

# Utjecaj benzo(a) pirena na integritet DNA-a škrigama dagnje *M. galloprovincialis*

---

Anić, Dorotea

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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:137:142922>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-26**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JURJA DOBRILE U PULI  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ ZNANOST O MORU

**Dorotea Anić**

**UTJECAJ BENZO(A)PIRENA NA INTEGRITET DNA U ŠKRGAMA  
DAGNJE *Mytilus galloprovincialis***

ZAVRŠNI RAD

Pula, 2020.

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli

Sveučilišni preddiplomski studij Znanost o moru

**Dorotea Anić**

**UTJECAJ BENZO(A)PIRENA NA INTEGRITET DNA U ŠKRGAMA  
DAGNJE *Mytilus galloprovincialis***

Završni rad

JMBAG: 0303068282, redoviti student

Studijski smjer: Znanost o moru

Predmet: Programirane biosinteze i genotoksični rizik

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Interdisciplinarno

Znanstvena grana: Znanost o moru

Mentor: izv. prof. dr.sc. Maja Fafandžel

Komentor: doc. dr. sc. Ines Kovačić

Pula, 2020.



## IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, dolje potpisani DOROTEJA ANIĆ, kandidat za prvostupnika 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.

*Doroteja Anić* Student:  
\_\_\_\_\_

U Puli, 2020. godine



## IZJAVA

### o korištenju autorskog djela

Ja, DOROTEA ANIĆ dajem odobrenje Sveučilištu Jurja Dobrile u Puli, kao nositelju prava iskorištavanja, da moj završni rad pod nazivom "UTJECAJ BENZO(A)PIRENA NA INTEGRITET DNA U ŠKRGAMA DAGNJE *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*" 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 sa 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, 2020. godine

Potpis  
*Dorotea Anić*

---

# Zahvala

Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Maji Fafanđel na strpljenju, pomoći i savjetima koji su mi pomogli u izradi završnog rada.

Zahvaljujem se voditelju laboratorija dr. sc. Renatu Batelu na strpljenju i pomoći tijekom praktičnog dijela završnog rada te u prikazivanju metode koju je profesor razvio.

Zahvaljujem se dr. sc. Ines Kovačić na strpljenju i savjetima tijekom izrade završnog rada.

Zahvaljujem se Centru za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković u Rovinju za povjeravanje laboratorijske opreme i prostora bez kojeg ovaj rad ne bi bilo moguće napraviti.

Također bi se od srca htjela zahvaliti svojoj obitelji, prijateljima Andrei, Ani, Kris, Ileani i Pauli, te svojim kolegama Marinu, Filipu, Ani i Bruni na strpljenju, podršci, savjetima i pomoći tijekom izrade ovog završnog rada.

## Sadržaj

Popis kratica i simbola .....	1
1. Uvod.....	2
1.1 Ugljikovodici i genotoksičnost.....	2
1.1.1 Benzo(a)piren .....	4
1.2 Mediteranska dagnja ( <i>Mytilus galloprovincialis</i> ) .....	6
1.2.1 Anatomija i reprodukcija.....	7
1.2.2 Bioindikatorska vrsta.....	8
1.2.3 Integritet DNA kao indikator genotoksičnog učinka .....	9
1.3 Metode određivanja integriteta DNA .....	12
2. Ciljevi istraživanja .....	14
3. Materijali i metode .....	15
3.1 Materijali .....	15
3.1.1 Kemikalije .....	15
3.1.2 Dagnja <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....	15
3.2 Metode.....	15
3.2.1 Izlaganje dagnje <i>Mytilus galloprovincialis</i> benzo(a)pirenu .....	15
3.2.2 Fast Mikrometoda .....	15
3.2.2.1 Priprema uzorka .....	16
3.2.2.2 Mjerenje fluorescencije.....	16
3.2.2.3 Određivanje integriteta DNA .....	16
4. Rezultati .....	18
4.1 Uvjeti mjerenja integriteta DNA u škrgama dagnje <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....	18
5. Rasprava.....	21
6. Zaključak.....	23
7. Literatura.....	24

## Popis kratica i simbola

DNA	Deoksiribonukleinska kiselina
RNA	Ribonukleinska kiselina
ds-DNA	Dvolančana DNA
ss-DNA	Jednolančana DNA
B(a)P	Benzo(a)piren
UV	Ultraljubičasto zračenje/svijetlo
PAU	Poličiklički aromatski ugljikovodici
DMSO	Dimetil sulfoksid
TRIS	Tris (hidroksimetil) aminometan
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina



## 1. Uvod

### 1.1 Ugljikovodici i genotoksičnost

Ugljikovodici su spojevi ugljika i vodika. Upravo zbog svojstva ugljikovih atoma da ostvaruju jake veze s drugim ugljikovim atomima i atomima drugih elemenata omogućena je velika raznolikost organskih molekula. Zbog velike raznolikosti u njihovoj strukturi veliki broj različitih molekula tvore život na Zemlji.

Ugljikovodici se dijele u dvije glavne skupine: alifatski i aromatski ugljikovodici. Alifatski ugljikovodici se dijele na acikličke (lančaste) i cikličke (prstenaste). Aciklički ugljikovodici se zatim dijele u tri glavne skupine: alkani, alkeni i alkini, a ciklični ugljikovodici dijele se u cikloalkane i cikloalkene (Carey i sur., 2016.).

Aromatski ugljikovodici ili areni sadrže benzensku jezgru ili aromatski prsten. Benzenska jezgra je šesterostrani prsten u kojem je svaka druga veza dvostruka. Njihov predstavnik i najjednostavniji spoj je benzen koji ima molekulsku formulu  $C_6H_6$ . Areni su karcenogene, nezasićene, stabilne te slabo reaktivne molekule koje se ne tope u vodi, imaju manju gustoću od vode te su nepolarne (Carey i sur., 2016.).

Policiklični aromatski ugljikovodici ili PAU su vrsta tzv. postojanog organskog zagađivala (engl. *Persistent organic pollutants* - POPs ) koji se sastoje od dva ili više spojenih aromatskih prstena. Broj spojenih prstena određuje njihove karakteristike uključujući topljivost i tlak pare. Te karakteristike potom određuju ako će se u atmosferi, hidrosferi i biosferi nalaziti u čestičnoj ili otopljenoj fazi. PAU se najčešće nalaze u mješavinama sa ostalim molekulama te zbog toga dolaze u različitim kombinacijama.

PAU se u okolišu mogu pojaviti iz prirodnih i antropogenih izvora. U prirodnim izvorima organska tvar prolazi kroz reakcije sa visokom temperaturom i tlakom (vulkanske erupcije, šumski požari). Kada govorimo o antropogenim izvorima, PAU dolaze iz sagorijevanja drva, nepotpunog sagorijevanja petrolejskih produkata, industrijskih procesa i ostalih ljudskih aktivnosti. Najveći ulazi PAU u okoliš su površinska oticanja i ispuštanja u atmosferu. U trenutku u kojemu PAU uđu u atmosferu, adsorbiraju se na partikularne tvari. Nakon što se adsorbiraju na partikularne tvari mogu prijeći veliku udaljenost. PAU su u hidrosferi i geosferi pod utjecajem mokrih i suhih taloženja. To nam omogućuje nekoliko podjela i transformacijskih procesa koji određuju sudbinu PAU, a to su podjela između vode i zraka, vode i sedimenta i vode i biota (Douben, 2003.). PAU sa 2 ili 3 prstena javljati će se otopljeni

u vodenom stupcu ili će biti u obliku pare u atmosferi, dok PAU sa 4, 5 i 6 prstena će se spajati sa česticama u zraku ili vodi.

U obalnom dijelu postoje dva glavna izvora PAU: dotok voda koje sadrže rastopljene i čestične konstituente i oborine ili otapanja konstituenata u more iz atmosfere. Najviše ih se nalazi u područjima estuarija i obalnih područja kod urbanih središta gdje se nalaze najveći izvori zagađenja kao što su otpadne vode, urbani odljevi, izljevi tijekom transporta i proizvodnje fosilnih goriva te izljevi iz industrije.

Kemijski sastav PAU utječe na njihovu topljivost i hidrofobnost te zajedno sa polarnosti vode omogućuje PAU da završavaju u sedimentu. Upravo to čini sediment najvećim skladištem PAU u morskom okolišu. Najveću zastupljenost u sedimentu imaju PAU sa 4, 5 i 6 spojenih prstenova. PAU sa 2 i 3 spojena prstena otopljeni u vodenom stupcu. U morskoj vodi koncentracija PAU ima veliku varijabilnost od neprimijećenih koncentracija sve do 11 µg/L. Koncentracije mogu imati velike varijacije čak i na relativno malom geografskom području. Najčešće postoji gradijent koncentracije, najmanje koncentracije se nalaze prema otvorenom moru dok koncentracije rastu što se više približavamo obalnom području.

Zbog velike izloženosti morske sredine PAU pojavljuje se bioakumulacija u kralješnjacima i nekim beskralješnjacima. Bioakumulacija se javlja kad organizam nakuplja više toksičnih tvari nego što ih gubi te dolazi do njihovog nakupljanja u organizmu. Organizmi viših trofičkih razina će moći eliminirati veće koncentracije toksičnih tvari nego organizmi manjih trofičkih razina. Biomagnifikacija je rast koncentracije toksičnih tvari kroz lanac prehrane zbog bioakumulacije toksičnih tvari u nižim trofičkim razinama. Biomagnifikacija PAU se kod organizama ne pojavljuje te se čak količina PAU u organizmima više trofičke razine smanjuje zbog različite toksikokinetike kod različitih vrsta i povećavanja biotransformacije pogotovo kod kralješnjaka (Douben, 2003.).

Količina PAU koji će biti unesen u organizam ovisi i o biodostupnosti PAU u sedimentu te sposobnosti eliminacije PAU iz organizma. Također, količina PAU-a bit će određena i načinom ishrane pojedine vrste organizma. Veće količine PAU-a će se naći u organizmima poput beskralješnjaka koji se hrane na filtratorski način ili kod organizama koji imaju bentički način života.

Zbog afiniteta prema lipidima i organskom ugljiku organizmi eliminiraju PAU tako da ih pohranjuju u masne naslage ili ih uklone pomoću metabolizma (Douben, 2003.).

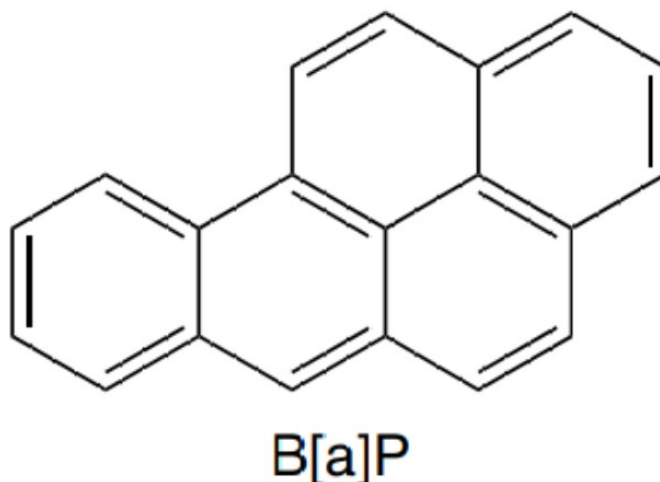
### 1.1.1 Benzo(a)piren

Benzo(a)piren ili B(a)P je policiklički aromatski ugljikovodik sa strukturom od 5 prstena ( $C_{20}H_{12}$ )(Slika 1). U okoliš ulazi nepotpunim izgaranjem fosilnog goriva, duhana i ugljena te ga se zato može pronaći u dimnjacima i u hrani koja je pržena na otvorenoj vatri. B(a)P je karcinogen. U jetri se pretvara u epoksi diol koji može dovesti do mutacije što dovodi do nekontroliranog rasta određenih stanica (Carey i sur., 2017.). Zbog svog karcinogenog i mutagenog svojstva stavljen je na EPA listu sa 16 PAU koji imaju toksične učinke na sisavce i morske organizme (Douben, 2003.).

B(a)P se zbog svoje strukture veže za čestice manjeg promjera koje duže ostaju u zraku te zbog toga predstavljaju veći rizik za dišni sustav organizama. Često se uzima kao indikator za PAU jer iako je njegova koncentracija mala uvijek je prisutan tamo gdje ima i PAH-ova. Unutar propisa europske unije gornja granica B(a)P-a je  $1\text{ ng}/\text{m}^3$  a tolerantna granica  $2\text{ ng}/\text{m}^3$  (Jakovljević, 2011.).

U vodi B(a)P se veže za partikularnu tvar te se zbog toga najveće koncentracije B(a)P-a nalaze upravo u sedimentu. Iako se najviše taloži u sedimentu dostupan je i u vodenom stupcu te tako može završiti unutar mnogih organizama pogotovo u onima koji se hrane filtracijom (Bihari i sur., 2006). B(a)P će se u manjim koncentracijama unutar organizma metabolizirati i eliminirati. Što je organizam na većoj trofičkoj razini to će se B(a)P bolje metabolizirati. Do bioakumulacije B(a)P će doći kod organizama koji imaju slabiji metabolizam (Rust i sur., 2004.). Ako je organizam duže vrijeme izložen B(a)P-u njegove će koncentracije linearno rasti (Akcha i sur., 2000.). U organizmu najviše B(a)P-a nalazi se u dijelovima organizma koji su bogati lipidima, kod školjkaša to su gonade i plašt (Akcha i sur., 2000.). Ako se B(a)P u organizmu bioakumulira može doći do toksičnih i genotoksičnih učinaka poput, na primjer, stvaranja DNA adukata (Akcha i sur., 2000.).

Utjecaj B(a)P-a na integritet DNA istražen je korištenjem Fast mikrometode (Jakšić, 2002.) i metodom alkalne elucije (Bihari i sur. 1990.). Uz to, utvrđeno je da se kod manjih doza B(a)P može eliminirati iz organizma dok se kod većih doza javlja oštećenje integriteta DNA.



Slika 1 Shematski prikaz benzo(a)pirena (preuzeto iz: Douben, 2003.)

Genotoksičnost je svojstvo kemijskih spojeva da oštećuju genetičku informaciju u samoj stanici. Takvi se spojevi nazivaju genotoksini te njihov učinak dolazi kao posljedica međudjelovanja kemikalija koje narušavaju strukturu i slijed DNA. Nakon što su se genotoksini metabolički aktivirali oni mogu izravno ili neizravno djelovati na DNA. Ako se primarna oštećenja ne poprave te se prenesu na stanicu kćeri, može doći do sekundarnih promjena kao što su to kromosomske aberacije, zamjena sestrinskih kromatida i aktivacija onkogen<sup>1</sup> koji ima vrlo toksične posljedice. Organizam koji je izložen genotoksinima imat će pomak njegovog ravnotežnog stanja prema smjeru oštećenja. U slučaju da se oštećenja DNA uklone pomoću mehanizma popravka genetička informacija vraća se u ravnotežno stanje (Smodlaka, 2015.).

B(a)P je poznat genotoksični i kancerogeni kemijski spoj, ima sposobnosti stvaranja toksičnih učinka na čitavom nizu bioloških razina. Može inducirati ksenobiotički metabolizam riba i morskih poliheta, stvara genotoksične međuprodukte, kao što je B(a)P-7,8-dihidrodiol-9,10-epodsid (BPDE) koji tvori velike DNA adukte, zbog kojih može doći do mutacija. Također može izazvati genotoksičnost, oksidativni stres i endokrini poremećaj kod morskih školjkaša. Uz sve navedene učinke može stupiti u interakciju sa drugim molekulama te tako uzrokovati još dodatna oštećenja (Banni i sur., 2017.).

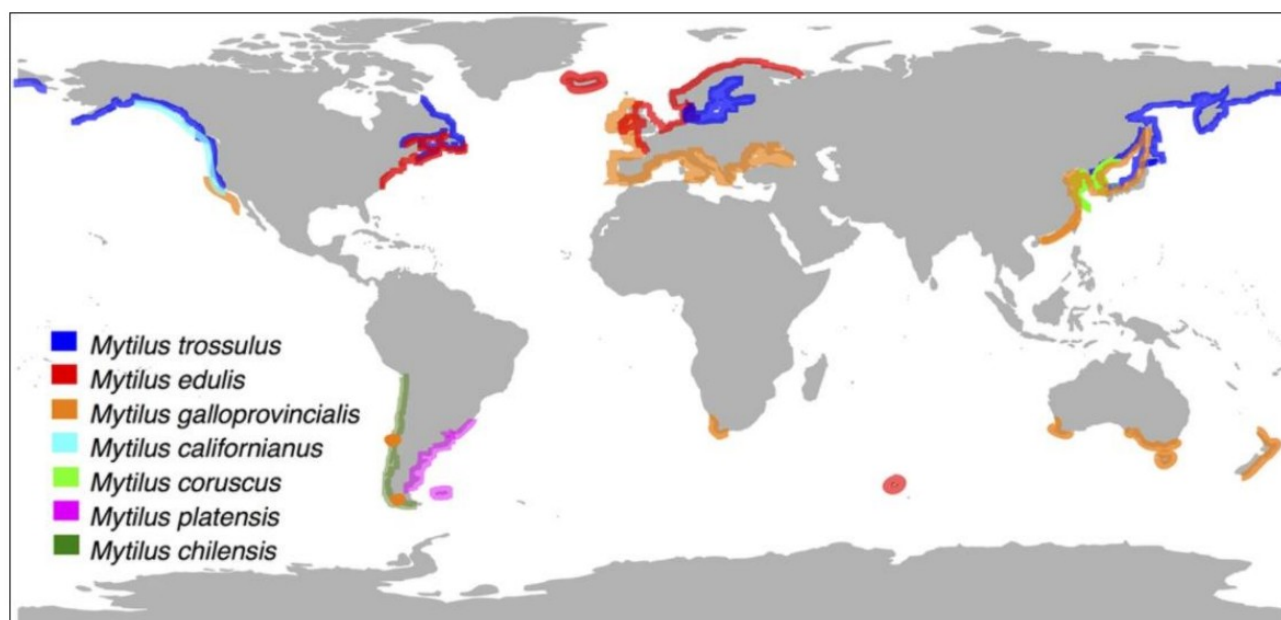
---

<sup>1</sup> Onkogen – geni koji izazivaju nekontrolirani rast stanica i razvijanje zloćudnih tumora

## 1.2 Mediteranska dagnja (*Mytilus galloprovincialis*)

*Mytilus galloprovincialis* (Lamarck 1819.) ili mediteranska dagnja spada u carstvo: Animalia, koljeno: Mollusca, razred: Bivalvia, red: Mytiloida, porodica: Mytilidae te rod: *Mytilus* (WoRMS taxon details: *Mytilus galloprovincialis*, 2020. Pristupljeno 11.06.2020.). Mediteranska dagnja ima dvije jednake ljuštore koje se izvana kreću od tamno plave pa sve do crne boje. Mogu narasti do 15 cm. Dagnja od 5 centimetra profiltrira 5 litara vode u sat vremena (*Cultured Aquatic Species Information Programme*, 2015. Pristupljeno 11.06.2020.). Ova vrsta voli kamenita dna, a zbog svog filtratorskog načina prehrane živi u prozračnim brzim vodama koje u sebi sadrže puno hranjivih čestica (Species profile: *Mytilus galloprovincialis* 2020. Pristupljeno 11.06.2020.).

Mediteranska dagnja je nativna na području Mediterana i Crnog mora. Zbog svoje lake prilagodljivosti rasprostranila se, na globalnoj razini, u velikim brodskim lukama zbog broskog prometa i balastnih voda. Ova se vrsta koristi i u marikulturi te je na nekim područjima uvedena kao izvor hrane. Na taj je način izazvala prijetnju nativnim školjkašima koji žive na tom području (Species profile: *Mytilus galloprovincialis* 2020. Pristupljeno 11.06.2020.).



Slika 2 Prikaz geografske rasprostranjenosti mediteranske dagnje (preuzeto s:

<https://www.nature.com/articles/srep26853/figures/1>)

### 1.2.1 Anatomija i reprodukcija

Na dorzalnoj strani mediteranske dagnje nalazi se mišić aduktor koji služi za čvrsto zatvaranje školjke te je štiti od predatora ili tijekom sušnih perioda. Ispod aduktora se nalazi stopalo, bisusna žlijezda koja ispušta bisusne niti i dagnji pomaže da se pričvrsti za podlogu, želudac i probavna žlijezda koja u sebi sadrži kristalni prutić koji omogućuje probavljane hrane. Na posteriornoj strani se nalaze izmetni i škržni sifoni. Optjecajni sustav je otvoreni te se srce koje se sastoji od jedne predklijetke i jedne klijetke nalazi pored bubrega. Na ventralnoj strani se nalaze dva para škrghi koje se sastoje od velikog broja paralelnih filamenata koji filtriraju vodu i hranu prenose do usta te gonade koje služe za reprodukciju.

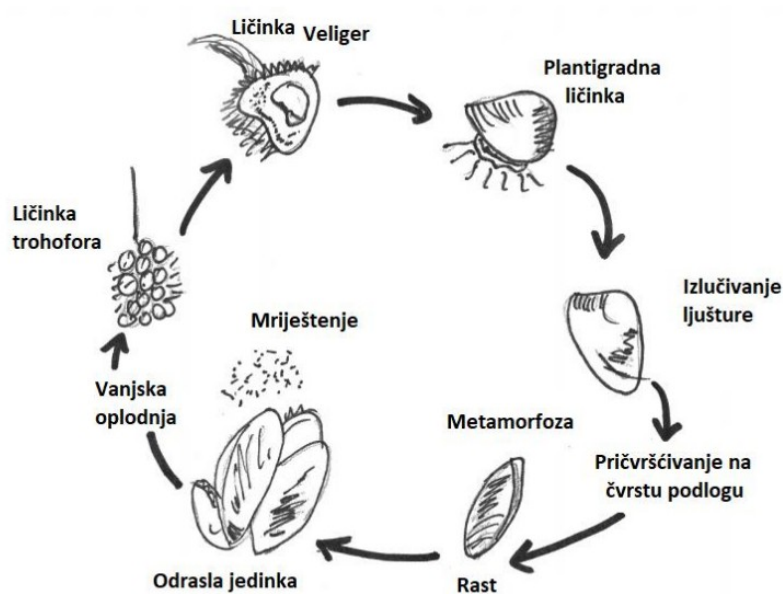


Slika 3 Prikaz dagnje *Mytilus galloprovincialis* (preuzeto s:

[https://www.google.com/imgres?imgurl=https%3A%2F%2Fupload.wikimedia.org%2Fwikipedia%2Fcommons%2Fa%2Fa9%2FMiesmuscheln-2.jpg&imgrefurl=https%3A%2F%2Fen.wikipedia.org%2Fwiki%2FBlue\\_mussel&docid=0ZOoSe2sFB6BaM&tbnid=mWZYVko6bkjkQM%3A&vet=10ahUKEwji85rS4K\\_kAhXSTxUIHb5\\_DXIQMwhIKAkWCQ..i&w=1864&h=3500&bih=576&biw=1366&q=mytilus%20galloprovincialis%20anatomy&ved=0ahUKEwji85rS4K\\_kAhXSTxUIHb5\\_DXIQMwhIKAkWCQ&iact=mrc&uact=8](https://www.google.com/imgres?imgurl=https%3A%2F%2Fupload.wikimedia.org%2Fwikipedia%2Fcommons%2Fa%2Fa9%2FMiesmuscheln-2.jpg&imgrefurl=https%3A%2F%2Fen.wikipedia.org%2Fwiki%2FBlue_mussel&docid=0ZOoSe2sFB6BaM&tbnid=mWZYVko6bkjkQM%3A&vet=10ahUKEwji85rS4K_kAhXSTxUIHb5_DXIQMwhIKAkWCQ..i&w=1864&h=3500&bih=576&biw=1366&q=mytilus%20galloprovincialis%20anatomy&ved=0ahUKEwji85rS4K_kAhXSTxUIHb5_DXIQMwhIKAkWCQ&iact=mrc&uact=8))

Mediteranska dagnja je odvojenog muškog i ženskog spola (gonohorist) te se oplodnja vrši kao i kod većine školjkaša izvan tijela same školjke (vanjska oplodnja). Za vrijeme razmnožavanja,

koje ovisno o temperaturi i hrani mogu biti jednom ili dvaput godišnje, dolazi do otpuštanja jajnih stanica i spermija u vodeni stupac gdje dolazi do oplodnje jajne stanice (Linardić, M., 2014.). Oplodene jajne stanice nošene plimama i morskim strujama razvijaju se u trohoforne ličinke, a zatim u veliger. Zadnji stadij je predvelige gdje je dužina ljuštore 0,25 milimetara te se tada pomoću bisusnih niti školjka pričvršćuje za podlogu (*Cultured Aquatic Species Information Programme*, 2015. Pristupljeno 11.06.2020.).



Slika 4 Shema reproduktivnog ciklusa dagnje (preuzeto s: [http://depts.washington.edu/oldenlab/wordpress/wp-content/uploads/2015/09/Mytilus\\_galloprovincialis\\_Green\\_2014.pdf](http://depts.washington.edu/oldenlab/wordpress/wp-content/uploads/2015/09/Mytilus_galloprovincialis_Green_2014.pdf))

### 1.2.2 Bioindikatorska vrsta

Bioindikatorski organizmi su organizmi koji zbog svoje specifične fiziologije mogu pouzdano pokazivati stanje u okolišu (Bioindikator. Hrvatska enciklopedija, 2020. Pristupljeno 11.06.2020.).

*Mytilus galloprovincialis* ili mediteranska dagnja zbog već poznatih fizioloških, histoloških i biokemijskih karakteristika je dobro poznata bioindikatorska vrsta koja služi za istraživanje zagađivala te njihov učinak na organizme i njihov okoliš (Jakšić i Batel, 2003).

Mediterranska dagnja je sesilni, filtratorski organizam. Geografski i ekološki je vrlo rasprostranjena vrsta. Lako ju se može sakupiti te je jednostavna za održavanje u laboratorijskim uvjetima što svakako pridonosi njezinom korištenju kao bioindikatorskoj vrsti (Viarengo i sur., 1997). Dagnja, također, ima sposobnost akumuliranja različitih zagađivala, upravo zbog filtracije velike količine morske vode (Livingstone i sur., 1989, Widdows i Donkin, 1992).

### **1.2.3 Integritet DNA kao indikator genotoksičnog učinka**

Živi organizmi prenose svoju genetičku informaciju s jedne generacije na drugu. Kako bi ta informacija došla do sljedeće generacije potrebna je DNA koja sadrži svu genetsku informaciju te njezinim udvostručavanjem omogućuje reprodukciju. Da u slijedećoj generaciji ne dođe do mutacija koje mogu štetno djelovati na organizam važan je integritet ili cjelovitost DNA (Cooper i sur., 2004.). Genotoksični spojevi utječu na integritet DNA na način da uzrokuju lomove i DNA adukte. DNA je u jezgri stanice prisutna kao stabilna, dvostruka uzvojnica koja je bez lomova. Kao takva se smatra da ima visoki integritet. Oštećenja DNA se javljaju i tijekom normalnih metaboličkih reakcija, ali također ta oštećenja mogu biti uzrokovana fizičkim agensima poput ultraljubičastog svjetla, ionizirajućeg zračenja ili kemijskim agensima. Takvi agensi mogu dovesti do pucanja DNA lanca što dovodi do smanjenja njezinog integriteta. Ionizirajuće zračenje i pojedine kemikalije uzrokuju izravno pucanje, dok ultraljubičasto svjetlo i razni mutageni i kancerogeni spojevi rade različite modifikacije DNA. Kako ne bi došlo do mutacije i gubitka genetske informacije, tako nastala DNA niskog integriteta se popravlja mehanizmima popravka DNA (Shugart i sur., 1990.).

Oštećenja DNA mogu nastati egzogenim ili endogenim djelovanjem. Endogena oštećenja nastaju inflamatornim odgovorom kao produkti oksidativnog stresa, kao posljedica normalne metaboličke aktivnosti. Endogena oštećenja uzrokuju 75% oštećenja DNA. Depurinacija, jedno od preostalih oštećenja (i u manjoj mjeri depirimidacija) proizlazi iz hidrolize glikolizidne veze između purinske baze i deoksiriboze te tako dolazi do stvaranja apurinskog mjesta u DNA. Spontanom putem može doći do deaminacije citozina što dovodi do stvaranja uracila (Geacintov, 2010.).

Među vanjskim uzročnicima oštećenja DNA su UV svjetlost i ionizirajuće zračenje. UV zrake valne duljine od 290 do 300 nm se apsorbiraju od strane DNA te stvaraju ciklobutanske

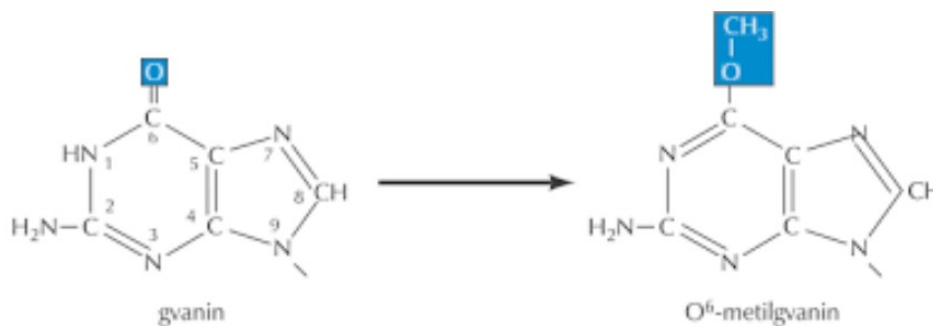


pirimidinske dimere. Ionizirajuće zračenje uzrokuje jednolančane i dvolančane prekide kao i oksidativno modificirane nukleinske baze i deoksiribozne dijelove. Mnoga egzogena oštećenja proizlaze iz ekoloških zagađivala koja se nalaze u okolišu. Oni kemijski reagiraju sa nukleinskim bazama što dovodi do nastajanja puknuća DNA lanca ili do stvaranja DNA aduktora (Geacintov, 2010.).

Da kemijske tvari mogu djelovati kancerogeno poznato je još iz osamnaestog stoljeća kad je uspostavljena prva povezanost između izloženosti čađi i visoke učestalosti karcinoma među dimnjačarima u Londonu. Tijekom dvadesetog stoljeća niz eksperimenata pružili su uvjerljive dokaze da su PAU, kao što je B(a)P, ključni kemijski kancerogeni u čađi i ugljenu. PAU spojevi su kemijski ne reaktivni i u najboljem slučaju slabo topivi u vodenim otapalima. Veliki aromatski spojevi moraju se najprije metabolički aktivirati. U tome im pomaže mikrosomalni P450 enzim koji ih pretvara u kisikove derivate koji imaju veću topljivost u vodenim otapalima te se tako mogu lakše izlučivati. Među njima se nalazi i vrlo reaktivni elektrofil koji mogu kemijski reagirati sa nukleinskim kiselinama uz stvaranje kovalentnih DNA aduktora. Tri različita puta pomoću kojih se metabolički PAH-ovi aktiviraju su : 1. put radikalnih kationa, gdje pomoću P450 peroksidaze i drugih peroksidaza dolazi do depurinacijskog adukta; 2. put epoksid diol gdje se pomoću P450 mono-okigenaze stvaraju DNA adukti; 3. PAH o-kinonski put gdje pomoću aldo-keto reduktaza dolazi do stvaranja velikih stabilnih adukata DNA, koji uključuju depurinacijske DNA adukate i oksidativno modificirane DNA baze (Geacintov, 2010.).

Kao i sve molekule, tako i molekula DNA, je podložna kemijskim promjenama. Zbog uloge koju DNA ima, jedinstvena i trajna kopija staničnog genoma, njezine promjene imat će znatno veće posljedice. Mutacije mogu biti posljedice krivo ugrađene baze tijekom umnožavanja DNA. Kod DNA može doći do spontanijeh kemijskih promjena pod utjecajem kemikalija ili zračenja. Kako bi se takva oštećenja izbjegla, uz to mutacija DNA te kako bi se sačuvao integritet genoma stanice su razvile mehanizam za popravak oštećenja DNA. One se mogu podijeliti u dvije skupine: izravni obrat kemijske reakcije koja je odgovorna za DNA oštećenje i uklanjanje oštećenih baza i zamjena sa nosintetiziranim DNA. Evolucija je razvila dodatne mehanizme za uklanjanje oštećenja u slučaju da ova dva mehanizma ne uspiju popraviti eventualna oštećenja DNA (Cooper i sur., 2004.).

Ova vrsta popravka se koristi kod nekoliko tipova oštećenja a to su pirimidinski dimeri nastali kao rezultat izlaganja UV svjetlu i alkilirani gvaninski ostaci, modificirani dodatkom metilne ili etilne skupine na  $O^6$  poziciju purinskog prstena (Slika 5). Glavni način oštećenja od UV svjetla je formiranje pirimidinskih dimera u kojem je susjedni pirimidin na istom lancu spojen pomoću ciklobutanskog prstena čime dolazi do zasićenja veze između petog i šestog ugljikovog atoma. U slučaju stvaranja takvih dimera dolazi do blokiranja replikacije ili transkripcije od tog mjesta oštećenja nizvodno. Jedan od načina popravka takvih oštećenja je obrat dimerizacijske reakcije. Taj se proces naziva fotoreaktivacija. Takvim se popravkom pomoću energije vidljivog spektra kidaju nastale veze koje tvore ciklobutanski prsten.



Slika 5 Prikaz alkiliranja gvanina (preuzeto iz: Cooper i sur., 2004.)

Drugi oblik direktnog popravka oštećenja odnosi se na oštećenja koja su proizašla iz reakcije između DNA i alkilirajućeg čimbenika. Alkilirajući čimbenik može prenijeti metilnu ili etilnu skupinu na bazu DNA i na taj je način kemijski modificirati. Jedan od važnijih tipa oštećenja je metilacija  $O^6$  pozicije gvanina pri čemu nastaje produkt  $O^6$ -metilgvanin koji stvara komplementarne bazne parove s timinom, a ne citozinom (Cooper i sur., 2004.).

Iako je izravni način popravka određenih tipova oštećenja učinkovitiji, popravak izrezivanjem je učinkovit kod široke skupine kemijske promijene DNA. Kod ove vrste popravka dolazi do prepoznavanja oštećenog dijela DNA te je se ukloni bilo u obliku slobodnih baza ili bilo u obliku nukleotida. Sintezom novog lanca DNA se popunjava nastala pukotina tako da se za kalup koristi neoštećeni komplementarni lanac. Postoje tri načina popravka DNA sa izrezivanjem a to su izrezivanje baze, izrezivanje nukleotida i popravak krivo sparenih baza te tako omogućuju stanici da se bori protiv širokog spektra oštećenja (Cooper i sur., 2004.).

Još jedan način DNA popravka je rekombinacijski popravak koji se zasniva na zamjeni oštećene DNA sa neoštećenom molekulom. Ovaj mehanizam popravka oštećenja pojavljuje se kod replikacije DNA odnosno kada postoji prisutnost timinskih dimera ili drugih lezija koji se ne mogu kopirati tijekom normalne replikacijske DNA-polimeraze te na taj način blokiraju daljnje djelovanje replikacijskih rašlji. Kod rekombinacijskog popravka jedan lanac roditeljske DNA mora ostati neoštećen kako bi se mogla razviti normalna sestrinska molekula koja se potom može koristiti za popravak oštećenog lanca. Ovaj tim popravka je glavni kod dvolančanih lomova koji nastaju djelovanjem ionizirajućeg zračenja i djelovanja nekih kemijskih čimbenika (Cooper i sur., 2004.).

### **1.3 Metode određivanja integriteta DNA**

Za pravilno funkcioniranje, razvoj i preživljavanje vrsta najvažnije je održavanje cjelovitosti DNA (Alberts i sur., 2002, Smoldaka, 2015). Iako kod DNA dolazi do stalnih no malobrojnih mutacija, mora postojati i ravnoteža među oštećenjem DNA i njezinog popravka. U slučaju da se u okolišu pojave genotoksične tvari one će najprije djelovati na cjelovitost DNA morskih organizama. To je razlog zbog kojeg je cjelovitost DNA najbolji pokazatelj stupnja zagađenja morskog okoliša sa genotoksinima (Shugart, 2000, Debenest i sur., 2013, Smoldaka, 2015). Tri metode za određivanje cjelovitosti DNA su: određivanje cjelovitosti DNA pomoću alkalne elucije, određivanje cjelovitosti pomoću Fast mikrometode i određivanje cjelovitosti DNA pomoću protočne citometrije (Smoldaka, 2015.). Sve tri metode se baziraju na mjerenju integriteta DNA kako bi se utvrdio i pratio genotoksični učinak. Fast mikrometoda DNA integritet mjeri pomoću fluorokromatskog bojila, metoda protočne citometrije pomoću interkalirajućih boja, a alkalno eluiranje pomoću brzine prolaska DNA kroz filter.

Alkalno eluiranje se često koristi u biomonitoringu morskih organizama (Bihari i sur., 1992, Batel i sur., 1993). Ova metoda se bazira na sporim propuštanjima alkalne otopine kroz filter. U alkalnoj otopini gdje je pH veći od 12 dolazi do odmotavanja DNA lanca i njezinog eluiranja sa filtra. Brzina kojom će DNA prolaziti kroz filter ovisi o duljini lanca. Što su fragmenti lanca kraći to će oni brže proći kroz filter. DNA u eluatu i na filteru mjeri se te se pomoću toga izračunava udio DNA koji se nalazi na filteru. Brzina prolaska DNA kroz filter izražava se kao postotak DNA koji nakon određenog vremena preostaje na filteru. Sama brzina eluiranja osim

o dužini, ovisi i o vrsti; vrste niže taksonomske razine eluiraju brže od onih viših taksonomskih razina (Zahn, 1989, Smodlaka, 2015).

Fast mikrometoda se koristi za određivanje oštećenja DNA mjerenjem njezinih lomova u alkalnim uvjetima. Zasniva se na sposobnosti fluorokromatskog bojila da se veže za dvolančanu DNA. Zbog toga nije potrebno izolirati ili pročitati uzorak kako bi se mogla izravno pratiti denaturacija dvolančane DNA. Prednost ove metode je brzina i efikasnost te mogućnost korištenja male količine uzorka (Jakšić, Batel, 2003.).

Pomoću metode protočne citometrije analizira se stanični ciklus i sadržaj DNA te je zbog toga moguća obrada velikog broja stanica u kratkom vremenskom periodu. Protočna citometrija temelji se na raspršivanju svjetlosti i fluorescenciji obojene stanice. Detektorom prelazi se preko uzorka, u tom trenutku on pretvara svjetlosni signal u elektronski signal koji odgovara specifičnom parametru određene stanice. Svi se rezultati prikazuju na računaru u grafičkom obliku. Sadržaj DNA može se pratiti pomoću interkalirajućih boja kao što su propidium jodid, etidijum bromid i akridin aranz te pomoću boja koje se vežu na površinu DNA (Fafandel i sur., 2008, Smodlaka, 2015.).

Uz ove tri navedene metode postoji još i metoda Komet test koji ne samo da ima mogućnost mjerenja oštećenja DNA nego i učinkovitost njenog popravka. Mjerenjem integriteta DNA ovom metodom možemo odrediti genotoksični učinak na DNA organizma (Collins, 2004, Speit i Haartmann, 2016).

Komet test ili Singel Cell Gel Electrophoresis (SCGE) je brza i osjetljiva metoda za mjerenje oštećenja DNA pojedinačne stanice (Ostling i Johanson, 1984, Singh i sur., 1988). Slika dobivena u rezultatima podsjeća na komet po kojem je metoda i dobila ime komet test. Glava je sačinjena od ukupne DNA koja se nalazi u stanici dok se rep sačinjava od malih fragmenta DNA koji su nastali oštećenjem njezinim oštećenjem (Ventura i sur., 2013). Ovom metodom se mogu vidjeti oštećenja kao što su unakrsno vezivanje s molekulama DNA ili proteinima, oštećenja nastala oksidativnim stresom, jednolančani i dvolančani lomovi te alkalirajuće modifikacije baza. Osim što se ova metoda može koristiti u laboratorijskim pokusima također se uspješno može koristiti i u sustavnom praćenju morskog ekosustava koji je izložen raznim zagađivačima (Michel i sur., 2013).

## 2. Ciljevi istraživanja

Ciljevi ovog istraživanja bili su:

- a) Utvrđivanje uvjeta mjerenja integriteta DNA u škragama dagnje *Mytilus galloprovincialis* pomoću Fast Mikrometode.
- b) Određivanje utjecaja benzo(a)pirena na integritet DNA u škragama dagnje

### **3. Materijali i metode**

#### **3.1 Materijali**

##### **3.1.1 Kemikalije**

Za eksperiment korištene su slijedeće kemikalije i otopine: PicoGreen®(P-7581, Molecular Probes Inc., OR, USA), tekući dušik, lizirajuća otopina (4.5 M urea, 0.1% SDS, 0.2% M EDTA, pH 10), NaOH - EDTA otopina, Tris – HCl (tris(hidroksmetil)aminometan hidroklorid), EDTA (etilendiaminotetraoctena kiselina), B(a)P (benzo(a)piren), DMSO (dimetilsulfoksid), Tris, SDS (natrijdodecil sulfat). Sve kemikalije koje su korištene tijekom rada odgovaraju zahtjevima analitičke čistoće.

##### **3.1.2 Dagnja *Mytilus galloprovincialis***

U ovom radu korištena je dagnja vrste *Mytilus galloprovincialis* iz uzgajališta smještenog u Limskom zaljevu, Istra u srpnju 2013. godine. Limski zaljev je pod strogim bakterijskim i kemijskim kontrolama te se također vrše kontrole nad biotoksinima i fitoplanktonu. Jedinke su tada iz Limskoga zaljeva prenesene u bazene Centra za istraživanje mora instituta Ruđer Bošković sa stalnom cirkulacijom morske vode te su puštene da se aklimatiziraju 48 sati.

#### **3.2 Metode**

##### **3.2.1 Izlaganje dagnje *Mytilus galloprovincialis* benzo(a)pirenu**

Nakon aklimatizacije jedinke približne veličine (6 - 8 cm) prebačene su u bazene sa morskom vodom. Deset jedinki stavljeno je u kontrolni bazen bez zagađivala, 10 u bazen sa DMSO- dimetil sulfoksid (nosilac zagađivala) i po 10 u šest bazena sa različitim koncentracijama zagađivala benzo(a)pirena (0.01, 0.05, 0.1, 1, 10 i 20 µg/l). Dagnje su puštene u bazenima u periodu od 4 dana te se svaki dan morska voda sa različitim koncentracijama benzo(a)pirena izmjenjivala (u isto vrijeme kad je eksperiment postavljen). Nakon 4 dana (96 sati) iz dagnji je izolirano tkivo škrge i stavljeno u tekući dušik i pohranjeno u zamrzivač na -80 °C.

##### **3.2.2 Fast Mikrometoda**

Integritet DNA određivan je Fast mikrometodom (Batel i sur., 1999). Fast Mikrometoda bazira se na vezanju PicoGreen boje na ds-DNA u alkalnim uvjetima. Alkalni uvjeti ključni su za

pojavu procesa denaturacije DNA. Uz to, u takvim uvjetima afinitet PicoGreen boje za RNA, ss-DNA i proteine znatno opada. Korištenjem ove metode dobivamo najbolje uvijete za praćenje ds- DNA. Smanjenje količine ds-DNA u uzorku uzrokuje smanjenje njegove fluorescencije.

### **3.2.2.1 Priprema uzorka**

Homogenizaciju škrga dagnje napravili smo u tekućem dušiku. U tarionik smo stavili 100 mg tkiva, 2 ml 10%-tnog DMSO-a u TE puferu i oko 1dl tekućeg dušika. Tijekom isparavanja tekućeg dušika smjesu smo zdrobili pomoću tučka tarionika sve dok cijeli tekući dušik nije ispario i nije ostao samo bijeli prah. Taj prah smo zatim skupili u epruvetu i pustili da se otopi. Nakon što su se uzorci otopili filtrirali smo ih i uzorak smo stavili u Eppendorf tube kojima smo potom probušili rupicu na čepu. Uzorak smo vorteksirali te smo ga ponovo stavili u tekući dušik.

### **3.2.2.2 Mjerenje fluorescencije**

U mikroploče ispipetirali smo 25  $\mu$ l uzorka homogenata i 25  $\mu$ l lizirajuće otopine u kojoj se nalazi otopljeni PicoGreen. Zatim, mikroploče smo ostavili 30 minuta na sobnoj temperaturi u mraku. Nakon što smo napravili liziranje stanica u jažice mikroploče, stavili smo 250  $\mu$ l otopine NaOH - EDTA. pH uzorak se zbog nadodanog NaOH povisio na 11.6 što je omogućilo denaturaciju DNA i vezanje PicoGreen boje za ds-DNA. Mikroploču smo zatim stavili u spektrofotometar. Mjerala se fluorescencija uz ekscitaciju na 480 i emisiju na 520 nm, 10 minuta sa konstantnim razmacima očitavanja od 1 minute.

### **3.2.2.3 Određivanje integriteta DNA**

Kako bi se iz dobivenih krivulja fluorescencije dobili podaci numeričkih vrijednosti koji se potom mogu koristiti za daljnje interpretacije podataka potrebno je izračunati SSF (Strand Scision Factor) vrijednost. SSF vrijednost omogućuje usporedbu cjelovitosti DNA uzorka s referentnim uzorkom. Porastom broja alkalno-labilnih mjesta povećava se i brzina denaturacije DNA. SSF vrijednost ili koeficijent jednolančanih lomova se računa na osnovi vrijednosti fluorescencija odnosno na razlici između relativne količine dvolančane DNA uzorka i

referentnog uzorka nakon korelacije za slijepu probu u nultom vremenu denaturacije. SSF se računaju pomoću formula:

$$SSF = \log 10 \frac{\% ds - DNA(uzorak)}{\% ds - DNA(ref.)}$$

Ili:

$$SSF = \log 10 \frac{RFU (uzorka)}{RFU (ref.)}$$

Ako nakon određenog intervala mjerenja denaturacije vrijednosti SSF-a su jednake 0 nema genotoksičnih učinka odnosno ne postoji razlika između broja lomova ili alkalno-labilnih mjesta uzorka i referentnog uzorka. SSF vrijednosti < 0 pokazuju povećanje oštećenja DNA u odnosu na referentni uzorak.



## 4. Rezultati

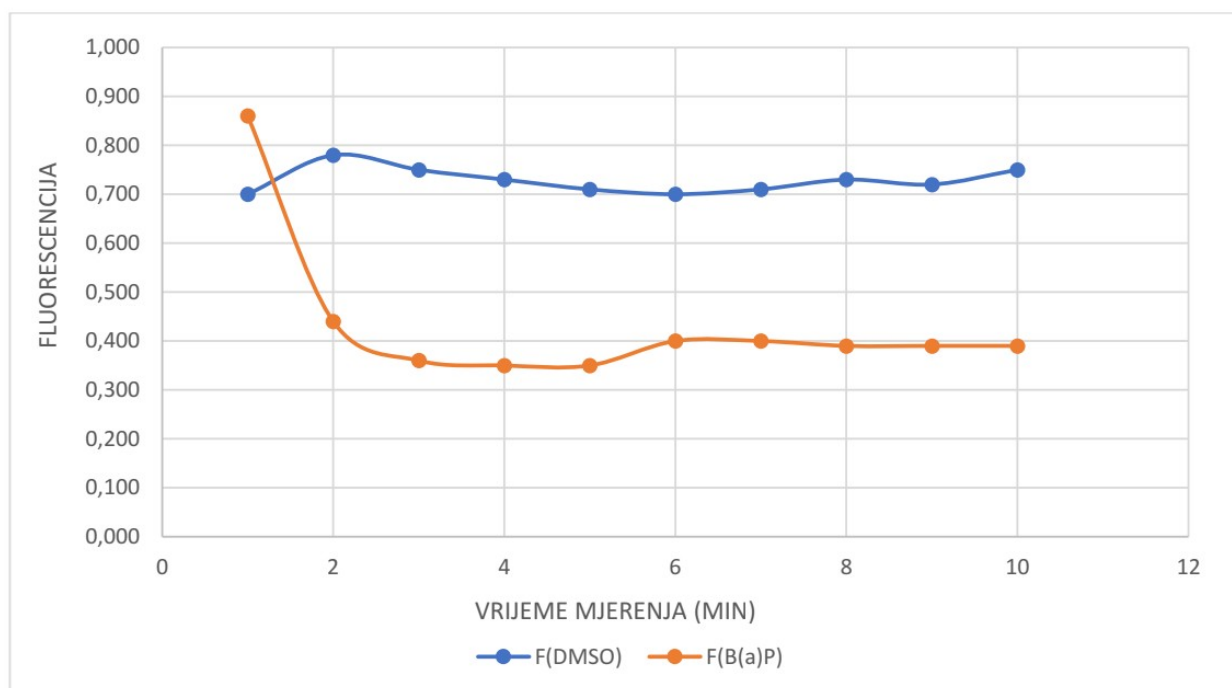
### 4.1 Uvjeti mjerenja integriteta DNA u škrgama dagnje *Mytilus galloprovincialis*

Mjerenjem fluorescencije u uzorku izlaganom BaP odredili smo kinetiku gubitka dvolančanosti u alkalnim uvjetima (pH 11.6) tijekom 10 minuta kako bi odredili optimalno vrijeme za određivanje učinka B(a)P.

Tablica 1 Prikaz fluorescencije uzorka DMSO i 10 µg/L B(a)P-a tijekom vremenskog intervala od 10 minuta

t(min)	F(DMSO)	F(B(a)p)
1	0.700	0.860
2	0.780	0.440
3	0.750	0.360
4	0.730	0.350
5	0.710	0.350
6	0.700	0.400
7	0.710	0.400
8	0.730	0.390
9	0.720	0.390
10	0.750	0.390

U kontrolnom uzorku fluorescencija ostaje ista tijekom cijelog intervala dok je u uzorku izlaganom zagađivalu već nakon 2 minute došlo do smanjivanja udjela ds-DNA kao posljedica smanjenog integriteta uslijed lomova. Stoga se u daljnjim analizama mjerila fluorescencija nakon 5 minuta po dodavanju alkalnog pufera. Usporedba kontrole i uzorka škrga izloženih zagađivalu nam je omogućila utvrđivanje vremena u kojem je najveća rezolucija učinka na integritet DNA u škrgama danje (Slika 6).

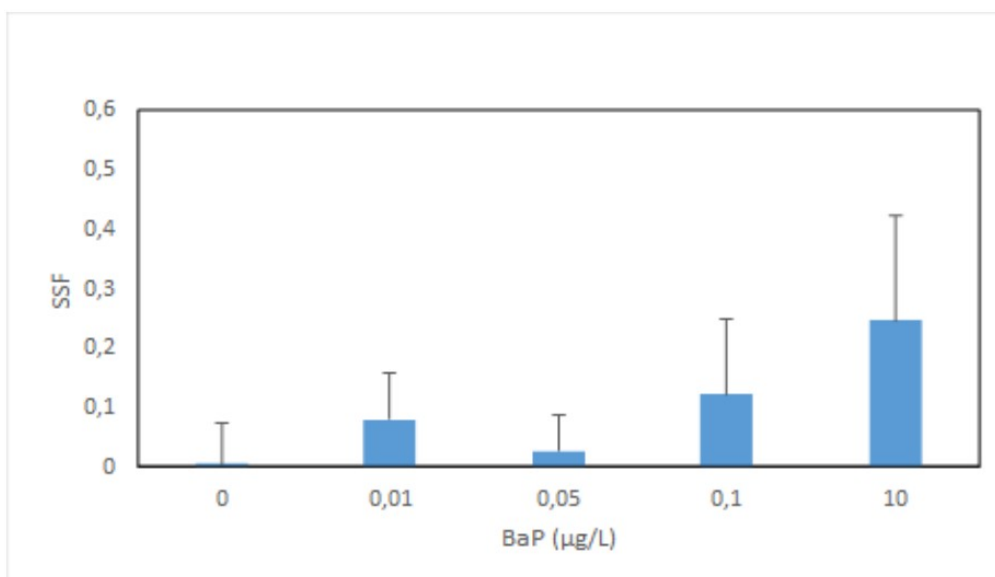


Slika 6 Prikaz odnosa fluorescencije kontrolnog i uzorka izloženog B(a)P tijekom vremenskog intervala od 10 minuta.

Tablica 2 Koeficijent jednostrukih lomova (SSF) izračunat za prikazanu srednju vrijednosti (AVG) uzorka i standardne devijacije (STDEV) te broj replikata mjerenja (N)

SSF	AVG	STDEV	N
DMSO	0.005	0.070	10
0.01	0.080	0.078	8
0.05	0.027	0.060	10
0.1	0.123	0.246	9
10	0.125	0.177	9

Iz vrijednost prikazanih u Tablici 2 dobivene su vrijednosti SSF. Dagnje koje su bile izložene različitim koncentracijama B(a)P pokazuju različite odgovore na njegovu prisutnost ovisno o njegovoj koncentraciji. Povećavanjem koncentracije B(a)P-a u uzorcima primjećuje se i porasti vrijednosti SSF-a. To nam pokazuje da povećavanjem koncentracije dolazi do povećavanja broja lomova i alkalno-labilnih mjesta na DNA te da njezin integritet opada u odnosu na referentni uzorak (Slika 7).



Slika 7 Prikaz izračunatog SSF-a kod svake koncentracije B(a)P-a.

Pomoću ANOVA testa određene su statistički značajne razlike za koncentracije 0.01, 0.05, 0.1 i 10 µg/L B(a)P-a (Tablica 3).

Tablica 3 Rezultati ANOVA testa. Statistička značajnost razlike SSF vrijednosti na razini  $p < 0.05$  utvrđena Fischer post-hoc testom)

	0	0.01	0.05	0.1	10
0.01		0.155473	0.657977	<b>0.024302</b>	<b>0.000023</b>
0.05			0.310606	0.428979	<b>0.003513</b>
0.1				0.063849	<b>0.000092</b>
10					<b>0.022591</b>

Kod koncentracija 0.01 i 0.05 µg/L primjećujemo da nema značajnih statističkih razlika. Kod koncentracije 0.1 µg/L postoji značajna statistička razlika u odnosu na koncentraciju 0.01 µg/L, dok kod koncentracije 10 µg/L se vidi statistički značajna razlika u odnosu na 0.01, 0.05, 0.1, i 10 µg/L.

## 5. Rasprava

B(a)P je kemijski spoj koji sa svojim kancerogenim i mutagenim karakteristikama može utjecati negativno na organizme.

U ovom radu smo jedinke dagnje izložili B(a)P-u da utvrdimo dolazi li do oštećenja odnosno smanjenja integriteta DNA u škrgama. Dagnja se u Jadranskom moru već duži niz godina koristi kao modelni i bioindikatorski organizam, dok se tkiva škrga dagnje najčešće koriste zbog konstantne izloženosti i prvog doticaja sa zagađivalima.

Postoje razne metode za određivanje integriteta DNA, ali sve metode iziskuju puno vremena ili prikazuju samo neka vrsta oštećenja DNA. Upravo se zbog tog razloga razvila Fast mikrometoda. Fast mikrometoda bazira se na sposobnosti flourokromatskog bojila (PicoGreen) da se u odgovarajućim uvjetima (pH između 11 i 12) veže za ds-DNA te tako omogućuje prikaz integriteta DNA kroz jačinu fluorescencije uzoraka. Kod ove metode, praćenje fluorescencije uzoraka ili kinetike denaturacije ds-DNA kroz optimalni vremenski period, omogućilo je da se bez prethodne izolacije ili pročišćavanja uzorka smanji njegovo oštećenje pri obradi te je tako povećana osjetljivost same metode.

Za svaki uzorak potrebno je utvrditi uvjete u kojima će razlučivanje biti najbolje. Preliminarnim praćenjem dinamike denaturacije DNA u alkalnim uvjetima (pH 11.6) tj. mjerenjem fluorescencije fluorokroma Picogreen utvrđeno je da je nakon 5 minuta najbolje razlučivanje. Shodno tome sve SSF vrijednosti su računana nakon 5 minuta reakcije denaturacije.

U ovom radu korištene su koncentracije BaP u rasponu od 0.01 do 10 µg/L što obuhvaća vrijednosti prisutne u morskoj vodi ( Riječki zaljev , < 30 ng/L) i veće. Utvrđeni dozni odgovor u cijelom rasponu koncentracija ukazuje na genotoksični učinak BaP-a u škrgama nakon izlaganja BaP-u u morskoj vodi. Naime, prethodna istraživanja koja su utvrdila genotoksični učinak BaP-a u dagnji *M. galloprovincialis* određivala su oštećenje DNA uslijed direktnog injektiranja BaP-a (Bihari i sur., 1990, Jakšić, 2002). Obzirom na nepolarnost BaP-a prisutnost u morskoj vodi ne podrazumijeva i dostupnost za dagnju. No, u ovom radu je FAST mikrometodom utvrđeno da doze veće od 50ng/L BAP-a uzrokuju statistički značajno smanjenje integriteta DNA u škrgama dagnje. U svojim istraživanjima genotoksičnog učinka u škrgama dagnje, Banni i sur. (2017) nisu utvrdili korištenjem Comet analize statistički značajni učinak za doze manje od 100 µg/L. Obzirom da je u ovom radu utvrđen učinak B(a)P

i za niže koncentracije u morskoj vodi, FAST mikrometode je pored brzine pokazala izuzetnu osjetljivost detekcije smanjenja integriteta DNA i genotoksični učinak u morskim organizmima. Fast mikrometode se pokazala kao jedinstvena, brza i osjetljiva metoda kojom se mogu dokazati oštećenja DNA u škrigama dagnje *Mytilus galloprovincialis*.

## 6. Zaključak

Na osnovu dobivenih rezultata možemo zaključiti sljedeće:

B(a)P utječe na integritet DNA u škrgama dagnje. Povećavanje koncentracije B(a)P-a uzrokuje smanjenje integriteta DNA.

Koncentracije B(a)P-a u vodi veće od 0.1 µg/L rezultiraju statistički značajnim smanjenjem integriteta DNA u škrgama

FAST mikrometode je pored brzine pokazala izuzetnu osjetljivost detekcije smanjenja integriteta DNA i genotoksični učinak u morskim organizmima.

## 7. Literatura

1. Akcha, F., Burgeot, T., Budzinski, H., Pfohl-Leszkowicz, A., Narbonne, J. F., (2000). Induction and elimination of bulky benzo(a)pyrene – related DNA adducts and 8-oxodGuo in mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed in vivo to B(a)P – contaminated feed. Marine ecology progress series. 205: 195-206.
2. Akcha, F., Zuel, C., Venier, P., Budzinski, H., Burgeot, T., Narbonne, J-F., (2000). Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in benzo(a)pyrene- contaminated mussels, *Mytilus galloprovincialis*. Aquatic Toxicology. 49: 269-287.
3. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002) Molecular biology of the cell. Garland Science, New York.
4. Banni, M., Sforzini, S. i sur. (2017.). Assessing the impact of Benzo[a]pyrene on Marine Mussels: Application of a novel targeted low density microarray complementing classical biomarker responses. Plos One, 12(6): e0178460
5. Batel, R., Vukmirović, M., Bihari, N., Zahn, R.K., Müller, W.E.G. (1993) Nonradiometric detection of DNA crosslinks in mussel hemolymph by alkaline elution. Analytical Biochemistry. 212:402-406.
6. Bihari, N., Batel, R., Zahn, R.K. (1992) Fractionation of DNA from marine invertebrate (*Maja crispata*, *Mytilus galloprovincialis*) haemolymph by alkaline elution. Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology. 102:419-424.
7. Bihari, Nevenka, Fafandel, Maja, Piškur, Vanda, (2006.). Polycyclic aromatic hydrocarbons and ecotoxicological characterization of seawater, sediment and mussel *Mytilus galloprovincialis* from the gulf of Rijeka, the Adriatic sea, Croatia. Archives of environmental contamination and toxicology. 52(3):379-87.
8. Carey, F. A., Giuliano, R. M., (2016.). Organic chemistry, tenth edition. New York McGraw-Hill Education.
9. Collins, A. (2004) The comet assay for DNA damage and repair. Molecular Biotechnology. 26:249-261.
10. Cooper, G. M., Hausman, R. E., Lauc, G. (ur.). (2004). Stanica: molekularni pristup (treće izdanje). Zagreb, Medicinska naklada.

11. Debenest, T., Gagne, F., Burgeot, T., Blaise, C., Pellerin, J. (2013) DNA integrity assessment in hemocytes of soft-shell clams (*Mya arenaria*) in the Saguenay Fjord (Quebec, Canada). *Environmental Science and Pollution Research International*. 20:621- 629.
12. Douben, Peter E. T. (ur.), (2003.). PAHs: An Ecotoxicological Perspective (Ecological & Environmental Toxicology Series). Bedford, Wiley.
13. Fafandjel, M., Bihari, N., Smodlaka, M., Ravlić, S. (2008) Hemocytes/coelomocytes DNA content in five marine invertebrates: Cell cycles and genome sizes. *Biologia (Lahore, Pakistan)*. 63:730-736
14. Geacintov, N. E., Broyde, S. (ur.) (2010). *The Chemical Biology of DNA Damage*. Weinheim, Wiley-VCH.
15. Jakovljević, I., Žužul, S., (2011.). Policiklički aromatski ugljikovodici u zraku. Institut za medicinska istraživanja i medicinski rad, Zagreb. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 62:357-370.
16. Jakšić, Željko, (2002.). Razvoj i primjena brze mikrometode određivanja i praćenja oštećenja DNA u škrigama dagnje *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). Disertacijski rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno – biotehnološki fakultet.
17. Jakšić, Željko, Batel, Renato, (2003). DNA integrity determination in marine invertebrates by Fast Micromethod. *Aquatic Toxicology*, 65: 361-376.
18. Linardić, M., (2014.). Procjena prilagodbe dagnje (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819.) na genotoksični stres. Diplomski rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu.
19. Livingstone, D., Kirchin, M., Wiseman, A. (1989) Cytochrome P-450 and oxidative metabolism in molluscs. *Xenobiotica*. 19:1041-1062.
20. Medić, N., (2015.). Učinak pesticida kloropirifosa na dagnju *Mytilus galloprovincialis* (Lam.): aktivnost kisele DNaze i toksičnost tkiva. Diplomski rad. Pula: Sveučilište Jurja Dobrile u Puli.
21. 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. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 92:18-26
22. Ostling, O., Johanson, K.J. (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 123:291-298.



23. Rust, A. J., Burgess, R. M., Brownawell, B. J., Anne, E. M., (2004). Relationship between metabolism and bioaccumulation of benzo(a)pyrene in benthic invertebrates. *Environmental toxicology and chemistry*, 23(11), 2587–2593.
24. Shugart, L. R., McCarthy, J. F., (1990) *Biomarkers of environmental contamination*. Lewis Publishers, CRC Press.
25. Shugart, L.R. (2000) DNA damage as a biomarker of exposure. *Ecotoxicology*. 9:329-340.
26. Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*. 175:184-191.
27. Smodlaka, M., (2015). Učinkovitost popravka DNA u prirodnim populacijama dagnje *Mytilus galloprovincialis*. Disertacijski rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu.
28. Speit, G., Hartmann, A. (2006) The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods in Molecular Biology*. 314:275-286.
29. Tolušić, Tomislav, (2019.). Plan praćenja kakvoće mora i školjkaša na proizvodnim područjima i područjima za ponovno polaganje živih školjkaša. Zagreb, Republika Hrvatska, ministarstvo poljoprivrede.
30. 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.
31. 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. *Marine Environmental Research*. 44:69-84.
32. Wade Jr., L. G., (2012.). *ORGANIC CHEMISTRY: Organic chemistry (eighth edition)*. Pearson.
33. Widdows, J., Donkin, P. (1992) Mussels and environmental contaminants: bioaccumulation and physiological aspects. U: Gosling, E., ed *The Mussel Mytilus: ecology, physiology, genetics, and culture*. Elsevier Press, Amsterdam, p. 383-424.
34. Zahn, R. (1989) DNA alterations by pollution and the problem of risk quantification. World Health Organization Regional Office for Europe and United Nations Environment Programme, *Carcinogenic, Mutagenic, and Teratogenic Marine Pollutants: Impact on Human Health and the Environment*, *Advances in Applied Biotechnology Series*. vol. 5. Portfolio The Woodlands, TX, p. 177-187.

Internetski izvori:

1. Bioindikatori (online). Hrvatska enciklopedija, Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2020. Dostupno na: <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=7745>, (11. 06. 2020.).
2. *Cultured Aquatic Species Information Programme: Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819)(online), 2015. FAO Fisheries Division, Rome. Dostupno na: [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Mytilus\\_galloprovincialis/en#tcNA00D9](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Mytilus_galloprovincialis/en#tcNA00D9), (11.06.2020.).
3. WoRMS taxon details: *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 2020. World Register of Marine Species, Dostupno na: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=140481>, (11.06.2020.).
4. Species profile: *Mytilus galloprovincialis* (online). 2020. Global Invasive Species Database. Dostupno na: <http://www.iucngisd.org/gisd/species.php?sc=102>, (11.06.2020.).

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

SVEUČILIŠTE JURJA DOBRILE U PULI

SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ ZNANOST O  
MORU

Utjecaj benzo(a)pirena na integritet DNA u škrgama dagnje *Mytilus galloprovincialis*

## SAŽETAK

U ovom radu je istražen učinak benzo(a)pirena (B(a)P) na integritet DNA u škrgama dagnje *Mytilus galloprovincialis* pomoću Fast mikrometode. Fast mikrometoda detektira smanjenje integriteta DNA uslijed oštećenja pomoću flourokromatskog bojila PicoGreen koji ima sposobnost vezanja za dvostruku DNA u alkalnim uvjetima. Jedinke dagnje su izlagane različitim koncentracijama B(a)P-a u vodi nakon čega je utvrđen dozni odgovor ukazujući na genotoksični učinak B(a)P-a u škrgama dagnje. Koncentracije B(a)P-a u vodi veće od 0.1 µg/L rezultiraju statistički značajnim smanjenjem integriteta DNA u škrgama.

Rad je pohranjen u knjižnicama Sveučilišta Jurja Dobrile i Instituta Ruđer Bošković u Rovinju. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Fast mikrometoda, *Mytilus galloprovincialis*, integritet DNA, PicoGreen.

# **BASIC DOCUMENTATION CARD**

**JURAJ DOBRILA UNIVERSITY OF PULA**

**UNIVERSITY UNDERGRADUATE STUDY PROGRAMME  
– MARINE SCIENCES**

**Effects of benzo(a)pyrene on DNA integrity in gills of mussel *Mytilus galloprovincialis***

## **Abstract**

In this work, the effect of benzo (a) pyrene on DNA integrity in the gills of the mussel *Mytilus galloprovincialis* was investigated using the Fast micromethod. The fast micromethod is used to detect DNA integrity decrease following DNA damage using the PicoGreen fluorochromatic dye, which has the ability to bind to double DNA under alkaline conditions. Mussel specimens were exposed to multiple B(a)P concentration in seawater. After DNA integrity measurement dose-response was established indicating B(a)P genotoxic effects in mussel gills. B(a)P concentrations in seawater higher than 0.1 µg/L result with statistically significant decrease in mussel gills DNA integrity.

This thesis is deposited in the Library of Juraj Dobrila University of Pula and Ruđer Bošković Institute in Rovinj. Original in Croatian.

Key words: Fast micromethod, *Mytilus galloprovincialis*, DNA integrity, PicoGreen