



# **PESTITSIIDIDE MÕJU SOOLESTIKU RAKKUDE BIOENERGEETIKALE**

Bakalaureusetöö

Üliõpilane: Karolin Kullison, 206792LAAB

Juhendaja: Kersti Tepp PhD, Keemilise ja Bioloogilise Füüsika Instituut, teadur

Õppekava: Rakenduskeemia ja geenitehnoloogia

Tallinn 2023



# **THE EFFECT OF PESTICIDES ON THE BIOENERGETICS OF INTESTINAL CELLS**

Bachelor thesis

Student: Karolin Kullison, 206792LAAB

Supervisor: Kersti Tepp PhD,

National Institute of Chemical Physics and Biophysics, Research Fellow

Study program: Applied Chemistry and Gene Technology

Tallinn 2023

## Autorideklaratsioon

Kinnitan, et olen koostanud antud lõputöö iseseisvalt ning seda ei ole kellegi teise poolt varem kaitsmisele esitatud. Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on töös viidatud.

Autor: Karolin Kullison

[allkiri ja kuupäev]

Töö vastab bakalaureusetööle esitatavatele nõuetele.

Juhendaja: Kersti Tepp

[allkiri ja kuupäev]

Töö on lubatud kaitsmisele.

Kaitsmiskomisjoni esimees: Indrek Koppel

[allkiri ja kuupäev]

# Sisukord

Annotatsioon.....	6
Abstract .....	7
Lühendite loetelu .....	8
Sissejuhatus.....	9
1. Kirjanduse ülevaade .....	10
1.1 Rakkude bioenergeetika .....	10
1.1.1 Mitokondrid .....	10
1.1.2 Oksüdatiivne fosforüülimine.....	10
1.1.3 Hingamisahel.....	10
1.2 Soolevähk .....	12
1.3 Pestitsiidid .....	13
1.3.1 Glüfosaat ja Roundup.....	14
1.3.2 NeemAzal .....	14
1.3.3 Boskaliid .....	15
2. Töö eesmärk.....	16
3. Materjalid ja meetodid .....	17
3.1 Reaktiivid.....	17
3.2 Caco-2 rakud .....	17
3.3 Rakkude kasvatamise tingimused.....	17
3.4 Mõõtelahus .....	17
3.5 MTT test .....	17
3.6 Oksügraafia .....	18
3.6.1 Rakkude ettevalmistus oksügraafiaks .....	18
3.6.2 Hingamisahela protokoll .....	19
3.6.3 Intaktsete rakkude hapnikutarbimise protokoll .....	20
3.7 Andmete töötlus .....	21
4. Tulemused .....	22
4.1 MTT katse tulemused.....	22
4.1.1 MTT DMEM .....	23
4.1.2 MTT Plasmax™ .....	24
4.1.3 Plasmax™ versus DMEM .....	25
4.2 Oksügraafia .....	26
4.2.1 Hingamisahela protokoll tulemused .....	26
4.2.2 Intaktsete rakkude hapnikutarbimise protokoll tulemused .....	27
4.2.3 Kontrollrakud eri tingimustel .....	28

5. Arutelu .....	29
Kokkuvõte .....	33
Tänuavaldus .....	34
Kasutatud kirjandus .....	35
Lisad .....	40
Lisa 1. Plasmax™ koostis.....	40
Lisa 2. Hingamisahela protokoll .....	42
Lisa 3. Intaktsete rakkude hapnikutarbimise protokoll .....	43
Lisa 4. Pestitsiidide kontsentratsioonid oksügraafias ja ADI, AOEL .....	44

## Annotatsioon

Kolorektaalset kartsinoomi peetakse teiseks kõige sagedasemaks vähitüübiks. Eriti murelikuks teeb, et kui seni on olnud kolorektaalvähk pigem vanema vanuserühma haigus, siis viimasel ajal on tõusnud juhtumite arv just nooremas vanuserühmas (20 - 49 aastased). Antud vähivormi puhul oletatakse, et keskkonnast tulenevad tegurid on olulisemad kui pärilikud. Üheks ainete rühmaks, mis võivad muuta meie seedesüsteemi rakkude ainevahetust, on meie toidus esinevad pestitsiidid. Muutused energia-ainevahetusega seotud substraatide saadavuses ja ensüümide aktiivsuses mõjutavad raku ainevahetust tervikuna. Seega on muutused rakkude bioenergeetikas üheks tundlikuks näitajaks, mille alusel saame hinnata pestitsiidide võimalikku mõju kogu rakkude ainevahetusele.

Antud töö peamiseks eesmärgiks on uurida, kas pestitsiidid - glüfosaat, glüfosaadil põhinev Roundup, bosakliid ja NeemAzal mõjuvad inimeste seedeelundkonna rakkude mitokondrites toimivale energia-ainevahetusele pärssivalt. Selleks uuriti, kas pikaajaline kokkupuude nende pestitsiididega ja koele sarnasem kasvukeskkond suurendavad Caco-2 rakkude tundlikkust pestitsiididele. Mitokondrite töö hindamiseks analüüsiti hapniku tarbimise kiirust lähtuvalt elektronide voost läbi üksikute hingamisahela komplekside ning samuti analüüsiti hingamisahela tööd tervikuna.

Saadud tulemustest järeldus, et pestitsiidide madalamad kontsentratsioonid, mis ei mõjuta rakke lühema aja jooksul, vähendavad pikemal kasutusel rakkude elumust oluliselt. Samuti näitasid katsed, et plasmale sarnanevas söötmes on pestitsiidide toksiline mõju suurem või samaväärne, võrreldes tavasöötmes kasvanud rakkudega. Sellest järeldub, et on oluline uurida rakukultuure füsioloogilises kasvukeskkonnas. Mitokondriaalse oksüdatiivse fosforüülimise analüüsi tulemustest järeldus, et kontsentratsioonidel, mis vähendavad rakkude elumust 20%, langes hingamisahela hapniku tarbimise kiirus kõigi pestitsiididega oluliselt. Madalatel pestitsiidi kontsentratsioonidel, mis vähendavad elumust kuni 10%, on mõju tuvastatav ainult boskaliidi ja Roundupi puhul.

Töö tulemustest saab järeldada, et madal pestitsiidi kontsentratsioon, mis lühema aja jooksul ei mõju, võib vähendada rakkude elumust ja pärssida mitokondri tööd pärast pikema ajalise toimet. Analüüs näitas, et pestitsiidide toimet inimese rakkudele peaks uurima füsioloogilisele keskkonnale sarnanevas söötmes. Töö tulemused kinnitasid, et müügil olevad taimekaitsevahendid koos seal olevate lisanditega omavad tugevamat toksilist mõju kui deklareeritud toimeaine üksinda.

## Abstract

Colorectal cancer is considered the second most common type of cancer. Particularly concerning is the increasing number of cases among younger age groups (20-49 years old), as colorectal cancer has traditionally been more prevalent among older age groups. For this cancer type, it is assumed that environmental factors are more important than hereditary factors. One group of substances that can alter the metabolism of our intestinal cells is pesticides present in our food. Changes in the availability of energy metabolism-related substrates and enzyme activities affect cellular metabolism as a whole. Therefore, changes in cellular bioenergetics serve as sensitive indicators to assess the potential impact of pesticides on overall cellular metabolism.

The aim of this bachelor's thesis was to investigate whether pesticides: glyphosate, glyphosate-based Roundup, boscalid, and NeemAzal, have inhibitory effects on the energy metabolism of human intestinal cells. To achieve this, the study examined whether prolonged exposure and different growth environments increase the sensitivity of Caco-2 cells to pesticides. To determine the alterations in mitochondrial metabolism, the study analysed the rate of oxygen consumption based on electron flow through individual respiratory chain complexes. Using internal substrates, the overall oxygen consumption rate of respiratory chain was also analysed.

The results demonstrated that lower concentrations of pesticides, which do not affect cells in the short term, significantly decrease cell viability with prolonged use. The experiments also showed that in a plasma-like medium, the toxic effect of pesticides is either higher than or equivalent to that observed in cells grown in a regular medium. This implies the importance of studying cell cultures in a physiological growth environment. Analysis of mitochondrial oxidative phosphorylation revealed a significant decrease in oxygen consumption rate through the electron transport chain at concentrations reducing cell viability by 20% for all pesticides. At lower pesticide concentrations reducing viability by up to 10%, the effect was detectable only for boscalid and Roundup.

The results of the study indicate that low pesticide concentration, which have no immediate impact, may exert toxic effects over a longer period. The analysis highlights the need to investigate the effects of pesticides on human cells in a medium that mimics physiological conditions. The findings confirm that commercially available pesticides, along with their accompanying additives, exhibit stronger toxic effects than the declared active ingredient alone.

## Lühendite loetelu

ADI - (*The acceptable daily Intake*) Aine kogus, mida võib elu jooksul igapäevaselt tarbida ilma märgatava terviseriskita

ADP - Adenosiindifosfaat

AOEL - (*Acceptable operator exposure levels*) Toimeaine maksimaalne kogus, millega kasutaja võib kokku puutuda ilma kahjulike tervisemõjudeta

AZA - Asadirahtiin

ATP - Adenosiintrifosfaat

Caco-2 - Inimese kolorektaalse adenokartsinoomi rakud

Cyt-C - Tsütokromosoom-c

CI - NADH-Q oksüreduktaas

CII - Duktsinaat-Q reduktaas

CIII - Q-tsütokromosoom-c oksüreduktaas

CIV - Tsütokromosoom-c oksüdaas

CV - ATP süntaas

DMSO - Dimetüülsulfoksiid

EPSPS - 5-enoalpüruvüülšikimaat-3-fosfaat

ETA - Mitokondri elektronitranspordiahel

FAD - Flaviinadeniindinukleotiid

FADH<sub>2</sub> - Redutseeritud flaviinadeniindinukleotiid

FBS - *Fetal bovine* seerum

FCCP - Karbonüülsüaniid-p-trifluorometoksüfenüülhüdrasoon

FMN - Flaviinmononukleotiid

MBI - Mitokondriaalne bioenergeetiline indeks

MSM - Mitokondri sisemembraan

mtDNA - Mitokondriaalne DNA

MTT- 3-(4,5-dimetüültiasool-2-üül)-2,5-difenüültetrasooliumbromiid

NaCN - Naatriumtsüaniid

NADH - Redutseeritud nikotiinamiid adeniin dinukleotiid

OXPHOS - Mitokondriaalne oksüdatiivne fosforüülimine

PBS - Fosfaatpuhverdatud soolalahus

POEA - Polüetoksüülitud rasvaamiin

ROS - Hapnikku sisaldavad reaktiivsed osakesed

ROX - Mitte-mitokondriaalne hapniku tarbimine

SDH - Suktsinaatdehüdrogenaas

TMPD - Tetrametüülfenüleendiamiin



## Sissejuhatus

Tehnoloogia, põllumajanduse ja meditsiini areng on parandanud inimkonna elukvaliteeti. Need edusammud on aga tekitanud uusi probleeme, mis mõjutavad keskkonda ja tulevasi põlvkondi. Viimastel aastakümnetel on pestitsiidide kasutamine aina intensiivistunud ning selle mõju meie keskkonnale ja inimeste tervisele on vägagi murettekitav (1). Olgugi, et tänapäevaseid taimekaitsevahendeid peetakse mittesihthiikidele suures osas suhteliselt ohutuks, näitavad arvukad uuringud siiski pestitsiidide negatiivset mõju nii ökosüsteemide tervisele kui ka stabiilsusele. Peamiseks mureks võib pidada just nende toodete seni avastamata toksilisust ning pikaajalist püsivust keskkonnas – seda soodustab süstemaatilise teaduspõhise lähenemisviisi puudulikkus preparaate väljatöötamisel. Euroopa Kemikaaliagentuuri aruannete kohaselt leidub kindlaid tõendeid, et mõned taimekaitsevahendile lisatavad ained, mis peaks suurendama algse toimeaine omastatavust, on ise niivõrd mürgised, et suurendavad hoopis lõpptoote toksilisust. Pestitsiidid ei avalda kahju mitte ainult põllukultuuridele, vaid mõjuvad ökosüsteemidele saastavalt ka maa, vee ja õhu transpordi käigus (2).

Pestitsiidid mõjuvad inimestele erinevatel viisidel nii otseselt kui ka kaudselt, kusjuures mürgiste ainete peamiseks tarbimise allikaks on just toit. Saastunud põllumuldadel kasvatavatesse puu- ja köögiviljadesse on imunud piisavalt kõrges kontsentratsioonis ohtlikke aineid, mis tekitavad kliinilisi probleeme nii inimestele kui loomadele. Pestitsiidid leiavad oma tee inimkehasse lisaks suule ka läbi naha, silmade ja hingamisteede. Teaduskirjanduses leiab laialdast käsitlust pestitsiidide ja kantserogeneesi seose kohta. Glüfosaadi ja mitmete kahjuritõrjete puhul on leitud positiivne seos kasvajate tekkega (2).

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks on uurida, kas ja kuidas mõjutavad Eestis enim kasutuses olevad taimekaitsevahendid inimeste soolestiku rakkude energia-ainevahetust. Lisaks on eesmärgiks teha kindlaks, kas rakkude kasvukeskkond mõjutab nende vastust pestitsiididele. Töö eesmärkidest lähtuvalt püstitati kolm hüpoteesi. Esimeseks seatud hüpoteesiks on, et pestitsiidide kasutamine pikema aja jooksul, kontsentratsiooni muutmata, mõjutab rakkude elumust negatiivselt. Teiseks hüpoteesiks püstitati, et ka madalad pestitsiidi kontsentratsioonid mõjutavad Caco-2 rakkude mitokondrite oksüdatiivset fosforüülimist. Töö kolmandaks hüpoteesiks on, et füsioloogilisele keskkonnale sarnanevas söötmes on rakud tundlikumad pestitsiidide suhtes ja muutused mitokondrite oksüdatiivse fosforüülimise profiilis on olulisemad.

Uurimise käigus kasvatati rakke spetsiaalses rakusöötmes Plasmax™, mis on rakkude tegelikule koosisesele keskkonnale oluliselt tõetruum, kui seda on teine kasutatud sööde DMEM. Teadaolevalt pole sellist lähenemist pestitsiidide raku toksilisust käsitlevates uuringutes varem kasutatud.

Bakalaureusetöö on osa pilootprojektist „Pestitsiidide mõju rakkude bioenergeetikale“(KBFI Arengufond\_KT), mille põhieesmärk on hinnata Eestis levinumate pestitsiidide pikaajalist toimet soolestiku- ja südamerakkude energiavahetustega seotud ainevahetusradadele.

# 1. Kirjanduse ülevaade

## 1.1 Rakkude bioenergeetika

### 1.1.1 Mitokondrid

Mitokondrid on topelt membraaniga organellid, kus tugevat kurrulist sisemembraani (MSM) katab välismembraan, ning nende vahelist ruumi nimetatakse membraani vaheruumiks. Mitokondri sees on mitokondri harjakesed, mille moodustavad sisemembraani kurrud, ning mitokondri sisemembraan ümbritseb mitokondri maatriksit (3). Välismembraan vahendab kokkupuudet tsütoplasma (4). Imetajarakkudes toodab mitokondri, olenevalt rakutüübist, kuni 90% raku energiast adenosintriifosfaadi (ATP) kujul, oksüdatiivse fosforüülimise (OXPHOS) protsessi kaudu. Mitokondritel on väike kogus oma DNA-d, mida nimetatakse mitokondriaalseks DNA-ks (mtDNA), mis kodeerib mitokondriaalse hingamise jaoks olulisi valke. Inimese rakkudes koosneb mtDNA 16 569 aluspaarist ja kodeerib 37 geeni, sealhulgas 13 polüpeptiidi, kahte ribosomaalset RNA-d ja 22 tRNA-d (5). Oksüdatiivse fosforüülimises osalevad kõik 13 valku, mida kodeerib mtDNA (3). mtDNA on pärit ainult emaliinist, kuna isapoolne mtDNA laguneb viljastamise käigus (5). Ülejäänud mitokondriaalsed valgud kodeeritakse tuumagenoomi poolt ja imporditakse hiljem mitokondritesse, seega kaks genoomi teevad omavahel koostööd (6).

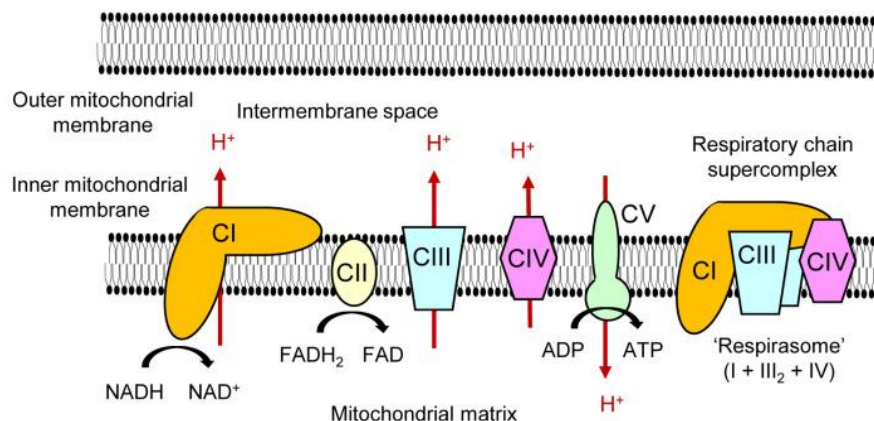
### 1.1.2 Oksüdatiivne fosforüülimine

Oksüdatiivne fosforüülimine on ATP sünteesi protsess, kus toimub elektronide astmeline ülekandmine läbi sisemises mitokondriaalses membraanis asuvate suurte valgukomplekside (7). Mitokondriaalne hingamisahel kannab prootoneid ja elektrone substraatidest lõplikule elektroonilisele aktseptorile hapnikule ja genereerib energiat, et toetada adenosintriifosfaadi (ADP) fosforüülimist (8). NADH ja FADH<sub>2</sub> oksüdeerumisel eraldub kaks elektroni, mille liikumisega kaasneb prootonite pumpamine läbi sisemembraani, mis tagab seeläbi elektrokeemilise gradiendi tekkimise ning ATP sünteesi (3). NADH ja FADH<sub>2</sub> elektronid läbivad elektronide transpordiahela (ETA), mille on moodustanud kolm suurt valgukompleksi – NADH-Q oksüreduktaas (CI), Q-tsütokromosoom-c oksüreduktaas (CIII) ning tsütokromosoom-c oksüdaas (CIV), ja selle ahela läbimise tulemusena taandub hapnik. On ka olemas neljas suur valgukompleks, mis on suktsinaat-Q reduktaas (CII) (4). Nii kompleks I, III kui ka IV võivad liitudes moodustada erinevaid superkomplekse (7). Nendes kompleksides pumbatakse prootoneid, erinevalt kompleks kahest, mis ei pumpa prootoneid aga transpordib elektrone. Kompleks V (CV) on ATP süntaas, kus toimub ATP süntees ADP-st (7).

### 1.1.3 Hingamisahel

Mitokondri ETA-s toimub elektronide liikumine astmeliselt läbi nelja ensüümkompleksi FADH<sub>2</sub>-lt või NADH-lt hapnikule ning selle tulemusel moodustub vesi (**Joonis 1**). Iga vaheülekandja esmalt redutseerub, omandades selle käigus elektroni ning seejärel oksüdeerub ehk kannab elektroni järgmisele vaheühendile. Elektronide transpordi ajal liiguvad prootonid maatriksist läbi mitokondri sisemembraani membraanide vahelisse ruumi, tekitades elektrokeemilise prootoni

gradiendi (3). Hingamisahela valgukompleksid mitokondrites on olulised komponendid ATP sünteesimiseks vajalike vesinikioonide elektrokeemilise potentsiaali säilitamiseks (9).



**Joonis 1. Hingamisahela kompleksid.** Joonisel on kujutatud mitokondriaalse oksüdatiivse fosforüülimise komplekse ning hingamisahela superkomplekse. OXPHOS teostavad viis sisemist mitokondriaalset kompleksi (CI-CV). Kompleksid I–IV vastutavad elektronide ülekandmise eest NADH-st või FADH<sub>2</sub>-st molekulaarsesse hapnikku. Protsessi käigus liiguvad prootonid (H<sup>+</sup>) läbi sisemise mitokondriaalse membraani mitokondriaalsest maatriksist membraanidevahelisse ruumi, mis loob prootonite gradiendi, mis on vajalik ATP sünteesiks kompleks V abil. Joonisel tähistavad prootonite liikumist punased nooled. Teatud osa mitokondriaalse hingamisahela kompleksidest moodustab kõrgema järgu struktuuri, mida nimetatakse "superkompleksiks"(10).

NADH-Q oksüreduktaas, mida tuntakse ka NADH dehüdrogenaasina on hingamisahela I kompleks ja selle kaudu NADH elektronid sisenevad hingamisahelasse. NADH-Q oksüreduktaas on L-kujuline kompleks, millel on kaks erinevat domeeni: hüdrofiilne pea, mis ulatub maatriksisse ja hüdrofoobne osa, mis asub mitokondri sisemises membraanis. CI koosneb flaviinmononukleotiidist (FMN) ja raud-väävli klastritest, kus elektronid liiguvadki kõigepealt NADH-lt FMN-ile ja seejärel üle raud-väävli klastrite koensüüm-Q-le (Q). Kahe elektroni liikumisel NADH-lt Q-le pumbatakse ka neli prootonit maatriksist välja (4, 11). Kompleks I on ka üks peamisi reaktiivsete hapnikuliikide (ROS) tootmise allikaid, millel on mõju mitokondritele ja oksüdatiivsele stressile ning mis võib olla üheks vananemise põhjuseks (12).

Hingamisahela kompleks II on suksinaat-Q reduktaas ehk suksinaadi dehüdrogenaas, mis transpordib elektrone FADH<sub>2</sub> kaudu. Kompleksi elektronkandjateks on flaviinadeniindinukleotiid (FAD), Q ja raud-väävlivalgud ja kuna FADH<sub>2</sub> on ensüümi osa, siis see ei lahku kompleksist. Esmalt kantakse elektronid raud-väävlivalgude tsentritele ja seejärel Q-le, mille järel elektronid sisestatakse transpordiahelasse. Suksinaat-Q reduktaasi omapäraks on, et see ei pumpa prootoneid läbi sisemembraani, nagu seda teevad teised kompleksid mistõttu FADH<sub>2</sub> oksüdeerumisel moodustub vähem ATP-d võrreldes NADH-ga (4).

Q-tsütokromosoom-c oksüreduktaas teise nimega tsütokromosoom-c reduktaas on III kompleks ning tema ülesandeks on katalüüsida NADH-Q oksüreduktaasi ja suksinaat-Q reduktaasi toimel toodetud QH<sub>2</sub> elektronide ülekannet tsütokromosoom-c (Cyt-C) oksüdeeritud vormile (4).

Tsütokromosoom-c oksüdaas ehk IV kompleks katalüüsib elektronide ülekannet Cyt-C taandatud vormilt molekulaarsele hapnikule, mis on lõppaktseptor. Seega nelja elektroni viimisega O<sub>2</sub>-le

taandatakse see kaheks veemolekuliks ning samas pumbatakse prootoneid mitokondri maatriksist välja (4).

Hingamisahela kompleks V ehk ATP süntaas kasutab ATP tootmiseks komplekside I–IV poolt genereeritud prootonigradiendi salvestatud energiat (7). Kompleks V koosneb kahest funktsionaalsest domeenist, millest üks domeen  $F_1$  asub mitokondriaalses maatriksis ning teine domeen  $F_0$  asub mitokondri sisemembraanis. Prootonid liiguvad membraanidevahelisest ruumist maatriksisse läbi  $F_0$ , mis kannab prootoni elektrokeemilise gradiendi tekitatud energia üle  $F_1$ -le, kus ADP fosforüülitakse ATP-ks (13).

Osa prootoneid võib ATP tootmisest sõltumatult uuesti maatriksisse siseneda, seda protsessi nimetatakse mitokondriaalseks lahtiühendamiseks või lahtisidestamiseks. Oksüdatiivse fosforüülimise korral seotakse hingamisahela redoksreaktsioonide energia ATP sünteesiga läbi ATP süntaasi, mis paikneb mitokondri sisemembraanil. Kuid see sidumine ei ole täielikult efektiivne, kuna prootonid võivad naasta mitokondriaalsesse maatriksisse näiteks indutseeritavate lekete ja spetsiaalsete valgukomplekside kaudu. Lekke tõttu töötab hingamisahel aktiivsemalt, et taastada prootongradiendi, tekitades soojust, mitte ATP-d (14). Prootonite leke suurendab hapniku tarbimise kiirust ja vähendab elektrokeemilist prootoni gradienti. See on oluline energia hajumise mehhanism, ja võib moodustada teatud juhtudel kuni 25% põhiainevahetuse kiirusest (15). Samas võib mitokondriaalne lahtiühendamine ja prootonite naasmine maatriksisse ilma ATP sünteesita kaitsta mitokondreid ka liigse ROS-i tekke eest (14).

Keemiliste lahtisidestajate abil võib indutseerida mitokondriaalset lahtiühendamist, kuna need väikesed molekulid muudavad mitokondri sisemembraani prootonitele läbitavaks põhjustades hingamisahela aktiveerumist ja hapniku tarbimise kiiret suurenemist. Need molekulid jagunevad kaheks peamiseks tüübiks: protonofoorseteks lahtiühendajateks ja mitteprotonofoorseteks. Protonofoorsed lahtiühendajad, nagu karbonüülsüaniid p-trifluorometoksüfenüülhüdrasoon (FCCP), on lipofiilsed nõrgad happed, mis suudavad läbida membraani laenguta kujul, kutsudes esile täieliku lahtisidestumise väga madalal kontsentratsioonil (vahemikus nM). Nende ainete optimaalset kontsentratsiooni kasutades aktiveeritakse ETA selle maksimumvõimsusel. Mitteprotonofoorid võivad põhjustada mitokondriaalset düsfunktsiooni, aktiveerides varjatud prootonite lekkeid spetsiifiliste valgukomplekside kaudu (14).

## 1.2 Soolevähk

Digestive Cancers Europe andmetel on kolorektaal ehk jäme- ja pärasoole vähk kasvajate hulgas sageduselt teine surma põhjustaja. Ainuüksi Euroopa Liidus sureb selle tõttu igal aastal ligikaudu 170 000 inimest. Arvatakse, et enamik soolevähkidest areneb adenoom-kartsinoomi järjestuse kaudu ehk polüübist vähini progresseerumise järjestus. Tavaliselt tekib inimese elu jooksul üks või mitu adenoomi, kuid valdav enamus healoomulisi adenome ei tungi limaskestale ega muutu pahaloomulisteks kartsinoomideks (16).

Soolevähk on multifaktoriaalne haigus, mida põhjustab kombinatsioon geneetilistest, keskkonna- ja elustiiliteguritest. Enamik soolevähi juhtudest (60-80%) on nn. juhuslikud, põhjustatud pigem keskkonnateguritest ning ei näi olevat seotud ühegi perekondliku taustafaktoriga (20-40% juhtudest) või tõestatud päriliku (5% juhtudest) eelsoodumusega (16). Üha rohkem andmeid

kinnitavad, et keskkonnategurid mõjutavad soolestiku mikroobide koostist ja funktsiooni ning see omakorda põhjustab muutusi jämesoole epiteelirakkudes, nende metaboolses regulatsioonis ning immuunvastuses (17). Üheks oluliseks vähi teket soodustavaks teguriks peetakse ka toidu valikut, mis sisaldab palju punast ja töödeldud liha, küllastunud rasvu ning vähe kiudaineid, puuvilju ja köögivilju. Samuti peetakse soolevähi tekke teguriks istuvat eluviisi, millest tingituna võib toimuda keha rasvumine ning tekkida ülekaalulisus (17). Kindlasti mõjutavad vähi teket alkohol ja suitsetamine. Kolorektaalvähi esineb sagedamini üle 50-aastastel inimestel, mis on tõenäoliselt tingitud vananemisest ning pikemast kokkupuutest toitumis- ja keskkonnateguritega, tekitades omandatud geneetilisi mutatsioone, mis võivad põhjustada kantserogeneesi. Samal ajal kui paljude teiste vähitüüpide, näiteks kopsuvähi, esinemissagedus on vähenemas, on kolorektaalvähi langusetrend aeglane ja mõnedes riikides see pigem suureneb (18). Eriti murelikuks teeb, et viimasel ajal on tõusnud kolorektaalvähi esmajuhtumite arv just nooremas vanuserühmas (20 - 49 aastased) (19). See informatsioon tekitab küsimuse, kas mingid muutused keskkonnas on aidanud kaasa kolorektaalvähi juhtumite kasvule.

### 1.3 Pestitsiidid

Pestitsiidid on taimekaitsevahendid, mille kasutamine on ette nähtud erinevate kahjurite vastu võitlemiseks või ebavajalike taimede kasvu reguleerimiseks. Pestitsiidi preparaadid sisaldavad vähemalt ühte toimeainet, mille funktsioonideks on: taimede või taimsete saaduste kaitsmine kahjurite või haiguste eest enne või pärast saagikoristust, taimede eluprotsesside mõjutamine, taimsete saaduste säilitamine, soovimatute taimede kasvu takistamine (20). Umbes kolmandik meie toidulauast on toodetud pestitsiidide abil, kuna ilma nende kasutamisetähtsuseks väheneks saagikus märgatavalt. Arvatakse, et puuviljatoodang väheneks 78%, köögiviljade saak 54% ja teraviljasaak 32%, seega on pestitsiididel oluline roll taimehaiguste vähendamisel ja saagikuse suurendamisel kogu maailmas. Pestitsiide klassifitseeritakse erinevate tunnuste ja näitajate järgi, nagu keemilised klassid, funktsionaalrühmad, toimeviisid ja toksilisus. Näiteks liigitatakse pestitsiide erinevate kahjurite sihtmärkide järgi: fungitsiide kasutatakse seente, insektitsiide kasutatakse putukate ning herbitsiide umbrohu hävitamiseks (21).

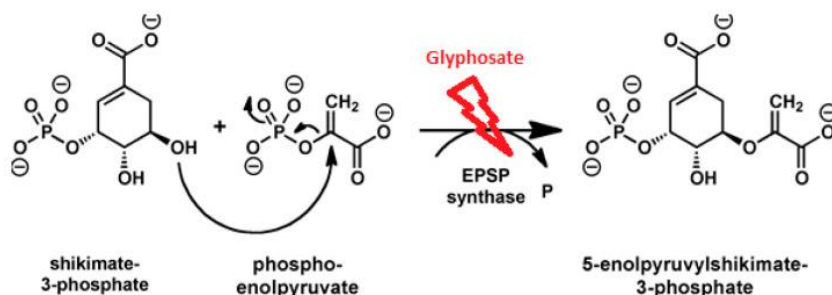
Pestitsiide kantakse sihtmärkorganismile, mille järel need lagunevad keemiliste reaktsioonide, mikroobide ja valguse toimel. Lagunemine võib kesta tunde, päevi või aastaid sõltuvalt keskkonnatingimustest ja pestitsiidi keemilisest omadusest. Nagu eelnevalt öeldud, on pestitsiidide lagunemist kolme tüüpi. Esiteks keemiline lagunemine, kus tänu keemilistele reaktsioonidele pinnases pestitsiidid lagunevad. Keemilise lagunemise kiirust ja tüüpi mõjutavad mulla temperatuur, pH tase, niiskus ja putukamürkide seondumine pinnasega. Teiseks lagunemise tüübiks on mikroobne lagunemine, kus lagunemine toimub mikroorganismide, näiteks seente ja bakterite poolt. Mikroobide lagunemist mõjutavad tegurid on hapnik, temperatuur, mulla niiskus ja pH ning mulla poorne struktuur. Kolmas lagunemise protsess on päikesevalguse toimel, kus lagunemise kiirus sõltub valguse intensiivsusest ja kokkupuute pikkusest (21).

Kuigi pestitsiidid takistavad paljude kahjurite levikut, mõjutab nende laialdane kasutus keskkonda negatiivselt, saastades mulda, õhku ja vett (1). Enamike hetkel kasutusel olevate pestitsiidide puhul on väidetud nende ohutust hinnates, et nende taimedele või seentele toksiline komponent ei ole aktiivne imetajate metaboolsete radade puhul, või vähemalt ei avalda ta mõju lubatud kasutuskontsentratsiooni piiresse jäädes. Samas on ilmunud mitmeid uuringuid ja ülevaateid, mis

näitavad seost pestitsiidide ja kõrgeenenud vähijuhtumite vahel (22). Näiteks on oluliselt kõrgeenenud risk saada kolorektaalvähi inimestel, kes elavad aktiivse põllumajanduse piirkonnas Hispaanias (22, 23). Glüfosaadi puhul on näidatud tema negatiivset mõju mikrobioomi koostisele ja lühikese ahelaga rasvhapete ainevahetusele hiirtes. Roundup vähendas seedesüsteemi ensüümide aktiivsust Hiina villkäppkrabidel (24). Seega on väga oluline jätkuvalt uurida kasutusel olevate pestitsiidide võimalikku toimet, seda eriti pikemaajalise mõju korral.

### 1.3.1 Glüfosaat ja Roundup

Glüfosaat [N-(fosfonometüül) glütsiin] on fosforaaniline herbitsiid, mida kasutatakse põllusaaduste kaitseks umbrohu vastu. Glüfosaadi omapäraks on hea lahustuvus hüdrofiilsetes lahustites, eriti vees (25). Glüfosaat sihib taimedes ensüümi 5-enoolpüruvüülshikimaat-3-fosfaadi süntaasi (EPSPS), mis vastutab taime kasvu kolme asendamatu aromaatses aminohappe tootmise eest, milleks on fenüülalaniin, trüptofaan ja türosiin (26). Glüfosaat pärsib EPSPS ensüümi, aeglustades oluliste metaboliitide ja valkude tootmist. Samuti häirib see mulla mikroobide ja taimede energiateid, mis on nende kasvuks ja ellujäämiseks hädavajalikud. Glüfosaat seondub EPSPS substraadi sidumissaidiga, mis pärsib selle aktiivsust ja blokeerib selle importi kloroplasti (Joonis 2) (25).



Joonis 2. Glüfosaadi seondumine EPSPS substraadi sidumissaidiga (25).

Roundup on kõige tuntum glüfosaadil põhinev herbitsiid, mis on väga tõhus umbrohtude vastane pestitsiid. Roundup Original® sisaldab toimeainena glüfosaati isopropüülamiinsoola kujul, samuti sisaldab ka pindaktiivset ainet, mida nimetatakse polüetoksüülitud rasvaamiiniks (POEA) (9). POEA sünteesitakse rasvhapetest, mis muundatakse rasvaamiinideks ja seejärel reageeritakse etüleenoksiidiga (27). Roundup Transorb R®-s on glüfosaadi kaaliumsoole lisaks ka pindaktiivseid aineid. Mõlemal juhul väidab tootja, et lisatud ained ei suurenda toksilisust, samas on näidatud, et lõpptooted on mürgisemad kui glüfosaat üksi (9).

Glüfosaat on ülemaailmselt kasutatav laia toimespektriga herbitsiid, mis kujutab endast potentsiaalset kahju pinnaveele. Roundup on potentsiaalne sisesekretsioonisüsteemi kahjustaja ning paljud uuringud on näidanud glüfosaadi põhiste herbitsiidide tsütotoksilisust (28).

### 1.3.2 NeemAzal

Looduslikud taimset päritolu pestitsiidid kuuluvad pestitsiidide hulka, mida viimasel ajal kasutatakse aina rohkem, et minimaliseerida orgaaniliste ja sünteetiliste pestitsiidide kahjulikku mõju. Taimsed insektitsiidid on keskkonnasõbralikud ega jäta oma biolagunevuse tõttu

veekeskkonda kahjulikke jääke. Üks neist taimedest on neemipuu, *Azadirachta indica*, mis on mitme otstarbeline insektitsiidsete, biomeditsiiniliste ja farmakoloogiliste omadustega taim, mida traditsiooniliselt kasutatakse paljude haiguste raviks. Asadirahtiini (AZA) saadakse neemipuu juurest, varrest, lehest ja seemnest. AZA-l on viirusevastased, antibakteriaalsed, seenevastased ja insektitsiidsete omadused. Põllumajanduses on AZA väga tõhus, laialdaselt sihtmärgispetsiifiline ja pigem vähem toksiline pestitsiid (29).

### **1.3.3 Boskaliid**

Fungitsiide kasutatakse peamiselt puu- ja köögiviljakasvatustes ning kogu maailma turust moodustab üle 35% pestitsiidide turuosas just fungitsiidid. Euroopat peetakse domineerivaks fungitsiidide turuks, kus peamiselt kasutatakse fungitsiide teraviljade (näiteks nisu), puuviljade (eriti intensiivselt viinamarjakasvatustes) ja köögiviljade kaitseks kahjurite eest. Fungitsiide kantakse kas seemnetele või otse põllukultuuridele (30).

Boskaliid [2-kloro-N(4'-kloro-bifenüül-2-üül)-nikotiinamiid] on fungitsiid, mis on mõeldud hallhallituse (*Botrytis cinerea*) ennetamiseks ja raviks (31). Suksinaatdehüdrogenaas (SDH) on oluline ensüüm raku hingamises. Boskaliid inhibeerib SDH ensüümi toimimist, seondudes Q-saidiga ja takistades ubikinooni redutseerimist. See omakorda piirab raku hingamist, põhjustades rakusurma (32).

## 2. Töö eesmärk

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks on uurida, kas ja kuidas mõjutavad Eestis enim kasutuses olevad taimekaitsevahendid: glüfosaat (glüfosaadil põhinev Roundup), boskaliid ja NeemAzaal, inimeste seedeelundkonna rakkude energia-ainevahetust. Mudelina kasutati Caco-2 rakuliini.

Projekti esimeseks osaks on määrata pestitsiidide kasvava kontsentratsiooni pikema-ajaline mõju Caco-2 rakkudele. Hüpoteesiks on, et pikema ajaperioodi vältel on vastava pestitsiidi sama kontsentratsiooni mõju rakkude elumusele oluliselt suurem.

Projekti teiseks osaks on kindlaks teha, kas pestitsiidide kontsentratsioonid, mis avaldavad vähest mõju rakkude elumusele, muudavad oluliselt energia tootmist rakkude mitokondrites. Hüpoteesiks on, et ka madalate pestitsiidide kontsentratsioonide juuresolekul toimuvad Caco-2 rakkude mitokondrite OXPHOS regulatsioonis ümberkorraldused, mida on võimalik kindlaks teha oksügraafilise meetodi abil.

Töö kolmandaks eesmärgiks on välja selgitada, kas kasvukeskkond mõjutab rakkude vastust pestitsiididele. Hüpoteesiks on, et füsioloogilisele keskkonnale sarnanevas söötmes on rakud tundlikumad pestitsiidide suhtes ja muutused OXPHOSi profiilis on nähtavamad. Katsed rakukultuuridega viiakse läbi nii tavapärastes kasvutingimustes kui ka söötmes, mis sarnaneb plasma koostisele ning on kudedele iseloomulikumas madalama hapnikusisaldusega (5%) keskkonnas.



### 3. Materjalid ja meetodid

#### 3.1 Reaktiivid

Seerum (*Fetal bovine seerum*, FBS), Trüpsiin-EDTA (0,5%) ja penitsiliin-streptomütsiin on firmalt Capricorn. Juhul kui ei ole märgitud teisiti olid ülejäänud kasutatud rakukultuuri lahused ja reaktiivid toodetud Corning poolt, ning muud kemikaalid ettevõttest Sigma-Aldrich.

#### 3.2 Caco-2 rakud

Katsetes kasutati Caco-2 rakke, mis on inimese kolorektaalse ehk käärsoole adenokartsinoomi rakud. Caco-2 rakkude algkultuur on pärit American Type Culture Collectionist; HTB-37™. Rakke kasvatati katseplaanile vastavas söötmes 37°C inkubaatoris 5% CO<sub>2</sub> juures. Ümberkülv toimus vastavalt kasvukiirusele 48-72 tunni järel kasutades madalat trüpsiini (0,05%) kontsentratsiooni.

#### 3.3 Rakkude kasvatamise tingimused.

Töös kasutati kahte erinevat söödet: DMEM (*Dulbecco Modified Eagle's Medium*, Corning) koos 4,5% glükoosi, L-glutamiini ja Na-püruvaadiga ning söödet Plasmax™. Plasmax™ on sööde, mis on optimeeritud peegeldama inimese plasmas leiduvate toitainete ja metaboliitide *in vivo* profiile, sealhulgas asendamataid ja mitteasendatavaid aminohappeid, aminohappe derivaate, orgaanilisi happeid ja muid polaarseid metaboliite (33). Täpsem Plasmax™ koostis on toodud lisas (Lisa 1) (34).

DMEM põhisöötmele lisati 10% seerumit (FBS), 100 U/ml penitsilliini ja 100 µg/ml streptomütsiini. Plasmax™ söötmele lisati 2,5% FBS, 100 U/ml penitsilliini ja 100 µg/ml streptomütsiini.

Imetajate rakukultuure kasvatatakse tavaliselt 5% CO<sub>2</sub> juures, mille tulemuseks on keskkond, mis sisaldab ligikaudu 18,6% O<sub>2</sub>. Seevastu enamik tervete inimkudede rakkudest paiknevad füsioloogilise O<sub>2</sub> osarõhu keskkonnas, mis jääb vahemikku umbes 0,5–10%, sõltuvalt asukohast ja veresoonkonna lähedusest (35). Need asjaolud suurendavad lahknevusi *in vitro* ja *in vivo* tingimuste vahel ja sellest tulenevalt otsustati kasvatada rakke lisaks tavatingimustele võrdlevalt ka Plasmax™ söötmes ja madalamal hapnikurõhul 5% O<sub>2</sub> juures.

#### 3.4 Mõõtelahus

Hapniku tarbimise kiiruse mõõtmiseks oksügraafis kasutati lahust Mitomeedium B: 0,5 mM EGTA, 3 mM MgCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O, 3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM tauriin, 20 mM HEPES, 110 mM sahharoos, 60 mM K-laktobionaat, 5 µM leupeptiin, 0,5 mM DTT, 2 mg/ml BSA.

#### 3.5 MTT test

MTT testi kasutatakse rakkude elumuse mõõtmiseks eri kasvutingimustel ja lisatud reagentide tsütotoksilisuse hindamiseks. MTT (3-(4,5-dimetüültiasool-2-üül)-2,5-difenüültetrasooliumbromiid) annab kollaka vesilahuse, mis metaboolselt aktiivsetes rakkudes esinevate dehüdrogenaaside ja redutseerivate ainete toimel redutseerimisel annab vees lahustumatu violetse-sinise formazaani (36). Formazaani kristallid lahustatakse dimetüülsulfoksiidiga (DMSO)

(37). Formazaani saab kvantifitseerida spektrofotomeetriliselt, õigesti optimeeritud tingimustes on saadud neeldumisväärtus otseselt võrdeline elusrakkude arvuga (38).

Caco-2 rakud külvati 96-kaevuga mikroplaatidele ning igasse kaevu viidi vastavalt katseprotokollile  $5 \cdot 10^3$  kuni  $15 \cdot 10^3$  kasvusöötmes suspendeeritud rakku. Enne pestitsiidide lisamist jäeti rakud kaheks tunniks inkubaatorisse, et nad kinnituksid plaadile.

MTT hindamine teostati vastavalt katseplaanile kuni nädala jooksul, täpsemalt teisel, neljandal ja seitsmendal päeval pärast rakkude külvamist. Nendel plaatidel, mille elumust hetkel ei hinnatud vahetati söödet (vajadusel koos vastava pestitsiidi sisaldusega) teisel ja neljandal päeval, et elumuse vähenemine ei oleks seotud substraatide puudusega.

Pestitsiididega katsete puhul viidi igasse pessa 75  $\mu$ l kasvusöötmes lahustatud  $7,5 \cdot 10^3$  rakku. Pärast ooteperioodi lisati veel 25  $\mu$ l söödet koos pestitsiididega, et saavutada soovitud lõpp-kontsentratsioon.

Elumuse katse läbiviimiseks lisati igasse pessa 10  $\mu$ l MTT lahust, mille järel inkubeeriti plaati 3 tundi 37°C juures. Seejärel lisati igasse pessa 150  $\mu$ l DMSO-t ja inkubeeriti 30 minutit 37°C juures. Viimasena teostati neeldumise spektrofotomeetriline mõõtmine, milleks kasutati spetsiaalset MTT toksilisuse programmi (FLUOstar Omega microplate reader (BMG Labtech) 570nm/630nm).

### 3.6 Oksügraafia

Oksügraafia on meetod, kus mõõdetakse hapniku kontsentratsiooni muutust lahuses, mis võimaldab hinnata proovi hapnikutarbimise kiirust (39). Mitokondriaalse OXPHOS protsessis on hapniku tarbimise kiirus otseselt seotud ATP sünteesiga. Seega on võimalik hapniku tarbimise kiirust mõõtes ja lisades spetsiifilisi substraate ja inhibiitoreid teha järeldusi OXPHOS vastavate komponentide toimimise kohta.

Antud katsetes kasutati Oxygraph-2k (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) instrumenti (40). Igal seadmel on kaks kambrit, kus hapniku kontsentratsioonide võrdlemiseks saab samaaegselt sisestada proovi ja registreerida hingamiskiirust. Mitokondriaalse funktsiooni hindamiseks lisatakse vastava mitokondriaalse hingamisahela kompleksi substraate ja inhibiitoreid. Protokollile vastavad substraadid või inhibiitorid süstitakse oksügraafi kambrisse, pärast iga lisandust oodatakse hapnikutarbimise kiiruse stabiliseerumist (*steady state*), fikseeritakse hapnikutarbimise määr ja arvutatakse tarkvara abil hapniku tarbimise kiirus vastavatel tingimustel (pikomoolides sekundis rakkude arvu kohta) (41).

#### 3.6.1 Rakkude ettevalmistus oksügraafiaks

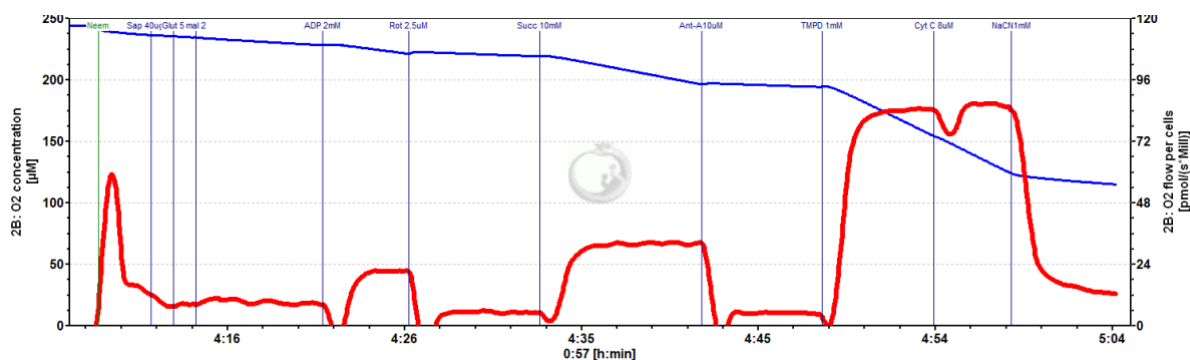
Oksügraafilise mõõtmise jaoks kasvatati rakke vastavalt katseplaanile kaks või neli ööpäeva koos vastava pestitsiidiga. Selleks koguti rakud kerge trüpsineerimisega (0,05%) kokku ning loeti üle Bürker-Türki kambri rakkude loendamise meetodil. Seejärel külvati rakud 100 mm Petri tassidele  $2,5 \cdot 10^6$  rakku tassi kohta ja lisati 8 ml söödet ning inkubeeriti 37°C juures kaks tundi. Pärast rakkude kinnitumist lisati 1 ml söödet koos vastava kontsentratsiooni pestitsiididega, et saavutada soovitud pestitsiidi lõppkontsentratsioon, kontrolli puhul lisati ainult 1 ml söödet. Pikema katse puhul vahetati teisel päeval sööde, lisades ka vastava koguse pestitsiidi.

Katse hommikul eemaldati rakkudel sööde ning seejärel pesti rakke kaks korda 5 ml PBSiga (fosfaatpuhverdatud soolalahus kaltsiumi ja magneesiumi vaba). Lisati 1 ml trüpsiin-EDTA (0,05%) ja inkubeeriti 37°C juures viis minutit. Pärast inkubeerimist kontrolliti, kas rakud on Petri tassi küljest tulnud lahti ning lisati 2 ml söödet, et lõpetada trüpsiini toime ning koguti rakud 15 ml tuubi. Rakud loendati Bürker-Türki meetodil ning seejärel tseentrifuugiti 125xg 5 minutit. Aspireeriti sööde, resuspendeeriti rakusade 2 ml PBS-is ning tseentrifuugiti 125xg 5 minutit PBS eraldamiseks. Seejärel aspireeriti PBS ja resuspendeeriti rakud mitomeedium B lahuses, mis sisaldas leupeptiini, DTT-d ja BSA-d 2 mg/ml.

### 3.6.2 Hingamisahela protokoll

Pärast rakkude süstimist kambrisse ja kambri sulgemist lisatakse kõigepealt (**Lisa 2**) saponiini, mis muudab rakkude välismembraani läbitavaks substraatidele kuid ei mõjuta mitokondri membraanide terviklikkust. Seejärel lisatakse lahusesse esmalt malaat (lõppkontsentratsioon 2 mM) ja glutamaat (5 mM), mis genereerivad NADH-d hingamisahela kompleksi I substraadina. Peale seda lisatakse ADP-d, et aktiveerida ATP süntaas ja registreeritakse kompleks I-sõltuv hingamine. Pärast stabiilse signaali saavutamist manustatakse kompleksi I inhibeerimiseks rotenooni. Järgnevalt lisatakse suksinaat, kompleksi II aktiveerimiseks ja registreeritakse kompleksist II sõltuv hingamine. Kompleks IV-sõltuva hingamise mõõtmiseks inhibeeritakse eelnevalt kompleksi III antimütsiin A lisamisega. Sellele järgnevalt stimuleeritakse maksimaalne kompleks IV-sõltuv hapnikutarbimine selle kompleksi kunstliku substraadi tetrametüülfenüleendiamiini (TMPD) manustamisega askorbaadi keskkonnas. TMPD võib hingamispuhvrts auto-oksüdeeruda, seetõttu lisatakse järgnevalt vastav inhibiitor naatriumtsüaniid ja arvutatakse maksimaalne kompleks IV-st sõltuv hingamiskiirus, lahutades hapniku tarbimise kiirus enne ja pärast naatriumtsüaniidi lisamist (41). CI hapniku tarbimise kiiruse arvutamiseks lahutatakse CI hingamiskiirusest see hapniku tarbimise kiirus, mis säilib CI spetsiifilise inhibiitori rotenooni juuresolekul. CII hapniku tarbimise kiirus arvutatakse, lahutades suksinaadiga saavutatud kiirusest antimütsiin A-ga säilinud hapniku tarbimine.

Tsütokroom-c paikneb mitokondriaalses membraanidevahelises ruumis ja osaleb hingamisahelas, kandes elektrone kompleksist III kompleksi IV. Kui mitokondri välismembraan on kahjustatud, vabaneb tsütokroom-c ja mitokondri hapnikutarbimine väheneb (41). Juhul kui tsütokroom-c lisamine hapniku tarbimise kiirust ei tõsta, näitab see mitokondri välismembraani intaktsust (**Joonis 3**).



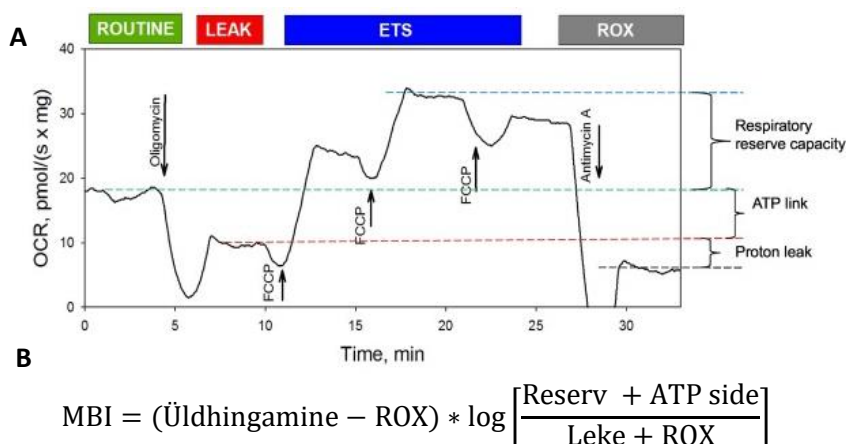
**Joonis 3. Näidis mõõtmise graafik Orobose oksügraafiast.** Graafikul näitab sinine joon hapniku osarõhku kambris ja punane joon näitab hapniku tarbimise kiirust (39). Neem- rakud, mis on kasvanud NeemAzali lisandiga söötmes, Sap –

saponiin, Glut – glutamaat, Mal – malaat, ADP – adensiindifosfaat, Rot – rotenoon, Succ – suksinaat, Ant-A – antimütsiin A, TMPD – tetrametüülfenüleendiiamiin askorbaadis, Cyt C – tsütokromosoom-c, NaCN – naatriumtsüaniid. Lisandite kontsentratsioonid on leitavad lisast (Lisa 2).

### 3.6.3 Intaktsete rakkude hapnikutarbimise protokoll

Rakud lisatakse oksügraafi kambrisse ja esmalt lisatakse rakkudele püruvaati (Lisa 3), mis liigub raku läbi vastavate transporterite. Seejärel registreeritakse rakkude hingamine, mis on seotud ATP sünteesiga sisemiste substraatide arvelt (*Routine* ehk üldine hapnikutarbimine) (Joonis 4A) (40). Järgnevalt inhibeeritakse oligomütsiini lisamisega ATP süntaas ja registreeritakse ATP sünteesist sõltumatu hapniku tarbimise kiirus (prootonite leke ehk *Leak*). Edasi tiitritakse lahust protonofoor karbonüülsüaniidi p-trifluorometoksüfenüülhüdrasooni (FCCP) kasvavates kontsentratsioonides ja määratakse maksimaalne hapniku tarbimise kiirus lahtisidestatud hingamisahela korral. Viimasena lisatakse mitokondriaalse hingamise inhibeerimiseks rotenoon ja antimütsiin A ja mõõdetakse mitokondrist sõltumatu hapniku tarbimine (ROX). Mitte-mitokondriaalne hapniku tarbimine (ROX) lahutatakse kõigist muudest hingamissagedustest (41).

Antud protokollist lähtuvaid hapniku tarbimise kiiruseid kasutades on võimalik arvutada raku mitokondri tööd iseloomustavaid näitajaid. Antud töös on kasutatud arvutatud suurust mitokondriaalset bioenergeetilist indeksit (MBI), mis algselt töötati välja vähiuuringutes, nimetusega mitokondriaalne onkobioenergeetiline indeks. MBI arvutamisel kasutatud protokoll ja parameetrid on toodud joonisel (Joonis 4B) (42).



**Joonis 4. (A) Intaktsete rakkude hapnikutarbimise protokoll ja sellest lähtuv (B) MBI arvutusvalem.** Alguses registreeritakse rakkude üldhingamine millest enamus on seotud ATP sünteesiga raku sisemiste substraatide arvelt (*Routine*). Järgnevalt inhibeeritakse ATP-süntaas oligomütsiini, järgi jääv hapnikutarve on leke (*Leak*, hapniku tarbimise kiirus, kui ATP sünteesi ei toimu), millest lõpus arvutatakse prootonite leke (*Proton leak*). Pärast FCCP astmelist lisamist, mis muudab mitokondri välismembraani prootonitele läbitavaks ehk toimub lahtisidestamine, on näha hingamisahela teoreetiline maksimaalne võime (ETS – *electron transport system capacity*). ROX – *residual oxygen consumption* – hapniku tarbimise kiirus kui hingamisahel on inhibeeritud (mõõdetakse pärast Antimütsiini lisamist)  $V_{Routine} - V_{Leak} = \text{ATP link}$  või  $\text{ATP dependent respiration} = \text{ATP side}$ , see näitab elektrontranspordi süsteemi võimekust kui see on seotud ATP sünteesiga.  $V_{ETS} - V_{Routine} = \text{Reserve capacity}$  – Reserv, näitab teoreetilist reservi, mis hingamisahelal on.  $V_{Leak} - V_{ROX} = \text{Proton leak}$  – prootonite leke, näitab elektrontranspordi süsteemi ebaefektiivsust (40, 42).

### **3.7 Andmete töötlus**

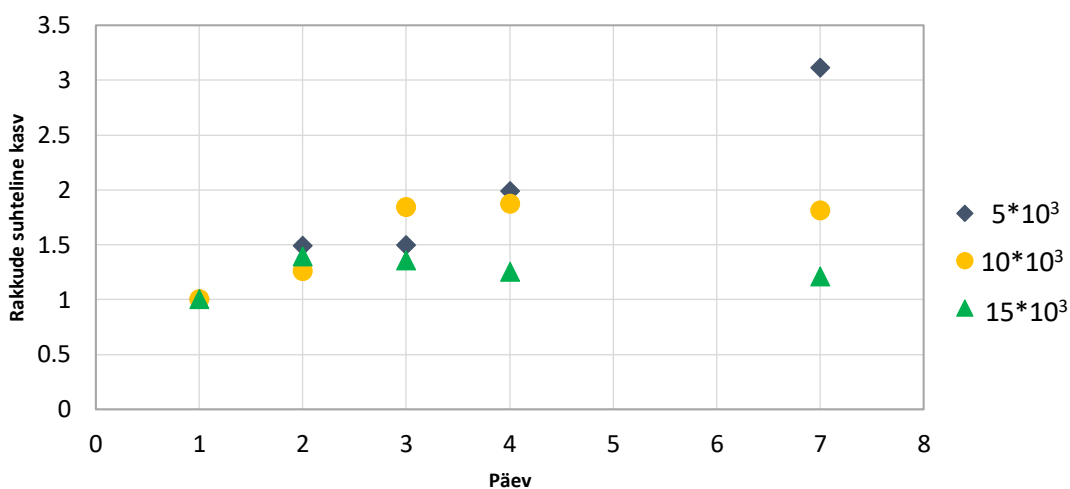
Andmete analüüsiks kasutati programme SigmaPlot ja MS Excel 2019. Tulemused on esitatud väärtuste keskmine  $\pm$  SEM. Statistiline olulisus töödeldud gruppide ja kontrolli vahel määrati kindlaks kasutades ANOVA testi. Kahe väärtuse vahelist erinevuse olulisust määrati Student's t-testi abil.

## 4. Tulemused

### 4.1 MTT katse tulemused

Selleks, et kindlaks teha, milline on sobiv rakkude kogus, mida kasutada pikaajalise elumuse testi läbiviimiseks, mõõdeti rakkude kasvu kolmest erinevast algkontsentratsioonist lähtudes. Kasutades MTT testi määrati rakkude kasvu seitsme päeva jooksul alustades kontsentratsioonist  $5 \cdot 10^3$ ,  $10 \cdot 10^3$  ja  $15 \cdot 10^3$  rakku kaevu kohta 96 kaevuga plaadil. Antud graafikul (**Joonis 5**) on tulemused esitatud suhtena rakkude arvu esimesel mõõtmisel (vastavalt MTT mõõtmise tulemusele). Graafikult on näha, et pannes kambrisse  $5 \cdot 10^3$  rakku, suureneb rakkude arv nädala jooksul ühtlases tempos. Samas kui panna rakke ühte kaevu  $10 \cdot 10^3$ , siis on näha, et teisel ja kolmandal päeval rakkude arv kasvab, kuid neljandal päeval suurt muutust kolmandaga võrreldes pole toimunud ehk juurdekasv on peatunud ning seitsmendal päeval on näha rakkude kasvu langust. Kui panna kaevu alguses  $15 \cdot 10^3$  rakku, siis teisel päeval on rakkude arv kasvanud võrreldes esimese päevaga, kuid juba kolmandal päeval hakkab rakkude arv kambris vähenema. See näitab, et antud kontsentratsioon on selgelt liiga kõrge antud kaevu pindala jaoks.

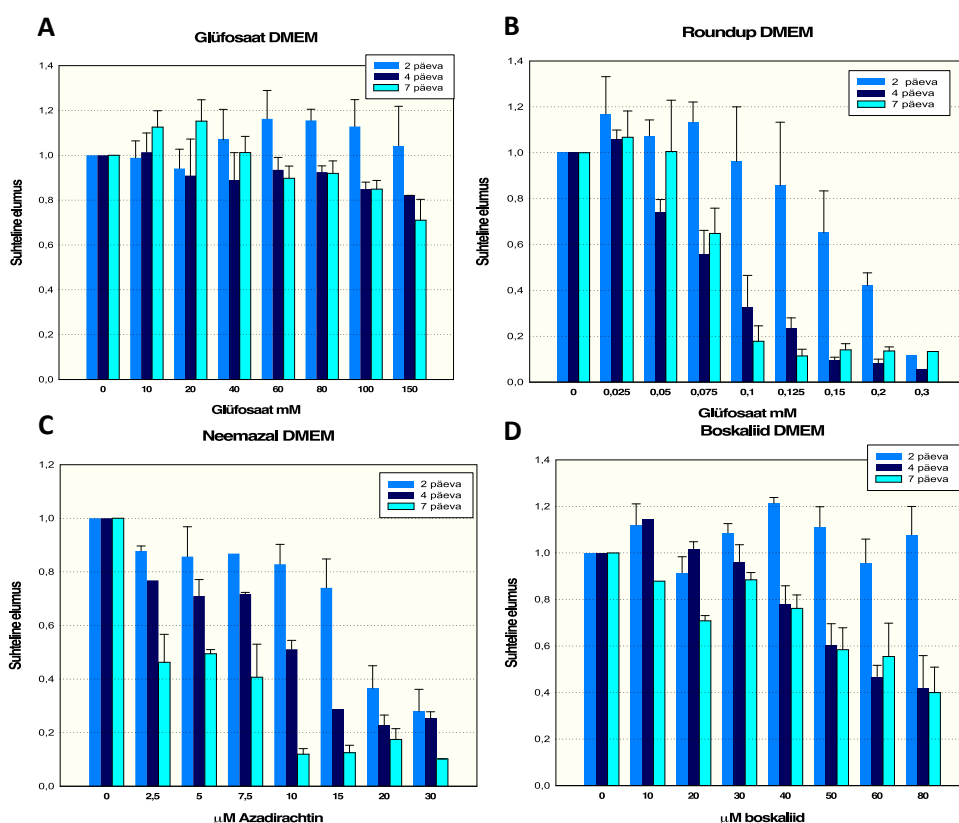
Pärast kaalutlemist otsustati lõplikuks rakkude arvuks ühes kaevus jätta  $7,5 \cdot 10^3$ , lähtudes sellest, et elumuse testis pestitsiididega rakkude arv väheneb, seega võiks katse esimeses faasis olla rohkem rakke kui  $5 \cdot 10^3$ .



**Joonis 5. Rakkude suhteline kasvugraafik.** X-teljel on kujutatud päevade arvu. Y-teljel rakkude suhtelist kasvu. Legend näitab kui palju rakke külvati ühte kaevu ( $5 \cdot 10^3$ ,  $10 \cdot 10^3$ ,  $15 \cdot 10^3$  rakku) 96-kaevuga plaadil.  $n=3$

Järgnevalt mõõdeti rakkude elumust pestitsiidide kasvavatel kontsentratsioonidel ning pikema ajaperioodi jooksul (7 päeva). Katsed viidi läbi kahes erinevas söötmes, DMEM ja Plasmax™, et võrrelda pestitsiidide mõju soolestiku rakkudele erinevate substraatide juuresolekul ja valida saadud tulemustest lähtuvalt vastavad pestitsiidide kontsentratsioonid oksügraafia katsete läbiviimiseks.

## 4.1.1 MTT DMEM



Joonis 6. Rakkude elumus DMEM söötmes. (A) glüfosaadi, (B) Roundupi, (C) NeemAzali, (D) boskallidi teise, neljanda ja seitsmenda päeva jooksul suhtena vastava päeva kontrollrakkude hulka. Veapostid tulemustes näitavad standarddviaga. n=4

Glüfosaadi (Joonis 6A) puhul on näha, et kaks päeva herbitsiidi juuresolekut ei mõjuta rakkude elumust ka kõrgematel kontsentratsioonidel. Rakkude elumus on sama kui võrdleme sama päeva prooviga, kuhu pole lisatud pestitsiidi. Pärast nelja- ja seitsmepäevast mõju on näha, et võrreldes kontrollprooviga on rakkude elumus kuni kontsentratsioonini 80 mM jäänud samaks, millest alates ta hakkab oluliselt langema ( $p < 0,01$ ).

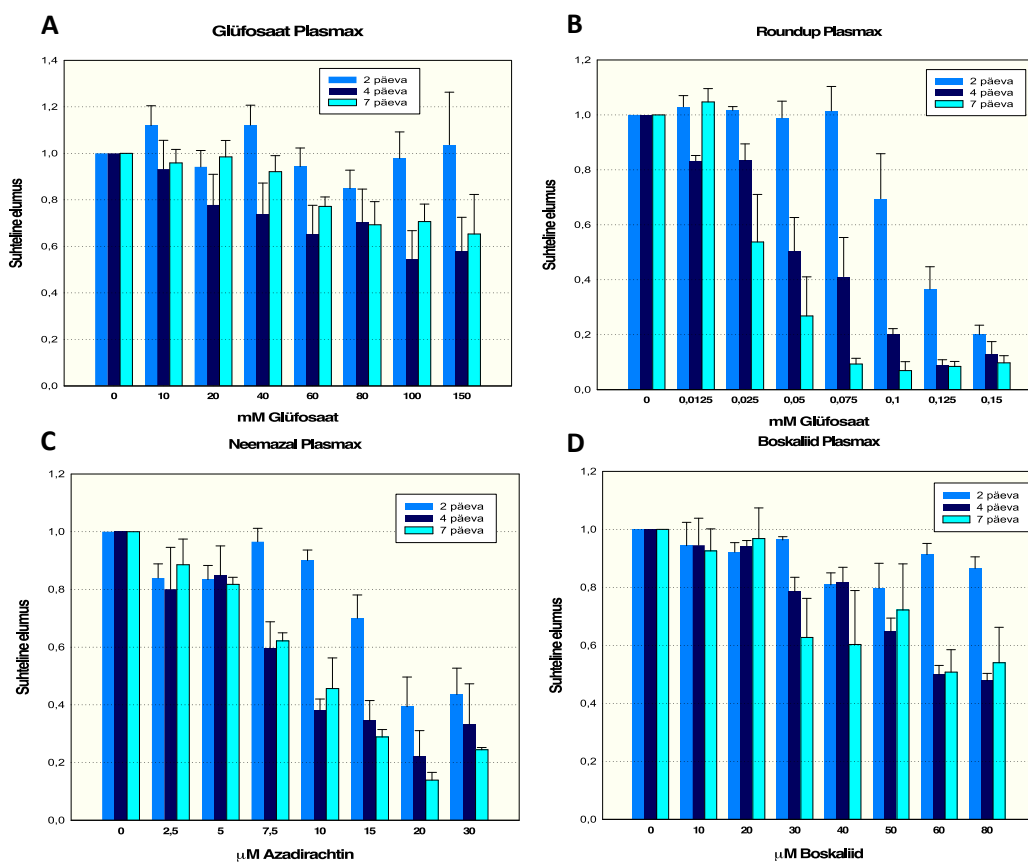
Roundup (Joonis 6B) kasutamisel glüfosaadi allikana on teisel päeval näha, et kuni kontsentratsioonini 0,125 mM ei mõjuta see oluliselt rakkude elumust võrreldes kontrollprooviga. Lisades Roundupi aga juba kõrgemas kontsentratsioonis, langeb rakkude elumus märgatavalt. Neljapäevasel mõjutusel on juba 0,075 mM glüfosaadi kontsentratsiooni juures rakkude elumus oluliselt langenud ( $p < 0,01$ ). Seitsmepäevase mõjutuse tulemus on sarnane neljanda päevaga, kus alates 0,075 mM glüfosaadi lisamisega toimub oluline elumuse langus. Roundupi puhul on kontsentratsioonid arvutatud vastavalt deklareeritud glüfosaadi sisaldusele tootes. Samas on näha, et kontsentratsioonid, millest alates on näha selget mõju rakkudele, erineb kümnetes kordades glüfosaadi kui reaktiivi omast. Edasistes oksügraafia katsetes otsustasime glüfosaadi mõju hindamiseks kasutada Roundupi kui reaalset toodet, mida kasutatakse taimekaitses.

NeemAzali (Joonis 6C) puhul on kahepäevase mõju puhul esialgu näha teatud elumuse langust, mis püsib samal tasemel kuni kontsentratsioonini 15 µM. Mõõtmistel pikema ajaperioodi järel on näha selget ajast sõltuvat rakkude elumuse langust juba 2,5 µM lisamisel rakkudele ( $p < 0,01$ ). Eriti

kiire langus ka madalamatel kontsentratsioonidel tekib seitsmendal päeval, näidates väga tugevat ajast sõltuvat mõju. Kõrgematel kontsentratsioonidel on rakkude elumus väga väike.

Boskaliidi (**Joonis 6D**) lisamisel rakkudele on näha, et kahepäevane töötlus mõjutab rakke minimaalselt. Samas pärast neljapäevast mõju on kuni kontsentratsiooni 30  $\mu\text{M}$  rakkude elumus üldjoontes sama, mis kontrollproovis, kuid juba 40  $\mu\text{M}$  boskaliidi mõjutab rakkude elumust oluliselt ( $p < 0,05$ ). Seitsmendal päeval boskaliidiga on näha rakkude elumuse olulist langust alates 10  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ). Sellest saab järeldada, et ka boskaliidi vähendab rakkude elumust oluliselt just pikema mõju tulemusena.

#### 4.1.2 MTT Plasmax™



**Joonis 7.** Rakkude elumus Plasmax™ söötmes (A) glüfosaadi, (B) Roundupi, (C) NeemAzali, (D) boskaliidi mõjul teise, neljanda ja seitsmenda päeva jooksul. Tulemustes olevad veapostid näitavad standardviga. n=4

Glüfosaadi (**Joonis 7A**) puhul ilmneb, et teisel päeval lisades glüfosaati kontsentratsioonides 10-150 mM ei mõjuta see rakkude suhtelist elumust võrreldes rakkudega, kus pestitsiidi pole lisatud. Nelja- ja seitsme-päevase mõjutuse järel on näha, et alates 60 mM kontsentratsioonist on rakkude suhteline elumus võrreldes kontrollprooviga oluliselt langenud ( $p < 0,07$ ). Siit saab järeldada, et puhta glüfosaadi pikaajalisel kasutamisel on mõju rakkude elumusele, kuid see on oluline ainult väga kõrgetel kontsentratsioonide pikemaajalise mõju korral.

Roundupi lisades (**Joonis 7B**) ei mõjuta see kahe päeva jooksul elumust oluliselt kuni glüfosaadi kontsentratsiooni 0,075 mM, kuid kui lisada pestitsiidi juba suuremas koguses, siis on näha suurt muutust rakkude elumuses võrreldes sama päeva kontrollprooviga ( $p < 0,05$ ). Neljapäevase mõju

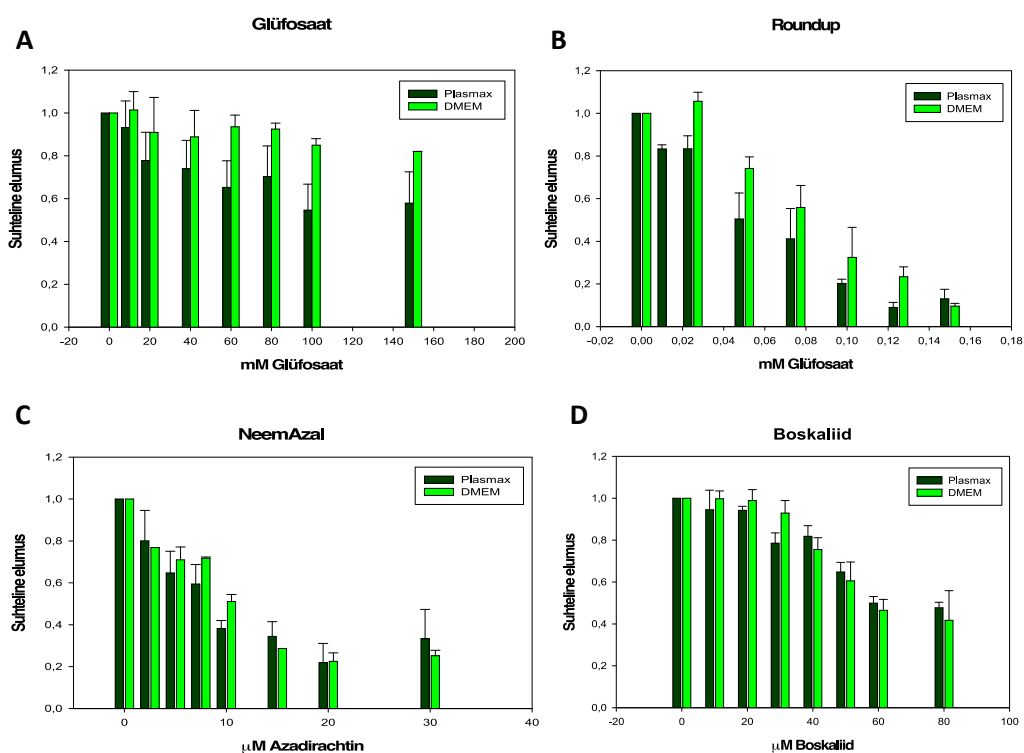


puhul on näha langust rakkude elumusele alates kontsentratsioonist 0,025 mM ja olulist langust alates 0,05 mM ( $p < 0,001$ ). Seitsmendal päeval on elumuse langus oluline juba alates kontsentratsioonist 0,025 mM ( $p < 0,05$ ).

NeemAzali (**Joonis 7C**) puhul on näha, et elumuse langus kahepäevasel mõjutusel algab 15  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ), samas kui pärast nelja- ja seitsmepäevast mõjutust on oluline elumuse langus alates kontsentratsioonist 7,5  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,01$ ).

Boskaliidi (**Joonis 7D**) puhul ei toimu kahepäevasel mõjutusel elumuse langust, samas pikema aja jooksul toimub elumuse oluline vähenemine alates kontsentratsioonist 30  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,01$ ).

#### 4.1.3 Plasmax™ versus DMEM



**Joonis 8.** Elumuse võrdlus kahes söötmes: Plasmax™ ja DMEM pärast neljapäevast mõjutust (A) glüfosaadiga, (B) Roundupiga, (C) NeemAzaliga, (D) boskaliidiga. Veapostid tulemustes näitavad standardviga.  $n=4$

Kui võrrelda rakkude elumust kahes söötmes, DMEM ja Plasmax™ pärast nelja päeva mõjutust pestitsiididega, siis nii glüfosaadi (**Joonis 8A**) kui Roundupi (**Joonis 8B**) puhul on näha, et Plasmax™ söötmes on pestitsiidi mõju tugevam ( $p < 0,05$ ), samas kui NeemAzali (**Joonis 8C**) ja boskaliidi (**joonis 8D**) puhul erinevust ei ole. Sellest järeldub, et füsioloogiliselt sarnasemas söötmes, milleks on Plasmax™ vähendab sama glüfosaadi kogus rakkude elumust oluliselt enam.

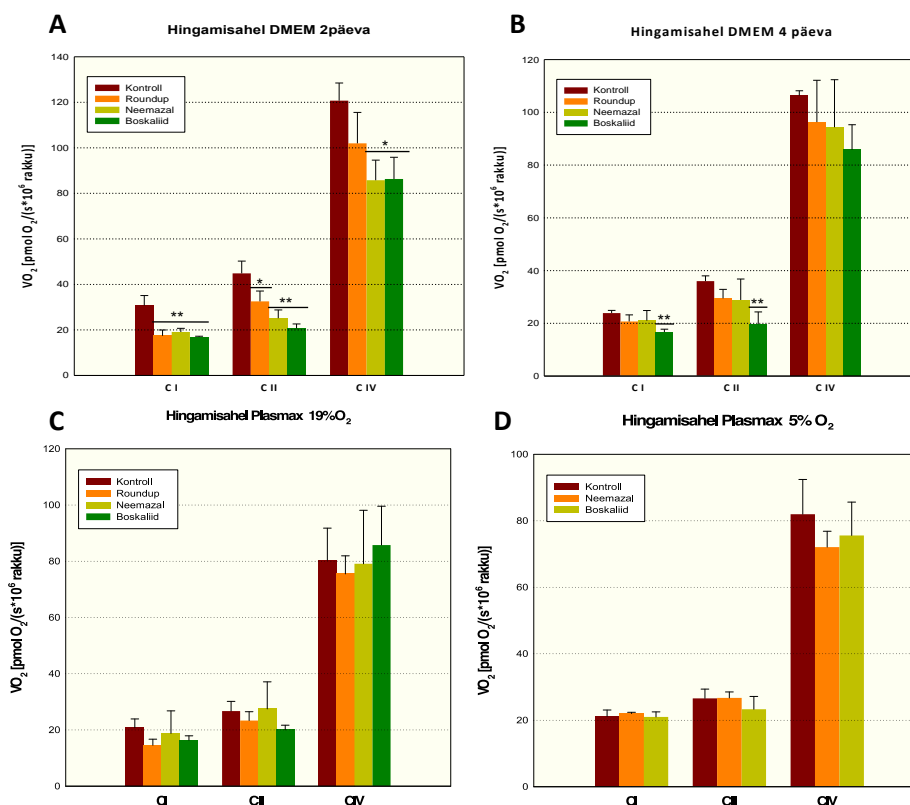
## 4.2 Oksügraafia

### 4.2.1 Hingamisahela protokollide tulemused

Esimese etapina viidi läbi katsed, kus rakke kasvatati pestitsiidide juuresolekul kahe päeva jooksul (48 tundi) (**Joonis 9A**). Mõjutuseks valiti pestitsiidide kontsentratsioonid, mis eelnevate MTT katsete tulemusel vähendasid elumust 20% (**Lisa 4**). Suurem kontsentratsioon valiti, et näha, kas antud pestitsiididel on mõju bioenergeetilistele parameetritele. Katsetes kasutati söödett DMEM.

Järgnevalt viidi läbi katsed, kus pestitsiidide mõju rakkudele kestis neli päeva. Selleks valiti kontsentratsioonid, kus eelnevate mõõtmiste tulemusel rakkude elumust vähenes 10% (**Lisa 4**). Katsed viidi läbi esmalt DMEM (**Joonis 9B**) ja siis Plasmax™ (**Joonis 9C**) söötmes.

Lisaks viidi katsed läbi Plasmax™ söötmes nelja päevase mõjutusega, kasvatades rakke madalamal (füsioloogilisel) 5% hapniku kontsentratsioonil (**Joonis 9D**).



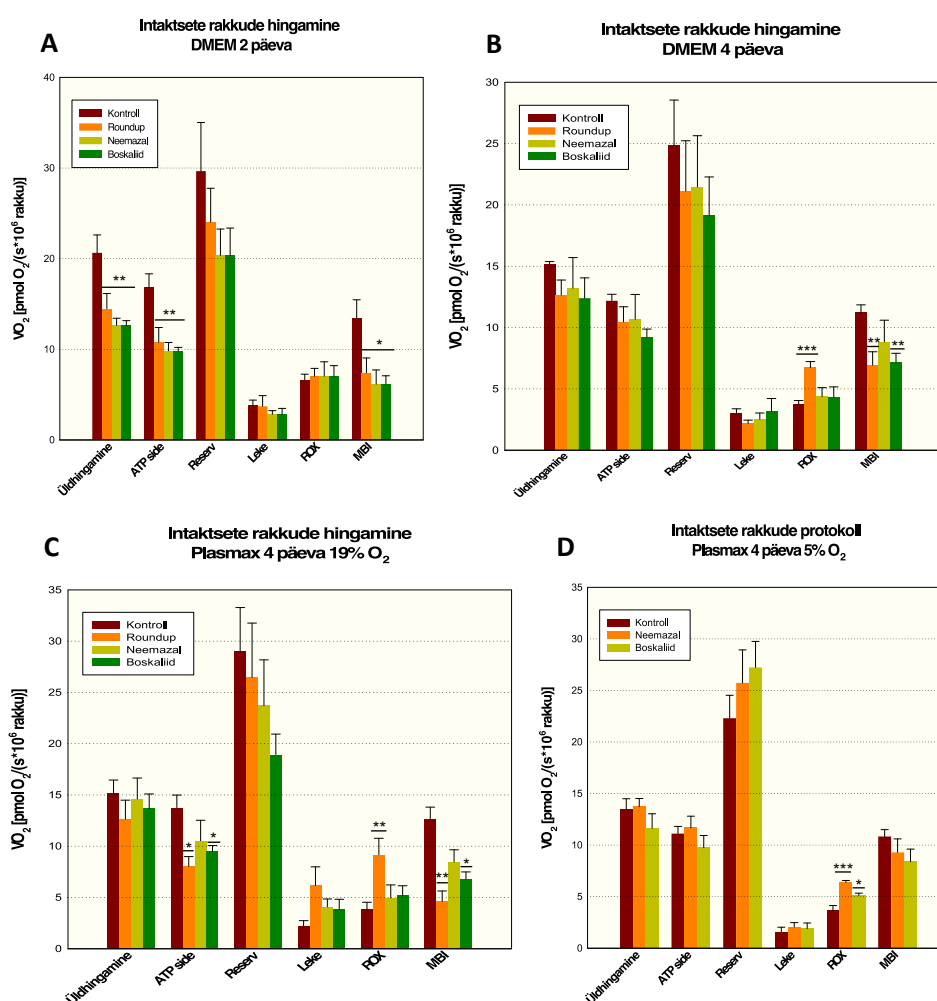
**Joonis 9.** Hingamisahela protokollide tulemused (A) pärast kahepäevast mõjutust pestitsiididega DMEM söötmes, (B) pärast neljapäevast mõjutust pestitsiididega DMEM söötmes, (C) Plasmax™ söötmes koos pestitsiididega 19% hapniku juures, (D) Plasmax™ söötmes koos pestitsiididega 5% hapniku juures. CI – kompleks I, CII – kompleks II, CIV – kompleks IV. Veapostid tulemustes näitavad standarddviaga. Kõiki tulemusi on võrreldud kontrolliga. \* p<0,05, \*\* p<0,01. n=6

Antud pestitsiidide kontsentratsiooni korral on pärast kahepäevast mõjutust (**Joonis 9A**) näha statistiliselt olulist langust nii esimese kui teise kompleksi hingamiskiiruses kõigi pestitsiidide korral võrreldes vastava kontrolliga.

Pärast neljapäevast mõjutust pestitsiididega (**Joonis 9B**) on võrreldes kontrolliga oluliselt langenud hingamiskiirus rakkudel, mis kasvasid boskaliidi lisandiga söötmes, seda nii esimese kui teise kompleksi puhul. Teiste pestitsiidide mõjul muutusi ei toimunud, kuigi ka neil võib täheldada teatud teise kompleksi hapniku tarbimise kiiruse vähenemist.

Plasmax™ söötmes kasvanud rakkude korral tulemustes statistiliselt olulist muutust ei täheldatud (**Joonis 9C, joonis 9D**), kuigi nii Roundupi kui boskaliidi puhul on teatud langus näha 19% hapniku korral.

## 4.2.2 Intaktsete rakkude hapnikutarbimise protokoll tulemused



**Joonis 10. Intaktsete rakkude hingamine (A) DMEM söötmes pärast kahepäevast mõjutust pestitsiididega, (B) DMEM söötmes pärast neljapäevast mõjutust pestitsiididega, (C) Plasmax™ söötmes pärast neljapäevast mõjutust pestitsiididega 19% O<sub>2</sub> juures, (D) Plasmax™ söötmes pärast neljapäevast mõjutust pestitsiididega 5% O<sub>2</sub> juures.** reserv – hingamisahela reservvõimsus, ATP side ehk ATP süntaasist sõltuv hapnikutarbimine, Leke – prootonite leke, MBI – mitokondriaalne bioenergeetiline indeks, FOX – mitte-mitokondriaalne hapniku tarbimine. Veapostid näitavad standardviga tulemustes. Kõiki tulemusi on võrreldud kontrolliga. \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001. n=6

Intaktsete rakkude protokoll järgi mõõtes on pärast kahepäevast (**Joonis 10A**) rakkude kasvu DMEM söötmes koos pestitsiidide kõrgema kontsentratsiooniga (**Lisa 4**) oluliselt langenud nii üldhingamine (p<0,01), ATP süntaasiga seotud hapniku tarbimine (p<0,01) kui ka reserv

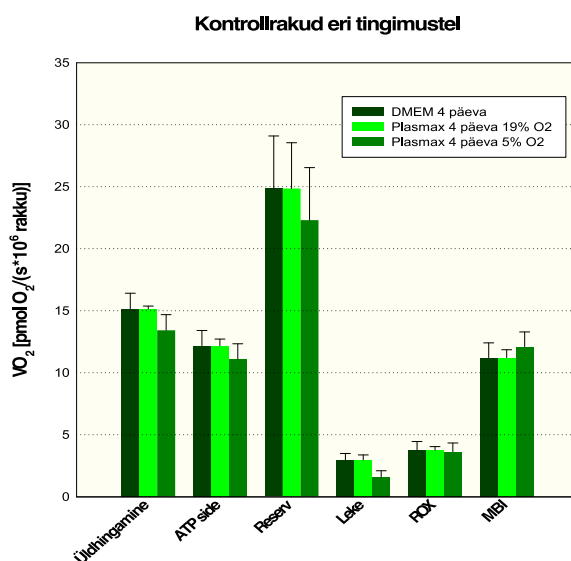
hapnikutarbimine. Prooton leke ja ROX tulemused ei erine võrreldes kontrolliga oluliselt aga arvutatud MBI ( $p < 0,05$ ) tulemused on tunduvalt madalamad kõigi pestitsiidide puhul võrreldes kontrolliga.

Pärast neljapäevast töötlust DMEM söötmes pestitsiide madalama kontsentratsiooniga (**Joonis 10B**) on Roundupi puhul näha olulist ROX kasvu ( $p < 0,05$ ). Samas on Boskaliidi mõjul langenud ATP sünteesiga seotud hingamine ( $p < 0,01$ ). MBI väärtus on madalam nii Roundupi kui ka boskaliidi puhul võrreldes kontrolliga ( $p < 0,01$ ).

Plasmax<sup>TM</sup>-is koos pestitsiididega kasvavate rakkude tulemustes on näha (**Joonis 10C**), et ATP sünteesiga seotud hapniku tarbimine on oluliselt madalam nii Roundupi kui ka boskaliidi korral. Roundupi puhul on oluliselt kõrgem ka ROX ( $p < 0,05$ ). MBI tulemused on kõigil pestitsiididel oluliselt madalamad kui kontrollil, eriti Roundupil ( $p < 0,01$ ).

Madalama hapniku keskkonnas mõõdetud rakkude korral (**Joonis 10D**) muudes väärtustes muutust ei täheldatud, siiski on hingamisahelaga mitte seotud hapniku tarbimine pestitsiididega oluliselt kõrgem kui kontrollrakkudes.

### 4.2.3 Kontrollrakkud eri tingimustel



**Joonis 11. Kontrollrakkud eri tingimustel.** reserv – hingamisahela reservvõimsus, ATP side ehk ATP süntaasist sõltuv hapnikutarbimine, Leke – prootonite leke, MBI – mitokondriaalne bioenergeetiline indeks, ROX – mitte-mitokondriaalne hapniku tarbimine. Veapostid näitavad standardviga. n=6

Võrreldes kontrollrakkude hapniku tarbimise kiirust pärast rakkude kasvatamist eri tingimustel (**Joonis 11**) on näha, et rakkude üldhingamisel erinevust ei ole, samuti nagu ka hapniku tarbimisel, mis on seotud ATP süntaasiga (ATP side). Madala hapniku keskkonnas (mis on tegelikult füsioloogiline kontsentratsioon) on näha pisut madalamat prootonleket, kuid see ei ole statistiliselt oluline, kuna katsete arv on hetkel väike ja viga seetõttu suur.

## 5. Arutelu

Energia tootmine rakus on aluseks kogu elutegevusele. Muutused substraatide saadavuses ja energia-ainevahetusega seotud ensüümide aktiivsuses mõjutavad kogu raku ainevahetust. Seega on muutused rakkude bioenergeetikas üheks tundlikuks näitajaks, mille alusel saab hinnata pestitsiidide võimalikku mõju kogu rakkude ainevahetusele.

Töö käigus läbi viidud katsete tulemused kinnitasid hüpoteesi, et pestitsiidi kogus, mis ei mõjuta rakkude elumust lühiajalise toime korral, vähendab seda aga oluliselt, kui toime on pikemaajaline. Roundupi juuresolekul on DMEMi söötmes kontsentratsioonil 0,075 mM mõju elumusele minimaalne, samas kui pärast nelja- ja seitsmepäevast toimet on elumuse langus võrreldes kontrolliga oluline. Plasmax™ söötmes on arvestatav elumuse langus näha pärast neljapäevast töötlust kontsentratsioonil 0,05 mM, ning pärast seitsmepäevast töötlust juba kontsentratsioonil 0,025 mM. Sama nähtus on täheldatav kõigi katses kasutatud pestitsiidide ja mõlema söötme puhul. Lisaks on glüfosaadil põhinevate pestitsiidide mõju rakkude elumusele tugevam, kui rakud on kasvanud füsioloogilises Plasmax™ söötmes, seda nii pikema kui lühema ajaperioodi jooksul. DMEMis kasvanud rakkudel ei ole Roundupi juuresolekul pärast kahepäevast töötlust drastilist elumuse langust kuni kontsentratsioonini 0,150 mM. Küll aga on Plasmax™-is kasvanud rakkudel väga oluline langus täheldatav 0,125 mM juures. Seega kinnitavad antud katsed, et toksiliste ainete mõju on kas sama või suurem füsioloogilises söötmes kasvanud rakkudel. Järelikult on oluline viia rakukultuuridega katsed läbi plasmale võimalikult sarnanevas kasvukeskkonnas. Lisaks kinnitasid tehtud katsed, et tooted, mida müüakse taimekaitsevahendina, omavad inimese rakukultuuridele kordades tugevamat mõju kui antud toodete komponendid eraldi. Sama tulemust on teiste rakukultuuridega leitud ka eelnevalt (43).

Hingamisahela komplekside protokollil abil mõõdetud hingamiskiirused näitavad, milline on eraldiseisvana iga mõõdetud kompleksi võimekus ATP-d toota. Töö käigus tehtud katsed, kus rakke kasvatati pestitsiidide lisanditega söötmes, näitavad, et kõrgematel pestitsiidi kontsentratsioonidel on oluline langus nii esimese kui teise kompleksi hingamises. Madalama pestitsiidide kontsentratsiooni juures on DMEM keskkonnas näha hingamise aktiivsuse langust pärast rakkude mõjutamist boskaliidiga. Boskaliidi algsel väljatöötamisel väideti, et kuigi tegemist on suktsinaat dehüdrogenaasi inhibiitoriga, pidurdab ta selektiivselt mitokondrite tööd seentes, mitte aga imetajate rakkudes. Samas on ka mitmed teised uuringud näidanud selle pestitsiidi mõju inimese rakuliinidele; näiteks HepG2 maksarakkude BJ fibroplastide hapniku tarbimise kiirusele (44).

Intaktsete rakkude protokollil abil mõõdetakse rakkude hapnikutarbimist nende sisemiste substraatide arvel, kasutades mitte ühte kompleksi, vaid hingamisahelat tervikuna. Üldhingamise tarbimine (*Basal oxygen consumption*) näitab, kui palju hapnikku mitokondrid vajavad, et rakud saaksid toetada põhilisi raku funktsioone ideaalsetes füsioloogilistes tingimustes. See tuleneb ATP tootmisest V kompleksis ja prootonite lekkest läbi mitokondri sisemembraani.

Läbi viidud katsete tulemustes on üldhingamises registreeritav oluline langus kõigi pestitsiidide puhul vaadeldav ainult pestitsiidide kõrgematel kontsentratsioonidel. Madalama kontsentratsiooni korral on pärast neljapäevast mõju teatav üldhingamise vähenemine märgatav Roundupi ja boskaliidiga mõjutatud rakkudes, kuid see ei ole statistiliselt oluline. Üldhingamine ei

näita kui efektiivne on ATP tootmine rakus, selle registreerimiseks inhibeeritakse ATP süntaas oligomütsiiniga ja väärtus, mille võrra hingamine väheneb on ATP-side.

ATP süntaasist sõltuv hapnikutarbimine ehk ATP-side (*ATP-link*) demonstreerib, millist osa üldhingamisest kasutatakse ATP sünteesiks V kompleksis. ATP sünteesist sõltuva hapnikutarbimise suurenemine viitab suurenenud ATP nõudlusele, samas kui selle vähenemine annab märku ATP nõudluse vähenemisest, substraadi puudumisest või OXPHOS-i kahjustusest. See osa hapniku tarbimisest, mis säilib pärast ATP süntaasi inhibeerimist, viitab prootonite lekke osakaalule üldhingamisest. Leke ehk prootonite leke on protsess, mille käigus prootonid sisenevad uuesti mitokondriaalsesse maatriksisse ilma ATP-süntaasi läbimata ning selle tulemusena hajub energia soojusena. Prootonleket võivad vahendada anioonikandjad ja lahtiühendavad valgud. Lekke suurenemist võib seostada sisemise mitokondriaalse membraani või hingamisahela komplekside kahjustusega. Teiseks võimaluseks, kuidas seletada seda tüüpi hapnikutarbimise kasvu, on nn. "elektronide libisemine". See on protsess, kus elektronid kantakse üle hingamisahela komplekside (kompleksid I, III ja IV) ilma prootoneid membraanidevahelisse ruumi pumpamata. Samuti on tõendeid selle kohta, et oksüdatiivne stress, mis võib kahjustada mitokondriaalset membraani või ETA komplekse, võib suurendada ATP-st sõltuvat hapnikutarbimist ja prootonite leket.

Tehtud katsed näitasid, et nii nagu üldhingamine, vähenes ka ATP sünteesiga seotud hapniku tarbimine kõrgematel pestitsiidide kontsentratsioonidel. Samas ei ole näha lekke olulist kasvu. Seega võib järeldada, et tegemist on hingamisahela töövõime üldise langusega, sest vähenenud on ka reserv, kuigi selle näitaja muutus ei ole statistiliselt oluline. See langeb kokku ka hingamisahela üksikute komplekside mõõtmisel saadud tulemusega.

Madalamatel pestitsiidide kontsentratsioonidel on DMEMi keskkonnas kasvanud rakkudel ATP sünteesiga seotud hapnikutarbimine langenud boskaliidi mõjul, samas kui Plasmax<sup>TM</sup>-is tavahapniku keskkonnas on olulist vähenemist näha nii boskaliidi kui ka Roundupi mõju tulemusena. Need tulemused näitavad veelkord, et boskaliid mõjutab negatiivselt ka imetaja rakkude mitokondreid ja konkreetset nende ATP sünteesi võimekust.

Maksimaalne hapnikutarbimine (*Maximum oxygen consumption*) - FCCP ja muude lahtisidestajate kasutamine võimaldab mõõta maksimaalset hapnikutarbimist ilma ATP süntaasi piiranguteta. Lahtisidestajad suurendavad hapnikutarbimist, muutes mitokondri sisemembraani prootonitele läbitavaks. Selle tulemusena näeb hingamisahela maksimaalset tööd ilma ATP süntaasi seatud piiranguta. Rakud kasutavad sisemisi substraate, glükoosi, püruvaati, glutamiini ja rasvhappeid redutseerivate ekvivalentide loomiseks ja ETA töötab maksimaalsel kiirusel, et taastada prootongradienti. Kõrge maksimaalne hingamine võrreldes üldhingamisega näitab, et rakud vajavad ainult osalist mitokondriaalset võimet energiavajaduse toetamiseks. Maksimaalse hapnikutarbimise vähenemine viitab võimalikule mitokondriaalsele düsfunktsioonile või metaboolsele ümberkorraldusele, nagu näiteks vähirakkude puhul.

Reservvõimsus (*Reserve capacity*) näitab seda osa hingamisahela hapniku tarbimise võimest, mis on rakul teoreetiliselt võimalik kasutada lisaks üldhingamisele. Selle suurus viitab lisaenergiale, mida raku mitokondrid võivad vajadusel toota. Reservvõimsus on erinevus kõige suurema energia vahel, mida rakk suudab toota, ja energia vahel, mida see toodab ATP sünteesiks. Reservvõimsus näitab, kui lähedal on rakk oma energiatootmise piirile. Seda lisaenergiat saab kasutada stressi ajal. Kasvajakududes võivad reservvõimsuse muutused olla seotud haiguse progresseerumisega ja

metastaseerumisega. Antud katsetes võib näha teatud langust reservvõimsuste väärtustes enamike pestitsiidide mõjul, samas on nende mõõtmiste vead suhteliselt suured ja seetõttu ei ole antud muutused statistiliselt olulised.

Pärast hingamisahela inhibeerimist säilinud jääk-hapnikutarbimine (ROX) ei ole seotud hingamisahela tööga. Kõrgenenud hapniku kasutamist mitokondris seostatakse kasvanud reaktiivsete hapnikuosakeste (ROS) sünteesiga, mis mõjutavad negatiivselt nii mitokondri tööd kui kogu raku toimimist. Oluliselt kõrgemat ROX väärtust võrreldes kontrolliga on näha neljapäevase Roundupi mõju tulemusena mõlemas söötmes.

Raku metaboolset profiili mõjutab oluliselt see, kuidas mitokondrid raku töötavad. Patoloogia tekkel raku metaboolne profiil muutub ja suure tõenäosusega teiseneb oluliselt ka energia-ainevahetus. See vastastikune regulatsioon on väga oluline vähirakkude uurimisel, et teha kindlaks, kuidas nende metaboolne profiil erineb normaalsete rakkude omast, et leida võimalikke sõlmpunkte ravimite väljatöötamiseks. Selleks, et paremini väljendada muutusi mitokondriaalses metabolismis, on välja töötatud seda iseloomustav indeks MBI, mida arvutatakse lähtudes intaktsete rakkude protokollis mõõdetud näitajatest. Kõrge MBI näitab head mitokondriaalset funktsiooni, OXPHOSi ja ATP-sünteesi efektiivsust. Vähenenud MBI viitab probleemidele mitokondriaalse OXPHOSi toimimises, seega mitokondrid ei tööta optimaalselt ja ATP süntees ei ole efektiivne. Seda langust võivad põhjustada mitmesugused tegurid, sealhulgas mitokondriaalne düsfunktsioon, oksüdatiivne stress või mitokondriaalse membraani kahjustus. On näidatud, et MBI on dünaamiline ja sõltub vähi korral kasvaja staadiumist, koe päritolust ja mikrokeskkonnast. Mitokondriaalne düsfunktsioon tekib siis, kui elektronide transpordiahel kaotab efektiivsuse ja stressi tõttu toodetakse vähem ATP-d. MBI on matemaatiline esitus, mis kirjeldab, kuidas vähi- või mõjutatud rakkudel on mitokondriaalne funktsioon ja ATP tootmise efektiivsus muutunud võrreldes normaalkoe (kontroll) rakkudega (42). Antud katsete tulemustes on näha, et pestitsiidide madalamatel kontsentratsioonidel on DMEM-is kasvanud rakkude puhul MBI langenud boskaliidi ja Roundupi puhul. Plasmax™-is kasvanud rakkudel on MBI langenud kõikide pestitsiidide korral. See tulemus näitab veelkord, et rakkudes tekkinud muutused on registreeritavad suurema tõenäosusega füsioloogilises söötmes.

Antud töö tulemusena leidis kinnitust hüpotees, et pikemaajalise mõju korral on sama pestitsiidi kontsentratsiooni mõju rakkude elumusele oluliselt suurem. Samuti võib kinnitada, et kasutades Plasmax™ söödet on rakkude tundlikkus pestitsiididele kas kõrgem või vähemalt sama.

Mitokondriaalse OXPHOSi analüüsi kokkuvõtteks võib teha järelduse, et kuigi kõrgetel kontsentratsioonidel on näha muutusi kõikide pestitsiidide korral, on madalamatel kontsentratsioonidel muutused loodusliku pestitsiidi, NeemAzali mõjul enamikes näitajates statistiliselt mitte olulised. Samas on NeemAzali puhul kõrgematel kontsentratsioonidel näha rakkude elumuse langust, seega tuleb ka seda pestitsiidi kasutada kaalutletult, ehk kasutada võimalikult madalaid kontsentratsioone ja jääda kindlasti lubatud koguste piiresse. Boskaliidi puhul on nii selle töö käigus läbiviidud katsete ja kui ka teiste rühmade katsetulemustes leitud oluline mõju imetajate rakkude mitokondritele. Lubatud ADI boskaliidi puhul on 0,12 µmol inimese keha kg kohta (45). See on samas suurusjärgus, nagu ka antud töö käigus kasutatud kontsentratsioonid. Boskaliid on pestitsiid, mida Põllumajandus- ja Toiduamet tuvastab igal aastal müügil olevate puu- ja juurviljade pestitsiidide sõelkontrollis, samas küll leitud kogused jäävad

lubatud piiridesse. Antud töö tulemused näitavad et küsimus kuidas mõjutab selline madal kuid püsiv boskaliidi olemasolu meie toidus seedesüsteemi rakke, vajab kindlasti edasisi uuringuid.

Antud katsete tulemused kinnitasid taas ka Roundupi tugevat toksilist mõju ning seda, et see on kordades kõrgem kui vastaval deklareeritud mõjuainel glüfosaadil. Sellega seoses peaks oluliselt rohkem uurima just konkreetseid müügil olevaid tooteid, sest ainete koosmõjul võib tekkida ka kumulatiivne efekt.



## Kokkuvõte

Kolorektaalset kartsinoomi peetakse teiseks kõige sagedasemaks vähitüübiks. Samal ajal kui paljude teiste vähitüüpide, nagu näiteks kopsuvähi esinemissagedus on vähenemas, on kolorektaalvähi langusetrend aeglane ja mõnedes riikides isegi suurenev. Eriti murelikuks teeb, et kui seni on kolorektaalvähk pigem vanema vanuserühma haigus, siis viimasel ajal on tõusnud juhtumite arv just nooremas vanuserühmas (20 - 49 aastased). Soolevähi tekkepõhjused on paljuski veel ebaselged, aga samas peetakse keskkonnast ja elustiilist tulenevaid mõjureid väga oluliseks. Üheks ainete rühmaks, mis võivad muuta meie seedesüsteemi rakkude ainevahetust, on meie toidus esinevad pestitsiidid. Energia tootmine rakus on aluseks kogu elutegevusele. Muutused energia-ainevahetusega seotud substraatide saadavuses ja ensüümide aktiivsuses mõjutavad raku ainevahetust tervikuna. Seega on muutused rakkude bioenergeetikas tundlik näitaja, mille alusel saame hinnata pestitsiidide võimalikku mõju kogu rakkude ainevahetusele.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk oli uurida, kas Eestis enim kasutuses olevad taimekaitsevahendid mõjuvad inimeste seedeelundkonna rakkude energia-ainevahetusele pärssivalt. Projekti käigus sooviti ka kindlaks teha, kas pikemaajalisem toime ja kasvukeskkond suurendavad rakkude tundlikkust pestitsiididele. Hüpooteeside tõestamiseks tehti katseid Caco-2 rakkudega, mis viidi läbi nii tavapäraustes kasvutingimustes (DMEM) kui ka söötmes, mis sarnaneb koe plasma koostisele Plasmax™ ning koele iseloomulikumas madalama hapnikusisaldusega (5%) keskkonnas. Katsetes kasutati nelja erinevat pestitsiidi erinevatel kontsentratsioonidel – glüfosaati, glüfosaadil põhinevat taimekaitsevahendit Roundup, boskaliidi ja NeemAzali.

Kinnitust leidis püstitatud hüpootees, et sama pestitsiidi kontsentratsiooni juures on rakkude elumuse langus oluliselt suurem pikemaajalise mõju puhul. Katsete tulemused näitasid ka seda, et pestitsiidide toksiline mõju on kas sama või suurem füsioloogilises söötmes kasvanud rakkudel, mis kinnitas teist hüpooteesi ja näitas, et on oluline uurida rakukultuure füsioloogiliselt kohases kasvukeskkonnas.

Rakkude mitokondrites toimunud muutuste hindamiseks kasutati kahte protokollit – hingamisahela ja intaktsete rakkude hapnikutarbimise protokollit. Hingamisahela protokolliga vaadeldi, milline on hapniku tarbimise kiirus lähtudes elektronide voost läbi konkreetse kompleksi küllastunud substraatide keskkonnas ja seega antud kompleksi võimekus ATP-d tootmist toetada. Intaktsete rakkude protokolliga mõõdeti hingamisahela võimekust tervikuna. Mitokondriaalse oksüdatiivse fosforüülimise analüüsi tulemustest järelalus, et kõikide pestitsiidide puhul toimub kõrgematel kontsentratsioonidel oluline langus mitokondriaalse ainevahetuse aktiivsuses. Pestitsiidi madalatel kontsentratsioonidel toimub statistiliselt oluline muutus ainult boskaliidi ja Roundupi puhul. Sellest järelalus, et püstitatud hüpootees - madalad pestitsiidi kontsentratsioonid mõjutavad Caco-2 rakkude mitokondrite oksüdatiivset fosforüülimist, leidis osaliselt kinnitust. Töö tulemustest saab järelalus, et uuritud pestitsiididel on toksiline mõju inimese rakkudele ning on oluline põhjalikumalt uurida müügil olevaid taimekaitsevahendeid.

## Tänuavaldus

Soovin tänada oma juhendajat Kersti Teppi suurepärase juhendamise ja toe eest nii eksperimentaalse osa teostamisel kui ka käesoleva töö kirjutamisel.

Soovin tänada ka KBFI Keemilise bioloogia uurimisrühma juhti Tuuli Käämbret, kes andis võimaluse uurimisrühmas bakalaureusetööd teha. Samuti tänan nooremteadur Leonardo Giuseppe Auditantot, kes abistas katsetel. Lisaks tänusõnad kõikidele teistele KBFI töötajatele, kes andsid nõu lõputöö valimisel.

Lõpetuseks soovin tänada keelekorrektuuri eest Karl Robert Konradit ja Kaarel Koeli. Samuti suured tänusõnad perekonnale ja sõpradele, kes tundsid huvi mu töö vastu, innustasid ja olid toeks selle valmimisel.

## Kasutatud kirjandus

1. Pereira LC, de Souza AO, Bernardes MFF, Pazin M, Tasso MJ, Pereira PH, et al. A perspective on the potential risks of emerging contaminants to human and environmental health. *Environ Sci Pollut Res Int* [Internet]. 2015 Sep 10 [cited 2023 Apr 28];22(18):13800–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26201652/>
2. Kalyabina VP, Esimbekova EN, Kopylova K V., Kratasyuk VA. Pesticides: formulants, distribution pathways and effects on human health – a review. *Toxicol Rep* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2023 Apr 30];8:1179. Available from: </pmc/articles/PMC8193068/>
3. Maimets T, Kuuse S, Alamäe T, Arend A, Gerhold J, Ingerpuu S, et al. *Rakubioloogia. Viikmaa M, Sikut R, editors. Tartu : Tartu Ülikooli Kirjastus; 2018. 1–1080 p.*
4. Tymoczko JL, Berg JM, Stryer L, (Tõlkijad: Mikelsaar RH, Tõugu V, Samel N, et al.). *Biokeemia: Lühikursus: õpik kõrgkoolidele. Tallinn: Tallinn : TTÜ Kirjastus; 2016. 1-832 p.*
5. Yan C, Duanmu X, Zeng L, Liu B, Song Z. Mitochondrial DNA: Distribution, Mutations, and Elimination. *Cells* [Internet]. 2019 Apr 1 [cited 2023 Mar 7];8(4). Available from: </pmc/articles/PMC6523345/>
6. Annesley SJ, Fisher PR. Mitochondria in Health and Disease. *Cells* [Internet]. 2019 Jul 1 [cited 2023 Mar 7];8(7). Available from: </pmc/articles/PMC6678092/>
7. Van Der Blik AM, Sedensky MM, Morgan PG. Cell Biology of the Mitochondrion. *Genetics* [Internet]. 2017 Nov 1 [cited 2023 Mar 23];207(3):843. Available from: </pmc/articles/PMC5676242/>
8. Guan S, Zhao L, Peng R. Mitochondrial Respiratory Chain Supercomplexes: From Structure to Function. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022 Nov 1 [cited 2023 Mar 7];23(22). Available from: </pmc/articles/PMC9696846/>
9. Strilbyska OM, Tsiumpala SA, Kozachyshyn II, Strutynska T, Burdyliuk N, Lushchak VI, et al. The effects of low-toxic herbicide Roundup and glyphosate on mitochondria. *EXCLI J* [Internet]. 2022 Jan 3 [cited 2023 Mar 23];21:183. Available from: </pmc/articles/PMC8859649/>
10. Kobayashi A, Azuma K, Ikeda K, Inoue S. Mechanisms Underlying the Regulation of Mitochondrial Respiratory Chain Complexes by Nuclear Steroid Receptors. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 Sep 2 [cited 2023 Apr 30];21(18):1–17. Available from: </pmc/articles/PMC7555717/>
11. Tang JX, Thompson K, Taylor RW, Oláhová M. Mitochondrial OXPHOS Biogenesis: Co-Regulation of Protein Synthesis, Import, and Assembly Pathways. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2023 Apr 29];21(11):1–32. Available from: </pmc/articles/PMC7312649/>
12. Santulli G, Lewis D, des Georges A, Marks AR, Frank J. Ryanodine Receptor Structure and Function in Health and Disease BT - Membrane Protein Complexes: Structure and Function

- [Internet]. Vol. 87, Membrane Protein Complexes: Structure and Function. Springer Singapore; 2018 [cited 2023 May 9]. 329–352 p. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-981-10-7757-9\\_11](http://link.springer.com/10.1007/978-981-10-7757-9_11)
13. Jonckheere AI, Smeitink JAM, Rodenburg RJT. Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *J Inherit Metab Dis* [Internet]. 2012 Mar [cited 2023 May 1];35(2):211. Available from: </pmc/articles/PMC3278611/>
  14. Lippe G, Coluccino G, Zancani M, Baratta W, Crusiz P. Mitochondrial F-ATP Synthase and Its Transition into an Energy-Dissipating Molecular Machine. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2019 [cited 2023 May 1];2019. Available from: </pmc/articles/PMC6501240/>
  15. Cadenas S. Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2018 Sep 1;1859(9):940–50.
  16. Tian J, Afebu KO, Bickerdike A, Liu Y, Prasad S, Nelson BJ. Fundamentals of Bowel Cancer for Biomedical Engineers. *Ann Biomed Eng* [Internet]. 2023 Apr 1 [cited 2023 Apr 25];51(4):679. Available from: </pmc/articles/PMC9927048/>
  17. Song M, Chan AT. Environmental factors, gut microbiota, and colorectal cancer prevention. *Clin Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2023 May 4];17(2):275. Available from: </pmc/articles/PMC6314893/>
  18. Cardoso R, Guo F, Heisser T, Hackl M, Ihle P, De Schutter H, et al. Colorectal cancer incidence, mortality, and stage distribution in European countries in the colorectal cancer screening era: an international population-based study. *Lancet Oncol* [Internet]. 2021 Jul 1 [cited 2023 May 13];22(7):1002–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34048685/>
  19. Vuik FER, Nieuwenburg SAV, Bardou M, Lansdorp-Vogelaar I, Dinis-Ribeiro M, Bento MJ, et al. Increasing incidence of colorectal cancer in young adults in Europe over the last 25 years. *Gut* [Internet]. 2019 [cited 2023 May 13];68(10):1820. Available from: </pmc/articles/PMC6839794/>
  20. Bondareva L, Fedorova N. molecules Pesticides: Behavior in Agricultural Soil and Plants. 2021 [cited 2023 Mar 5]; Available from: <https://doi.org/10.3390/molecules26175370>
  21. Tudi M, Ruan HD, Wang L, Lyu J, Sadler R, Connell D, et al. Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the Environment. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2023 Apr 17];18(3):1–24. Available from: </pmc/articles/PMC7908628/>
  22. Matich EK, Laryea JA, Seely KA, Stahr S, Su LJ, Hsu PC. Association between Pesticide Exposure and Colorectal Cancer Risk and Incidence: A Systematic Review. *Ecotoxicol Environ Saf* [Internet]. 2021 Aug 1 [cited 2023 May 13];219:112327. Available from: </pmc/articles/PMC8694176/>

23. Parrón T, Requena M, Hernández AF, Alarcón R. Environmental exposure to pesticides and cancer risk in multiple human organ systems. *Toxicol Lett.* 2014 Oct 15;230(2):157–65.
24. Giambò F, Teodoro M, Costa C, Fenga C. Toxicology and Microbiota: How Do Pesticides Influence Gut Microbiota? A Review. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. 2021 Jun 1 [cited 2023 May 13];18(11):5510. Available from: /pmc/articles/PMC8196593/
25. Singh S, Kumar V, Gill JPK, Datta S, Singh S, Dhaka V, et al. Herbicide Glyphosate: Toxicity and Microbial Degradation. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. 2020 Oct 2 [cited 2023 Mar 7];17(20):1–18. Available from: /pmc/articles/PMC7602795/
26. Leino L, Tall T, Helander M, Saloniemi I, Saikkonen K, Ruuskanen S, et al. Classification of the glyphosate target enzyme (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) for assessing sensitivity of organisms to the herbicide. *J Hazard Mater.* 2021 Apr 15;408:124556.
27. Tush D, Meyer MT. Polyoxyethylene Tallow Amine, a Glyphosate Formulation Adjuvant: Soil Adsorption Characteristics, Degradation Profile, and Occurrence on Selected Soils from Agricultural Fields in Iowa, Illinois, Indiana, Kansas, Mississippi, and Missouri. *Environ Sci Technol* [Internet]. 2016 Jun 7 [cited 2023 May 7];50(11):5781–9. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.est.6b00965>
28. Stur E, Aristizabal-Pachon AF, Peronni KC, Agostini LP, Waigel S, Chariker J, et al. Glyphosate-based herbicides at low doses affect canonical pathways in estrogen positive and negative breast cancer cell lines. *PLoS One* [Internet]. 2019 Jul 1 [cited 2023 Apr 30];14(7). Available from: /pmc/articles/PMC6622539/
29. Korkmaz N, Örün İ. Effects of pesticide NeemAzal-T/S on thyroid, stress hormone and some cytokines levels in freshwater common carp, *Cyprinus carpio* L. <https://doi.org/10.1080/1556954320211895841> [Internet]. 2021 [cited 2023 Apr 16];41(2):496–505. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15569543.2021.1895841>
30. Zubrod JP, Bundschuh M, Arts G, Brühl CA, Imfeld G, Knäbel A, et al. Fungicides: An Overlooked Pesticide Class? *Environ Sci Technol* [Internet]. 2019 Apr 2 [cited 2023 Apr 17];53(7):3347–65. Available from: /pmc/articles/PMC6536136/
31. Bhatt D, Srivastava A, Srivastava PC, Sharma A. Evaluation of three novel soil bacterial strains for efficient biodegradation of persistent boscalid fungicide: Kinetics and identification of microbial biodegradation intermediates. *Environmental Pollution.* 2023 Jan 1;316:120484.
32. Pearce TL, Wilson CR, Gent DH, Scott JB. Multiple mutations across the succinate dehydrogenase gene complex are associated with boscalid resistance in *Didymella tanacetii* in pyrethrum. *PLoS One* [Internet]. 2019 Jun 1 [cited 2023 May 7];14(6). Available from: /pmc/articles/PMC6586343/

33. The future of Cancer Cell Culture | Case study | CancerTools.org [Internet]. [cited 2023 Apr 16]. Available from: <https://www.cancertools.org/case-study/the-future-of-cancer-cell-culture>
34. Plasmax TM MEM IMDM DMEM DMEM/ F-12 F-12 Plasmax TM formulation RPMI 1640 Plasmax TM [Internet]. [cited 2023 May 10]. Available from: [https://9406360.fs1.hubspotusercontent-na1.net/hubfs/9406360/Product%20Files/Media/Plasmax/Plasmax\(TM\)%20formulation%20compared%20to%20historic%20media%20-%20CancerTools.org.pdf](https://9406360.fs1.hubspotusercontent-na1.net/hubfs/9406360/Product%20Files/Media/Plasmax/Plasmax(TM)%20formulation%20compared%20to%20historic%20media%20-%20CancerTools.org.pdf)
35. Ferguson DCJ, Smerdon GR, Harries LW, Dodd NJF, Murphy MP, Curnow A, et al. Altered cellular redox homeostasis and redox responses under standard oxygen cell culture conditions versus physioxia. *Free Radic Biol Med*. 2018 Oct 1;126:322–33.
36. Stockert JC, Blázquez-Castro A, Cañete M, Horobin RW, Villanueva Á. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem*. 2012 Dec 1;114(8):785–96.
37. Babini G, Morini J, Barbieri S, Baiocco G, Ivaldi GB, Liotta M, et al. A Co-culture Method to Investigate the Crosstalk Between X-ray Irradiated Caco-2 Cells and PBMC. *J Vis Exp* [Internet]. 2018 Jan 30 [cited 2023 Apr 18];2018(131):56908. Available from: </pmc/articles/PMC5912320/>
38. Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I. The mtt assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2023 Apr 18];22(23). Available from: </pmc/articles/PMC8657538/>
39. Bird MJ, Adant I, Windmolders P, Elst I Vander, Felgueira C, Altassan R, et al. Oxygraphy Versus Enzymology for the Biochemical Diagnosis of Primary Mitochondrial Disease. *Metabolites* [Internet]. 2019 Oct 10 [cited 2023 Mar 7];9(10):220. Available from: </pmc/articles/PMC6835216/>
40. Ounpuu L, Klepinin A, Pook M, Teino I, Peet N, Paju K, et al. 2102Ep embryonal carcinoma cells have compromised respiration and shifted bioenergetic profile distinct from H9 human embryonic stem cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2017 Aug 1;1861(8):2146–54.
41. Djafarzadeh S, Jakob SM. High-resolution Respirometry to Assess Mitochondrial Function in Permeabilized and Intact Cells. *J Vis Exp* [Internet]. 2017 Feb 8 [cited 2023 Apr 1];2017(120):54985. Available from: </pmc/articles/PMC5408571/>
42. Vayalil PK. Mitochondrial oncobioenergetics of prostate tumorigenesis. *Oncol Lett* [Internet]. 2019 [cited 2023 Apr 30];18(5):4367. Available from: </pmc/articles/PMC6781517/>
43. Gasnier C, Dumont C, Benachour N, Clair E, Chagnon MC, Séralini GE. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology*. 2009 Aug 21;262(3):184–91.

44. D'hose D, Isenborghs P, Brusa D, Jordan BF, Gallez B. The Short-Term Exposure to SDHI Fungicides Boscalid and Bixafen Induces a Mitochondrial Dysfunction in Selective Human Cell Lines. *Molecules* [Internet]. 2021 Oct 1 [cited 2023 May 13];26(19). Available from: [/pmc/articles/PMC8510389/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/398510389/)
45. EU Pesticides Database - Active substances [Internet]. [cited 2023 May 19]. Available from: <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/start/screen/active-substances>

# Lisad

## Lisa 1. Plasmax™ koostis



### Plasmax™ formulation

	Plasmax™	MEM	IMDM	DMEM	DMEM/ F-12	F-12	RPMI 1640
<b>Proteinogenic Amino Acids</b>							
L-Alanine	510		281		50	100	
L-Arginine	64	597	399	398	699	1000	1149
L-Asparagine	41		189		50	100	379
L-Aspartic acid	6		226		50	100	150
L-Cysteine	33				100	200	
LI-Glutamate	98		510		50	100	136
L-Glutamine	650	2000	4000	4000	2500	1000	2055
Glycine	330		400	400	250	100	133
L-Histidine	120	200	200	200	150	100	97
LI-Isoleucine	140	397	802	802	416	31	382
L-Leucine	170	397	802	802	451	100	382
L-Lysine	220	399	798	798	499	199	219
LII-Methionine	30	101	201	201	116	30	101
L-Phenylalanine	68	194	400	400	215	30	91
L-Proline	360		348		150	300	174
L-Serine	140		400	400	250	100	286
L-Threonine	240	403	798	798	449	100	168
L-Tryptophan	78	49	78	78	44	10	25
L-Tyrosine	74	199	462	399	214	30	111
L-Valine	230	393	803	803	452	100	171
<b>Non-proteinogenic Amino Acids</b>							
α-Aminobutyrate	41						
L-Citrulline	55						
L-Cystine	65	99	292	201.3	100		207.7
L-Homocysteine	9						
4-Hydroxy-L-proline	13						152.7
L-Ornithine	80						
5-Pyroglutamate	20						
<b>Amino Acids Derivatives</b>							
L-Acetyl glycine	70						
L-Carnosine	6						
Glutathione (reduced)	37						3.3
Putrescine					0.5	1.0	
Taurine	130						
N-Trimethylglycine (Betaine)	72						
<b>Other Components</b>							
Acetate	42						
Acetone	55						
Acetyl carnitine	5						
Citrate	114						
Carnitine	46						
Creatine	37						
Creatinine	74						
Formate	33						
D-Glucose	5556	5556	25000	25000	17506	10011	11111
Glycerol	82						
2-Hydroxybutyrate	31						
3-Hydroxybutyrate	77						
3-Hydroxyisobutyrate	20						
Hypoxanthine	5				15	30	
Lactate	500						
Linoleic Acid					0.15	0.30	



## Plasmax™ formulation continued

Lipoic Acid					0.5	1.0	
Methyl acetoacetate	41						
Phenol Red	25.0	26.6	39.9	39.9	21.5	3.2	13.3
Pyruvate	100		1000	1000	500	1000	
Succinate	23						
Thymidine					1.5	2.9	
Uracil	2						
Urate	270						
Urea	3000						
Uridine	3						
<b>Inorganic Salts</b>							
Ammonium Chloride	50						
Calcium Chloride	1800	1802	1487	1802	1050	299	
Calcium Nitrate							424
Magnesium Chloride					302	602	
Magnesium Sulfate	813	814	814	814	407		407
Potassium Chloride	5330	5333	4400	5333	4157	2981	5333
Potassium Nitrate			1				
Sodium Bicarbonate	26191	26191	36000	44048	29024	14000	23810
Sodium Chloride	118706	117241	77672	110345	120612	131017	103448
Sodium Phosphate monobasic	1010	1014	906	906	453		
Sodium Phosphate dibasic					500	1000	5634
<b>Trace elements</b>							
Ammonium Metavanadate	0.0026						
Cupric Sulfate	0.0052				0.0052	0.0100	
Ferric Chloride			2				
Ferric Nitrate	0.1238			0.2475	0.1238		
Ferric Sulfate	1.0428				1.5000	3.0000	
Manganous Chloride	0.0002						
Sodium Selenite	0.0289		0.0980				
Zinc Sulfate	1.50		0.49		1.50	2.90	
<b>Vitamins</b>							
p-Aminobenzoate							7.3
Ascorbate	62						
D-Biotin	4.100		0.530		0.014	0.030	0.820
Choline	7.1	7.1	28.6	28.6	64.1	100	21.4
Folate	2.30	2.30	9.10	9.10	6.00	2.90	2.27
myo-Inositol	11.1	11.1	40.0	40.0	70.0	100.0	194.4
Niacinamide	8.2	8.2	32.8	32.8	16.6	0.3	8.2
D-Calcium pantothenate	2.10	2.10	8.40	8.40	4.70	1.05	0.52
Pyridoxal	4.90	4.90	19.60				
Pyridoxin				19.40	9.80	0.29	4.90
Riboflavin	0.30	0.27	1.10	1.10	0.58	0.01	0.53
Thiamine	3.0	3.0	11.9	11.2	6.4	0.9	3.0
Vitamin B12	0.0050		0.0096		0.5000	1.0000	0.0037

**Plasmax™ formulation compared to historic media.** The concentrations are reported in  $\mu\text{M}$ . The colors represent the concentration of each component relative to Plasmax™ (white), blue and red represent lower and higher concentrations respectively. The cutoff on color scale is eightfold. Grey: not present.

## Lisa 2. Hingamisahela protokoll

Nr.	Lisandid oksügraafia kambritesse	Lisatav kogus ( $\mu$ l)	Lõplik kontsentratsioon	Märkused
1	Rakud	100		
2	Saponiin, 5 mg/ml	16	40 $\mu$ g/ml	
3	Glutamaat 2M	5	5	
4	Malaat 0.4 M	10	2	
5	ADP 0.2 M	20	2 mM	
6	Rotenoon, 1 mM	5.0	2.5 $\mu$ M	CI inhibiitor
7	Suktsinaat, 1 M	20	10 mM	CII substraat
8	Antimütsiin A, 5 mM	4	10 $\mu$ M	CIII inhibiitor
9	TMPD 0.1 M (askorbaadis)	20	1 mM	CIV aktiveerimine
10	Tsütokroom C, 2mM	8	8 $\mu$ M	Välismembraani intaksus
11	NaCN, 0.2 M	10	1 mM	CIV inhibiitor

### Lisa 3. Intaktsete rakkude hapnikutarbimise protokoll

Nr.	Lisandid oksügraafia kambritesse	Lisatav kogus ( $\mu$ l)	Lõplik kontsentratsioon	Hingamisolekud
1	Rakud	100		ÜLDHAPNIKU TARBIMINE
2	Püruvaat 2M	10	10 mM	
3	Oligomütsiin, 4 mg/ml	1	2 $\mu$ g/ml	LEKE
4	FCCP, 0.5 mM*	2	0.5 $\mu$ M	ETA
5	FCCP, 0.5 mM	2	1 $\mu$ M	ETA
6	FCCP, 0.5 mM	2	1.5 $\mu$ M	ETA
7	FCCP, 0.5 mM	2	2 $\mu$ M	ETA
8	Rotenoon, 1 mM	5	2.5 $\mu$ M	ROX
9	Antimütsiin A, 5 mM	4	10 $\mu$ M	ROX

#### Lisa 4. Pestitsiidide kontsentratsioonid oksügraafias ja ADI, AOEL

	MW	Oksügraafia		ADI mg/kg (45)		AOEL (45)	
		20%	10%	mg/kg	μmol	mg/kg	μmol
<b>Roundup (Glüfosaat)</b>	169,1	0,15 mM	0,05 mM	0,5	2,96	0,10	0,59
<b>Boskaliid</b>	343,21	60 μM	30 μM	0,04	0,12	0,10	0,29
<b>Neemazal (Azadirachtin)</b>	720	15 μM	5 μM	0,1	0,14	0,10	0,14

**Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks<sup>1</sup>**

Mina Karolin Kullison,

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Pestitsiidide mõju soolestiku rakkude bioenergeetikale“,

mille juhendaja on Kersti Tepp,

1.1 reprodutseerimiseks lõputöö säilitamise ja elektroonse avaldamise eesmärgil, sh Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogusse lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tallinna Tehnikaülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogu kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. Olen teadlik, et käesoleva lihtlitsentsi punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest ning muudest õigusaktidest tulenevaid õigusi.

---

\_\_\_\_\_ (kuupäev)

---

<sup>1</sup> Lihtlitsents ei kehti juurdepääsupiirangu kehtivuse ajal vastavalt üliõpilase taotlusele lõputööle juurdepääsupiirangu kehtestamiseks, mis on allkirjastatud teaduskonna dekaani poolt, välja arvatud ülikooli õigus lõputööd reprodutseerida üksnes säilitamise eesmärgil. Kui lõputöö on loonud kaks või enam isikut oma ühise loomingulise tegevusega ning lõputöö kaas- või ühisautor(id) ei ole andnud lõputööd kaitsvale üliõpilasele kindlaksmääratud tähtjaks nõusolekut lõputöö reprodutseerimiseks ja avalikustamiseks vastavalt lihtlitsentsi punktidele 1.1. ja 1.2, siis lihtlitsents nimetatud tähtaja jooksul ei kehti.