

Određivanje fitotoksičnosti i genotoksičnosti bisfenola A na luku (*Allium cepa* L.)

Šiniković, Miriam

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:163:192724>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



Repository / Repozitorij:

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



Miriam Šiniković

**Određivanje fitotoksičnosti i genotoksičnosti
bisfenola A na luku (*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. Ane-Marije Domijan sa Zavoda za farmaceutsku botaniku Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i dr. sc. Gorana Gajskog iz Jedinice za mutagenezu s Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada. Istraživanje je provedeno u sklopu bilateralnog hrvatsko-slovenskog znanstveno-istraživačkog projekta „Toksikološki profil i interakcije bisfenola A i njegovih analoga“ (BI-HR/20-21-019) financiranog iz sredstava Ministarstva znanosti i obrazovanja.

Neizmerno zahvaljujem profesorici i svojoj mentorici prof. dr. sc. Ani-Mariji Domijan kao i višem znanstvenom suradniku Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada dr. sc. Goranu Gajskom na velikoj pomoći, razumijevanju i dostupnosti tokom pisanja ovog diplomskog rada. Također zahvaljujem svojim roditeljima i najboljim kolegicama koje su mi pružile potporu tokom cijelog studija i bez kojih danas ne bih bila tu gdje jesam.

Sadržaj

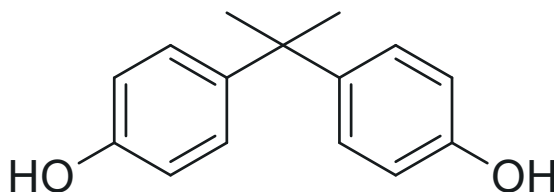
1. UVOD	1
1.1 Bisfenol A.....	2
1.1.1 BPA u okolišu	3
1.1.2 Mehanizam djelovanja BPA na životinje i ljude.....	3
1.1.3 Zakoni u EU koji uključuju BPA	4
1.2 <i>Allium</i> test.....	5
1.3 Kromosomska oštećenja	6
2. OBRAZLOŽENJE TEME	8
3. MATERIJALI I METODE	10
3.1 Materijali	11
3.1.1 Kemikalije	11
3.1.2 Oprema	11
3.1.3 Modelni organizam - obični luk	11
3.2 Metode.....	12
3.2.1 Biološki pokus.....	12
3.2.1.1 Priprema otopina BPA.....	12
3.2.1.2 Postupak provođenja biološkog pokusa	13
3.2.2 Makroskopska analiza korjenčića	14
3.2.3 Mikroskopska analiza korjenčića	14
3.2.3.1 Priprema otopina za mikroskopsku analizu.....	14
3.2.3.2 Priprema mikroskopskog preparata	15
3.3 Statistička obrada rezultata.....	16
4. REZULTATI I RASPRAVA	17
4.1 Duljina korjenčića luka.....	18
4.2 Izgled korjenčića luka.....	19
4.3 Kromosomska oštećenja u meristemskim stanicama luka	21
4.4 Mikronukleus u meristemskim stanicama luka	23
5. ZAKLJUČCI.....	26
6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA.....	28
7. LITERATURA	30
8. SAŽETAK/SUMMARY.....	34
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD	

1.UVOD

1.1 Bisfenol A

Bisfenoli su skupina fenolnih organskih spojeva u koju spadaju: bisfenol A (BPA), bisfenol B, bisfenol C, bisfenol S, bisfenol F i bisfenol AF. BPA prvi je sintetizirao ruski kemičar Aleksandr Pavlovič Dianin 1891. godine u reakciji acetona i fenola uz prisutnost kiselog katalizatora. BPA ili 2,2-bis (4-hidroksifenil) bijela je organska krutina kemijske formule $C_{15}H_{16}O_2$ koja se sastoji od dvije fenolne funkcionalne skupine (Kim i sur., 2019; Rogers, 2021) (Slika 1).

U pedesetim godinama 20. stoljeća otkriveno je da BPA u reakciji s fosgenom kao rezultat daje, danas vrlo poznate, polikarbonate koji se od tada koriste u izradi plastike (Rogers, 2021). U današnje doba BPA se koristi u proizvodnji plastike, polikarbonata, epoksi smola, termalnog papira, kuhinjskog pribora, igračaka i mnogih drugih materijala koji su dio svakodnevne upotrebe (Kim i sur., 2019).



Slika 1. Strukturna formula BPA.

Razlog njegove široke uporabe u industriji polikarbonata i epoksi smola njegove su karakteristike koje u kombinaciji s ostalim sastavnicama daju dobra svojstva materijalu, poput adhezivnosti, što omogućava spajanje raznih materijala poput drva, metala, stakla i keramike (Rudawska, 2021). Polikarbonatna plastika izrađena od BPA vrlo je visoke čvrstoće i tako pruža zaštitu predmetu od razbijanja pri padu ili udaru te mu daje stabilnost pri visokim temperaturama čime se omogućava zagrijavanje i u mikrovalnoj. Zbog navedenih svojstava, pogotovo čvrstoće i otpornosti pri jakom udaru, koristi se pri izradi motociklističkih kaciga, zaštitnih naočala i štitnika za lice te prozora otpornih na metke (Rogers, 2021). Ljudi su najviše u doticaju s BPA preko ambalaže za hranu i piće s kojom se svakodnevno susreću. Dokazano je da BPA može, pod utjecajem viših temperatura,

prijeći iz ambalaže u hranu ili piće i tako „ući“ u ljudski organizam i naštetiti ljudskom zdravlju (Kučić Grgić i sur., 2019).

Početkom 21. stoljeća proizvodnja BPA bila je masovna. Godišnje se proizvelo 2,7 milijardi kilograma BPA, a za čak trećinu te proizvodnje bile su odgovorne Sjedinjene Američke Države (SAD). S obzirom da su i ljudi u doticaju s BPA, razina BPA u ljudi kreće se ispod 50 µg/kg dnevno, što je zapravo i maksimalna dozvoljena količina BPA prema američkoj Agenciji za zaštitu okoliša (EPA, engl. *Environmental Protection Agency*) (Rogers, 2021).

1.1.1 BPA u okolišu

Zbog uporabe BPA u predmetima široke potrošnje, BPA je sveprisutan u okolišu te se u njemu i nakuplja. Pokazano je da se ipak male koncentracije BPA mogu ukloniti iz okoliša fotorazgradnjom zbog njegove fotonestabilnosti te mikroorganizmima. Njegovo prisustvo utvrđeno je u morima, rijekama i tlu gdje dospijeva prilikom transporta, kemijske proizvodnje, spaljivanjem otpada kao i nepravilnim odlaganjem plastičnih boca. Koncentracije BPA u vodama variraju, no u većini površinskih voda koncentracija mu je manja od 1 mg/L (Kučić Grgić i sur., 2019). Njegova koncentracija u atmosferi varira ovisno o području na kojem je mjerena. Prema nekim mjerenjima u Njemačkoj je izmjerena koncentracija BPA od 5 do 15 pg/m³ zraka, na području iznad Japana 10 do 1920 pg/m³, dok je najviša koncentracija BPA izmjerena na području Indije te je iznosila 4,55 ng/m³ zraka. Zbog izloženosti životinja i biljaka, akumulaciji u okolišu i prelaskom iz ambalaže, BPA je prisutan i u hrani. Tako su u mesnim proizvodima izmjerene koncentracije BPA od 0,49–56 g/kg, ribi od 7,1–102,7 g/kg, voću i povrću od 11,0–95,3 g/kg te u žitaricama od 1,0–3,8 g/kg (Michałowicz, 2014).

1.1.2 Mehanizam djelovanja BPA na životinje i ljude

BPA može ući u životinjski ili ljudski organizam preko probavnog sustava, inhalacijom ili se može apsorbirati preko kože, a najviše se apsorbira u probavnom sustavu (Zhang i sur., 2019). Nakon ulaska u organizam, BPA može različitim mehanizmima ispoljavati svoj toksični učinak. Jedan od utvrđenih mehanizama je taj da BPA uzrokuje povećano stvaranje

reaktivnih kisikovih spojeva (ROS, engl. *reactive oxygen species*), odnosno uzrokuje oksidativni stres koji može dovesti do oštećenja lipida, proteina i molekule DNA te posljedično do stanične smrti (Kim i sur., 2019). Pokazano je da BPA dovodi do disbalansa antioksidativnog sustava odnosno inhibira aktivnost antioksidativnih enzima kao što je glutation-peroksidaza, te na razini genoma dovodi do smanjenja ekspresije gena za antioksidanse (Zhang i sur., 2019). Također, BPA uzrokuje disfunkciju mitohondrija kao i generiranje upalnog odgovora svojim sudjelovanjem u brojnim signalnim putevima stanica imunskog sustava što rezultira povećanjem broja upalnih citokina kao što su interleukin 6 i faktora tumorske nekroze alfa, a smanjenjem broja protuupalnih citokina (Kim i sur., 2019; Michałowicz, 2014). Jedan od njegovih najvažnijih mehanizama djelovanja je vezanje na receptore hormona poput androgena, estrogena, progesterona i receptora hormona štitnjače čime uzrokuje hormonalni disbalans. BPA zapravo djeluje kao prirodni 17β estradiol. Posljedično BPA uzrokuje promjenu aktivnosti tih hormonskih receptora što dovodi do brojnih poremećaja reproduktivnog, endokrinog, respiratornog i živčanog sustava. Njegovi metaboliti imaju puno veću estrogenu aktivnost što može rezultirati preuranjenim pubertetom, nemogućnošću oplodnje, disfunkcijom jajnika, nižom porođajnom masom i preuranjenim rođenjem djeteta. Povećanom izloženosti BPA povećava se rizik pretilosti, jetrene disfunkcije, kardiovaskularnih bolesti te reproduktivni poremećaji (Kim i sur., 2019). Pokazan je negativan utjecaja BPA na fetus zbog mogućeg prelaska BPA kroz posteljicu do ploda, što može dovesti do pobačaja ili genetskog poremećaja djeteta (Kučić Grgić i sur., 2019). Također izloženost BPA povezuje se s razvojem diabetes mellitusa zbog utjecaja BPA na aktivnost inzulina (Kim i sur., 2019).

1.1.3 Zakoni u EU koji uključuju BPA

Uporaba BPA se zbog njegove toksičnosti i navedenih rizika za ljudsko zdravlje u Europskoj Uniji (EU, engl. *European Union*) ograničila. REACH (engl. *Registration, Evaluation, Authorization, and Restriction of Chemicals*) je regulativa EU koja se bavi zabranom uporabe određenih kemijskih supstanci u proizvodima namijenjenim potrošačima u svrhu očuvanja zdravlja i okoliša. 2017. godine BPA svrstan je na popis posebno zabrinjavajućih tvari (SVHC, engl. *Substances of very high concern*) u kategoriju 1B zbog rizika reprotoksičnosti i poremećaja endokrinog sustava. Tom kategorizacijom, BPA podliježe zakonu koji nalaže da njegova količina ne smije biti veća od 0,1% ukupne težine

proizvoda. Direktivom o sigurnosti dječjih igraćaka (engl. *Toy safety directive*) u EU (*Appendix C* prema *Annex II*), uvedena je odredba koja nalaže da za sve dječje igračke namijenjene za stavljanje u usta ili namijenjene za djecu mlađu od 3 godine, otpuštanje BPA ne smije biti veće od 0,04 mg/L. Dana 1. svibnja 2011., prema *Annexu I* Uredbe Komisije (EU) No 10/2011, zabranila se uporaba BPA u proizvodnji plastičnih bočica za novorođenčad, a od 1. lipnja 2011. zabranila se uporaba BPA u proizvodnji plastičnih boca za novorođenčad i djecu mlađu od 3 godine. Odredbom od 2. siječnja 2020. Europske kemijske agencije (ECHA, engl. *European Chemicals Agency*) i REACH-a, zabranjuje se koncentracija BPA veća ili jednaka od 0,02% u termalnom papiru. EU pod Uredbom Europske Unije 10/2011/EU (engl. *Regulation*) dozvoljava uporabu BPA u materijalima koji dolaze u doticaj s hranom, no količina ne smije biti veća od 0,05 mg/kg. Prema dostupnim informacijama EFSA (engl. *The European Food Safety Authority*) razmatra uvođenje novih restrikcija od 2022. godine koje obuhvaćaju nove smjernice za proizvodnju spremnika za hranu i piće (<https://echa.europa.eu/hr/home>).

1.2 *Allium* test

Allium test jedan je od najpouzdanijih bioloških testova te se koristi za praćenje zagađenja okoliša i procjene genotoksičnosti različitih spojeva koji se mogu naći kao onečišćivači u okolišu (Tedesco i Laughinghouse, 2012). Pomoću *Allium* testa moguće je pratiti promjene makroskopskih (oblik, boja, dužina) i mikroskopskih (oštećenja molekule DNA, kromosomske aberacije, poremećaji u mitotskom ciklusu) parametara korjenčića luka (Leme i Marin-Morales, 2009). Testovi koji uključuju biljke prikladni su za istraživanja zbog lakog rukovanja i povoljne cijene, a s etičkog stajališta puno je prihvatljivije u odnosu na animalni model. Pored toga *Allium cepa* test izvrstan je model za *in vivo* ispitivanja pošto korjenčići rastu u izravnom kontaktu s ispitivanim spojem (Tedesco i Laughinghouse, 2012). Također, rezultati dobiveni *Allium* testom mogu se ekstrapolirati na ostale vrste biljaka kao i životinja. Naime, pokazano je da rezultati dobiveni *Allium* testom vrlo dobro koreliraju s rezultatima testiranja na animalnim modelima, primjerice animalnim stanicama V79 (stanična linija plućnih fibroblasta hrčka) (Fiskesjö, 1985). U *Allium* testu, korjenčići su uronjeni u otopinu spoja čije se citogenotoksično djelovanje ispituje te su meristemske stanice vrška korijena luka u direktnom kontaktu s ispitivanim spojem (Slika 2). Stoga je moguće utvrditi direktno mutageno ili karcinogeno djelovanje

ispitivanog spoja praćenjem kromosomskih oštećenja u meristemskim stanicama koje se nalaze u vršku korjenčića luka (Tedesco i Laughinghouse, 2012).



Slika 2. Položaj meristemskih stanica vrška korjenčića lukovice luka.

1.3 Kromosomska oštećenja

U molekuli DNA pohranjene su informacije za kontrolu svih procesa unutar stanice te je za normalno funkcioniranje stanice važno da je integritet molekule DNA nepromijenjen (Pavlica, 2021). Oštećenje molekule DNA direktno se povezuje s nastankom tumora (Mitchell i sur., 1995). Genotoksičnost podrazumijeva sposobnost nekog spoja da uzrokuje oštećenje molekule DNA što može dovesti do razvoja tumora ukoliko ne dođe do popravka molekule DNA. Mutageneza podrazumijeva mutacije, odnosno promjene genetske informacije (Theodorakis, 2008). Iz toga proizlazi činjenica da je svaki mutageni spoj genotoksičan, upravo zbog sposobnosti uzrokovanja mutacija genetskog materijala stanice. No nije i svaki genotoksični spoj mutagen jer može imati i druge mehanizme toksičnosti (npr. ometanje segregacije DNA molekula) kojima izaziva promjene genoma, a ne samo sposobnosti stvaranja mutacija (Theodorakis, 2008).

Za vrijeme interfaze molekula DNA je tanka i slabo vidljiva te je teško pratiti oštećenja genoma. Kromosomi predstavljaju pakirane molekule DNA te su vidljivi za vrijeme mitoze (Alberts, 2015; Pavlica, 2021). Stoga citogenetička istraživanja prate oštećenja kromosoma za vrijeme mitoze koje je moguće vidjeti svjetlosnim mikroskopom.

Kromosomska oštećenja, odnosno kromosomske aberacije obuhvaćaju: a) strukturne promjene kromosoma (primjerice lomovi kromosoma) i b) promjene u broju kromosoma (aneuploidija – promjena broja pojedinačnih kromosoma, odnosno višak ili manjak jednog/dva kromosoma; poliploidija – povećan broj cijelog seta kromosoma). Do takvih oštećenja može doći spontano ili pod utjecajem kemijskih ili fizikalnih spojeva (Leme i Marin-Morales, 2009; Pavlica, 2021). Kromosomska oštećenja mogu se javiti u bilo kojoj fazi staničnog ciklusa (interfaza, profaza, metafaza, anafaza, telofaza) te su pokazatelj genotoksičnosti ispitivanog spoja.

Za spoj koji dovodi do promjene broja kromosoma (aneuploidije ili poliploidije) govorimo da ima aneugeno djelovanje. U većini slučajeva taj spoj djeluje tako da dovodi do oštećenja i gubitka funkcionalnosti diobenog vretena što rezultira abnormalnom segregacijom kromosoma za vrijeme mitoze. Klastogeno djelovanje nekog spoja direktno je djelovanje tog spoja na kromosome koje uzrokuje pucanje kromosoma što rezultira kromosomskim lomovima i stvaranjem mostova (Leme i Marin-Morales, 2009).

Mikronukleus je acentrični kromosomski fragment ili cijeli kromosom koji je zaostao nakon mitoze te se vidi u citoplazmi stanice kćeri pod svjetlosnim mikroskopom tijekom interfaze kao mala dodatna jezgra (Fenech 2000; Leme i Marin-Morales, 2009; Kwasniewska i Bara, 2022). Mikronukleus ukazuje na aneugeni ili klastogeni učinak nekog spoja (Kwasniewska i Bara, 2022). S obzirom da vrsta *Allium cepa* ima simetrični kariotip, analizom veličine mikronukleusa može se odrediti mehanizam djelovanja kemikalije. Nastajanje većeg mikronukleusa u stanicama ukazivalo bi na aneugeno djelovanje spoja kao posljedica gubitka kromosoma, a u slučaju kada bi nastali mikronukleus bio manje veličine, ukazivao bi na klastogeno djelovanje spoja zbog kromosomskog loma (Leme i Marin-Morales, 2009). Stanica običnog luka u normalnim uvjetima ima 16 kromosoma ($2n=16$), koji su relativno veliki, stoga je to prednost običnog luka zbog lakšeg praćenja potencijalnih oštećenja, genotoksičnih i mutagenih učinaka (Firbas i Amon, 2014).

2.OBRAZLOŽENJE TEME

U današnje vrijeme, uz brzorastuću tehnologiju i industriju, čovjek je svakodnevno izložen raznim agensima iz zraka, okoliša, hrane i pića. Jedan od tih mnogobrojnih agenasa je i BPA. BPA se koristi u proizvodnji plastike i epoksi smola, a njegovo prisustvo utvrđeno je u zraku, tlu, morima i rijekama. Ljudi najviše dolaze u doticaj s BPA kroz plastične spremnike i boce koje se koriste za pohranjivanje hrane i pića. Iz plastičnih pakiranja BPA migrira u hranu i piće za konzumaciju čime ljudi direktno unose BPA u organizam (Janda i sur., 2021; Kučić Grgić i sur., 2019; Kim i sur., 2019). Pokazano je da BPA svojim djelovanjem oponaša estrogen te se veže za njegove receptore i dovodi do promjene u sekreciji hormona što za posljedicu može imati brojne zdravstvene probleme u ljudi. Zbog prisustva BPA u morima i rijekama BPA može uzrokovati promjene reproduktivnog sustava u životinja, a prisustvo BPA u tlu djeluje negativno na rast i razvoj biljaka (Kim i sur., 2019; Kučić Grgić i sur., 2019).

Zadnjih par godina provode se brojna ispitivanja toksičnosti BPA i mehanizama njegovog toksičnog djelovanje na ljude, životinje i biljke, no i dalje mehanizam njegovog djelovanja nije u potpunosti razjašnjen. Stoga je cilj ovog diplomskog rada bio ispitati djelovanje BPA na običnom luku (*Allium cepa* L.). Kao modelni organizam odabran je luk zbog jednostavnosti provedbe pokusa, ali i činjenice da se dobiveni rezultati na luku mogu ekstrapolirati na čovjeka (Tedesco i Laughinghouse, 2012). Kao parametri fitotoksičnog učinka BPA praćeni su duljina i izgled korjenčića. Genotoksičan učinak BPA praćen je u meristemskim stanicama vrška korjenčića luka određivanjem kromosomskih oštećenja za vrijeme mitoze i praćenjem učestalosti pojave mikronukleusa u stanicama u interfazi.

Istraživanje je provedeno tako što su se korjenčići luka izložili tri dana ili otopinama BPA u koncentracijskom rasponu 1-50 mg/L ili destiliranoj vodi (kontrola) te su se uspoređivale duljina i izgled korjenčića luka koji su rasli u destiliranoj vodi (kontrola) i duljina i izgled korjenčića luka nakon izloženosti BPA. Genotoksičan učinak BPA pratio se bilježenjem kromosomskih oštećenja i prisustvom mikronukleusa na mikroskopskim preparatima meristemskih stanica vrška korjenčića luka izloženih destiliranoj vodi (kontrola) i izloženih otopinama BPA u koncentracijskom rasponu 1-50 mg/L.

3.MATERIJALI I METODE

3.1 Materijali

3.1.1 Kemikalije

U ovom istraživanju korištene su kemikalije:

- bisfenol A, BPA, Sigma-Aldrich, SAD
- 96% ethanol, Lach-Ner, Češka
- ledena octena kiselina, J. T. Baker, SAD
- orcein, Sigma-Aldrich, SAD.

Sve kemikalije korištene u ovom istraživanju bile su *p.a.* čistoće.

3.1.2 Oprema

U ovom istraživanju korištena je oprema:

- magnetska miješalica s grijanjem, MSH, Witeg, Njemačka
- analitička vaga, PB303, Mettler Toledo, Švicarska
- termoblok, MPS-1, Biosan, Latvija
- svjetlosni mikroskop, CX 23, Olympus, Japan.

3.1.3 Modelni organizam - obični luk

Obični luk (*Allium cepa* L.) dvogodišnja je zeljasta biljka koja pripada porodici Liliaceae. Porijeklom dolazi iz Azije i spada u najstarije kultivirano povrće. Danas se uzgaja u cijelom svijetu, pogotovo na mjestima s umjerenom klimom (Marefati i sur., 2021). *Cepa* vrste razlikuju se međusobno po boji, koja može biti bijela, crvena ili žuta, i okusu (Alok Sagar i sur., 2022). Luk, zbog svog sastava bogatog flavonoidima, fenolnim komponentama i tiosulfinitima nudi brojne farmakološke prednosti poput antimikrobnog, antioksidativnog i protuupalnog djelovanja (Alok Sagar i sur., 2022; Lanzotti, 2006). U prehrani se koristi u svježem obliku, prerađenom obliku, u obliku ulja i začina te svojim djelovanjem pospješuje izlučivanje probavnih sokova i poboljšava apetit (Marefati i sur., 2021).

Zbog dobrih karakteristika običnog luka kao što su veliki kromosomi kod kojih su onda kromosomska oštećenja vidljivija, lakog rukovanja samom biljkom i postavljanja eksperimenta, dobre korelacije između nastalih kromosomskih oštećenja i mutagenosti te moguće ekstrapolacije dobivenih rezultata na ljude, upravo je on i izabran kao modelni organizam za ovo istraživanje (Fiskesjö, 1985; Tedesco i Laughinghouse, 2012; Firbas i Amon, 2014).

Lukovice običnog luka korištene u ovom istraživanju kupljene su u sjemenari u Zagrebu.

3.2 Metode

3.2.1 Biološki pokus

3.2.1.1 Priprema otopina BPA

Za provođenje pokusa prvo je bilo potrebno pripremiti „štok“ otopinu BPA. Ona se pripremila tako što je na analitičkoj vagi izvagano 2 g BPA koji se prebacio u odmjernu tikvicu od 10 mL. S obzirom da BPA nije topljiv u vodi, otopljen je u etanolu, a otapanje je potpomognuto grijanjem na grijaćoj ploči. Potom je odmjerna tikvica nadopunjena do oznake. Tako je pripremljena otopina BPA koncentracije 200 g/L odnosno 2×10^5 mg/L.

Iz „štok“ otopine BPA koncentracije 2×10^5 mg/L pripremljene su radne otopine BPA željenih koncentracija (1, 5, 10, 25 i 50 mg/L) u destiliranoj vodi. Za izračun korištena je formula:

$$c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$$

Tako je primjerice za pripremu 250 mL (V_2) otopine BPA koncentracije 25 mg/L (c_2) uzet volumen (V_1) od 0,03125 mL (ili 31,25 μ L) „štok“ otopine BPA koncentracije 2×10^5 mg/L (c_1). Volumeni „štok“ otopine BPA potrebni za izradu 250 mL (V_2) radnih otopina BPA ostalih koncentracija prikazani su Tablicom 1.

Tablica 1. Priprema radnih otopina BPA iz „štok“ otopine koncentracije 2×10^5 mg/L

Koncentracija otopina BPA (mg/L)	1	5	10	25	50
V „štok“ otopine BPA koncentracije 200 g/L (μ L)	1,25	6,25	12,5	31,25	62,5

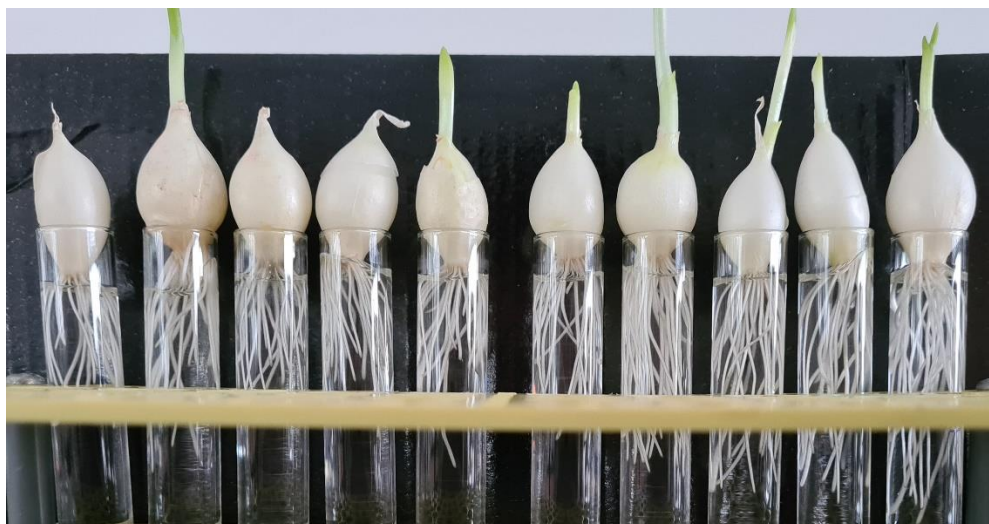
3.2.1.2 Postupak provođenja biološkog pokusa

Bazu lukovica prvo je bilo potrebno očistiti te zatim postaviti na vrh staklene posude, odnosno epruvete, tako da su bazom uronjene u destiliranu vodu. Lukovice su ostavljene na naklijavanju u destiliranoj vodi 48 sati (dva dana).

Na Slici 3. prikazane su lukovice luka s korjenčićima nakon dvodnevnog naklijavanja. Nakon dvodnevnog naklijavanja odabrane su one lukovice koje su proklijale i imale pravilne korjenčiće. One su podijeljene u 6 skupina od po 10 lukovica ($n=10$). Jedna skupina od po 10 lukovica bila je negativna kontrola. Te lukovice prebačene su u epruvete s destiliranom vodom. Ostalih 5 skupina od po 10 lukovica prebačeno je u epruvete s otopinama BPA koncentracija: 1 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 25 mg/L i 50 mg/L. Lukovice su izložene ili destiliranoj vodi (kontrola) ili otopinama BPA još tri dana (72 sata).



Slika 3. Korjenčići lukovica luka nakon dvodnevnog naklijavanja u destiliranoj vodi.



Slika 4. Korjenčići lukovica luka nakon tri dana izloženosti destiliranoj vodi nakon prethodnog naklijavanja (kontrola).

3.2.2 Makroskopska analiza korjenčića

Nakon trodnevnog izlaganja ili destiliranoj vodi (kontrola) (Slika 4) ili otopinama BPA u koncentracijskom rasponu 1-50 mg/L, korjenčići su pregledani. Potom su se lukovice jedna po jedna izvadile iz epruvete, korjenčići obrisali papirnatim ručnikom od otopine te se promotrla morfologija korjenčića (boja i oblik). Nakon toga ravnalom se izmjerila duljina dva najduža korjenčića od jedne lukovica, a izmjerene duljine korjenčića su zapisane. Postupak se ponovio za svaku od 10 lukovica po tretmanu.

3.2.3 Mikroskopska analiza korjenčića

3.2.3.1 Priprema otopina za mikroskopsku analizu

Otopina fiksativa

Otopina fiksativa pripremila se miješanjem 96%-tnog etanola i ledene octene kiseline u omjeru 3:1. Uloga fiksativa je da zaustavi diobu stanica. U fiksativu korjenčići moraju ostati barem pola sata prije bojenja i pripreme mikroskopskog preparata. Menzutom je uzeto 10 mL 96%-tnog etanola i prebačeno u čašu. Potom je menzutom uzeto 30 mL ledene octene kiseline te je dodano u čašu u kojoj se nalazio 96 %-tni etanol. Tako pripremljeni fiksativ čuva se u boci s čepom.

Otopina orceina

Kako bi se lakše i jasnije vidjele meristemske stanice, potrebno ih je obojiti. U ovom istraživanju koristila se aceto-boja orcein odnosno 1% otopina orceina pripremljena u 45%-tnoj ledenoj octenoj kiselini. Prvo je napravljena 45%-tna ledena octena kiselina tako da je menzurom uzeto 45 mL ledene octene kiseline i prebačeno u čašu te je potom menzurom uzeto 55 mL destilirane vode i dodano ledenoj octenoj kiselini u čaši. Nakon toga izvagano je 0,1 g orceina te se izvagani orcein prebacio u odmjernu tikvicu od 10 mL na što je do oznake dodana 45%-tna ledena octena kiselina. Pripremljena boja čuva se u tamnoj boci s čepom.

3.2.3.2 Priprema mikroskopskog preparata

Nakon trodnevnog izlaganja ili destiliranoj vodi ili otopinama BPA u koncentracijskom rasponu od 1-50 mg/L, vršni dijelovi korjenčića (po tri korjenčića) od 5 lukovica po tretmanu stavljeni su u otopinu fiksativa. Nakon što su korjenčići bili u fiksativu, pripremili su se mikroskopski preparati. Korjenčić se izvadio iz fiksativa, malo obrisao te se stavio u epruvetu s bojom (1% otopina orceina). Epruveta se zagrijavala u termobloku 15-20 minuta kako bi se korjenčić luka što bolje obojio (boja „ušla“ u stanice korjenčića luka). Nakon toga korjenčić se izvadio iz epruvete s otopinom boje, stavio na predmetno stakalce te se odrezao gornji vršak korjenčića koji se potom vrškom iglice macerirao. Potom se vršak korjenčića preklopio predmetnim stakalcem te pritisnuo palcem (tehnika „gnječenja“) kako bi se stanice jednoslojno rasporedile radi bolje vidljivosti. Tako pripremljeni mikroskopski preparat se promatrao pod mikroskopom te su se uočavale vrste i učestalost kromosomskih oštećenja i abnormalnosti i prisustvo mikronukleusa. Vrsta i broj kromosomskih oštećenja i mikronukleusa bilježila se u za to pripremljenu tablicu.

3.3 Statistička obrada rezultata

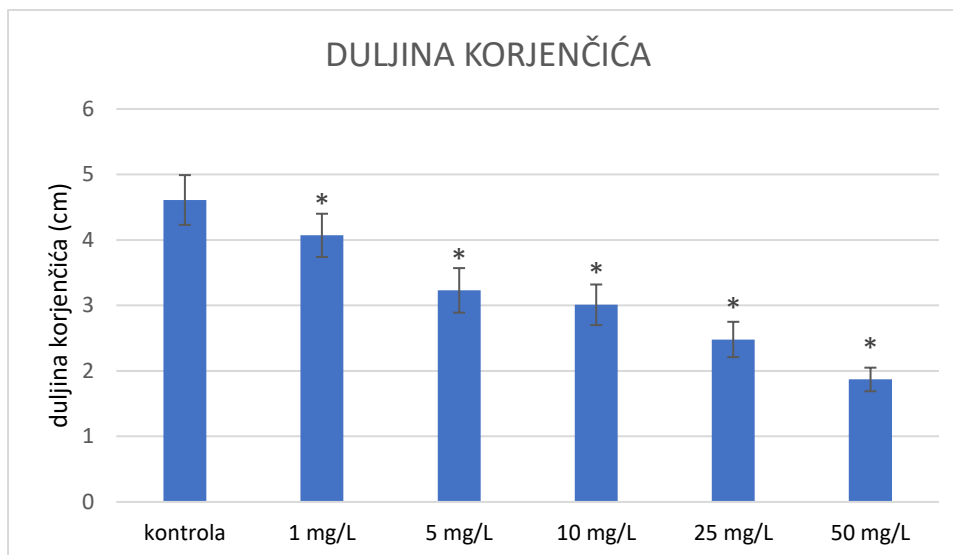
Rezultati duljine korjenčića prikazani su kao srednje vrijednosti 10 lukovica \pm standardna devijacija. Oštećenja kromosoma praćena su na minimalno 500 stanica u diobi, a učestalost mikronukleusa na minimalno 500 stanica u interfazi po mikroskopskom preparatu (što znači da je po tretmanu pregledano po 2500 stanica) te su rezultati prikazani samo brojčano. Za statističku obradu podataka korišten je *Excel* program (*MS Office*). Statistički značajna razlika između kontrole i izloženosti BPA odredila se pomoću studentovog t-testa, a značajnost je postavljena na $p \leq 0,05$.

4.REZULTATI I RASPRAVA

U ovom istraživanju ispitan je fitotoksični i genotoksični učinak BPA pomoću *Allium* testa. *Allium* test je pouzdan i brzi test, čiji rezultati su relevantni i usporedivi s drugim testovima. Stoga se smatra prikladnim pokazateljem toksičnog učinka ispitivanih spojeva (Fiskesjö, 1985). Istraživanje je provedeno na način da su se korjenčići lukovica običnog luka ($n = 10$) nakon dvodnevno naklijavanja izložili tri dana otopinama BPA u koncentracijskom rasponu 1-50 mg/L ili destiliranoj vodi (kontrola). Nakon trodnevne izloženosti ili otopinama BPA ili destiliranoj vodi, pregledana je morfologija korjenčića te im je izmjerena duljina kako bi se utvrdio fitotoksični učinak BPA. Iz meristemskih stanica vršaka korjenčića luka pripremljeni su mikroskopski preparati koji su pregledani pod mikroskopom kako bi se utvrdilo prisustvo kromosomskih oštećenja (koja su vidljiva za vrijeme mitoze) i pojava mikronukleusa (koja je vidljiva za vrijeme interfaze), a koji su pokazatelji genotoksičnog učinka, ali i mogućeg posljedičnog mutagenog učinka BPA.

4.1 Duljina korjenčića luka

Jedan od glavnih makroskopskih parametara procjene toksičnosti nekoga spoja *Allium* testom upravo je duljina korjenčića (Fiskesjö, 1985). Stoga je, kako bi se ustvrdio toksični učinak BPA na rast korjenčića, u ovome istraživanju izmjerena duljina korjenčića luka. Na slici 5 prikazani su dobiveni rezultati utjecaja BPA na duljinu korjenčića luka. Duljine korjenčića luka koji su bili tri dana izloženi BPA uspoređene su s duljinom korjenčića luka koji su tri dana bili izloženi destiliranoj vodi (kontrola) što predstavlja normalne fiziološke okolišne uvjete (Fiskesjö, 1985). Iz rezultata prikazanih na Slici 5 je vidljivo kako se s porastom koncentracije BPA, smanjuje duljina korjenčića što pokazuje da BPA zaustavlja produžni rast korjenčića. Već se kod izloženosti BPA u koncentraciji od 1 mg/L uočava statistički značajna razlika u produžnom rastu u usporedbi s kontrolom ($4,07 \pm 0,33$ cm vs. $4,61 \pm 0,38$ cm; $p < 0,05$). Daljnjim povećanjem koncentracije BPA zabilježena je još manja duljina korjenčića koja je bila značajno niža od duljine korjenčića kontrola. Najkraći korjenčići izmjereni su nakon trodnevne izloženosti BPA u koncentraciji od 50 mg/L ($1,87 \pm 0,18$ cm; $p < 0,05$) što dokazuje fitotoksični utjecaj BPA na korjenčiće luka.



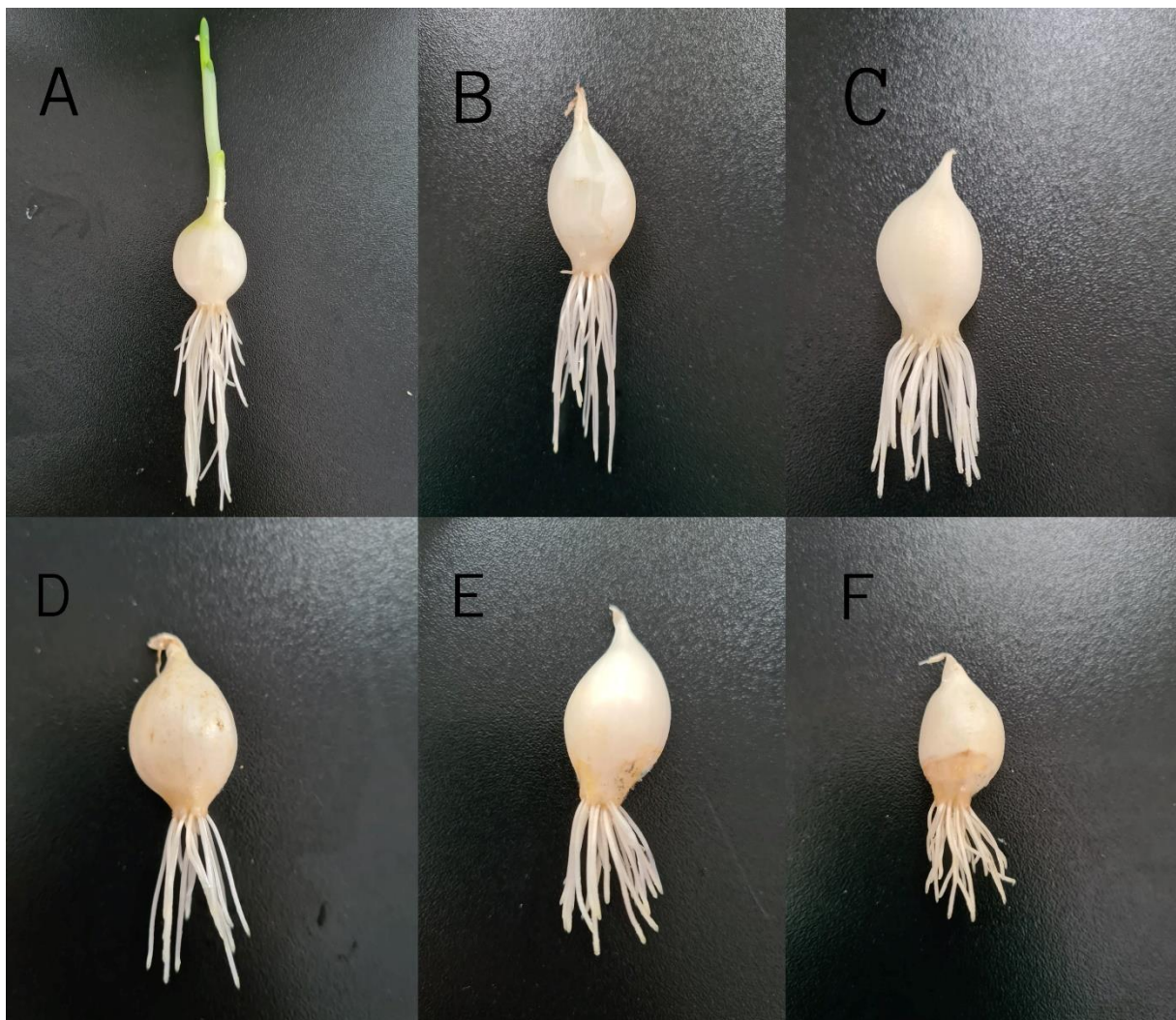
Slika 5. Duljina korjenčića luka nakon trodnevnog tretmana s BPA u koncentracijskom rasponu 1-50 mg/L i kontrola (tretman s destiliranom vodom); * značajno različito od kontrole ($p < 0,05$)

Fitotoksični učinak BPA na rast korjenčića zabilježili su i drugi istraživači. U istraživanju koje je pratilo utjecaj BPA u koncentraciji od 0-10 mg/L tokom 14 dana na rast korijena talijnog uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*), BPA je inhibirao rast i razvoj biljke kao i rast samih korjenčića inhibirajući dijeljenje stanica i produljenje korjenčića (Bahmani i sur., 2019). Utjecaj BPA ispitan je i na soji (*Glycine max*) (Li i sur., 2018). I u tom je istraživanju zabilježeno smanjenje površine i duljine korjenčića soje nakon 7-dnevne izloženosti BPA u koncentraciji od 0,8 do 17,2 mg/L. Rezultati navedenih istraživanja u skladnosti su s rezultatima dobivenim u ovom istraživanju.

4.2 Izgled korjenčića luka

Uz duljinu korjenčića luka, kao jednim od najvažnijih parametara procjene toksičnosti spoja (u ovom slučaju BPA), također je vrlo bitan i sam izgled korjenčića. *Allium* test omogućuje praćenje dva makroskopska parametra: turgescenciju i promjenu boje korjenčića. Turgescencija se procjenjuje prema tvrdoći vrha korijena što onda ukazuje na stupanj toksičnosti koji određeni spoj uzrokuje te se može koristiti kao parametar u preliminarnom ispitivanju kako bi se ustvrdile optimalne granične koncentracije spoja u eksperimentu. Također može doći i do promjene boje korjenčića uslijed tretiranja biljke sa soli ili do nastanka smečkaste boje koja je pokazatelj stanične smrti uzrokovane toksičnim efektom spoja (Fiskesjö, 1985).

Nakon trodnevnog tretmana s BPA (koncentracijski raspon 1-50 mg/mL) ili destiliranom vodom (kontrola) osim duljine korjenčića promatran je i izgled korjenčića. Rezultati su prikazani na Slici 6. Kod kontrole (korjenčići izloženi destiliranoj vodi), korjenčići su bili bijele boje, čvrsti i ravni (Slika 6A). Nakon izloženosti BPA u koncentraciji od 1 mg/L nije uočena razlika u izgledu korjenčića u odnosu na kontrolu (Slika 6B). No, nakon tretmana s višim koncentracijama BPA (5-50 mg/L) bila je vidljiva razlika u tvrdoći, boji i obliku korjenčića u usporedbi s kontrolom. Povećanjem koncentracije BPA, korjenčići su postajali sve mekši, nepravilniji, uvinuti te su bili blago smeđe boje (Slika 6C-F).



Slika 6. Izgled korjenčića luka nakon trodnevnog tretmana s BPA u koncentracijskom rasponu 1-50 mg/L i kontrola (tretman s destiliranom vodom): A) kontrola, BPA u koncentraciji B) 1 mg/L, C) 5 mg/L, D) 10 mg/L, E) 25 mg/L i F) 50 mg/L.

4.3 Kromosomska oštećenja u meristemskim stanica luka

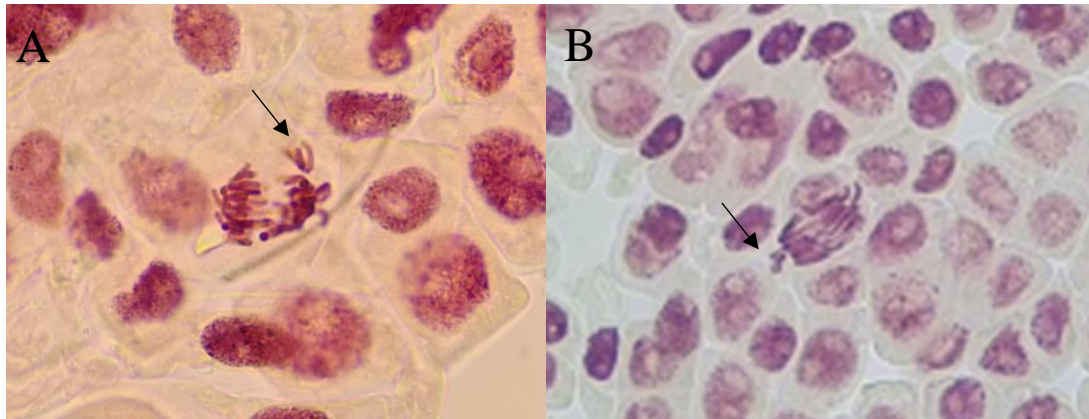
Kromosomska i mitotička oštećenja promatraju se kroz odstupanja od pravilnih struktura kromosoma kao što su anafazni mostovi, lomovi kromosoma, sljepljivanje, zaostajanje kromosoma, pojava anafaze s multipolarnim vretenom i gubitak kromosoma (Leme i Marin-Morales, 2009). Kromosomska oštećenja kao što su kromosomski mostovi i lomovi govore da ispitivani spoj ima klastogeni učinak, a gubitak kromosoma i njegov zaostatak govori o aneugenom učinku spoja.

Nakon trodnevne izloženosti BPA (u koncentracijskom rasponu 1-50 mg/L) ili destiliranoj vodi (kontrola) pripremljeni su mikroskopski preparati meristemskih stanica luka kako bi se mogao pratiti genotoksični utjecaj BPA. Proučavanjem mikroskopskih preparata utvrđeno je da BPA uzrokuje različite kromosomske aberacije ovisno o koncentraciji otopine BPA, a oštećenja kromosoma su zabilježena u različitim fazama mitotskog ciklusa (profaza, metafaza, anafaza, telofaza). Primijećene kromosomske aberacije bile su: gubitak kromosoma (Slika 7), lomovi kromosoma (Slika 8) i anafazni mostovi.

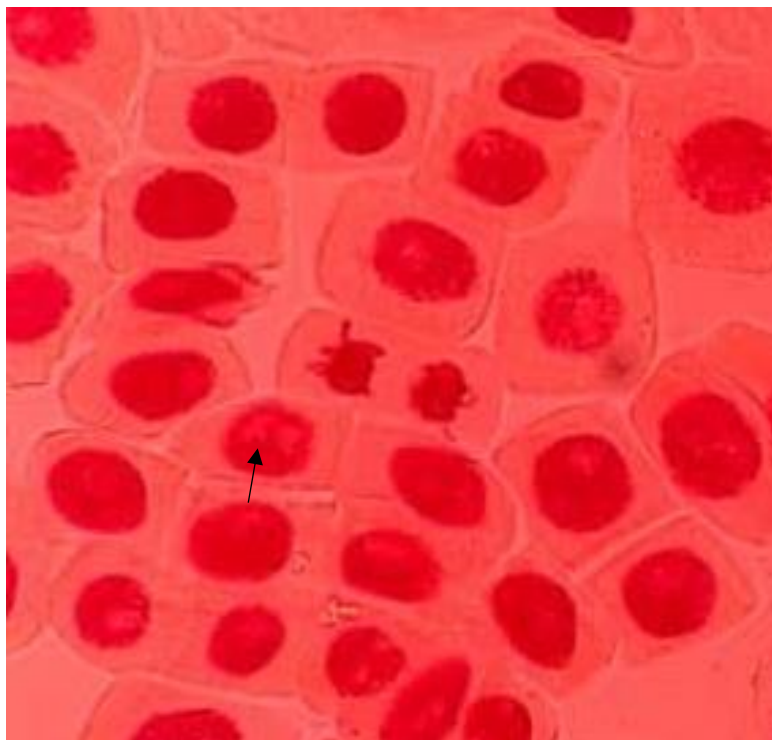
Prema dobivenim rezultatima, vidljivo je proporcionalno povećanje broja kromosomskih aberacija s povećanjem koncentracije BPA. Vrste i broj kromosomskih oštećenja u meristemskim stanicama običnog luka nakon trodnevnog tretmana s BPA ili s destiliranom vodom (kontrola) prikazane su u Tablici 2. S obzirom da su uočeni i zaostali kromosomi, mostovi kao i lomovi kromosoma može se reći da BPA ima i klastogeni i aneugeni učinak.

Tablica 2. Vrste i broj kromosomskih oštećenja u meristemskim stanicama običnog luka nakon trodnevnog tretmana s BPA u koncentracijskom rasponu 1-50 mg/L i kontrola (tretman s destiliranom vodom)

Tretman	Zaostali kromosom	Anafazni mostovi	Lomovi kromosoma
Kontrola	-	-	-
1 mg/L BPA	1	-	-
5 mg/L BPA	1	-	-
10 mg/L BPA	2	-	-
25 mg/L BPA	1	1	1
50 mg/L BPA	4	-	2



Slika 7. Mikroskopska slika gubitka kromosoma u meristemskim stanicama običnog luka nakon trodnevnog tretmana s BPA u koncentraciji: A) 5 mg/L i B) 50 mg/L; (A-povećanje 1000×; B-povećanje 400×)



Slika 8. Mikroskopska slika kromosomskog loma u meristemske stani običnog luka nakon trodnevnog tretmana s BPA koncentracije 50 mg/L; (povećanje 400×).

4.4 Mikronukleus u meristemskim stanicama luka

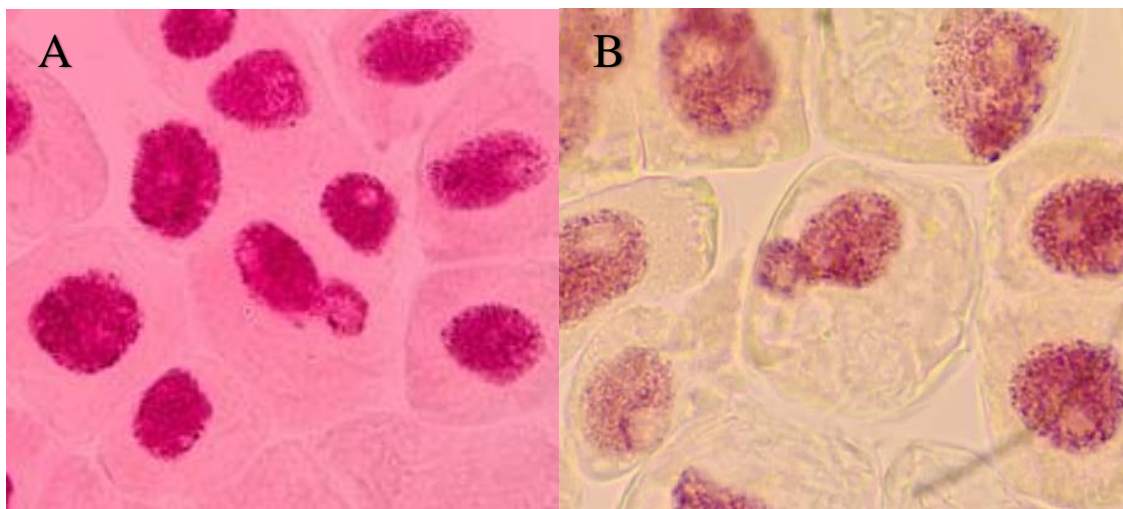
Mikronukleus je mala, ovalna formacija koja je jasno odvojena od glavne jezgre i promjera je 1/16 do 1/3 promjera glavne jezgre. Sličnog je uzorka i obojenja kao i glavna jezgra stanice (Fenech, 2009; Leme i Marin-Morales, 2009). Mikronukleus je rezultat loma ili dijela kromosoma ili kromatida (klastogeni učinak) te takvi acentrični fragmenti nisu povučeni unutar genoma u glavnu jezgru te zaostaju u interfaznoj citoplazmi. Mikronukleus može nastati i zbog izloženosti aneugenima. Zbog nemogućnosti vezanja na diobeno vreteno, čitav kromosom nije povučen unutar genoma glavne jezgre. Stoga je mikronukleus posljedica kromosomskih oštećenja.

Osim mikronukleusa, moguće je uočiti i tzv. jezgrine pupove (engl. *nuclear bud*). Jezgrini pupovi slični su mikronukleusu, ali su povezani s glavnom jezgrom. Jezgrini pupovi posljedica su prekomjernog umnažanja molekule DNA koja se u S fazi pozicionira uz rub jezgre te se iz nje izbacuje procesom pupanja. Kada bi se pupanje nastavilo, prekomjerno umnožena DNA odvojila bi se od glavne jezgre te bi tako nastao mikronukleus (Fenech, 2007).

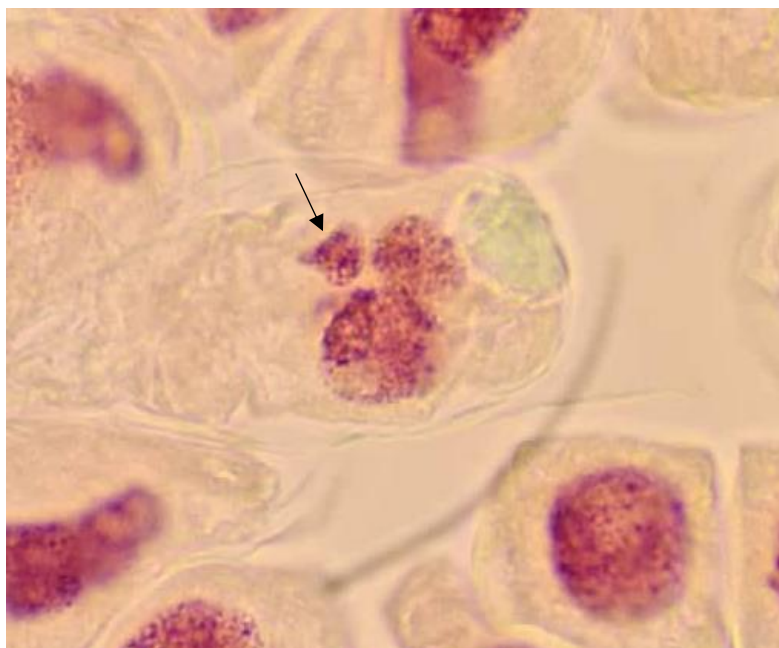
Analizom mikroskopskih preparata meristemskih stanica vršaka korjenčića luka nakon trodnevne izloženosti BPA u koncentracijskom rasponu 1-50 mg/L ili destiliranoj vodi (kontrola) utvrđeno je prisustvo mikronukleusa i jezgrinih pupova nastalih djelovanjem BPA. Pojava mikronukleusa zabilježena je 2 puta pri koncentraciji BPA od 25 mg/L te jedanput pri koncentraciji BPA od 50 mg/L (Tablica 3). Mikronukleus je prikazan na Slici 10. Također zabilježena je pojava i jezgrinih pupova i to već kod koncentracije BPA od 10 mg/L (Tablica 3; Slika 9). Iz tih rezultata može se zaključiti da BPA ima genotoksično djelovanje iz razloga što je upravo nastanak mikronukleusa jedan od jednostavnijih i učinkovitih pokazatelja genotoksičnosti nekog spoja (Leme i Marin-Morales, 2009).

Tablica 3. Broj jezgrinih pupova i mikronukleusa u meristemskim stanicama običnog luka nakon trodnevnog tretmana s BPA u koncentracijskom rasponu 1-50 mg/L i kontrola (tretman s destiliranom vodom).

Tretman	Jezgrini pupovi	Mikronukleusi
Kontrola	1	-
1 mg/L BPA	-	-
5 mg/L BPA	-	-
10 mg/L BPA	1	-
25 mg/L BPA	7	2
50 mg/L BPA	3	1



Slika 9. Jezgrin pup u meristemske stani običnog luka nakon trodnevnog tretmana s BPA u koncentraciji: A) 25 mg/L i B) 50 mg/L; (povećanje 1000×).



Slika 10. Mikronukleus u meristemske stanici običnog luka nakon trodnevnog tretmana s BPA u koncentraciji 50 mg/L; (povećanje 1000×).

Iz dobivenih rezultata istraživanja toksičnog učinka BPA na morfologiju i kromosomska oštećenja običnog luka može se zaključiti da BPA djeluje toksično na korjenčiće luka. To je vidljivo iz smanjenja duljine korjenčića luka s porastom koncentracije BPA. Osim djelovanja na produžni rast korjenčića, BPA je promijenio i izgled korjenčića uslijed kojeg su poprimili smečkastu boju te porastom koncentracije BPA postajali sve mekši i nepravilniji. Drugi dio ovoga istraživanja uključivao je mikroskopsku analizu meristemskih stanica vrška korjenčića luka kako bi se utvrdilo nastajanje kromosomskih oštećenja i mikronukleusa uslijed izloženosti BPA. Mikroskopskom analizom utvrđena je pojava kromosomskih oštećenja kao što su: lomovi i zaostajanje kromosoma te pojava anafaznih mostova što pokazuje genotoksično djelovanje BPA. Također zabilježeni su jezgrini pupovi, a mikronukleusi su zabilježeni pri višim koncentracijama BPA, koji su pokazatelj genotoksičnog učinka ispitivane supstance koja za posljedicu može imati i mutageni učinak. U ovom istraživanju ispitivane su koncentracije BPA koje su veće od onih koje su zabilježene u okolišu stoga što su korjenčići luka bili izloženi BPA tri dana. Naime, treba uzeti u obzir da su biljke, životinje i ljudi svakodnevno izloženi BPA te da dugoročnom izloženosti dolazi do akumulacije BPA u organizmu. Stoga postoji opasnost od BPA kako za okoliš, tako i za ljudsko zdravlje.

5.ZAKLJUČCI

Iz dobivenih rezultata ispitivanja učinka BPA na morfologiju i kromosomska oštećenja korjenčića luka nakon trodnevnog tretmana s BPA u koncentracijskom rasponu 1-50 mg/L može se zaključiti:

1. BPA je fitotoksičan za korjenčiće luka jer je inhibirao produžni rast korjenčića luka i to već u koncentraciji od 1 mg/L.
2. Fitotoksični učinak BPA je potvrđen i morfološkom analizom izgleda korjenčića luka koji su porastom koncentracije BPA postajali sve mekši, nepravilniji i blago smeđe boje.
3. BPA je imao genotoksični učinak na meristemske stanice korjenčića luka jer je za vrijeme mitoze stanica zabilježena pojava kromosomskih oštećenja kao što su lomovi i zaostajanje kromosoma te pojava anafaznih mostova.
4. Genotoksičnost BPA potvrđena je nalazom mikronukleusa i jezgrinih pupova u meristemskim stanicama korjenčića luka, a koji se koriste kao biomarkeri genotoksičnosti pojedine supstance.

6.POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

BPA-bisfenol A

DNA-deoksiribonukleinska kiselina

ECHA-Europska kemijska agencija (engl. *European Chemicals Agency*)

EFSA-Europska agencija za sigurnost hrane (engl. *European Food Safety Authority*)

EPA-Agencija za zaštitu okoliša (engl. *Environmental Protection Agency*)

REACH-uredba koja se odnosi na registraciju, evaluaciju, autorizaciju i restrikciju kemikalija (engl. *Registration, Evaluation, Authorization, and Restriction of Chemicals*)

ROS-reaktivni kisikovi spojevi (engl. *reactive oxygen species*)

SVHC-popis posebno zabrinjavajućih tvari (engl. *Substances of very high concern*)

TNF- α -faktor tumorske nekroze alfa (engl. *tumor necrosis factor alpha*)

7.LITERATURA

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*, New York, Garland Pub, 1989.

Bahmani R, Kim D, Modareszadeh M, Thompson AJ, Park JH, Yoo HH, Hwang S. The mechanism of root growth inhibition by the endocrine disruptor bisphenol A (BPA). *Environmental Pollution*, 2019, 257, 113516.

Bisfenol A, <https://echa.europa.eu/hr/hot-topics/bisphenol-a>, pristupljeno 15.05.2022.

Bisphenol A (BPA) Regulations in the European Union: An Overview, 2020., https://www.compliancegate.com/bisphenol-a-regulations-european-union/#Is_Bisphenol_A_banned_in_the_European_Union, pristupljeno 26.05.2022.

Crtanje strukture bisfenola A <https://chemicalize.com/app/drawing>, pristupljeno 14.04.2022.

Crveni luk, <https://www.plantea.com.hr/crveni-luk/>, pristupljeno 26.04.2022.

Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature protocols* 2, 2007, 1084–1104.

Firbas P, Amon T. Allium Chromosome Aberration Test for Evaluation Effect of Cleaning Municipal Water with Constructed Wetland (CW) in Sveti Tomaž, Slovenia. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 2013, 4, 189.

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.

Janda R, Ukić Š, Mikulec N, Vitale K. Bisphenol A – an Environmental and Human Threat. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 2021, 86, 295-304.

Kim JJ, Kumar S, Kumar V, Lee YM, Kim YS, Kumar V. Bisphenols as a Legacy Pollutant, and Their Effects on Organ Vulnerability. *Int J Environ Res Public Health*, 2019, 17, 112.

Kučić Grgić D, Kovačević A, Lovrinčić E, Očelić Bulatović V, Vuković Domanovac M. Biorazgradnja bisfenola A u okolišu. *Hrvatske vode*, 2019, 27, 1-6.

Kwasniewska J, Bara AW. Plant Cytogenetics in the Micronuclei Investigation—The Past, Current Status, and Perspectives. *Int J Mol Sci*, 2022, 23, 1306.

Lanzotti V. The analysis of onion and garlic. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1112, 3-22

Leme DM, Marin-Morales MA. Allium cepa test in environmental monitoring: a review on its application. *Mutat Res*, 2009, 682, 71-81.

Li X, Wang L, Shen F, Zhou Q, Huang X. Impacts of exogenous pollutant bisphenol A on characteristics of soybeans. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2018, 157, 463-471.

Marefati N, Ghorani V, Shakeri F, Boskabady M, Kianian F, Rezaee R, Boskabady MH. A review of anti inflammatory, antioxidant, and immunomodulatory effects of Allium cepa and its main constituents. *Pharmaceutical Biology*, 2021, 59, 285-300.

Michałowicz J. Bisphenol A – Sources, toxicity and biotransformation. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2014, 37, 738-758.

Mitchell DL, Adair GM, MacLeod MC, Tang MS, Nairn RS. DNA damage and repair in the initiation phase of carcinogenesis. *Epigenetics & Molecular Carcinogenesis*, 1995, 47, 449-455.

Mrežni udžbenik Genetika, 2021., <https://www.genetika.biol.pmf.hr>, pristupljeno 23.05.2022.

Pavlova D. Nickel effect on root-meristem cell division in Plantago lanceolata (Plantaginaceae) seedlings. *Australian Journal of Botany*, 2017, 65, 10.1071/BT17054.

Razlika između genotoksičnosti i mutagenosti, <https://hr.strephonsays.com/genotoxicity-and-mutagenicity-1321>, pristupljeno 26.05.2022.

Rudawska, A. Mechanical Properties of Epoxy Compounds Based on Bisphenol a Aged in Aqueous Environments. *Polymers*, 2021, 13, 952.

Sagar NA, Pareek S, Benkeblia N, Xiao J. Onion (*Allium cepa* L.) bioactives: Chemistry, pharmacotherapeutic functions, and industrial applications. *Food Frontiers*, 2022, 1–33.

Tedesco SB, Laughinghouse HD IV. Bioindicator of Genotoxicity: The Allium cepa Test; Dr. Jatin Srivastava (Ed.). *Environmental Contamination*, 2012, 10.5772/31371.

Theodorakis CW. Encyclopedia of Ecology. U: Mutagenesis. Academic Press, Jørgensen SE, Fath BD, Elsevier B.V., 2008, str. 2475-2484

Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, Fenech M. Buccal micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 2009, 4, 825–837.

Ya M, Haohao L, Jinxia W, Le Y, Yueqin W, Xingde D, Rui W, Phelisters Wegesa M, Pavankumar P, Xinghai C, Huizhen Z. The adverse health effects of bisphenol A and related toxicity mechanisms. *Environmental Research*, 2019, 176, 108575.

8.SAŽETAK/SUMMARY

Bisfenol A (BPA) je organski spoj koji se koristi u proizvodnji epoksidnih smola i polikarbonata koji su glavne komponente predmeta u svakodnevnoj upotrebi. Dosadašnja istraživanja su dokazala njegov toksični učinak na okoliš i ljudsko zdravlje pa je glavni cilj ovog istraživanja bio ispitati fitotoksični i genotoksični učinak BPA na meristemske stanice korjenčića luka (*Allium cepa* L). *Allium* test ima niz prednosti u istraživanju kao što su jednostavnost rukovanja, veličina i broj kromosoma koji su praktični za analizu kromosomskih aberacija te povoljna cijena. Nakon naklijavanja (dva dana) korjenčići luka ($n = 10$) bili su izloženi ili BPA (u koncentracijskom rasponu 1-50 mg/L) ili destiliranoj vodi (kontrola) kroz tri dana. Nakon tri dana, pregledana je morfologija korjenčića, izmjerena duljina korjenčića te su pripremljeni mikroskopski preparati meristemske stanice korjenčića luka u kojima je praćena pojava kromosomskih oštećenja i mikronukleusa. Dobiveni rezultati statistički su obrađeni t-testom (*Excel, MS Office*), a razina značajnosti postavljena je na $p < 0,05$.

Trodnevni tretman s BPA doveo je do smanjenja produžnog rasta korjenčića te je već nakon tretmana s najnižom ispitivanom koncentracijom (1 mg/L) zabilježena značajno manja duljina korjenčića u odnosu na kontrolu ($4,07 \pm 0,33$ cm vs. $4,61 \pm 0,38$ cm; $p < 0,05$). Također, trodnevni tretman s BPA utjecao je i na izgled korjenčića te su s porastom koncentracije BPA korjenčići postali mekši, nepravilni i uvinuti u odnosu na kontrolu. Mikroskopska analiza meristemske stanice korjenčića luka pokazala je da je trodnevni tretman s BPA doveo do pojave kromosomski oštećenja. S porastom koncentracije BPA povećala se učestalost pojave kromosomskih oštećenja kao što su gubitak kromosoma, lomovi kromosoma i anafazni mostovi. U interfaznim jezgrama meristemske stanice luka nakon trodnevnog tretmana s BPA zabilježena je pojava mikronukleusa i jezgrinih pupova te je njihova učestalost rasla s povećanjem koncentracije BPA. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da BPA ima fitotoksični i genotoksični, ali i potencijalno mutageni učinak na korjenčice luka.

Bisphenol A (BPA) is an organic compound used for production of epoxy resins and polycarbonates that are main components of items used in everyday life. Investigations conducted by now demonstrated its toxicity. Therefore, the aim of this study was to test phytotoxicity and genotoxicity of BPA on meristem cells of onion (*Allium cepa* L.) roots. The *Allium* test has number of advantages such as simple handling, size and number of chromosomes which make analysis of chromosome aberrations easy, as well as affordable price. After two-day germination, roots of onion bulbs (n = 10) were exposed to either BPA (in the concentration range of 1-50 mg/L) or distilled water (control) for three days. After three days, the morphology of the roots was examined, and the length of the roots was measured. Additionally, microscopic slides of meristem cells of the onion roots were prepared, in which chromosome aberrations and micronucleus were monitored. The obtained results were statistically analyzed by a t-test (Excel, MS Office), and the level of significance is set to $p < 0.05$.

Three-day treatment with BPA reduced root length and the lowest BPA concentration (1 mg/L) significantly reduced root length compared to the control (4.07 ± 0.33 cm vs. 4.61 ± 0.38 cm; $p < 0.05$). Additionally, a three-day treatment with BPA had effect on the roots' appearance; with an increase in the concentration of BPA the roots became softer, irregular, and twisted in comparison to the control. Analysis of onion roots meristem cells revealed that a three-day treatment with BPA led to the chromosome aberrations. The frequency of chromosome damage such as loss of chromosome, chromosome-breaks and anaphase bridges increased with the increase of BPA concentration. In meristem cells in the interphase treatment with BPA induce formation of micronucleus and nuclear buds, and their frequency increased with an increase in BPA concentration. The results of this study demonstrate that BPA has phytotoxic and genotoxic, but also potentially mutagenic effect on onion roots cells.

**9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA
KARTICA / BASIC DOCUMENTATION
CARD**

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Određivanje fitotoksičnosti i genotoksičnosti bisfenola A na luku (*Allium cepa* L.)

Miriam Šiniković

SAŽETAK

Bisfenol A (BPA) je organski spoj koji se koristi u proizvodnji epoksidnih smola i polikarbonata koji su glavne komponente predmeta u svakodnevnoj upotrebi. Dosadašnja istraživanja su dokazala njegov toksični učinak na okoliš i ljudsko zdravlje pa je glavni cilj ovog istraživanja bio ispitati fitotoksični i genotoksični učinak BPA na meristemske stanice korjenčića luka (*Allium cepa* L.). *Allium* test ima niz prednosti u istraživanju kao što su jednostavnost rukovanja, veličina i broj kromosoma koji su praktični za analizu kromosomskih aberacija te povoljna cijena. Nakon naklijavanja (dva dana) korjenčići luka ($n = 10$) bili su izloženi ili BPA (u koncentracijskom rasponu 1-50 mg/L) ili destiliranoj vodi (kontrola) kroz tri dana. Nakon tri dana, pregledana je morfologija korjenčića, izmjerena duljina korjenčića te su pripremljeni mikroskopski preparati meristemskih stanica korjenčića luka u kojima je praćena pojava kromosomskih oštećenja i mikronukleusa. Dobiveni rezultati statistički su obrađeni t-testom (*Excel, MS Office*), a razina značajnosti postavljena je na $p < 0,05$. Trodnevni tretman s BPA doveo je do smanjenja produžnog rasta korjenčića te je već nakon tretmana s najnižom ispitivanom koncentracijom (1 mg/L) zabilježena značajno manja duljina korjenčića u odnosu na kontrolu ($4,07 \pm 0,33$ cm vs. $4,61 \pm 0,38$ cm; $p < 0,05$). Također, trodnevni tretman s BPA utjecao je i na izgled korjenčića te su s porastom koncentracije BPA korjenčići postali mekši, nepravilni i uvinuti u odnosu na kontrolu. Mikroskopska analiza meristemskih stanica korjenčića luka pokazala je da je trodnevni tretman s BPA doveo do pojave kromosomski oštećenja. S porastom koncentracije BPA povećala se učestalost pojave kromosomskih oštećenja kao što su gubitak kromosoma, lomovi kromosoma i anafazni mostovi. U interfaznim jezgrama meristemskih stanica luka nakon trodnevnog tretmana s BPA zabilježena je pojava mikronukleusa i jezgrinih pupova te je njihova učestalost rasla s povećanjem koncentracije BPA. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da BPA ima fitotoksični i genotoksični, ali i potencijalno mutageni učinak na korjenčiće luka.

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

Rad sadrži: 36 stranica, 10 grafičkih prikaza, 3 tablice i 29 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Bisfenol A, *Allium* test, fitotoksičnost, mutagenost, genotoksičnost

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

Dr. sc. Goran Gajski, viši znanstveni suradnik Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada.

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

Dr. sc. Goran Gajski, viši znanstveni suradnik Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada.

Dr. sc. Lovorka Vujić, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: lipanj 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

Determination of phytotoxicity and genotoxicity of bisphenol A on onion (*Allium cepa* L.)

Miriam Šiniković

SUMMARY

Bisphenol A (BPA) is an organic compound used for production of epoxy resins and polycarbonates that are main components of items used in everyday life. Investigations conducted by now demonstrated its toxicity. Therefore, the aim of this study was to test phytotoxicity and genotoxicity of BPA on meristem cells of onion (*Allium cepa* L.) roots. The *Allium* test has number of advantages such as simple handling, size and number of chromosomes which make analysis of chromosome aberrations easy, as well as affordable price. After two-day germination, roots of onion bulbs (n = 10) were exposed to either BPA (in the concentration range of 1-50 mg/L) or distilled water (control) for three days. After three days, the morphology of the roots was examined, and the length of the roots was measured. Additionally, microscopic slides of meristem cells of the onion roots were prepared, in which chromosome aberrations and micronucleus were monitored. The obtained results were statistically analyzed by a t-test (Excel, MS Office), and the level of significance is set to $p < 0.05$. Three-day treatment with BPA reduced root length and the lowest BPA concentration (1 mg/L) significantly reduced root length compared to the control (4.07 ± 0.33 cm vs. 4.61 ± 0.38 cm; $p < 0.05$). Additionally, a three-day treatment with BPA had effect on the roots' appearance; with an increase in the concentration of BPA the roots became softer, irregular, and twisted in comparison to the control. Analysis of onion roots meristem cells revealed that a three-day treatment with BPA led to the chromosome aberrations. The frequency of chromosome damage such as loss of chromosome, chromosome-breaks and anaphase bridges increased with the increase of BPA concentration. In meristem cells in the interphase treatment with BPA induce formation of micronucleus and nuclear buds, and their frequency increased with an increase in BPA concentration. The results of this study demonstrate that BPA has phytotoxic and genotoxic, but also potentially mutagenic effect on onion roots cells.

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

Thesis includes: 36 pages, 10 figures, 3 tables and 29 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Bisphenol A, *Allium* test, phytotoxicity, mutagenicity, genotoxicity

Mentors: **Ana-Marija Domijan, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Goran Gajski, Ph.D., Senior Scientific Associate, Institute for Medical Research and Occupational Health

Reviewers: **Ana-Marija Domijan, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Goran Gajski, Ph.D. Senior Scientific Associate, Institute for Medical Research and Occupational Health
Lovorka Vujić, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2022.