

Citotoksični učinak bisfenola A na meristemske stanice korjenčića luka (*Allium cepa* L.)

Habljak, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:300782>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-29**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Lucija Habljak

**Citotoksični učinak bisfenola A na meristemske
stanice korjenčića luka (*Allium cepa* L.)**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Stanična biologija s genetikom Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za Farmaceutsku botaniku pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Ana-Marije Domijan. Istraživanje je provedeno u sklopu bilateralnog hrvatsko-slovenskog znanstveno-istraživačkog projekta „Toksikološki profil i interakcije bisfenola A i njegovih analoga“ financiranog iz sredstava Ministarstvo znanosti i obrazovanja Republike Hrvatske.

Zahvaljujem profesorici Ana-Mariji Domijan na mentorstvu, izuzetnoj posvećenosti, dostupnosti i velikoj potpori tijekom izrade rada. Veliko hvala i na odličnoj i opuštenoj atmosferi tijekom biološkog istraživanja.

Hvala i mojoj obitelji koja je budno pratila svaku stepenicu pisanja ovog rada, kao i cijelog studiranja. Ogromna ste podrška i ovo je i vaš uspjeh.

Hvala Filipu koji je uljepšao ovaj period i bio veliki poticaj, koji mi daje ogromnu snagu i želju za napredovanje i od koga sam toliko toga naučila.

I za kraj, hvala mojim prijateljima, sa fakulteta i izvan, koji su bili puni razumijevanja i potpore u svakom trenutku, koji su uvijek voljni pomoći i koji su prepuni pozitivne energije.

Bili smo dio jedne prekrasne priče koja se i dalje nastavlja samo u novom smjeru.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Bisfenol A	1
1.1.1. Toksičnost BPA za čovjeka	2
1.1.2. Utjecaj BPA na okoliš	4
1.2. <i>Allium</i> test	4
1.2.1. Mitotski indeks	5
1.3. Stanični ciklus	5
1.3.1. Interfaza	6
1.3.2. Mitoza	7
2. OBRAZLOŽENJE TEME	9
3. MATERIJALI I METODE	10
3.1. Materijali	10
3.1.1. Kemikalije	10
3.1.2. Oprema	10
3.1.3. Modelni organizam – obični luk	10
3.2. Metode	12
3.2.1. Biološki pokus	12
3.2.1.1. Priprema otopina BPA	12
3.2.1.2. Provođenje biološkog pokusa	13
3.2.2. Određivanje mase svježeg tkiva korjenčića	14
3.2.3. Određivanje mitotskog indeksa	14
3.2.3.1. Priprema otopine za fiksaciju	14
3.2.3.2. Priprema otopine za bojenje	14
3.2.3.3. Postupak određivanja mitotskog indeksa	14
3.2.4. Određivanje učestalosti pojedinih faza staničnog ciklusa	16
3.2.5. Statistička obrada podataka	17
4. REZULTATI	18
4.1. Masa svježeg tkiva korjenčića	18

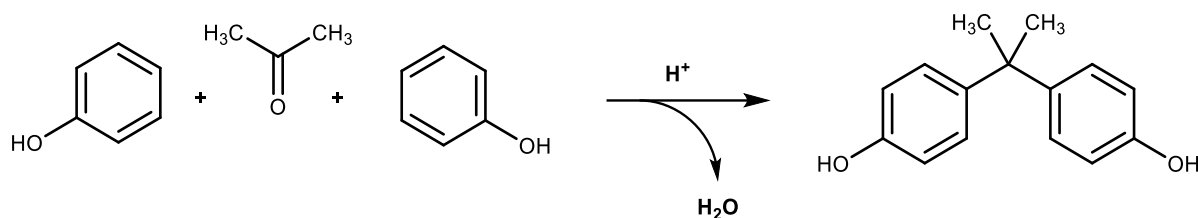
4.2. Mitotski indeks meristemskih stanica korjenčića luka.....	20
4.3. Korelacija rezultata mase svježeg tkiva korjenčića i mitotskog indeksa	21
4.4. Učestalost pojedinih faza staničnog ciklusa.....	21
5. RASPRAVA	23
6. ZAKLJUČCI	27
7. SAŽETAK/SUMMARY	28
8. LITERATURA.....	30

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

1.1. Bisfenol A

Bisfenol A (BPA) kemijski je spoj koji sadrži dvije fenolne funkcionalne skupine. Dobiva se sintezom dvije molekule fenola i jedne molekule acetona uz klorovodičnu kiselinu kao katalizator (Slika 1). Molekularna formula spoja je $C_{15}H_{16}O_2$, a molarna masa iznosi 228,29 g/mol. Čisti BPA je u obliku praha ili malih pahuljica bijele do svijetlo smeđe boje. Za dobivanje BPA zaslužan je ruski kemičar A. P. Dianin koji ga je sintetizirao 1891. godine (Jalal i sur., 2017).



Slika 1. Sinteza BPA iz fenola i acetona uz katalizator, klorovodičnu kiselinu

BPA je primarno sintetiziran kao sintetički estrogen, ali tada se pokazalo da slabo djeluje na estrogene receptore. Iz tog razloga, sintetiziran je dietilstilbestrol (DES) koji pokazuje jače estrogeno djelovanje nego BPA (Eichenlaub-Ritter i Pacchierotti, 2015). Primjena BPA datira od 1950-ih godina kada se počeo upotrebljavati kao glavni sastojak za dobivanje polikarbonata koji se koriste u proizvodnji plastike i epoksidnih smola kako bi se spriječilo hrđanje unutrašnjosti limenki i konzervi (Kawamura i sur., 1998). Većina metalne ambalaže, posebice konzervi u kojima se čuva hrana, premazana je s unutarnje, kontaktne strane epoksidnim ili organosolnim smolama. Također, kontaktna površina farmaceutske ambalaže ima premaz čiji je glavni sastojak BPA (Satoh i sur., 2004). Budući da nije bio proglašen hormonski aktivnom supstancom sve do kraja 19. stoljeća, njegova upotreba u proizvodnji plastike i epoksidnih smola masovno se povećala (Flint i sur., 2012.), a BPA je ujedno i jedna od kemikalija koja se najviše proizvodi u svijetu (Ballesteros-Gómez i sur., 2009). Osim u proizvodnji plastike, primjenjuje se kao stabilizator i antioksidans (Kawamura i sur., 1998). Zastupljenost BPA u industrijskim proizvodima, a sukladno tome i u okolišu, vrlo je velika. Neki od proizvoda koji sadrže BPA su plastične boce i bočice za mlijeko, dentalni materijali (zubne plombe), limenke, konzerve, elektronička i sportska oprema te ostali proizvodi s kojima se svakodnevno susrećemo (Staples i sur., 1998). Budući da BPA nije čvrsto vezan za materijal

u kojem se nalazi, može doći do njegovog otpuštanja iz materijala (Hoekstra i Simoneau, 2013). Utvrđeno je da dugim stajanjem, zagrijavanjem, reakcijama s kiselinama i lužinama, nepravilnim skladištenjem i transportom dolazi do otpuštanja BPA u hranu i piće. Svi navedeni faktori utječu na brzinu otpuštanja BPA iz materijala čime on postaje dio prehrane (Flint i sur., 2012). Izračunata vrijednost njegove specifične razine migracije (SML, od engl. *specific migration limits*) iznosi 0,05 mg/kg hrane (www.efsa.europa.eu).

1.1.1. Toksičnost BPA za čovjeka

Pokazano je da BPA djeluje kao endokrini disruptor jer ometa normalnu funkciju endokrinog sustava te na taj način štetno djeluje na zdravlje živih organizama. Američka agencija za zaštitu okoliša (EPA, od engl. *U.S. Environmental Protection Agency*) definira endokrine disruptore kao egzogene tvari koje ometaju proizvodnju, oslobađanje, transport, metabolizam, vezanje, djelovanje ili eliminaciju prirodnih hormona u tijelu koji su odgovorni za održavanje homeostaze i reguliranje prirodnih procesa (Crisp i sur., 1998). Mehanizmi djelovanja BPA uključuju njegovo vezanje na membranske receptore za estrogen, vezanje za glukuronidne receptore, sprječavanje transkripcije receptora hormona štitnjače, smanjenje transporta kolesterola kroz membranu, povećanje oksidacije masnih kiselina, stimulaciju otpuštanja prolaktina i smanjenje ekspresije aromataze (Eichenlaub-Ritter i Pacchierotti, 2015).

BPA u organizam ulazi ingestijom, inhalacijom ili kroz kožu. Nakon ulaska u organizam ingestijom brzo se apsorbira kroz stijenke tankog crijeva te se metabolizira u jetri. Glavni metabolički put eliminacije je glukuronidacija (90 %), a manjim dijelom sulfatacija (10 %) prilikom čega nastaju pretežito netoksični produkti (Mandić, 2006). Međutim, u mnogim tkivima sisavaca te prenatalno u jetri, bubrezima i plućima raznih laboratorijskih životinja, utvrđena je prisutnost enzima beta-glukuronidaze čija je primarna uloga razgradnja proteoglikana. Osim toga, enzim beta-glukuronidaza može razgraditi konjugirani BPA te tako ponovno osloboditi njegov aktivni oblik. Beta-glukuronidaza prisutna je i u ljudskoj posteljici te je ključan enzim za pravilan razvoj fetusa *in utero* (Ginsberg i Rice, 2009). Postoji mogućnost da konjugirani BPA cirkulira kroz placentu i podvrgne se dekonjugaciji prilikom čega dolazi do naknadnog izlaganja fetusa aktivnom obliku i bioakumulaciji BPA (Csanady i sur., 2002). Dokazano je da ponovna izloženost aktivnom metabolitu ima jače učinke na estrogene receptore nego sam BPA (Hirao-Suzuki i sur., 2019). Osim dekonjugiranog BPA, aktivnim oblikom

smatra se i 4-metil-2,4-bis(4-hidroksifenil)pent-1-en (MBP) koji pokazuje vrlo snažno estrogeno djelovanje u *in vitro* i *in vivo* uvjetima (Hirao-Suzuki i sur., 2019).

Utvrđeno je da BPA može uzrokovati poremećaje reproduktivnog sustava u muškaraca (smanjena proizvodnja i kvaliteta ejakulata) i žena (sindrom policističnih jajnika, kvaliteta i sazrijevanje oocita). Provedeno je istraživanje na Leydigovim stanicama čija je glavna uloga proizvodnja muških spolnih hormona i stanica (spermatogeneza), a rezultati su pokazali da zbog smanjene ekspresije steroidnog enzima 17- α monooksigenaze, BPA već i u malim koncentracijama (0,01 nM) smanjuje biosintezu testosterona za 25 % (Akingbemi i sur., 2004). Brojne studije razmatraju BPA i ostale endokrine disruptore kao tvari koje pridonose smanjenoj plodnosti žena (Wetherill i sur., 2007). Također, studije pokazuju da izloženost BPA može doprinijeti razvoju dijabetesa, kardiovaskularnih bolesti i hormonski ovisnih tumora (Lang i sur., 2008). Rezultati istraživanja provedenih *in vitro* pokazali su da pri koncentraciji BPA od 10 nM dolazi do smanjene adhezije makrofaga i ekspresije antigena što ima ključnu ulogu u modulaciji imunskog odgovora (Wetherill i sur., 2007).

Zbog učinaka BPA na endokrini sustav mnoge zemlje svijeta imaju zakone koji reguliraju prisustvo BPA u proizvodima široke potrošnje. Najveća razina opreza postavljena je za proizvode namijenjene novorođenčadi i djeci jer u njihovoj dobi hormonski sustav ima jako važnu ulogu u rastu i razvoju te funkcijama imunološkog sustava. Djeca su i najviše izložena BPA jer su u dodiru s plastičnim materijalima koje stavljaju u usta (bočice, čaše, igračke i sl.) (Rykowska i Wasiak, 2006). Europska komisija 2011. godine i Američka organizacija za hranu i lijekove (FDA, od engl. *US Food and Drug Administration*) 2012. godine zabranile su proizvodnju dječjih bočica za mlijeko koje sadrže BPA (www.ec.europa.eu, www.fda.gov). Sukladno tome, na tržištu postoje bočice s oznakom *BPA free*. Belgija, Švedska, Danska i Francuska zabranile su uporabu BPA u svim materijalima za pakiranje hrane. Francuska agencija REACH (engl. *Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals*) BPA svrstava u supstance visokog rizika zbog mutagenog, karcinogenog i toksičnog djelovanja na reproduktivni sustav (Moriyama i sur., 2002). U siječnju 2015. godine, Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA, engl. *European Food Safety Authority*) je objavila opsežnu procjenu izloženosti i toksičnosti BPA te smanjila prihvatljivi dnevni unos BPA s 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ na 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tjelesne težine (www.efsa.europa.eu).

1.1.2. Utjecaj BPA na okoliš

Razvojem i urbanizacijom zemalja povećavaju se proizvodni i potrošački zahtjevi za plastikom. Samim time i količine BPA u okolišu u konstantnom su porastu. Rast globalne proizvodnje BPA kreće se oko 5 % godišnje, a posljednji najveći rast dogodio se u Aziji (Kina) gdje je porast proizvodnje BPA do 2006. godine iznosio 13 % godišnje (Huang i sur., 2012).

Izvori BPA u okolišu mogu se klasificirati na one nastale tijekom ili nakon proizvodnje. Tijekom proizvodnje najveće otpuštanje BPA je iz proizvodnih pogona u otpadne vode, a izvori nakon proizvodnje uključuju odlaganje i razgradnju plastike u okolišu, ispiranje s odlagališta i spaljivanje kućnog otpada (Flint i sur., 2012). BPA se konstantno otpušta u okolinu tijekom proizvodnje, transporta i prerade plastike. Zbog visokih temperatura, pogotovo u ljetnim mjesecima, dolazi do akumulacije BPA u okolišu. Također, zbog migracije BPA iz plastike, dolazi do zagađenja površinskih i komunalnih voda te spremnika za pitku vodu (Kučić Grgić i sur., 2019). Istraživanja su utvrdila prisutnost BPA (u niskim koncentracijama) u vodi iz slavine i flaširanoj vodi (Santhi i sur., 2012). Osim vode, zagađene su i brojne obradive površine. Također, može ga se dokazati u odlagalištima i spalionicama otpada, a razlog tomu je nepravilno zbrinjavanje plastike nakon uporabe. Zbog podizanja svjesnosti o toksičnosti BPA, promovira se odvajanje plastike u za to namijenjena odlagališta (Kučić Grgić i sur., 2019).

Iz okoliša se BPA može ukloniti fotorazgradnjom jer je fotonestabilan te razgradnjom mikroorganizmima. Jedne od rijetkih bakterija koje imaju mogućnost razgradnje BPA za čak 90 % su: *Pseudomonas sp.* i *Pseudomonas putida* te *Streptomyces sp.* (Kang i sur., 2004).

1.2. *Allium* test

Allium test je biološki test koji se koristi za određivanje citotoksičnosti i genotoksičnosti različitih spojeva. Također, koristi se i za ispitivanje antiproliferativnog učinka ekstrakata ljekovitih biljaka (Firbas i Amon, 2014). Ima niz prednosti zbog kojih se koristi u eksperimentalnom radu: kratko vrijeme pripreme i provedbe, jednostavnost izvođenja i povoljna cijena (Fiskesjö, 1985). Dovoljno je osjetljiv, a rezultati dobiveni *Allium* testom usporedivi su s rezultatima dobivenim na animalnim stanicama. Primjerice, rezultati *Allium* testa dobro su korelirali s rezultatima dobivenim na V79 stanicama (stanice plućnih fibroblasta hrčka) (Fiskesjö, 1985). Kao standardni testni materijal najčešće se upotrebljavaju biljne vrste

roda *Allium*, u većini slučajeva običan luk (*Allium cepa* L.), po kojem je test dobio ime (Fiskesjö, 1985). Prednosti luka u genotoksičnim ispitivanjima su: a) korijen luka je vrlo osjetljiv na toksične spojeve i onečišćenja te se utjecaj genotoksičnih tvari brzo uočava; b) jasno su vidljivi kromosomi što omogućuje proučavanje nepravilnosti staničnog ciklusa i kromosomskih aberacija; c) ima stabilan kariotip (broj i izgled kromosoma, $2n = 16$); d) rijetko dolazi do spontanih kromosomskih oštećenja. Pozitivne rezultate dobivene *Allium* testom treba smatrati upozorenjem i indikacijom da testirana kemikalija može predstavljati rizik za ljudsko zdravlje i okoliš (Fiskesjö, 1985).

1.2.1. Mitotski indeks

Prilikom provođenja *Allium* testa, određuje se mitotski indeks koji je kao mikroskopski parametar pokazatelj utjecaja određenog spoja na stanični ciklus promatrane vrste. Budući da se vrijednostima mitotskog indeksa procjenjuje učestalost stanica u diobi, postoji povezanost s rastom biljke. Mitotski indeks predstavlja omjer broja promatranih stanica koje se nalaze u diobi i ukupnog broja promatranih stanica.

Prema Fiskesjö (1985) mitotski indeks se može izraziti formulom:

$$\text{Mitotski indeks} = \text{broj stanica u diobi} / 1000 \text{ promatranih stanica.}$$

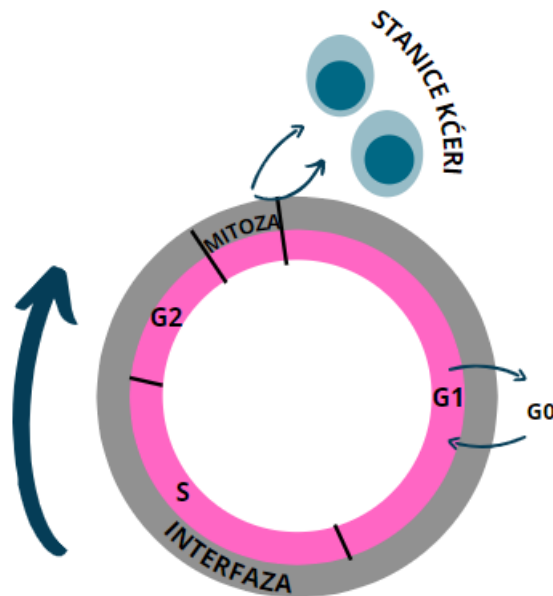
Prema Sehgalu i sur. (2006) mitotski indeks se računa prema formuli:

$$\text{Mitotski indeks} = \text{broj stanica u diobi} / \text{ukupan zbroj stanica} \times 100.$$

1.3. Stanični ciklus

Stanični ciklus ili ciklus stanične diobe predstavlja niz kontroliranih procesa unutar stanice koji uključuje udvostručenje kromosoma i drugih staničnih dijelova te njihovo raspoređivanje na dvije stanice kćeri (Slika 2). To je proces staničnog rasta kroz koji prolazi svaka stanica, a stanični ciklus možemo podijeliti na interfazu (faza rasta) i mitozu (faza diobe stanice) (Cooper, 2010). Kod jednostaničnih organizama, dioba stanica predstavlja nastajanje novog organizma, dok kod višestaničnih organizama velikim brojem dioba oplođene jajne stanice (zigote), dolazi do stvaranja različitih vrsta stanica koja tvore tkiva, organe i organizam.

Također, dioba stanica kod odraslih organizama služi za obnavljanje i zamjenu oštećenih stanica (Morgan, 2007). Stanični ciklus eukariotskih stanica traje u prosjeku 24 sata, ali varira ovisno o organizmu i dijelovima organizma u kojima se stanica nalazi. Većinu vremena stanica provede u interfazi (95 % vremena) dok ostatak vremena (5 % vremena) predstavlja mitozu (Cooper, 2010).



Slika 2. Prikaz faza staničnog ciklusa

1.3.1. Interfaza

U interfazi se stanica zapravo priprema za diobu te dolazi do umnažanja staničnog i genetičkog materijala (citoplazmatskih organela, strukturnih proteina, kromosoma), a sukladno tomu i do udvostručenja veličine stanice. Interfaza se dijeli na tri faze: G1 (G od engl. *gap*), S (S od sinteza) i G2 fazu od kojih svaka faza ima bitnu ulogu u cjelokupnom staničnom ciklusu te je važno da stanica kroz svaku fazu prođe ispravno (Cooper, 2010). U G1 fazi stanica provodi oko 11 sati gdje raste i priprema se za replikaciju DNK. Kromosomi se odmotavaju i tvore eukromatin koji je transkripcijski aktivan te dolazi do sinteze tRNK, mRNK, proteina, ugljikohidrata, lipida i enzima koji su potrebni stanici za normalno funkcioniranje.

Kada je stanica spremna za udvostručenje, ulazi u S fazu interfaze gdje se odvija replikacija DNK te dolazi do udvostručenja broja kromosoma. Prilikom replikacije dolazi do

razmatanja dvostruke uzvojnice DNK molekule, te svaki od lanaca DNK predstavlja kalup za replikaciju na osnovu kojega se sintetizira novi lanac DNK. U konačnici, nastaju dvije molekule DNK, svaka se sastoji od jednog starog i jednog novog lanca DNK. U S fazi stanica provodi 8 sati te se osim replikacije DNK odvija i sinteza organela i proteina, ali u manjoj mjeri nego u G1 fazi (Cooper, 2010).

Nakon udvostručenja broja DNK molekula, stanica ulazi u G2 fazu u kojoj provodi oko 4 sata. Stanica i dalje raste te se u ovom dijelu ciklusa odvijaju posljednje pripreme za diobu stanice uključujući sintezu proteina za mitozu te formiranje diobenog vretena (koje se formira od vlakana mikrotubula koja imaju ulogu staničnog kostura) i centrosoma (služe za organizaciju mikrotubula, sastoje se od dvije centriole). Nakon navedenih procesa, stanica ulazi u M fazu (mitoza) u kojoj se nalazi otprilike jedan sat (Cooper, 2010).

Osim navedenih faza, prisutna je i G0 faza (faza mirovanja) u koju stanica ulazi ukoliko dođe do pojave neodgovarajućih uvjeta. Stanice su metabolički aktivne, ali se ne dijele. Neke stanice kao što su neuroni mogu trajno ostati u G0 fazi, a ostale stanice čekaju vanjske signale koji signaliziraju stanici da su uvjeti za rast uspostavljeni i da stanica može nastaviti s ostalim fazama ciklusa (Rye i sur., 2017).

1.3.2. Mitoza

Mitozu karakteriziraju kariokineza (podjela jezgre) i citokineza (podjela citoplazme). Iako je mitoza kontinuiran proces, radi lakšeg razumijevanja dijeli se na faze ovisno o položaju i kondenzaciji kromosoma unutar stanice. Kariokineza se dijeli na profazu, prometafazu, metafazu, anafazu i telofazu (Rye i sur., 2017).

Na početku profaze, kromosomi su u obliku tankih i dugih niti koje se kondenziraju oko proteina uz nastajanje sve debljih i kraćih niti koje se nazivaju sestrinske kromatide, međusobno povezane centromerom. Između centrosoma koji se gibaju prema suprotnom polu stanice, formiraju se niti diobenog vretena izgrađene od mikrotubula koji služe za pričvršćivanje i pomicanje kromosoma unutar stanice. Na kraju profaze, u prometafazi, razgrađuje se jezgrina ovojnica (Cooper, 2010).

Metafaza predstavlja najdulji period mitoze u kojem su kromosomi najbolje vidljivi svjetlosnim mikroskopom jer su maksimalno spiralizirani. Mikrotubuli vezani za kinetohorne proteine na centromerama kromosoma dovode kromosome u ekvatorijalnu ravninu.

U anafazi dolazi do kidanja veze između sestrinskih kromatida jer ih niti diobenog vretena povlače prema polovima stanice. Samostalne kromatide, odnosno sada kromosomi, putuju na suprotne polove, a stanica se izdužuje. Razdvajanje kromatida služi za raspodjelu genetskog materijala na dvije stanice kćeri koje će imati istu nasljednu uputu kao i početna stanica u interfazi (Cooper, 2010).

Tijekom telofaze kromosomi se nalaze na polovima stanice i počinju se dekondenzirati te ponovno poprimaju oblik tankih i dugih niti. Diobeno vreteno se razgrađuje, a formira se jezgrina ovojnica oko svakog seta kromosoma te nastaju dvije jezgre.

Nakon kariokineze slijedi citokineza u kojoj se membrana na središtu stanice udubi te se stanica podijeli na dvije stanice kćeri od kojih svaka sadrži svoju jezgru i ostale dijelove stanice (www.khanacademy.org).

2.OBRAZLOŽENJE TEME

BPA plastici daje čvrstoću te se stoga nalazi u skoro svim predmetima od plastike u općoj upotrebi. Za ljudsko zdravlje najveću opasnost predstavlja upotreba BPA u prehrambenoj industriji u kojoj se plastična ambalaža koristi za omatanje i čuvanje hrane i pića. S obzirom da BPA migrira iz plastike u hranu i piće koje se nalazi u plastičnoj ambalaži, ljudi su izloženi djelovanju BPA. Kod odrasle populacije, izloženost BPA povezana je s razvojem bolesti poput dijabetesa, bolesti srca, pretilosti, poremećaja reproduktivnog sustava i oštećenja jetre (Ellahi i Rashid, 2017). U većini zemalja od 2018. godine upotreba BPA u proizvodima od plastike za djecu do 3 godine je zabranjena (www.compliancegate.com). Istraživanja pokazuju da je najveća opasnost djelovanja ovoga spoja za novorođenčad i fetus jer BPA prolazi kroz posteljicu, što posebno zabrinjava s obzirom da su posljedice toksičnosti BPA na fetus veće u odnosu na odraslog čovjeka (Ginsberg i Rice, 2009).

Usprkos brojnim studijama, učinak BPA na zdravlje ljudi i okoliš je nedovoljno istražen, a njegovi mehanizmi toksičnosti nisu u potpunosti razjašnjeni. Stoga je u ovome istraživanju ispitan učinak BPA na makroskopske i mikroskopske karakteristike korjenčića luka. Kao modelni organizam korišten je običan luk (*A. cepa*) kako bi se izbjegla upotreba životinja i stanica životinjskog ili ljudskog porijekla. Također, luk ima brojne prednosti u eksperimentalnom radu poput jednostavnosti uzgoja, a stanice i kromosomi vrška korjenčića luka su dovoljno veliki da ih je moguće promatrati pod svjetlosnim mikroskopom (Fiskesjö, 1985). Osim toga, ako se dokaže toksično djelovanje BPA na stanice korjenčića luka, dobiveni rezultati mogu se povezati s toksičnim utjecajem i na ljudske stanice (Firbas i Amon, 2014).

Kako bi se ispitaio učinak BPA na korjenčiće luka, pripremljene su otopine BPA u koncentracijskom rasponu 1-50 mg/L te su korjenčići luka izloženi pripremljenim otopinama BPA ili destiliranoj vodi koja je služila kao negativna kontrola (nije sadržavala BPA). Nakon 72-satne izloženosti, izvagana je masa korjenčića te je određen mitotski indeks kao i zastupljenost određenih faza staničnog ciklusa u stanicama vrška korjenčića luka (meristemske stanice), odnosno određeni su pokazatelji fitotoksičnog i citotoksičnog učinka ispitivanog spoja.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

U ovom istraživanju korištene su kemikalije:

- bisfenol A, BPA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- 96%-tni etanol (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- ledena octena kiselina (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, SAD)
- orcein (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, SAD).

Sve kemikalije bile su *pro analysis* čistoće, a otopine su pripravljene s destiliranom vodom.

3.1.2. Oprema

U ovom istraživanju korištena je oprema:

- analitička vaga, PB303 Delta Range (Mettler Toledo, Columbus, SAD)
- magnetska miješać s grijačem, MSH-A (Witeg, Wertheim, Njemačka)
- termoblok, MPS-1 (Biosan, Riga, Latvija)
- svjetlosni mikroskop, CX 23 (Olympus, Tokio, Japan).

Za provođenje istraživanja korištene su još: staklene epruvete, Eppendorf epruvete, plastični stalci za epruvete, staklene čaše, odmjerne tikvice, Erlenmeyerove tikvice, kapalice, automatske mikropipete i odmjerne tikvice. Sva oprema nalazi se na Zavodu za farmaceutsku botaniku gdje je i provedeno istraživanje.

3.1.3. Modelni organizam – obični luk

Obični luk (*Allium cepa* L.) je višegodišnja zeljasta biljka iz porodice Liliaceae. Ima čupave korjenčiće, jestivu podzemnu lukovicu i cjevasto, pri vrhu zatvoreno, jestivo lišće. Kada

je lukovica zrela, od gubitka vode je zaštićena ovojnim listovima koji mogu biti raznih boja (www.enciklopedija.hr). O ljekovitosti luka pisali su i antički liječnici koji u svojim djelima navode luk kao antiseptik, bakteriostatik, diuretik i antidijabetik. Bogat je vitaminima i mineralima što dodatno potiče njegov uzgoj diljem svijeta. Uz ljekovita svojstva luk se od davnina koristi u kulinarstvu u raznim jelima, a ujedno poboljšava apetit i potiče probavu (Hulina, 2011).

U ovom istraživanju korišten je luk varijetet srebrenac koji za Hrvatsku distribuira Planta Prelesje d.o.o. (Slika 3).

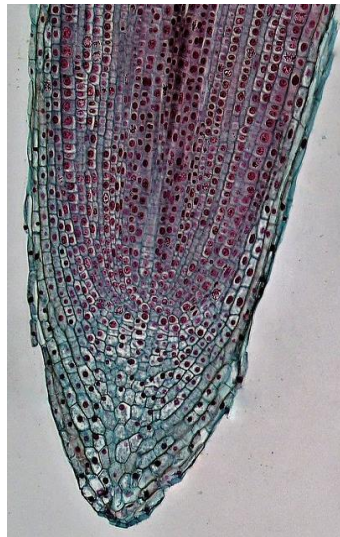


Slika 3. Lukovica običnog luka (*A. cepa*), varijetet srebrenac s vidljivim korjenčićima

Prednost luka kao modelnog organizma u eksperimentalnom radu je njegovo brzo klijanje i laki uzgoj te relativno veliki kromosomi pogodni za citogenetička istraživanja (Fiskesjö, 1985). Meristemske stanice korijena luka su prve izložene djelovanju kemijskih spojeva te su stoga najosjetljivije na citotoksične i genotoksične spojeve. One se nalaze u meristemskom dijelu korijena unutar kojeg je najčešća dioba stanica (Slika 4). Zato je vrlo važno prilikom ispitivanja toksičnosti spojeva promatrati upravo te stanice. Prema bazi nastavlja se zona produženog rasta korijena u kojoj se također odvija dioba, ali manjim intenzitetom (Murčić, 2012).

Učinak nekog spoja očituje se u promjenama morfoloških karakteristika korjenčića (izgled korjenčića, boja, čvrstoća, usporen ili inhibiran rast korjenčića te smanjenje mase svježeg

ili suhe tvari), citotoksičnih karakteristika (smanjenje mitotskog indeksa odnosno broja stanica u diobi) te genotoksičnih parametara (prisutstvo kromosomskih aberacija koje uključuju slijepljene kromosome, anafazne mostove, lomove kromosoma, mikronukleuse i nepravilan broj kromosma) (Vidaković-Cifrek i sur., 2014).



Slika 4. Uzdužni presjek korjenčića luka s vidljivim meristemskim stanicama (preuzeto iz *Berkshire Community College Bioscience Image Library* uz dopuštenje autora)

3.2. Metode

3.2.1. Biološki pokus

3.2.1.1. Priprema otopina BPA

Najprije je odvagano 2,0 g krutog BPA koji se prebacio u odmjernu tikvicu od 10 mL. Potom se BPA otopio u 96 %-tnom etanolu (BPA nije topljiv u vodi). Nakon otapanja koje je potpomognuto zagrijavanjem na grijaćoj ploči, odmjerna tikvica je nadopunjena s 96 %-tnim etanolom. Tako pripremljena otopina ima koncentraciju BPA 2 g/10 mL, odnosno 200 g/L te je to matična otopina BPA koja je služila za pripremu radnih otopina BPA.

Iz matične otopine pripremljene su radne otopine BPA u koncentracijama 1 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 25 mg/L i 50 mg/L. Radne otopine BPA pripremljene su razrjeđivanjem matične otopine koncentracije 200 g/L (c1) prema formuli:

$$c1 \times V1 = c2 \times V2$$

Za pripremu otopine BPA (c_2) iz matične otopine uzimao se alikvot (V_1) koji se prebacio u odmjernu tikvicu od 500 mL te razrijedio destiliranom vodom do oznake. Volumen dobivenih radnih otopina za pripremu svake od navedenih radnih otopina BPA iznosi 500 mL (V_2) jer je volumen epruveta koje se koriste u pokusu (u koje se stavljaju lukovice) oko 15 mL. Priprema radnih otopina BPA za tretman luka prikazana je tablicom 1.

Budući da je za pripremu matične otopine BPA bio potreban 96 %-tni etanol (jer BPA nije topljiv u vodi), u negativnu kontrolu (destilirana voda) dodano je 125 μ L 96 %-tnog etanola (taj volumen 96 %-tnog etanola nalazio se u otopini BPA koncentracije 50 mg/L) kako bi se isključio mogući učinak etanola na korjenčiće.

Tablica 1. Priprema radnih otopina BPA iz matične otopine BPA koncentracije 200 g/L

Koncentracija radne otopine BPA (mg/L)	Volumen matične otopine BPA koncentracije 200 g/L (μ L)	Ukupni volumen radne otopine BPA (mL)
1	2,5	500
5	12,5	500
10	25	500
25	62,5	500
50	125	500

3.2.1.2. Provođenje biološkog pokusa

Na početku pokusa odabrale su se lukovice običnog luka podjednake veličine te su nakon čišćenja od ljuskica stavljene na 48-satno naklijavanje u epruvete s destiliranom vodom. Bitno je da baza lukovice bude uronjena u vodu. Nakon 48 sati naklijavanja, za pokus su odabrane one lukovice koje su proklijale te su imale pravilne korjenčiće. Za svaki od tretmana, negativnu kontrolu (destilirana voda) i svaku od koncentracija BPA (1-50 mg/L) odabrano je po 10 lukovica. Potom su se lukovice ($n = 10$) stavile u epruvete s destiliranom vodom (negativna kontrola) ili s otopinama BPA (koncentracijski raspon, 1-50 mg/L). Nakon 72-satne izloženosti ili destiliranoj vodi ili otopinama BPA, lukovice su se izvadile iz epruveta te su zabilježene morfološke promjene korjenčića (izgled, boja, duljina i masa korjenčića).

3.2.2. Određivanje mase svježeg tkiva korjenčića

Nakon 72-satne izloženosti destiliranoj vodi ili otopinama BPA u koncentracijskom rasponu 1-50 mg/L, izvagana je masa korjenčića za svaku od lukovica. To je napravljeno tako da se lukovica izvadi iz destilirane vode (negativna kontrolna, koncentracija BPA 0 mg/L) ili iz otopine BPA te se korjenčići jedne po jedne lukovice posuše papirnatim ručnikom kako bi se maksimalno izbjeglo povećanje mase zbog zaostale otopine na korjenčićima. Lukovice se uzimaju jedna po jedna iz epruvete s otopinom BPA (ili destilirane vode), korjenčići se suše, odvoje pomoću skalpela od lukovice i važu. Postupak se ponavlja za svaku od 10 lukovica po tretmanu/izloženosti.

3.2.3. Određivanje mitotskog indeksa

3.2.3.1. Priprema otopine za fiksaciju

Otopina za fiksaciju (Carnoy otopina) dobivena je miješanjem 96 %-tnog etanola i octene kiseline u omjeru 3:1. Otopina je pripremljena tako što se pomoću menzure prvo uzme 30 mL 96 %-tnog etanola te prebaci u čašu. Potom se menzutom uzme 10 mL octene kiseline te doda u čašu s 96 %-tnim etanolom. Pripremljena otopina čuva se u boci s čepom.

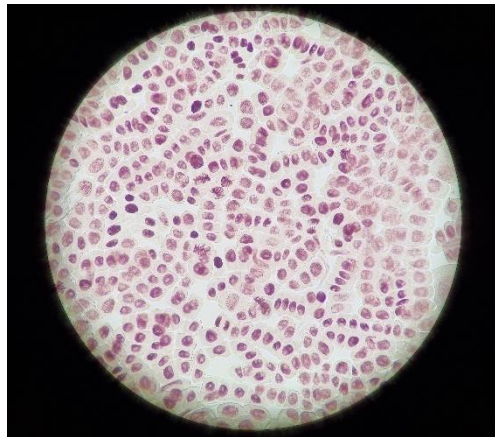
3.2.3.2. Priprema otopine za bojenje

Prvo je pripremljena 45 %-tna otopina octene kiseline tako što je ledena octena kiselina razrijeđena s destiliranom vodom u omjeru 45:55. Potom je odvagano 0,1 g orceina i prebačeno u odmjernu tikvicu od 10 mL. Orcein je otopljen u 45%-tnoj octenoj kiseline te je odmijerna tikvica nadopunjena s 45 %-tnom octenom kiselinom. Pripremljena otopina orceina čuva se u tamnoj bočici.

3.2.3.3. Postupak određivanja mitotskog indeksa

Nakon 72-satne izloženosti ili destiliranoj vodi (negativna kontrola) ili otopinama BPA, odabrano je po tri korjenčića od pet lukovica ($n = 5$) iz svakog tretmana te stavljeno u fiksativ (Carnoy otopinu) kako bi se zaustavila dioba stanica.

Za određivanja mitotskog indeksa korjenčice je potrebno obojiti kako bi stanice na mikroskopskom preparatu bile jasno vidljive. Bojenje je provedeno tako da se korjenčić iz fiksativa prebacio u epruvetu s bojom (otopina orceina) te je epruveta zagrijavana u termobloku 20-ak minuta. Potom se vršni dio korjenčića odvojio žiletom (vršni dio tamnije je obojen meristem gdje se stanice najviše dijele), prebacio na predmetno stakalce i macerirao pomoću tupog kraja laboratorijske iglice. Na to je stavljena pokrovnica te se tehnikom „gnječenja“ stisnula palcem kako bi se dobile stanice u jednom sloju (Sharma i Sharma, 1972). Mikroskopiranje pripremljenog mikroskopskog preparata provedeno je tako da se na povećanju od 40 x nađe područje vršnog meristema i diobe stanica (Slika 5) te se na povećanju od 400 x proučavaju stanice i faze staničnog ciklusa u kojima se stanice nalaze.



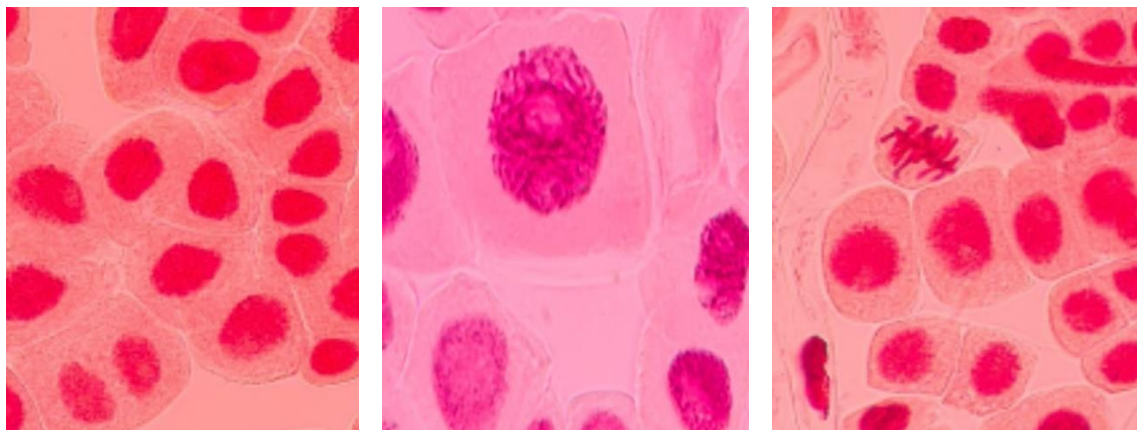
Slika 5. Meristemske stanice korjenčića luka; svjetlosni mikroskop, povećanje 40 x

Mitotski indeks odredio se na ukupno 500 stanica po preparatu. Za negativnu kontrolu i za svaku od koncentracija BPA (1 – 50 mg/L) pripremljeno je po pet mikroskopskih preparata. Na izbrojanih 500 stanica po preparatu, potrebno je, ovisno o položaju i kondenzaciji kromosoma unutar stanica, uočiti koje stanice se nalaze u diobi (mitoza), a koje u interfazi. Svaka pojedina stanica se promatra i određuje je li u diobi ili nije, a broj stanica u svakoj od pojedinih faza se bilježi. Mitotski indeks se računa na 500 promatranih stanica po mikroskopskom preparatu i izražava u postocima prema formuli (Sehgal i sur., 2006):

$$\text{Mitotski indeks (\%)} = \text{broj stanica u diobi} / 500 \times 100$$

3.2.4. Određivanje učestalosti pojedinih faza staničnog ciklusa

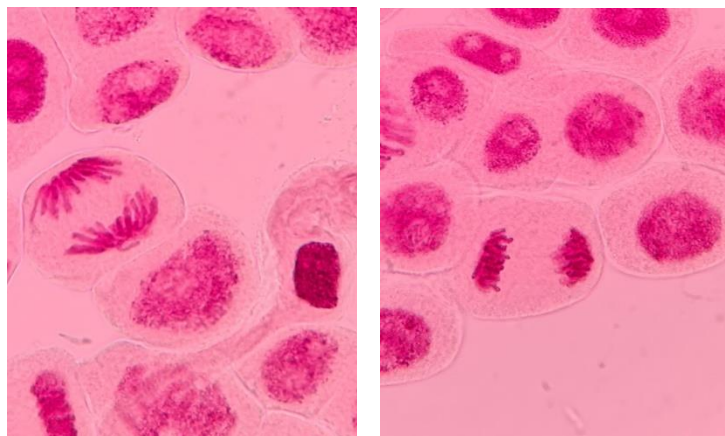
Za sve stanice koje su izbrojane ($n = 500$) po mikroskopskom preparatu i ulaze u izračun mitotskog indeksa bilježila se i faza u kojoj se stanica unutar staničnog ciklusa nalazila. To se lako može odrediti promatranjem položaja i stupnja kondenzacije kromosoma unutar stanice. Na slici 6 prikazane su pojedine faze staničnog ciklusa. Pomoću dobivenih rezultata može se izračunati zastupljenost pojedine faze i izračunati koliko je stanica napredovala unutar staničnog ciklusa.



INTERFAZA

PROFAZA

METAFAZA



ANAFAZA

TELOFAZA

Slika 6. Faze staničnog ciklusa meristemskih stanica korjenčića luka; svjetlosni mikroskop, povećanje 400 x

3.3. Statistička obrada podataka

Masa svježeg tkiva određena je za deset lukovica ($n = 10$) za negativnu kontrolu i za svaku od ispitivanih koncentracija BPA, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost 10 lukovica \pm standardna devijacija za svaki od tretmana. Za izračun mitotskog indeksa pregledano je po pet mikroskopskih preparata za kontrolu i za svaku od ispitanih koncentracija BPA, a na svakom mikroskopskom preparatu prebrojano je 500 stanica (što znači da je po tretmanu izbrojano 2500 stanica). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost 2500 izbrojanih stanica po tretmanu \pm standardna devijacija. Korištenjem t-testa pomoću računalnog programa *Excel (MS Office)* uspoređeni su dobiveni rezultati između tretmana lukovica destiliranom vodom (negativna kontrola) i otopinama BPA u koncentracijskom rasponu (1-50 mg/L). Pomoću statističkog računalnog programa *Social Science Statistics* (socscistatistics.com) izračunata je Pearsonova korelacija između mase svježeg tkiva korjenčića i mitotskog indeksa. Kao statistički značajna razlika postavljena je vrijednost $P \leq 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Masa svježeg tkiva korjenčića

U ovome istraživanju korjenčići lukovica luka bili su 72 sata izloženi destiliranoj vodi (negativna kontrola) ili otopinama BPA u koncentracijskom rasponu 1-50 mg/L. Na slici 7 prikazane su lukovice (n = 10) izložene destiliranoj vodi, a na slici 8 otopini BPA u koncentraciji 50 mg/L. Na slikama je jasno vidljivo da je 72-satna izloženost otopini BPA (50 mg/L) u odnosu na negativnu kontrolu (destilirana voda) značajno inhibirala produženi rast korjenčića luka što se posljedično odražava i na svježju masu korjenčića.



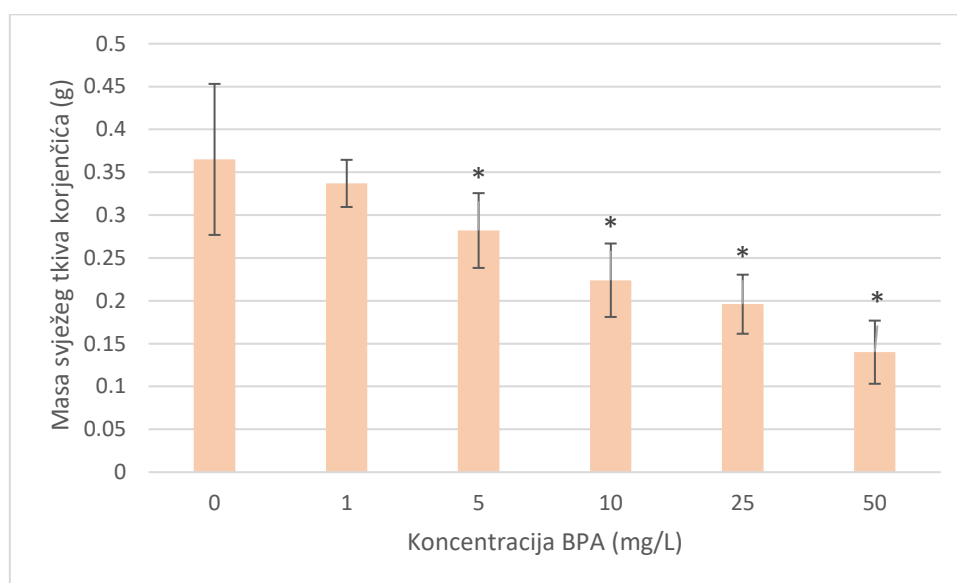
Slika 7. Lukovice luka nakon 72-satne izloženosti destiliranoj vodi (negativna kontrola, koncentracija BPA 0 mg/L)



Slika 8. Lukovice luka nakon 72-satne izloženosti otopini BPA koncentracije 50 mg/L

Nakon 72-satne izloženosti destiliranoj vodi (negativna kontrola) ili otopinama BPA u koncentracijskom rasponu 1-50 mg/L, odvojeni su korjenčići od lukovice te je izvagana masa svježeg tkiva korjenčića. Masa svježeg tkiva u izravnom je odnosu s rastom korjenčića i stoga predstavlja važan parametar u ispitivanju toksičnog djelovanja nekog spoja na korjenčiće (Fiskesjö, 1985).

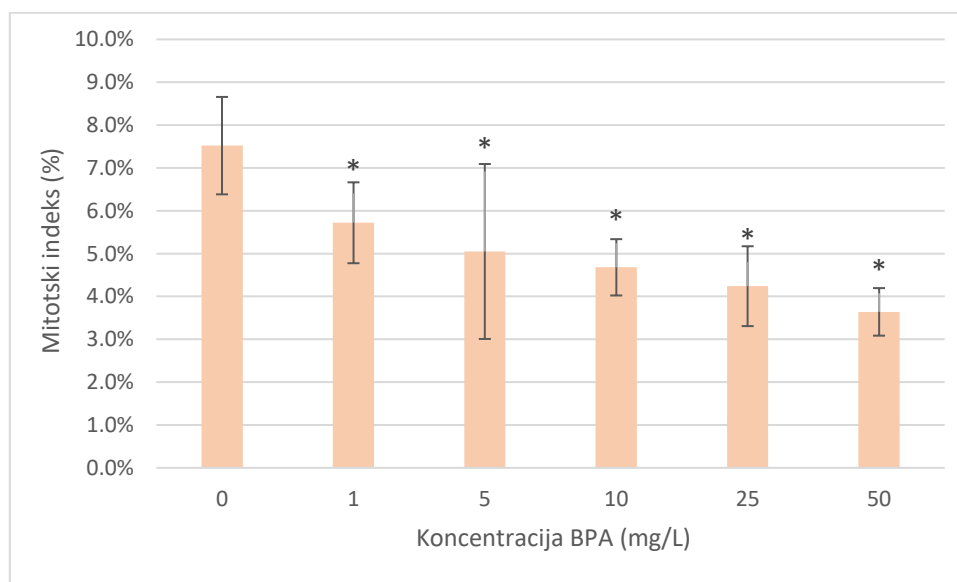
Rezultati mase svježega tkiva korjenčića prikazani su na slici 9. U ovome istraživanju korjenčići izloženi destiliranoj vodi (negativna kontrola) predstavljali su normalne fiziološke uvjete (Sacramento i sur., 2020). Iz rezultata se može očitati pad mase svježeg tkiva korjenčića izloženih rastućim koncentracijama otopina BPA u odnosu na negativnu kontrolu (destiliranu vodu). Nakon 72-satne izloženosti otopini BPA koncentracije 1 mg/L zabilježena je masa svježeg tkiva korjenčića luka od $0,337 \pm 0,028$ g što je niže od negativne kontrolne $0,365 \pm 0,088$, međutim nije statistički značajno ($P=0,374$). Daljnje sniženje mase svježega tkiva korjenčića zabilježeno je nakon 72-satne izloženosti otopini BPA u koncentraciji od 5 mg/L te je masa svježeg tkiva iznosila $0,282 \pm 0,044$ što je bilo značajno niže od negativne kontrole ($P < 0,05$). Najveći pad mase svježega tkiva korjenčića u odnosu na negativnu kontrolu zabilježen je nakon izloženosti otopini BPA u koncentraciji 50 mg/L te je masa svježeg tkiva iznosila $0,140 \pm 0,037$ g ($P < 0,05$). Iz ovih podataka može se zaključiti kako već i mala koncentracija ispitivanog spoja (1 mg/L) negativno utječe na rast korjenčića, a porastom koncentracije BPA smanjuje se masa svježeg tkiva korjenčića.



Slika 9. Masa svježeg tkiva korjenčića luka nakon 72-satne izloženosti BPA u rasponu koncentracija 1-50 mg/L; 0 - negativna kontrola, korjenčići izloženi destiliranoj vodi; * statistički značajno različito u odnosu na negativnu kontrolu, $P \leq 0,05$

4.2. Mitotski indeks meristemskih stanica korjenčića luka

Nakon 72-satne izloženosti destiliranoj vodi (negativna kontrola), mitotski indeks meristemskih stanica korjenčića luka bio je $7,5 \pm 0,01$ %, dok je nakon 72-satne izloženosti otopini BPA u koncentraciji 1 mg/L mitotski indeks iznosio $5,7 \pm 0,01$ %, što je bilo značajno niže od negativne kontrole ($P < 0,05$). Iz ovog rezultata se može zaključiti da se već i pri najmanjoj koncentraciji BPA (1 mg/L) iznos mitotskog indeksa smanjio za 1,8 % te da i male koncentracije BPA djeluju citotoksično na korjenčiće luka. Mitotski indeks nakon 72-satne izloženosti otopini BPA u koncentraciji od 5 mg/L iznosio je $5,1 \pm 0,02$ % što je također bilo niže od negativne kontrole ($P < 0,05$). Pri izloženosti otopini BPA u koncentraciji 5 mg/L zabilježena je i najveća standardna devijacija, no kako je ovo biološki pokus, takva odstupanja su prihvatljiva. Najmanji iznos mitotskog indeksa zabilježen je nakon 72-satne izloženosti otopini BPA koncentracije 50 mg/L ($3,6 \pm 0,01$ %) te se statistički razlikovao od mitotskog indeksa negativne kontrole ($P < 0,05$). Razlika u postocima između mitotskih indeksa nakon izloženosti otopini BPA koncentracije 50 mg/L i negativne kontrole (izloženost destiliranoj vodi) iznosi skoro 4 %. Smanjenje mitotskog indeksa s povećanjem koncentracije BPA pokazuje da BPA citotoksično djeluje na korjenčiće luka. Niži mitotski indeks nakon tretmana s BPA govori da je smanjen broj stanica u diobi.

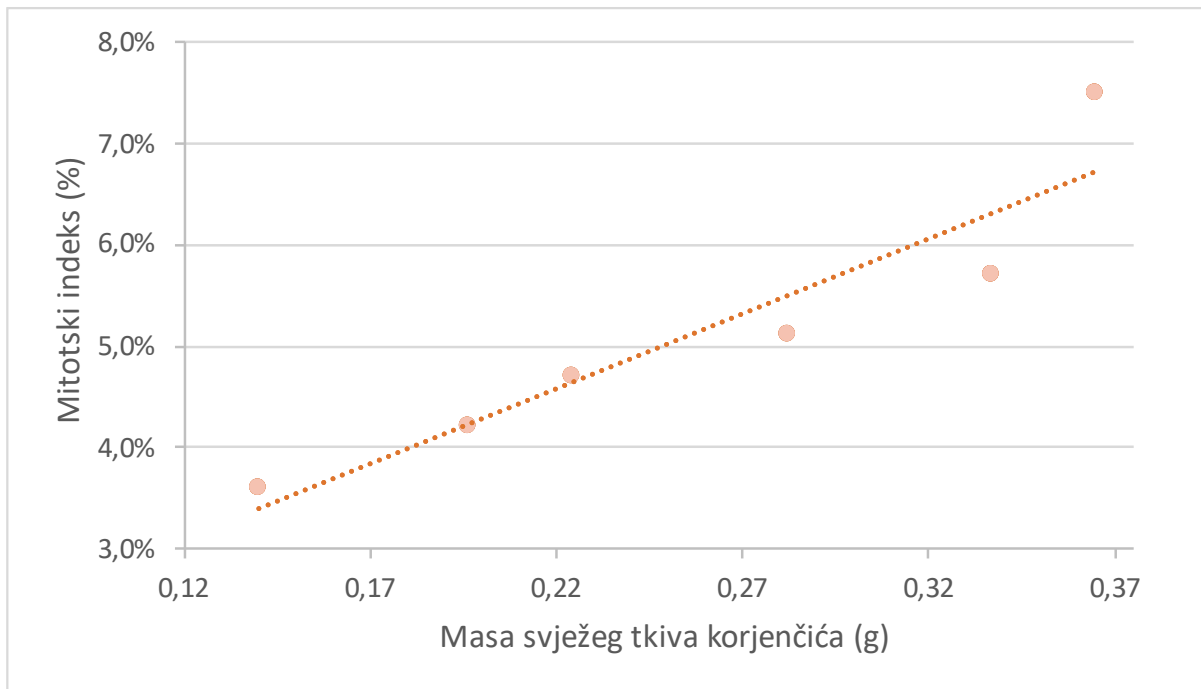


Slika 10. Mitotski indeks meristemskih stanica korjenčića luka nakon 72-satne izloženosti BPA u koncentracijskom rasponu 1-50 mg/L; 0 - negativna kontrola korjenčići izloženi destiliranoj vodi; * statistički značajno različito od negativne kontrole, $P \leq 0,05$

4.3. Korelacija rezultata mase svježeg tkiva korjenčića i mitotskog indeksa

Pearsonov koeficijent korelacije koristi se za određivanje linearne povezanosti između dviju varijabli pri čemu $r = 1$ znači potpunu pozitivnu korelaciju, a vrijednost $r = -1$ znači potpunu negativnu korelaciju. Ova korelacija izračunata je kako bi se utvrdilo postoji li povezanost između mase svježeg tkiva i mitotskog indeksa.

Pomoću Pearsonovog kalkulatora (u statističkom programu *Social Science Statistic*) izračunata je vrijednost Pearsonovog koeficijenta koji iznosi $r = 0,9348$ što ukazuje na pozitivnu korelaciju između dva mjerena parametra. Stoga se može zaključiti da je mitotski indeks ovisan o fitotoksičnosti, a parametar fitotoksičnosti je masa svježeg tkiva. Statistička značajnost iznosi $P = 0,0046$ što odgovara vrijednostima $P < 0,005$.

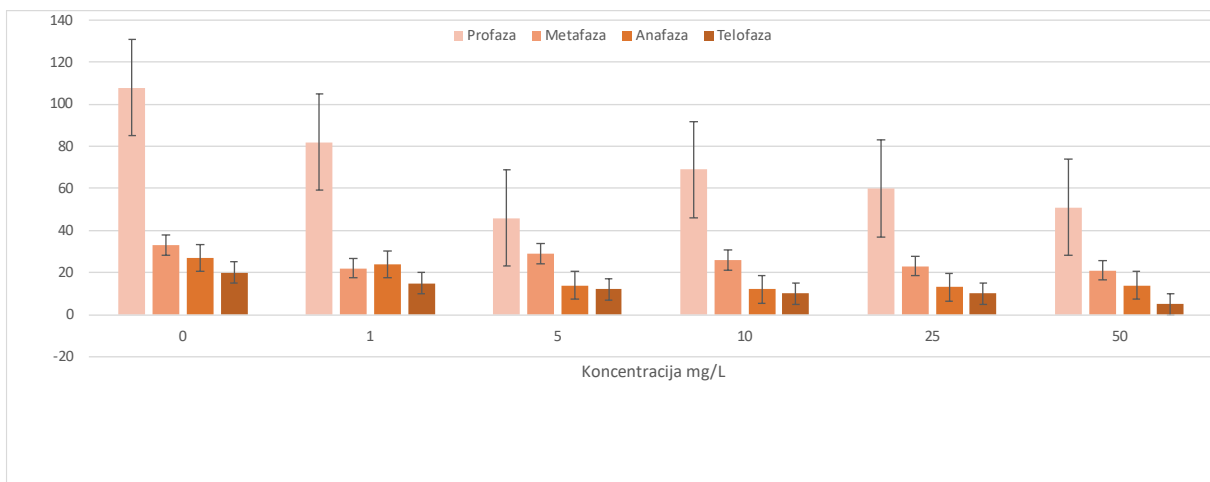


Slika 11. Korelacija dobivenih rezultata mase svježeg tkiva korjenčića i mitotskog indeksa

4.4. Učestalost pojedinih faza staničnog ciklusa

O mitotskom indeksu ovisi učestalost pojedinih faza staničnog ciklusa. Naime, što je manji mitotski indeks, manja je i pojavnost stanica u diobi i obrnuto. Na svakom od pregledanih

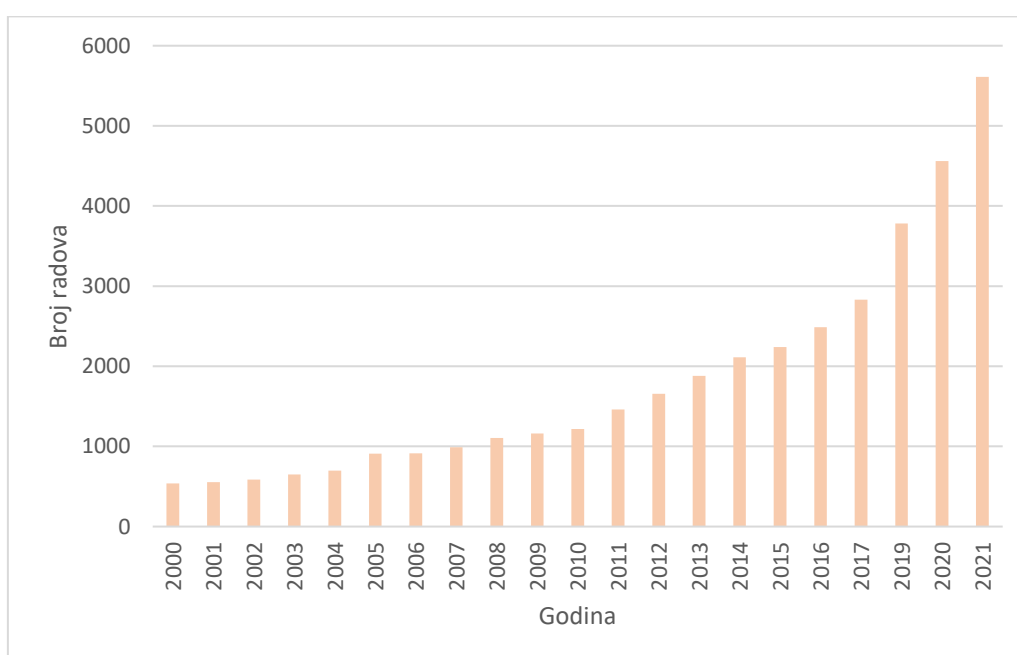
preparata najveća je zastupljenost profaze što ukazuje da je dioba stanica zaustavljena (pomoću fiksativa) na samom početku. Na slici 12 vidljivo je da je zastupljenost telofaze najveća u negativnoj kontroli (izloženost destiliranoj vodi), a najmanja pri koncentraciji BPA od 50 mg/L. Određivanjem učestalosti faza, može se odrediti „napredovanje“ stanica unutar ciklusa. Sukladno tomu, stanice su se najviše dijelile i napredovale unutar ciklusa u negativnoj kontroli (izloženost destiliranoj vodi). Iz rezultata je vidljivo da BPA svojim citotoksičnim djelovanjem onemogućava dijeljenje stanicama i usporava diobu stanica. Iz toga se može zaključiti da BPA štetno djeluje na diobu stanica korjenčića luka, a samim time i na korjenčiće.



Slika 12. Učestalost pojedinih faza staničnog ciklusa meristemskih stanica korjenčića luka nakon 72-satne izloženosti otopinama BPA u koncentracijskom rasponu 1-50 mg/L; 0 - negativna kontrola, tretman s destiliranom vodom

5. RASPRAVA

Još od kraja 20. stoljeća provode se brojna istraživanja na različitim organizmima i staničnim kulturama o učinku BPA, a broj objavljenih istraživanja u konstantnom je porastu. Na slici 13 prikazan je broj objavljenih znanstvenih radova koji su proučavali toksičnost BPA u razdoblju od 2000.-2021. godine prema bazi podataka *Science Direct* (www.sciencedirect.com). Najveći broj studija je ispitivao štetno djelovanje BPA na laboratorijskim životinjama (*in vivo* modeli) te na kulturama animalnih stanica (*in vitro* modeli).



Slika 13. Prikaz broja objavljenih radova koji su istraživali toksičnost BPA u razdoblju 2000.-2021. godine prema bazi *Science Direct*

Epidemiološke studije pokazuju da je izloženost BPA sveprisutna kod ljudi, a utvrđeno je prisustvo BPA u krvi, krvnom serumu i urinu (Markham i sur., 2010) te u majčinom mlijeku (Sun i sur., 2004). BPA je nađen u alkoholnim i bezalkoholnim pićima, gotovim jelima (Sungur i sur., 2014), plastičnim i dječjim bocama (Brede i sur., 2003) te papiru (Gao i sur., 2013). Kako bi se zaštitilo zdravlje ljudi, zbog postojećih dokaza o štetnom učinku BPA na zdravlje čovjeka, važno je pratiti razinu BPA, ali i provoditi epidemiološke studije kako bi se što bolje povezala izloženost ljudi BPA sa štetnim učinkom BPA na ljudsko zdravlje (Rochester, 2013). Također,

važno je provoditi istraživanja na animalnim modelima, ali i drugim modelima kako bi se utvrdio mehanizam toksičnog djelovanja BPA.

Najveću opasnost BPA predstavlja za fetus i novorođenčad. Naime, epidemiološke studije su pokazale da djeca kod čijih je majki pronađena visoka koncentracija BPA u krvi, imaju dva puta veću vjerojatnost pojave poteškoća u disanju, astme, bronhitisa, alergija i infekcija. Izloženost BPA može dovesti i do kromosomskih poremećaja kod fetusa te je tako moguća pojava primjerice Downovog sindroma (Rykowska i Wasiak, 2006). Iako toksično djelovanje BPA ima najviše utjecaja na fetus i djecu jer su najosjetljiviji, pokazalo se da visoke koncentracije BPA mogu dovesti do razvoja određenih bolesti i kod odrasle populacije poput dijabetesa, bolesti srca, pretilosti, poremećaja reproduktivnog sustava i oštećenja jetre (Lang i sur., 2008). Kako bi se zaštitilo zdravlje djece, od 2018. godine Europska unija zabranila je upotrebu BPA u proizvodima od plastike za djecu do 3 godine starosti (www.compliancegate.com).

Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati toksično djelovanje BPA na korjenčiće luka korištenjem *Allium* testa. To je pristupačan i jednostavan test za izvođenje s velikom osjetljivošću. Ukoliko se *Allium* testom dokaže da ispitivana kemikalija (u ovom slučaju BPA) ima fitotoksični, citotoksični ili genotoksični učinak na meristemske stanice korjenčića luka, ti rezultati trebaju se smatrati kao upozorenje da testirana kemikalija predstavlja rizik za okoliš, ali i ljudsko zdravlje (Fiskesjö, 1985). Pokazana je jako dobra korelacija između rezultata dobivenih *Allium* testom i onih dobivenih na animalnom staničnom modelu (Firbas i Amon, 2014). Također, korjenčići luka su živi sustav te imaju enzime koji mogu metabolizirati i tako aktivirati spoj za razliku od animalnih stanica uzgojenih *in vitro* koje su većinom izgubile neke karakteristike tkiva iz kojega su dobivene (Fiskesjö, 1985).

Prije samog ispitivanja, kako bi se odredile koncentracije za ispitivanje toksičnog učinka BPA, provedeno je preliminarno istraživanje u kojem je ispitan učinak BPA u dvije koncentracije 1 mg/L i 100 mg/L. Utvrđeno je da je BPA u koncentraciji 100 mg/L izrazito toksičan za korjenčiće luka (dužina korjenčića i masa svježeg tkiva bili su manji za više od 50 % od negativne kontrole). Stoga je za daljnja ispitivanja kao najviša koncentracija BPA odabrana koncentracija 50 mg/L. Modelni organizam izložen je otopinama BPA u koncentracijama 1, 5, 10, 25, 50 mg/L. Za svaku koncentraciju korišteno je 10 lukovica. Kao negativna kontrola služila je destilirana voda, odnosno korjenčići 10 lukovica izloženih destiliranoj vodi što je oponašalo fiziološke uvjete rasta (Sacramento i sur, 2020). Nakon 72-

satne izloženosti BPA, kao parametar fitotoksičnosti izmjerena je masa svježeg tkiva korjenčića. Potom su po tri korjenčića svake od po 5 lukovica po tretmanu stavljena u otopinu fiksativa kako bi se zaustavila dioba stanica. Korjenčići su potom obojani orceinom te je pripremljen mikroskopski preparat. U tim je korjenčićima kao parametar citotoksičnosti određen mitotski indeks metodom prema Sehgalu i sur. (2006). Također, određena je učestalost pojedinih faza staničnog ciklusa na promatranom preparatu kako bi se odredilo napredovanje stanica unutar staničnog ciklusa.

Rezultati ovoga istraživanja pokazali su da je BPA izrazito fitotoksičan te je već u koncentraciji od 5 mg/L značajno smanjio svježu masu korjenčića. Povećanjem koncentracije BPA, došlo je do dodatnog smanjenja mase, a najveći pad mase zabilježen je pri koncentraciji BPA od 50 mg/L. Također izloženost korjenčića luka BPA dovela je do značajnog smanjenja mitotskog indeksa meristemskih stanica što pokazuje da je BPA imao citotoksičan učinak na meristemske stanice korjenčića luka. Broj stanica u diobi između kontrole i tretmana s BPA u koncentraciji 50 mg/L smanjio se za oko 4 %. Kako je učestalost faza ciklusa povezana i s brojem stanica koje se nalaze u diobi, odnosno mitotskim indeksom, zabilježen je i pad učestalosti svake pojedine faze povećanjem koncentracije BPA u odnosu na negativnu kontrolu. Taj rezultat također ukazuje na citotoksično djelovanje BPA na meristemske stanice korjenčića.

Dobivene rezultate treba razmotriti i s obzirom na fitokemijski sastav luka. Luk je sesilni organizam, a kako bi se obranio od različitih štetočina i njihovih toksina sposoban je sam sintetizirati niz fitokemikalija za koje je pokazano da imaju antibakterijsko i antioksidativno djelovanje poput vitamina C, vitamina E, karotena, kvercetina i izotiocijanata (Lešić i sur., 2002). Osim ovih važnih spojeva, u luku se u tragovima nalaze mikroelementi (bor, aluminij, željezo) i makroelementi (kalij, kalcij, sumpor, magnezij). Usprkos prisustvu fitokemikalija, mikro i makroelemenata, koji luku služe u „obrani“ od štetnog djelovanja vanjskih čimbenika, u ovom je istraživanju zabilježen toksičan učinak BPA. To dodatno daje na važnosti dobivenim rezultatima i ukazuje na opasnost koju predstavlja BPA za ljudsko zdravlje.

I drugi su istraživači ispitali učinak BPA na biljnome modelu. Tako je Al-Hiyasat (2017) ispitao utjecaj BPA na klijanje, razvoj korijena i omjer klorofila a i b kod povrtne leće (*Lens culinaris* Medik.). Rezultati tog istraživanja pokazali su kako BPA u koncentracijama od 10, 50 i 100 mg/L inhibira klijanje i razvoj korijena povrtne leće te uzrokuje povećanje omjera klorofila a i b. Ovi rezultati pokazuju da bi BPA zbog utjecaja na klijanje, razvoj korijena i

omjer klorofila a i b u povrtne leće mogao predstavljati značajnu opasnost na razvoj ne samo povrtne leće već i ostalih biljaka.

Utjecaj BPA na klijanje, razvoj korijena i citogenetičke promjene (mitotski indeks i kromosomske aberacije) ispitan je i na grašku (*Pisum sativum* L.) (Siddiqiui i sur., 2021). U tom istraživanju već je 24-satni tretman s BPA smanjio dužinu korjenčića graška te inhibirao klijanje sjemenki ove vrste što potvrđuje fitotoksično djelovanje BPA. Sve ispitivane koncentracije BPA (2-25 mg/L) dovele su do smanjenja mitotskog indeksa nakon 24-satne izloženosti, a s povećanjem koncentracije BPA, povećao se i broj kromosomskih aberacija (što ukazuje na genotoksično djelovanje BPA). Fitotoksičan učinak BPA te sniženje mitotskog indeksa u meristemskim stanicama korjenčića graška nakon izloženosti BPA u skladu je s rezultatima ovoga istraživanja.

Provedeno je i istraživanje učinka BPA (u koncentraciji 50 mg/L) na organizaciju interfaznog i mitotičkog niza mikrotubula u meristemskim stanicama korjenčića luka (*A. cepa*) i durum pšenice (*Triticum turgidum ssp. durum* Desf.) (Adamakis i sur., 2019). Dvodnevni tretman u stanicama luka rezultirao je zamjenom kortikalnih mikrotubula prstenastim, a u durum pšenici fragmentacijom kortikalnih mikrotubula. Također, došlo je do poremećaja mitotičkih nizova mikrotubula u obje vrste. Ovi rezultati pokazuju da BPA utječe na mitozu/citokinezu narušavajući organizaciju mikrotubula, a time i na formiranje diobenog vretena.

Istraživanje provedeno u sklopu ovog diplomskog rada u skladnosti je s navedenim istraživanjima te je potvrđeno citotoksično i fitotoksično djelovanje BPA na korjenčiće luka kako u visokim tako i u nižim koncentracijama, što bi svakako trebalo uzeti u obzir za daljnja istraživanja o toksičnom djelovanju ove kemikalije oko koje se „lome koplja“.

6. ZAKLJUČCI

Nakon provedenog istraživanja u kojem je ispitan fitotoksični (masa svježeg tkiva korjenčića) i citotoksični (mitotski indeks i učestalost pojedinih faza staničnog ciklusa) učinak BPA na korjenčiće luka može se zaključiti:

1. 72-satna izloženost BPA u koncentracijama 1-50 mg/L dovela je do smanjenja mase svježeg tkiva korjenčića u odnosu na kontrolu (destilirana voda) te se može zaključiti da BPA ima fitotoksično djelovanje na korjenčiće luka.

2. 72-satna izloženost BPA uzrokovala je smanjenje mitotskog indeksa meristemskih stanica korjenčića luka u odnosu na kontrolu (destilirana voda) iz čega proizlazi da BPA djeluje citotoksično na meristemske stanice vrška korjenčića luka.

3. Učestalost pojedinih faza staničnog ciklusa s povećavanjem koncentracije BPA se smanjivala u odnosu na kontrolu (destilirana voda), a pri najvećoj koncentraciji BPA (50 mg/L) bila je najmanja zastupljenost stanica u telofazi te se može zaključiti da BPA štetno djeluje na diobu meristemskih stanica vrška korijena luka.

Dobiveni rezultati ukazuju na fitotoksično i citotoksično djelovanje BPA na korjenčiće luka kako u visokim tako i u nižim koncentracijama spoja što svakako treba uzeti u obzir u daljnjim istraživanjima.

7. SAŽETAK / SUMMARY

Sažetak

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati fitotoksični i citotoksični učinak bisfenola A (BPA) na korjenčiće običnog luka (*Allium cepa* L.). *Allium* test je osjetljiv test koji omogućuje praćenje fitotoksičnosti (masa svježega tkiva korjenčića) i citotoksičnosti (mitotski indeks i učestalost pojedine faze staničnog ciklusa) nekoga spoja. Korjenčići lukovica luka (n = 10) su nakon 48-satnog naklijavanja u destiliranoj vodi izloženi ili otopinama BPA (u koncentracijskom rasponu 1-50 mg/L) ili destiliranoj vodi (negativna kontrola) kroz 72 sata. Nakon 72-satne izloženosti otopinama BPA ili destiliranoj vodi, korjenčićima svake od lukovica je izvagana masa svježeg tkiva, a u meristemskim stanicama korjenčića luka određen je mitotski indeks i učestalost pojedinih faza staničnog ciklusa. Mitotski indeks određen je kao postotak stanica koje se nalaze u diobi u odnosu na ukupan broj izbrojanih stanica po korjenčiću (n = 500). Dobiveni rezultati statistički su obrađeni korištenjem t-testa (*Excel, MS Office*).

Masa svježeg tkiva korjenčića tretiranih otopinama BPA (1-50 mg/L) bila je niža u odnosu na kontrolnu skupinu te se smanjivala povećanjem koncentracije BPA. Masa svježeg tkiva korjenčića bila je najniža nakon tretmana s BPA u koncentraciji 50 mg/L ($0,282 \pm 0,044$ g) što je bilo značajno niže u odnosu na negativnu kontrolu ($0,365 \pm 0,088$ g; $P < 0,05$). Povećanjem koncentracije BPA zabilježen je pad mitotskog indeksa u odnosu na negativnu kontrolu. Najmanja vrijednost mitotskog indeksa bila je pri koncentraciji BPA 50 mg/L ($3,6 \pm 0,01$ %) što je za 4 % manje u odnosu na negativnu kontrolu ($7,5 \pm 0,01$ %; $P < 0,05$). Učestalost pojedinih faza staničnog ciklusa pratila je promjene mitotskog indeksa te je pri većim koncentracijama BPA zabilježen i manji broj stanica u telofazi. Rezultati mitotskog indeksa dobro su korelirali s masom svježeg tkiva korjenčića ($r = 0,9348$; $P < 0,005$). Iz dobivenih rezultata ovog istraživanja može se zaključiti da BPA djeluje fitotoksično i citotoksično na stanice korjenčića luka.

Summary

The aim of this study was to explore phytotoxicity and cytotoxicity of bisphenol A (BPA) on roots of common onion (*Allium cepa* L.). *Allium* test is a very sensitive test that allows observations of phytotoxicity (roots fresh weight), and cytotoxicity (mitotic index and frequency of each phase of the cell cycle) of tested compound. After 48 hours of germination in distilled water, roots of onion bulbs (n = 10) were exposed to BPA (in concentration range 1-50 mg/L) or to distilled water (negative control) for 72 hours. After 72 hours of exposure to BPA or distilled water, the roots fresh weight per each bulb was weighted and in root meristem cells mitotic index and frequency of each phase of the cell cycle were determined. The mitotic index was calculated as the percentage of cells in division in relation to the total number of counted cells (n = 500). The statistical analysis of results was done by t-test (*Excel, MS Office*).

The fresh weight of roots exposed to BPA (1-50 mg/L) was lower in comparison to the negative control and decreased with increase of BPA concentration. The fresh weight of roots was the lowest after exposure to BPA in concentration 50 mg/L (0.282 ± 0.044 g) that was significant in comparison to negative control (0.365 ± 0.088 g; $P < 0.05$). With an increase in BPA concentration a decrease in the mitotic index was noted in comparison to negative control. The lowest value of the mitotic index was at BPA in concentration 50 mg/L (3.6 ± 0.01 %) that is approximately 4 % lower in comparison to negative control (7.5 ± 0.01 %; $P < 0.05$). The frequency of cells in each phase of the cell cycle followed the changes in the mitotic index, and with the increase of BPA concentration fewer cells in telophase were recorded. The results obtained for mitotic index correlated well with the root fresh weight ($r = 0.9348$; $P < 0.005$). From obtained results it can be concluded that BPA is phytotoxic and cytotoxic to onion root cells.

8. LITERATURA

Adamakis IS, Panteris E, Eleftheriou EP. Tubulin Acetylation Mediates Bisphenol A Effects on the Microtubule Arrays of *Allium cepa* and *Triticum turgidum*. *Biomolecules*, 2019, 9, 185.

Akingbemi BT, Sottas CM, Koulova AI, Klinefelter GR, Hardy MP. Inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen bisphenol A is associated with reduced pituitary luteinizing hormone secretion and decreased steroidogenic enzyme gene expression in rat Leydig cells. *Endocrinology*, 2004,145, 592-603.

Al-Hiyasat A. The Effect of Bisphenol A on Root Development and Chlorophyll a:b Ratio in *Lens culinaris*. *IJSBAR*, 2017, 34, 115-123.

Ballesteros-Gómez A, Rubio S, Pérez-Bendito D. Analytical methods for the determination of bisphenol A in food. *J Chromatogr A*, 2009, 1216, 449-469.

Bisphenol A, EU ban on baby bottles to enter into force tomorrow, 2011., https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/IP_11_664, pristupljeno 28.04.2022.

Bisphenol A, <https://www.sciencedirect.com/search?q=bisphenol%20A>, pristupljeno 02.05.2022.

Bisphenol A, <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/bisphenol>, pristupljeno 17.04.2022.

Bisphenol A (BPA) Regulations in the European Union: An Overview, 2020., <https://www.compliancegate.com/bisphenol-a-regulations-european-union/>, pristupljeno 15.05.2022.

Bisphenol A (BPA): Use in Food Contact Application, 2014., <https://www.fda.gov/food/food-additives-petitions/bisphenol-bpa-use-food-contact-application>, pristupljeno 01.06.2022.

Brede C, Fjeldal P, Skjevrak I, Herikstad H. Increased migration levels of bisphenol A from polycarbonate baby bottles after dishwashing, boiling and brushing. *Food Addit Contam*, 2003, 20, 684–689.

Cooper GM. Stanica: Molekularni pristup. Zagreb, Medicinska naklada, 2010, str. 603-606.

Crisp TM, Clegg ED, Cooper RL, Wood WP, Anderson DG, Baetcke KP, Hoffmann JL, Morrow MS, Rodier DJ, Schaeffer JE, Touart LW, Zeeman MG, Patel YM. Environmental endocrine disruption: An effects assessment and analysis. *Environ Health Perspect*, 1998, 106, 11–56.

Csanady GA, Oberste-Frielinghaus HR, Semder B, Baur C, Schneider KT, Filser JG. Distribution and unspecific protein binding of the xenoestrogens bisphenol A and daidzein. *Arch Toxicol*, 2002, 76, 299–305.

Eichenlaub-Ritter U, Pacchierotti F. Bisphenol a effects on mammalian oogenesis and epigenetic integrity of oocytes: A case study exploring risks of endocrine disrupting chemicals. *BioMed Res Int*, 2015, 2015, 698-795.

Ellahi M, Rashid M. Bisphenol A: Exposure and Health Risks, London, IntechOpen, 2017, str.143-147.

Firbas P, Amon T. Chromosome damage studies in the onion plant *Allium cepa* L. *Caryologia*, 2014, 67, 25-35.

Fiskesjö G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, 1985, 102, 99-112.

Flint S, Markle T, Thompson S, Wallace E. Bisphenol A exposure, effects, and policy: A wildlife perspective. *J Environ Manage*, 2012, 104, 19-34.

Gao L, Zou J, Liu H, Zeng J, Wang Y, Chen X. Determination of bisphenol A in thermal printing papers treated by alkaline aqueous solution using the combination of single-drop microextraction and HPLC. *J Sep Sci*, 2013, 36, 1298–1303.

Ginsberg G, Rice DC. Does rapid metabolism ensure negligible risk from bisphenol A? *Environ Health Perspect*, 2009, 117, 1639–1643.

Hirao-Suzuki M, Takeda S, Okuda K, Takiguchi M, Yoshihara S. Repeated Exposure to 4-Methyl-2,4-bis(4-hydroxyphenyl)pent-1-ene (MBP), an Active Metabolite of Bisphenol A, Aggressively Stimulates Breast Cancer Cell Growth in an Estrogen Receptor β (ER β)-Dependent Manner. *Mol Pharmacol*, 2019, 95, 260-268.

Hoekstra EJ, Simoneau C. Release of bisphenol A from polycarbonate – a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2013, 53, 386–402.

Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021. <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=37467>, pristupljeno 22. 5. 2022.

Huang YQ, Wong CKC, Zheng JS, Bouwman H, Barra R, Wahlström B, Neretin L, Wong, MH. Bisphenol A (BPA) in China: A review of sources, environmental levels, and potential human health impacts. *Environ Int*, 2012, 42, 91–99.

Hulina N. Više biljke – stablašice, Sistematika i gospodarsko značenje. *Agron Glas*, 2011, 73, 179-183.

Jalal N, Surendranath AR, Pathak JL, Yu S, Chung CY. Bisphenol A (BPA) the mighty and the mutagenic. *Toxicol Rep*, 2017, 5, 76-84.

Kang JH, Ri N, Kondo F. Streptomyces sp. strain isolated from river water has high bisphenol A degradability. *Lett Appl Microbiol*, 2004, 39, 178-180.

Kawamura Y, Koyama Y, Takeda Y, Yamada T. Migration of Bisphenol A from Polycarbonate Products. *J Food Hyg Soc Jpn*, 1998, 99, 206-212.

Kučić Grgić D, Kovačević A, Lovrinčić E, Očelić Bulatović V, Vuković Domanovac M. Biodegradation of bisphenol A in the environment. *Hrvatske vode*, 2019, 27, 1-6.

Lang IA, Galloway TS, Scarlet A, Henley WE, Depledge M, Wallace RB, Melzer D. Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *JAMA*, 2008, 300, 1303-1310.

Lešić R, Borošić J, Buturac I, Čustić M, Poljak M, Romić D. Povrćarstvo. Čakovec, Zrinski d.d., 2002, str. 164-166.

Mandić D. Toksikološke značajke bisfenola A-seminar iz kolegija Analitička toksikologija. Osijek, 2006.

Markham DA, Waechter JM, Wimber M, Rao N, Connolly P, Chuang JC, Hentges S, Shiotsuka RN, Dimond S, Chapelle AH. Development of a method for the determination of bisphenol A at trace concentrations in human blood and urine and elucidation of factors influencing method accuracy and sensitivity. *J Anal Toxicol*, 2010, 34, 293–303.

Morgan D. Cell Cycle: Principles of Control, London, New Science Press Ltd, 2007, str. 1- 9.

Moriyama K, Tagami K, Akamizu T. Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87, 5185-5190.

Murtić S. Praktikum fiziologije biljaka (interna skripta), Poljoprivredno-prehrambeni fakultet Univerziteta u Sarajevu, 2012.

Phases of the cell cycle, <https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/cell-communication-and-cell-cycle/cell-cycle/a/cell-cycle-phases>, pristupljeno 15.04.2022.

Rochester JR. Bisphenol A and human health: A review of the literature. *Reprod Toxicol*, 2013, 42, 132-155.

Rye C, Wise R, Jurukovski V, DeSaix J, Choi J, Avissar Y. Biology. Houston, Rice University, 2017, str. 273-279.

Rykowska I, Wasiak W. Properties, Threats, and methods of analysis of bisphenol A and its derivatives. *Acta chromatogr*, 2006, 16, 7-27.

Sacramento EB, Azevedo CA, Abreu ST, Borba HR, Lima VM. Evaluation of the cytotoxic and genotoxic potential of waters of the Paraíba do Sul River Basin - RJ through the *Allium cepa* test system. *Rev Ambient Água*, 2020, 15, 3-10.

Santhi VA, Sakai N, Ahmad ED, Mustafa AM. Occurrence of bisphenol A in surface water, drinking water and plasma from Malaysia with exposure assessment from consumption of drinking water. *Sci Total Environ*. 2012, 332, 427-428.

Satoh K, Ohyama K, Aoki N, Iida M, Nagai F. Study on anti-androgenic effects of bisphenol A diglycidyl ether (BADGE), bisphenol F diglycidyl ether (BFDGE) and their derivatives using cells stably transfected with human androgen receptors. *Food Chem Toxicol*, 2004, 42, 983–993.

Sehgal R, Roy S, Kumar VL. Evaluation of cytotoxic potential of latex of root model. *Biocell*, 2006, 30, 9-13.

Sharma AK, Sharma A. Chromosome techniques : theory and practice. London, Butterworth & Co, 1972, str. 97-111.

Siddiqui S, Al Amri SAM, Al Ghamdy HA, Alqahtani WSS, Alquyr SM, Yassin HM. Impact of Bisphenol A on seed germination, radicle length, cytogenetic alterations in *Pisum sativum* L. *Caryologia*, 2021, 74, 103-109.

Staples CA, Dorn PB, Klecka KM, O'Block ST, Harris LR. A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere*, 1998, 6, 2149-2173.

Sun Y, Irie M, Kishikawa N, Wada M, Kuroda N, Nakashima K. Determination of bisphenol A in human breast milk by HPLC with column-switching and fluorescence detection. *Biomed Chromatogr*, 2004, 18, 501–507.

Sungur S, Koroglu M, Ozkan A. Determination of bisphenol A migrating from canned food and beverages in market. *Food Chem*, 2014, 142, 87–91.

Vidaković- Cifrek Ž, Pevalek- Kolzina B, Tkalec M, Babić M, Radić- Brkanac S. Praktikum iz fiziologije bilja, skripta za internu upotrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu, 2014.

Wetherill YB, Akingbemi BT, Kanno J, McLachlan JA, Nadal A, Sonnenschein C, Watson CS, Zoeller RT, Belcher SM. In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reprod Toxicol*, 2007, 24, 178-198.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Citotoksični učinak bisfenola A na meristemske stanice korjenčića luka (*Allium cepa* L.)

Lucija Habljak

SAŽETAK

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati fitotoksični i citotoksični učinak bisfenola A (BPA) na korjenčiće običnog luka (*Allium cepa* L.). *Allium* test je osjetljiv test koji omogućuje praćenje fitotoksičnosti (masa svježega tkiva korjenčića) i citotoksičnosti (mitotski indeks i učestalost pojedine faze staničnog ciklusa) nekoga spoja. Korjenčići lukovica luka (n = 10) su nakon 48-satnog naklijavnja u destiliranoj vodi izloženi ili otopinama BPA (u koncentracijskom rasponu 1-50 mg/L) ili destiliranoj vodi (negativna kontrola) kroz 72 sata. Nakon 72-satne izloženosti otopinama BPA ili destiliranoj vodi, korjenčićima svake od lukovica je izvagana masa svježeg tkiva, a u meristemskim stanicama korjenčića luka određen je mitotski indeks i učestalost pojedinih faza staničnog ciklusa. Mitotski indeks određen je kao postotak stanica koje se nalaze u diobi u odnosu na ukupan broj izbrojanih stanica po korjenčiću (n = 500). Dobiveni rezultati statistički su obrađeni korištenjem t-testa (*Excel, MS Office*). Masa svježeg tkiva korjenčića tretiranih otopinama BPA (1-50 mg/L) bila je niža u odnosu na kontrolnu skupinu te se smanjivala povećanjem koncentracije BPA. Masa svježeg tkiva korjenčića bila je najniža nakon tretmana s BPA u koncentraciji 50 mg/L ($0,282 \pm 0,044$ g) što je bilo značajno niže u odnosu na negativnu kontrolu ($0,365 \pm 0,088$ g; $P < 0,05$). Povećanjem koncentracije BPA zabilježen je pad mitotskog indeksa u odnosu na negativnu kontrolu. Najmanja vrijednost mitotskog indeksa bila je pri koncentraciji BPA 50 mg/L ($3,6 \pm 0,01$ %) što je za 4 % manje u odnosu na negativnu kontrolu ($7,5 \pm 0,01$ %; $P < 0,05$). Učestalost pojedinih faza staničnog ciklusa pratila je promjene mitotskog indeksa te je pri većim koncentracijama BPA zabilježen i manji broj stanica u telofazi. Rezultati mitotskog indeksa dobro su korelirali s masom svježeg tkiva korjenčića ($r = 0,9348$; $P < 0,005$). Iz dobivenih rezultata ovog istraživanja može se zaključiti da BPA djeluje fitotoksično i citotoksično na stanice korjenčića luka.

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

Rad sadrži: 34 stranica, 13 grafička prikaza, 1 tablicu i 51 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: bisfenol A, *Allium* test, fototoksičnost, citotoksičnost, mitotski indeks

Mentor: **Dr. sc. Ana-Marija Domijan**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ana-Marija Domijan**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Željko Maleš, redoviti profesor u trajnome zvanju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Daniela Jakšić, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: srpanj 2022.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

Cytotoxic effect of bisphenol A on onion (*Allium cepa* L.) root meristem cells

Lucija Habljak

SUMMARY

The aim of this study was to explore phytotoxicity and cytotoxicity of bisphenol A (BPA) on roots of common onion (*Allium cepa* L.). *Allium* test is a very sensitive test that allows observations of phytotoxicity (roots fresh weight), and cytotoxicity (mitotic index and frequency of each phase of the cell cycle) of tested compound. After 48 hours of germination in distilled water, roots of onion bulbs (n = 10) were exposed to BPA (in concentration range 1-50 mg/L) or to distilled water (negative control) for 72 hours. After 72 hours of exposure to BPA or distilled water, the roots fresh weight per each bulb was weighted and in root meristem cells mitotic index and frequency of each phase of the cell cycle were determined. The mitotic index was calculated as the percentage of cells in division in relation to the total number of counted cells (n = 500). The statistical analysis of results was done by t-test (*Excel, MS Office*). The fresh weight of roots exposed to BPA (1-50 mg/L) was lower in comparison to the negative control and decreased with increase of BPA concentration. The fresh weight of roots was the lowest after exposure to BPA in concentration 50 mg/L (0.282 ± 0.044 g) that was significant in comparison to negative control (0.365 ± 0.088 g; $P < 0.05$). With an increase in BPA concentration a decrease in the mitotic index was noted in comparison to negative control. The lowest value of the mitotic index was at BPA in concentration 50 mg/L (3.6 ± 0.01 %) that is approximately 4 % lower in comparison to negative control (7.5 ± 0.01 %; $P < 0.05$). The frequency of cells in each phase of the cell cycle followed the changes in the mitotic index, and with the increase of BPA concentration fewer cells in telophase were recorded. The results obtained for mitotic index correlated well with the root fresh weight ($r = 0.9348$; $P < 0.005$). From obtained results it can be concluded that BPA is phytotoxic and cytotoxic to onion root cells.

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

Thesis includes: 34 pages, 13 figures, 1 tables and 51 references. Original is in Croatian language.

Keywords: bisphenol A, *Allium* test, phytotoxicity, cytotoxicity, mitotic index

Mentor: **Ana-Marija Domijan, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ana-Marija Domijan, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Željko Maleš, Ph.D. Distinguished Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Daniela Jakšić, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2022.