

Usporedba metoda za određivanje oštećenja DNA u dagnji

Bažon, Jelena

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Pula / Sveučilište Jurja Dobrile u Puli**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:137:272712>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-06**



Repository / Repozitorij:

[Digital Repository Juraj Dobrila University of Pula](#)



SVEUČILIŠTE JURJA DOBRILE U PULI
ODJEL ZA PRIRODNE I ZDRAVSTVENE STUDIJE

Jelena Bažon

Usporedba metoda za određivanje oštećenja DNA u dagnji

Završni rad

Pula, 2019.

SVEUČILIŠTE JURJA DOBRILE U PULI
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ ZNANOST O MORU

Jelena Bažon

Usporedba metoda za određivanje oštećenja DNA u dagnji

JMBAG: 0303063218

Studijski smjer: Preddiplomski studij Znanost o moru

Predmet: Molekularna toksikologija i ekotoksikologija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Interdisciplinirane prirodne znanosti

Znanstvena grana: Znanost o moru

Mentor: prof.dr.sc.Nevenka Bihari

Pula, 2019.



IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, dolje potpisana Jelena Bažon, kandidatkinja za prvostupnicu Znanosti o moru ovime izjavljujem da je ovaj Završni rad rezultat isključivo mogega vlastitog rada, da se temelji na mojim istraživanjima te da se oslanja na objavljenu literaturu kao što to pokazuju korištene bilješke i bibliografija. Izjavljujem da niti jedan dio Završnog rada nije napisan na nedozvoljen način, odnosno da je prepisan iz kojega necitiranog rada, te da ikoji dio rada krši bilo čija autorska prava. Izjavljujem, također, da nijedan dio rada nije iskorišten za koji drugi rad pri bilo kojoj drugoj visokoškolskoj, znanstvenoj ili radnoj ustanovi.

Studentica: Jelena Bažon

U Puli, _____, 2019. godine



IZJAVA

o korištenju autorskog djela

Ja, Jelena Bažon dajem odobrenje Sveučilištu Jurja Dobrile u Puli, kao nositelju prava iskorištavanja, da moj završni rad pod nazivom „Usporedba metoda za određivanje oštećenja DNA u dagnji“ koristi na način da gore navedeno autorsko djelo, kao cjeloviti tekst trajno objavi u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice Sveučilišta Jurja Dobrile u Puli te kopira u javnu internetsku bazu završnih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice (stavljanje na raspolaganje javnosti), sve u skladu s Zakonom o autorskom pravu i drugim srodnim pravima i dobrom akademskom praksom, a radi promicanja otvorenoga, slobodnoga pristupa znanstvenim informacijama.

Za korištenje autorskog djela na gore navedeni način ne potražujem naknadu.

U Puli, _____ (datum)

Potpis

ZAHVALA

Veliku zahvalnost dugujem mojoj mentorici prof.dr.sc. Nevenki Bihari na predloženoj temi, strpljenju, pomoći i savjetima pri izradi ovog završnog rada.

Zahvaljujem se i svojoj obitelji, kolegama i prijateljima koji su uvijek bili uz mene te mi pružali podršku u lijepim, ali i u teškim trenucima.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1 Onečišćenje mora.....	1
1.2 Učinak genotoksičnih tvari	1
1.3 Dagnja kao bioindikator.....	4
2. CILJ	6
3. RAZRADA TEME	7
3.1 Alkalno filter eluiranje.....	7
3.2 Brza mikrometoda.....	12
3.3 Komet test	16
3.4 Protočna citofluorimetrija	20
4. ZAKLJUČCI.....	23
5.LITERATURA:	24
6.SAŽETAK	30
7.ABSTRACT.....	31

1. UVOD

1.1 Onečišćenje mora

More se onečišćuje zbog brojnih tvari koje dospijevaju u morski ekosustav. U morski okoliš dospijevaju razne kemikalije i to prvenstveno donosom iz atmosfere, balastnim voda s brodova, ispiranjem tankova i gradskim otpadnim vodama. Jedna od glavnih karakteristika antropogenog onečišćenja je i namjerni ali i slučajni unos različitih kemikalija poput pesticida i ugljikovodika u morski okoliš. Prisutnost raznih zagađivala poput policikličkih aromatskih ugljikovodika predstavlja znatno onečišćenje mora. Moguće je i onečišćenje metalima koji mogu onečistiti razne dijelove biosfere (atmosfera, hidrosfera, litosfera) i to čak u područjima koja su i udaljenija od primarnog ispuštanja. Uz to upotreba teških metala poput žive ima negativan utjecaj na morski ekosustav. Također u more dospijeva i razni otpad poput plastike ali i drugi kemijski otpad. Razne kemijske tvari akumuliraju se u mnoge morske organizme te tako uzrokuju brojne promjene u organizmu. Značajnu grupu onečišćivala koji mogu izazvati poguban učinak za organizme u moru čine genotoksične tvari.

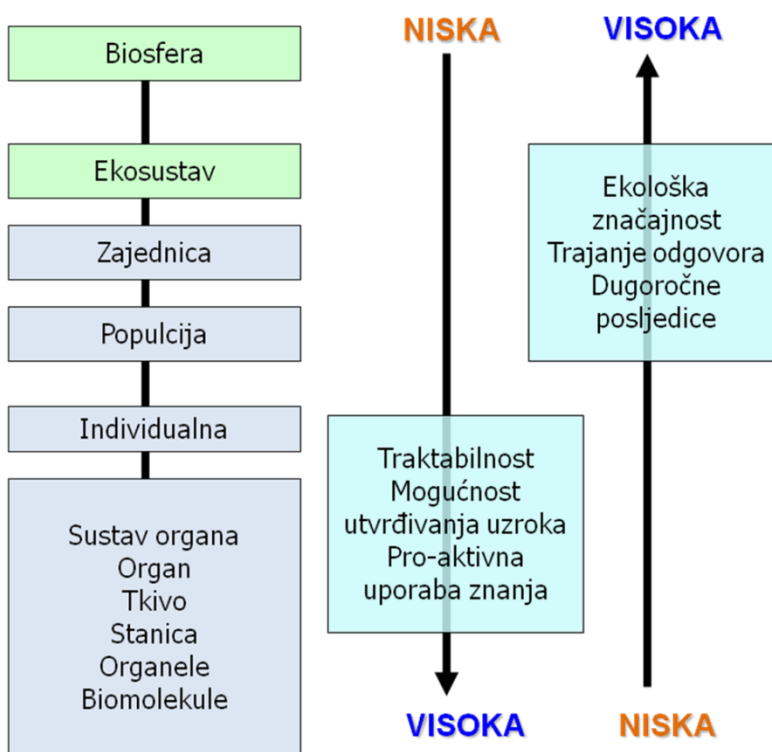
1.2 Učinak genotoksičnih tvari

Genotoksini su tvari koje utječu na promjenu strukture i funkcije molekule DNA. Oni na razne načine dolaze u more, ispiranjem poljoprivrednih površina, prijenosom podzemnim vodama, ali i normalnim procesima u proizvodnji i transportu naftnih derivata, pranjem tankova te balastnim vodama s brodova. Genotoksini također dospijevaju u more i otpadnim vodama te donosom iz atmosfere.

Njihov učinak na morske organizme može se pratiti na različitim razinama biološke organizacije i to na razini stanice, jedinke, vrste ili zajednice. Preživljavanje jedinke odnosno cijele zajednice ovisi o molekuli DNA pa je stoga vrlo važno istražiti genotoksični učinak onečišćivala na morske organizme. Ako je narušena sposobnost primanja informacija u DNA narušeno je ustrojstvo stanice odnosno organizma, pa je procjena genotoksičnog rizika kojem su izloženi organizmi u moru neupitna. Oštećenje DNA pokazuje da je došlo do interakcije između zagađivala i organizma. Brojna su oštećenja molekule DNA poput jednolančanih i dvolančanih

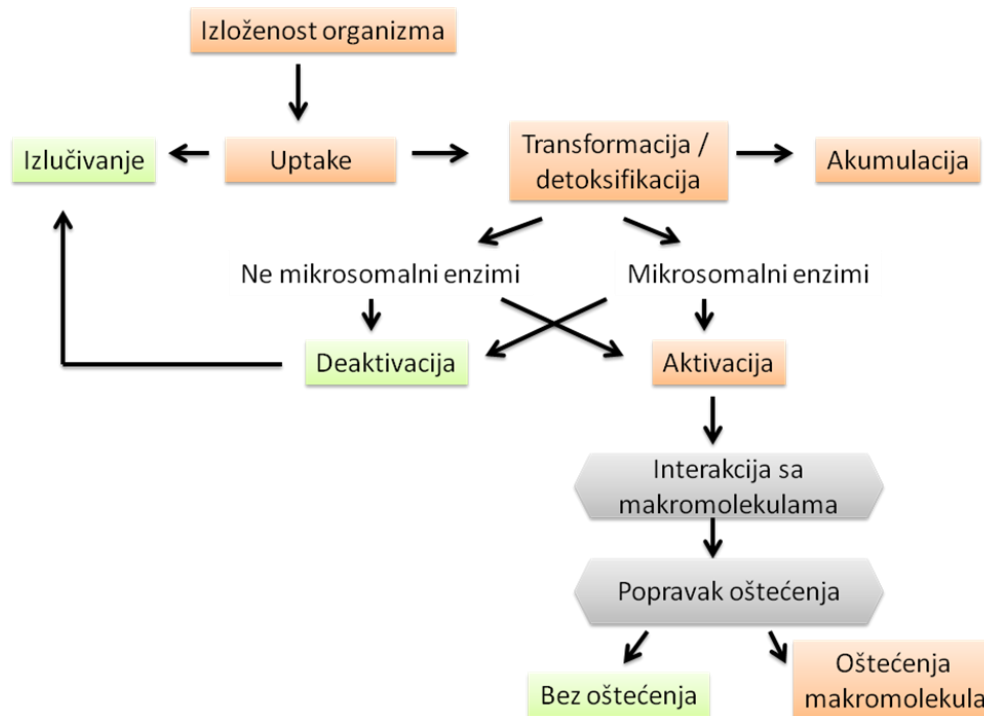
lomova umrežavanja DNA lanca, umrežavanje DNA i proteina, nastanak alkalno labilnih mjesta, interkaliranje između pojedinih baza, oštećenja baza i sl. Mjerenje oštećenja DNA daje informaciju o genotoksičnom riziku kojem su izloženi organizmi u moru te o prisutnosti nepoznate smjese genotoksičnih zagađivala u morskom ekosustavu.

Za procjenu kvalitete okoliša upotrebljavaju se učinci genotoksina na različitim razinama biološke organizacije (Slika 1.). Učinci na nižoj razini događaju se brzo, a često i nestaju brzo, čim se stresor ukloni iz okoliša. Učinci na višim razinama biološke organizacije imaju dugotrajnije posljedice.



Slika 1: Procjena kvalitete okoliša temeljena na istraživanjima različitih razina biološke organizacije. (Bihari i Batel, 2018).

Sudbina genotoksina u organizmu prikazana je na slici 2.



Slika 2: Sudbina genotoksina u organizmu. (Bihari i Batel, 2018).

Najprije je organizam izložen raznim zagađivalima te dolazi do uptake-a. To je kretanje onečišćivala u /na organizam te predstavlja direktni unos (škrge, površina tijela, pluća) te indirektni unos (usni otvor). Zatim dolazi do transformacije odnosno pretvorbe zagađivala koja može uključivati akumulaciju, mikrosomalne ili nemikrosomalne enzime. Krajnji rezultat sudbine genotoksina u organizmu su oštećenja makromolekule DNA koji dokazuju da je došlo do interakcije između zagađivala i organizma.

Istraživanja utjecaja genotoksina na morske organizme su zasnovana na pretpostavci da su oštećenja i popravak DNA u školjkašima relativno konstantni. Općenito oštećenja DNA mogu biti rezultat ovih procesa: a) oštećenje DNA se događa brže od popravka, b) popravak nije prepoznao oštećenja ili c) oštećeni su enzimi popravka pa se oštećenja niti ne popravljaju. Dakle mjerenje oštećenja daje informaciju o genotoksičnom riziku kojem su izloženi organizmi u moru.

Postoje brojne metode koje se bave utvrđivanjem oštećenja DNA. U ovom radu fokusirali smo se na: alkalno filter eluiranje, brzu mikrometodu, komet test te protočnu citofluorimetriju. Metode su vrlo sofisticirane, brze, jeftine te omogućuju analizu velikog broja uzorka. Sve četiri metode su

upotrebljene za proučavanje oštećenja DNA, u tkivima bioindikatorske vrste, dagnji *Mytilus galloprovincialis*

1.3 Dagnja kao bioindikator

Beskralješnjaci, a posebno dagnja *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck 1819) (Slika 3.) pokazala se kao dobar indikatorski organizam za praćenje zagađenja morskog ekosustava (Viarengo i sur, 2007). Mediteranska dagnja *M. galloprovincialis* je sedentarni organizam koji relativno dobro tolerira promjene u okolišu kao što su plima, oseka te visoke količine onečišćivala pa se zbog toga upotrebljava kao bioindikator u brojnim istraživanjima (Bihari i Batel, 2018). Zbog tih karakteristika dagnje se prilagođavaju različitim ekološkim čimbenicima (temperatura, prehrana, količina kisika) pa su i tolerantni na razne ekološke promjene (Bayne., 1976). S obzirom da su sedentarni organizmi, cijeli život provedu na istom mjestu, mogu u svim tkivima akumulirati određenu količinu zagađivala.

Dagnje imaju veliku rasprostranjenost (kozmpolitska vrsta), brojnost, dostupnost, jednostavnost uzorkovanja te mogućnost akumuliranja teških metala i organskih spojeva što ih čini odličnim organizmom za biomonitoring morskog ekosustava (Bihari i Batel, 2018). Zbog mogućnosti filtriranja vode dagnja u sebi nakuplja razna zagađivala i toksine odražavajući prisutnost zagađivala u vodenom stupcu. Također dagnja se lako prikuplja i održava u laboratorijskim uvjetima, a izlaganje otopljenim i lipofilnim zagađivalima čine ju dobrim organizmom za testiranje učinaka toksičnih tvari (Viarengo i sur., 1997). Zbog održavanja morskog ekosustava kao i ljudskog zdravlja poželjno je korištenje dagnje kao bioindikatora. Mjerenjem različitih biomarkera u tkivima dagnji sakupljenih na različitim postajama može se utvrditi prisutnost određenog zagađivala.



Slika 3: Mediteranska dagnja *Mytilus galloprovincialis*

(izvor: <https://www.swims.hku.hk/>)

2. CILJ

Ciljevi ovog rada su:

- 1) Usporediti metode za određivanje oštećenja DNA s naglaskom na prednosti i nedostatke
- 2) Pokušati utvrditi koja je metoda najbolja za procjenu opterećenja morskog ekosustava

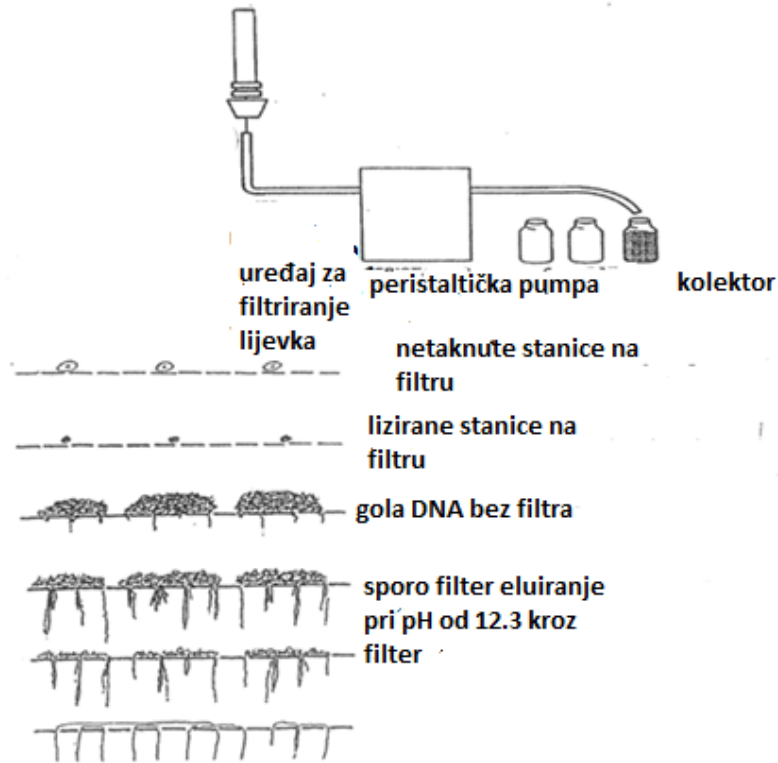
3. RAZRADA TEME

Ako onečišćivalo ošteti molekulu DNA i ako se to oštećenje prenese na stanice kćeri, tj. da oštećenu DNA nasljeđuju buduće generacije stanica nastaje tumor (rak) koji je poguban za cijeli organizam. Oštećenje DNA spolnih stanica može se prenijeti na potomstvo pa se ta oštećenja gomilaju u zajednici što je od posebnog značaja za cijelu populaciju. S obzirom da je važno pratiti genotoksični učinak tvari u organizmima razvijene su u tu svrhu i brojne metode zbog utvrđivanja oštećenja molekule DNA. Te su metode najprije primjenjene na kulturama sisavaca i to najčešće stanicama ovarija kineskog hrčka (CHO stanice) ali i na homogenatima tkiva te na stanicama miševa, a naposljetku i na kulturama humanih stanica (HeLa stanice). Za istraživanje učinka zagađivala na DNA morskih organizama bilo je važno izabrati pogodan organizam. Kao modalni organizam često se koriste beskralješnjaci, a od njih posebno dagnje upravo zbog svojih bioindikatorskih karakteristika. Metode koje su primjenjene na istraživanje genotoksičnog učinka dagnje su alkalno filter eluiranje, brza mikrometoda, komet test i protočna citofluorimetrija.

3.1 Alkalno filter eluiranje

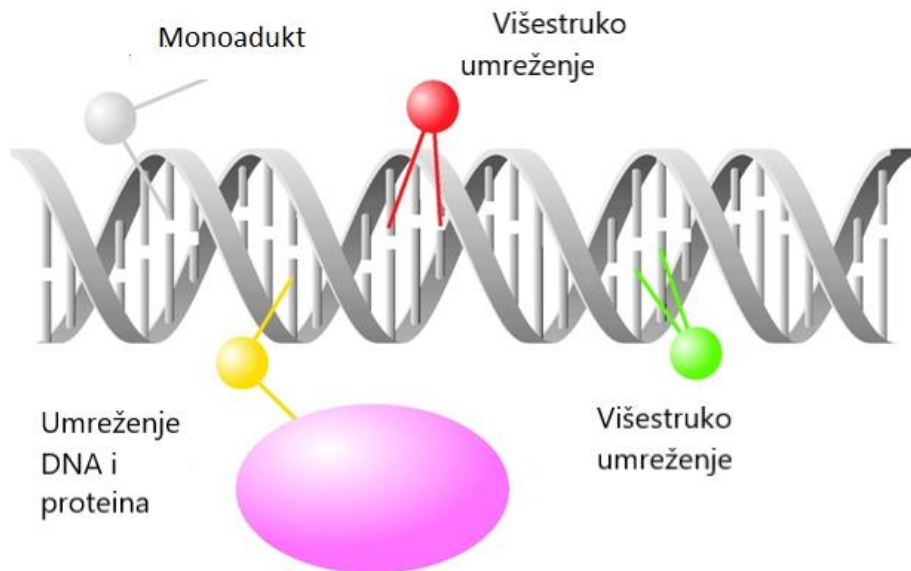
Alkalno filter eluiranje se temelji na tome da se u alkalnim uvjetima pri višoj pH vrijednosti lanci molekule DNA kidaju zbog toga što pucaju vodikove veze između lanaca.

Sam princip alkalnog filter eluiranja omogućava da brzina kojom dugački lanci DNA prolaze kroz membranski filter pod alkalnim denaturirajućim uvjetima ovisi o dužini lanca. Kraći lanci ujedno prolaze (eluiraju) brže od dugih lanaca.



Slika 4: Procedura alkalnog filter eluiranja. (Bihari i sur.,1990).

Alkalnim filter eluiranjem (Kohn i Grimek-Ewig, 1976; Kohn, 1991) može se odrediti količina jednolančane DNA (ss-DNA) ovisno o njihovoj veličini uz upotrebu filtera bez mehaničke fragmentacije uzorka. Kako se ss –DNA određuje na osnovi kinetike eluiranja s filtera primjena ove metode ovisi i o izvoru DNA odnosno o njenoj duljini. Metoda omogućava istovremenu analizu velikog broja uzorka i zahtjeva više od 10^5 stanica u uzorku. Ovom metodom se utvrđuje nekoliko oštećenja molekule DNA: jednolančani lomovi, alkalno – labilna mjesta, unakrsno vezanje lanaca DNA te unakrsno vezanje DNA i proteina.



Slika 5: Prikaz oštećenja DNA

(izvor: [helancet.com/journals/lanonc/article/PIIS1470-2045\(01\)00454-5/fulltext?refuid=S1476-5586%2814%2900015-3&refissn=1476-5586&code=lancet-site](http://helancet.com/journals/lanonc/article/PIIS1470-2045(01)00454-5/fulltext?refuid=S1476-5586%2814%2900015-3&refissn=1476-5586&code=lancet-site))

Alkalno filter eluiranje predstavlja ponovljivu i brzu metodu za potvrdu drugih testova kada imamo nepoznate kancerogene spojeve u morskom okolišu (Petzold i Swenberg, 1978). Također može identificirati moguće ciljane organizme za otkrivanje genotoksičnih agenasa, a ujedno može se koristiti i za procjenu oštećenja DNA u organizmima izloženim raznim genotoksičnim agensima (Bihari i sur., 1990).

Metoda je vrlo osjetljiva zbog toga što utvrđuje jedno oštećenje DNA na 10^7 nukleotida. Procedura same metode je u tome da sa sporim propuštanjem alkalne otopine, pH vrijednost je veća ili jednaka 12, dolazi do odvajanja lanaca DNA te zatim njihovog eluiranja s filtra, zavisno o duljini fragmenata. Što je niža količina DNA na filteru to je prisutna veća količina lomova, a što je veća količina DNA prisutnost lomova je manja (Vukmirović i sur., 1994). Mjerenjem količine DNA u eluatu i na filteru izračunava se udio DNA koji izostaje na filteru tijekom

eluiranja. Brzina izlaženja DNA kroz filter je izražena kao postotak DNA koji nakon određenog vremena ostaje na filteru (Bihari i sur., 1992).

Alkalnim filter eluiranje određujemo najčešće prisutnost jednostrukih lomova u ovisnosti o duljini i veličini DNA.

Dagnje se koriste kao bioindikatorski organizam za procjenu genotoksičnog učinka, a kao ciljani organ korištena je hemolimfa dagnje. Hemolimfa dagnje se može upotrijebiti za određivanje genetskih oštećenja uzrokovanih zagađivalima te njihov popravak (Bihari i sur., 1990). Hemolimfa predstavlja oko 50 % mokre mase dagnje, stanice ne koaguliraju u vremenu koje je potrebno za manipulaciju. Lako se nanosi na filter izbjegavajući uzrokovanje dodatnih lomova tijekom procedure (Bihari i sur., 1991). Nadalje, hemociti predstavljaju stanice koje su sposobne lako se kretati te ući u druga tkiva, a raspoređene su po cijelom tijelu. Također mogu progutati čestice te ih transportirati do hemolimfe. Međutim s druge strane hemociti smanjuju količinu hranjivih tvari kao i toksične čestice u hemolimfi (Bayne i sur., 1976; Jones 1983). U svrhu utvrđivanja odgovora dagnji na prisutnost genotoksičnih agensa kao model zagađivala koristili su se benzo(a)piren, i 4- nitrokinolin –1 oksida (4-NQO). Rezultati pokazuju da iako postoji odnos između doze i razine oštećenja mehanizmi popravka mogu utjecati na razine oštećenja DNA hemolimfe dagnje. Što je niža doza benzo(a)pirena nanesena na dagnje prisutno je manje oštećenje DNA koje se postojano i povećava tijekom 48 sati. Nadalje veće doze benzo(a)pirena induciraju veće oštećenje ali i brži popravak (Bihari i Batel, 1998). Metabolizam benzo(a)pirena u dagnji pored jednostrukih lomova može dovesti do nastanka slobodnih radikala koji također oštećuju DNA kao i do formiranja adukata (Cerutti i sur., 1983). Nitroaromatski spojevi su česti kontaminanti u morskim i slatkovodnim sustavima pa samim time predstavljaju i opasnost za vodene ekosustave (Washburn i Giulio, 1989). *Mytilus sp.* ima sposobnost da akumulira 4-NQO koji se veže kovalentno na molekulu DNA uzrokujući oštećenja DNA (Bihari i Batel, 1998).

Mjerenje jednolančanih lomova i alkalno labilnih mjesta u DNA morskih organizama daje informaciju o samoj izloženosti organizma genotoksičnim agensima (Bihari i Fafandel, 2004). Alkalno filter eluiranje omogućava biomonitoring kvalitete mora te predstavlja pogodnu metodu za otkrivanje oštećenja DNA uzrokovanih nepoznatom smjesom genotoksina prisutnih u moru kao i raznih promjena koje se događaju u školjkašima (Vukmirović i sur., 1994). Utvrđivanje

jednolančanih lomova i umreženja DNA te DNA i proteina u dagnji koje obitavaju u područjima pod različitim antropogenim utjecajem daje nam informaciju o genotoksičnom učinku.

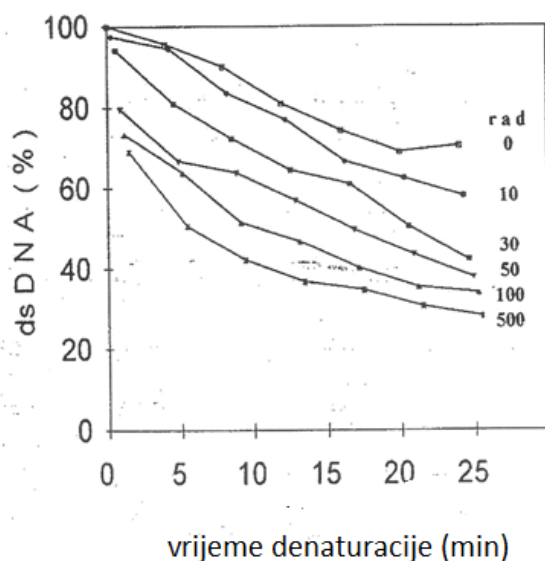
Za utvrđivanje umrežavanja DNA lanaca te DNA lanca i proteina koristi se spoj bleomicin koji unosi poznatu količinu lomova u DNA. Općenito umreženje uzrokuje smanjene brzine elucije te se tretiranjem DNA na filtru sa bleomicinom unosi poznata količina dodatnih lomova. Usporedba brzine eluiranja i bez dodatnog tretiranja bleomicinom kao i s protein kinazom K omogućila je utvrđivanje umrežavanja DNA lanca te DNA i proteina u školjkašima (Batel i sur., 1992).

Tehnika alkalnog filter eluiranja je povoljna za otkrivanje oštećenja DNA u dagnji u svrhu monitoringa te utvrđivanju izloženosti genotoksičnim sredstvima. Ova tehnika daje prednost utvrđivanju različitih tipova oštećenja DNA, dajući posebnu informaciju o uzorkovanim mjestima te genotoksičnim učincima na dagnji. Upravo to omogućava klasifikaciju uzorkovanih mjesta po genotoksičnim učincima kod onečišćenih dagnji (Bihari i sur., 2001).

Prednost metode se ogleda u njoj jednostavnosti izvođenja te osjetljivosti. Nedostatak same metode predstavlja što zahtjeva ograničeni broj uzoraka (12 uzoraka tijekom 48 sati analize), a i trajanje samog procesa je dugotrajno.

3.2 Brza mikrometoda

U alkalnim uvjetima odnosno pri pH višem od 12 dolazi do odmotavanja dvostruke zavojnice DNA. Princip brze mikrometode se osniva na mogućnosti fluorokroma da reagiraju preferentno s dvolančanim DNA (dsDNA) u prisutnosti ssDNA, RNA i proteina pri visokom pH (>12.0) dozvoljavajući direktno mjerenje DNA bez denaturacije uzorka i izolacije DNA. Vrijeme i stupanj denaturacije DNA se prati fluorimetrijski u mikropločama za manje od jednog sata. Predstavlja vrlo zgodnu tehniku za utvrđivanje integriteta DNA u stanici i tkivu.



Slika 6: Denaturacija DNA praćena brzom mikrometodom. (Batel i sur., 1999)

Ova metoda koristi se za mjerenje jednolančanih lomova, abazičnih mjesta, alkalno labilna mjesta u alkalnim uvjetima, pa je stoga pogodna za procjenjivanje učinaka zagađivala u akvatičnim organizmima poput šarana, pastrve, ali i školjkaša i to posebno dagnje (Bihari i sur., 2002). Brza mikrometoda mjeri smanjenje integriteta DNA uzrokovanog genotoksičnim agensima. Alkalno labilna mjesta i jednolančani te dvolančani lomovi smanjuju integritet DNA.

Ova metoda mjeri brzinu odmotavanja DNA u alkalnim uvjetima s pretpostavkom da su vodikove veze u molekuli destabilizirane. DNA nižeg integriteta razmota se brže nego višeg integriteta. Kako bi razlikovali koji je nizak, a koji je viši integritet dodaje se fluorescentna boja PicoGreen (Batel i sur., 1999). PicoGreen je fluorokromatska boja koje se postojano i specifično veže sa ds-DNA te predstavlja pogodan reagens za otkivanje DNA niske cjelovitosti u uzorku odnosno oštećene DNA (Jakšić, 2002). Uočeno je da se ova boja veže viskospetskično za ds-DNA te da je pogodna za primjenu u uvjetima viskog alkaliteta i ionske jakosti (Batel i sur., 1999). Čimbenici koji mogu utjecati na ovu metodu su gustoća stanica te alkalni uvjeti (pH, ionska jakost) koji ovise o tipu stanice ili tkiva (Bihari i sur., 2002).

Iako brza metoda omogućuje utvrđivanje brojnih oštećenja DNA može propustiti i neke promjene na molekuli DNA uključujući procese kao što su umreženja, supstitucije nukleotida te formiranje adukata (Bihari i sur., 2004).

Brza mikrometoda je primjenjena najprije na kulturi stanica ovarija kineskog hrčka te u homogenatima tkiva i stanicama laboratorijskih miševa, ali i na kulturama humanih stanica (HeLa stanice) zbog razvoja modela i metodologije. Međutim osim tih stanica metoda je prilagođena uvjetima rada s morskim beskralješnjacima i to posebno stanicama spužve *Suberitus domuncula* te homogenatima škrgi dagnji *M. galloprovincialis*. Korištenje ove metode na morskim beskralješnjacima je testirano zbog procjene učinka genotoksičnih zagađivala kod onečišćenja mora. Kao modelni spoj za samo utvrđivanje jednostrukih lomova u dagnji korišteni su bleomicin, 4-nitrokinolin 1- oksid, benzo(a)piren i tributilin (Batel i sur., 1999). Nizak integritet DNA određivan brzom mikrometodom je korišten kao biomarker u dagnji koje su uzorkovane na različim kontaminiranim područjima. Dugoročna istraživanja DNA integriteta u škrgama dagnje omogućila je definiranje vrućih točaka tj. mjesta u kojima su prisutne različite vrste genotoksičnih agensa (Jakšić, 2002). Dakle integritet u morskim organizmima reflektira razine zagađenja morskog okoliša genotoksičnim sredstvima pa je i zbog toga upotrebljen kao biomarker (Shugart, 2000).

Brza mikrometoda predstavlja vrlo moćan alat za procjenu genotoksičnih učinaka na školjkašima i to posebno u njihovim škrgama (Jakšić i Batel, 2003). Ova metoda je brza, jednostavna te nije skupa, a predstavlja *in vivo* te *in vitro* test za procjenu genotoksičnih učinaka (Jakšić i sur., 2005). Brza mikrometoda je fokusirana na utvrđivanje jednolančanih lomova te predstavlja

manje osjetljivu, ali više pogodniju metodu za utvrđivanje različitih drugih oštećenja u dagnji baziranu na činjenici da različita oštećenja uzrokuju različitu brzinu denaturiranja i to u alkalnim uvjetima. Dakle, primjena brze mikrometode na dagnji služi za procjenu genotoksičnosti morskog ekosustava. Stoga, upravo brza mikrometoda predstavlja osjetljivu metodu u svrhu utvrđivanja genotoksičnih učinka u različitim tipovima stanica i tkiva iz različitih vrsta. Ona se preporučuje za mjerenje integriteta u medicinske svrhe, ali i u monitoringu morskog ekosustava (Jakšić, 2002). Uz to metoda je korištena i u otkrivanju integriteta DNA u ribi *Limanda limanda* u svrhu monitoringa (Schroder i sur., 2000).

Nadalje brza mikrometoda je korištena u svrhu brzog i jednostavnog utvrđivanja integriteta DNA i procjene fiziološkog stresa u morskim organizmima nakon aklimatizacije niskog saliniteta (Batel i sur., 1999; Jakšić i Batel, 2003). Integritet molekule DNA služi kao biomarker izloženosti te on uključuje izloženost genotoksinima, ali i brzinu popravka DNA, a ovisi o tjelesnom stanju organizma (opći odgovor na stres) i to posebno dagnji *M.galloprovincialis* (Hamer i sur.,2008).

Brza mikrometoda se preporučuje kao metoda u testu osjetljivosti prije zračenja odnosno koristi se kao sredstvo za procjenu učinkovitosti popravka DNA u humanim limfocitima nakon *in vitro* testiranja (Jakšić, 2002). Metoda se koristi u okolišnom monitoringu odnosno u procjeni genotoksičnih učinaka u organizmima (posebno u školjkašima i spužvama). Međutim metoda ne zahtjeva uklanjanje tvari koje reagiraju s DNA (Bihari i sur., 2001). Integritet DNA kao biomarker izloženosti genotoksičnim agensima je specifičan za različite tipove stresora, a mehanički odnos između stresora i ekoloških čimbenika može nam pomoći u razumjevanju i uspostavljanju uzročnih odnosa (Hamer i sur., 2008).

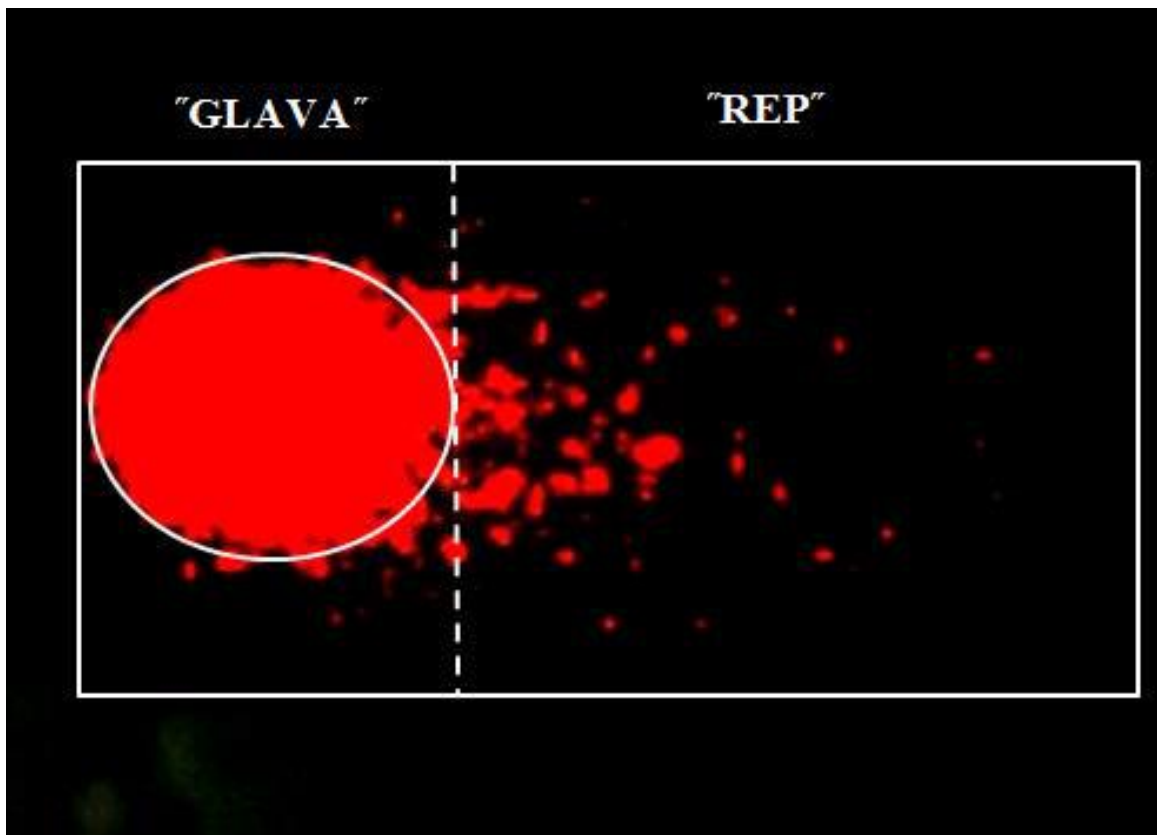
Prednosti brze mikrometode su u tome što omogućuje analiziranje većeg broja uzorka te je jednostavna, a sam postupak je relativno kratak, manje od 2 sata (Batel i sur.,1999). Također prednost joj je i brz te jednostavan način određivanja cjelovitosti DNA u manjoj količini uzorka te mogućnost razlučivanja okoliša pod različitim antropogenim pritiskom poput pesticida i ugljikovodika (Bihari i Fafandjel, 2004). Osjetljivost i preciznost ove tehnike je usporediva sa komet testom (Bihari i sur., 2002). Velika prednost brze mikrometode u odnosu na komet test je što je ona automatizirana, te je potrebno manje vremena za izvođenje. Iako obje metode služe za detektiranje oštećenja molekule DNA odnosno detektiraju alkalno-labilna mjesta i prolazne

kratkotrajne lomove lanca nastale tijekom njezina popravka pogodnija je brza mikrometoda zbog toga što je ona relativno brza, a i pogodna za određivanje lomova lanca u suspenzijama stanica, dok komet test mjeri lomove u pojedinačnoj stanici. Međutim postignuta je ista osjetljivost za obe metode. Kako je vrijeme neophodno za izvođenje brze mikrometode kratko, njezina uporaba za određivanje lomova lanca i integriteta DNA u stanicama se može preporučiti i za primjenu u monitoringu genotoksičnih zagađivala u okolišu (Bihari i sur., 2002). Također prednost joj se ogleda i u testiranju male količine uzorka tkiva (oko 25 µg tkiva).

Iako ova metoda ima brojne prednosti ima i nedostatak, a to je što uvjeti denaturacije molekule DNA ovise o vrsti testiranog organizma (Jakšić i Batel, 2003).

3.3 Komet test

Komet test temelji se na pokretljivosti oštećenih djelova DNA u električnom polju, pri čemu dolazi do njihovog odvajanja od nukleoida, koji su u agaroznom gelu i pod djelovanjem električnog polja pokazuju karakterističnu sliku kometa (Slika 7). Cjelovita molekula DNA te oštećena DNA se različito ponašaju u električnom polju. Zatim se molekula DNA boji specifičnim bojama, a preparate je potrebno pregledati na fluorescentnom mikroskopu.



Slika 7: Prikaz glave i repa kometa. (Linardić, 2014)

Predstavlja osjetljivu i brzu tehniku za kvantifikaciju i analizu oštećenja DNA u pojedinačnim stanicama (Ostling i Johanson 1984; Singh i sur., 1988). Ime je dobio upravo zbog toga što ima karakterističan oblik kometa odnosno slika podsjeća na komet gdje su jasno vidljivi glava i rep. Glava je sačinjena od ukupne DNA dok se u repu nalazi oštećena molekula DNA. Ova metoda se većinom koristi za istraživanja životinjskih stanica, iako postoje primjeri korištenja i biljnih stanica (Ventura i sur., 2013). Sama analiza komet testa obuhvaća 7 koraka, a to su: priprema

agaroze, liziranje stanica, izlaganje stanica alkalnim uvjetima ($\text{pH} > 13$) elektroforeza pod alkalnim uvjetima, neutralizacija, bojanje i vizualizacija kometa. Tijekom mikrogel elektroforeze jezgara, fragmenti DNA ukoliko su prisutni lomovi, migriraju iz jezgre prema anodi. Jezgra s repom nalikuje kometu i postaje vidljiva nakon fluorescentnog bojanja DNA, a postotak DNA u repu upućuje na stupanj genotoksičnosti, što je on duži i oštećenje DNA je veće. Pri manjim oštećenjima dolazi do izvlačenja slobodnih krajeva molekule iz nukleoida, dok je kod većeg broja lomova prisutno putovanje samostalnih fragmenata (Tice i sur., 2000). Nakon elektroforeze slijedi neutralizacija. S obzirom da se provodi mikroskopska analiza potrebno je uzorke obojati, u tu se svrhu koriste specifične boje poput etidijevog bromida. Utvrđivanje oštećenja molekule DNA ovisi o mnogim čimbenicima kao što je koncentracija agaroze, pH vrijednost, temperatura i vrijeme denaturacije te pH vrijednost, jačina i napon struje kao i vrijeme trajanja elektroforeze (Hartman i sur., 2003). Elektroforeza se obavlja najčešće na 25 V i 300 mA., a vrijeme trajanja procesa ovisi o vrsti upotrebljenih stanica.

Komet test predstavlja vrlo pogodnu metodu koja omogućuje praćenje i predviđanje genetičkog rizika na morske organizme i to osobito prisutnost zagađivala te raznih drugih okolišnih stresora. Nadalje pokazala se prikladnom metodom za kvantifikaciju genotoksičnog stresa u obalnim ekosustavima (Vasileva i sur., 2017).

Oštećenja DNA koja se utvrđuju ovom tehnikom su jednostruki i dvostruki lomovi lanca DNA, modifikacije baza (alkilacija), oštećenja uzrokovana oksidacijskim stresom te unaksnim vezivanjem DNA lanca te DNA lanca i proteina (Tice i sur., 2000; Kumaravel i sur., 2009).

Metoda je vrlo pogodna za analizu genotoksičnih učinaka na različite organizme u obalnom ekosustavu (Klobučar i sur., 2003; Bolognesi i sur., 2004; Rank i sur., 2005). Komet test je široko korištena metoda u ekotoksikologiji (Cottelle i Ferard, 1999). Štoviše, upravo se on upotrebljava kao alat u procjeni fizikalno kemijskih svojstava morske vode kao i za njezinu kvalitetu.

Primjena ove metode je u ispitivanju genotoksičnosti i biomonitoringu. Također ova metoda se primjenjuje i u mjerenju količine oštećenja DNA kao i učinkovitosti popravka DNA (Collins, 2004; Speit i Hartman, 2006). Komet test se već neko vrijeme koristi u istraživanju stanja okoliša (Lee i Steinart, 2003). Tkiva koja se najčešće koriste za analizu komet testa su škrge, hemolimfa

i probavna žijezda. Nadalje kao idealno tkivo za analizu samog genotoksičnog učinka se koriste škrge upravo zbog toga što one predstavljaju prvu barijeru zaštite organizma od potencijalnih genotoksičnih sredstava.

Komet test omogućuje otkrivanje oštećenja u pojedinačnim stanicama te zahtjeva mali broj stanica koje moraju biti mitotički aktivne (Rojas i sur., 1999; Lee i Steinart, 2003). Međutim mora biti dovoljan broj stanica u suspenziji bez uzorkovanja dodatnih oštećenja (Rojas i sur., 1999). Predstavlja vrlo pogodnu metodu za određivanje genotoksičnosti *in vivo* te *in vitro*. Jedna od bitnih značajki ovog testa ogleda se u njegovoj svestranosti koja omogućuje primjenu na različite tipove stanica. Svestranost i osjetljivost čine ovaj test posebno prikladnom metodom za ekotoksikološka istraživanja kako na kopnenom tako i u vodenom području (Joaquin de Lapuente i sur., 2015).

Posljednjih godina komet test se osobito primjenjuje u analizi oštećenja DNA školjkaša. Ti se organizmi već dugi niz godina smatraju korisnim u biomonitoringu te posebno za istraživanje toksičnosti. Među njima često je korištena dagnja, *M. galloprovincialis* koja se koristi zbog svoje široke distribucije kao i zbog svoje osjetljivosti na onečišćivala. Tako su analizirane dagnje u istraživanju i provjeri nakon izljevanja nafte (Thomas i sur., 2007; Almeida i sur., 2011).

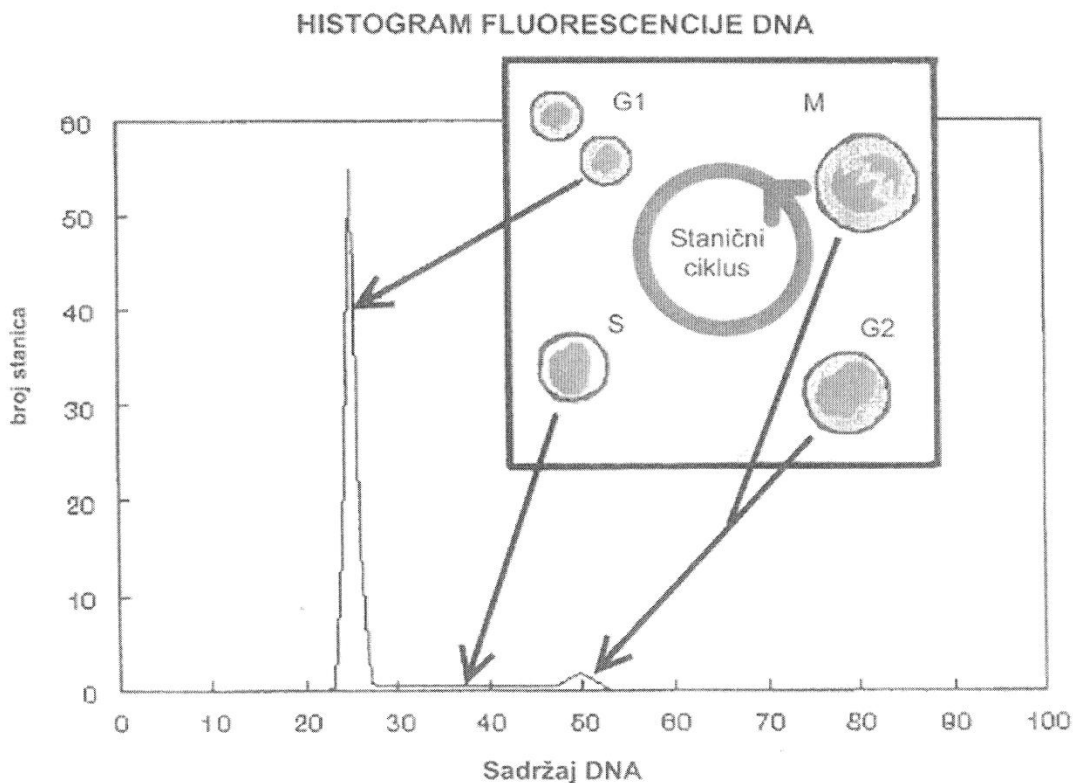
Vrste roda *Mytilus* su uspješno korištene u biomonitoringu genotoksičnog učinka okolišnog onečišćenja i to u mnogim istraživanjima (Frenzilli i sur., 2001). No iako se ona koristi već dugi niz godina postoje razlike u proceduri između različitih laboratorija što otežava primjenu metode u standardnim sustavima praćenja kvalitete morskog okoliša (Lee i Steinert, 2003). Hemociti dagnje su direktno izloženi okolišnoj kontaminaciji te upravo to igra važnu ulogu u transportu endogenih i egzogenih tvari te u imunom sustavu (Mersch i sur., 1996). Također hemociti najčešće služe za procjenu genotoksičnosti *in vivo* te *in vitro* na dagnji pa je upravo komet test pogodan za takva istraživanja. Škrge dagnji se također uspješno primjenjuju. No uočeno je da se lomovi lanca DNA uvelike mogu razlikovati između organa (Lapuente i sur., 2015). Prema istraživanju Michel i suradnika (2013) na školjkašima izlaganim u kavezima sa onečišćenim policikličkim aromatskim ugljikovodicima (PAH) ovaj test može se uspješno koristiti za biomonitoring okolišnog onečišćenja. Izlaganje školjkaša poznatim genotoksinima u laboratoriju često pokazuje pravilan učinak ovisan o dozi (Banni i sur., 2010; Štambuk i sur., 2008) što ukazuje na primjenjivost i osjetljivost ovog testa. Upotreba komet testa u biomonitoringu pružila je

rezultate u istraživanjima starenja, oksidativnog stresa, nepravilne prehrane, utjecaja ozona, kao i biomonitoringa različitih vrsta u kopnenim i vodenim ekosustavima (Djelić i sur., 2003). Također koristi se u testiranjima genotoksičnosti, za određivanje potencijalne toksičnosti lijekova, kozmetike i ostalih kemikalija. Istraživanja se mogu provoditi *in vivo* (analiza tkiva različitih laboratorijskih životinja) te *in vitro* (na kulturama stanica). Njegova primjena je široka u ekotoksikologiji gdje se upotrebljavaju razni organizmi (školjkaši, biljke) kao indikatori genetičkog oštećenja pod utjecajem zagađivala.

Prednosti ove tehnike ogledaju se u tome što je to osjetljiva metoda, brza te ekonomična za otkrivanje oštećenja na molekuli DNA. Također ona omogućava otkrivanje oštećenja DNA u pojedinačnim stanicama te ujedno zahtjeva mali broj stanica koje ne moraju biti mitotički aktivne (Rojas i sur., 1999). Nadalje ova metoda je korisna za određivanje i kvantifikaciju oštećenja DNA, te kvalitetna metoda u genotoksičnim istraživanjima. Nerijetko se ovaj test koristi za određivanje popravaka DNA kod morskih beskralješnjaka (Frenzilli i sur., 2009). Komet test ima nekoliko prednosti u odnosu na druge uobičajne testove u utvrđivanju genotoksičnosti. Njegova primjenjenost na prokariotske i eukariotske te njegova upotreba u gotovo svim tipovima stanica čini ga pouzdanim te omogućava relativno brzo prikupljanje podataka. Nedostaci se ogledaju u tome što je to dugotrajan proces (elektroforeza i mikroskopiranje), traži stručnu osobu, te uključuje opasne kemikalije poput etidijevog bromida (Bihari i sur., 2002). Nadalje ovaj test ne može utvrditi učinke na veće koncentracije usljed relativno viskog sadržaja DNA u repu.

3.4 Protočna citofluorimetrija

Protočna citofluorimetrija je instrumentalna metoda kojom se određuju promjene u staničnom ciklusu uzrokovane oštećenjima DNA. U pravilu normalne diploidne stanice (ne-replicirajuće G_0 stanice i stanice u G_1 fazi staničnog ciklusa) u organizmima trebaju imati isti sadržaj DNA-2N. DNA replikacija tijekom S faze rezultira povećanjem sadržaja DNA na 4 N (u S fazi događa se replikacija DNA), koji ostaje kao vrijednost tijekom G_2 faze i mitoze (M faza). Nakon mitoze originalna stanica je replicirana odnosno nastaju 2 stanice kćeri, a svaka sadrži 2 N. Sam princip metode temelji se na stehiometrijskom vezanju fluorescentne boje (DAPI) na DNA, a emitirana fluorescencija je proporcionalna količini DNA. Na Slici 8. su prikazane analizirane stanice koje su svrstane u 3 kategorije: stanice u G_0 ili G_1 fazi s nerepliciranom DNA, stanice u G_2 fazi ili mitozu s više repliciranom DNA (dvaput u G_1 fazi) te stanice u S fazi sa srednjim iznosom DNA.



Slika 8: Tipičan histogram fluorescencije DNA dobiven protočnom citofluorimetrijom. (Bihari, 2017)

Protočna citofluorimetrija predstavlja pogodnu metodu za utvrđivanje genotoksičnih učinaka zagađivala te može utvrditi prisutnost genotoksične komponente u nepoznatom ekosustavu (Bihari, 2017). Tehnika omogućava analiziranje staničnog ciklusa i sadržaj DNA kao i obradu velikog broja stanica u kratkom vremenu. Metoda može brzo otkriti promjene u staničnom ciklusu nastale oštećenjem DNA.

Protočna citofluorimetrija je omogućena razvojem protočnog citofluorimetra. Protočni fluorimetar je uređaj koji se sastoji od 3 međusobno povezana sustava: protočnog, optičkog i elektronskog (Batinić i sur., 2006).

Načelo rada protočnog citofluorimetra temelji se na raspršivanju svjetlosti te fluorescenciji obojane ili nebojane stanice prolaskom kroz detektor koji pretvara signal u elektronski signal, a odgovara specifičnom parametru za određenu stanicu. Sadržaj DNA se može pratiti i pomoću raznih boja poput etidijevog bromida ili uz pomoć onih boja koje se vežu na površinu DNA (Telford i sur., 1992).

Pomoću protočne citofluorimetrije možemo analizirati sadržaj DNA te razne promjene u staničnom ciklusu, pa je zbog toga ova metoda korištena za utvrđivanje genotoksina ili ksenobiotika u različitim tipovima stanica u morskim beskralješnjacima i kralješnjacima. Analiza protočne citofluorimetrije provedena je za otkrivanje postotka stanica u svakoj fazi staničnog ciklusa u svrhu procjene staničnog ciklusa u populacijama.

Dobiveni sadržaj DNA se analizira pomoću software programa samog protočnog citofluorimetra. Analiza uključuje izračunavanje koeficijenta varijacije (CV). Više vrijednosti CV od kontrolnih uzoraka ukazuju na oštećenja DNA kao što su kromosomske aberacije uzrokovane klastogenim agensima - mutagenima koji uzrokuju lomove u kromosomima. Nadalje više vrijednosti CV mogu ukazivati i na aneuploidiju kao i na oštećenja DNA uzrokovane zračenjem.

S trenutnom zabrinutošću o mutagenim spojevima u morskom okolišu te priznatošću da su morske vrste osjetljivije na agense koji uzrokuju oštećenja, upravo protočna citofluorimetrija predstavlja jednu od korisnih metoda za procjenu okolišnog opterećenja ekosustava. Ono što nam je već poznato je to da postoje podaci o promjenama u staničnom ciklusu izazvanih genotoksičnim agensima. Već ranije je otkriveno da su promjene u staničnom ciklusu su

uzrokovane genotoksičnim agensima koji su prisutni u hemocitima dagnji te upravo to može uzrokovati zastoj u G₁ i G₂ fazi što uzrokuje i duži popravak (Bihari i sur., 2001).

U posljednjem desetljeću analiza protočne citofluorimetrije primjenjena je na akvatičnim organizmima gdje su oni bili izloženi raznim genotoksičnim agensima (Mičić i sur., 2004). Abnormalnosti u distribuciji staničnog sadržaja DNA te progresija neoplastičnih promjena otkrivena je u školjkašima (Elston i sur., 1990; Moore i sur., 1991; Reno i sur., 1994). Dokazano je da izlaganje dagnji *M. galloprovincialis* raznim okolišnim agensima dovodi do promjena u staničnom ciklusu hemocita. Potvrđene su razlike u integritetu DNA između jedinki, aneuploidija te apoptoza (Bihari i sur., 2003). Također je utvrđen učinak 2,4-diklorofenoksi octene kiseline (herbicid) na stanični ciklus hemocita dagnji (Mičić i sur., 2004) kao i benzo(a)pirena, 4-nitrokinolin-1-oksida te tributilinkositra (Mičić i sur., 2002).

Metoda protočne citofluorimetrije dokazana je kao moćna tehnika za utvrđivanje promjena u staničnom ciklusu u hemolimfi dagnje. Ona može poslužiti za otkrivanje ekološke značajnosti kod oštećenja gena u populacijama morskih beskralješnjaka (Bihari i sur., 2003). Karakteristike ove metode ogledaju se u tome što je brza, precizna te praktična metoda, s kojom je moguće analizirati čak 50 uzoraka dnevno. Omogućava analizu različitih tipova stanica te nije destruktivna za organizam i vrlo praktična zbog toga što je za analizu potrebna mala količina uzorka.

Predstavlja vrlo pogodnu metodu za analizu velikog broja uzorka tijekom monitoringa. Brzina detekcije je isto jedna od prednosti te dopušta akviziciju od 10⁴- 10⁵ stanica i to u 5 min. Protočna citofluorimetrija omogućava brzo otkrivanje promjene u staničnom ciklusu koje su rezultirale od oštećenja DNA odnosno omogućuje analizu koja uključuje proliferaciju, kašnjenje u G₁ fazi, zastoj G₂ faze, apoptozu te ploidiiju (Bihari, 2017).

No, s obzirom da je za ovu metodu potreban protočni citofluorimetar, upravo to predstavlja njen najveći nedotatak zbog skupe uređaja.

4. ZAKLJUČCI

U ovom radu su uspoređene četiri metode za određivanje oštećenja DNA uzrokovanih modelnim genotoksinima i aktualnim genotoksičnim zagađenjem mora. To su alkalno filter eluiranje, brza mikrometoda, komet test i protočna citofluorimetrija. Na osnovu provedene analize može se zaključiti sljedeće:

1. Alkalno filter eluiranje omogućava detekciju primarnih oštećenja DNA u 12 uzoraka tijekom 48 sati analize te nije pogodna za biomonitoring.
2. Brza mikrometoda omogućava analizu cjelovitosti DNA u 96 uzoraka tijekom 2 sata analize što je čini vrlo pogodnom za biomonitoring.
3. Komet test omogućava analizu većeg broja uzoraka ali sama metoda je dugotrajna (elektroforeza, mikroskopiranje) zamorna i koristi etidijum bromid kao opasnu kemikaliju.
4. Protočna citofluorimetrija omogućava analizu promjena staničnog ciklusa uzrokovanih oštećenjima DNA velikog broja uzoraka (više od 50) tijekom radnog dana te je izuzetno pogodna za biomonitoring. Međutim protočni citofluorimetar je vrlo skup instrument.
5. Za potrebe biomonitoringa kvalitete mora opterećenog genotoksinima preporuča se kao jeftinija metoda brza mikrometoda ili sofisticirana protočna citofluorimetrija. Izbor ovisi o tipu oštećenja DNA koji se želi istražiti.

5.LITERATURA

- Almeida, C., Peirera, C., Gomes, T., Bebbianno, M.J., Cravo, A. (2011) DNA damage as a biomarker of genotoxic contamination in *Mytilus galloprovincialis* from the south coast of Portugal, J. Environm. Moniti 13:2559-2567
- Banni, M., Negri, A., Dagnino, A., Jebali, J., Ameer, S., Boussetta, H. (2010) Acute effects of benzo[a]pyrene on digestive gland enzymatic biomarkers and DNA damage on mussel *Mytilus galloprovincialis*. Ecotoxicol. Environm. Safety. 73:842 -848
- Bayne B.L. (1976) In: Marine mussels, their ecology and physiology, Ed. B.L. Bayne, Cambridge University Press London, 506
- Batel, R., Jakšić, Ž., Bihari, N., Hamer, B., Fafandel, M., Chauvin, C., Schroder H.C., Müller W.E.G., Zahn, R.K. (1999) A microplate assay for DNA damage determination (Fast Micromethod) in cell suspension and solid tissue. Anal. Biochem. 270: 195-200
- Batel, R., Vukmirović, M., Bihari, N., Zahn, R.K., Müller, W.E.G. (1992). Nonradiometric detection of DNA crosslinks in mussel hemolymph by alkaline elution. Anal. Biochem. 212: 402-406
- Batinić, D., Rnjak, L., Dubravčić, L. (2006) Protočna citometrija u hematologiji. Paediatrica Croatia Supplement 50:176-182
- Bihari, N. (2017) Rapid Assessment of Genotoxicity by Flow Cytometric Detection of Cell Cycle Alterations. UR Didenko, V.13 ppt 21
- Bihari, N., Batel, I. (2018) Ekotoksikologija mora i oceana. Split: Institut za oceanografiju i ribarstvo, udžbenik
- Bihari, N., Batel, R. (1998) Procjena genotoksičnog rizika kojemu su izloženi organizmi u moru, Priroda 30-31
- Bihari, N., Fafandel, M. (2004) Interspecies differences in DNA single strand breaks caused by benzo(a)pyrene and marine environment. Mutat. Reas. 552: 209-217

Bihari, N., Hamer, B., Jakšić, Ž., Fafandžel, M., Mičić, M., Batel, R. (2001) Application of alkaline elution, fast micromethod and flow cytometry in detection of marine contamination. Cell. and Mol. Biol.48:373-377

Bihari, N., Batel, R., Jakšić, Ž., Müller, W.E.G., Waldmann, P., Zahn, R.,K (2002) Comparasion between DNA damage in HeLa cells as measured by a Comet assay and Fast Micromethod.Croat Chem Acta 75, 793-804

Bihari, N., Batel, R., Zahn, R.K. (1990) DNA damage determination by the alkaline eluation technique in heamolymph of mussel *Mytilus galloprovincialis* treated with benzo(a)pyrene and 4- nitroquinoline-N-oxide, Aquat. Toxicol. 18: 13-22

Bihari, N., Mičić, M., Batel, R., Zahn, R .K. (2003) Flow cytometry detection of DNA cell cycle alterations in hemocytes of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) off the Adriatic coast. Croatia. Aquat. Toxicol., 64: 121-129

Bihari, N., Batel,R., Zahn, R.K. (1991) DNA determination by alkaline elution technique in the heamolymph of mussel *Mytilus galloprovincialis* treathed with benzo(a)pyrene and 4-nitroquinoline-N-oxide. Aquat. Toxicol., 18: 13-22

Bihari, N., Batel, R., Zahn,R. K. (1992) Fractionation of DNA from marine invertebrate (*Maja crispata*, *Mytilus galloprovincialis*) hemolymph by alkaline elution. Comp. Biochem. Physiol. 102: 419-424

Bolognesi, C., Frenzilli, G., Lasagna, C. Perrone, E., Roggieri, P. (2004) Genotoxicity biomarkers in *Mytilus galloprovincialis*: wild vesus caged mussels. Experimental studies. Environ Mol Mutagen. 33:287-292

Cerutti, P., Emerit., I. Amstad, P. (1983) Membrane mediated chromosomal damage. In: Genes and proteins in oncogenesis, edited by Weinstein, I.B. and H.J. Vogel, Academic Press, New York, pp. 55 67.

Collins, A. (2004) The comet assay for DNA damage and repair. Mol. Biotechnol. 26: 249-261

Cottelle, S. Ferard, J.F (1999) Comet assay in genetic ecotoxicology:a review. Environ Mol Mutagen. 34: 246-55

- Djelić, N., Marković, B., Djelić, D. (2003) Komet test - Visoko senzitivna metoda detekcije oštećenja DNK. Katedra za Biologiju, Fakultet veterinarske medicine Beograd 21: 1-9
- Elston, R.A., Drum, A.S., Allen, S. K. (1990) Progressive development of circulating polyploid cells in *Mytilus* with hemic neoplasia. Dis. Aquat. Org. 8, 51 – 59
- Frenzilli, G., Nigro, M., Scarcelli, V., Gorbi, S., Regoli, F. (2001) DNA integrity and total oxyradical scavenging capacity in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*: a field study in a highly eutrophicated coastal lagoon. Aquat. Toxicol. 53: 19-32.
- Frenzilli, G., Nigro, M., Lyons, B.P. (2009) The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. Mutat. Res. 681: 80-92
- Hamer, B., Jakšić, Ž., Pavičić-Hamer, D., Perić, L., Medaković, D., Ivanković, D., Pavičić J., Zilberberg. C., Schroder Heinz. C., Müller, W. E.G., Smodlaka, N., Batel, R. (2008) Effect of hypoosmotic stress by low salinity acclimation of Mediterranean mussels *Mytilus galloprovincialis* on biological parameters used for pollution assessment. Aquat. Toxicol. 89:137-151
- Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab S., Burlinson, B., Clay, P., Collins, A., Smith, A., Speit G., Thybaud, V., Tice, R.R. (2003) Recommendation for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. Mutagenesis,18:45-51
- <https://www.swims.hku.hk/> (28.8.2019.)
- [helancet.com/journals/lanonc/article/PIIS1470-2045\(01\)00454-5/fulltext?refuid=S1476-5586%2814%2900015-3&refissn=1476-5586&code=lancet-site](http://helancet.com/journals/lanonc/article/PIIS1470-2045(01)00454-5/fulltext?refuid=S1476-5586%2814%2900015-3&refissn=1476-5586&code=lancet-site) (20.7.2019.)
- Jakšić, Ž. (2002) Razvoj i primjena brze mikrometode određivanja i praćenja oštećenja DNA u škrigama dagnje *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck,1819). Doktorska disertacija
- Jakšić, Ž., Batel, R. (2003) DNA integrity determination in marine mussel *Mytilus galloprovincialis* by Fast Micromethod. Aquat. Toxicol. 65: 361-376
- Jakšić, Ž., Batel, R., Bihari, N., Mičić, M., Zahn R. K. (2005) Adriatic coast as a microsom for global genotoxic marine contamination- A long-term field study. Mar. Poll. Bull. 50: 1314-1327

- Jones, H.D. (1983) Circulatory systems of gastropods and bivalves. In: The mollusca, Vol. 5, Physiology, Part 2., edited by A.S.M. Saleuddin and K.M. Wilbur, Academic Press, New York. 189-238
- Klobučar, G.I.V., Pavlica, M., Erben, R., Papeš, D. (2003) Application of the micronucleus and comet assay to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. *Aquat. Toxicol.* 64: 15-23
- Kohn, K.W. (1991) Principles and practice of DNA filter elution. *Pharmac. Ther.* 49: 55-77
- Kohn K. W., Grimek-Ewig R. A. (1976) Effect of pH on the bleomycin-induced DNA single strand scission in L1210 cells and the relation to cell survival. *Cancer Res.* 36: 3834-2838
- Kumaravel, T.S., Vilhar, B., Faux, S., Jha, A. (2009) Comet assay measurements: a perspective. *Cell Biol. Toxicol.* 25: 53-64
- Lapiente, J., Lourenco, J., Mendo, S., Borrás, M., Martins, G. Costa, P., Pacheco, M. (2015) The comet assay and its applications in the field of ecotoxicology: a mature tool that continues to expand its perspectives. *Front. Genet.* 6:180-190
- Lee, R.F., Steinart, S. (2003) Use of single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat. Res.* 544: 43-64
- Linardić, M., (2014) Procjena prilagodbe dagnje *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 na genotoksični stres. Diplomski rad
- Mersch, J., Beauvais, M.N., Nagel P. (1996) Induction of micronuclei haemocytes and gill cells of zebra mussels *Dreissena polymorpha* exposed to clastogens. *Mutat Res.* 371: 47-55
- Michel, C., Bourgeault, A., Gourlay-Francé, C., Palais, F., Geffard, A., Vincent Hubert, F. (2013) Seasonal and PAH impact on DNA strand-break levels in gills of transplanted zebra mussels. *Ecotoxicol. Environ. Safety.* 92: 18–26
- Mičić, M., Bihari, N., Jakšić, Ž. Müller, W.E.G., Batel, R. (2002) DNA damage and apoptosis in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Environ. Res.* 53: 243-262

- Mičić, M., Bihari, N., Mlinarič-Raščan, I. (2004) Influence of herbicide, 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, on haemocyte DNA of *in vivo* treated mussel. *Exp. Mar. Biol. and Ecol.* 311:1 57-169
- Moore, J.D., Elston, R.A., Drum, S., Wilkinson, M.T. (1991) Alternate pathogenesis of systematic neoplasia in the bivalve mollusc *Mytilus*. *J. Invertebr. Pathol.* 5: 231 – 243
- Ostling, O., Johanson, K.J. (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biochem. Res. Comm.* 123: 291-298
- Petzold, G.L., Swenberg J.A. (1978) Detection of DNA damage *in vivo* following exposure of rats to carcinogens. *Cancer Res.* 38: 1589-1594
- Rank, J., Jensen, K., Jespersen, P. H. (2005) Monitoring DNA damage in indigenous blue mussels (*Mytilus edulis*) sampled from coastal sites in Denmark. *Mutat Res.* 585: 33-42
- Reno, P.W., House, M., Illingworth, A., (1994) Flow cytometric and chromosome analysis of softshell clams *Mya arenaria*, with disseminated neoplasia. *J. Invertebr. Pathol.* 64: 163 – 172.
- Rojas, E., Lopez, M.C. Valverde, M. (1999) Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications *J. Chromatogr B* 722: 225-254
- Schröder, HC, Batel, R., Hassanein, H.M.A. (2000) Correlation between the level of the potential biomarker, heatshock protein, and the occurrence of DNA damage in the dab, *Limanda limanda*: a field study in the North Sea and the English Channel *Mar. Environ. Res.* 49:201-215
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 175:18-191
- Shugart, L.R. (2000) DNA damage as a biomarker of exposure. *Ecotoxicology.* 9: 329-340
- Speit, G., Hartmann, A. (2006) The comet assay: a sensitive genotoxicity test for detection of DNA damage and repair. *Meth. Mol. Biol.* 314: 275-286
- Štambuk, A., Pavlica, M., Malović, L., Klobučar, G. (2008) Persistence of DNA damage in the freshwater mussel *Unio pictorum* upon exposure to ethyl methanesulphonate and hydrogen peroxide. *Environ. Mol Mutagen.* 49: 217-225.

- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Myamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F. (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicity testing. *Environm. Mol. Mutagen.* 35: 206-221
- Telford, W.G., King, L.E., Fraker, P.J. (1992) Comparative evaluation of several DNA binding dyes in the detection of apoptosis-associated chromatin degradation by flow cytometry. *Cytometry* 13: 137-143
- Thomas, R.E., Lindeberg, M., Harris, P.M., Rice S.D. (2007) Induction of DNA strand breaks in the mussel (*Mytilus trossulus*) and clam (*Protothaca staminea*) following chronic field exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons from the Exxon Valdez spill. *Mar. Poll. Bull.* 54: 726-732
- Vasileva, B., Yakimov, L., Kukurina, B., Georgieva, M., Miloshev, G., Chipev, N. (2017) Comet assay- a sensitive tool for genotoxicity assessment of environmental stress in *Mytilus galloprovincialis* from the Bulgarian Black Sea coast. *BioDiscovery* 20: 1-2
- Ventura, L., Giovannini A., Savio, M., Donà M., Macovei, A., Buttafava, A., Carbonera, D., Balestrazzi, A. (2013) Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay with plants: Research on DNA repair and ecogenotoxicity testing. *Chemosphere.* 92: 1-9
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., Koehler, A. (2007) The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp. Biochem. Physiol.* 146C: 281-300
- Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F., Fabbri, R. (1997) A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs, *Mar. Environ. Res.* 44: 69-84
- Vukmirović, M., Bihari, N., Zahn, R.K., Müller, W.E.G., Batel, R. (1994) DNA damage in marine mussel *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of environmental contamination. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 109: 165-172
- Washburn, P.C., Di Giulio, R.T. (1989) Nitroaromatic stimulation of superoxide production in three species of freshwater fish. *Mar. Environ. Res.* 24: 291-294

6.SAŽETAK

More se sve više onečišćuje zbog brojnih tvari koje dospijevaju u morski okoliš. Značajna grupa onečišćivala koji mogu izazvati učinak poguban za morske organizme su genotoksične tvari. To su tvari koje utječu na promjenu strukture i funkcije molekule DNA. Izmjereno oštećenje DNA pokazuje da je došlo do interakcije između zagađivala i organizma. Stoga je mjerenje oštećenja DNA bitno za utvrđivanje genotoksičnog rizika. U svrhu određivanja oštećenja DNA u bioindikatorskom organizmu, dagnji (*Mytilus galloprovincialis*) za praćenje zagađenja morskog ekosustava koriste se ove metode: alkalno filter eluiranje, brza mikrometoda, komet test te protočna citofluorimetrija. Alkalno filter eluiranje i komet test su dugotrajne i zamorne metode dok brza mikrometoda omogućava analizu cjelovitosti DNA velikog broja uzoraka u kratkom periodu (96 uzoraka tijekom 2 sata) pa je pogodna i za monitoring. Sve tri metode analiziraju iste tipove oštećenja DNA: jednolančane i dvolančane lomove, umrežavanja DNA lanca te DNA lanca i proteina, interkaliranje između pojedinih baza, nastanak alkalno labilnih mjesta i dr. Protočna citofluorimetrija pogodna je za analizu staničnog ciklusa većeg broja uzoraka, ali je instrument za ovu metodu skup. Stoga, se za potrebe biomonitoringa preporuča brza mikrometoda kao jeftinija metoda ili skuplja protočna citofluorimetrija, a izbor ovisi o genotoksičnom učinku.

Ključne riječi: oštećenje DNA, dagnja, *Mytilus galloprovincialis*, alkalno filter eluiranje, brza mikrometoda, komet test, protočna citofluorimetrija

7.ABSTRACT

The sea is becoming increasingly polluted by the sum of the many substances that enter the marine environment. A significant group of substances affecting marine organisms are genotoxic. These are the substances damaging structure and function of a DNA molecule. Measured DNA damage indicates that an interaction has occurred between the pollutant and the organism. Therefore, the measurement of DNA damage is essential to determine genotoxic risk. For the purpose of determining DNA damage in a bioindicator organism, mussels (*Mytilus galloprovincialis*) used to monitor marine ecosystem pollution, the following methods are being applied: alkaline filter elution, rapid micromethod, comet assay and flow cytometry. Alkaline filter elution and comet assay are time-consuming and tedious methods, while the rapid micromethod enables the analysis of DNA integrity in multiple samples in short time (96 samples over 2 hours) and is therefore suitable for monitoring. All three methods analyze the same types of DNA damage: single-stranded and double-stranded breaks, cross-linking of DNA strands and DNA strands and proteins, intercalation between bases, formation of alkaline labile sites, etc. Flow cytometry is suitable for cell cycle analysis of larger number of samples but the necessary instrument is expensive. Therefore, it is recommended to use fast micromethod for biomonitoring as a more cost effective method or expensive flow cytometry, and the choice depends on the genotoxic effect.

Key words: DNA damage, mussel, *Mytilus galloprovincialis*, alkaline filter elution, fast micromethod, comet assay, flow cytometry

