

Benjamin Vinković

Ispitivanje genotoksičnosti klorpirifosa,
imidakloprida i alfa cipermetrina Komet i Komet-
FISH testom na produženim kulturama limfocita
čovjeka

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu

Zagreb, 2016.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Primjenjena mikrobiologija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Maje Šegvić Klarić i suvoditeljstvom prof. dr. sc. Davora Želježića.

Zahvaljujem se svojoj obitelji na podršci i ljubavi koju su mi pružili. Dakako želim zahvaliti posebno Benediktu na svim lijepim sjećanjima i uspomenama. Doktoru Davoru Želježiću na strpljivosti i pomoći pri izvođenju rada i pisanju te svim članovima IMI-ja koji su bili iznimno srdačni prema meni. I mentorici profesoric Maji Šegvić Klarić koja mi pružila mogućnost raditi na ovoj temi.

SADRŽAJ:

1. UVOD.....	4
1. Pesticidi.....	4
2. Insekticidi.....	4
2.1. Piretroidi.....	5
2.2. Neonikotinoidi.....	5
2.3. Organofosfati.....	6
3. Komet test.....	7
4. FISH- fluorescentna in-situ hibridizacija.....	8
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	10
3. MATERIJALI I METODE.....	12
1. Materijali	12
2. Metode.....	13
2.1 Dugoročne kulture limfocita i tretiranje insekticidima..	13
2.2 Alkalni komet test.....	15
2.3 FISH-komet.....	16
2.4 Pozitivne kontrole.....	16
3.2.5 Statistička analiza.....	17
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	18
5. ZAKLJUČCI.....	29
6. LITERATURA.....	30
7. SAŽETAK/SUMMARY.....	32
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA.....	34

1. UVOD

1.1 Pesticidi

Pesticide možemo definirati kao bilo koju tvar ili mješavinu tvari namjenjenu za sprječavanje, uništavanje, odbijanje i smanjivanje broja štetočina. Možemo ih dijeliti prema namjeni tj. vrsti štetočine na koji djeluje i prema kemijskoj građi. Štetočine mogu biti insekti, glodavci, korovi, plijesni, larve, uši, mekušci, grinje, a pesticidi za njihovo suzbijanje su insketicidi, rodenticidi, herbicidi, fungicidi, larvicidi, pedikulocidi, moluscidi i akaricidi. Također prema učinku pesticida na štetočine možemo ih na široko svrstati u repelente, atraktante, regulatore rasta i biocide. Ove podjele međutim nisu nam ovdje toliko bitne koliko podjele prema kemijskoj građi i djelovanju unutar skupina tj. inskticida. (Curtis i Watkins, ured., 2015.)

1.2. Insketicidi

Insekticidi su tvari namjene ubijanju kukaca kako bi se zaštitile biljke tj. uglavnom poljodjelski usjevi te je današnji život i uzgoj hrane bez njih nezamisliv. Upravo zbog neophodnosti primjene insekticida u današnje vrijeme potrebno je provesti istaživanja glede njihove toksičnosti na ljude i u prirodi. Također nam je zbog raširenosti primjene važno razviti nisko toksične i neštetljive insekticide. Mahom je većina njih neurotoksična. Zbog visoke razvijenosti živčanog sustava insekata koji se ne razlikuje jako puno od onog u sisavaca većina insekticida ima veliku akutnu toksičnost prema neciljanim organizmima. Insketicide dijelimo kako je već spomenuto prema kemijskoj građi i djelovanju na

- 1) organofosforne spojeve (OP),
- 2) piretroide,
- 3) karbamate,
- 4) organoklorirane spojeve
- 5) i druge spojeve. (Curtis i Watkins, ured., 2015.)

1.2.1 Piretroidi

Piretroidi skupina pesticida koje se razvila kao sintetski analozi piretrina iz ekstrakata biljke *Chrysanthemum cinerariaefolium* koja se koristila još u drevnoj Kini i Perziji. Piretroidi se mogu podijeliti u dvije velike skupine ovisno o djelovanju na tip I koji ne sadrži cijano skupinu u njihovoj strukturi i uključuju aletrin, tetrametin, permetrin i fenotrin te tip II koji sadrži cijano skupinu i uključuje novije spojeve poput deltametrina, cifenotrina, cipermetrina, and fenvalerata (Chakravarthi i sur. 2007). Što se njihovih učinaka tiče spojevi tipa I uzrokuju sindrome uzbuđenog ponašanja, agresivnosti, povećanog uznemirenja i finog tjelesnog drhtanja koji napreduje do cjelotjelesnog drhtanja i klonulosti dok spojevi tipa II uzrokuju obilnu salivaciju, grubo drhtanje koje napreduje do koreoatetoze i kloničkih napadaja. Kao predstavnika piretroida uzeli smo alfa cipermetrin. Svoje djelovanje ostvaruju remećenjem napon-ovisnih natrijevih kanala, vežu se za α podjedinicu natrijevih kanala i usporavaju aktivaciju tj otvaranja kanala kao i stopu inaktivacije čime dovode do hiperekscitabilnog stanja. Pri višim koncentracijama od onih potrebnih za aktivaciju natrijevih kanala veže se za GABA receptore koji propuštaju klorove ione. Smatra se da je veća selektivnost prema insektima posljedica veće osjetljivosti kukaca prema piretroidima od sisavaca kombinacija sporije biotransformacije, niže tjelesne temperature i veće osjetljivosti natrijevih kanala. (Curtis i Watkins, 2015.). ADI (engl. *Acceptable daily intake*) cipermetrina je 0,05 mg/kg/dan, NOEL (engl. *No observable effect level*) je 4,7 mg/kg/dan dok je LD50 50 mg/kg tjelesne mase. (Luty i sur. 2000.)

1.2.2 Nikotinoidi

Nikotinoidi su danas najčešće korišteni insekticidi od 5 glavnih kemijskih skupina spojeva u svijetu što uvelike zahvaljuju činjenici da imaju systemska svojstva zahvaljujući svojim fizikalno-kemijskim svojstvima koja im omogućuju ulazak u sva tkiva biljaka i translokaciju u sve dijelove. Stoga neovisno o načinu primjene neonikotinoidi se distribuiraju kroz biljku čime su toksični za insekte koji se njima hrane. Vežu se na acetilkolinske (nAChR) receptore u živčanom sustavu. S obzirom da je broj nikotinskih receptora s visokim afinitetom u bezkralježnjaka za neonukleotide veći nego u kralježnjaka, pokazuju veću toksičnost za beskralježnjake. Djeluju kao agonisti na nACh receptore, otvarajući kationske kanale te također djeluju i na kalcijeve kanale u insekata što uzrokuje produženu ekscitaciju neuralnih membrana koji vode paralizi i iznemorenosti stanica. (N. Simon Delso i sur. 2015)

U teškim slučajevim trovanja ljudi zabilježeni su respiratorni, kardiovaskularni i određeni neurološki simptomi poput kome i midrijaze dok se mučnina i slabije neurološke smetnje javljaju jednako često u lakšim i težim slučajevima trovanja. Liječenje se provodi uglavnom suporativnom terapijom i dekontaminacijom. (Pei-Chen Len i sur., 2013.)

1.2.3 Organofosfatni spojevi

Organofosfatni insekticidi su spojevi opće formule $R_1R_2PXO(S)$, a postoje i podgrupe tih spojeva poput fosfata, fosforotioata, fosforoamida i fosfonata te drugih. Imaju visoku akutnu toksičnost te su LD50 vrijednosti često u štakora niže od 50 mg/kg, a za neke je i dermalna akutna toksičnost visoka. Svoje akutne učinke postižu inhibicijom acetilkolin esteraze (AChE) što uzrokuje nakupljanje acetilkolina u kolinergičkim sinapsama s prekomjernom stimulacijom muskarinskih i nikotinskih receptora. Budući da su ti receptori rasprostranjeni po cijelom tijelu uzrokuju kolinergični sindrom koji uključuje pojačano znojenje, salivaciju, bronhalnu ekskreciju, bronhokonstrikciju, povećani motilitet gastrointestinalnog sustava, dijareju, drhtavicu, mišićne trzaje i razne druge efekte na centralni živčani sustav. Od tih simptoma najpoznatiji je zatajenje disanja kod visokih akutnih doza dok međutim kod nižih i srednjih ne mora doći do ikakvih ili samo blagih simptoma. Druga značajka kod izlaganja OP spojevima je takozvani posredni sindrom koji se javlja u 20 do 50% slučajeva trovanja, a javlja se jedan ili više dana nakon akutnog otrovanja tokom oporavka ili čak nakon oporavka od kolinergičkih simpotma. Ti simptomi uključuju slabosti respiratornih, vratnih, i proksimalnih mišića udova, a oporavak traje i do 30 dana. Nisu posljedica inhibicije AChE i njihov mehanizam nastanka nije sa sigurnošću poznat. Neki OP uzrokuju i organofosfatima-induciranu odgođenu polineuropatiju (OPIDP). Znakovi i simptomi uključuju trnce u nogama i rukama, slijedi gubitak osjetila, progresivna mišićna slabost i ataksija. Javlja se 2-3 tjedna nakon jednog izlaganja OP nakon što su se akutni i posredni simptomi povlačili. Kronične i dugoročna toksičnost OP su pomalo kontroverzna tema jer pojedinačne visoke doze mogu ostaviti trajne posljedice na CNS, a smatra se da i dugotrajna izloženost niskim dozama može imati utjecaja na CNS što rezultira u promjenama ponašanja. (Curtis i Watkins, ured., 2015.)

1.3 Komet test

Komet test ili SCGE (*engl. single-cell gel electrophoresis* / gel elektroforeza pojedinačnih stanica) je relativno jednostavna, osjetljiva i kvantitativna metoda izučavanja DNA oštećenja (uključujući oksidacijska oštećenja) i popravka na razini pojedinačne stanice tj. određivanja genotoksičnosti. Za komet test bitno je prirediti stanice koje će se obrađivati, a u današnje vrijeme mogu se analizirati uz prilagodbe metode gotovo sve vrste eukariotskih stanica. Analiza koja se danas uglavnom koristi obuhvaća sedam koraka a to su 1) priprema stakalaca s naslaganim stanicama u agarozu, 2) liza stanica radi oslobađanja DNA, 3) izlaganje alkalnim uvjetima ($\text{pH} > 13$), 4) elektroforeza pod alkalnim uvjetima, 5) neutralizacija lužnate sredine i 6) DNA bojanje i vizualizacija kometa. Glavni cilj pripreme mikroskopskih stakalaca je dobivanje jednolikog gela dovoljno stabilnog za preživljavanje kroz prikupljanje podataka kao i osiguravanje lako vidljivih kometa s minimalnom pozadinskom smetnjom. Stakalca se pripremaju nanošenjem, ovisno o protokolu, određenog broja slojeva agaroznih gelova u koje se uklope stanice. Jedna od generalno uspješnih metoda za dobivanje stabilnih gelova je uranjanje stakalaca u rastopljeni agarozu koja se potom suši. Optimalan broj stanica bi bilo 50. Nakon što agarozni gel dovoljno očvrstne, stakalca se stave u otopinu za lizu koja se sastoji od visokih soli i detergenata, najmanje 1 sat. Lizirajuća otopina je smjesa različitih otopina poput 100 mM otopine EDTA, 2,5 M NaCl, 1% N-lauroilsarkozina, 10 nM Trizma baze, 1% Triton X-100 koje se moraju podesiti na $\text{pH} 10.0$. Također se zna dodavati i 10% otopina dimetilsulfoksida kako bi se spriječila oštećenja uzrokovana radikalima i željezom otpuštenim iz eritrocita prisutnima u tkivima i krvi za vrijeme lize. Minimalno vrijeme potrebno za lizu stanica može varirati i ovisi o tipu stanice. Smatra se da bi dodatno ispiranje stakalaca u lužnatoj sredini radi ispiranja zaostalih detergenata i soli prije alkalnog odmatanja moglo povećati reproducibilnost. Prije elektroforeze stakalca se inkubiraju u alkalnom ($\text{pH} > 13$) elektroforetskom puferu kako bi se dobila jednolančana DNA i ALS (*engl. Alkali-labile site* / mjesto podložno alkalnim promjenama) alkali prikazali kao SSB (*engl. Single strand break* / lom jednog lanca). Nakon odmatanja u alkalnom, jednolančana DNA u gelu se podvrže elektroforezi pod alkalnim uvjetima kako bi se dobili kometi. Zbog raznovrsnosti elektroforetskih jedinica napon je bolje izraziti u V/cm i obično se kreće u rasponu od 0,7 do 1 V/cm iako se niže i više vrijednosti mogu koristiti dok jakost struje obično iznosi 300 mA. Optimalni uvjeti napona, jakosti struje i trajanja elektroforeze ovisi o željenoj migraciji DNA za kontrolne stanice i rasponu odgovora za treirane stanice. Vrijeme trajanja obično iznosi 5 do 40 minuta. Nakon elektroforeze, lužina u gelu se neutralizira ispiranjem stakalaca

prikladnim puferom (npr. Trizma pri pH 7.5). Protokol prema Singh i sur [1988] predlaže ispiranje 3 puta po 5 minuta, ali jače ispiranje može biti korisno u slučaju kod uočene jake pozdaine kod brojanja. Nakon neutraliziranja stakalca se mogu obojiti i izbrojati ili gel isušiti, pohraniti a kometi brbrojajati kad je zgodno. U potonjem slučaju agarozni gel se može dehidrirati uranjanjem stakalca u apsolutni etanol ili metanol na kraće vrijeme (pr 5 min). DNA bojanje i vizualizacija kometa se potom vrši pomoću DNA specifičnih boja koje ovise o potrebi istraživača i po svoj prilici imaju utjecaj na osjetljivost ili pouzdanost metode. Najčešće korištene fluorescentne boje su etidijev bromid, propidijev jodid, 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI), SYBR Green i YOYO. Kod nekih boja se može koristiti tzv. antifade za značajno smanjenje stope utišavanja signala i dopustit da se stakalca broje više puta. Kod brojanja kometa, sva stakalca uključujući pozitivne i negativne kontrole se trebaju neovisno označiti, a brojati bez poznavanja oznaka. Jedan od najjednostavnih pristupa brojanju kometa je uporaba analiza slike i komercijalno dostupnih programa. Najčešće korišteni parametri pri brojanju kometa su dužina migracije DNA (dužina repa) koja se smatra direktno povezana s veličinom fragmenta i smatra se proporcionalnom razini jednolančanih lomova DNA. Prednosti komet testa u usporedbi s drugim genotoksičnim metodama su u demonstriranoj osjetljivosti za detektiranje niskih razina DNA oštećenja, potreba za malim brojem stanica po uzorku, fleksibilnosti, niskoj cijeni, jednostavnosti primjene, mogućnost provođenja studija niskim koncentracijama supstancija i relativno kratkom vremenskom razdoblju potrebnom za izvedbu metode. (Tice i sur. 2000)

1.4. FISH – Fluorescentna in-situ hibridizacija

Ova metoda se koristi za vizualizaciju jednog ili više specifičnih gena ili sekvenci u cjelokupnom genomu. DNA sekvence veličine od čak samo 1000 baznih parova (bp) se može detektirati u metafaznom kromosomu ili inetrfaznom nukleusu. Ovim postupkom bi se moglo odrediti topološka ili pozicijska informacija željenog gena ili sekvence. FISH se temelji na spajanju fluorescentno obilježene probe s genom ili sekvencom DNA koja nas zanima u cjelokupnom genomu što potom možemo vidjeti/vizualizirati fluorescentnim mikroskopom.

Metoda se sastoji od više različitih koraka: pripremanje stakalaca sa satanicama, vezivanje sonde, denaturacije, hibridizacije i mikroskopiranja. Svaki bi se korak trebao pomalo modificirati ovisno o korištenoj metodi. Pripremanje i obrada uzorka stanica na

stakalcu ovisi o fazi staničnog ciklusa koje želimo proučavati nakon dobivanja/uzgoja tipa stanica koji nam je potreban podrazumjeva izdvajanje stanica za obradu, fiksiranje i stavljanje na stakalce te predtretiranje RNazaom A i proteazama kako bismo olakšali pristup probe za reakciju s ciljanom sekvencom DNA. Proba je mala DNA molekula komplementarna sekvenci genoma koji se želi detektirati. Može biti zasebna kao oligonukleotid ili uklopljena u veće DNA molekule koja se mora prije same hibridizacije obilježiti fluorokromom što se obično postiže polimerazom I bakterije *E. coli*, ili Taq polimerazom. Prije same hibridizacije potrebno je denaturirati probu i ciljanu DNA kako bismo razdvojili lance DNA. Ovisno o složenosti probe možemo denaturaciju vršiti zajedno ili odvojeno od ciljane DNA. Kod jednostavnih proba možemo zajedno zagrijati s preparatom na 80 °C kroz nekoliko minuta inače se proba odvojeno denaturira pri visokim temperaturama dok se preparat denaturira puferiranim otopinama formamida nakon čega se proba veže na preparat. Preparat se stavlja u vlažnu komoru i ostavi hibridizirati 1-5 dana ovisno o metodi te se potom suši u seriji etanola i zrakom. Preparati se potom pozadinski oboja s DAPI ili propidij jodidom koji bojaju cjelokupni kromatin i dodaje se „anti-fade“ otopina koja štiti probe od prebrzog blijedenja fluorescencije i povećava kontrast između kromosoma i pozadine. Mikroskopiranje se vrši pod epifluorescentnim mikroskopom gdje se pomoću različitih filtara propušta svjetlost koja pobuđuje fluorokromatske strukture probe. (Željezić i Garaj-Vrhovac, 2000)

2. OBRAZLOŽENJE TEME

U današnje vrijeme život bez pesticida bio bi gotovo nezamisliv. Neizostavni su u poljoprivredi i masovnoj proizvodnji hrane koja je postala neophodna. Upravo zbog te neizbježne primjene pesticida u proizvodnji hrane cjelokupna populacija, a ne samo poljoprivrednici, je svakodnevno izložena pesticidima. Stoga je bitno i bilo bi poželjno znati kakvi su učinci i posljedice takve primjene pesticida. Dok su akutni učinci dosta dobro poznati i imamo dosta pouzdanih načina utvrđivanja takvih učinaka kronični učinci izlaganja su teži za odrediti i manje poznati. Dakle što se kroničnih učinaka tiče, neki su uočeni i utvrđeni no zbog toga što se javljaju kroz duži vremenski period izloženosti, pri niskim koncentracijama/dozama, a ponekad se mogu uočiti i nakon prestanka izloženosti nije ih jednostavno sa sigurnošću utvrditi i/ili uočiti. Jedan od takvih primjera je genotoksičnost koja nam je bitna iz nekoliko razloga; dugoročno gledano genotoksičnost može biti povezana s više različitih bolesti, apoglavito pojavljivanje raka. Stoga je sa strane javnog zdravstva i opće dobrobiti stanovništva bitno sa sigurnošću utvrditi genotoksične učinke pesticida. Nadalje takvi podaci nisu bitni i neophodni samo s medicinskog pogleda nego također i s regulatorne strane. Veoma je bitno i korisno znati takve podatke pri izradi zakonskih regulativa kako bi se mogla najbolje utvrditi dopustljiva količina i način primjene svakog pojedinog pesticida i sagledati uopće treba li neki pesticid dozvoliti u poljoprivrednoj uporabi ili ne. Također takvi bi podaci i znanja bili bitni u ekologiji i razmatranju posljedica dugoročne primjena pesticida na ekosustave. Upravo je iz svih navedenih razloga bitno doći do podataka glede genotoksičnosti kako bi se mogli donijeti ispravni zaključci i planovi glede rješavanja takvih problema. Nažalost kako se već spomenulo, do takvih konkluzivnih zaključaka nije lako doći, djelomično i zbog činjenice da je za donošenje zaključaka u vezi ovakvih učinaka potrebno i puno pokusa i podataka kako bi se isključile ljudske greške pri prikupljanju podataka, a i ostale moguće varijable. Još uvijek nema dovoljno podataka i radova niti idealne metode kojom bi se došlo do tih rezultata. Dosad je jedna od glavnih metoda izbora bio komet test, ali ne može jednoznačno i savršeno odgovoriti na sve zahtjeve. Stoga kombinacija komet i FISH testa nudi dodatni uvid i brojne mogućnosti u određivanje takvih podataka, ali je nažalost još uvijek relativno „mlada“ i ne pretjerano korištena metoda. To je drugi razlog, osim samog utvrđivanja genotoksičnosti, zašto je ova tema bitna jer je za svaku metodu bitno da se kroz

mnoštvo pokusa utvrdi najbolji način izvođenja i protokola metode, točna i sigurna interpretacija rezultata metode i sama preciznost i vjerodostojnost podataka.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1 Instrumenti:

1. Vodena kupelj 37C - Clifton® Nickel Electro, UK
2. Vodena kupelj 60°C - Inako, Hrvatska
3. Vortex - Heidolph Instruments, Njemačka
4. Centrifuga - Hettich Zentrifugen, Njemačka
5. Tresilica - Bibby Scientific Ltd, UK
6. Inkubacijska Peć - Termostat - Heraeus Instruments, Njemačka
7. Mikroskop - Olympus – Japan
8. Vruća ploča - Grijača ploča - Inako, Hrvatska
9. Objektna stakalca - Biognost d.o.o., Hrvatska
10. pokrovnice (18 mm x 18 mm, 22mm x 22 mm) - Biognost d.o.o., Hrvatska
11. vertikalna koplinovala posuda - Glasswarefabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Njemačka

3.1.2. Reagensi i puferi:

- A) Agaroza s normalnom točkom taljenja - Sigma-Aldrich, Njemačka
- B) Agaroza s niskom točkom taljenja - Sigma-Aldrich, Njemačka
- C) Histopak 1077 - Sigma-Aldrich, Njemačka
- D) Fosfatni pufer bez Ca^{2+} i Mg^{2+} NaHPO_4 (1,15 g) KH_2PO_4 (0,2 g) NaCl (8,0 g), KCl (0,2 g) 1000 ml destilirana H_2O pH 7,4 - Kemika, Hrvatska

- E) RPMI-1640 medij - Sigma-Aldrich, Njemačka

- F) Otopina za lizu: pripremiti 1 L 2,5M NaCl, 0.1M Na₂EDTA, 10mM Trizma baza, 1% natrij N-lauroilsarcozin soli. Podesiti pH na 10 sa 10M NaOH otopinom. Kod pripreme 100ml radnog lizijskog pufera koristiti 89 ml stocka lizijske otopine, 1ml Triton X-100 (1%) i 10 ml 10% dimetil sulfoksida (DMSO) - NaCl i Dimetil sulfoksid i Na OH su Kemika, Hrvatska, ostalo Sigma-Aldrich, Njemačka. 10 mM Tris-HCl

- G) Alkalna denaturacija i elektroforetski pufer: 0.1M NaOH, 1mM Na₂EdtA

- H) Natrij citratni pufer (20x SSC): 0.3 natrij citrat, 3M natrij klorid, pH 7.0 - oboje Kemika, Hrvatska

- I) Tween-20 - Sigma-Aldrich, Njemačka

- J) Fotoljepilo - fotograsko ljepilo - Henzo, Danska

- K) Aluminijska folija

- L) proba - Cytocell, SAD

3.2. Metode

3.2.1 Kulture limfocita i tretiranje pesticidima/insekticidima

Uspostava dugoročnih kultura limfocita se napravila prateći malo izmjenjeni protokol originalno predložen od O'Donovan i sur (1995). Kulture se uspostave nasađivanjem 10⁵ izoliranih limfocita po ml stimuliranog medija (SR) koji se sastoji od RPMI 1640 (gibco Invitrogen, UK) 10% fetalnog goveđeg seruma, 50 U/ml penicilina, 50 mg/ml streptomicina (gibco invitrogen), 250 IU/ml IL-2 i 0,4 µg/ml fitohemaglutinina. Kao što je O'Donovan preporučio, kultura se suplementira s 5µg/ml pune krvi iz donora iz koga su se limfociti pripremili. Limfociti se uzgajaju 14 dana na 37 °C u 5% CO₂. Trećeg dana kulture se

razrijede sa SR bez fitohemaglutinina (v/v 1:1). Poslije toga svaka 2 dana medij se u potpunosti izmijeni, limfociti se isperu sa svježim SR, podijele u pola i dodan svježi SR bez fitohemaglutinina za daljnje uzgajanje.

Iz limfocita svakog donora su se izdvojile dvije paralelne kulture za svaki tretman (pesticid i koncentraciju) i negativnu kontrolu. Potom duple kulture, po donoru, su se tretirale s cipermetrinom tehničke kakvoće, imidaklopridom i klorpirifosom. Prije tretmana pesticidi su se razrijedili u PBS i provjerio se pH. Svi pesticidi su se testirali pri konačnim koncentracijama koje su odgovarale vrijednostima dozvoljenog dnevnog unosa (ADI) i profesionalne razine izloženosti (OEL) u suglasnosti s vrijednostima koje je definirala EPA za klorpirifos, imidakloprid i alfa cipermetrin. Ekstrapolacija se izračunala prema kalkulacijama predloženim u Guyton i Hall (1996) gdje koncentracija izražena u mg/kg je pomnožena s masom prosječne osobe i potom podijeljena s volumenom tjelesne tekućine kako bi se dobila koncentracija u ng/ml kojima su stanice u tijelu izložene.

Tablica 1 Izračunate koncentracije insekticida korištene u radu

	ADI		REL		OEL		4. koncentracija
	Doza	EK	Doza	EK	Doza	EK	
Alfa cipermetrin	0,015 mg/kg bw/dan	0,025 µg/ml	2,186 µg/kg bw/dan	0,003643 µg/ml	0,1572 mg/kg bw/dan	0,262 µg/ml	3 µg/ml
Klorpirifos	0,01 mg/kg bw/dan	0,01666 µg/ml	0,000374 mg/kg bw/dan	0,000623 µg/ml	0,01572 mg/kg bw/dan	0,0262 µg/ml	3 µg/ml
Imidakloprid	0,06 mg/kg bw/dan	0,1 µg/ml	0,205 mg/kg bw/dan	0,3146 µg/ml	0,08 mg/kg bw/dan	0,13 µg/ml	3 µg/ml

ADI – dopušteni dnevni unos (allowed daily intake)

REL – razina izloženosti stanovništva

OEL - razina izloženosti radnika

EK – ekvivalentna koncentracija

Bw – tjelesna masa

Svaki aktivni sastojak se testirao s i bez metaboličke aktivacije mikrosoma jetre kroz 14 dana (10% v/v 59 mješavine jetre čovjeka). Metabolička transformacija pesticida se izvršila prije tretmana kulture. Otopina pesticida se dodaje u RPMI 1640 kulturu medija suplementirana s 10% (v/v) 59 frakcijom ljudske jetre, 1.3 mM NADP, 3.3 mM glukoza-6-fosfata i 0,4 U/ml G-6-P dehidrogenaze. Metabolička transformacija trajala je 4h prema OECD testirajućoj smjernici. Potom se metabolička mješavina filtrirala (pora veličine 0.22 μm). Filtrat se koristio za tretiranje kulture. Konačna koncentracija pesticida u metaboličkoj mješavini je odgovarala koncentraciji pesticida u početnoj otopini za direktno tretiranje kulture. Stoga je volumen filtrata korištenog u tretiranju kulture odgovarao volumenu nemetabolizirane otopine. Na ovaj način, ukoliko ne dođe do metaboličke transformacije, poslije tretiranja kultura s filtratom jednake konačne koncentracije pesticida bi se dobile kao i u direktnom tretmanu netransformiranog pesticida. Tretiranje pesticidima se započelo istovremeno s inicijacijom kulture. Poslije razrijeđivanja trećeg dana dodatna doza pesticida se dodala kako bi se očuvala koncentracija pesticida unutar gore navedenih vrijednosti. Pri dijeljenju kultura, kad medij se kompletno micao i zamijenio svježim početne doze pesticida su se dodavale do postizanja tretirajućih koncentracija. Citotoksičnost bi se rutinski provjeravala s triptan blue ekscizijskim testom (Mladinić i Želježić 2014.)

3.2.2 Alkalni komet test

Obična staklena predmetna mikroskopska stakalca se presvuku umakanjem u 1% otopinu agaroze normalne točke taljenja u destiliranoj vodi i osuše. Nakon tretiranja pesticidima stanice se centrifugiraju (300 x g, 5 min) i supernatant se ukloni. Talog se resuspendira i izvrši brojanje stanica. 10^4 stanica (otprilike 1 μl) se pomiješa s 100 μl 0.5% agaroze niskog tališta pri 37 °C i stavi stakalce presvučeno agaroznim gelom. Nakon polimerizacije gela stakalca se urone u lizirajuću otopinu (2.5 M NaCl, 0.1 M Na₂EDTA, 10 mM tris-HCl, 10% DMSO, % Triton X-100, pH 10) na 1 h na 4 °C. Denaturacija se napravi u puferskoj otopini (1 mM Na₂-EDTA i 300 mM NaOH, pH>13) kroz 15 min. Elektroforeza se odvija u ledenom denaturirajućem puferu kroz 15 min koristeći 0.7 V/cm. Stakalca se neutraliziraju u 3 izmjene u 0,4 Tris-HCl, pH 7.5. Za komet test analizu stakalca su se bojala etidijevim bromidom (20 $\mu\text{g/ml}$; Sigma). Ukupno 100 kometa po koncentraciji po donoru se mjerilo koristeći Komet test IV analizirajući sistem (Perceptive <instruments, UK), vezan uz

epifluorescentni mikroskop, 20x povećanje objektiva. Rezultati se prikazuju kao srednje vrijednosti za dužinu repa i postotak DNA u repu.

3.2.3 FISH-komet

Istovremeno uz stakalca za alkalni komet test su se pripremila stakalca za in-situ hibridizaciju prema prethodno propisanoj proceduri (Singh i sur., 1988). Prateći komet test, komet-FISH protokol počinje uranjanjem komet stakalaca u 2 x SSC (*engl. Saline sodium citrate buffer* / puferaska otopina natrijevog citrata) u Coplinovoj posudi na 5 min na sobnoj temperaturi. U ovom koraku SSC se koristi za optimiziranje okoliša gela u kojem su nukeloidi što je potrebno za maksimiziranje stupnja spajanja probe za ciljane nukleinske kiseline i da se smanji nespecifično vezanje i cross-hibridizacija te da isperemo DNA. Potom treba dehidrirati stakalca u Coplinovoj posudi ispiranjem u seriji etanola (70%, 96%, 100%) na 5 min svaki. Slijedeći korak je denaturacija. Stakalce i sondu treba odvojeno zagrijati na 37 °C na 10 min. Stavi 10 µl tople probe na odabranu površinu stakalca i pažljivo nanijeti 18 mm x 18 mm pokrovnicu. Koddenaturiraju se stakalce i proba na vrućoj ploči pri 80 °C na 2 min (prema proizvođačevim uputama) naša stakalca su bila hibridizirana s TP53 delecijском probom (cytocell, cambridge, UK), sadržavajući texas red-označenu probu za TP53 gen i FITC-označenu probu za centromerske regije kromosoma 17 (cen 17). Zapečatila se pokrovnica fotoljepilom i stavilo stakalce u vlažnu, zatvorenu i od svjetla zaštićenu čašu preko noći na 37 °C za hibridizaciju. Trebali smo ukloniti ljepilo iznimno pažljivo a potom pokrovnicu. Post-hibridizacijska ispiranja su provedena 2 x SSC pri temperaturi 60 °C na 2 min što smo popratili s ispiranjem u 2 x SSC i 0,05 % Tween-20 na sobnoj temperaturi na 30 sekundi. Nadalje smo dehidrirali stakalca tako što smo ih ispirali u ledeno hladnom alkoholu 5 min svaki (70%, 96%, 100%). Stakalca su bila obojana DAPI, pokrivena s 22 mm x 22 mm stakalcem i zapečaćena fotoljepilom te analizirana Olympus AX70 (Tokyo, Japan) epifluorescentnim mikroskopom.

3.2.4 Pozitivne kontrole

Kako bi se pokazalo da metabolička aktivacija djeluje ispravno kao pozitivnu kontrolu koristimo ciklofosfamid u koncentraciji od 30 µg/ml na kulturi 4 h prije uzorkovanja kultura. Metabolička transformacija se napravila na isti način kao i za pesticidno tretiranje. Dodatna

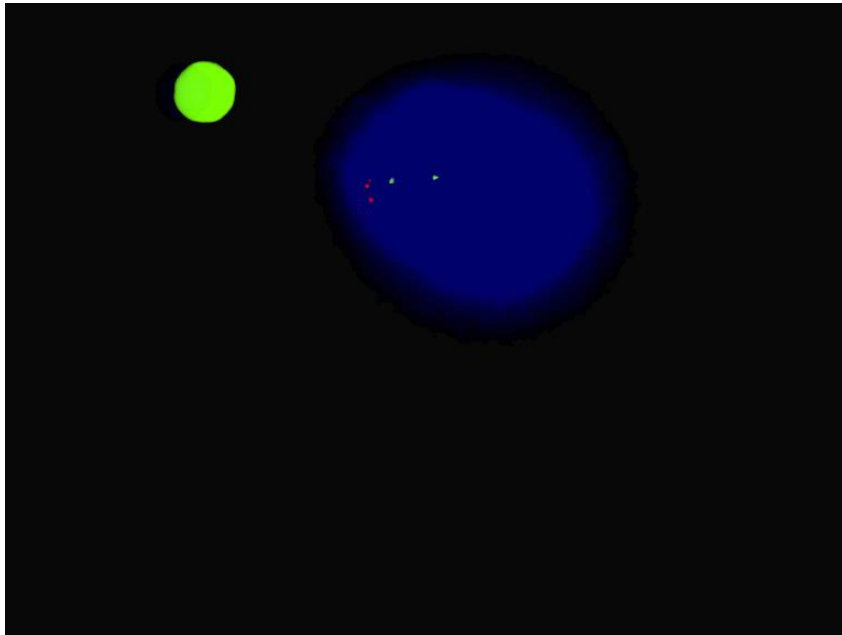
pozitivna kontrola se napravila za komet test tako što se stakalca pripremljena iz kultura negativne kontrole tretiraju s 1 mM H₂O₂ kroz 10 min na ledu.

3.3 Statistička analiza

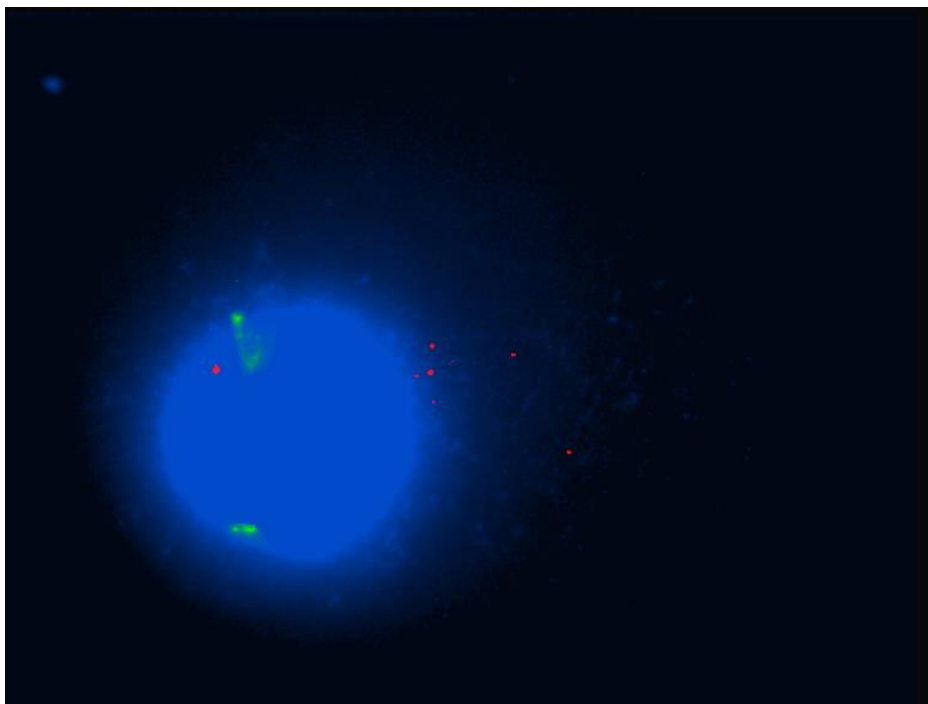
Podaci su se analizirali koristeći Statistica 9.0 paket, vrijednosti su se izrazile kao srednje vrijednosti \pm standardne devijacije (S.D). Srednja vrijednost za svaki mjereni parametar (dužina repa, % DNA u repu, % stanica s centromerom/genskih signala u repu) se računala na razini donora. Poslije toga, statistička analiza se radila uspoređujući srednje vrijednosti na razini donora dobivene iz negativne kontrole i srednje vrijednosti dobivene na razini donora poslije tretiranja pesticidom. Na primjer, 3 vrijednosti dobivene za negativne kontrole (srednje vrijednosti za svakog donora) su se usporedile s 3 vrijednosti dobivene iz kultura tretiranih pesticidima. Parametri komet testa su se logaritamski transformirali i analizirali Mann-Whitney U-testom, dok su se razlike u relativnom obilju signala u repu analizirali analizom varijanica (ANOVA) slijedeći Duncanov test.

REZULTATI I RASPRAVA :

U tablicama 2-7 su prikazani rezultati dobiveni komet-FISH (2-4 broj uočenih delecija, 5-7 broj uočenih migracija u rep kometa) testom na stanicama limfocita izloženih u ekvivalentima koncentracija od ADI (dopušteni dnevni unos), REL (razina izloženosti stanovništva) , OEL (razina izloženosti radnika) i 3 µg/ml insekticida klorpirifos, alfa ciprotrina i imidakloprida. U tablicama 8-13 su prikazani rezultati dobiveni komet testom (dužina repa tabl 7-9 i intenzitet repa tablice 10-12) pri istim uvjetima izloženosti insekticidima. Kod niti jednog primjenjenog insekticida nije primjećeno značajno povećanje promatranih parametara (niti kod kometa, niti kod komet-FISHa) u usporedbi s negativnom kontrolom.



Slika 1. Komet-FISH na limfocitima periferne krvi. Slika predstavlja neoštećeni nukleoid u kojem su svi signali unutar glave kometa, crveni signal predstavlja gen TP53, dok zeleni centromeru kromosoma 17



Slika 2. Komet-FISH limfocita periferne krvi. Slika predstavlja nukleoid s primarnim oštećenjima u kojem je određeni 1 crveni signala za gen TP53 i dva zelena signala za centromere kromosoma 17 u glavi, a četiri crvena signala u repu kometa

Kod evaluacije komet-FISHa razmatramo smještaj signala unutar kometa te broj signala Shaposhnikov i sur (2009) pokazano je da broj signala koji se javlja generalno u kometima je isti onom kojem možemo očekivati od jezgre u metafazi tj. 2 signala (Glei i sur 2009.), a mogu se naći unutar glave kometa ili repa. Signal koji je uočen unutar repa kometa predstavlja migraciju (Mladinić i sur. 2012.), a to znači da je došlo do oštećenja unutar DNA zavojnice koja se potom relaksirala i počela putovati prema anodi, međutim oštećenje se nije nužno dogodilo unutar područja signala tj. gena koji promatramo (Glei i sur, 2009). Kod rezultata komet testa određujemo dužinu repa kometa i postotak intenziteta čime želimo vidjeti do koliko je generalno oštećenja DNA došlo. Postotak intenziteta i dužina repa su parametri koji su proporcionalnom odnosu s razinom oštećenja – postotak intenziteta repa nam općenito govori o omjeru količine DNA u repu i glavi kometa, a dužina repa se generalno smatra da govori o dužini fragmenta DNA (Tice i sur. 2000).

Navedeni rezultati ne ukazuju da izlaganje ovim insekticidima dovodi do oštećenja DNA. Koncentracije kojima su limfociti bili izloženi ne pokazuju značajnu razliku s rezultatima između negativne kontrole kod komet-FISH testa, a manje vrijednosti kod samog

komet testa. Međutim na temelju toga ne može se doći do zaključka o neškodljivosti ovih preparata za DNA nego bi se naime trebalo još usporediti s prijašnjim radovima na ovu temu među kojima ima radova sa drugačijim rezultatima. Feng i sur. (2004). su proveli ispitivanja genotoksičnosti imidakloprida prvo na vodozemcima, a potom na limfocitima periferne ljudske krvi putem komet testa i mikronukleus (MN) testa. Na vodozemcima se pokazalo statistički značajno povećanje frekvencija MN za imidaklopid pri koncentraciji od 8 mg/L u usporedbi s negativnom kontrolom dok je pri koncentracijama od 0,05, 0,1, 0,2 i 0,5 mg/L pokazana značajna distribucija među razredima oštećenja DNA u usporedbi s negativnom kontrolom te je uočena ovisnost DNA rezultata oštećenja s razinom izlaganja i dozama imidakloprida. U ispitivanju na limfocitima međutim nisu uočili značajne razike u rezultatima u usporedbi s negativnom kontrolom MN testa pri niskim koncentracijama iako su u komet testu uočili značajno različitu distribuciju rezultata DNA oštećenja u svim ispitivanim grupama(koncentracijama) ovisno o razini izlaganja imidaklopidu i linearnu ovisnost efekata o dozi. (Feng i sur., 2005)

Međutim u kasnijem ispitivanju na ljudskim limfocitima pri koncentracijama imidakloprida od 0,2, 2 i 20 mM imidakloprida se pokazalo da je imidaklopid genotoksičan i uzrokuje značajno povećanje rezultata komet testa samo pri najvišim koncentracijama te se zaključilo da se radi o genotoksičnom spoju (Costa i sur. 2009.)Prema tome moglo bi se reći da imidaklopid nije genotoksičan za populaciju u koncentracijama koje su određene propisima (ADI, REL, OEL), s obzirom da su koncentracije imidakloprida koje su se koristile u ovom radu niže od onih korištenih u prijašnjim radovima.

U ispitivanjima provedenim na leukocitima švicarskih albino miševa se odredila genotoksičnost klorpirifosa in vivo, 24 sata nakon izlaganja oralno apliciranih doza od 0,28, 0,56, 1,12, 2,24, 4,48 i 8,96 mg/kg tjelesne mase. Komet test se radio prema postupku opisanom u Singh i sur. (1988), a uočeno je značajno povećanje vrijednosti repa kometa za sve koncentracije koje se povećavalo ovisno o dozi od 4,32 μ m do 9,23 μ m. (Rahman i sur., 2002). Daljnim ispitivanjima, ali ovog puta provedenog na stanicama punoglavaca kineske žabe izloženih koncentracijama klorpirifosa od 0,08, 0,16, 0,32, 0,64 mg/L provedenih malo izmjenjenom procedurom komet testa predloženom Singh i sur. (1988) se opet utvrdila genotoksičnost klorpirifosa značajnim povećanjem vrijednosti dužine repa kometa u usporedbi s negativnom kontrolom. Također se zabilježilo povećanje vrijednosti dužine repa u ovisnosti o dozi (XiaoHui Yin i sur. 2009). Međutim u rezultatima ovog rada ne uočava se značajno povećanje vrijednosti dužina repa što bi semoglo pripisati nižim koncentracijama

klorpirifosa, dok su u spomenutim radovima korištene više doze u kraćem vremenskom razdoblju.

Nadalje kod usporedbe rezultata za alfa cipermetrin ovog rada s rezultatima ostalih radova opet dolazimo do nesuglasnosti. Komet testom provedenom *in vitro* na humanim limfocitima izloženih alfa cipermetrinu 24 sata prema proceduri koju je opisao Singh (1988) uz male modifikacije, pri rastućim koncentracijama alfa cipermetrina od 3,6 mM do 7,6 mM. Došlo je do povećanja dužine repa kometa s 12,28 μm na 44.00 μm čime se ukazalo na genotoksičnost tog insekticida (Chakravarthi i sur 2007.)

Ispitivanjem DNA oštećenja kulture pune krvi komet testom izložene varirajućim subletalnim dozama cipermetrina (3,36 mM, 3,60 mM i 3,80 mM) kroz dva sata u usporedbi s negativnom kontrolom je došlo do povećanja dužine repa. Prosječna dužina repa negativne kontrole je bila 3,299 μm dok su se prosječne dužine repova kometa izloženih cipermetrinu povećavale od 12,192 μm do 26,678 μm s porastom koncentracije cipermetrina. (Suman i sur. 2005.) S obzirom da su vrijednosti koncentracija alfa cipermetrina korištenih u ovom radu puno niže od onih korištenih u prethodno navedenim radovima (0.262 $\mu\text{g/ml}$ najveća u ovom radu, dok su koncentracije u navedenim radovima iznad 1000 $\mu\text{g/ml}$), moguće je objašnjenje suprotnih rezultata ovog rada.

Komet-FISH je relativno jednostavna i brza metoda kojom možemo mjeriti količinu DNA oštećenja i popravljanja pojedinačnih stanica i lako se može modificirati kako bi odgovarala potrebama ispitivanja (Glei i sur. 2009) te dobiti uvid u samu strukturu nukleoida dobivenog komet testom tj. prostornu lokalizaciju raznih kromosomskih struktura (Glei i sur. 2009..). Metoda je kombinacija komet testa s fluorescencijskom in-situ hibridizacijom gdje promatramo ciljane/označene strukture/gene u nukleoidu kometa kako bismo dobili bolji uvid u sama događanja s molekulom DNA.

Ovo je prvi rad kojim se ispituje genotoksičnost ovih pesticida komet-FISH testom tako da nema u literaturi radova za usporedbu, međutim postoje radovi o genotoksičnosti drugih pesticida. U istraživanju na limfocitima periferne krvi proučavala se genotoksičnost karbofurana i terbutilazina pri koncentracijama od 0,58 i 8 ng/ml sa i bez metaboličke aktivacije na genima TP53 i c-Myc gdje se uočio povećani broj signala u repu kometa za sve vrijednosti i promatrane gene osim za TP53 kod terbutilazina pri koncentraciji od 0.58 ng/ml. Također je pokazano da nakon metaboličke aktivacije insekticidi pokazuju veće vrijednosti migracija c-Myc od TP53 te se kao moguće objašnjenja nude razlika u veličini gena i veći

afinitet nastanka oštećenja na tom genu (Mladinić i sur. 2012.). Rad u kojem se vršilo ispitivanje p53, HER2/neu i ZNF217 na stanicama dojke i raka dojke uočeno je preferirano popravljavanje gena p53 nasuprot genu HER2/neu iako su oba na kromosomu 17 jer se nakon izlaganja IR zračenju uočilo potpuno vraćanje signala iz repa u glavu za razliku od HER2/neu gdje su uočene povišene vrijednosti signala u repovima kometa. Nadalje se došlo do zaključka o osjetljivosti tih dvaju gena odnosno kromatinskih struktura u stanicama raka dojke budući su oni za razliku od ZNF217 putovali u rep (Kumaravel i Brisow, 2005). U radu na stanicama kolona je pokazano da u različitim stanicama različiti geni mogu biti više ili manje podložni štetnim čimbenicima u ovom slučaju reaktivnim vrstama kisika (ROS). Pokazano je da je TP53 u svim staničnim linijama bio podložniji oštećenjima od APC i KRAS gena iako je značajnu osjetljivost pokazivao u LT97 i primarnim stanicama kolona dok je značajnu osjetljivost pokazivao uz TP53 i APC u normalnim stanicama kolona (Schaeferhenrich i sur. 2007.) Rezultati ovog rada nisu pokazali statistički značajne razlike u migracijama i delecijama u usporedbi s negativnom i pozitivnom kontrolom što nas upućuje na to da se oštećenja (fragmentiranja) DNA ne događaju selektivno za promatrane gene. Međutim, kod koncentracije od 3 µg/ml se uočava veći broj signala nego kod negativne kontrole. Primjerice broj delecija gena TP53 za koncentraciju od 3 µg/ml za alfa cipermetrin i imidakloprid iznosi 5 i 4 što vidimo u tablicama 4 i 6 , što je više od negativne kontrole i ostalih nižih koncentracija za spomenute pesticide. Klorpirifos ima veći broj delecija TP53 nego negativna kontrola što se vidi u tablici 2, ali je jednak broju delecija OEL-a. Broj delecija centromere kromosoma 17 pri koncentraciji od 3 µg/ml su više za klorpirifos i imidakloprid dok su iste za alfa cipermetrin što se vidi u tablicama 3, 5 i 7. Slični rezultati se mogu uočiti i kod broja migracija signala gdje su povišene vrijednosti zamjećene za gen TP53 kod imidakloprida i centromere kromosoma 17 imidakloprida i klorpirifosa. Unatoč ovom uočenom povišenju broja signala s koncentracijom insekticida mora se istaknuti da nijedno od povišenja nije statistički značajno tako da ne upućuje izričito na povećanje genotoksičnosti u ovisnosti o dozi insekticida. Time bi se moglo dodatno potvrditi naše dobivene rezultate komet testa koji upućuju na odsutnost genotoksičnosti/neškodljivosti pesticida jer promatrani geni, koji su inače povezani s oboljenjima nisu više fragmentirani od ostatka genoma, dakle pesticidi ne djeluju selektivnije genotoksično. Stoga vjerojatno do oštećenja DNA dolazi neselektivno, nasumično po cijeloj DNA.

Tablica 2. Broj zabilježenih delecija uzrokovanih klorpirifosom dobiven komet-FISH testom

	TP53	CEN17
ADI	1	0
REL	1	1
OEL	3	1
3 µg/ml	3	2
Negativna kontrola – RPMI 1640	2	1
EMS (etil-metilsulfonat) 0,3 mg/ml	10*	1

*statistički značajno; pokusne skupine u odnosu na kontrolnu skupinu ($p > 0,05$)

ADI – dozvoljeni dnevni unos (allowed daily intake)

REL – razina izlaganja stanovništva

OEL – razina izlaganja profesionalno izložene populacije

TP53 – signal za gen TP53

CEN – signal za centromeru kromosoma 17

Tablica 3. Broj migracija signala u rep kometa dobiven komet-FISH testom uzrokovanih klorpirifosom

	TP53	CEN17
ADI	1	1
REL	1	1
AOEL	3	1
3 µg/ml	3	3
Negativna kontrola - RPMI 1640	2	1
EMS (etil-metansulfonat) 0,3 mg/ml	10*	1

*statistički značajno; pokusne skupine u odnosu na kontrolnu skupinu ($p > 0,05$)

ADI – dozvoljeni dnevni unos (allowed daily intake)

REL – razina izlaganja stanovništva

OEL – razina izlaganja profesionalno izložene populacije

TP53 – signal za gen TP53

CEN – signal za centromeru kromosoma 17

Tablica 4. Broj zabilježenih delecija uzrokovanih alfa cipermetrinom dobiven komet-FISH testom

	TP53	CEN17
ADI	1	1
REL	2	1
AOEL	1	0
3 µg/ml	5	1
Negativna kontrola - RPMI 1640	2	1
EMS (etil-metansulfonat) 0,3 mg/ml	10*	1

*statistički značajno; pokusne skupine u odnosu na kontrolnu skupinu ($p > 0,05$)

ADI – dozvoljeni dnevni unos (allowed daily intake)

REL – razina izlaganja stanovništva

OEEL – razina izlaganja profesionalno izložene populacije

TP53 – signal za gen TP53

CEN – signal za centromeru kromosoma 17

Tablica 5. Broj migracija signala u rep kometa dobiven komet-FISH testom uzrokovanih alfa cipermetrinom

	TP53	CEN17
ADI	0	1
REL	1	1
AOEL	1	0
3 µg/ml	2	2
Negativna kontrola - RPMI 1640	2	1
EMS (etil-metansulfonat) 0,3 mg/ml	10*	1

*statistički značajno; pokusne skupine u odnosu na kontrolnu skupinu ($p > 0,05$)

ADI – dozvoljeni dnevni unos (allowed daily intake)

REL – razina izlaganja stanovništva

OEEL – razina izlaganja profesionalno izložene populacije

TP53 – signal za gen TP53

CEN – signal za centromeru kromosoma 17

Tablica 6. Broj zabilježenih delecija uzrokovanih imidaklopridom, dobiven komet-FISH testom

	TP53	CEN17
ADI	1	0
REL	1	1
AOEL	1	0
3 µg/ml	4	2
Negativna kontrola - RPMI 1640	2	1
EMS (etil-metansulfonat) 0,3 mg/ml	10*	1

*statistički značajno; pokusne skupine u odnosu na kontrolnu skupinu ($p > 0,05$)

ADI – dozvoljeni dnevni unos (allowed daily intake)

REL – razina izlaganja stanovništva

OEEL – razina izlaganja profesionalno izložene populacije

TP53 – signal za gen TP53

CEN – signal za centromeru kromosoma 17

Tablica 7. Broj migracija signala u rep kometa dobiven komet-FISH testom uzrokovanih imidaklopridom

	TP53	CEN17
ADI	1	0
REL	0	0
AOEL	1	1
3 µg/ml	6	2
Negativna kontrola - RPMI 1640	2	1
EMS (etil-metansulfonat) 0,3 mg/ml	10*	1

*statistički značajno; pokusne skupine u odnosu na kontrolnu skupinu ($p > 0,05$)

ADI – dozvoljeni dnevni unos (allowed daily intake)

REL – razina izlaganja stanovništva

OEEL – razina izlaganja profesionalno izložene populacije

TP53 – signal za gen TP53

CEN – signal za centromeru kromosoma 17

Tablica 8. Genotoksičnost klorpirifosa – duljina repa (μm) izmjerena komet testom

	Prosječna vrijednost	Medijan	Standardna devijacija
0	14,8	14,7	1,77
ADI	15,0	14,7	3,59
REL	15,3	15,2	1,86
OEL	14,7	14,2	2,20
3 $\mu\text{g/ml}$	15,0	14,7	2,18
H ₂ O ₂ 50 μM	24,2*	23,5	8,25

*statistički značajno; pokusne skupine u odnosu na kontrolnu skupinu ($p > 0,05$)

ADI – dozvoljeni dnevni unos (allowed daily intake)

REL – razina izlaganja stanovništva

OEL – razina izlaganja profesionalno izložene populacije

Tablica 9. Genotoksičnost alfa ciprometrina - duljina repa (μm) izmjerena komet testom

	Prosječna vrijednost	Medijan	Standardna devijacija
0	14,8	14,7	1,77
ADI	14,6	13,6	2,06
REL	15,1	13,6	3,13
OEL	14,7	13,3	2,98
3 $\mu\text{g/ml}$	14,9	13,3	2,80
H ₂ O ₂ 50 μM	24,2*	23,5	8,25

*statistički značajno; pokusne skupine u odnosu na kontrolnu skupinu ($p > 0,05$)

ADI – dozvoljeni dnevni unos (allowed daily intake)

REL – razina izlaganja stanovništva

OEL – razina izlaganja profesionalno izložene populacije

Tablica 10. Genotoksičnost imidakloprida – duljina repa (μm) izmjerena komet testom

	Prosječna vrijednost	Medijan	Standardna devijacija
0	14,8	14,7	1,77
ADI	14,7	14,7	1,75
REL	14,4	14,3	1,62
OEL	14,3	14,3	2,29
3 $\mu\text{g/ml}$	16,2	16,2	1,93
H ₂ O ₂ 50 μM	24,2*	23,5	8,25

*statistički značajno; pokusne skupine u odnosu na kontrolnu skupinu ($p > 0,05$)

ADI – dozvoljeni dnevni unos (allowed daily intake)

REL – razina izlaganja stanovništva

OEL – razina izlaganja profesionalno izložene populacije

Tablica 11. Genotoksičnost klorpirifosa - intenzitet repa (% DNA u repu) izmjeren komet testom

	Prosječna vrijednost	Medijan	Standardna devijacija
0	0,34	0,00	0,72
ADI	1,26	0,00	11,41
REL	0,50	0,02	1,08
OEL	0,27	0,03	0,54
3 $\mu\text{g/ml}$	4,46	0,07	13,18
H ₂ O ₂ 50 μM	35,19*	9,83	32,64

*statistički značajno; pokusne skupine u odnosu na kontrolnu skupinu ($p > 0,05$)

ADI – dozvoljeni dnevni unos (allowed daily intake)

REL – razina izlaganja stanovništva

OEL – razina izlaganja profesionalno izložene populacije

Tablica 12. Genotoksičnost alfa ciprometrina - intenzitet repa (% DNA u repu) izmjeren komet testom

	Prosječna vrijednost	Medijan	Standardna devijacija
0	0,34	0,02	0,72
ADI	0,63	0,02	1,56
REL	1,08	0,05	2,21
OEL	0,87	0,05	1,78
3 µg/ml	1,07	0,07	2,10
H ₂ O ₂ 50 µM	35,19*	9,83	32,64

*statistički značajno; pokusne skupine u odnosu na kontrolnu skupinu (p>0,05)

ADI – dozvoljeni dnevni unos (allowed daily intake)

REL – razina izlaganja stanovništva

OEL – razina izlaganja profesionalno izložene populacije

Tablica 13. Genotoksičnost imidakloprida - intenzitet repa (% DNA u repu) izmjeren komet testom

	Prosječna vrijednost	Medijan	Standardna devijacija
0	0,34	0,00	0,72
ADI	0,30	0,00	0,56
REL	0,26	0,00	0,44
OEL	0,43	0,00	0,84
3 µg/ml	0,39	0,00	0,76
H ₂ O ₂ 50 µM	35,19*	9,83	32,64

*statistički značajno; pokusne skupine u odnosu na kontrolnu skupinu (p>0,05)

ADI – dozvoljeni dnevni unos (allowed daily intake)

REL – razina izlaganja stanovništva

OEL – razina izlaganja profesionalno izložene populacije

5. ZAKLJUČCI

Na temelju ispitivanja provedenih na limfocitima periferne krvi pomoću komet i komet-FISH testa u koncentracijama ADI, REL i OEL navedenih u tablici 1 dobiveni su sljedeći rezultati:

- Nakon tretiranja stanica limfocita periferne krvi insekticidima u propisanim koncentracijama (ADI, REL i OEL) nisu uočene statistički značajne promjene vrijednosti dužine repa kometa u usporedbi s pozitivnom kontrolom.
- Nakon tretiranja stanica limfocita periferne krvi insekticidima u vrijednostima ADI, REL i OEL vrijednosti intenziteta repa nisu se statistički značajno razlikovale od pozitivne kontrole.
- Vrijednosti delecija dobivene brojanjem signala u repu kometa za gen TP53 i centromeru kromosoma 17 komet-FISH testom za sve insekticide se ne razlikuju od onih za negativnu kontrolu pri koncentracijama za ADI, REL i OEL.
- Vrijednosti migracija dobivene brojanjem signala u repu kometa za gen TP53 i centromeru kromosoma 17 komet-FISH testom za sve insekticide se ne razlikuju od onih za negativnu kontrolu pri koncentracijama za ADI, REL i OEL.
- Kod vrijednosti delecija dobivenih pri koncentraciji od 3 µg/ml uočava se povećanje broja signala u repu kometa za centromeru kromosoma 17 za klorpirifos i imidakloprid dok se povećan signala za gen TP53 uočava kod alfa cipermetrina i imidakloprida, međutim povećanja nisu statistički značajna
- Kod vrijednosti migracija dobivenih pri koncentraciji od 3 µg/ml uočava se povećanje broja signala u repu kometa za centromeru kromosoma 17 za imidakloprid i klorpitifos, dok se povećanje signala za gen TP53 uočava samo kod imidakloprida, ali povećanja nisu statistički značajna.
- Može se zaključiti da ukoliko se ispitivani insekticidi pravilno primjenjuju i razine izloženosti budu unutar propisanih vrijednosti (ADI, REL, OEL) nisu genotoksični tj. opasni za populaciju

6. LITERATURA:

1. Chakravarthi K, B, Rambabu Naravaneni, Philip, G H. Study of Cypermethrin Cytogenesis effects on Human Lymphocytes Using In-Vitro Techniques. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 2007., 11 (2), 77-81
2. Costa C, Silvari V, Melchini A, Catania S, Heffron JJ, Trovato A, De Pasquale R. Genotoxicity of imidacloprid in relation to metabolic activation and composition of commercial product. *Enviornental Mutagenesis*, 2009, 672, 40-44
3. Costa LG. Toxic Effects of Pesticides. U: Cassarett and Doull's Essentials of Toxicology 3E. Curtis D. Klaassen i John B. Watkins III, urednici, New York, McGraw-Hill, 2015, str. 334-340.
4. Feng S, Zhiming K, Xinming W, Peng P, Zeng EY. Genotoxicity of imidacloprid and RH-5849 in human peripheral blood lymphocytes in vitro with comet assay and cytogenetic tests. *Ecotoxicology and Enviornmental Safety*, 2005, 61, 239-246
5. Glej M, Hovhannisyanyan G, Pool-Zobel BL. Use of Comet-FISH in study of DNA damage and repair: Review. *Mutation Research*, 2009, 681, 33-43
6. Kumaravel TS i Bristow RG. Detection of genetic instability at HER2/neu and p53 loci in breast cancer cells using Comet-FISH. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2005, 91, 89-93
7. Lin PC, Lin HY, Liao YY, Guo, HR, Chen KT. Acute Poisoning with Neonicotinoid Insecticides: A Case Report and Literature Review. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 2013, 112, 282-286
8. Luty S, Latuszynska J, Obuchowska-Przebirowska D, Tokarska M, Haratym-Maj A. Subacute toxicity of orally applied alpha-cypermethrin in swiss mice. *Annals of Environmental and Agricultural Medicine*, 2000, 7, 33-41
9. Mladinić M i Želježić D. Modification of comet-FISH technique by using temperature instead of chemical denaturation. *MethodsX*, 2014, 1, 162-167
10. Mladinić M i Želježić D, Shaposhnikov SA, Collins AR. The use of FISH-comet to detect c-Myc and TP53 damage in extended-term lymphocyte culture with terbuthylazine and carbofuran. *Toxicology Letters*, 2012, 211, 62-69
11. Muranlı FDG. Genotoxic and Cytotoxic Evaluation of Pyrethroid Insecticides λ -Cyhalothrin and α -Cypermethrin on Human Blood Lymphocyte Culture. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2013, 90, 357-363

12. Rahman MF, Mahboob M, Danadevi K, Saleha Banu B, Paramjit Grover. Assessment of genotoxic effects of chlorpyrifos and acephate by comet assay in mice leucocytes. *Mutation Research*, 2002, 516, 139-147
13. Shaferhenrich A, Gleis M, Claussen U, Keuchler A, Liehr T, Weise A, Marian B, Sendt W, Pool-Zobel BL. Comet Fluorescence in situ Hybridization Analysis for Oxidative Stress-Induced DNA Damage in Colon Cancer Relevant Genes. *Toxicological Sciences*, 2007, 96(2), 279-284
14. Shaposhnikov S, Frengen E, Collins AR. Increasing the resolution of the comet assay using fluorescent in situ hybridization-a review. *Mutagenesis*, 2009, 24, 383-389
15. Simon-Delso N, Amaral-Rogers V, Belzunces LP, Bonmatin JP, Chagnon M, Downs C, Furlan L, Gibbons DW, Giorio C, Girolami V, Goulson D, Kreuzweiser DP, Krupke CH, Liess M, Long E, McField M, Mineau P, Mitchell EAD, Morrissey CA, Noome DA, Pisa L, Settele J, Stark JD, Tapparo A, Van Dyck H, Van Praagh J, Van der Sluijs JP, Whitehorn PR, Wiemers R. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental and Science Pollution Research*, 2015, 22, 5-34
16. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 1988, 175, 184-191
17. Suman G, Naravaneni R, Kaiser J. In vitro cytogenetic studies of cypermethrin on human lymphocytes. *Indian Journal of experimental Biology*, 2006, 44, 233-239
18. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 2000, 35, 206-221
19. Topaktaş KAYM. The In Vitro Genotoxic Effects of a Commercial Formulation of α -Cypermethrin in Human Peripheral Blood Lymphocytes. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 2009, 50, 27-36
20. XiaoHui Y, Zhu GN, Bing Li X, Liu SY. Genotoxicity evaluation of chlorpyrifos to amphibian Chinese toad (Amphibian: Anura) by Comet assay and Micronucleus test. *Mutation Research*, 2009, 680, 2-6
21. Želježić D i Grahaj-Vrhovac V. FISH: the most powerful cytogenetic tool at the end of century. *Periodicum Biologorum*, 102, 231-236

7. SAŽETAK / SUMMARY

7.1 Sažetak

Insekticidi su u današnje vrijeme neizostavan dio uzgoja hrane kojima je kroz tu hranu izložena cjelokupna populacija. Stoga je bitno saznati kakve učinke te tvari imaju na ljudski organizam i zdravlje i odrediti regulativu koja će najbolje izbalansirati moguće štetne posljedice i uporabu insekticida. Jedan od bitnih učinaka je genotoksičnost koja se može pokušati odrediti raznim metodama poput ovdje korištenih komet i komet-FISH testova. Komet test je alkalna elektroforeza DNA pojedinačnih stanica u gelu gdje se oštećenja na molekuli DNA očituju kao 'reповi' a očitavanjem dužine i intenziteta repa možemo saznati opću razinu oštećenja molekule DNA. Stanice korištene za eksperiment su bile stanice limfocita iz čovjeka. Ta metoda se već dugo vremena koristi u određivanju genotoksičnosti tvari, ali iako je dosta osjetljiva govori nam samo o općem stanju cjelokupne molekule DNA. Kako bi se dobio uvid u oštećenja specifičnih gena ili struktura molekule DNA primjenio se komet-FISH test. To je kombinacija komet testa s fluorescentnom in-situ hibridizacijom pri čemu određeni slijed molekule DNA obilježimo fluorescentnom bojom pri čemu dobijemo probu koju možemo hibridizirati s nukleoidom u dobivenom kometu čime možemo vidjeti smještaj i izgled promatranog gena kao fluorescentnog signala u sklopu kometa. Nažalost unatoč mogućnostima koje nudi ova metoda nije korištena u puno istraživanja zbog čega ovaj diplomski rad predstavlja značajan doprinos saznanjima o metodi i genotoksičnom učinku ispitivanih insekticida. Nakon dugotrajnog (14 dana) izlaganja limfocita izabranim insekticidima – klorpirifosa, imidakloprida i alfa cipermetrina – u malim koncentracijama (ADI, REL, OEL) i kontrolnim spojevima, izmjerila se dužina i intenzitet repa kometa te je određen broj delecija i migracija ciljanog gena u kometima. Nije pokazana statistički značajna razlika u vrijednosti komet niti komet-FISH testa nakon tretiranja stanica odabranim insekticidima u usporedbi s kontrolnim supstancama. Razmatranjem dostupnih literaturnih podataka došli smo do zaključka da ukoliko se insekticidi koriste ispravno i u propisanim dozama ne bi trebalo doći do štetnih posljedica.

7.2 Summary

In modern times insecticides are an integral part of food production through which means the entire population is exposed. Therefore, it's paramount to determine the effects such substances have on human organism and health so that regulations for usage with best can be made. One important effect that they might cause is genotoxicity which could be assessed by methods such as comet and comet-FISH assays. Comet test is gel electrophoresis of DNA of single cells usually under alkaline conditions in which damaged DNA is observed as tails of comets. General level of overall DNA damage can be determined by measuring tail length and intensity. For the purpose of this experiment cultured human lymphocytes out of peripheral blood were used. While comet assay is relatively sensitive method and has been used for a long time in assessing genotoxicity it provides insight only into general state of damage of the whole DNA. So in order to gain insight into damage of specific genes of DNA structures comet-FISH assay has been used. Comet-FISH is a combination of comet assay with fluorescent in-situ hybridization where a specific sequence of DNA is labelled with a fluorochrome that can be annealed to comet DNA thus allowing us to observe position and appearance of wanted gene as fluorescent signal in comets. Unfortunately despite its many possible applications this method isn't widely used which makes this study important for future reference and insight into method. After exposing lymphocytes for a long time (14 days) to selected insecticides- chlorpyrifos, imidacloprid and alpha cypermethrine- in low concentrations (ADI, REL, OEL) and control substances, tail length and intensity of comets were measured and the number of deletions and migrations of FISH signals were counted. After statistical analysis no significant values, in comet nor comet-FISH assays, were observed in comparison to control substances. After comparing results obtained by previous studies with ones provided by this study it was concluded that with proper care and usage of these insecticides it should come to no harmful effects.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za Mikrobiologiju
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Ispitivanje genotoksičnosti klorpirifosa, imidakloprida i alfa cipermetrina Komet i Komet-FISH testom na produženim kulturama limfocita čovjeka

Benjamin Vinković

SAŽETAK

Tekst sažetka Insekticidi su u današnje vrijeme neizostavan dio uzgoja hrane kojima je kroz tu hranu izložena cjelokupna populacija. Stoga je bitno saznati kakve učinke te tvari imaju na ljudski organizam i zdravlje i odrediti regulativu koja će najbolje izbalansirati moguće štetne posljedice i uporabu insekticida. Jedan od bitnih učinaka je genotoksičnost koja se može pokušati odrediti raznim metodama poput ovdje korištenih komet i komet-FISH testova. Komet test je alkalna elektroforeza DNA pojedinačnih stanica u gelu gdje se oštećenja na molekuli DNA očituju kao 'reповi' a očitavanjem dužine i intenziteta repa možemo saznati opću razinu oštećenja molekule DNA. Stanice korištene za eksperiment su bile stanice limfocita iz čovjeka. Ta metoda se već dugo vremena koristi u određivanju genotoksičnosti tvari, ali iako je dosta osjetljiva govori nam samo o općem stanju cjelokupne molekule DNA. Kako bi se dobio uvid u oštećenja specifičnih gena ili struktura molekule DNA primjenio se komet-FISH test. To je kombinacija komet testa s fluorescentnom in-situ hibridizacijom pri čemu određeni slijed molekule DNA obilježimo fluorescentnom bojom pri čemu dobijemo probu koju možemo hibridizirati s nukleoidom u dobivenom kometu čime možemo vidjeti smještaj i izgled promatranog gena kao fluorescentnog signala u sklopu komete. Nažalost unatoč mogućnostima koje nudi ova metoda nije korištena u puno istraživanja zbog čega ovaj diplomski rad predstavlja značajan doprinos saznanjima o metodi i genotoksičnom učinku ispitivanih insekticida. Nakon dugotrajnog (14 dana) izlaganja limfocita izabranim insekticidima – klorpirifosa, imidakloprida i alfa cipermetrina – u malim koncentracijama (ADI, REL, OEL) i kontrolnim spojevima, izmjerila se dužina i intenzitet repa komete te je određen broj delecija i migracija ciljanog gena u kometima. Nije pokazana statistički značajna razlika u vrijednosti komet niti komet-FISH testa nakon tretiranja stanica odabranim insekticidima u usporedbi s kontrolnim supstancama. Razmatranjem dostupnih literaturnih podataka došli smo do zaključka da ukoliko se insekticidi koriste ispravno i u propisanim dozama ne bi trebalo doći do štetnih posljedica.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 37 stranica, 2 grafičkih prikaza, 13 tablica i 22 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Genotoksičnost, komet, komet-FISH, TP53, insekticidi limfociti

Mentor: **Dr. sc. Maja Šegvić Klarić**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Maja Šegvić Klarić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Davor Želježić, *naslovni redoviti profesor Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada*

Dr. sc. Ana-Marija Domijan, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Rad prihvaćen: rujan 2016.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of microbiology
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Evaluation of genotoxicity of chlorpyrifos, imidaclopramid and alpha cypermethrine using Comet and Comet-FISH assays in extended-term human lymphocytes

Benjamin Vinković

SUMMARY

Text In modern times insecticides are an integral part of food production through which means the entire population is exposed. Therefore, it's paramount to determine the effects such substances have on human organism and health so that regulations for usage with best can be made. One important effect that they might cause is genotoxicity which could be assessed by methods such as comet and comet-FISH assays. Comet test is gel electrophoresis of DNA of single cells usually under alkaline conditions in which damaged DNA is observed as tails of comets. General level of overall DNA damage can be determined by measuring tail length and intensity. For the purpose of this experiment cultured human lymphocytes out of peripheral blood were used. While comet assay is relatively sensitive method and has been used for a long time in assessing genotoxicity it provides insight only into general state of damage of the whole DNA. So in order to gain insight into damage of specific genes of DNA structures comet-FISH assay has been used. Comet-FISH is a combination of comet assay with fluorescent in-situ hybridization where a specific sequence of DNA is labelled with a fluorochrome that can be annealed to comet DNA thus allowing us to observe position and appearance of wanted gene as fluorescent signal in comets. Unfortunately despite its many possible applications this method isn't widely used which makes this study important for future reference and insight into method. After exposing lymphocytes for a long time (14 days) to selected insecticides- chlorpyrifos, imidacloprid and alpha cypermethrine- in low concentrations (ADI, REL, OEL) and control substances, tail length and intensity of comets were measured and the number of deletions and migrations of FISH signals were counted. After statistical analysis no significant values, in comet nor comet-FISH assays, were observed in comparison to control substances. After comparing results obtained by previous studies with ones provided by this study it was concluded that with proper care and usage of these insecticides it should come to no harmful effects.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 37 pages, 2 figures, 13 tables and 22 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Genotoxicity, Comet, Comet-FISH, TP53, insecticides, lymphocytes

Mentor: **Maja Šegvić Klarić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Maja Šegvić Klarić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Davor Želježić, Ph.D. Full Professor, Institute for Medical Research and Occupational Health
Ana-Marija Domijan, Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2016.

