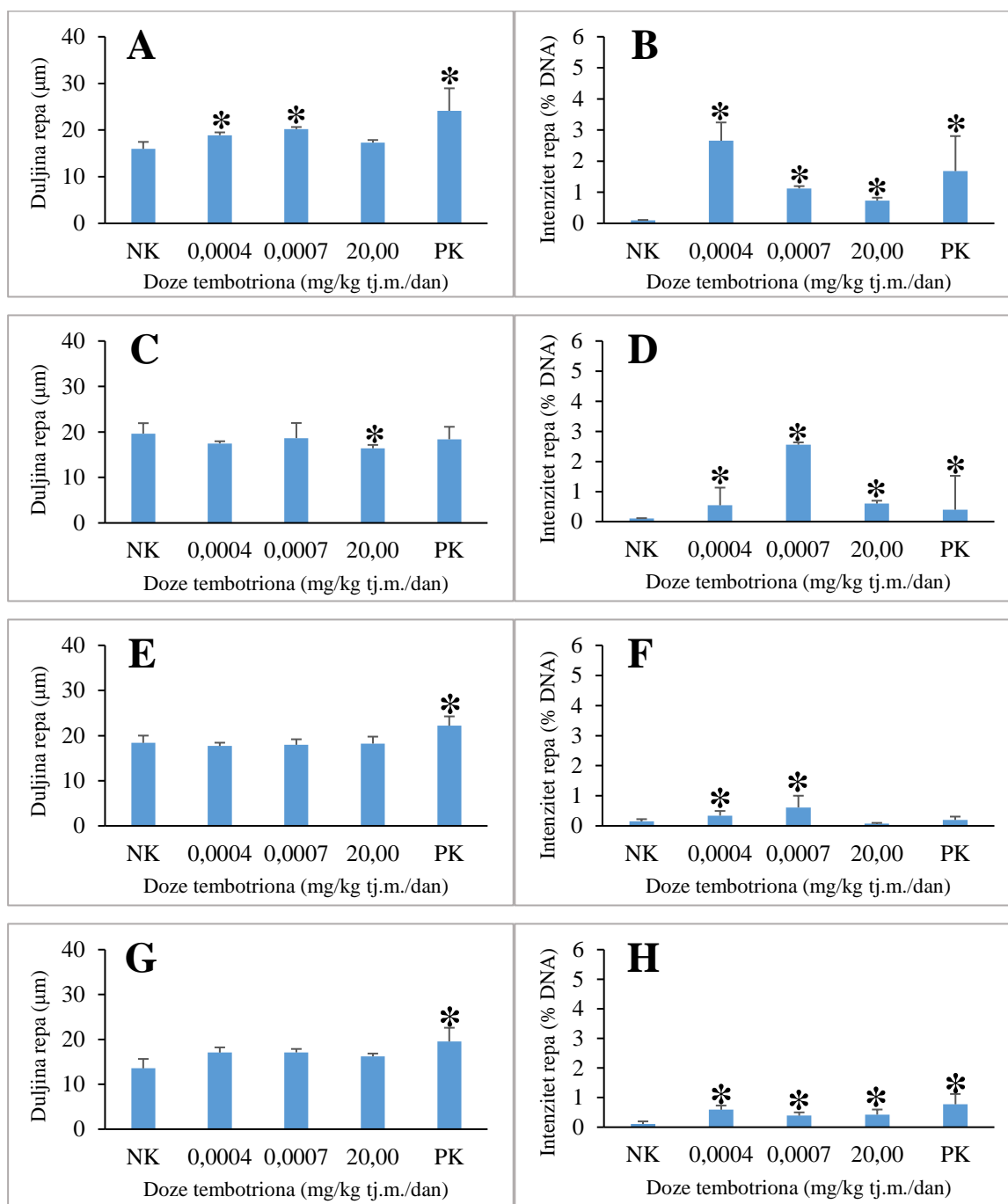


Slika 28. Rezultati alkalnog komet testa (duljina i intenzitet repa) u uvjetima *in vivo* na leukocitima muških mladunaca majki svakodnevno izloženih tembotrionu tijekom: gestacije i žrtvovanja nakon okota (A,B); gestacije i laktacije i žrtvovanja nakon odbijanja (C, D); gestacije i laktacije i žrtvovanja nakon ulaska mladunaca u pubertet (E, F), laktacije i žrtvovanja nakon odbijanja (G, H). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD mjerenja na 5 životinja po dozi. Analizirano je 150 nukleoida u triplikatu. NK – negativna kontrola (redestilirana voda), PK – pozitivna kontrola (ciklofosamid u dozi 5 mg/kg t.j.m./dan). * - statistički značajno u odnosu na NK ($p < 0,05$, Mann-Witney U test).

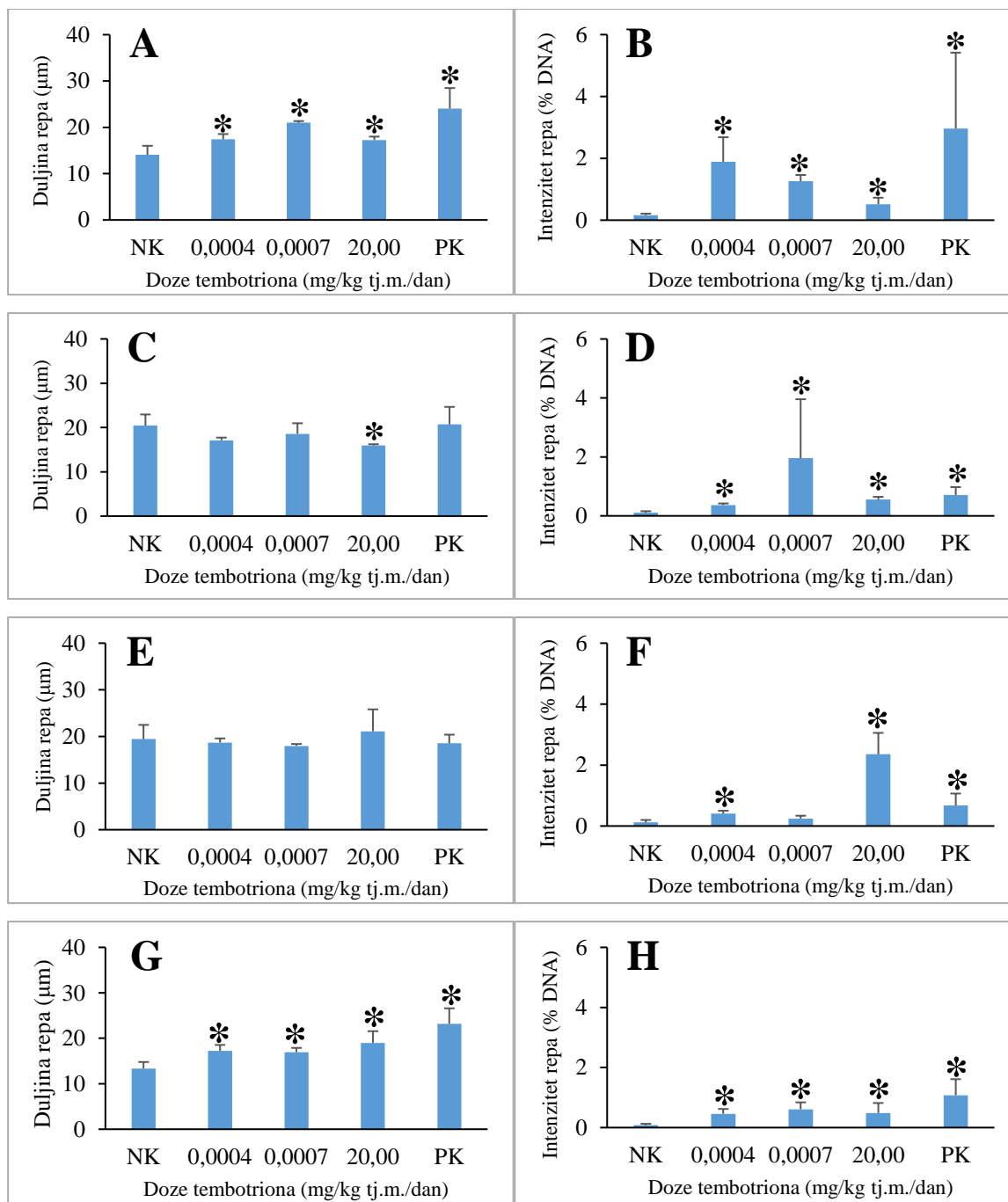


Slika 29. Rezultati alkalnog komet testa (duljina i intenzitet repa) u uvjetima *in vivo* na leukocitima ženskih mladunaca majki svakodnevno izloženih tembotrionu tijekom: gestacije i žrtvovanja nakon okota (A,B); gestacije i laktacije i žrtvovanja nakon odbijanja (C, D); gestacije i laktacije i žrtvovanja nakon ulaska mladunaca u pubertet (E, F), laktacije i žrtvovanja nakon odbijanja (G, H). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD mjerenja na 5 životinja po dozi. Analizirano je 150 nukleoida u triplikatu. NK – negativna kontrola (redestilirana voda), PK – pozitivna kontrola (ciklofosamid u dozi 5 mg/kg tj.m./dan). * - statistički značajno u odnosu na NK ($p < 0,05$, Mann-Witney U test).

Rezultati alkalnog komet testa na stanicama jetre u uvjetima *in vivo* za muške mladunce majki izlaganih tembotrionu prikazani su slikom 30, a za ženske slikom 31. Kod mladunaca majki tretiranih tijekom gestacije uočili smo povećanu genotoksičnost u vidu značajnog povećanja oba parametra primarnih oštećenja DNA u odnosu na negativnu kontrolu (Slika 30(A-B) i Slika 31(A-B)). U mladuncima majki tretiranih tijekom laktacije također je došlo do značajnog povećanja razine primarnih oštećenja u odnosu na negativnu kontrolu (Slika 30H i 31(G-H)). Kod mladunaca majki tretiranih tijekom gestacije i laktacije zabilježili smo značajan porast vrijednosti intenziteta repa u odnosu na negativnu kontrolu pri žrtvovanju nakon odbijanja (Slika 30D i 31D). Nakon ulaska u pubertet zamijetili smo značajno povećanje intenziteta repa u odnosu na negativnu kontrolu pri dozama 0,0004 i 0,0007 mg/kg tj.m./dan (ADI i AOEL) u muškim mladuncima (Slika 30F), te pri dozama 0,0004 i 20 mg/kg tj.m./dan (Slika 31F).

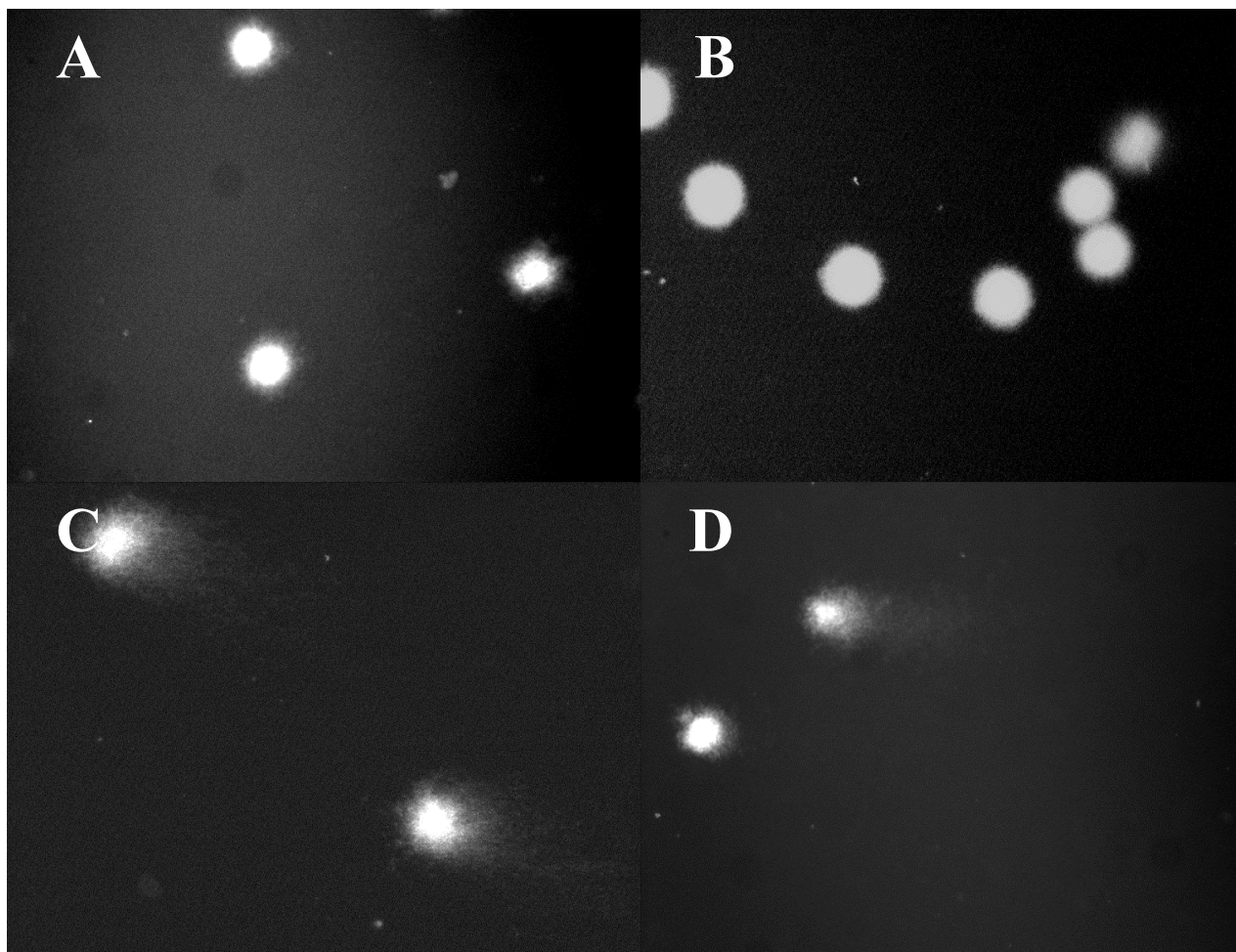


Slika 30. Rezultati alkalnog komet testa (duljina i intenzitet repa) u uvjetima *in vivo* na stanicama jetre muških mladunaca majki svakodnevno izloženih tembotrionu tijekom: gestacije i žrtvovanja nakon okota (A,B); gestacije i laktacije i žrtvovanja nakon odbijanja (C, D); gestacije i laktacije i žrtvovanja nakon ulaska mladunaca u pubertet (E, F), laktacije i žrtvovanja nakon odbijanja (G, H). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD mjerenja na 5 životinja po dozi. Analizirano je 150 nukleoida u triplikatu. NK – negativna kontrola (redestilirana voda), PK – pozitivna kontrola (ciklofosamid u dozi 5 mg/kg tj.m./dan). * - statistički značajno u odnosu na NK ($p < 0,05$, Mann-Witney U test).



Slika 31. Rezultati alkalnog komet testa u uvjetima *in vivo* na stanicama jetre ženskih mladunaca majki svakodnevno izloženih tembotrionu tijekom: gestacije i žrtvovanja nakon okota (A,B); gestacije i laktacije i žrtvovanja nakon odbijanja (C, D); gestacije i laktacije i žrtvovanja nakon ulaska mladunaca u pubertet (E, F), laktacije i žrtvovanja nakon odbijanja (G, H). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD mjerenja na 5 životinja po dozi. Analizirano je 150 nukleoida u triplikatu. NK – negativna kontrola (redestilirana voda), PK – pozitivna kontrola (ciklofosamid u dozi 5 mg/kg tj.m./dan). * - statistički značajno u odnosu na NK ($p < 0,05$, Mann-Witney U test).

Primjeri nukleoida analiziranih u sklopu istraživanja u uvjetima *in vivo* prikazani su slikom 32.



Slika 32. Fotografije nukleoida mladunaca štakora majki tretiranih tembotrionom u različitim periodima razvoja ploda: (A) nukleoidi jetre ženskih mladunaca majki izlaganih redestiliranoj vodi tijekom laktacije; (B) nukleoidi leukocita ženskih mladunaca majki izlaganih dozi 0,0004 mg/kg tj.m./dan (ADI) tijekom laktacije; (C) nukleoidi jetre muških mladunaca majki izlaganih dozi 20 mg/kg tj.m./dan (1/500 LD₅₀) tijekom laktacije; (D) nukleoidi leukocita muških mladunaca majki izlaganih dozi 0,0007 mg/kg tj.m./dan (AOEL) tijekom gestacije.

5. RASPRAVA

Cilj našeg istraživanja bio je ispitati genotoksični učinak često korištenih aktivnih tvari pesticidnog djelovanja pri niskim razinama izloženosti koje predstavljaju realnu izloženost stanovništva. Za ispitivanje smo odabrali po tri aktivne tvari insekticidnog odnosno herbicidnog djelovanja različitih generacija; insekticide klorpirifos, imidakloprid i α -cipermetrin, te herbicide terbutilazin, glifosat i tembotrion. Genotoksični učinak u uvjetima *in vitro* ispitili smo na ljudskoj perifernoj krvi izloženoj niskim koncentracijama pesticida korištenjem alkalnog komet testa za detekciju primarnih oštećenja DNA, te mikronukelus testa za detekciju sekundarnih oštećenja DNA u vidu MN, NB i NPB. Kako bismo dodatno okarakterizirali genotoksični učinak koristili smo metodu FISH za kromosome 18 i 9 koji su često uključeni u limfoidne malignosti povezane s izlaganjem pesticidima, te X i Y kao biomarkere gubitka kromosoma. Genotoksični učinak u uvjetima *in vivo* istražili smo primjenom alkalnog komet testa na gravidnim i doječim štakoricama soja Wistar. Naposljetku, primjenom alkalnog komet testa ispitili smo mogući genotoksični učinak u mladuncima oba spola čije su majke bile izložene niskim dozama pesticida tijekom gestacije i laktacije kao najosjetljivijih faza razvoja ploda.

U alkalnom komet testu u uvjetima *in vitro* utvrdili smo povećanje primarnih oštećenja u DNA leukocita uslijed izlaganja uzoraka krvi muškog i ženskog donora pesticidima (Slika 14-17). Navedeni učinak bio je izraženiji u leukocitima muškog donora, u skladu s dosadašnjim istraživanjem (Hofer i sur., 2006), iako je kod ženskog donora zabilježen porast varijabilnosti (Slika 16-17). Iz literature je poznato da postoje razlike po spolu u odgovoru na oštećenja DNA izazvana djelovanjem različitih ksenobiotika. Nekoliko autora ukazalo je na povezanost oštećenja kromosoma i spola (Bonassi i sur., 1995; Bonassi i sur., 2001; Fenech i sur., 1994). Spolne razlike nastaju spolnom diferencijacijom, uz aktivno djelovanje spolnih hormona. Kao posljedica razlika u razvoju dolazi do razlika u metabolizmu ksenobiotika (Chella i sur., 2018) koje bi mogle doprinijeti razlici u genotoksičnom učinku. Ni kod muškog ni kod ženskog donora nismo uočili povezanost povećanja duljine repa s koncentracijom pesticida (Slika (14A-17A)). Pri izlaganju insekticidima u leukocitima muškog donora zamijetili smo značajan porast intenziteta repa u ovisnosti o primijenjenoj dozi koji je biološki značajan pri najvišoj koncentraciji (Slika 14B). Porast repnog intenziteta pri najvišoj dozi je značajan i kod terbutilazina, dok glifosat i tembotrion pokazuju trend ne-monotonog odnosa koncentracije (engl. *Non monotonic dose response*, NMDR) i porasta repnog intenziteta (Slika 14B). Pri niskim razinama izloženosti genotoksičnom agensu popravak oštećenja DNA može nadvladati

njegov genotoksični učinak (USEPA, 2013) što se u našem istraživanju ispoljava kao smanjenje repnog intenziteta pri srednjoj koncentraciji. Porast repnog intenziteta u leukocitima ženske donorice nije dovoljan da bi se smatrao biološki značajnim (Slika 16B i 17B). U mikronukleus testu insekticidi klorpirifos, imidakloprid i α -cipermetrin te herbicid terbutilazin nisu doveli do značajnog porasta sekundarnih oštećenja DNA niti su utjecali na kinetiku proliferacije stanica (Tablica 2-5). Razlika u broju stanica sa MN između muškog i ženskog donora u skladu je s prethodnim istraživanjima (Bonassi i sur., 2001; Fenech i sur., 1994). Porast MN i pad CBPI kojeg smo uočili u limfocitima muškog donora je nasumičan i incidentalnog karaktera budući da nije koreliran s koncentracijom tembotriona, niti pokazuje trend NMDR (Tablica 3). Također, porast CBPI pri srednjoj, odnosno pad CBPI pri višoj koncentraciji glifosata je nasumičan i biološki neznačajan (Tablica 3). Svi pesticidi su pokazali aneugeno djelovanje najviše povećavajući udio hipoploidnih stanica, potom hiperploidnih stanica te stanica s pogrešnom razdiobom kromosoma (Tablica 6-9). Uočeni aneugeni učinak nije u korelaciji s parametrima mikronukleus testa, s iznimkom tembotriona gdje smo uočili povezanost porasta hipoploidnih stanica za kromosome 18, 9 i Y s porastom MN (Tablica 7). Najznačajniji aneugeni učinak pokazuju imidakloprid i α -cipermetrin povećavajući udio hipoploidnih stanica za ženski kromosom X (Tablica 8), te glifosat i tembotrion povećavajući udio hipoploidnih stanica za kromosom Y (Tablica 7) te ženski kromosom X (Tablica 9). Izlaganje odraslih štakorica α -cipermetrinu je dovelo do o dozi zavisnog povećanja oštećenja DNA u leukocitima majki žrtvovanih nakon okota iskazanog jedino parametrom dužine repa. Ostala statistički značajna povećanja u dužini repa i intenzitetu nisu pokazivala zavisnost o dozi te se smatraju nasumičnima i nisu biološki značajna (Slike 20 i 21), dok je kod majki izloženih tembotrionu zamijećeno povećanje oštećenja DNA u oba tkiva pri svim dozama i točkama žrtvovanja (Slike 22 i 23). Značajno povećanje je zabilježeno za vrijednosti oba parametra komet testa (dužina i intenzitet repa) te je obrnuto zavisno o dozi i pokazuje NMDR. U mladuncima majki izloženih α -cipermetrinu najizraženiji, ali biološki neznačajan učinak na oštećenja DNA je u leukocitima muških mladunaca nasumičan s obzirom na intenzitet repa (Slika 24B), dok je u jetri mladunaca oba spola obrnuto zavisno o dozi (Slike 26B i 27B). Povećanje repnog intenziteta u mladuncima majki izloženih tembotrionu tijekom gestacije bilo je obrnuto zavisno o dozi u leukocitima muških i jetri mladunaca oba spola (Slike 28B, 30B i 31B), te nasumično u leukocitima ženskih mladunaca (Slika 29B). Kod mladunaca majki izlaganih tembotrionu tijekom gestacije i laktacije smo zamijetili povećanje repnog intenziteta koje je bilo obrnuto ovisno o dozi u leukocitima (Slike 28D i 29D), te nasumično u jetri (Slike 30D i 31D). S druge strane, nakon ulaska u pubertet povećanja repnog intenziteta u ženskim mladuncima su bila ovisna o dozi u

leukocitima (Slika 29F) te ne-monotona u jetri (Slika 31F). U odraslim štakoricama i njihovim mladuncima izlaganje tembotrionu rezultiralo je izraženijim genotoksičnim učinkom u odnosu na izlaganje α -cipermetrinom. Genotoksični učinak je i u odraslim štakoricama i mladuncima najizraženiji nakon okota. Kao i u uvjetima *in vitro*, muški mladunci su se pokazali osjetljivijima na indukciju genotoksičnosti. Veći respiratorni i fosforilativni kapacitet mitohondrija ženki u odnosu na mužjake štakora upućuju na učinkovitiji respiratorni lanac (Justo i sur., 2005) i posljedično učinkovitiji metabolizam genotoksičnih agenasa.

Dugotrajno izlaganje niskim razinama pesticida može oštetiti DNA preko nastanka alkilacija (Mehl i sur., 2000), adukata (Alleva i sur., 2018) i lomova okosnice (Kaur i Kaur, 2018). Pogrešnim popravkom DNA ta oštećenja se u genomu mogu fiksirati kao mutacije povećavajući rizik od maligne transformacije stanice (Alleva i sur., 2018). Oštećenja DNA vidljiva komet testom mogu nastati izravno djelovanjem pesticida i/ili nepotpunim popravkom izrezivanjem, uključujući i endogene izvore oštećenja poput oksidacijskog stresa. Oštećenja koja detektira komet test nisu fiksirana u vidu mutacija i brzo se popravljaju, što otežava utvrđivanje značaja i korelacije njihovog nastanka s razvojem malignih oboljenja. Međutim, uslijed izvanrednih okolnosti, poput nastanka oštećenja netom prije ili nakon replikacije DNA ili izostanka njihovog popravka, ta primarna oštećenja će se fiksirati u vidu mutacija ili čak dovesti do kromosomskih aberacija. Stoga su rezultati komet testa biološki biljeg (biomarkeri) izloženosti ispitivanoj tvari i popravka oštećenja DNA. U našem istraživanju uslijed izlaganja pune krvi pesticidima u uvjetima *in vitro* intenzitet fluorescencije repa kometa se pokazao osjetljivijim parametrom u odnosu na duljinu repa, što je u skladu s prethodnim istraživanjima (Collins, 2004). U leukocitima ženskog donora smo zabilježili porast varijabilnosti čak i u odsutnosti statističke značajnosti razlike (Slike 16B i 17B), što upućuje na veću distribuciju intenziteta oštećenja, ali i prisutnost populacije leukocita rezistentnijih na oštećenja DNA.

Ranija istraživanja genotoksičnosti pesticida koji su obuhvaćeni ovom disertacijom također ukazuju na moguću genotoksičnost. Ojha i Gupta (2014) su izlagali leukocite odraslih mužjaka štakora soja Wistar niskim koncentracijama klorpirifosa od 0,02 i 0,05 $\mu\text{g/mL}$ tijekom 2, 4, 8 i 12 h. Nakon usporedne provedbe komet testa u alkalnim i neutralnim uvjetima elektroforeze otkrili su statistički značajno, ali o uvjetima neovisno povećanje indeksa oštećenja DNA što upućuje na genotoksični učinak nastajanjem lomova u okosnici. Povećanje oštećenja DNA u navedenom istraživanju bilo je ujedno veće od onoga u našim uvjetima. Ostala istraživanja genotoksičnog učinka klorpirifosa koristila su više koncentracije od onih u našem istraživanju. Sandal i Yilmaz (2010) su utvrdili povećanje oštećenja DNA alkalnim komet

testom u limfocitima muških dobrovoljaca tretiranih klorpirifosom kroz 1 h u koncentraciji od 3,5 µg/mL. Pri koncentracijama od 3,1 µg/mL na više potvrđen je genotoksični učinak klorpirifosa u mišjim hepatocitima (Cui i sur., 2011). Lu i suradnici (2015) su izlagali krvotvorne stanice fetalne jetre klorpirifosu u koncentraciji 10 µM (3,5 µg/mL) kroz 24 h i otkrili porast intenziteta repa u komet testu u neutralnim uvjetima, što upućuje na indukciju dvolančanih lomova okosnice DNA. U istoj studiji zabilježena je i povećana učestalost translokacija gena *MLL*, smještenog na kromosomu 11, važnog za diferencijaciju krvotvornih stanica, što se dovodi u vezu s povećanim rizikom razvitka dječje leukemije. Genotoksični učinak pri koncentracijama 50-750 µM zabilježen je i u ljudskim spermijima (Salazar-Arredondo i sur., 2008). Pri 24-satnom tretmanu porast oštećenja DNA zabilježen je pri i iznad koncentracija 90 µM u HEK293 te 200 µM u HeLa stanicama (Li i sur., 2015). Štakori tretirani klorpirifosom u dozama od 3 i 12 mg/kg tj.m./dan kroz 7 i 14 dana (100 do 1000X više doze od onih korištenih tijekom disertacije, ali dvostruko kraći tretman) također pokazuju porast intenziteta repa (Sandhu i sur., 2013). Također viša doza od 1,12 mg/kg tj.m./dan davana kroz tri mjeseca je djelovala genotoksično u alkalnom komet testu (Mehta i sur., 2008). Izlaganje miševa klorpirifosu pokazuje povećanje duljine repa i 24 h i 48 h poslije tretmana. Vrijednosti se vraćaju na početnu bazalnu razinu 96 h nakon tretmana (Rahman i sur., 2002). Povećanje primarnih oštećenja je uočeno pri sedmodnevnom izlaganja štakora dozi 10 mg/kg tj.m./dan (Muller i sur., 2014). Izlaganje štakora klorpirifosu pri srednjoj dozi LD₅₀ 155 mg/kg tj.m./dan dovodi do velikog povećanja parametra komet testa (duljina i intenzitet repa) u mozgu i jetri uz histološke promjene u mozgu (Yahia i Ali, 2018). Imidakloprid je povećao primarna oštećenja DNA u uvjetima *in vitro* izlaganjem leukocita koncentraciji od 0,05 i 0,1 µg/mL kroz 1 h (Feng i sur., 2005). Ispitivane koncentracije su u razini onih koje smo koristili u našem istraživanju. Stanice TK6 su se pri 24-satnom izlaganju imidaklopridu u koncentraciji 0,1 µg/mL pokazale osjetljivijima na povećanje oštećenja DNA u odnosu na leukocite u našoj studiji (Guo i sur., 2020). Povećana oštećenja DNA iskazana parametrom intenziteta repa nakon 24-satnog tretmana potvrđena su pri višim koncentracijama; u stanicama neuroblastoma SHSY-5Y pri 127 µg/mL te u stanicama HepG2 pri 51 µg/mL (Şenyildiz i sur., 2018).

Unatoč istovremenoj prisutnosti cipermetrina kao racemične mješavine svih 8 enantiomera, te mješavina određenih enantiomera (α -cipermetrin, β -cipermetrin, *cis*-cipermetrin, *trans*-cipermetrin), većina dosadašnjih studija istraživala je genotoksičnost cipermetrina. Iako enantiomeri mogu imati različito biološko djelovanje, smatra se da cipermetrin i njegovi izomeri imaju usporedivi toksikološki profil (IPCS, 1992). Cipermetrin je

pokazao genotoksični učinak u alkalnom komet testu u leukocitima u koncentraciji 10 μM (Sandal i Yilmaz, 2010) što odgovara oko 4,16 $\mu\text{g/mL}$, oko 15,8 puta većoj od najviše koncentracije u našem istraživanju. Pri koncentraciji 3,1 $\mu\text{g/mL}$ i višoj potvrđen je genotoksični učinak cipermetrina u mišjim hepatocitima metodom alkalnog komet testa (Cui i sur., 2011). Undeger i Basaran (2005) su izlagali ljudske leukocite cipermetrinu tijekom pola sata i detektirali značajno povećanje oštećenja pri koncentraciji od 200 $\mu\text{g/mL}$ što je 1000 puta viša koncentracija od najviše koju smo mi koristili pri izradi disertacije. Genotoksični učinak u komet testu u stanicama jajnika kineskog hrčka pokazan je na 4,1 $\mu\text{g/mL}$ kroz 3 h izlaganja (Patel i sur., 2007). Intraperitonealna primjena cipermetrina u visokim dozama, između 12,5 i 200 mg/kg tj.m./dan, što je 20 do 400 puta veća doza od najviše korištene u našoj studiji, kroz 5 dana dovela je do povećanja oštećenja DNA povećanjem duljine repa i repnog intenziteta u mozgu, jetri, bubregu i slezeni miševa (Patel i sur., 2006).

U limfocitima triju donora muškog te jednog donora ženskog spola izloženima glifosatu kroz 4 h koncentracijama 0,16 i 1,6 $\mu\text{g/mL}$, koje su u razini onih koje smo mi koristili, nije utvrđeno značajno povećanje oštećenja DNA (Nagy i sur, 2019). U ostalim studijama utvrđena su povećana oštećenja DNA u leukocitima tretiranim 24 h koncentracijama od 20 $\mu\text{g/mL}$ (Koller i sur, 2012), 42 $\mu\text{g/mL}$ (Wozniak i sur, 2018) te 84,53 $\mu\text{g/mL}$ (Kwiatkowska i sur, 2017). U literaturnim podacima nismo uspjeli pronaći studije kojima su prije nas komet testom istraživani genotoksični učinci uslijed izlaganja pune krvi α -cipermetrinu, terbutilazinu i tembotrionu *in vitro* tako da dobivene rezultate ne možemo usporediti s literaturnima.

Vrijednosti parametara komet testa u našem istraživanju u negativnoj kontroli odražavaju oštećenja DNA koja nastaju pod utjecajem endogenih čimbenika. Vrijednosti intenziteta repa od 0 do 10 % u negativnoj kontroli smatraju se bazalnim (Lovell i Omeri, 2008). Blagi porast vrijednosti parametara alkalnog komet testa u uvjetima *in vitro* u našem istraživanju nastao je izlaganjem pune krvi niskim koncentracijama pesticida kroz period od 24 sata. Tijekom tretmana je nakon određenog vremena došlo do uspostave ravnoteže između novonastalih oštećenja i popravka istih mehanizmima izrezivanja nukleotida ili baza koji djeluju brzo. Zbirni rezultat oba učinka očitovao se u izmjenjenim vrijednostima parametara komet testa. Iako su promjene bile statistički značajne, malen dio njih je dovoljno odstupao od bazalnih vrijednosti ili pokazivao trend ovisnosti koncentracija-učinak, odnosno NMDR za niske doze, da bi se smatrao biološki značajnim. Biološki značajne promjene su veće promjene parametara komet testa i praćene su drugim štetnim učincima poput patohistoloških promjena u mozgu štakora (Yahia i Ali, 2008). Temeljem navedenoga statistički značajna blaga indukcija

primarnih oštećenja DNA nije ujedno i biološki značajna, ali je vrijedan putokaz koji ukazuje na eventualnu potrebu uključivanja ostalih tehnika u istraživanje u svrhu detekcije biomarkera učinka.

Primarna oštećenja DNA koja se ne mogu popraviti ili se produljeno popravljaju, prelaze u sekundarna oštećenja. Klastogeni učinak ksenobiotika na ovoj razini vidljiv je u obliku kromosomskih i kromatidnih lomova, fragmenata odlomljenih kromosoma, te dicentričnih kromosoma. Aneugeni učinak vidi se po nepravilnostima u broju kromosoma. Povećana učestalost MN ukazuje na postojanje acentričnih fragmenata ili čitavih kromosoma izvan glavne jezgre; povećanje učestalosti NB upućuje na prisutnost velikog broja oštećenja DNA na maloj udaljenosti; povećanje učestalosti NPB ukazuje na postojanje dicentričnih kromosoma. Pri povećanoj izloženosti stanice genotoksičnim agensima navedena kromatinska oštećenja prelaze jedna u druge; MN prelaze u NB procesom reintegracije u jezgru, NB odvajanjem postaju MN, dok NPB pucaju tvoreći MN i nove mostove ponovnim spajanjem. Da bi se navedena kromatinska oštećenja mogla detektirati, potrebna je aktivna dioba stanica. Pojedini agensi djeluju i na kinetiku diobe; ukoliko dolazi do zastoja staničnog ciklusa povećan udio mononuklearnih stanica će dovesti do smanjenja vrijednosti CBPI; obrnuto uslijed ubrzane diobe doći će do povećanog udjela tri- i tetranuklearnih stanica te povećanja CBPI. Budući da se u netransformiranim stanicama većina oštećenja DNA popravljaju u interfazi prije diobe radi prevencije njihovog prijenosa u stanice kćeri, povećanje parametara mikronukleus testa ukazuje na biološku značajnost oštećenja DNA budući da dolazi do njihove fiksacije u genomu. Obrnuto, izostanak značajnog učinka u mikronukleus testu s obzirom na prisutnost primarnih oštećenja upućuje na njihov uspješan popravak (Goethem, 1997; Vrzoc i Petras, 1997). Upravo to je slučaj s većinom ispitivanih pesticida u našem istraživanju.

Pri 4-satnom tretmanu štakorskih limfocita u uvjetima *in vitro* klorpirifos nije značajno utjecao na indukciju kromosomskih aberacija (Gollapudi i sur., 1995). Ostala istraživanja genotoksičnog učinka klorpirifosa koristila su više koncentracije i/ili dulja vremena izlaganja. 30-minutni tretman limfocita klorpirifosom u višim koncentracijama od primijenjenih u ovoj studiji doveo je do povećanja kromosomskih aberacija (Vindas i sur., 2004). 48-tretman klorpirifosom koncentracije 0,37 µg/mL u stanicama pluća kineskog hrčka doveo je do povećanja kromosomskih lomova (Sultana Shaik i sur., 2016). Ferré i sur. (2020) su kroz 72 h izlagali goveđe limfocite klorpirifosu u koncentraciji 11 µg/mL te su detektirali povećanje učestalosti MN i NB. Genotoksični učinak pri višim dozama potvrđen je i u studiji *in vivo*; pri dozi 12 mg/kg tj.m./dan nakon 7 i 14 dana oralne izloženosti u štakorima je dokazano povećanje

primarnih oštećenja i MN (Sandhu i sur., 2013). Komercijalne formulacije pesticida pokazuju jači genotoksični učinak uslijed potencirajuće ili sinergističke interakcije aktivne pesticidne tvari i adjuvanasa. Ezzi i suradnici (2015) su tako pri dozama 3,1 i 6,2 mg/kg tj.m./dan komercijalne formulacije klorpirifosa kroz 4 tjedna izlaganja muških štakora otkrili povećanu učestalost MN u koštanoj srži.

Naši rezultati za imidaklopid u mikronukleus testu odgovaraju onima Demsie i suradnika (2007) koji nisu detektirali značajnu indukciju MN u rasponu koncentracija između 0,1 i 100 µg/mL. Također, Guo i suradnici (2020) su zamijetili indukciju primarnih oštećenja, MN, ali i NPB pri 24-satnom tretmanu i koncentracijama 0,1 µg/mL i više u TK6 stanicama. S druge strane, indukcija MN je detektirana u drugom istraživanju pri koncentraciji 0,1 µg/mL, ali pri dvostruko duljem vremenu tretmana (Feng i sur., 2005). Pri 24-satnom tretmanu u koncentraciji 5 µg/mL zamijećena je indukcija MN, ali tek nakon 24-satne stimulacije fitohemaglutininom (Costa i sur., 2009). Genotoksični učinak imidakloprida u uvjetima *in vivo* na miševima, štakorima i zečevima uključuje indukciju MN (Stivaktakis i sur., 2016; Vardavas i sur., 2018), indukciju MN i kromosomskih aberacija (Bagri i sur., 2015; Karabay i Oguz, 2005) te indukciju MN i kromosomskih aberacija uz zastoj u diobi stanica (Kataria i sur., 2016). Ponovno, navedeni učinci dokazani su pri dozama višim od onih u našem istraživanju. U formulaciji pri 0,36 µg/mL i višim dozama imidaklopid povećava MN u HepG2 stanicama (Bianchi i sur., 2015). Cipermetrin se pokazao genotoksičnijim s obzirom na indukciju MN i NPB u goveđim limfocitima (Ferré i sur., 2020). Inducirao je aberacije u mišjim stanicama slezene nakon 4 h tretmana u rasponu koncentracija 0,25 – 400 µg/mL i u mišjoj slezeni i koštanoj srži pri jako visokoj jednokratnoj dozi od 180 mg/kg (Amer i sur., 1993). Pri nižim dozama u rasponu 5,54-22 mg/kg tj.m./dan, 5x tjedno davan kroz 4 tjedna cipermetrin nije inducirao aberacije (Nehez i sur., 2000). Uzrokovao je i porast MN u zečevima (Vardavas i sur., 2016). Kao i u našem istraživanju, terbutilazin nije pokazao indukciju MN u *in vivo* uvjetima na koštanoj srži miša (Gebel i sur., 1997).

Santovito i suradnici (2018) su izlagali punu krv glifosatu 48 h u koncentracijama između 0,0125 i 0,5 µg/mL, detektirajući povišenje aberacija, MN te NPB pri najvišoj koncentraciji, bez učinka na mitostki indeks i CBPI. Razlika u značajnosti rezultata između prethodno navedene i ove studije, osim u duljem trajanju tretmana, može se objasniti i analizom većeg broja stanica po koncentraciji. U ostalim dosadašnjim istraživanjima glifosata u uvjetima *in vitro* dokazan je njegov citostatski učinak na različitim vrstama staničnih linija. U dva istraživanja pri koncentracijama usporedivima sa onima u našem istraživanju zamijećen je

zastoj u rastu granulosa stanica izoliranih iz jajnika svinje i goveda (Gigante i sur., 2018; Perego i sur., 2017). Tretman visokim koncentracijama glifosata (15 mM i više) kroz 72 h dovodi do zastoja u rastu transformiranih staničnih linija (Li i sur., 2013). Adjuvansi u komercijalnim formulacijama s glifosatom kao aktivnom tvari dodatno pojačavaju citostatski učinak (Hao i sur., 2020; Lin i Garry, 2000; Luaces i sur., 2017; Martini i sur., 2012). S druge strane, proliferativno djelovanje zabilježeno je na ljudskim keratinocitima pri 72-satnom tretmanu u koncentraciji 16,91 µg/mL (George i Shukla, 2013). Velika interindividualna varijabilnost u parametrima mikronukleus testa (Wojewódzka i sur., 1998) je doprinijela razlici u značajnosti rezultata našeg istraživanja za tembotrion i glifosat između muškog i ženskog donora. Iz navedenoga se daje zaključiti kako učinak izlaganja glifosata na diobu stanica *in vitro* ovisi o karakteristikama donora, vrsti stanice te uvjetima tretmana. Citostatski učinak može nastati kao posljedica oštećenja DNA. Uslijed opterećenosti genotoksičnim agensima stanica zaustavlja stanični ciklus radi popravka oštećenja DNA, što dovodi do zastoja u diobi (Lawrence i sur., 2014).

Uslijed aneugenog djelovanja genotoksičnih agenasa dolazi do poremećaja u sintezi i širenju niti diobenog vretena i/ili funkcije kinetohora za koje se te niti vežu. Kromosomi vezani na takve niti zaostaju u anafazi diobe stanice, te u telofazi pri kondenzaciji jezgrine ovojnice tvore MN ili se neravnomjerno raspoređuju po novonastalim jezgrama. Primjenom fluorescentno obilježenih sonda moguće je istražiti prisutnost određenih kromosoma. Aneugeni učinak se tako vidi po odstupanju (hipo- odnosno hiperploidiji) od uobičajenog broja kromosoma (euploidija). Kromosom 18 je najosjetljiviji na učinke okolišnih kemikalija, dok kromosom 9 sadrži gen JAK2 koji je najčešće oštećen u non-Hodgkinovim limfomima pod utjecajem izlaganja pesticidima (Hu i sur., 2017; Taylor i sur, 2017). Za spolni kromosom X je dokazano povećano gubljenje i posljedično hipoploidija u žena ovisno o dobi, kao i za kromosom Y u muškaraca (Galloway i Buckton, 1978), stoga smo koristili sonde za spolne kromosome kao biomarkere remećenja u razdvajanju i aneuploidije. Vrijednosti hipoploidije u našem istraživanju u negativnoj kontroli su veće od vrijednosti hiperploidije i pogrešaka u razdiobi kromosoma (Tablice 6-9), što je u skladu sa studijom Nowinskog i suradnika (1990). To upućuje na nastanak aneuploidije mehanizmom zastoja u diobi (Jackson-Cook, 2011). Aneugeni učinak svih ispitivanih pesticida osim tembotriona dokazan je u odsutnosti značajne indukcije MN (Tablica 2-5). Međutim, usprkos povećanju MN u limfocita muškaraca izloženog djelovanju tembotriona u najnižoj koncentraciji 0,0012 µg/mL (REL) (Tablica 3), zamijetili smo vrlo malen broj izdvajanja FISH signala za ispitivane kromosome u MN (Slika 18C).

Aneugeni učinci u našem istraživanju ispoljavaju se kao nepravilnosti u raspodjeli signala između jezgara neovisno o indukciji MN. Budući da mehanizam aneugenog učinka preko remećenja funkcije diobenog vretena dovodi do povećane mikronukleacije, u našim uvjetima riječ je o drugom vjerojatnom mehanizmu, koji se sastoji u remećenju kohezije sestrinskih kromatida. Centromere kromosoma su bogate heterokromatinom te predstavljaju vezno mjesto za protein kohezin. Uloga kohezina je da omogući koheziju sestrinskih kromatida umnoženog kromosoma i pravilnu orijentaciju u metafazi (Sagi i sur., 2017). Djelovanjem genotoksičnih agenasa na kohezin, onemogućavanjem razdvajanja sestrinskih kromatida u anafazi te njihovom migracijom u jednu od jezgara kćeri moguć je nastanak aneuploidnih stanica bez nastanka MN. Raimondi i suradnici (1989) su dokazali aneugeni učinak benzimidazolnog spoja benomila povećanjem hipoploidije kromosoma 9 u uvjetima *in vitro* na ljudskim limfocitima. S druge strane, Radwan i suradnici (2015) su korelirali razinu metabolita piretroidnih insekticida u urinu s hiperploidiom kromosoma 18, X i Y u spermijima. Fisetin, inhibitor enzima topoizomeraze II doveo je do pogrešaka u razdvajanju kromosoma (Olaharski i sur., 2005), što ukazuje na još jedan mogući mehanizam aneugenog učinka pesticida pogotovo pri višim dozama. Iz navedenoga proizlazi da se indukcija MN u limfocitima muškog donora pri niskoj koncentraciji 0,0012 µg/mL (REL) vjerojatnije odvija klastogenim nego aneugenim mehanizmom.

Aneuploidija može djelovati promotivno na razvoj tumora u ranijim fazama (Milán i sur., 2014), ali može nastati i kao posljedica genomske nestabilnosti u kasnijim stadijima razvoja tumora (Gordon i sur., 2012; Fang i Zhang, 2012). Ovo je prvo istraživanje aneugenog učinka klorpirifosa, imidakloprida, α -cipermetrina, glifosata, terbutilazina i tembotriona pri niskim koncentracijama s kojima ljudska populacija svakodnevno dolazi u dodir. Buduće studije bi trebale istražiti točan mehanizam djelovanja pesticida na razini citoskeleta.

U našim istraživanjima u uvjetima *in vivo* koristili smo dvije niske doze pesticida koje predstavljaju prihvatljive razine izloženosti ljudske populacije. Treća doza, izračunata kao frakcija LD₅₀ vrijednosti, korištena je tako da dopire do ciljanih tkiva krvi i jetre, i ujedno ne izazove smrtnost ili patnju životinja. Uspoređujući učinak α -cipermetrina i tembotriona na gravidnim štakoricama uočava se jači učinak tembotriona na oba parametra komet testa. Povećanje repnog intenziteta u novorođenim mladuncima majki izlaganih pesticidima tijekom gestacije ukazuje na mogućnost transplacentalnog prijenosa pesticida. Iako posteljica djeluje kao barijera sprječavajući dolazak nekih stranih tvari u plod, ne djeluje dovoljno dobro kao barijera u slučaju brojnih pesticida koji ju mogu prijeći (Alvarado-Hernandez i sur., 2013;

Debost-Legrand i sur., 2016; Dufour i sur., 2018; von Ehrenstein i sur., 2019; Shukla i Arora, 2001; Silver i sur., 2016; Whyatt i sur., 2005). Metaboliti organofosfornih pesticida su detektirani u plodovoj vodi trudnica u prvom tromjesečju trudnoće (Bradman i sur., 2003). Diuron, herbicid derivat fenilureje i poznati reprotoksikant i karcinogen u štakorskom urotelu prelazi ljudsku posteljicu u uvjetima *in vitro* (Mohammad i sur., 2018). Budući da je zamijećen učinak α -cipermetrina u dozi 0,02 mg/kg tj.m./dan davanoj u hrani kroz gestaciju na porast oksidativnog stresa (Hocine i sur., 2016), možemo pretpostaviti da bi i u našem slučaju moglo doći do porasta oksidativnog stresa koji može doprinijeti oštećenjima DNA. U našem istraživanju leukociti ženskih mladunaca pokazali su se manje osjetljivima na genotoksičnost α -cipermetrina u odnosu na leukocite muških mladunaca (Slike 24B i 25B). Međutim, u oba spola ne dolazi do značajnog genotoksičnog učinka pri najvišoj primijenjenoj dozi u leukocitima, dok su kod jetre uočena statistički značajna, ali vrlo blaga povećanja repnog intenziteta obrnuto zavisna o dozi (Slike 26B i 27B). Izostanak genotoksičnog učinka u krvi uz prisutnost istoga u jetri ukazuje na mogućnost metaboličke razgradnje α -cipermetrina u jetri na metabolite cis-2,2-diklorovinildimetilciklopropansku kiselinu i 3-fenilbenzojevu kiselinu. S druge strane, prisutnost statistički značajnog, ali ponovno blagog, genotoksičnog učinka u oba tkiva mladunaca izloženih tembotrionu (Slike 28-31) upućuje na slabiju mogućnost metabolizma i eliminacije tog spoja u mladuncima.

Mnogi pesticidi i ksenobiotici se mogu raspodijeliti i u majčino mlijeko te biti preneseni potomstvu tijekom dojenja (de Castro i sur., 2005; Iszatt i sur., 2019; Laugeray i sur., 2017; Gómez-Meda i sur., 2016). U štakoricama izloženih pesticidima tijekom dojenja je došlo do genotoksičnog učinka samo u leukocitima majki izloženih tembotrionu (Slike 22(G-H) i 23(G-H)). Sukladno izostanku učinka tijekom oba perioda izlaganja zasebno, u majkama izlaganim α -cipermetrinom nije zamijećen genotoksični učinak niti u jednom tkivu (Slike 20(C-D) i 21(C-D)), dok je u majkama izlaganim tembotrionu zamijećen izraženiji genotoksični učinak u oba tkiva (Slike 22(C-D) i 23(C-D)) u odnosu na izlaganje samo tijekom laktacije (Slike 22(G-H) i 23(G-H)). Ukoliko je sposobnost prijenosa pesticida preko majčinog mlijeka značajna, genotoksični učinak u mladuncima majki izlaganih tijekom gestacije i laktacije do odbijanja od mladunaca trebao bi biti značajnije veći i od učinka tijekom gestacije i učinka tijekom laktacije. U leukocitima muških (Slika 24D) te jetri ženskih mladunaca (Slika 27D) majki izlaganih α -cipermetrinu u dozi 0,010 mg/kg tj.m./dan (ADI) tijekom gestacije i laktacije zamijetili smo nasumično blago povećanje repnog intenziteta. S druge strane, nismo zamijetili genotoksični učinak u leukocitima ženskih mladunaca (Slika 25D), dok u jetri muških mladunaca dolazi do

povećanja repnog intenziteta pri svim dozama (Slika 26D) slično kao kod tretmana tijekom gestacije (Slika 26B), i značajnije u odnosu na tretman tijekom laktacije (Slika 26H). Mladunci majki izlaganih tembotrionu tijekom gestacije i laktacije pokazuju genotoksični učinak u leukocitima sličan izlaganju tijekom laktacije (Slike 28D i 29D), dok se jetra pokazala osjetljivijom, s najizraženijim povećanjem repnog intenziteta u dozi 0,0007 mg/kg tj.m./dan u odnosu na tretman tijekom gestacije (Slike 30D i 31D). Ovi rezultati ukazuju na potencijal tembotriona za prijenosom preko majčinog mlijeka u niskim dozama.

Nakon prekida izlaganja majki tembotrionu te nakon ulaska u pubertet ženski mladunci pokazuju porast intenziteta ovisno o dozi u leukocitima (Slika 29F), odnosno NMDR u jetri (Slika 31F). Budući da je značajan, ali i slabiji porast repnog intenziteta zabilježen u točki žrtvovanja nakon odbijanja pri izlaganju majki istoj dozi (Slike 29D i 31D), moguće je da se tembotrion zadržao u mladuncima do ulaska u pubertet. Međutim, porast oštećenja DNA nakon ulaska u pubertet može biti uzrokovan i drugim čimbenicima. Tijekom ulaska u pubertet pod utjecajem estrogena u jetri dolazi do promjena u metabolizmu željeza (Kozlov i sur., 2010), i posljedično do oksidativnog stresa koji oštećuje DNA (Hanada i sur., 2010). Promjene u metabolizmu lipida pod utjecajem estrogena zajedno sa izlaganjem ksenobioticima mogu doprinijeti propadanju jetre što se vidi kao porast oštećenja DNA (Maradonna i Carnevali., 2010).

U našem istraživanju *in vivo* period gestacije je najosjetljiviji na genotoksični učinak izlaganja α -cipermetrinu i tembotrionu. Gravidne štakorice nalaze se pod povećanim metaboličkim opterećenjem i kao takve su osjetljivije na štetne učinke okolišnih kemikalija, dok je plod osjetljiviji u odnosu na rođeni organizam zbog prisutnosti velikog broja matičnih stanica i nedovoljno razvijenog metaboličkog kapaciteta (Fučić i sur., 2017).

Dosadašnja istraživanja genotoksičnosti pesticida u uvjetima *in vivo* su u pravilu koristila više doze u odnosu na doze korištene u sklopu ovog istraživanja. Cipermetrin u dozama od 25, 50 i 75 mg/kg tj.m./dan doveo je do neznačajnog povećanja oštećenja DNA u gravidnim štakoricama (Murkunde i sur., 2012). U mozgu mladunaca majki izlaganih istom pesticidu u dozama 5 i 20 mg/kg tj.m./dan kroz gestaciju i laktaciju do 15. dana nakon okota dokazane su promjene u ekspresiji gena važnih za homeostazu proteina što dovodi do poremećaja u ponašanju mladunaca u pubertetu (Laugeray i sur., 2017). U mladunaca majki izloženih cipermetrinu u dozi 25 mg/kg tj.m./dan tijekom laktacije dokazan je poremećaj u razvoju testisa i spermatogenezi, te prolazno smanjenje razine testosterona (Wang i sur., 2011). U još višim dozama od 40 i 80 mg/kg tj.t. jednokratno klorpirifos djeluje transplacentalno genotoksično

povećavajući mikronukleuse u mišjim zamecima (Tian i Yamauchi, 2003). Još jedan primjer djelovanja na spolni razvoj je odgođeno odvajanje prepucija mladunaca i povećanje prostate mladunaca štakora soja Long Evans čije su majke od 15. do 19. dana gestacije bile izložene atrazinu u dozi 100 mg/kg tj.m./dan (Rayner i sur., 2007).

Izraženije genotoksično djelovanje izlaganja tembotrionu u odnosu na α -cipermetrin u našem istraživanju moglo bi se objasniti sporijim prelaskom cipermetrina kroz ljudsku posteljicu dokazanim u istraživanju Mathiesena i suradnika (2020). U našem istraživanju nismo u svim slučajevima dokazali statistički značajan porast oštećenja DNA pri svim dozama ispitivanih pesticida u izloženih majki i njihovim mladuncima. Statistički značajan genotoksični učinak pri svim ili tek pri višim dozama predstavlja blagi porast oštećenja DNA te nije praćen povećanom smrtnošću ili pogoršanjem općeg stanja laboratorijskih životinja. Ujedno, uz navedena istraživanja koja su dokazala nepovoljna djelovanja na razvoj tek pri višim dozama, genotoksične učinke kroz porast parametara komet testa ne smatramo biološki značajnima. Međutim, statistički značajan porast parametara komet testa, napose repnog intenziteta, u mladuncima koji nisu bili izravno izloženi pesticidima ukazuje na mogućnost njihove izloženosti pesticidima preko posteljice i/ili majčinog mlijeka. Kasnija istraživanja bi trebala dodatno karakterizirati moguće učinke tembotriona na razvoj mladunaca.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata u sklopu ovog istraživanja donosimo sljedeće zaključke:

U uvjetima *in vitro* izlaganjem pune krvi zdravih odraslih osoba insekticidima klorpirifosu, imidaklopridu i α -cipermetrinu te herbicidima glifosatu, terbutilazinu i tembotrionu niskim koncentracijama kroz 24 h:

- svi ispitivani pesticidi djeluju genotoksično povećavajući razinu primarnih oštećenja DNA
- svi ispitivani insekticidi te herbicid terbutilazin ne djeluju genotoksično povećavajući razinu kromatinskih oštećenja u mikronukleus testu
- tembotrion djeluje citostatski i genotoksično inducirajući mikronukleuse klastogenim mehanizmom
- glifosat djeluje citostatski bez indukcije kromatinskih oštećenja

U uvjetima *in vitro* aneugeni učinak izlaganja najnižoj dozi ispitivanih pesticida očituje se ometanjem razdvajanja sestrinskih kromatida:

- za klorpirifos i imidakloprid na kromosomima 18 i Y u limfocitima muškog donora te kromosomima 9 i X u limfocitima donora oba spola
- za insekticid α -cipermetrin i herbicid terbutilazin na kromosomima 9 i Y u limfocitima muškog donora te kromosomima 18 i X u limfocitima ženskog donora
- za glifosat na kromosomima 9 i Y u limfocitima muškog donora te kromosomu X u limfocitima ženskog donora
- za tembotrion na kromosomima 18, 9 i Y u limfocitima muškog donora te kromosomima 18 i X u limfocitima ženskog donora

U uvjetima *in vivo* izlaganjem odraslih gravidnih i dojećih štakorica soja Wistar niskim dozama insekticida α -cipermetrina i herbicida tembotriona:

- tembotrion djeluje izraženije genotoksično u odnosu na α -cipermetrin u gravidnim i dojećim štakoricama tijekom svih točaka razvoja njihovih mladunaca do njihovog ulaska u pubertet
- α -cipermetrin djeluje genotoksično na gravidne štakorice bez učinka u dojećim štakoricama

Konačno, u uvjetima *in vivo* u mladuncima štakora soja Wistar majki izloženih insekticidu α -cipermetrinu i herbicidu tembotrionu u niskim dozama tijekom gestacije i/ili laktacije:

- α -cipermetrin i tembotrion djeluju genotoksično u novookoćenim mladuncima oba spola
- tembotrion djeluje genotoksično u dojećim mladuncima oba spola
- genotoksični učinak zadržava se nakon prestanka izlaganja tembotrionu u ženskim mladuncima
- genotoksični učinci ukazuju na mogući prijenos α -cipermetrina i tembotriona preko posteljice, te tembotriona preko majčinog mlijeka

7. POPIS LITERATURE

1. Abd-Elhakim YM, Mohammed HH, Mohamed WAM (2018) Imidacloprid Impacts on Neurobehavioral Performance, Oxidative Stress, and Apoptotic Events in the Brain of Adolescent and Adult Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66: 13513–13524. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05793>.
2. Abdel-Gawad H, Tata H (2011) Bioavailability and toxicological potential of sunflower-bound residues of C-14-chlorpyrifos insecticide in rats. *Journal of Environmental Science and Health Part B - Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes* 46: 683–690. <https://doi.org/10.1080/03601234.2011.594397>.
3. Alaux C, Brunet JL, Dussaubat C, Mondet F, Tchamitchan S, Cousin M, Brillard J, Baldy A, Belzunces LP, Le Conte Y (2010) Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*) *Environmental Microbiology* 12: 774–782. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02123.x>.
4. Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagmar L, Hemminki K, Merlo F, Natarajan AT, Norppa H, Shuker DE, Tice R, Waters MD, Aitio A (2000). IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *International Programme on Chemical Safety. Mutation Research* 463: 111-172. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(00\)00049-1](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(00)00049-1).
5. Alleva R, Manzella N, Gaetani S, Bacchetti T, Bracci M, Ciarapica V, Monaco F, Borghi B, Amati M, Ferretti G, Tomasetti M (2018) Mechanism underlying the effect of long-term exposure to low doses of pesticides on DNA integrity. *Environmental Toxicology* 33: 476-87. <https://doi.org/10.1002/tox.22534>.
6. Alvarado-Hernandez DL, Montero-Montoya R, Serrano-García L, Arellano-Aguilar O, Jasso-Pineda Y, Yáñez-Estrada L. (2013) Assessment of Exposure to Organochlorine Pesticides and Levels of DNA Damage in Mother-Infant Pairs of an Agrarian Community. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 54: 99-111. <https://doi.org/10.1002/em.21753>.
7. Amer SM, Ibrahim AA, el-Sherbeny KM (1993) Induction of chromosomal aberrations and sister chromatid exchange in vivo and in vitro by the insecticide cypermethrin. *Journal of Applied Toxicology* 13: 341-345. <https://doi.org/10.1002/jat.2550130508>.
8. Anadón A, Martínez-Larrañaga MR, Martínez MA, Castellano VJ, Martínez M, Martín MT, Nozal MJ, Bernal JL (2009) Toxicokinetics of glyphosate and its metabolite

- aminomethyl phosphonic acid in rats. *Toxicology Letters* 190: 91–95. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.07.008>.
9. Anifandis G, Katsanaki K, Lagodonti G, Messini C, Simopoulou M, Dafopoulos K, Daponte A (2018) The Effect of Glyphosate on Human Sperm Motility and Sperm DNA Fragmentation. *International journal of environmental research and public health* 15. <https://doi.org/10.3390/ijerph15061117>.
 10. Anwar, WA (1997) Biomarkers of human exposure to pesticides. *Environmental Health Perspectives* 105: 801–806. <https://doi.org/10.1289/ehp.97105s4801>.
 11. Bacey, J (2002) Environmental fate of imidacloprid. <http://cues.cfans.umn.edu/old/pollinators/pdf-pesticides/BaceyEnvironmentalFate.pdf>.
 12. Badgajar, PC., Jain SK, Singh A, Punia JS, Gupta RP, Chandratre GA (2013) Immunotoxic effects of imidacloprid following 28 days of oral exposure in BALB/c mice *Environmental Toxicology and Pharmacology* 35: 408–418. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.01.012>.
 13. Bagri P, Kumar V, Sikka AK (2015) An in vivo assay of the mutagenic potential of imidacloprid using sperm head abnormality test and dominant lethal test. *Drug and Chemical Toxicology* 38: 342–348. <https://doi.org/10.3109/01480545.2014.966832>.
 14. Bal R, Naziroğlu M, Türk G, Yılmaz Ö, Kuloğlu T, Etem E, Baydas G (2012) Insecticide imidacloprid induces morphological and DNA damage through oxidative toxicity on the reproductive organs of developing male rats. *Cell Biochemistry and Function* 30: 492–499. <https://doi.org/10.1002/cbf.2826>.
 15. BCPC (British Crop Protection Council). 1994. Glyphosate. U: The Pesticide Manual.
 16. Bian, Q (2004) Study on the relation between occupational fenvalerate exposure and spermatozoa DNA damage of pesticide factory workers. *Occupational and Environmental Medicine* 61: 999–1005. <https://doi.org/10.1136/oem.2004.014597>.
 17. Bianchi J, Cabral-de-Mello DC, Marin-Morales MA (2015) Toxicogenetic effects of low concentrations of the pesticides imidacloprid and sulfentrazone individually and in combination in in vitro tests with HepG2 cells and *Salmonella Typhimurium*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 120: 174–183. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.05.040>.
 18. Blacquièrè T, Smagghe G, van Gestel CAM, Mommaerts V (2012) Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology* 21: 973–992. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0863-x>.
 19. Bonassi S, Bolognesi C, Abbondandolo A, Barale R, Bigatti P, Camurri L, Dalpra L, De

- Ferrari M, Forni A, Lando C (1995) Influence of sex on cytogenetic end points: evidence from a large human sample and review of the literature. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 4: 671–679. <https://cebp.aacrjournals.org/content/cebp/4/6/671.full.pdf>.
20. Bonassi S, Fenech M, Lando C, Lin YP, Ceppi M, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Ban S, Barale R, Bigatti P, Bolognesi C, Jia C, Di Giorgio M, Ferguson LR, Fučić A, Lima OG, Hrelia P, Krishnaja AP, Lee TK, Migliore L, Mikhalevic L, Mirkova E, Mosseso P, Müller WU, Odagiri Y, Scarffi MR, Szabova E, Vorotsova I, Vral A, Zijno A (2001) HUMAN MicroNucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 37: 31–45. [https://doi.org/10.1002/1098-2280\(2001\)37:1<31::AID-EM1004>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/1098-2280(2001)37:1<31::AID-EM1004>3.0.CO;2-P).
 21. Bonassi S, El-Zein R, Bolognesi C, Fenech M (2011) Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. *Mutagenesis* 26: 93–100. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq075>.
 22. Bradman A, Barr DB, Henn BGC, Drumheller T, Curry C, Eskenazi B (2003) Measurement of pesticides and other toxicants in amniotic fluid as a potential biomarker of prenatal exposure: a validation study. *Environmental Health Perspectives* 111: 1779–1782. <https://doi.org/10.1289/ehp.6259>.
 23. Burke AP, Niibori Y, Terayama H, Ito M, Pidgeon C, Arsenault J, Camarero PR, Cummins CL, Mateo R, Sakabe K, Hampson DR (2018) Mammalian Susceptibility to a Neonicotinoid Insecticide after Fetal and Early Postnatal Exposure. *Scientific Reports* 8: 16639. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35129-5>.
 24. Burns BG, Peach ME, Stiles DA (1975) Organochlorine pesticide residues in a farming area, Nova Scotia--1972-73. *Pesticides monitoring journal* 9: 34–38. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1181549>.
 25. Casida JE (2018) Neonicotinoids and Other Insect Nicotinic Receptor Competitive Modulators: Progress and Prospects. *Annual Review of Entomology* 63: 125–144. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043042>.
 26. de Castro VLS, de Mello MA, Poli P, Zucchi TMAD (2005) Prenatal and Perinatal Fenarimol-Induced Genotoxicity in Leukocytes of in Vivo Treated Rats. *Mutation Research* 583: 95-104. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2005.02.001>.
 27. Cereda A, Carey JC (2012) The trisomy 18 syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases*

- 7: 81. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-7-81>.
28. Chakraborty J, Das S (2016) Molecular perspectives and recent advances in microbial remediation of persistent organic pollutants. *Environmental Science and Pollution Research* 23: 16883–16903. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6887-7>.
 29. Chandler D, Bailey AS, Tatchell GM, Davidson G, Greaves J, Grant WP (2011) The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 366: 1987–1998. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0390>.
 30. Chatterjee N, Walker GC (2017) Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 58: 235–263. <https://doi.org/10.1002/em.22087>.
 31. Chella KK, Mehrabian M, Lusic AJ (2018) Sex differences in metabolism and cardiometabolic disorders. *Current Opinion in Lipidology* 29: 404–410. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000536>.
 32. Collins AR (2004) The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations. *Molecular Biotechnology* 26: 249–261. <https://doi.org/10.1385/MB:26:3:249>.
 33. Costa LG, Giordano G, Guizzetti M, Vitalone A (2008) Neurotoxicity of pesticides: a brief review. *Frontiers in Bioscience* 13: 1240–1249. <https://doi.org/10.2741/2758>.
 34. Costa C, Slivari V, Melchini A, Catania S, Heffron JJ, Trovato A, De Pasquale R (2009) Genotoxicity of imidacloprid in relation to metabolic activation and composition of the commercial product. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 672: 40–44. [10.1016/j.mrgentox.2008.09.018](https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.09.018).
 35. Costa C, Rapisarda V, Catania S, Di Nola C, Ledda C, Fenga C (2013) Cytokine patterns in greenhouse workers occupationally exposed to α -cypermethrin: An observational study. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 36: 796–800. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.07.004>.
 36. Cox C, Sorgan M (2006) Unidentified Inert Ingredients in Pesticides: Implications for Human and Environmental Health. *Environmental Health Perspectives* 114: 1803–1806. <https://doi.org/10.1289/ehp.9374>.
 37. Cui Y, Guo J, Xu B, Chen Z (2011) Genotoxicity of chlorpyrifos and cypermethrin to ICR mouse hepatocytes. *Toxicology Mechanisms and Methods* 21: 70–74. <https://doi.org/10.3109/15376516.2010.529192>.
 38. Cui J, Wang F, Gao J, Zhai W, Zhou Z, Liu D, Wang P (2019) Bioaccumulation and

- Metabolism of Carbosulfan in Zebrafish (*Danio rerio*) and the Toxic Effects of Its Metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 67: 12348–12356. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b03674>.
39. Debost-Legrand A, Warembourg C, Massart C, Chevrier C, Bonvallot N, Monfort C, Rouget F, Bonnet F, Cordier S (2016) Environ Prenatal Exposure to Persistent Organic Pollutants and organophosphate Pesticides, and Markers of Glucose Metabolism at Birth. *Environmental Research* 146: 207-217. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.01.005>
 40. Decordier I, Kirsch-Volders M (2013) Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Technique for the Micronucleus Test. U: *Methods in Molecular Biology*, 237–244. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-529-3_12.
 41. Demisia G, Vlastos D, Goumenou M, Matthopoulos DP (2007) Assesment of the genotoxicity of imidacloprid and metalaxyl in cultured human lymphocytes and rat bone marrow. *Mutation Research* 634: 32-39. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.05.018>.
 42. Dufour P, Pirard C, Seghaye MC, Charlier C (2018) Association Between Organohalogenated Pollutants in Cord Blood and Thyroid Function in Newborns and Mothers From Belgian Population. *Environmental Pollution* 238: 389-396. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.03.058>.
 43. Duke SO (1990) Overview of herbicide mechanisms of action. *Environmental Health Perspectives* 87: 263–271. <https://doi.org/10.1289/ehp.9087263>.
 44. Dumas E, Giraud M, Goujon E, Halma M, Knhili E, Stauffert M, Batisson I, Besse-Hoggan P, Bohatier J, Bouchard P, Celle-Jeanton H, Costa Gomes M, Delbac F, Forano C, Goupil P, Guix N, Husson P, Ledoigt G, Mallet C, Mousty C, Prévot V, Richard C, Sarraute S (2017) Fate and ecotoxicological impact of new generation herbicides from the triketone family: An overview to assess the environmental risks. *Journal of Hazardous Materials* 325: 136–156. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.11.059>.
 45. Eaton DL, Daroff RB, Autrup H, Bridges J, Buffler P, Costa LG, Coyle J, McKhann G, Mobley WC, Nadel L, Neubert D, Schulte-Hermann R, Spencer PS (2008) Review of the Toxicology of Chlorpyrifos With an Emphasis on Human Exposure and Neurodevelopment. *Critical Reviews in Toxicology* 38: 1–125. <https://doi.org/10.1080/10408440802272158>.
 46. ECHA (European Chemicals Agency) (2012) CLH report for tembotrione. https://echa.europa.eu/documents/10162/13626/clh_tembotrione_en.pdf.
 47. ECHA (2014) CLH report for terbuthylazine. <https://echa.europa.eu/documents/10162/a765f0dd-a71c-f0df-decf-d7e4e1fb47ea>.

48. EFSA (European Food Safety Authority) (2013) Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance tembotrione“. EFSA Journal 11: 3131. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3131>.
49. von Ehrenstein OS, Ling C, Cui X, Cockburn M, Park AS, Yu F, Wu J, Ritz B (2019) Prenatal and infant exposure to ambient pesticides and autism spectrum disorder in children: population based case-control study. BMJ 1962. <https://doi.org/10.1136/bmj.1962>.
50. EK (Europska Komisija) (2004) Review report for the active substance alpha-cypermethrin.
51. EK (2008) Review report for the active substance imidacloprid.
52. EK (2020) Baza podataka pesticida EU. https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_approval-factsheet.pdf.
53. EP (2009) Direktiva 2009/128/EZ Europskog Parlamenta i Vijeća od 21. listopada 2009. o uspostavi okvira za djelovanje Zajednice u postizanju održive upotrebe pesticida.
54. Eriksson M, Hardell L, Carlberg M, Åkerman M (2008) Pesticide exposure as risk factor for non-Hodgkin lymphoma including histopathological subgroup analysis. International Journal of Cancer 123: 1657–1663. <https://doi.org/10.1002/ijc.23589>.
55. EU (2012) Uredba (EU) br. 528/2012 Europskog Parlamenta i Vijeća od 22. svibnja 2012. o stavljanju na raspolaganje na tržištu i uporabi biocidnih proizvoda. Službeni list Europske Unije 18.
56. Ezzi L, Salah IB, Haouas Z, Sakly A, Grissa I, Chakroun S, Kerkeni E, Hassine M, Mehdi M, Cheikh HB (2016) Histopathological and genotoxic effects of chlorpyrifos in rats. Environmental Science and Pollution Research 23: 4859–4867. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5722-x>.
57. Fang X, Zhang P (2012) Aneuploidy and tumorigenesis. Seminars in Cell & Developmental Biology 22: 595–601. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2011.03.002>.
58. FAO, WHO, IPCS (1999) Pesticide residues in food 1999 Toxicological evaluations: Chlorpyrifos. <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v99pr03.htm>.
59. FAO, WHO, IPCS (2001) Pesticide residues in food 2001 Toxicological evaluations: Imidacloprid. <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2001pr07.htm#2.1.1>.
60. FAO, WHO, ICPS (2004) Pesticide residues in food 2004 Toxicological evaluations: Glyphosate. <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v2004pr01.pdf>
61. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A (2007) G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. Behavior Research

- Methods 39: 175-191. <https://doi.org/10.3758/bf03193146>
62. Fenech M, Neville S, Rinaldi J (1994) Sex is an important variable affecting spontaneous micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes. *Mutation Research* 313: 203–207. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(94\)90050-7](https://doi.org/10.1016/0165-1161(94)90050-7).
 63. Fenech, M (2007) Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols* 2: 1084-1104. [10.1038/nprot.2007.77](https://doi.org/10.1038/nprot.2007.77)
 64. Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, Surrallés J, Crott JW, Parry J, Norppa H., Eastmond D, Tucker JD, Thomas P (2011) Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis* 26: 125–132. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq052>.
 65. Feng S, Kong Z, Wang X, Peng P, Zeng EY (2005) Assessing the genotoxicity of imidacloprid and RH-5849 in human peripheral blood lymphocytes in vitro with comet assay and cytogenetic tests. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 61: 239–246. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.10.005>.
 66. Ferguson-Smith MA (2001) In situ Hybridization. U: *Encyclopedia of Genetics*, 1002–1004. <https://doi.org/10.1006/rwgn.2001.0697>.
 67. Ferré DM, Ludueña HR, Romano RR, Gorla NBM (2020) Evaluation of the genotoxic potential of cypermethrin, chlorpyrifos and their subsequent mixture, on cultured bovine lymphocytes. *Chemosphere* 243: 125341. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125341>.
 68. Fučić A, Guszak V, Mantovani A (2017) Transplacental exposure to environmental carcinogens : Association with childhood cancer risks and the role of modulating factors. *Reproductive Toxicology* 72: 182-190. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.06.044>.
 69. Fujii T, Mashimo M, Moriwaki Y, Misawa H, Ono S, Horiguchi K, Kawashima K (2017) Physiological functions of the cholinergic system in immune cells. *Journal of Pharmacological Sciences* 134: 1-21. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2017.05.002>
 70. Galloway SM, Buckton KE (1978) Aneuploidy and ageing: chromosome studies on a random sample of the population using G-banding. *Cytogenetics and Cell Genetics* 20: 78-95. <https://doi.org/10.1159/000130842>.
 71. Gawade L, Dadarkar SS, Husain R, Gatne M (2013) A detailed study of developmental immunotoxicity of imidacloprid in Wistar rats. *Food and Chemical Toxicology* 51: 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.009>.
 72. Gebel T, Kevekordes S, Pav K, Edenharder R, Dunkelberg H (1997) In vivo genotoxicity of selected herbicides in the mouse bone-marrow micronucleus test. *Archives of*

- Toxicology 71:193–197. <https://doi.org/10.1007/s002040050375>.
73. George J, Shukla Y (2013) Emptying of Intracellular Calcium Pool and Oxidative Stress Imbalance Are Associated with the Glyphosate-Induced Proliferation in Human Skin Keratinocytes HaCaT Cells. *ISNR Dermatology*: 825180. <https://doi.org/10.1155/2013/825180>.
 74. Gigante P, Berni M, Bussolati S, Grasselli F, Grolli S, Ramoni R, Bassini G (2018) Glyphosate affects swine ovarian and adipose stromal cell functions. *Animal Reproduction Science* 195: 185-196. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.05.023>.
 75. Goethem FV (1997) Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis assay for the detection of DNA damaging agents: genotoxic effects of cobalt powder, tungsten carbide and cobalt-tungsten carbide. *Mutation Research* 392: 31-43. [https://doi.org/10.1016/s0165-1218\(97\)00043-8](https://doi.org/10.1016/s0165-1218(97)00043-8).
 76. Gollapudi BB, Mendrala AL, Linscombe VA (1995) Evaluation of the genetic toxicity of the organophosphate insecticide chlorpyrifos. *Mutation Research* 342: 25-36. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(95\)90087-x](https://doi.org/10.1016/0165-1218(95)90087-x).
 77. Gómez-Meda BC, Bañales-Martínez LR, Zamora-Perez AL, Lemus-Varela MDL, Trujillo X, Sánchez-Parada MG, Torres-Mendoza BM, Armendáriz-Borunda J, Zúñiga-González GM (2016) Micronucleated Erythrocytes in Peripheral Blood from Neonate Rats Exposed by Breastfeeding to Cyclophosphamide, Colchicine, or Cytosine-Arabinoside. *BioMed Research International*: 9161648. <https://doi.org/10.1155/2016/9161648>.
 78. Gonçalves ÍFS, Souza TM, Vieira LR, Marchi FC, Nascimento AP, Farias DF (2020) Toxicity testing of pesticides in zebrafish—a systematic review on chemicals and associated toxicological endpoints. *Environmental Science and Pollution Research* 27: 10185–10204. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-07902-5>.
 79. Gordon D, Resio B, Pellman D (2012) Causes and consequences of aneuploidy in cancer. *Nature Reviews Genetics* 13: 189–203. <https://doi.org/10.1038/nrg3123>.
 80. Greenop KR, Peters S, Bailey HD, Fritschi L, Attia J, Scott RJ, Glass DC, de Klerk NH, Alvaro F, Armstrong BK, Milne E (2013) Exposure to pesticides and the risk of childhood brain tumors. *Cancer Causes & Control* 24: 1269–1278. <https://doi.org/10.1007/s10552-013-0205-1>.
 81. Guffei A, Sarkar R, Klewes L, Righolt C, Knecht H, Mai S (2010) Dynamic chromosomal rearrangements in Hodgkin’s lymphoma are due to ongoing three-dimensional nuclear remodeling and breakage-bridge-fusion cycles. *Haematologica* 95: 2038–2046.

- <https://doi.org/10.3324/haematol.2010.030171>.
82. Guo J, Shi R, Cao Y, Luan Y, Zhou Y, Gao Y, Tian Y (2020) Genotoxic effects of imidacloprid in human lymphoblastoid TK6 cells. *Drug and Chemical Toxicology* 43: 208-212. <https://doi.org/10.1080/01480545.2018.1497048>.
 83. Guyton AC, Hall JE (1996) *Textbook of Medical Physiology*. W.B. Saunders Company, Philadelphia.
 84. Hackenberger DK, Stjepanović N, Lončarić Ž, i Hackenberger BK (2018) Acute and subchronic effects of three herbicides on biomarkers and reproduction in earthworm *Dendrobaena veneta*. *Chemosphere* 208: 722–730. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.047>.
 85. Hanada S, Snider NT, Brunt EM, Hollenberg PF, Omary MB (2010) Gender dimorphic formation of mouse Mallory-Denk bodies and the role of xenobiotic metabolism and oxidative stress. *Gastroenterology* 138: 1607-1617. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.055>.
 86. Hao Y, Zhang Y, Cheng J, Xu W, Xu Z, Gao J, Tao L (2020) Adjuvant contributes Roundup's unexpected effects on A549 cells. *Environmental Research* 184: 109306. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109306>.
 87. Hasenbein S, Connon RE, Lawler SP, Geist J (2015) A comparison of the sublethal and lethal toxicity of four pesticides in *Hyalella azteca* and *Chironomus dilutus*. *Environmental Science and Pollution Research* 22: 11327–11339. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4374-1>.
 88. Helleday T, Eshtad S, Nik-Zainal S (2014) Mechanisms underlying mutational signatures in human cancers. *Nature Reviews Genetics* 15: 585–598. <https://doi.org/10.1038/nrg3729>.
 89. Hickey JJ, Anderson DW (1968) Chlorinated Hydrocarbons and Eggshell Changes in Raptorial and Fish-eating birds. *Science* 162: 271–273. <https://doi.org/10.1126/science.162.3850.271>.
 90. Hocine L, Merzouk H, Merzouk SA, Ghorzi H, Youbi M, Narce M (2016) The effects of alpha-cypermethrin exposure on biochemical and redox parameters in pregnant rats and their newborns. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 134: 49-54. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2016.04.007>
 91. Hofer T, Karlsson HL, Möller L (2006) DNA oxidative damage and strand breaks in young healthy individuals: A gender difference and the role of life style factors. *Free Radical Research*, 40, 707–714. doi:10.1080/10715760500525807.

92. Hoppin JA, Umbach DM, London SJ, Lynch CF, Alavanja MCR, Sandler DP (2006) Pesticides and adult respiratory outcomes in the agricultural health study. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1076: 343–354. <https://doi.org/10.1196/annals.1371.044>.
93. Hou L, Andreotti G, Baccarelli AA, Savage S, Hoppin JA, Sandler DP, Barker J, Zhu ZZ, Hoxha M, Dioni L, Zhang X, Koutros S, Freeman LEB, Alavanja MC (2013) Lifetime pesticide use and telomere shortening among male pesticide applicators in the Agricultural Health Study. *Environmental Health Perspectives* 121: 919–924. <https://doi.org/10.1289/ehp.1206432>.
94. How V, Hashim Z, Ismail P, Said SM, Omar D, Tamrin SBM (2014) Exploring Cancer Development in Adulthood: Cholinesterase Depression and Genotoxic Effect From Chronic Exposure to Organophosphate Pesticides Among Rural Farm Children. *Journal of Agromedicine* 19: 35–43. <https://doi.org/10.1080/1059924X.2013.866917>.
95. Hu L, Luo D, Zhou T, Tao Y, Feng J, Mei S (2017) The association between non-Hodgkin lymphoma and organophosphate pesticides exposure: A meta-analysis. *Environmental Pollution* 231: 319–328. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.028>.
96. IARC (2017) IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans; some organophosphate insecticides and herbicides 112.
97. Ibáñez-Cabellos JS, Pérez-Machado G, Seco-Cervera M, Berenguer-Pascual E, García-Giménez JL, Pallardó FV (2018) Acute telomerase components depletion triggers oxidative stress as an early event previous to telomeric shortening. *Redox Biology* 14: 398–408. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.10.004>.
98. IPCS (International Programme for Chemical Safety) (1992) Environmental health criteria 142: alpha-cypermethrin. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc142.htm#PartNumber:6>.
99. Iszatt N, Janssen S, Lenters V, Dahl C, Stigum H, Knight R, Mandal S, Peddada S, González A, Midtvedt T, Eggesbø M (2019) Environmental toxicants in breast milk of Norwegian mothers and gut bacteria composition and metabolites in their infants at 1 month. *Microbiome* 7:34. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0645-2>.
100. Jackson SP, Bartek J (2009) The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461: 1071–1078. <https://doi.org/10.1038/nature08467>.
101. Jackson-Cook C (2011) Constitutional and acquired autosomal aneuploidy. *Clinics in Laboratory Medicine* 31: 481–511. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2011.08.002>.
102. Jaga K, Dharmani C (2006) Methyl Parathion: an Organophosphate Insecticide Not Quite

- Forgotten. Reviews on Environmental Health 21.
<https://doi.org/10.1515/REVEH.2006.21.1.57>.
103. Jarman WM, Ballschmiter K (2012) From coal to DDT: the history of the development of the pesticide DDT from synthetic dyes till Silent Spring. *Endeavour* 36: 131–142.
<https://doi.org/10.1016/j.endeavour.2012.10.003>.
104. Jayasumana C, Gunatilake S, Senanayake P (2014) Glyphosate, Hard Water and Nephrotoxic Metals: Are They the Culprits Behind the Epidemic of Chronic Kidney Disease of Unknown Etiology in Sri Lanka? *International Journal of Environmental Research and Public Health* 11: 2125–2147. <https://doi.org/10.3390/ijerph110202125>.
105. Jin M, Fu J, Xue B, Zhou S, Zhang L, Li A (2017) Distribution and enantiomeric profiles of organochlorine pesticides in surface sediments from the Bering Sea, Chukchi Sea and adjacent Arctic areas. *Environmental Pollution* 222: 109–117.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.12.075>.
106. Johnson, T (1999) CRC Ethnobotany Desk Reference
107. Jungmann G (1966) Arsenic cancer in vintagers. *Der Landarzt* 42: 1244–1247.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5928681>.
108. Justo R, Boada J, Frontera M, Oliver J, Bermudez J, Gianotti M (2005) Gender dimorphism in rat liver mitochondrial oxidative metabolism and biogenesis. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 289: 372–378.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00035.2005>.
109. Kahl VFS, da Silva J, da Silva FR (2016) Influence of exposure to pesticides on telomere length in tobacco farmers: A biology system approach. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 791–792: 19–26.
<https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2016.08.003>.
110. Karabay NU, Oguz MG (2005) Cytogenetic and genotoxic effects of the insecticides, imidacloprid and methamidophos. *Genetics and molecular research : GMR* 4: 653–662.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16475109>.
111. Kataria SK, Chhillar AK, Kumar A, Tomar M, Malik V (2016) Cytogenetic and hematological alterations induced by acute oral exposure of imidacloprid in female mice. *Drug and Chemical Toxicology* 39: 59–65.
<https://doi.org/10.3109/01480545.2015.1026972>.
112. Kaur K, Kaur R (2018) Occupational pesticide exposure, impaired DNA repair and diseases. *Indian Journal of Occupational and Environmental Medicine* 22: 74–81.
https://doi.org/10.4103/ijoem.IJOEM_45_18.

113. Kawashima K, Fujii T (2003) The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. *Life Sciences* 74: 675-696. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.09.037>.
114. Kerage D, Sloan EK, Mattarollo SR, McCombe PA (2019) Interaction of neurotransmitters and neurochemicals with lymphocytes. *Journal of Neuroimmunology* 332: 99-111. <https://doi.org/10.1016/j.neuroim.2019.04.006>.
115. Kimura K, Yokoyama K, Sato H, Nordin RB, Naing L, Kimura S, Okabe S, Maeno T, Kobayashi Y, Kitamura F, Araki S (2005) Effects of Pesticides on the Peripheral and Central Nervous System in Tobacco Farmers in Malaysia: Studies on Peripheral Nerve Conduction, Brain-Evoked Potentials and Computerized Posturography. *Industrial Health* 43: 285–294. <https://doi.org/10.2486/indhealth.43.285>.
116. Kirsch-Volders M, Sofuni T, Aardema M, Albertini S, Eastmond D, Fenech M, Ishidate M Jr, Kirchner S, Lorge E, Morita T, Norppa H, Suralles J, Vanhauwaert A, Wakata A (2003) Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutation Research* 540: 153–163. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2003.07.005>.
117. Kirsch-Volders M, Pacchierotti F, Parry EM, Russo A, Eichenlaub-Ritter U, Adler ID (2019) Risks of aneuploidy induction from chemical exposure: Twenty years of collaborative research in Europe from basic science to regulatory implications. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 779: 126–147. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2018.11.002>.
118. Kjeldsen LS, Ghisari M, Bonefeld-Jørgensen EC (2013) Currently used pesticides and their mixtures affect the function of sex hormone receptors and aromatase enzyme activity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 272: 453–464. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.06.028>.
119. Klayman MB (1968) Exposure to insecticides. *Archives of Otolaryngology* 88: 116–117. <https://doi.org/10.1001/archotol.1968.00770010118028>.
120. Koller VJ, Fürhacker M, Nersesyan A, Mišik M, Eisenbauer M, Knasmueller S (2012) Cytotoxic and DNA-damaging properties of glyphosate and Roundup in human-derived buccal epithelial cells. *Archives of Toxicology* 86: 805-813. <https://doi.org/10.1007/s00204-012-0804-8>.
121. Kos K, Celar FA (2013) Sensitivity of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. to selected herbicides. *Pest Management Science* 69: 717–721. <https://doi.org/10.1002/ps.3427>.
122. Kozlov AV, Duvigneau JC, Hyatt TC, Raju R, Behling T, Hartl RT, Staniek K, Miller I,

- Gregor W, Redl H, Chaudry IH (2010) Effect of estrogen on mitochondrial function and intracellular stress markers in rat liver and kidney following trauma-hemorrhagic shock and prolonged hypotension. *Molecular Medicine* 16: 254-261. <https://doi.org/10.2119/molmed.2009.00184>.
123. Küpper A, Peter F, Zöllner P, Lorentz L, Tranel PJ, Beffa R, Gaines TA (2018) Tembotrione detoxification in 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD) inhibitor-resistant Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri* S. Wats.). *Pest Management Science* 74: 2325–2234. <https://doi.org/10.1002/ps.4786>.
124. Kwiatkowska M, Reszka E, Wozniak K, Jablonska E, Michalowicz J, Bukowska B (2017) DNA damage and methylation induced by glyphosate in human peripheral blood mononuclear cells (in vitro study). *Food and Chemical Toxicology* 105: 93-98. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.03.051>.
125. Lambert IB, Napolitano RL, Fuchs RP (1992) Carcinogen-induced frameshift mutagenesis in repetitive sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89: 1310–1314. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.4.1310>.
126. Laugeray A, Herzine A, Perche O, Richaard O, Montecot-Dubourg C, Menuet A, Mazaud-Guittot S, Lesne L, Jegou B, Mortaud S (2017) In utero and lactational exposure to low-doses of the pyrethroid insecticide cypermethrin leads to neurodevelopmental defects in male mice-An ethological and transcriptomic study. *PLoS One* 12: e0184475. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184475>.
127. Lawrence K, Chau T, Engebrecht JA (2014) DNA damage response and spindle assembly checkpoint function throughout the cell cycle to ensure genomic integrity. *PLoS Genetics* 11: e1005150. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005150>.
128. Lee WJ (2005) Agricultural pesticide use and risk of glioma in Nebraska, United States. *Occupational and Environmental Medicine* 62: 786–792. <https://doi.org/10.1136/oem.2005.020230>.
129. Lerro CC, Koutros S, Andreotti G, Hines CJ, Blair A, Lubin J, Ma X, Zhang Y, Freeman LEB (2015) Use of acetochlor and cancer incidence in the Agricultural Health Study. *International Journal of Cancer* 137: 1167–1175. <https://doi.org/10.1002/ijc.29416>.
130. Li Q, Lambrechts MJ, Thang Q, Liu S, Ge D, Yin R, Xi M, You Z (2013) Glyphosate and AMPA inhibit cancer cell growth through inhibiting intracellular glycine synthesis Drug desing, development and therapy 7: 635-643. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S49197>.
131. Li D, Huang Q, Lu M, Zhang L, Yang Z, Zong M, Tao L (2015) The organophosphate

- insecticide chlorpyrifos confers its genotoxic effects by inducing DNA damage and cell apoptosis. *Chemosphere* 135: 387–393. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.05.024>.
132. Li J, Pang G, Ren F, Fang B (2019) Chlorpyrifos-induced reproductive toxicity in rats could be partly relieved under high-fat diet. *Chemosphere* 229: 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.020>.
 133. Lin N, Garry VF (2000) In vitro studies of cellular and molecular developmental toxicity of adjuvants, herbicides, and fungicides commonly used in Red River Valley, Minnesota. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A* 60: 423-439. <https://doi.org/10.1080/00984100050033494>.
 134. Lin H, Mei N, Manjanatha MG (2013) In vitro comet assay for testing genotoxicity of chemicals. U: Caldwell GW, Yan Z (ed) Optimization in drug discovery: In vitro methods, *Methods in Pharmacology and Toxicology*. Springer Science Business Media, New York 517-536. 10.1007/978-1-62703-742-6_31.
 135. Lindberg HK, Wang X, Järventaus H, Falck GC, Norppa H, Fenech M (2007) Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. *Mutation Research* 617: 33–45. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.12.002>.
 136. Lovell D, Omori T (2008) Statistical issues in the use of comet assay. *Mutagenesis* 23: 171-182. <https://doi.org/10.1093/mutage/gen015>.
 137. Lu Y, Wang Z (2002) Bioconcentration of trace organochlorinepesticides by the rainbow trout. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 37: 529–539. <https://doi.org/10.1081/ESE-120003234>.
 138. Lu C, Liu X, Liu C, Wang J, Li C, Liu Q, Li Y, Li S, Sun S, Yan J, Shao J (2015) Chlorpyrifos Induces MLL Translocations Through Caspase 3-Dependent Genomic Instability and Topoisomerase II Inhibition in Human Fetal Liver Hematopoietic Stem Cells. *Toxicological Sciences* 147: 588–606. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv153>.
 139. Luaces JP, Rossi LF, Chirino MG, Browne M, Merani MS, Mudry MD (2017) Genotoxic effects of Roundup Full II® on lymphocytes of *Chaetophractus villosus* (Xenarthra, Mammalia): In vitro studies. *PLoS One* 12: e0182911. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182911>.
 140. Mamane A, Raheison C, Tessier JF, Baldi I, Bouvier G (2015) Environmental exposure to pesticides and respiratory health. *European Respiratory Review* 24: 462–473. <https://doi.org/10.1183/16000617.00006114>.
 141. Manera M, Dezfuli BS, DePasquale JA, Giari L (2016) Multivariate approach to gill

- pathology in European sea bass after experimental exposure to cadmium and terbuthylazine. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 129: 282–290. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.03.039>.
142. Mansilha C, Melo A, Ferreira IMPLVO, Pinho O, Domingues V, Pinho C, Gameiro P (2011) Groundwater from Infiltration Galleries Used for Small Public Water Supply Systems: Contamination with Pesticides and Endocrine Disruptors“. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 87: 312–318. <https://doi.org/10.1007/s00128-011-0337-5>.
143. Maradonna F, Carnevali O (2010) Lipid Metabolism Alteration by Endocrine Disruptors in Animal Models: An Overview *Frontiers in Endocrinology* 9: 654. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00654>.
144. Martini CN, Gabrielli M, Vila Mdel C (2012) A commercial formulation of glyphosate inhibits proliferation and differentiation to adipocytes and induces apoptosis in 3T3-L1 fibroblasts. *Toxicology In Vitro* 26: 1007-1013. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.04.017>.
145. Mathiesen L, Mørck TA, Sønnegaard Poulsen M, Kolstrup Søgaard Nielsen J, Mose T, Long M, Bonefeld-Jørgensen E, Bossi R, Knudsen LE (2020) Placental transfer of pesticides studied in human placental perfusion. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology (u tisku)*. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13456>.
146. Maynard S, Schurman SH, Harboe C, de Souza-Pinto NC, Bohr VA (2008) Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. *Carcinogenesis* 30: 2–10. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn250>.
147. Mehl A, Rolseth V, Gordon S, Bjørnaas M, Seeberg E, Fonnum F (2000) Brain hypoplasia caused by exposure to trichlorfon and dichlorvos during development can be ascribed to DNA alkylation damage and inhibition of DNA alkyltransferase repair. *Neurotoxicology* 21: 165-173. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10794396>.
148. Mehta A, Verma RS, Srivastava N (2008) Chlorpyrifos-induced DNA damage in rat brain and liver. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 49: 426-33. <https://doi.org/10.1002/em.20397>.
149. Meuling WJA, Ravensberg LC, Roza L, van Hemmen JJ (2005) Dermal absorption of chlorpyrifos in human volunteers. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 78: 44–50. <https://doi.org/10.1007/s00420-004-0558-6>.
150. Mikolić A, Brčić Karačonji I (2018) Imidacloprid as reproductive toxicant and endocrine disruptor: investigations in laboratory animals. *Archives of Industrial Hygiene and*

- Toxicology 69: 103–108. <https://doi.org/10.2478/aiht-2018-69-3144>.
151. Milán M, Clemente-Ruiz M, Dekanty A, Muzzopappa M (2014) Aneuploidy and tumorigenesis in *Drosophila*. *Seminars in cell and developmental biology* 28: 110-115. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2014.03.014>.
 152. Mishima M (2017) Chromosomal aberrations clastogens vs aneugens. *Frontiers in Bioscience* 9: 468. <https://doi.org/10.2741/s468>.
 153. Mnif W, Hassine AIH, Bouaziz A, Bartegi A, Thomas O, Roig B (2011) Effect of Endocrine Disruptor Pesticides: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 8: 2265–2303. <https://doi.org/10.3390/ijerph8062265>.
 154. Mohammad AM, Karttunen V, Huuskonen P, Huovinen M, Auriola S, Vahakangas K (2018) Transplacental transfer and metabolism of diuron in human placenta. *Toxicology Letters* 295: 307-313. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.07.012>.
 155. Moore A, Waring CP (2001) The effects of a synthetic pyrethroid pesticide on some aspects of reproduction in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquatic Toxicology* 52: 1–12. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(00\)00133-8](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(00)00133-8).
 156. Morris AD, Muir DCG, Solomon KR, Letcher RJ, McKinney MA, Fisk AT, McMeans BC, Tomy GT, Teixeira C, Wang X, Duric M (2016) Current-use pesticides in seawater and their bioaccumulation in polar bear-ringed seal food chains of the Canadian Arctic. *Environmental Toxicology and Chemistry* 35: 1695–1707. <https://doi.org/10.1002/etc.3427>.
 157. Morton V, Staub T (2008) A Short History of Fungicides. *APSnet Feature Articles*. <https://doi.org/10.1094/APSnetFeature-2008-0308>.
 158. Mostafalou S, Abdollahi M (2017) Pesticides: an update of human exposure and toxicity. *Archives of Toxicology* 91: 549–599. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1849-x>.
 159. Mrema EJ, Rubino FM, Brambilla G, Moretto A, Tsatsakis AM, Colosio C (2013). Persistent organochlorinated pesticides and mechanisms of their toxicity. *Toxicology* 307: 74–88. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.11.015>.
 160. Muller M, Hess L, Tardivo A, Lajmanovich R, Attademo A, Poletta G, Simoniello MF, Yodice A, Lavarello S, Chialvo D, Scremin O (2014) Neurologic dysfunction and genotoxicity induced by low levels of chlorpyrifos. *Neurotoxicology* 45: 22-30. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2014.08.012>
 161. Murkunde YV, Sathya TN, Subashini N, Balakrishna Murthy P (2012) Transplacental genotoxicity evaluation of cypermethrin using alkaline comet assay. *Human and Experimental Toxicology* 31: 185-192. <https://doi.org/10.1177/0960327111412091>.

162. Mužinić V, Ramić S, Želježić D (2019) Chromosome missegregation and aneuploidy induction in human peripheral blood lymphocytes in vitro by low concentrations of chlorpyrifos, imidacloprid and α -cypermethrin. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 60: 72-84. <https://doi.org/10.1002/em.22235>.
163. Müller G (2008) History of the Discovery and Development of Triazine Herbicides. U: *The Triazine Herbicides*, 13–29. <https://doi.org/10.1016/B978-044451167-6.50005-2>.
164. Nagy K, Tessema RA, Budnik LT, Adam B (2019) Comparative cyto- and genotoxicity assessment of glyphosate and glyphosate-based herbicides in human peripheral white blood cells. *Environmental Research* 179(dio B): 108851. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108851>.
165. Nehez M, Lorencz R, Desi I (2000) Simultaneous Action of Cypermethrin and Two Environmental Pollutant Metals, Cadmium and Lead, on Bone Marrow Cell Chromosomes of Rats in Subchronic Administration. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 45: 55-60. <https://doi.org/10.1006/eesa.1999.1831>.
166. Nik-Zainal S (2019) From genome integrity to cancer. *Genome Medicine* 11: 4. <https://doi.org/10.1186/s13073-019-0617-y>.
167. Nowinski G, Van Dyke D, Tilley B, Jacobsen G, Babu V, Worsham M, Wilson G, Weiss L. 1990. The frequency of aneuploidy in cultured lymphocytes is correlated with age and gender but not with reproductive history. *American Journal of Human Genetics* 46: 1101–1111. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1683821>.
168. OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) (2016a) Test no. 487: In vitro mammalian cell micronucleus test. OECD Guidelines for the testing of chemicals. OECD Publishing, Pariz.
169. OECD (2016b) Test no. 489: In vivo mammalian alkaline comet assay. OECD Guidelines for the testing of chemicals. OECD Publishing, Pariz.
170. Ojha A, Gupta YK (2014) Evaluation of genotoxic potential of commonly used organophosphate pesticides in peripheral blood lymphocytes of rats. *Human and Experimental Toxicology* 34: 390-400. <https://doi.org/10.1177/0960327114537534>.
171. Olaharski A, Mondrala S, Eastmond D (2005) Chromosomal malsegregation and micronucleus induction in vitro by the DNA topoisomerase II inhibitor fisetin. *Mutation Research* 582: 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2005.01.002>.
172. Olive PL, Banath JP (2006) The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols* 1: 23-29. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.5>.
173. Patel S, Pandey AK, Bajpayee M, PArmar D, Dhawan A (2006) Cypermethrin-induced

- DNA damage in organs and tissues of the mouse: evidence from the comet assay. *Mutation Research* 607: 176-183. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.04.010>.
174. Patel S, Bajpayee M, Pandey AK, Parmar D, Dhawan A (2007) In vitro induction of cytotoxicity and DNA strand breaks in CHO cells exposed to cypermethrin, pendimethalin and dichlorvos. *Toxicology In Vitro* 21: 1409-1418. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.05.009>.
175. Paz-y-Miño C, Bustamante G, Sánchez ME, Leone PE (2002) Cytogenetic monitoring in a population occupationally exposed to pesticides in Ecuador. *Environmental Health Perspectives* 110: 1077–1080. <https://doi.org/10.1289/ehp.110-1241062>.
176. Pearce PA, Reynolds LM, Peakall DB (1978) DDT residues in rainwater in New Brunswick and estimate of aerial transport of DDT into the Gulf of St. Lawrence, 1967-68. *Pesticides monitoring journal* 11: 199–204. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/673662>.
177. Peiris DC, Dhanushka T (2017) Low doses of chlorpyrifos interfere with spermatogenesis of rats through reduction of sex hormones. *Environmental Science and Pollution Research* 24: 20859–20867. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9617-x>.
178. Perego MC, Schutz LF, Caloni F, Cortinovis C, Albonico M, Spicer LJ (2017) Evidence for direct effects of glyphosate on ovarian function: glyphosate influences steroidogenesis and proliferation of bovine granulosa but not theca cells in vitro. *Journal of Applied Toxicology* 37: 692-698. <https://doi.org/10.1002/jat.3417>.
179. Pérez J, Domingues I, Monteiro M, Soares AMVM, Loureiro S (2013) Synergistic effects caused by atrazine and terbuthylazine on chlorpyrifos toxicity to early-life stages of the zebrafish *Danio rerio*. *Environmental Science and Pollution Research* 20: 4671–4680. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1443-6>.
180. Portmann JE (1975) The bioaccumulation and effects of organochlorine pesticides in marine animals. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences* 189 :291–304. <https://doi.org/10.1098/rspb.1975.0058>.
181. Preston RJ, Hoffman GR (2013) Genetic Toxicology. U: Casarett and Doull's Toxicology : The basic science of poisons, ur: Klaassen, CD. 8. izdanje, 445–480.
182. Queirós L, Vidal T, Nogueira AJA, Gonçalves FJM, Pereira JL (2018) Ecotoxicological assessment of the herbicide Winner Top and its active substances—are the other formulants truly inert? *Ecotoxicology* 27: 945–955. <https://doi.org/10.1007/s10646-018-1939-z>.
183. Radwan M, Jurewicz J, Wielgomas B, Piskunowicz M, Sobala W, Radwan P, Jakubowski

- L, Hawuła W, Hanke W (2015) The association between environmental exposure to pyrethroids and sperm aneuploidy. *Chemosphere* 128: 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.12.077>.
184. Rahman MF, Mahboob M, Danadevi K, Saleha Banu B, Grover P (2002) Assessment of genotoxic effects of chlorpyrifos and acephate by the comet assay in mice leucocytes. *Mutation Research* 26: 139-147. [https://doi.org/10.1016/s1383-5718\(02\)00033-5](https://doi.org/10.1016/s1383-5718(02)00033-5).
 185. Raimondi E, Scariolo S, De Sario A, De Carli L (1989) Aneuploidy assays on interphase nuclei by means of in situ hybridization with DNA probes. *Mutagenesis* 4: 165–169. <https://doi.org/10.1093/mutage/4.3.165>.
 186. Rauh V, Arunajadai S, Horton M, Perera F, Hoepner L, Barr DB, Whyatt R (2011) Seven-Year Neurodevelopmental Scores and Prenatal Exposure to Chlorpyrifos, a Common Agricultural Pesticide. *Environmental Health Perspectives* 119: 1196–1201. <https://doi.org/10.1289/ehp.1003160>.
 187. Rayner JL, Enoch RR, Wolf DC, Fenton SE (2007) Atrazine-induced reproductive tract alterations after transplacental and/or lactational exposure in male Long_evs rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 218: 238-248. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.11.020>
 188. Re D, Zander T, Diehl W, Wolf J (2002) Genomic instability in Hodgkin’s lymphoma. *Annals of Oncology* 13: 19–22. <https://doi.org/10.1093/annonc/13.s1.19>.
 189. Ren N, Atyah M, Chen WY, Zhou CH (2017) The various aspects of genetic and epigenetic toxicology: testing methods and clinical applications. *Journal of Translational Medicine* 15: 110. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1218-4>.
 190. Ridgway RL, Tinney JC, MacGregor JT, Starler NJ (1978) Pesticide Use in Agriculture. *Environmental Health Perspectives* 27: 103–112. <https://doi.org/10.1289/ehp.7827103>.
 191. Roizen, NJ, Patterson D (2003) Down’s syndrome. *The Lancet* 361: 1281–1289. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12987-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12987-X).
 192. Sagi D, Marcos-Hadad E, Bari V, Resnick MA, Covo S (2017) Increased LOH due to defective sister chromatid cohesion is due primarily to chromosomal aneuploidy and not recombination. *G3 (Bethesda)* 7:3305–3315. <https://doi.org/10.1534/g3.117.300091>.
 193. Salazar-Arredondo E, De Jesus Solis Heredia M, Rojas-Garcia E, Hernandez-Ochoa I, Quintanilla-Vega B (2008) Sperm chromatin alteration and DNA damage by methyl-parathion, chlorpyrifos and diazinon and their oxon metabolites in human spermatozoa. *Reproductive Toxicology* 25: 455-460. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2008.05.055>.
 194. SAN (Sustainable Agriculture Network) (2011) List of prohibited pesticides.

[https://coricafe.com/library/Sustainability/RAINFOREST ALLIANCE - Prohibited Pesticides.pdf](https://coricafe.com/library/Sustainability/RAINFOREST_ALLIANCE_-_Prohibited_Pesticides.pdf).

195. Sanchez-Bayo F (2012) Insecticides Mode of Action in Relation to Their Toxicity to Non-Target Organisms. *Journal of Environmental & Analytical Toxicology* s4. <https://doi.org/10.4172/2161-0525.S4-002>.
196. Sandal S, Yilmaz B (2010) Genotoxic effects of chlorpyrifos, cypermethrin, endosulfan and 2,4-D on human peripheral lymphocytes cultured from smokers and nonsmokers. *Environmental Toxicology* 26: 433–442. <https://doi.org/10.1002/tox.20569>.
197. Sandhu M, Saeed A, Khilji M, Ahmed A, Latif M, Khalid N (2013) Genotoxicity evaluation of chlorpyrifos: a gender related approach in regular toxicity testing. *Journal of Toxicological Sciences* 38:237–244. <https://doi.org/10.2131/jts.38.237>.
198. Santaguida S, Amon A (2015) Short- and long-term effects of chromosome mis-segregation and aneuploidy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16: 473–485. <https://doi.org/10.1038/nrm4025>.
199. Santovito A, Ruberto S, Gendusa C, Cervella P (2018) In vitro evaluation of genomic damage induced by glyphosate on human lymphocytes. *Environmental Science and Pollution Research* 25: 34693-34700. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3417-9>.
200. Savic S, Bubendorf L (2016) Common Fluorescence In Situ Hybridization Applications in Cytology. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 140: 1323–1330. <https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0202-RA>.
201. Schinasi L, Leon ME (2014) Non-Hodgkin lymphoma and occupational exposure to agricultural pesticide chemical groups and active ingredients: a systematic review and meta-analysis. *International journal of environmental research and public health* 11: 4449–4527. <https://doi.org/10.3390/ijerph110404449>.
202. Şenyildiz M, Kilinc A, Ozden S (2018) Investigation of the genotoxic and cytotoxic effects of widely used neonicotinoid insecticides in HepG2 and SH-SY5Y cells. *Toxicology and Industrial Health* 34: 375–383. <https://doi.org/10.1177/0748233718762609>.
203. Sharma A, Kumar V, Shahzad B, Tanveer M, Sidhu GPS, Handa N, Kohli SK, Yadav P, Bali AS, Parihar RD, Dar OI, Singh K, Jasrotia S, Bakshi P, Ramakrishnan M, Kumar S, Bhardwaj R, Thukral AK (2019) Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Applied Sciences* 1: 1446. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-1485-1>.
204. Shim, YK, Mlynarek SP, van Wijngaarden E (2009) Parental Exposure to Pesticides and Childhood Brain Cancer: U.S. Atlantic Coast Childhood Brain Cancer Study.

205. Shukla Y, Arora A (2001) Transplacental Carcinogenic Potential of the Carbamate Fungicide Mancozeb. *Journal of Environmental Pathology Toxicology and Oncology* 20: 127-131. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11394711>.
206. Silver MK, Shao J, Chen M, Xia Y, Lozoff B, Meeker JD (2016) Distribution and predictors of pesticides in the umbilical cord blood of Chinese newborns. *International Journal of Environmental Research and Occupational Health* 13: 94. <https://doi.org/10.3390/ijerph13010094>.
207. Singh S, Kumar V, Thakur S, Banerjee BD, Chandna S, Rautela RS, Grover SS, Rawat DS, Pasha ST, Jain SK, Ichhpujani RL, Rai A (2011) DNA damage and cholinesterase activity in occupational workers exposed to pesticides. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 31: 278-285. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2010.11.005>.
208. Soares, RLP, de Andrade ALC, Santos TP, da Silva SCBL, da Silva JF, dos Santos AR, da Silva Souza EHL, da Cunha FM, Teixeira W, Cadena VS, Ribeiro M, de Sá FB, de Carvalho LB Jr, Cadena, PG (2016) Acute and chronic toxicity of the benzoylurea pesticide, lufenuron, in the fish, *Colossoma macropomum*. *Chemosphere* 161: 412–421. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.07.033>.
209. Solomon KR, Williams WM, Mackay D, Purdy J, Giddings JM, Giesy JP (2014) Properties and Uses of Chlorpyrifos in the United States. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 13–34. https://doi.org/10.1007/978-3-319-03865-0_2.
210. Stivaktakis, PD, Kavvalakis MP, Tzatzarakis MN, Alegakis AK, Panagiotakis MN, Fragkiadaki P, Vakonaki E, Ozcagli E, Hayes, WA, Rakitskii VN, Tsatsakis, AM (2016) Long-term exposure of rabbits to imidacloprid as quantified in blood induces genotoxic effect. *Chemosphere* 149: 108–113. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.040>.
211. Sullivan S (2015) Greener chemistry for sustainable future: biopesticides. *Chimica Oggi - Chemistry Today* 33: 46–49. https://www.teknoscienze.com/tks_article/greenerchemistryfor-sustainableagriculturebiopesticides/
212. Sultana Shaik A, Shaik AP, Jamil K, Alsaed AH (2016) Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of pesticide mixtures. *Toxicology Mechanisms and Methods* 26: 588-594. <https://doi.org/10.1080/15376516.2016.1218577>.
213. Sutris JM, How V, Sumeri SA, Muhammad M, Sardi D, Mohd Mokhtar MT, Mohammad H, Ghazi HF, Isa ZM (2016) Genotoxicity following Organophosphate Pesticides

- Exposure among Orang Asli Children Living in an Agricultural Island in KualaLangat, Selangor, Malaysia. *The International Journal of Occupational and Environmental Medicine* 7: 42–51. <https://doi.org/10.15171/ijoem.2016.705>.
214. Tarja N, Kristi E, Marja L, Kari E (2003) Thermal and metabolic factors affecting bioaccumulation of triazine herbicides by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology* 18: 219–226. <https://doi.org/10.1002/tox.10118>.
 215. Tasca AL, Puccini M, Fletcher A (2018) Terbutylazine and desethylterbutylazine: Recent occurrence, mobility and removal techniques. *Chemosphere* 202: 94–104. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.091>.
 216. Taylor J, Xiao W, Abdel-Wahab O (2017) Diagnosis and classification of hematologic malignancies on the basis of genetics. *Blood* 130: 410–423. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-02-734541>.
 217. Tian Y, Yamauchi T (2003) Micronucleus formation in 3-day mouse embryos associated with maternal exposure to chlorpyrifos during the early preimplantation period. *Reproductive Toxicology* 17: 401–405. [https://doi.org/10.1016/s0890-6238\(03\)00039-x](https://doi.org/10.1016/s0890-6238(03)00039-x).
 218. Tomizawa M, Casida JE (2005) Neonicotinoid Insecticide Toxicology: Mechanisms of Selective Action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 45: 247–268. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095930>.
 219. Torres-Mendoza BM, Coronado-Medina DE, Gómez-Meda BC, Vázquez-Valls E, Zamora-Perez AL, Lemus-Varela ML, Zúñiga-González GM (2014) Micronucleated erythrocytes in newborn rats exposed to raltegravir placental transfer. *BioMed Research International*: 851820. <http://doi.org/10.1155/2014/851820>.
 220. Tweats, DJ, Johnson GE, Scandale I, Whitwell J, Evans DB (2016) Genotoxicity of flubendazole and its metabolites in vitro and the impact of a new formulation on in vivo aneugenicity. *Mutagenesis* 31: 309–321. <https://doi.org/10.1093/mutage/gev070>.
 221. Undeger U, Basaran N (2005) Effects of pesticides on human peripheral lymphocytes in vitro: induction of DNA damage. *Archives of Toxicology* 79: 169–176. <https://doi.org/10.1007/s00204-004-0616-6>.
 222. Unger ER, Nitta H, Lee DR, Grogan TM (2010) In Situ Hybridization. U: Molecular Diagnostics, 71–79. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-369428-7.00007-0>.
 223. Unsworth J (2010) History of pesticide use. http://agrochemicals.iupac.org/index.php?option=com_sobi2&sobi2Task=sobi2Details&catid=3&sobi2Id=31.
 224. USEPA (United States Environmental Protection Agency) (1995) Reregistration

- Eligibility Decision (RED): Terbutylazine 738-R-95-005.
225. USEPA (2004) Glyphosate; Pesticide Tolerance.
 226. USEPA (2011) Chlorpyrifos: Preliminary human health risk assessment for registration.
 227. USEPA (2013) State of the Science Evaluation: Nonmonotonic Dose Responses as They Apply to Estrogen, Androgen and Thyroid Pathways and EPA Testing and Assessment Procedures.
 228. USEPA (2017) Pesticides Industry Sales and Usage 2008-2012 Market Estimates.
 229. Vardavas AI, Stivaktakis PD, Tzatzarakis MN, Fragkiadaki P, Vasilaki F, Tzardi M, Datseri G, Tsiaoussis J, Alegakis AK, Tsitsimpikou C, Rakitskii VN, Carvalho F, Tsatsakis AM (2016) Long-term exposure to cypermethrin and piperonyl butoxide cause liver and kidney inflammation and induce genotoxicity in New Zealand white male rabbits. *Food and Chemical Toxicology* 94: 250-259. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.06.016>.
 230. Vardavas, AI., Ozcagli E, Fragkiadaki P, Stivaktakis PD, Tzatzarakis MN, Alegakis AK, Vasilaki F, Kaloudis K, Tsiaoussis J, Kouretas D, Tsitsimpikou C, Carvalho F, Tsatsakis AM (2018) The metabolism of imidacloprid by aldehyde oxidase contributes to its clastogenic effect in New Zealand rabbits. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 829–830: 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.03.002>.
 231. Velisek J, Stara A, Zuskova E (2016) Effect of single and combination of three triazine metabolites at environmental concentrations on early life stages of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Environmental Science and Pollution Research* 23: 24289–24297. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7689-7>.
 232. Velisek J, Stara A, Zuskova E, Kouba A (2017) Effects of three triazine metabolites and their mixture at environmentally relevant concentrations on early life stages of marbled crayfish (*Procambarus fallax* f. *virginalis*). *Chemosphere* 175: 440–445. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.080>.
 233. de la Vega Salazar MY, Tabche LM, García CM (1997) Bioaccumulation of Methyl Parathion and Its Toxicology in Several Species of the Freshwater Community in Ignacio Ramirez Dam in Mexico. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 38: 53–62. <https://doi.org/10.1006/eesa.1997.1551>.
 234. Vindas R, Ortiz F, Ramírez V, Cuenca P (2004) Genotoxicity of three pesticides used in Costa Rican banana plantations (članak na španjolskom). *Revista de Biología Tropical* 52:601–609. <https://doi.org/10.15517/rbt.v1i2.15343>.

235. Vrzoc M, Petras L (1997) Comparison of alkaline single cell gel (Comet) and peripheral blood micronucleus assays in detecting DNA damage caused by direct and indirect acting mutagens. *Mutation Research* 381: 31-40. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(97\)00143-7](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(97)00143-7).
236. Wang H, Wang SF, Ning H, Ji YL, Zhang C, Zhang Y, Yu T, Ma XH, Zhao XF, Wang Q, Liu P, Meng XH, Xu DX (2011) Maternal cypermethrin exposure during lactation impairs testicular development and spermatogenesis in male mouse offspring. *Environmental Toxicology* 26: 382-394. <https://doi.org/10.1002/tox.20566>.
237. Webster LR, McKenzie GH, Moriarty HT (2002) Organophosphate-based pesticides and genetic damage implicated in bladder cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 133: 112–117. [https://doi.org/10.1016/S0165-4608\(01\)00576-3](https://doi.org/10.1016/S0165-4608(01)00576-3).
238. Weng S, Stoner SA, Zhang DE (2016) Sex chromosome loss and the pseudoautosomal region genes in hematological malignancies. *Oncotarget* 7. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12050>.
239. Weniger M, Barth T, Möller P (2006) Genomic Alterations in Hodgkin's Lymphoma. *International Journal of Hematology* 83: 379–384. <https://doi.org/10.1532/IJH97.06048>.
240. Wessler I, Kirkpatrick CJ (2009) Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *British Journal of Pharmacology* 154: 1558–1571. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.185>.
241. WHO (Svjetska zdravstvena organizacija) (1992) International Programme on Chemical Safety Environmental Health Criteria 142: alpha-cypermethrin. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc142.htm>.
242. WHO (1998) Terbutylazine (TBA) in drinking water. Guidelines for drinking water quality, 2. izdanje. https://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/terbutylazine.pdf
243. WHO (2020) Pesticides. <https://www.who.int/topics/pesticides/en/>.
244. Whyatt RM, Camann D, Perera FP, Rauh VA, Tang D, Kinney PL, Garfinkel R, Andrews H, Hoepner L, Barr DB (2005) Biomarkers in assessing residential insecticide exposures during pregnancy and effects on fetal growth. *Toxicology and Applied Pharmacology* 206: 246-254. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.11.027>.
245. Williams GM, Brady R (2020) Patau Syndrome. StatPearls (Internet). StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538347>.
246. Wojewódzka M, Kruszewski M, Iwanenko T, Collins AR, Szumiel I (1998) Application of the comet assay for monitoring DNA damage in workers exposed to chronic low-dose

- irradiation. I. Strand breakage. *Mutation Research* 416: 21-35.
[https://doi.org/10.1016/s1383-5718\(98\)00074-6](https://doi.org/10.1016/s1383-5718(98)00074-6).
247. Wozniak E, Sicinska P, Michalowicz J, Wozniak K, Reszka E, Huras B, Zakrzewsky J, Bukowska B (2018) The mechanism of DNA damage induced by Roundup 360 PLUS, glyphosate and AMPA in human peripheral blood mononuclear cells - genotoxic risk assesment. *Food and Chemical Toxicology* 120: 510-522.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.07.035>.
248. Yahia D, Ali MF (2018) Assessment of neurohepatic DNA damage in male Sprague-Dawley rats exposed to organophosphates and pyrethroid insecticides. *Environmental Science and Pollution Research International* 25: 15616-15629.
<https://doi.org/10.1007/s11356-018-1776-x>.
249. Yang C, Hamel C, Vujanović V, Gan Y (2011) Fungicide: Modes of Action and Possible Impact on Nontarget Microorganisms. *ISRN Ecology* 2011: 1–8.
<https://doi.org/10.5402/2011/130289>.
250. Zhulidov AV, Headley JV, Pavlov DF, Robarts RD, Korotova LG, Vinnikov YY, Zhulidova OV (2000) Riverine fluxes of the persistent organochlorine pesticides hexachlorocyclohexane and DDT in the Russian Federation. *Chemosphere* 41: 829–841.
[https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00520-2](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00520-2).

Životopis autora

Vedran Mužinić rođen je 22. srpnja 1991. godine u Bjelovaru. Diplomirao je na Farmaceutsko-biokemijskom Fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, smjer Farmacija 2015. godine. Od 2015. do 2016. bio je zaposlen kao magistar farmacije pripravnik u Gradskoj Ljekarni Zagreb. Od 2016. godine zaposlen je kao asistent-doktorand u Jedinici za mutagenezu Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada. Autor/koautor je na tri rada, od kojih su dva objavljena u CC časopisima. Član je Hrvatskog toksikološkog društva i Hrvatske ljekarničke komore.