

PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET
SVEUČILIŠTA U ZAGREBU

Željko Jakšić

**Razvoj i primjena brze mikrometode određivanja i
praćenja oštećenja DNA u škrgama dagnje
Mytilus galloprovincialis (Lamarck, 1819)**

DISERTACIJA

Rovinj, srpanj 2002.

PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET
SVEUČILIŠTA U ZAGREBU

Željko Jakšić

**Razvoj i primjena brze mikrometode određivanja i
praćenja oštećenja DNA u škrigama dagnje
Mytilus galloprovincialis (Lamarck, 1819)**

DISERTACIJA

Rovinj, srpanj 2002.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zagreb
UDK:
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Disertacija

RAZVOJ I PRIMJENA BRZE MIKROMETODE ODREĐIVANJA I PRAĆENJA OŠTEĆENJA *DNA* U ŠKRGAMA DAGNJE *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819)

Mr. sc. Željko Jakšić, dipl. ing.

Institut "Ruđer Bošković", Zagreb, Zavod za istraživanje mora,
Laboratorij za morsku molekularnu toksikologiju, HR-52210 Rovinj, G. Paliage 5

Voditelji rada : Dr. sc. Renato Batel, znanstveni savjetnik, IRB
Dr. sc. Jasna Franekić Čolić, redovita profesorica, PBF

Broj stranica: 137

Broj slika: 30

Broj tablica: 2

Broj literaturnih referenci: 297

Ključne riječi: biomonitoring / brza mikrometoda (Fast Micromethod[®]) / cjelovitost DNA /
dagnja / oštećenja DNA

Datum obrane: 18. srpanj 2002.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Dr. sc. Jasna Franekić Čolić, redovita profesorica, PBF
2. Dr. sc. Renato Batel, znanstveni savjetnik, IRB
3. Dr. sc. Dražena Papeš, redovita profesorica, PMF
4. Dr. sc. Vladimir Mrša, redovni profesor, PBF (zamjena)

Rad je pohranjen u knjižnici Instituta "Ruđer Bošković" u Zagrebu, Bijenička cesta 54; knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog Fakulteta u Zagrebu, Kačićeva 23; Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb; knjižnici Sveučilišta u Rijeci, Riječke rezolucije 7; knjižnici Sveučilišta u Splitu, Livanjska 5 i knjižnici Sveučilišta u Osijeku, Trg Sv. Trojstva 3.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Zagreb
UDC:
Scientific area: Biotechnical science
Scientific field: Biotechnology

PhD Thesis

**DEVELOPMENT AND APPLICATION OF FAST MICROMETHOD
DETECTION AND MEASUREMENT OF *DNA* DAMAGE IN MUSSEL
Mytilus galloprovincialis (Lamarck, 1819) GILLS**

M. Sc. Željko Jakšić, B. Sc.

Ruđer Bošković Institute, Zagreb, Center for Marine Research,
Laboratory for Marine Molecular Toxicology, HR-52210 Rovinj, G. Paliage 5, CROATIA

Supervisors: Renato Batel, PhD, scientific advisor, RBI Rovinj
Jasna Franekić Čolić, PhD, university professor, FFTB Zagreb

Pages: 137
Figures: 30
Tables: 2
References: 297

Keywords: biomonitoring / blue mussel / DNA damage / DNA integrity / Fast Micromethod®

Date: July 18, 2002

Scientific Committee:

1. Renato Batel, PhD, scientific advisor, RBI Rovinj
2. Jasna Franekić Čolić, PhD, university professor, FFTB Zagreb
3. Dražena Papeš, PhD, university professor, FSM Zagreb
4. Vladimir Mrša, PhD, university professor, FFTB Zagreb (substitute)

This Dissertation is stored in the library of the Ruđer Bošković Institute - Zagreb, Bijenička cesta 54; library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology - Zagreb, Kačićeva 23; National and University Library - Zagreb, Hrvatske bratske zajednice bb; library of the University of Rijeka, Riječke rezolucije 7; library of the University of Split, Livanjska 5; and library of the University of Osijek, Trg Sv. Trojstva 3.

Tema rada prihvaćena je na sjednici fakultetskog vijeća Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu održanoj dana 27. 03. 2001. godine.

Zbog potrebe praćenja promjena u okolišu uzrokovanih kontinuiranim odlaganjem genotoksičnih zagađivala u morski ekološki sustav ukazuje se potreba za razvojem jednostavnih i brzih metoda određivanja njihove akumulacije i učinaka. Stoga je razvijena brza mikrometoda (Fast Micromethod[®]) određivanja oštećenja DNA u suspenziji stanica i homogenatima tkiva sisavaca te morskih beskralješnjaka (dagnja, *Mytilus galloprovincialis*). Metoda se zasniva na sposobnosti fluorokromatskog bojila PicoGreen[®]-a da se i u prisustvu jednolančane DNA, RNA i proteina u alkalnim uvjetima postojano veže za dvolančanu DNA, što omogućava izravno praćenje denaturacije dvolančane DNA bez prethodne izolacije i pročišćavanja uzorka. Opisanom analitičkom tehnikom može se na brz i jednostavan način u maloj količini uzorka (3000 stanica; 2.5 ng DNA) i uporabu mikroploča odrediti cjelovitost DNA odnosno, može se pratiti denaturacija dvolančane DNA u alkalnim uvjetima tijekom vremena. Brza mikrometoda (Fast Micromethod[®]) primjenjuje se u medicinskim ispitivanjima, u biomonitoringu genotoksičnih zagađivala i u procjeni njihovog učinka na sesilne bioindikatorske organizme u moru kao i predviđanju smjera promjena i nastanka štetnih posljedica u ekološkom sustavu.

Ključne riječi: biomonitoring / brza mikrometoda (Fast Micromethod[®]) /
cjelovitost DNA / dagnja / oštećenja DNA

Due to the changes in the marine environment and continuing disposal of genotoxic xenobiotics the main goal of environmental pollution monitoring is the development of fast and simple methods for the genotoxic risk assessment. Thus, a rapid and convenient procedure for DNA damage determination in cell suspensions and solid tissues of mammals and marine invertebrates (blue mussel, *Mytilus galloprovincialis*) on single microplates was developed. The procedure is based on the ability of the commercially available fluorochrome PicoGreen[®] to interact with double-stranded DNA in the presence of single-stranded DNA, RNA and proteins at high pH, with a high lifetime of the complex and small rate of deactivation, thus allowing direct measurements of double-stranded DNA denaturation without sample handling or stepwise DNA separations. The described analytical technique allows simple and fast analysis of DNA integrity in a small sample (3000 cells; 2.5 ng DNA) on microplates. The Fast Micromethod[®] is used to measure the occupational exposure of different types of DNA damaging agents and in medical research of human DNA integrity, biomonitoring assessment of genotoxic xenobiotics and their effects on sessile marine invertebrates, and estimation of changes directions of harmful effects in the ecosystem.

Keywords: biomonitoring / blue mussel / DNA damage / DNA integrity /
Fast Micromethod[®]

Zahvaljujem voditelju dr. sc. Renatu Batelu, znanstvenom savjetniku IRB-a, na stručnoj pomoći i savjetima tijekom izrade sve do konačnog oblikovanja rada.

Zahvaljujem voditeljici dr. sc. Jasni Franekić Čolić, redovitoj profesorici PBF-a na komentarima, savjetima i sugestijama tijekom pisanja rada.

Posebno se zahvaljujem dr. sc. Nevenki Bihari i dr. sc. Mileni Mičić na korisnim savjetima, diskusiji te kritičkom osvrtu na moj rad kao i na podršci tijekom izrade rada.

Željku Stipiću se zahvaljujem na podacima potrebnim za prikaz geografske karte Jadrana.

Također se zahvaljujem kolegama dr. sc. Siniši Petroviću, mr. sc. Bojanu Hameru, mr. sc. Maji Fafandel na pomoći tijekom sakupljanja uzoraka, rada u laboratoriju, statističke obrade rezultata te konačne izrade rada.

Srdačno se zahvaljujem i svim ostalim kolegama iz Zavoda za istraživanje mora Rovinj i kolegama s Instituta za fiziološku kemiju Sveučilišta u Mainzu, koji su na bilo koji način doprinijeli izradi ovog rada.

Željko Jakšić

Disertacija je predana na ocjenu Fakultetskom vijeću Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja znanstvenog stupnja doktora biotehničkih znanosti polja biotehnologija.

Disertacija je izrađena u Laboratoriju za morsku molekularnu toksikologiju, Zavoda za istraživanje mora, Instituta “Ruđer Bošković” i na Institutu za fiziološku kemiju Sveučilišta “Johannes Gutenberg” u Mainzu, Njemačka, pod voditeljstvom znanstvenog savjetnika dr. sc. Renata Batela.

Rad je opremljen sredstvima Laboratorija za morsku molekularnu toksikologiju, Zavoda za istraživanje mora, Instituta “Ruđer Bošković” i Ministarstva znanosti i tehnologije Republike Hrvatske (projekt 1-08-222, tema programa 00981306).

KAZALO

I UVODNI DIO

Temeljna dokumentacijska kartica	i
Basic documentation card	ii
Tema rada	iii
Sažetak	iv
Summary	v
Zahvala	vi
Kazalo	viii
Popis simbola i kratica	xi

II OSNOVNI DIO

1. UVOD	1
1.1. Predmet, metodologija i cilj istraživanja	1
1.1.1. Predmet istraživanja	1
1.1.2. Metodologija istraživanja	1
1.1.3. Cilj istraživanja	2
2. OPĆI DIO	3
2.1. Upotreba biomarkera kao pokazatelja onečišćenja	4
2.2. Mehanizmi, vrste i određivanje oštećenja DNA	10
2.2.1. Agensi koji induciraju nastanak oštećenja DNA	17
2.2.1.1. Fizikalni agensi	17
2.2.1.1.1. Ionizirajuće (γ -) zračenje	18
2.2.1.1.2. Ultraljubičasto (UV-) zračenje	20
2.2.1.2. Kemijski agensi	21
2.2.1.2.1. Benz[a]piren (B[a]P)	22
2.2.1.2.2. 4-Nitrokinolin-N-oksidi (NQO)	23
2.2.1.2.3. Bleomicin-Fe(II) kompleks	23
2.2.2. Primarna oštećenja koja značajno utječu na cjelovitost DNA	24
2.2.2.1. Alkalno-labilna mjesta	24
2.2.2.2. Jednolančani lomovi	25
2.2.3. Određivanje oštećenja DNA	27

2.3. Pregled dosadašnjih istraživanja genotoksičnog učinka zagađivala u morskom ekološkom sustavu s posebnim osvrtom na školjkaše	29
2.3.1. Određivanje genotoksičnosti	29
2.3.2. Određivanje oštećenja DNA kao molekularnih biomarkera	31
2.3.2.1. Brza mikrometoda (Fast Micromethod®)	35
2.3.3. Školjkaši kao indikatorski organizmi	37
2.3.4. Pregled istraživanja genotoksičnosti u Jadranu	42
3. MATERIJALI I METODE	46
3.1. Kemikalije i otopine	46
3.2 Izvori i primjena modelnih zagađivala	48
3.2.1. UV-C zračenje	48
3.2.2. γ - zračenje	49
3.2.3. Priprema i primjena otopine aktiviranog bleomicin-Fe(II) kompleksa	49
3.2.4. Priprema i primjena otopine NQO	49
3.2.5. Priprema i primjena otopine B[a]P	50
3.3. Organizmi, tkiva, kulture stanica i načini njihovog tretiranja	50
3.3.1. Humane stanice	50
3.3.1.1. Kultura humanih HeLa stanica	50
3.3.1.2. Humani limfociti (HL-60)	50
3.3.2. Stanice i homogenati tkiva laboratorijskih miševa	51
3.3.2.1. Limfoblasti L5178Y laboratorijskih miševa DBA/2	51
3.3.2.2. Homogenat tkiva jetre laboratorijskih miševa NMRI	51
3.3.2.3. Homogenat mišićnog tkiva laboratorijskih miševa NMRI	51
3.3.3. Stanice ovarija kineskog hrčka (CHO stanice)	52
3.3.4. Nativni izolat DNA iz gonada trpa <i>Holothuria tubulosa</i> (3567A)	52
3.3.5. Stanice spužve <i>Suberites domunculla</i>	52
3.3.6. Homogenat škrga dagnje <i>Mytillus galoprovincialis</i>	53
3.4. Brza mikrometoda (Fast Micromethod®)	55
3.4.1. Priprema uzoraka	56
3.4.1.1. Nativna DNA	56
3.4.1.2. Kulture stanica	56
3.4.1.3. Homogenati tkiva	56
3.4.2. Određivanje količine DNA u uzorku	56
3.4.3. Liziranje stanica i fluorimetrijsko određivanje denaturirane DNA	57
3.4.4. Priprema denaturirajuće otopine NaOH i pH uvjeta	58
3.4.5. Prikaz i obrada rezultata	58

4. REZULTATI	63
4.1. Optimalizacija primjene fluorokromatskog bojila Picogreen®-a za određivanje integriteta DNA u denaturirajućim uvjetima	63
4.1.1. Utjecaj količine DNA na fluorescenciju kompleksa DNA-Picogreen® u alkalnim uvjetima	63
4.1.2. Utjecaj pH vrijednosti na fluorescenciju kompleksa DNA-Picogreen®	65
4.2. Razvoj i primjena brze mikrometode (Fast micromethod®) na stanicama i tkivima sisavaca	66
4.2.1. Limfoblasti L5178Y laboratorijskih miševa DBA/2	66
4.2.2. Homogenat tkiva jetre i mišića laboratorijskih miševa NMRI	69
4.2.3. Stanice ovarija kineskog hrčka (CHO)	71
4.2.4. Humani limfociti HL-60	72
4.2.5. Kultura humanih HeLa stanica	73
4.3. Razvoj i primjena brze mikrometode (Fast micromethod®) na morskim beskralješnjacima	77
4.3.1. Nativni preparat DNA iz gonada trpa <i>Holothuria tubulosa</i> (3567 A)	77
4.3.2. Stanice spužve <i>Suberites domuncula</i>	79
4.3.3. Homogenat škrge dagnje <i>Mytilus galloprovincialis</i>	80
4.3.3.1. Ovisnost kinetike denaturacije ds-DNA o količini DNA i pH denaturirajućeg medija	80
4.3.3.2. Utjecaj umjetnih zagađivala na oštećenja DNA	83
4.3.3.3. Biomonitoring (Projekt Jadran)	86
5. RASPRAVA	94
6. ZAKLJUČCI	107
7. LITERATURA	109

III DODATAK

8. ŽIVOTOPIS	135
9. POPIS RADOVA	136
10. UČEŠĆE NA ZNANSTVENIM SKUPOVIMA	137

Popis simbola i kratica

AF	- aminofluoren
AAF	- acetil aminofluoren
AP	- apurinsko/apirimidinsko mjesto
B[a]P	- benz[a]piren
BPDE	- benz[a]piren-7,8-diol-9,10-epoksid
BPMO	- benz[a]piren monooksigenaza
CHO stanice	- stanice ovarija kineskog hrčka (engl. “ <u>C</u> hinese <u>H</u> amster <u>O</u> vary”)
DBA/2	- soj laboratorijskih miševa
DMSO	- dimetil sulfoksid
DNA (ds-, ss-)	- dezoksiribonukleinska kiselina (dvolančana, jednolančana)
EDTA	- etilendinitrotetraoctena kiselina
HeLa	- stanična linija karcinoma grlića maternice
HL-60	- humani leukociti
L5178Y	- leukociti miša
MNNG	- N-metil-N'-nitro-N-nitrogvanidin
NMRI	- soj laboratorijskih miševa
NQO	- 4-nitrokinolin-N-oksid
OMF	- oksidaze miješanih funkcija
P-450	- citokrom P-450
PAH	- policiklički aromatski ugljikovodici
PCB	- poliklorirani bifenili
RNA	- ribonukleinska kiselina
S9	- postmitohondrijska frakcija jetre štakora
SDS	- natrijdodecil sulfat (engl. “ <u>s</u> odium <u>d</u> odecil <u>s</u> ulphate”)
SSF	- koeficijent jednolančanih lomova (engl. “ <u>s</u> trand <u>s</u> cission <u>f</u> actor”)
TBT	- bis(tri-n-butilkositar)
Tris-HCl	- tris[hidroksimetil]aminometan hidroklorid
UV-zračenje	- ultra-ljubičasto zračenje valnih duljina od 100 do 400 nm
γ-zračenje	- elektromagnetsko zračenje valnih duljina manjih od 100 nm

1. UVOD

1.1. Predmet, metodologija i cilj istraživanja

1.1.1. Predmet istraživanja

Oštećenja DNA u nekom morskom organizmu odražavaju stupanj zagađenja mora, a mjerenjem cjelovitosti DNA dobiva se uvid u genotoksični rizik kojem su organizmi izloženi u aktualnom zagađenju. Procjena stupnja ugroženosti odabranih morskih organizama temelji se na istraživanju učestalosti primarnih oštećenja DNA nastalih djelovanjem genotoksičnih agensa i modulacije mehanizama oštećenja i popravka DNA kojima prethodi genotoksični stres.

1.2. Metodologija istraživanja

Brza mikrometoda (Fast Micromethod[®]) određivanja oštećenja DNA razvijena je i standardizirana na kulturi stanica ovarija kineskoga hrčka (CHO, Chinese Hamster Ovary), kulturi stanica i homogenatima tkiva glodavaca (mišji DBA/2 limfoblasi L5178Y te tkiva jetre i mišića laboratorijskih miševa NMRI), kulturi humanih stanica (HeLa stanice karcinoma maternice) i humanim limfocitima HL-60. Nakon toga metoda je primjenjena i prilagođena uvjetima rada s morskim beskralješnjacima (stanice spužve *Suberites domuncula* i homogenat škrga dagnje *Mytilus galloprovincialis*). Primjena metode za proučavanje oštećenja DNA u homogenatima škrga dagnji *Mytilus galloprovincialis* kao bioindikatorskog organizma zahtjeva standardizaciju metode, koja uključuje optimalizaciju količine uzorka potrebnog za analizu, primjenu test zagađivala ((- i UV-C zračenje, NQO, B[a]P, bleomicin-Fe(II)) te optimalizaciju uvjeta (pH, ionska jakost) i vremena liziranja i denaturacije ds-DNA. Nakon standardizacije metode za proučavanje učestalosti oštećenja DNA u škrgama dagnji u laboratorijskim uvjetima pristupilo se određivanju oštećenja DNA u škrgama prirodnih populacija dagnji *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). Kako bi se utvrdila razina izloženosti dagnji genotoksičnim zagađivalima te procjenio stupanj njihove ugroženosti u aktualnom zagađenju mora dagnje su sakupljane na 24 različite

lokacije uzduž sjeveroistočne jadranske obale koje su pod utjecajem komunalnog i industrijskog otpada (tzv. engl. "hot spots"). U tu svrhu uzorkovalo se po 5 dagnji sa svake lokacije, 4 puta godišnje od kolovoza 1998. do listopada 2001. godine.

1.3. Cilj istraživanja

Cilj istraživanja je razviti brzu i jednostavnu metodu za određivanje genotoksičnog potencijala zagađivala prisutnih u morskoj vodi i procjenu genotoksičnog rizika kojemu su izloženi organizmi u aktualnom zagađenju. Potrebno je utvrditi njezinu valjanost, primjenjivost i značajnost mjerenja oštećenja DNA kao biomarkera zagađenja određivanjem oštećenja DNA u škrgama školjkaša duž jadranske obale, utvrditi mjesta i načine uzorkovanja (učestalost i brojnost uzoraka) te procijeniti mogućnost regulacije upotrebe i planiranje prihvatljivih načina odlaganja tvari antropogenog podrijetla u okolišu, u ovom slučaju posebno genotoksičnih zagađivala. Razumijevanje i produbljivanje saznanja o osnovnim mehanizmima odgovora morskih beskralješnjaka na zagađenje pomaže nam u odabiru markera biološkog učinka genotoksičnih zagađivala na organizme (tzv. molekularni biomarkeri), boljem upoznavanju i razumijevanju njihovog utjecaja na ugrožene vrste, kao i za praćenje njihove rasprostranjenosti u morskom ekološkom sustavu.

2. OPĆI DIO

Velika količina kemijskih proizvoda koji su za prirodu i organizme u njoj strani (ksenobiotici) ispuštaju se u okolinu tijekom proizvodnje, skladištenja, prijevoza i upotrebe ili u obliku krajnjeg otpada (Helmer, 1977; UNEP/ECE/UNIDO/FAO/UNESCO/WHO/IAEA, 1984; Livingstone, 1993; Tahedl i Hader, 2001). U najvećoj mjeri otpadne tvari na koncu dospjevaju vodotokovima u morski ekološki sustav gdje se s vremenom nagomilavaju kako u vodenom stupcu i sedimentu tako i u živim organizmima, procesima bioakumulacije i biomagnifikacije. Iako su neka zagađivala utvrđena i u otvorenim oceanskim vodama (Bothner i sur., 1994), zagađenje je najintenzivnije u priobalju i na ušćima rijeka tj. u blizini ljudske djelatnosti (Hanson i sur., 1993; Dascalakis i O' Connor., 1995). U takvim relativno zatvorenim područjima s ograničenim izmjenama vodenih masa, morski organizmi su izloženi ne samo stresovima izazvanim unosom ksenobiotika već i djelovanju prirodnih stresova zbog promjena fizikalno-kemijskih čimbenika kao što su temperatura, salinitet morske vode, kolebanje ionskog sastava i organske tvari u moru. Unos toksičnih i/ili genotoksičnih tvari u more doprinosi stresu morskih organizama, odnosno izaziva povećanu osjetljivost na koju se organizmi moraju prilagoditi (Sindermann, 1996). Djelovanje zagađivala i njihovih metaboličkih produkata nadovezuje se na već eventualno postojeći prirodni stres (hipoksija, promjene saliniteta i temperature) stvarajući tako konstantno prisutan stres tzv. "sindrom genotoksične bolesti" (Kurelec, 1992) usljed kojeg nastaju specifični i kompleksno uzrokovani odgovori organizama. Zbog velikog broja i raznolikosti umjetno sintetiziranih spojeva i spojeva nastalih prirodnim procesima, u morskom ekološkom sustavu ne može se procijeniti stvaran utjecaj pojedinog kemijskog spoja na pojedinu biološku vrstu. U pravilu ti su kemijski spojevi prisutni u mješavinama, različito su dostupni organizmu i različitim se intenzitetom bioaktiviraju u krajnje toksične produkte, djeluju na različitim nivoima stanične i genomske organizacija te uzrokuju i direktna i indirektna oštećenja DNA (DeFlora i sur., 1991; Eastman i Barry, 1992; Würigler i Kramers, 1992). Slično je i s biološkim odgovorima koji su različiti, od onih najosjetljivijih koji se opažaju u promjeni ponašanja, preko anatomskih i citoloških abnormalnosti pa sve do letalnih. Stupanj do

kojeg će neki morski organizam biti ugrožen razlikuje se od vrste do vrste. Općenito su najugroženije životne zajednice morskog dna, odnosno bentos (GESAMP, 1977). Glavni razlog tome jesu teško topljive supstance koje se adsorbiraju na suspendiranu tvar s kojom padaju na dno te se nakupljaju u sedimentu (Neff, 1978). Priroda ulaska zagađivala, njihovo nakupljanje i sudbina u organizmu je vrlo složena. Zagađivala adsorbirana na sediment ulaze u organizam na razne načine: putem intersticijske vode, hranjenjem s površine sedimenta i direktnim kontaktom sa sedimentom. Ulazak zagađivala i njihova akumulacija ovisi o nekoliko čimbenika, kao što su stanište i uloga pojedinog organizma u prehranbenom lancu, prisutnost i vrijeme zadržavanja zagađivala u vodi ili sedimentu, te njegova fizikalno-kemijska svojstva (molekularna težina, polarnost, hlapivost i sl.).

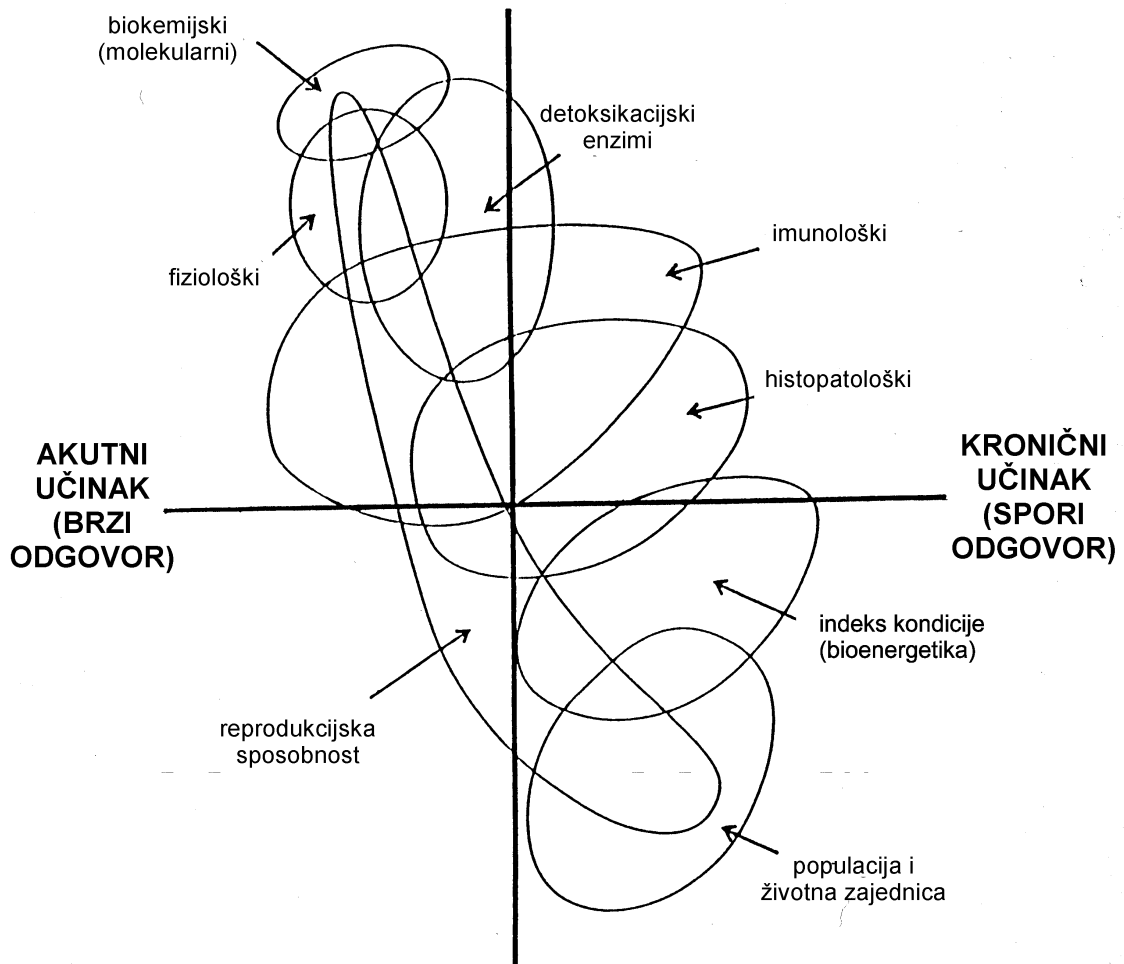
2.1. Upotreba biomarkera kao pokazatelja onečišćenja

Mehanizam ulaska zagađivala uključuje procese kao što su difuzija, aktivni transport i adsorpcija. Međusobnim djelovanjem različitih grupa zagađivala prisutnih u moru ti se procesi mogu značajno mijenjati. Zato je značajno odrediti i mjeriti ugroženost ne samo jedinke, već i ugroženost viših stupnjeva integracije vrste, uključivši i stupanj ekološkog sustava. Nakon ulaska u organizam kroz škrge, kožu ili usta, zagađivala se nagomilavaju u tkivima i metaboliziraju. Njihov učinak na organizam, može se procijeniti na različitim razinama biološke organizacije; molekularnoj i substancičnoj razini, staničnoj razini, razini tkiva, organa i čitavog organizma, odnosno razini jedinke, populacije i životne zajednice. Proučavanje svake pojedine razine daje informacije koje nam pomažu u razumijevanju i objašnjavanju odnosa između izloženosti zagađivalima i njihovog štetnog učinka. Upravo ti mjerljivi signali fizioloških, biokemijskih i histoloških promjena u staničnim ili biokemijskim procesima, strukturama ili funkcijama biološkog sustava nazivaju se krajnjim točkama

odnosno biološkim markerima ili biomarkerima izloženosti organizma (Rand, 1995). Biomarkeri pokazuju da je zagađivalo ušlo u organizam, stiglo na mjesto toksičnog ili genotoksičnog djelovanja te izazvalo štetni učinak.

Prema prirodi krajnjih točaka izloženosti i učinka zagađivala razlikujemo biomarkere izloženosti, biomarkere učinka (odgovora) i biomarkere osjetljivosti na učinak nastao uslijed izloženosti (Lagadic i sur., 1994). Ključno je razlikovanje između općih biomarkera, koji daju odgovor na gotovo sve vrste stresa te stoga predstavljaju i omogućuju kvantitativno određivanje nekih parametara biološkog odgovora organizma (Widdows i Donkin, 1992) i specifičnih biomarkera koji su specifični za određene grupe zagađivala (Livingstone, 1993, 2000; Groopman i Kensler, 1999). Važno je pritom znati da do promjena u biomarkerima, njihovoj različitoj kvalitativnoj i kvantitativnoj razini može doći i uslijed normalnih klimatskih ili fizioloških procesa. Tako prisutan osnovni odgovor (engl. "background") neophodno je uključiti u strategije praćenja odabranog biomarkera na nekom području. Cilj upotrebe biomarkera je da se na osnovi molekularnih, staničnih i fizioloških promjena nekog organizma, unaprijed predvide promjene na razini naselja populacije i životne zajednice (McCarthy i Schugart, 1990) (**Slika 1.**). Ekološki indikatori su parametri koji opisuju strukturu i funkciju ekološkog sustava kao što su raznolikost vrsta, populacijska dinamika ili razina nutrijenata, dok se bioindikatorima smatraju jedna ili više vrsta organizama, koji svojim prisustvom, brojnošću i samim fiziološkim stanjem ukazuju na stanje u okolišu u kojem žive (Van Gestel i Van Brummelen, 1995). Posebna se pozornost usmjerava ka primjeni nedestruktivnih biomarkera i neinvazivnih tehnika kako bi se maksimalno zaštitile promatrane bioindikatorske vrste (Fossi, 1996). Sama upotreba bioindikatora (Melancon, 1995) uključuje praćenje (monitoring) prirodnog stresnog odgovora radi procjene učinaka zagađivala u okolišu i predviđanja ranih upozoravajućih pokazatelja te omogućavanja uvida u uzročni odnos između stresa i učinka u životnoj zajednici i cijelom ekološkom

MALI EKOLOŠKI ZNAČAJ - velika specifičnost



VELIKI EKOLOŠKI ZNAČAJ - mala specifičnost

Slika 1. Razine biološkog odgovora (biomarkera) u ovisnosti o vremenu nastanka učinka i ekološkoj značajnosti (specifičnosti) (Prema: Adams i sur., 1989).

sustavu na više različitih razina biološke organizacije (Adams i sur., 1989). Anatomske i citološke abnormalnosti poznati su biomarker koji se dugo upotrebljavao kao pokazatelj pogubnog učinka zagađivala. Različiti tipovi adaptivnih biokemijskih i imunoloških promjena u organizmu su također korišteni kao biomarkeri. Tako su

promjene u serumskim proteinima i lipidima, oštećenja lizosomalnih membrana i promjena u profilu amino kiselina korištena kao pokazatelj stresa (Moore, 1985; 1988; Sanders, 1993; Sanders i Martin, 1993). Kao indikator nazočnosti teških metala koristi se indukcija enzimskog detoksikacijskog sustava metalotioneina, dok se kao indikator zagađenja organskim spojevima upotrebljava indukcija enzimskog sustava citokrom P-450 oksidaza miješanih funkcija. Među različitim organskim spojevima proučavano je i djelovanje tzv. genotoksičnih agenasa. To su kemijski i fizikalni agensi koji izazivaju oštećenja DNA (Zahn, 1991) i/ili mijenjaju stanične procese vezane uz cjelovitost genoma. Genotoksičnost se od opće toksičnosti razlikuje u tome što genotoksični agensi mogu nestati iz okoliša mnogo ranije od pojave prvih znakova oštećenja organizama koja se često otkrivaju tek u slijedećim generacijama, za razliku od toksičnih sredstava koji djeluju na organizme u minimalnim koncentracijama tako dugo dok su prisutni na nekom mjestu, te uzrokuju oštećenja organizama samo tijekom njihova izlaganja. Važno je znati da genotoksični agensi uzrokuju nastanak genskih mutacija pa i neoplazija, koje se manifestiraju kao različite bolesti uključujući i teratogene abnormalnosti, kao i latentna genetska oštećenja koja se ne moraju manifestirati tijekom nekoliko generacija ali se mogu nepovoljno odraziti na potencijal preživljavanja kako jedinke tako i čitave populacije (Depledge, 1996, 1998). Mnoga zagađivala nisu genotoksična *per se* ali uzrokuju nekrozu i staničnu smrt, tj. iniciraju patofiziološke mehanizme koji dovode do degradacije DNA i smrti stanice. Vrlo specifičan slučaj je zagađivalima inducirana apoptoza pri čemu dolazi do fragmentacije DNA, a najčešće se za detekciju iste koristi "end labeling" tehnika određivanja lomova DNA (Sweet i sur., 1999). Nakon ulaska u organizam kroz škrge, usni otvor ili površinu tijela ti se genotoksični agensi, koji su ujedno i lipofilni, akumuliraju u tkivima bogatim lipidima nakon čega slijedi njihova oksidacija u hidrofilne produkte, koji se ili izlučuju iz organizma ili vežu na nukleofilna mjesta makromolekula (Gelboin, 1980). Primarno mjesto metabolizma ksenobiotika u riba je jetra, koja sadrži najvišu aktivnost OMF (citokrom P-450 monooksigenaze ili mikrosomske monooksigenaze) odgovornih za njihovu detoksikaciju. Prvi stupanj u

biotransformaciji je tzv. "faza I" (Williams, 1974), tj. ugradnja jednog atoma molekularnog kisika u supstrat, a drugog u vodu, nakon čega slijedi "faza II" u kojoj dolazi do konjugacije u glutation, glukuronid ili sulfat konjugat pri čemu se ti lipofilni spojevi transformiraju u vodotopive produkte lako izlučive iz organizma putem žuči ili urina. Istovremeno, oksidacijom nekih lipofilnih tvari dolazi do metaboličke transformacije premutagena i/ili prekancerogena u elektrofilne mutagene/kancerogene, koji se vežu na nukleofilne dijelove DNA, RNA ili staničnih proteina (Miller i Miller, 1971), koji tako mogu izazvati toksične i genotoksične učinke, uključujući i stvaranje neoplazija (Farber i Sarma, 1986). U tom smislu, endogena metabolička transformacija premutagena/prekancerogena u aktivni mutagen/kancerogen, zapravo je neželjena posljedica aktivnosti mehanizma za detoksifikaciju. Upravo te promjene na DNA, koje nastaju djelovanjem genotoksičnih agenasa i njihovih metabolita, predstavljaju biomarkere na biokemijskoj, molekularnoj i staničnoj razini tzv. biomarkere kratkog perioda. Drugim riječima, oni su indikator promjena u okolišu jer brzo odgovaraju na promjene izazvane prisutnim zagađivačima dajući osjetljiv i specifičan odgovor. Uočljivo je da su navedeni molekularno biološki, biokemijski, fiziološki i imunološki biomarkeri vrlo specifični i uz akutan učinak (rani signal) imaju malu ekološku vrijednost. Nasuprot tome, biomarkeri mjereni na visokoj razini biološke organizacije (histopatološki pokazatelji, bioenergetski pokazatelji, rast i metabolizam lipida, brojnost i različitost vrsta u populaciji) uočavaju se tek nakon dužeg vremenskog razdoblja (godine i desetljeća). Oni su od direktnog ekološkog značenja, ali ne dokazuju sami za sebe da li su izmjerene promjene uzrokovane zagađenjem ili prirodnim ekološkim čimbenicima (Adams i sur., 1989). U ekotoksikološkim studijama preživljavanje jedinki, njihov rast, indeks kondicije i reproduktivna sposobnost kao krajnje točke učinka zagađivala koriste se u različitim testovima toksičnosti (engl. "bioassay"). Na razini populacije učinci zagađivala se ispoljavaju u vidu promjena u genetskoj strukturi ili čak izostanku jedinki date populacije, dok su promjene na razini životne zajednice uočljive kao kvalitativne i kvantitativne promjene vrsta u promatranom ekološkom sustavu (Van Gestel i Van Brummelen, 1996). Upravo je

predviđanje smjera promjena i učinka zagađivala na populacijskoj razini ili još bolje na razini cijele životne zajednice osnovni cilj biomonitoringa i ekotoksikoloških studija. Procjena ekološkog rizika uključuje analizu kvalitativnog i kvantitativnog potencijala zagađivala (opisivanje forme, dimenzija i karakterizacija izloženosti i učinka) da uzrokuju značajne i štetne promjene u ekološkom sustavu (Haldway, 1996; EPA, 1998).

Molekularni biomarkeri su molekularni markeri biološkog učinka zagađivala na organizam (pokazatelj stresa) te se njihov razvoj i primjena očituju kako u ekotoksikologiji (McChartey i Shugart 1990; Livingstone i sur., 1993), koja objedinjuje ekologiju i toksikologiju (Chapman, 1995), tako i u humanoj toksikologiji (Timbrell, 1996.). Danas se oni naširoko primjenjuju u monitoring programima i studijama kao dio sveobuhvatnih i integriranih multidisciplinarnih proučavanja i praćenja zagađenja okoliša pri čemu su promjene strukture i funkcije DNA, odnosno primarna oštećenja DNA, klastogeni efekti kao i njihovo objedinjavanje u okvirima genotoksikologije, uz primjenu sofisticiranih metoda i tehnika, u stalnom razvoju i primjeni širom svijeta (Dixon i Wilson, 2000; Shugart, 2000; D'Surney i sur., 2001; Theodorakis, 2001).

Posljedice tj. učinci oštećenja DNA su na različitim nivoima biološke organizacije različiti (Hansen, 1994). Moguće posljedice takvih genotoksičnih promjena opisane su kao "sindrom genotoksične bolesti" (Kurelec, 1992), što uključuje promjene enzimskih funkcija i broja izmjene (engl. "turnover number") opće promjene u metabolizmu, produkcija inicijatora citotoksičnih oštećenja, inhibicija rasta i razvoja jedinke, degenerativne procese i atrofiju tkiva i organa, smanjenje mogućnosti prilagodbe i imunološkog odgovora, brže starenje, povećanu frekvenciju bolesti i neoplazija, poremećaje u adaptaciji, preživljavanju i nasljeđivanju te na kraju i ekstinkciju tj. izostanak vrste. Stoga se s posebnom pozornošću proučavaju rani znakovi genotoksičnih promjena, prvenstveno primarna oštećenja DNA i njihova veza s promjenama u organizmu izloženom djelovanju genotoksičnih zagađivala, a u svrhu predviđanja genotoksičnog rizika kojemu su organizmi izloženi u aktualnom zagađenju

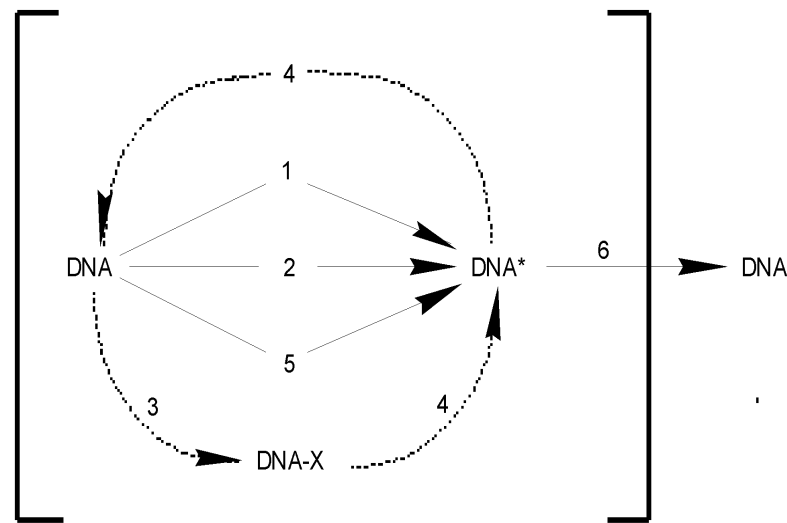
mora (Shugart, 1990). Prema tome, molekularni biomarkeri se mogu smatrati ranim, upozoravajućim signalom izloženosti organizma zagađivalima, te su stoga uključeni u programe praćenja zagađenja morskog ekološkog sustava. Za oživotvorenje upotrebe biomarkera u praćenju promjena u okolini uzrokovanih zagađivalima (biomonitoring), potrebno je istraživati one osnovne mehanizme kojima zagađivalo izaziva promjene u živih organizama i interpretirati podatke dobivene na mjestima izloženosti organizama ("*in situ*") uz razvoj i primjenu novih analitičkih tehnika. Vjerodostojnim saznanjima o kemijsko-analitičkim vrijednostima aktualne razine izloženosti, bioakumulaciji zagađivala te patološkim podacima o istraživanim bioindikatorskim organizmima postići će se bolja povezanost mjerljivih bioloških odgovora s vremenom i načinom izloženosti te dozom (koncentracijom) zagađivala (Luoma, 1996). Navedeni sveobuhvatni pristupi važne su i međusobno ovisne komponente uspješnih programa praćenja zagađenja i procjene učinka istih na morske organizme.

2.2. Mehanizmi, vrste i načini određivanja oštećenja DNA

DNA je u stanicama prisutna kao funkcionalno stabilna, dvolančana molekula bez trajnih diskontinuiteta, odnosno, bez trajnih jednolančanih lomova ili abnormalnih strukturalnih promjena, te u kompleksu sa specifičnim proteinima čini kromatin. Kao takva smatra se strukturom visoke cjelovitosti. Zadržavanje takve cjelovitosti važno je za funkcioniranje, razvoj i preživljavanje stanice. Mali broj stalnih mutacija koje su primijećene u živim stanicama (1 mutacija po genu na 200 000 godina) upućuje na njenu konstantnost (Alberts i sur., 1994). Ova ekstremna strukturalna stabilnost mora biti ostvarena dinamički, tj. postojanjem ravnotežnog stanja između neprestanog oštećivanja DNA, odnosno popravljivanja tih oštećenja. Međutim, molekula DNA živih stanica vrlo lako reagira s brojnim kemijskim i manjim brojem fizikalnih agensa. Svaka promjena koja nastaje u molekularnoj strukturi genetskog materijala, smatra se

oštećenjem DNA. Primarna oštećenja DNA nastaju kao posljedica normalnih staničnih metaboličkih procesa (replikacija, transkripcija, popravak oštećene DNA) (Lindahl, 1993) te kao posljedica djelovanja različitih fizikalnih i/ili kemijskih agensa. Ona obuhvaćaju i zagađivalima inducirane promjene u kemijskoj strukturi DNA, kao što su kovalentno vezivanje zagađivala ili njegovih metabolita na DNA (formiranje adukata), kemijske promjene u bazama i nastanak alkalno-labilnih mjesta, stvaranje jednolančanih i dvolančanih lomova, unakrsno međusobno vezanje DNA lanaca (engl. "intra-" i "interstrand cross-linking"), te DNA lanaca sa proteinima (engl. "DNA-protein cross-linking"). Toplinska energija uzrokuje nastanak na tisuću abazičnih mjesta u stanici tijekom jednog dana. Takva se oštećenja normalno popravljaju, ali se njihova učestalost povećava djelovanjem genotoksičnih zagađivala. Abazično mjesto predstavlja oštećenje koji može rezultirati lomom DNA lanca i nastankom privremenog diskontinuiteta sekundarne strukture. Ionizirajuće zračenje kao i slobodni radikali uzrokuju direktni nastanak lomova lanca, dok npr. UV-zračenje i neki genotoksini uzrokuju nastanak produkata koji se popravljaju različitim mehanizmima popravka tijekom kojih nastaju privremeni diskontinuiteti jednog od lanaca (Shugart i sur., 1992; Shugart, 1998).

Putevi nastanka oštećenja DNA prikazani su na **slici 2**. Put 1 predstavlja normalni fiziološki nastanak oštećenja uzrokovan metaboličkim procesima te usljed nasumične termalne kolizije staničnih molekula, a put 5 opisuje nastanak oštećenja DNA tijekom replikacije. Putevi 2 i 3 predstavljaju interakcije s fizikalnim (γ - i UV-zračenje) odnosno kemijskim agensima pri čemu nastaju strukturne modifikacije DNA (adukti, lomovi lanca). Put 4 predstavlja popravak tako oštećene DNA mehanizmima koji mogu privremeno stvarati i dodatna oštećenja DNA. Određeni agensi djeluju preko mehanizma slobodnih radikala, uzrokujući jednolančane lomove direktno, dok poneki interferiraju s normalnim popravkom DNA, tijekom postreplikativnih procesa (put 6).

**OŠTEĆENJE DNA:**

1. normalni fiziološki put oštećenja
2. UV i ionizirajuće (γ - i X-) zračenje
3. djelovanje različitih kemijskih sredstava

POPRAVAK DNA:

4. incizija, ekscizija, resinteza, ligacija

SINTEZA DNA

5. replikacija
6. postreplikativni procesi

DNA: DNA bez jednolančanih lomova (DNA visoke cjelovitosti)

DNA-X : kemijski promijenjena DNA

DNA* : DNA s jednolančanim lomovima (DNA niske cjelovitosti)

Slika 2. Oštećenje, popravak i sinteza DNA (Prema: Shugart, 1990).

Strukturno promjenjena i kratkotrajna "prijelazna populacija DNA" se uslijed nepotpunog i nepravovremenog popravka, replicira te prenosi u stanice kćeri. Pritom može doći do pojave mutacija, koje se uočavaju u vidu poremećaja funkcije proteina, nastanka kromosomskih aberacija, izmjene sestrinskih kromatida, formiranja mikronukleusa te konačno aktivacije onkogena i nastanka tumora (Harvey, 1982). Takve, sekundarne promjene i oštećenja DNA značajne su za višu kromatinsku

strukturu i uočljive su na razini kromosoma tj. cjelokupnog genoma. Kao odgovor na oštećenje DNA, osim popravkom stanica može odgovoriti i vlastitim uništenjem, tzv. programiranom staničnom smrću (Kerr i sur., 1972) i tako spriječiti krajnje negativne posljedice po cijeli organizam.

Genotoksičnim agensima smatraju se ona kemijska i fizikalna zagađivala koja imaju sposobnost interakcija te oštećivanja strukture DNA uz direktan negativni utjecaj na biološki integritet po živi organizam nazivaju se genotoksinima. Tako nastale specifične vrste oštećenja strukture DNA mogu poslužiti kao biomarkeri izloženosti, dok se takvim oštećenjima inducirani biološki odgovori smatraju biomarkerima učinka (Shugart, 1990, Shugart i sur., 1998). U staničnoj jezgri molekule DNA nalaze se u postojanoj ravnoteži između funkcionalno stabilne ds- strukture bez diskontinuiteta lanaca i intermedijera nestabilnog stanja, gdje je strukturna cjelovitost DNA promjenjena usljed normalnih fizioloških procesa (transkripcija, translacija, popravak DNA). Trajna ili prolazna nesposobnost organizma da savlada nastali stres i održi strukturnu cjelovitost DNA može poslužiti kao svojevrsni biljeg genotoksičnog djelovanja nekog zagađivala. Najuobičajenije strukturne promjene na DNA su: nastanak pirimidinskih dimera, lomovi lanaca DNA, adukti na DNA, zamijena purinskih/pirimidinskih baza, nastanak abazičnih mjesta, hipometiliranost baza itd. Neke od tih strukturnih modifikacija DNA točno su određene vrstom genotoksičnog agensa. Tako npr. pirimidinski dimeri nastaju samo usljed djelovanja UV-B zračenja, a PAH-ovi uzrokuju nastanak DNA-adukata. Nadalje, genotoksična zagađivala mogu interferirati i s normalnim staničnim metaboličkim procesima kao što su replikacija, metilacija, popravak DNA, a to može imati za posljedicu nastanak različitih mutacija kao što su delecije ili adicije baza.

Prema tome, može se reći, da je u stanici u bilo koje vrijeme prisutna određena količina DNA niske cjelovitosti, odnosno, DNA s različitim vrstama strukturalnih promjena. Utvrđeno je da većina stanica posjeduje mehanizme popravka DNA (Sancar i Sancar, 1988) kojima se može smanjiti količina DNA niske cjelovitosti. Omjer DNA visoke i niske cjelovitosti pokazuje mjeru oštećenja DNA. U pravilu se očekuje da će organizmi, koji su izloženi genotoksičnim agensima imati pomaknutu ravnotežu u smjeru DNA niske cjelovitosti. Stanica po oštećenju DNA može odgovoriti na dva načina: blokiranjem staničnog ciklusa u G_1 fazi, kako bi se omogućio popravak, ili samouništenjem u procesu programirane stanične smrti (Enoch i Norbury, 1995). Jednom kad je oštećenje DNA nastalo, razvoj mogućih genetskih promjena na stanicama kćeri uvjetuje odgovarajući stanični odgovor. Prvi kritični stupanj za stanicu je odstranjenje oštećenja DNA tj. potpun popravak DNA (tzv. engl. "error-free"; ekscizijski i rekombinantni popravak). Drugi kritični stupanj za stanicu predstavlja vrijeme popravka oštećenja DNA s obzirom na dva ključna stanična procesa: replikaciju DNA i mitozu. Drugim riječima stanica ne bi trebala udvostručiti svoju DNA ili dopustiti odvajanje kromosoma prije popravka kromosomske DNA. U slučaju oštećenja DNA stanica ima tri mogućnosti izbora: a) popraviti oštećenje DNA u potpunosti, bez posljedica na stanice kćeri, b) nepotpuno popraviti oštećenje DNA, međutim ipak preživjeti ili c) započeti proces samouništenja. Izbor stanice bilo za popravak oštećenja DNA ili za samouništenje, omogućuje održavanje stabilnosti genoma. U slučaju nepotpunog popravka DNA (tzv. engl. "error-prone") postoji mogućnost razvoja stalnih genetskih promjena. Ravnoteža među staničnim populacijama jednog organizma, kontrolirana je regulacijom brzine proliferacije, diferencijacije i smrti konstitutivnih stanica.

Svako oštećenje DNA popravljaju se različitim mehanizmima popravka do različitog stupnja te je za proučavanje genotoksičnog rizika izloženosti morskih organizama potrebno poznavati i dinamičku ravnotežu između nastanka oštećenja i samog popravka DNA što konačno može rezultirati povećanjem ili smanjenjem učestalosti oštećenja, promjenom tipa oštećenja te ravnotežnim stanjem između stalnog

nastanka i uklanjanja tj. popravka oštećene DNA.

Razlikujemo primarna i sekundarna oštećenja DNA. Primarna oštećenja DNA mogu nastajati spontano, tijekom normalnog staničnog metabolizma, a mogu biti i inducirana genotoksičnim zagađivačima. Spontana oštećenja DNA (nesparene i krivo sparene baze, tautomerizacija, deaminacija, oksidativna oštećenja i gubitak baza) nastaju kao rezultat staničnog metabolizma ili raspadanja organizma u okolišu, bez djelovanja genotoksičnog agensa. Učestalost pojavljivanja apurinskih mjesta u ljudskim stanicama iznosi od $1-3 \times 10^4$ /stanici/danu (Lindahl i Nyberg, 1972), a apirimidinskih mjesta 100/stanici/danu (Lindahl i Karlström, 1973). Ta oštećenja u stanici nastaju zbog prirodnih procesa i u pravilu se brzo popravljaju, međutim, mogu predstavljati i potencijalno letalna oštećenja unutar genoma (Fortini i sur., 1990; Laval i sur., 1990). Vrste primarnih oštećenja DNA koja nastaju i spontano i djelovanjem različitih fizikalnih i kemijskih genotoksičnih zagađivala iz okoliša (Friedberg i sur., 1995), a njihova raznolikost i količina, zahvaljujući utjecaju čovjeka (urbanizacija i industrija) svakodnevno raste., prikazani su u **Tablici 1**.

PRIMARNA OŠTEĆENJA DNA				
način nastanka		vrsta	posljedice	
SPONTANA	greške nastale tijekom normalnog staničnog metabolizma; replikacije, transkripcije, popravka i rekombinacije DNA		nesparene baze (engl. "mismatches")	ispuštanje (delecija) baznih parova
	Kemijske promjene	nestabilnost kemijskih veza	tautomerizacija baza (NH ₂ u NH oblik)	zamjena (supstitucija; tranzicija ili transformacija) baznih parova
		strukturna nestabilnost baza	deaminacija baza (Citozin u Uracil, Adenin u Hipoksantin, Gvanin u Ksantin)	
		reakcije ovisne o pH i temperaturi	gubitak baza (depurinizacija, depirimidini zacija)	ispuštanje (delecija) baznih parova
djelovanje •OH radikala tijekom mitohondrijske respiracije i enzimske sinteza NO ₂ u stanicama		oksidativna oštećenja (gubitak baza, odvajanje H iz CH ₃ skupine)		
INDUCIRANA	fizikalni agensi	ionizirajuće (γ-) zračenje	oštećenja baza, oštećenja šećera dezoksiriboze, alkalno-labilna mjesta, lomovi DNA	usljed neučinkovitog popravka DNA može doći do zastoja replikacije i transkripcije
		UV - zračenje	ciklobutanski pirimidinski dimeri, pirimidin-pirimidon (6-4) fotoprodukt, sporni fotoprodukt, kompleksna oštećenja purina, pirimidin hidrat, timin glikol, lomovi DNA, umrežavanje DNA (engl. "inter-" i "intrastrand cross-linking")	
	kemijski agensi	alkilirajući agensi (MNNG, etilmetansulfonat, etiletansulfonat, nitrozigvanidin)	alkilacija baza (uvođenje CH ₃ , CH ₂ CH ₃ skupina), deaminacija baza, nastanak abazičnih (AP) mjesta, umrežavanja DNA (engl. "inter-" i "intrastrand cross-linking") te umrežavanje DNA i proteina	
		umrežavajući agensi (psoraleni, formaldehid)		
		interkalirajući agensi (antraciklinski glikozidi, aktinomycin D, etidijumske i akridinske boje)	narušavanje sekundarne strukture DNA uzvojnice	
		agensi koji zahtijevaju metaboličku aktivaciju (aromatski amini, aflatoksini, NQO, B[a]P, AAF) pri čemu nastaju reaktivni elektrofilni intermedijeri	DNA adukti, umrežavanja DNA (engl. "inter-" i "intrastrand cross-linking") te umrežavanje DNA i proteina, alkalno-labilna mjesta, lomovi DNA	
	analozi baza (5-bromuracil, 5-fluoruracil, 5-joduracil, 2-aminopurini)	inkorporacija baznih analoga u molekulu DNA umjesto odgovarajućih purina ili pirimidina	pogreške u sparivanju baza te nastanak tranzicije	

Tablica 1. Načini nastanka, inducirajući agensi i vrste primarnih oštećenja DNA.

Usljed postojanosti i neefikasnog odstranjivanja primarnih oštećenja DNA može doći do razvoja sekundarnih oštećenja bilo da se radi o nastanku klastogenih oštećenja kao što su: kromosomske aberacije (odstupanje od normalnog broja ili oblika kromosoma), zamjena sestrinskih kromatida, delecije, translokacije te razvoj mikronukleusa; i/ili nastanka mutacija i smanjenja genetičke raznolikosti te indukcije aktivacije onkogena te nastanka neoplastičnih transformacija, promjena u normalnoj staničnoj proliferaciji i diferencijaciji pa i samoj smrti stanice, odnosno morfološkim i funkcionalnim poremećajima tkiva i organa te razvoja tumora. Osim toga, mnoga klastogena zagađivala koja uzrokuju uočljiva oštećenja DNA na višem nivou kromatinske organizacije ujedno su i mutageni tj. genotoksični agensi. Takvi će organizmi iskazivati smanjenu sposobnost razmnožavanja i preživljavanja što za posljedicu ima smanjenje brojnosti populacije te na koncu, njeno isčeznuće iz životne zajednice koje se na nivou ekološkog sustava ispoljava u vidu smanjenja biološke raznolikosti.

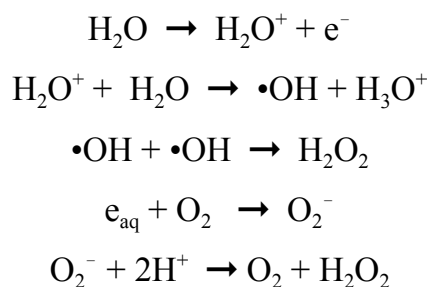
2.2.1. Agensi koji induciraju nastanak oštećenja DNA

2.2.1.1. Fizikalni agensi

Fizikalni agensi, kao što su ionizirajuće (γ -) i ultraljubičasto (UV-) zračenje, direktno utječu na stvaranje različitih oštećenja DNA. Ionizirajuće zračenje stvara slobodne radikale (\bullet OH), koji u polidezoksiribonukleotidnim lancima utječu na pucanje fosfodiesterske veze između fosfata i šećera deoksiriboze, te nastaju jednolančani i dvolančani lomovi i mnogobrojne modifikacije purinskih i pirimidinskih baza. Kao posljedica direktne apsorpcije fotona UV-zračenja u purinskim ili pirimidinskim bazama molekule DNA ili indirektnim prijenosom fotona posredstvom "pobuđenih" molekula na DNA te djelovanjem slobodnih radikala nastalih usljed γ -zračenja u tzv. "primarnim reakcijama" nastaju različita oštećenja, koja mijenjaju njezinu strukturu i funkciju pri čemu se gube svojstva "normalne" genetičke upute.

2.2.1.1.1. Ionizirajuće (γ -)zračenje

Ionizirajuće zračenje je prirodni izvor oštećenja DNA živih organizama tijekom evolucije. U današnje vrijeme od veće je važnosti nastanak oštećenja uzrokovanih γ -zračenjem koje potječe od različitih industrijskih, dijagnostičkih i terapijskih izvora. γ -zračenje uzrokuje nasumična oštećenja DNA. Ovisno o energiji zračenja, koja se definira linearnim prijenosom energije ($\text{keV}/\mu\text{m}$) odnosno gubitkom energije na nekom putu usljed kolizije s česticama, nastaju ionizirane i energetski pobuđene molekule. Direktni učinak γ -zračenja rezultat je direktne interakcije tj. prijenosa energije zračenja na DNA, dok se indirektni učinak očituje u interakcijama DNA s reaktantima nastalim djelovanjem zračenja. Različite makromolekule, anorganski ioni, a posebno H_2O predstavljaju izvor najrazličitijih reaktivnih vrsta koje mogu egzistirati i u pobuđenom molekulskom stanju ili u obliku ionskih te slobodnih radikala. Složenost reakcijskih mehanizama te veliki broj potencijalnih reaktanata osiguravaju široki spektar produkata nastalih na DNA izazvanih γ -zračenjem. H_2O je u biološkim sistemima najzastupljeniji izvor indirektnih oštećenja DNA, te se procjenjuje da oko 80% ukupne energije zračenja apsorbira H_2O te da radiolizom vode nastaju reaktivni elektroni (e^-), te druge reaktivne vrste kao što su $\cdot\text{OH}$, $\text{H}\cdot$, H_2 i H_2O_2 i O_2^- :



Smatra se da je glavnina (cca 65%) DNA oštećenja uzrokovana γ -zračenjem posljedica djelovanja $\cdot\text{OH}$, a samo 35% otpada na oštećenja nastala direktnim djelovanjem energije zračenja. Oštećenja DNA koja nastaju djelovanjem γ -zračenja su oštećenja purinskih i pirimidinskih baza, molekula šećera dezoksiriboze te lomovi lanca DNA (Friedberg i sur., 1995).

Oštećenja purinskih baza svode se na napad $\bullet\text{OH}$ na dvostruku vezu između C-5 i C-6 atoma purinskog prstena. Uslijed direktnog djelovanja zračenja izbija se jedan elektron iz elektronskog oblaka te nezasićene veze tako da nastali kationski radikal reagira s hidroksilnim ionom pri čemu i u slučaju direktnog i indirektnog djelovanja γ -zračenja nastaju isti reaktivni međuprodukti. U aerobnim uvjetima reakcije tako nastalog kationskog radikala s O_2 rezultiraju različitim zasićenim derivatima samog pirimidinskog prstena npr. timidin glikola te nadalje nastankom metil tartroniluree, 5-hidroksi hidantiona, N-formamido uree i uree, dok pri anaerobnim uvjetima nastaju 5-hidroksitimidin i 6-hidroksi-5,6-dihidrotimin. Zasićeni derivati DNA baza dovode do destabilizacije N-glikozilne veze i nastanka abazičnih dezoksiriboznih ostataka. Donosom relativno velike energije zračenja na pojedinu lokaciju DNA može prouzročiti i tzv. lokalno više oštećeno mjesto zbog nastanka većeg broja oštećenja uzrokovanih brojnim reakcijama na ograničenom području na što utječe i tercijska struktura DNA.

Oštećenja molekula šećera dezoksiriboze rijetka su od oštećenja samih baza. Međutim, biološki značaj takvih oštećenja je velik jer mogu rezultirati lomom DNA lanca. Predhodno spomenuti abazični dezoksiribozni ostaci kao i produkti nastali direktnim djelovanjem $\bullet\text{OH}$ radikala su alkalno labilna mjesta koja mogu prerasti u mjesta nastanka lomova DNA lanca u alkalnim uvjetima.

Ionizirajuće zračenje također dovodi i do direktnog nastanka lomova DNA. Prisustvo jednolančanog loma olakšava posredovani napad slobodnih radikala na tom mjestu, a ukoliko je jednolančani lom na komplementarnom lancu DNA dovoljno blizu dolazi do nastanka dvolančanih lomova DNA. Povećana koncentracija O_2 dovodi do povećanja frekvencije oštećenja izazvanih ionizirajućim zračenjem i naziva se učinak kisika. Stanični radioprotektori kao što je glutation spriječavaju nastanak oštećenja natječući se s O_2 da na svoju tiolnu grupu vežu pobuđeni elektron s molekule slobodnog radikala.

2.2.1.1.2. Ultraljubičasto (UV-) zračenje

Ukupno zračenje Sunca tzv. solarna konstanta (tok energije sunčevog zračenja pri srednjoj udaljenosti Zemlje od Sunca) iznosi $1376 \pm 1,2 \text{ W/m}^2$ (Haigh, 1996). Više od 50% tog zračenja je infracrveno ili toplinsko zračenje (IR), 40% čini vidljiva svjetlost (VIS), a oko 5% ultraljubičasto (UV) zračenje (Cligen i sur., 1995). Ultraljubičasti (UV) dio spektra zračenja podjeljen je na tri valna područje: UV-A koji obuhvaća zračenje valnih duljina od 400 do 320 nm, UV-B od 320 do 290 nm i UV-C od 290 do 100 nm. Onaj dio UV-zračenja koji dopire do površine Zemlje sastoji se pretežno od UV-A (oko 94%) i UV-B zraka jer se zračenje valnih duljina manjih od 320 nm apsorbira u gornjim slojevima atmosfere i ozonskom omotaču koji se u kontinuiranom procesu stvara iz molekula O_2 pod utjecajem kratkovalnog UV-zračenja i raspada pod utjecajem dugovalnoga UV-zračenja. Valne duljine UV-B područja apsorbiraju mnoge biološki važne makromolekule: maksimalnu apsorpciju zračenja elektromagnetskog spektra molekule DNA i RNA pokazuju kod 260 nm, a proteini kod 280 nm, pri čemu dvostruke veze u ugljikovim spojevima imaju ulogu apsorpcije te energije čime dolazi do narušavanja njihove strukture. Kao odgovor na prirodno prisutnu količinu UV-zračenja u okolišu, organizmi su razvili niz mehanizama za smanjenje i otklanjanje oštećenja koje ono izaizva, kao što su: sinteza UV-apsorbirajućih komponenti koje služe kao barijera za UV-zračenju, fiziološki mehanizmi koji prepoznaju i popravljaju oštećenja nastala djelovanjem UV-zračenja te stvaranje antioksidansa koji neutraliziraju učinak slobodnih radikala nastalih usljed djelovanja istog. Oštećenja DNA, koja nastaju djelovanjem UV-zračenja su ciklobutanski pirimidinski dimeri, pirimidin-pirimidon (6-4) fotoprodukti, umrežavanje i lomovi lanaca DNA (Friedberg i sur., 1995).

2.2.1.2. Kemijski agensi

Usporedi li se djelovanje kemijskih agenasa u odnosu na fizikalne, može se zaključiti da je testiranje kemijskih agenasa i procjena njihovog genotoksičnog djelovanja, složenija u odnosu na djelovanje fizikalnih. Dok fizikalni agensi uzrokuju promjenu genetskog materijala gotovo u svim stanicama, kemijski agensi su s jedne strane jaki mutageni u određenoj vrsti stanica (organizma), a s druge strane, na druge stanice (organizme) slabo ili uopće ne djeluju. Ipak, do koje će mjere na genetski materijal nekog organizma djelovati određeni fizikalni ili kemijski agensi određuju i drugi brojni čimbenici, kao što su kemijska struktura spojeva, način pristizanja agenasa u organizam, dužina trajanja izlaganja, doza, apsorpcija, izlučivanje, raspodjela agenasa u organizmu i sl. Monofunkcionalni alkilirajući kemijski agens (nitrozourea, etilenamin, alkilsulfonat) direktno stvaraju različita oštećenja DNA (depurinacija/depirimidinacija, alkalno-labilna mjesta), dok bifunkcionalni alkilirajući kemijski agensi (dušična kiselina, mitomicin, dušični i sumporni peroksidi, derivati platine (*cis*-platinum[II]diaminodiklorid) unakrsno vezuju lance DNA međusobno, te DNA lance i proteine (Friedberg i sur., 1995). Interkalirajući agensi (antraciklinski glikozidi: daunorubicin, adriamicin, mitramicin, nogalamicin, te aktinomicin D, etidijske i akridinske boje), također direktno djeluju na DNA, ali tako da se interkaliraju tj. umeću između parova baza. Takva interkalacija narušava strukturu DNA i dovodi do pogrešaka tijekom replikacije DNA. Premutageni/prekancerogeni kemijski agensi, metaboličkom se aktivacijom, pomoću enzimskog sustava, transformiraju u reaktivne mutagene/kancerogene, koji tada poput alkilirajućih agenasa postaju elektrofilni i vezuju se na nukleofilna mjesta u DNA. Na taj način uzrokuju: a) direktne promjene u kemijskoj strukturi DNA pri čemu nastaju tzv. DNA adukti (kovalentna veza kemijskog agenasa ili njegovih metabolita na DNA) (Shinohara i Cerutti, 1977, Cerutti i sur., 1978), b) indirektna oštećenja DNA koja nastaju djelovanjem reaktivnih oksigeniranih vrsta, kao što su superoksidi i hidroksil radikali (Leadon i sur., 1988). Njihovim djelovanjem dolazi do stvaranja jednolančanih i dvolančanih lomova, do kemijskog mijenjanja baza (Rhease i Freese, 1986; Rhease i

sur., 1986) i unakrsnog vezanja dva nukleofilna centra jednog polinukleotidnog lanca (engl. "intrastrand cross-linking"), odnosno, unakrsnog vezanja polinukleotidnih lanaca (engl. "interstrand crosslinking"). U skupinu najviše primjenjivanih i istraženih agenasa koji se metabolički aktiviraju u elektrofilne reaktante su benz[a]piren (B[a]P) te 4-Nitrokinolin-N-oksid(NQO).

2.2.1.2.1. Benz[a]piren (B[a]P)

Benz[a]piren je planarna nepolarna molekula koja se ugrađuje između vodikovih veza sparenih baza ds-DNA. Međutim B[a]P je nereaktivan spoj i on na taj način ne oštećuje DNA te se stoga smatra indirektnim premutagenom/prekancerogenom (Sims i sur., 1974; Jerina i Dalay, 1974, Gelboin, 1980). Aril hidrolaze, koje su sastavni dio sustava citokroma P-450, metaboliziraju policiličke aromatske ugljikovodike (PAH) pa tako i B[a]P do fenola i dihidrodiola. Oni su pak zajedno s pripadajućim esterima koji nastaju u daljnjoj fazi metabolizma (Levin i sur., 1977; Philips, 1983) topivi u vodi i mogu se lako izlučiti iz organizma. Međutim, elektrofilni benz[a]piren *anti* diol-epoksid koji je nastao takvim metabolizmom, a predstavlja jaki elektrofilni i ultimativni mutagen (Sims i sur., 1974; Jerina i Daily, 1974) i karcinogen 7 β ,8 α -diol-9 α ,10 α -epoksi-7,8,9,10-tetrahidrobenz[a]piren (BPDE), koji se najčešće veže za 2-amino grupu gvanina pri čemu nastaju adukti na molekuli DNA (Vähäkangas i Pelkonen, 1989), ali i izaziva i jednolančane lomove DNA *in vitro* (Gamper i sur., 1977, Kakefuda i Yammamoto, 1978), odnosno apurinska alkalno-labilna mjesta u DNA (Drinkwater i sur., 1980; Sage i Haseltine, 1984).

2.2.1.2.2. 4-Nitrokinolin-N-oksid (NQO)

Oštećenja inducirana 4-Nitrokinolin-N-oksidom, koji je kao i druga nitrozaminska zagađivala izravni i/ili neizravni mutagen/kancerogen kao i premutagen/prekancerogen (Petzold i Swenberg, 1978; Galiuegue-Ziotina i sur., 1985) često se zbog sličnog mehanizma popravka uspoređuju sa oštećenjima DNA koja izaziva UV-zračenje. Aktivnost NQO-a uzrokovana je interkalacijom kinolinske molekule između baznih parova DNA lanca, kovalentnog vezivanja kinolina s pojedinim bazama te formiranjem lomova lanaca DNA. Za stvaranje adukata DNA potrebna je metabolička aktivacija NQO-a (Soileau, 1987). Metabolička aktivacija NQO-a započinje nastankom proksimativnog karcinogena 4-hidroksi-aminokinolin-1-oksida nakon čega dolazi do njegove alkilacije posredstvom seril-AMP enzimskog kompleksa koji uvodi kinolinsku grupu u samu molekulu DNA. Utvrđeno je da se aktivira u bakterijske mutagene pomoću substaničnih frakcija probavne žlijezde dagnje *Mytilus edulis* (Garcia Martinez i sur., 1992). NQO kao izravan mutagen, NQO uzrokuje jednolančane lomove DNA u stanicama jetre štakora (Petzold i Swenberg, 1978; Galiuegue-Zoitina i sur., 1985) i u hemolimfi beskralješnjaka (Bihari i sur., 1991, 1992). Uočeni su i specifični adukti na C-8 i N-2 gvanina te N-6 adenina.

2.2.1.2.3. Bleomicin-Fe(II) kompleks

Samo aktivirana molekula bleomicina, tj. vezana za Fe(II) izaziva nastanak lomova DNA na specifičnim mjestima (D'Andrea i Haseltine, 1978; Takeshita i sur., 1978). Tako aktivirani bleomicin-Fe(II) kompleks stvaranjem slobodnih radikala uzrokuje nastanak jednolančanih i dvolančanih lomova DNA (Haidle, 1971; Coquerelle i sur., 1973) te nastanak velikog broja alkalno labilnih AP mjesta smještenih jedno blizu drugoga na jednolančanom DNA fragmentu (Iqbal i sur., 1976; Kohn i Grimek-Ewig 1976; Povirk i sur., 1977). Jednolančani lomovi nastaju napadom slobodnih radikala na C-4 položaj dezoksiriboze pri čemu dolazi do kidanja veze između C-3 i C-4 molekule šećera (Takeshita i sur., 1978). Dvolančani lomovi DNA nastali djelovanjem bleomicin-Fe(II) kompleksa pojavljuju se na svakih 10 jednolančanih

lomova za razliku od djelovanja Fe(II) koje uzrokuje nastanak nasumično raspoređenih jednolančanih lomova te nemjerljivi broj dvolančanih lomova na molekuli DNA (Povirk i sur 1977; Lloyd i sur., 1978).

2.2.2. Primarna oštećenja koja značajno utječu na cjelovitost DNA

Primarna oštećenja DNA čije postojanje značajno utječe na snižavanje cjelovitost molekule DNA svakako su alkalno-labilna mjesta te jednolančani i/ili dvolančani lomovi DNA.

2.2.2.1. Alkalno-labilna mjesta

Molekula DNA, je za razliku od RNA, neosjetljiva na alkalnu hidrolizu (Teebor i Brent, 1981), međutim u fiziološkim uvjetima ili djelovanjem različitih kemijskih i fizikalnih agenasa nastaju alkalno-labilna mjesta, u koja se ubrajaju apurinska/apirimidinska (AP) mjesta i mjesta nastajanja alkilfosfatnog triestera.

Depurinacija tj. gubitak purinskih baza u molekuli DNA, najčešće je spontano oštećenje DNA koje se javlja u fiziološkim uvjetima. Rezultat je cijepanja N-glikozilne veze između purina i šećera dezoksiriboze. Jedan od mogućih mehanizama nastajanja takvog oštećenja DNA je tijekom elektrofilnog napada alkilirajućih tvari na poziciji N⁷- guanina, N³-adenina ili O²-timina i citozina, pri čemu se uvodi pozitivni naboj u prsten baza, čime glikozilna veza postaje nestabilna, te dolazi do gubitka modificirane baze (Gamper i sur, 1977). Do formiranja AP mjesta može doći i nakon enzimskog napada uracil N-glikozilaze na glikozilnu vezu dezoksiuridinskog ostatka u DNA (Gupta i Sirover, 1981). Nastalo AP mjesto stabilno je na neutralnom pH, međutim, podložno je napadu AP specifičnih endonukleaza i stvaranju jednolančanih lomova (Teebor i Brent, 1981). U nekim stanicama, kao što su limfociti, alkalno-labilna oštećenja prerastaju u dvolančane lomove i slobodne nukleosomalne jedinice, dok u drugim stanicama, ostaju samo kao prvotna oštećenja (Tomei i sur., 1993).

Alkilfosfatni triesteri nastaju vezivanjem mutagena (npr. B[a]P diol-epoksida) na slobodnu -OH grupu fosfata u kosturu DNA (Gamper i sur., 1977). Ti su triesteri u DNA stabilni, jer dezoksiriboza ne posjeduje 2'-OH grupu koja može uvjetovati njihovu pregradnju i na taj način destabilizirati vezu fosfat-šećer. Međutim, OH grupa u β položaju vezanog mutagena, može katalizirati hidrolizu alkilfosfat triestera, te na taj način inducira stvaranje jednolančanih lomova u DNA. Oštećenja DNA kao što su alkalno-labilna mjesta, popravljaju se ekscizijskim popravkom.

2.2.2.2. Jednolančani lomovi DNA

Jednolančani lomovi su najčešća primarna oštećenja DNA (Henson, 1978), koja nastaju kao posljedica normalnog staničnog metabolizma, ali i izravnim djelovanjem genotoksičnih agenasa (Shugart, 1990). Oni nastaju i tijekom popravka DNA (Cleaver, 1984) kao i tijekom procesa programirane stanične smrti (Barry i Eastman, 1993). Jednolančani lomovi u DNA mogu nastati (Bradly i Sina, 1984): direktnim cijepanjem kostura DNA, hidrolizom fosfodieterske veze i enzimskim izrezivanjem fosfodieterske veze između fosfata i molekule dezoksiriboze, djelovanjem endonukleaza, lizosomalnih DNA hidrolaza, giraza i topoizomeraza. Direktno cijepanje kostura DNA najčešće je uzrokovano izlaganjem stanica γ -zračenju. Zračenjem se energija pohranjuje u stanicama što rezultira stvaranjem pobuđenih i ioniziranih molekula kao što su ionski ili slobodni radikali (hidroksilni radikali, radikali peroksida). Nuklearnu DNA od zračenja štite poliamini i histoni koji je obavijaju, te njena organizacija u više kromatinske strukture (Ljungman i Hanawalt, 1992). Međutim, većinom ta zaštita nije dovoljna, te nastaju različita oštećenja DNA, od oštećenja pojedinih baza DNA te stvaranja alkalno-labilnih mjesta do jednolančanih i dvolančanih lomova DNA. Tako npr. zračenje od 1.0 Gy rezultira stvaranjem 600-1000 jednolančanih lomova, odnosno 16-40 dvolančanih lomova u DNA (Ward, 1988). Mehanizam nastanka, odnosno pojedinosti niza reakcija koji vode do jednolančanih lomova, nisu još u potpunosti poznati. Popravak jednolančanih lomova koji su nastali zračenjem otežan je zbog nemogućnosti popravka jednostavnom ligacijom (Obe i sur.,

1992). Naime, nastali lomovi najčešće završavaju s fosfatnim grupama na 5'-kraju DNA, dok se ligaza najčešće veže za 3'-OH krajeve (Bopp i Hagen, 1970). Međutim, zračenjem dolazi čak i do gubitka fosfatnih grupa koje su ponekad i u potpunosti izgubljene, te dolazi do odvajanja fragmentiranih derivata šećera (Obe i sur., 1992). Ponekad dolazi i do gubitka čitavih baza, te mnogi jednolančani lomovi u tom slučaju predstavljaju nukleotidne rupe jednog lanca DNA (Obe i sur., 1992). Aktivacija većeg broja enzima potrebna je za uspješan popravak nastalog oštećenja, kao što je slučaj kod popravka izrezivanjem baza. Lomovi lanaca DNA produkt su i normalnog staničnog metabolizma gdje toplinska energija uzrokuje nastanak na tisuću abazičnih mjesta u stanici tijekom jednog dana te su normalno popravljani. Abazično mjesto predstavlja oštećenje koje može rezultirati lomom DNA lanca i nastankom privremenog diskontinuiteta sekundarne strukture. Ionizirajuće zračenje kao i slobodni radikali uzrokuju direktni nastanak lomova lanca, dok npr. UV-zračenje i neka genotoksična zagađivala uzrokuju nastanak produkata koji se popravljaju različitim mehanizmima popravka i tijekom kojih nastaju privremeni prekidi jednog od lanaca (Shugart i sur., 1992; Shugart, 1998).

Mehanizam nastanka dvolančanih lomova također nije u potpunosti poznat, te se ne zna da li nastaju prijenosom radikala s jednog na drugi lanac DNA (Siddiqi i Bothe, 1987) ili su posljedice direktnog napada radikala (Ward, 1988; Ward, 1990). Popravak dvolančanih lomova kompleksniji je od popravka jednolančanih lomova i zahtijeva rekombinacijski popravak.

2.2.3. Određivanje oštećenja DNA

Neke od metoda koje se primjenjuju za određivanje lomova DNA zasnivaju se na *in vivo* denaturacijskim uvjetima uz visoki pH i ionsku jakost gdje je odvajanje ss-DNA od DNA visoke cjelovitosti direktno proporcionalno broju jednolančanih lomova (Ryberg, 1975) i/ili abazičnih mjesta a postojeane abazičnih (AP) mjesta te jednolančanih i/ili dvolančanih lomova DNA kao i određivanje umrežanih struktura DNA s DNA i DNA s proteinima. Stoga su i razvijene tehnike određivanja količine takvih oštećenja DNA u alkalnim uvjetima kao što je denaturiranje DNA u alkalnim uvjetima (engl. "alkaline unwinding") (Ahnstrom i Erixon, 1973) te alkalno eluiranje (Kohn i Grimek-Ewig, 1973; Khon i sur., 1976, 1981; Khon, 1991).

Nadalje, za određivanje primarnih oštećenja DNA primjenjuju se tehnike centrifugiranja u alkalnom gradijentu saharoze (Dean i sur., 1966; McGrath i Williams, 1966; Lett, 1981), CsCl gradijent centrifugiranje DNA (McGrath i Williams, 1966), viskozoelastometrija (Parodi i sur., 1981; Brambila i sur., 1983) i DNA precipitacija (Olive, 1988), sedimentacija nukleotida (Cook i Brazell, 1976), elektronska mikroskopija preparata DNA (Zahn i sur., 1981; Clayton, 1981), elektroforeza DNA u agaroznim gelovima (Seawell i Ganesan 1981; Theodorakis i sur., 1994) te protočna tekućinska fluorimetrija (Rydberg, 1984). U novije vrijeme moguća je i uporaba specifičnih fluorokromatskih bojila koja se specifično vezuju za ds-DNA (Schröder i sur., 1999a, 1999b).

Upotreba tehnike centrifugiranja u alkalnom gradijentu saharoze može usljed visokog pH medija rezultirati povećanjem broja lomova DNA na tzv. AP mjestima, a kelatni agensi mogu djelovati kao oksidoredukcijska sredstva.. Uspješnost alkalnog filter eluiranja ovisno je izvoru DNA i mogućnosti njene deproteinizacije te je uz dugotrajnost izvedbe teško primjenjivo na veliki broj uzoraka. Alkalno denaturiranje i hidroksiapatitna kromatografija omogućuju analizu većeg broja uzoraka ali važan čimbenik u nastanku neželjenih lomova tijekom denaturacije je visoki pH te je nakon neutralizacije ultrazvukom spriječena njihova renaturacija. Nadalje, pri primjeni

"unwinding" tehnike neophodna je velika količina materijala, barem $1-2 \times 10^6$ stanica što je često nemoguće osigurati.

Pri elektroforezi DNA izolirane iz stanične jezgre, u agaroznom gelu pri alkalanim uvjetima (engl. "single cell gel electrophoresis assay - SCGE" ili "Comet" tehnika) (Ostling i Johanson, 1984; Singht i sur., 1988; Rydberg i Johanssen, 1988; McKelvey-Martin i sur., 1993) pri čemu obojani fragmenti DNA niske cjelovitosti migriraju u električnom polju drukčije od DNA visoke cjelovitosti u jezgri te se na osnovi razlike u migraciji i količini DNA u tzv. glavi i repu "komete" može odrediti količina lomova DNA (Mitchelsmore i Chipman, 1998a, 1998b; Steinert i sur., 1998; Wilson i sur., 1998). Međutim, određivanjem oštećenja DNA u pojedinoj stanici primjenom tzv. "comet" tehnike koja omogućavaju ispravnije procjenjivanje učinka genotoksina u svakoj pojedinoj stanici neke populacije, dobivaju se samo polukvantitativni rezultati, a metoda je dugotrajna te teško primjenjiva u mnogim vrstama stanica i tkiva.

Za određivanje kovalentno vezanih DNA adukata primjenjuje se "³²P postlabeling" tehnika (Miller, 1978; Gupta i sur., 1982), koja omogućava detekciju 1 adukta na 10^{10} normalnih nukleotida (Qu i sur., 1997), visokorazdjelna tekućinska kromatografija (Dunn i san, 1988), te imunološki testovi (Poireir i sur., 1982; Philips, 1990; Burgeot i sur., 1996).

2.3. Pregled dosadašnjih istraživanja genotoksičnog učinka zagađivala u morskom ekološkom sustavu s posebnim osvrtom na školjkaše

Dosadašnja istraživanja genotoksičnosti u morskom ekološkom sustavu kao dio cjelovitih biomonitoring studija, zajedno uz primjenu kemijsko analitičkih tehnika, sprovedena su na brojnim vrstama riba i morskih beskralješnjaka. Ona se danas sve više razvijaju s ciljem njihove primjenjivosti kao upotrebljivih pokazatelja dugoročnih ekotoksikoloških učinaka (Hose, 1991). Proučavajući učinke zagađivala moguće je sve bolje i detaljnije razumijeti uzroke i mehanizme koji do njih dovode, te na koncu predvidjeti moguće posljedice za više razine biološke organizacije. Istraživanja genotoksičnosti u morskom ekološkom sustavu u najvećoj mjeri obuhvaćaju školjkaše, sesilne organizme s velikom biofiltracijskom sposobnošću, ali i druge morske beskralješnjake, te ribe i morske ptice (Reish i sur., 1992). U daljnjem tekstu navedeni su primjeri i koncepti istraživanja genotoksičnosti u moru sa posebnim osvrtom na njihovu dosadašnju primjenu u Jadranu, te naročito primjenu školjkaša kao bioindikatorskih organizama.

2.3.1. Određivanje genotoksičnosti

Procjena učinka genotoksičnih zagađivala bila je u početku ograničena na primjenu općih testova toksičnosti i genotoksičnosti s različitim laboratorijskim test organizmima i njihovim populacijama u moru. Razvoj i primjena novih tehnologija u analitičkoj biokemiji i posebno molekularnoj biologiji potaknuli su izučavanje primarnih oštećenja DNA i razvoj genetske ekotoksikologije i primjene DNA markera u procjeni učinka genotoksičnih zagađivala. Pretpostavlja se da povećana učestalost mutacija u prirodnim populacijama, koje nastaju djelovanjem prirodnih genotoksičnih agenasa, ne predstavlja znatniji ekotoksikološki problem, međutim, povećanim unosom

zagađivala antropogenog porijekla u morski ekološki sustav, ona to postaje. Testovi toksičnosti daju samo podatak o kvalitativnim i kvantitativnim vrijednostima uočenih kemikalija, relativnoj toksičnosti specifičnih kemikalija, unosu i apsorpciji u organizam te akumulaciji kroz prehrambeni lanac pa je stoga ekstrapolacija na morski ekološki sustav otežana. Testovi genotoksičnosti baziraju se na reakciji mutagenih spojeva i molekule DNA. Alkilacije, interkalacije, unakrsno vezanje s DNA i fosfotriesterske forme koje pritom nastaju rezultiraju stvaranjem jednolančanih lomova, kemijskim promjenama baza i formiranjem adukata. U slučaju da se ta oštećenja DNA ne poprave, ona mogu izazvati daljnje tzv. sekundarne promjene na DNA. Praćenje genotoksičnosti u moru omogućeno je razvojem analitičkih metoda. Osim što nisu ekonomične, rezultati tih testova nisu pridonijeli upoznavanju djelovanja genotoksičnih tvari na organizme. To je omogućeno razvojem kratkotrajnih, rutinskih, ali i jeftinijih testova. Među njima najznačajniji su Amesov test, SOS-Chromotest i SOS-umu test. Amesov test je standardizirani test za otkrivanje potencijalnih kancerogena na osnovu njihove mutagenosti. Mjeri se broj povratnih mutacija koje izaziva mutageni spoj uz upotrebu posebno uzgojenih sojeva bakterije *Salmonella typhimurium* TA1535, TA100, TA1537, TA1538, TA98 (Ames i sur., 1973). Za razliku od Ames testa, SOS testovi ne detektiraju mutacije već indukciju SOS popravka uzrokovanog oštećenjem DNA molekule (Oda i sur., 1985; Quillardet i Hofnung, 1985; Bihari i sur., 1990a). Međutim, tim se putem može odrediti samo mutagenost nekog spoja, ali ne i stupanj oštećenja DNA koja će ti spojevi izazvati u određenom organizmu.

Prije više od 20 godina započelo se s proučavanjem sustava OMF u morskim beskralješnjacima (Bend i James, 1977; Bend i sur., 1978; Payne, 1977; Batel i sur., 1983) i ribama (Payne, 1976; Kurelec i sur., 1977; Stegeman, 1978; Narbone i Gallis, 1979; Narbone i sur., 1987; Stegeman i sur., 1988), te se mjerenje inducibilnosti tog sustava u jetri riba pokazalo pogodnim i za utvrđivanje prisustva PAH-ova u vodi (Payne i Pernose, 1975). Djelovanjem toga sustava nastaju genotoksični elektrofilni intermedijeri koji lako stupaju u reakcije s DNA. Aktivnost BPMO *in vitro* niže su u

morskih beskralješnjaka u odnosu na njihovu aktivnost u riba i sisavaca (Payne, 1977,1984; Bend i James, 1977; Lee, 1981; James i Little, 1984; Livingstone, 1985).

2.3.2. Određivanje oštećenja DNA kao molekularnih biomarkera

U zadnjih 25 godina razvijeno je mnoštvo metoda i tehnika određivanja oštećenja DNA te je njihova primjena u biomonitoringu učinka genotoksičnih zagađivala u morskih riba i beskralješnjaka veoma značajna. Za organizme, koji žive u uvjetima stalnog zagađenja, oštećenje DNA izmjereno u trenutku uzimanja uzorka predstavlja rezultantu dinamičkog stanja nastajanja oštećenja i njegovog popravka. U tom slučaju oštećenja DNA će odražavati stupanj zagađenja mora genotoksičnim tvarima. Procjena stupnja ugroženosti odabranih morskih organizama temelji se na istraživanju učestalosti primarnih oštećenja DNA nastalih djelovanjem genotoksičnih zagađivala i modulacije mehanizama oštećenja i popravka DNA kojima predhodi genotoksični stres. Određivanje strukturnih promjena DNA koje predstavljaju biomarkere izloženosti nije jednostavno. Genotoksična zagađivala najčešće su prisutna u miješavinama i to pretežito u vrlo niskim koncentracijama. Nakon njihovog dospijanja u organizam ona se metaboliziraju u manje ili netoksične produkte, rezultat čega je često vrlo nizak nivo izmjenjene tj. oštećene strukture DNA. Do danas su razvijene brojne metode koje svojom selektivnošću i osjetljivošću osiguravaju *in situ* izučavanje DNA oštećenja, te je uspjeh postojećih analiza biomonitoringa okoliša ovisan o primjeni i prilagodbi (optimalizaciji) suvremenih analitičkih tehnika molekularne biologije te analitičke biokemije i biofizike koje se primjenjuju u humanoj toksikologiji (toksikologiji sisavaca). Svaka od njih ima i svoja ograničenja, tako da može dovesti do neispravnog ili nepotpunog zaključivanja o stanju cjelovitosti DNA. Zato je vrlo bitno znati što se kojim metodom može izmjeriti; dakle kvaliteta tj. vrsta te kvantitet, odnosno brojnost specifičnih oštećenja DNA. Potrebno je odabrati prigodnu referentnu populaciju (ili čak dvije) koja nije izložena genotoksičnom stresu tj. za koju se zna da

je razina oštećenja DNA u normalnim uvjetima dovoljno niska da bi se kvalitativno/kvantitativno razlikovala od oštećenja DNA koja nastaju djelovanjem genotoksičnih agenasa.

O određivanju primarnih oštećenja DNA kao biomarkera izloženosti morskih organizama detaljno je pisano u radovima Shugarta (2000) i Steinarta (1999).

U zadnjih 15-ak godina "³²P postlabeling" tehnika primjenjuje se na različitim morskim životinjskim vrstama i na gotovo svim geografskim područjima (Dunn i sur., 1987; Kurelec i sur., 1989a, 1989b, 1990a, 1990b, 1992; Duun, 1991; Sole i sur, 1996; Venier i Canova, 1996; Canova i sur., 1998; Harvey i Parry, 1998a, 1998b; Akcha i sur., 2000a, 2000b, 2000c; Xu i sur., 1999).

Poznate su i neke druge vrste strukturnih oštećenja DNA u morskih beskralješnjaka i riba kao što su nastanak 8-hidroksideoksiguanozina (8-OH-dGuo) (Canova i sur. 1998; Ploch i sur 1999; Akcha i sur., 2000b, 2000c), te nastanak otvorene prstenaste strukture 2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidina (Fapy-Gua) (Malins i Haimanot, 1991).

Alkalno denaturiranje (engl. "alkaline unwinding") DNA primjenjuje se na brojnim morskim beskralješnjacima (Nacci i Jakim, 1989; Black i sur., 1996; Bresler i sur., 1999) i ribama (Ostling i Johanson, 1984; Olive i sur., 1990; Shugart, 1990, 1998; Accomando i sur., 1991; Viarengo i sur., 1991; Nacci i Nelson, 1992; Theodorakis i sur., 1992; Bresler i sur., 1999). S ciljem određivanja cjelovitosti DNA morske zvijezde *Asteria rubens* i iverka *Limanda limanda* kao bioindikatorskih organizma u Sjevernom moru primjenjuje se već dulji niz godina (Everats i sur., 1994; Everats i Sarkar, 1996; Everats, 1995,1997).

"Comet" tehnika jedna je od danas najprimjenjivijih metoda (Theodorakis i sur., 1992, 1994, 1997; Nacci i sur., 1996; Steinert, 1996; Steinert i sur., 1998; Wilson i sur., 1998; Taddei i sur., 2001) određivanja jednolančanih lomova i alkalno-labilnih mjesta DNA.

Primjena određivanja klastogenih oštećenja DNA u biomonitoringu i praćenju genotoksičnog učinka na morske organizme, odnosno procjeni njihove izloženosti genotoksičnim agensima, koja su posljedica primarnih oštećenja DNA i strukturnih poremećaja pri replikaciji DNA uključuje izučavanje različitih kromosomskih abnormalnosti (Savage, 1993; Dixon i Wilson, 2000; Jha i sur., 2000a, 2000b). U proučavanju strukturnih kromosomskih aberacija (insercija, delecija, translokacija i dr.) primjenjuju se brojne metode i tehnike npr.: analiza kromosoma u metafazi (Dixon i Clarke, 1982; Dixon i Favel, 1986; Jha i sur., 1996) te tehnika kromosomskog vezivanja (engl. "chromosome binding") (Dixon i McFadzen, 1987.). Osim strukturnih kromosomskih aberacija i sam broj (povećanje ili manjak) pojedine kopije kromosoma predstavlja krajnju točku klastogenog učinka, a do kojeg može doći uslijed oštećenja mikrotubula pri diobi stanice što se može odrediti direktnim brojanjem kromosoma (Dixon, 1982), mikroskopskom analizom anafaznog rastezanja (Dixon i sur., 1999) te upotrebom specifične DNA probe primjenom FISH tehnike. Određivanje klastogenih (kromosomskih) oštećenja DNA uključuje i proučavanje strukturnih kromosomskih aberacija (Prein i sur., 1978; Hoofman i Vink, 1981; Maddock i sur., 1986), zamjene sestrinskih kromatida (Taylor, 1957; Al Sabti i Kurelec, 1985; Van der Gag i Van der Kerkhoff, 1985; Maddock i sur., 1986; Jha i sur., 1996, 2000a, 2000b) te primjenu mikronukleus testa (Heddle, 1973; Schmid, 1977; Hoofman i De Raat, 1982; Das i Nanda 1986; Jayalet 1986; Brunetti i sur., 1988).

Jednolančani lomovi DNA u jetri iverka *Limanda limanda* tijekom godišnjeg ciklusa u Sjevernom i Baltičkom moru, određivani brzom mikrometodom (Fast Micromethod[®]), pokazuju njihovo povećanje tijekom ljetnih mjeseci te su osim s aktualnom temperaturom mora u korelaciji i sa sadržajem lipida u tkivu jetre (Lacorn i sur., 2001).

Usljed smanjenja genetičke varijabilnosti i biološke raznolikosti prirodnih populacija pa čak i isčeznuća pojedinih vrsta zabrinutost za učinke zagađivala na populacijskoj razini dostigla je svoj vrhunac (Vitousek i sur., 1997). Stoga velika važnost primjene genetskih markera leži u proučavanju odnosa između specifičnih zagađivala prisutnih u okolišu i genetskog varijabiliteta. Proučavanje kemijski ili fizikalno induciranih promjena genskog materijala u prirodi (Theodorakis i sur., 1997; Theodorakis i Shugart, 1997; Theodorakis i sur., 1998, 1999, 2001), bilo da se radi o direktnim promjenama na genima, promjenama u genskoj ekspresiji ili selektivnom djelovanju zagađivala na frekvenciju gena, uključuje izučavanje direktnih oštećenja DNA te promjene njene funkcionalne aktivnosti izazvane genotoksinima (Anderson i Wild, 1994; Anderson i sur., 1994). Genetička ekotoksikologija objedinjava proučavanje učinaka genotoksičnih zagađivala na strukturu i funkciju DNA s učincima mjerljivim na razini populacijske genetike (Theodorakis i sur., 2001). Genotoksična zagađivala mogu uzrokovati promjene genetičke varijabilnosti jedinki usljed nastanka novih mutacija ili usljed nastanka tzv. populacijskih uskih grla (Bickham i sur., 2000). Glavni cilj genetičke ekotoksikologije je procjena, predviđanje i prevencija fizikalno-kemijski induciranih značajnih genetskih i epigenetskih oštećenja u živom svijetu. Značajno genetičko oštećenje na populacijskoj razini podrazumijeva promjenu genske strukture i/ili funkcije u jedinkama koja ultimativno rezultira smanjenjem populacijske brojnosti i/ili rasprostranjenosti odnosno ireverzibilnim promjenama u genskoj varijabilnosti cjelovitog genoma. Na razini ekološkog sustava značajna genetička oštećenja su ona koja rezultiraju poremećajem odnosno gubitkom funkcionalne biološke raznolikosti u ekološkom sustavu. U zadnjih 15-ak godina, zahvaljujući

razvoju sekvencioniranja DNA i PCR tehnologije, naročito se razvija primjena različitih sistema genetskih markera prisustva i učinka zagađivala u okolišu (Burton, 1996; D'Surney i sur., 2001) kao što su: mtDNA sekvenca, PCR-RFLP (engl. "PCR-Restriction Fragment Length Polymorphisms"), RAPD (engl. "Random Amplified Polymorphic DNA"), SSR (engl. "Simple Sequence Repeats") mini i mikrosatelitske DNA te AFLP metoda (engl. Amplified Fragment Length Polymorphisms).

Za samu procjenu izloženosti morskih organizama raznim onečišćenjima u moru potrebno je odabrati metodu koja će zbog velikog broja uzoraka i trajnog sezonskog ispitivanja biti prihvatljiva za primjenu kako sa tehničkog tako i ekonomskog stajališta, te isto tako odabrati organizam i organ proučavanja. Ovaj rad opisuje razvoj, prilagodbu i evaluaciju nove, relativno jednostavne i brze mikrometode (Fast Micromethod[®]) određivanja i praćenja oštećenja DNA, odnosno količine DNA visoke cjelovitosti (ds-DNA); dakle one frakcije DNA koja u uvjetima visokog pH i ionske jakosti relativno postojanija i otpornija na denaturaciju i narušavanje dvolančane molekularne (sekundarna) strukture što ukazuje na manji broj prisutnih primarnih oštećenja same DNA. Kao indikatorski organizam odabrana je dagnja *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) koja odražava ne samo prisutnost specifičnih zagađivala ili njihove mješavine nego i relativnu razinu onečišćenja te njihovu promjenjivost. Odabrani organizam lako je dostupan, široko rasprostranjen te obitava i na mjestima koja su pod direktnim utjecajem urbanog i industrijskog zagađenja.

2.3.2.1. Brza mikrometoda (Fast Micromethod[®])

Dosad opisane tehnike određivanja primarnih oštećenja DNA ne zadovoljavaju u potpunosti potrebe brzih i efikasnih biomonitornih studija. Stoga je uvedena nova analitička tehnika tzv. brza mikrometoda (Fast Micromethod[®]) određivanja oštećenja DNA (Müller i sur., 1997; Batel i sur. 1999). U tom smislu metoda je najprije razvijena na sustavu kultura stanica i tkiva glodavaca, zatim limfocitima i kulturama humanih stanica te konačno prilagođena za upotrebu na stanicama i homogenatima tkiva

morskih beskralješnjaka, točnije homogenatima škrge dagnje *Mytilus galloprovincialis* kao bioindikatorskog organizma. Metoda se zasniva na selektivnoj sposobnosti fluokromatskog pigmenta (PicoGreen[®], Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, SAD) da se specifično veže na dvostruku uzvojniju DNA te pritom fluorescira, dok je njegov afinitet u alkalnim uvjetima za ss-DNA, RNA i proteine bitno snižen. Stanice sisavaca ili homogenata tkiva se najprije liziraju pri čemu se DNA oslobađa staničnih proteina, membrana i RNA, te nakon liziranja ostaje u nativnom, dvolančanom obliku a istovremeno dolazi do ugrađivanja specifičnog fluorokromatskog bojila (PicoGreen[®]-a) u ds-DNA i do nastanka njihovog kompleksa. Nakon toga slijedi alkalna denaturacija ds-DNA tj. dolazi do odvajanja lanaca molekule DNA i smanjenja tj opadanja intenziteta fluorescencije (ekscitacija 485 nm / emisija 520 nm) kompleksa ds-DNA-PicoGreen[®], koja ovisi o prisutnim primarnim oštećenjima molekule DNA. Mjerenjem promjene intenziteta fluorescencije u relativno kratkom vremenskom intervalu (30-45 min) dobiva se informacija o kinetici “odmotavanja ds-DNA” i promjeni brzine smanjenja količine (nestajanja) DNA velike cjelovitosti u ovisnosti o vremenu pri datim denaturacijskim uvjetima (pH, ionska jakost i temperatura). Na taj je način omogućeno direktno praćenje DNA denaturacije u alkalnoj sredini, tj. praćenje promjena količine kompleksa pigment-ds- DNA tijekom vremena u lizatu kulture stanica ili homogenata tkiva bez predhodne izolacije i pročišćavanja same DNA. Time se izbjegava dodatna manipulacija uzorcima i oštećenje DNA te povećava osjetljivost same metode. Ovisno o cjelovitosti DNA tj. prisustva oštećenja (jednolančani i dvolančani lomovi, AP mjesta, umrežavanje) i fizikalnim uvjetima mikrookoline (pH, ionska jakost, temperatura) dolazi do pucanja vodikovih veza između baza DNA tj. do narušavanja strukture dvostruke uzvojnice pri čemu se snižava i fluorescencija uzorka koja se može pratiti u dovoljno širokom vremenskom intervalu. Kontrolirana brzina odvajanja DNA lanaca u eksperimentalnim uvjetima pH i temperature ovisi o samoj duljini ds-DNA ali i o prisutnim primarnim oštećenjima, tako da je kod kraćih molekula ds-DNA i onih sa većom frekvencijom primarnih oštećenja odvajanje lanaca u alkalnim uvjetima ubrzano te se takvo relativno povećanje brzine odvajanja lanaca

DNA u odnosu na referentni uzorak može uzeti kao mjera cjelovitosti DNA tj. prisutnih primarnih oštećenja kao što su jednolančani lomovi i alkalno-labilna mjesta. Različite vrste oštećenja DNA daju različite denaturacijske profile, s obzirom na brzinu denaturacije ds-DNA. Iz denaturacijskih krivulja, karakterističnih za pojedina oštećenja, ovom je metodom moguće određivanje jednolančanih ali i dvolančanih lomova DNA kao i alkalno labilnih mjesta te unakrsnog vezivanja DNA s DNA kao i DNA i proteina. Kinetički profili tj. dijagrami fluorescencije u ovisnosti o vremenu uspoređuju se s fluorogramskom krivuljom referentnog uzorka za kojeg se predpostavlja postojanje relativno malog broja primarnih oštećenja DNA tj prisustvo DNA visoke cjelovitosti.

Ovom metodom utvrđuje se cjelovitost DNA, odnosno primarna oštećenja DNA, koja u alkalnim uvjetima pogoduju bržem “odmotavanju” DNA molekule. Metoda je veoma brza i jednostavna za izvedbu, te uz uporabu mikroploča omogućuje obradu većeg broja uzoraka istovremeno.

2.3.3. Školjkaši kao indikatorski organizmi

Među morskim beskralješnjacima, upravo su se školjkaši pokazali kao pogodni biološki indikatorski organizmi za praćenje zagađenja morskog ekološkog sustava (Martin i Sewerd, 1984; Widows i sur., 1988; Viarengo i Canesi, 1991) jer ukazuju ne samo na prisutnost ili odsutnost specifičnih zagađivala, već i na razinu zagađenja s periodičnim fluktuacijama. Kao modelni, test i bioindikatorski organizam korištena je dagnja *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). Dagnje su poznati biološki indikatorski organizmi onečišćenja mora (Gosling, 1992), a široke su ekološke i geografske rasprostranjenosti. To su sesilni (sjedilački), eurihalini i intertidijalni organizmi, a naseljavaju i čista i zagađena područja. Prilagođavaju se različitim ekološkim parametrima (temperatura, količina kisika, mogućnost prehrane), te su stoga tolerantni raznim ekološkim promjenama (Bayne, 1976). Školjkaši su relativno stabilna

i pogodna populacija za uzorkovanje većeg broja jedinki s neke mikrolokacije. Detaljno su izučene njihove fiziološke, histološke i biokemijske karakteristike. Mogu se prenositi i čuvati u kavezima čak i na mjestima na kojima ih uobičajeno nema (tzv. engl. "mussel-watch"). Hrane se suspendiranim česticama i neselektivno filtriraju velike količine vode (više od 4 l/h), te na taj način koncentriraju različite kemijske tvari u svojim tkivima, npr. teške metale Hg, Cu, Zn (Steinert i sur., 1998), odnosno pokazuju veću bioakumulacijsku sposobnost od drugih organizama (Goldberg 1978). Koncentracija kemikalija može u tkivima dagnje dostići i do 1000 puta veću vrijednost nego u morskoj vodi. Zbog takve sposobnosti škрге su kao promatrani organ koji je kontinuirano direktno izložen djelovanju zagađivala izabrane kao modelno tkivo. Dagnje su komercijalno značajna morska hrana i mjerenje njihovog onečišćenja od širokog je javnog interesa.

Školjkaši se smatraju pogodnim organizmima za praćenje obalnog zagađenja u odnosu na ribe i rakove, jer posjeduju nisku razinu aktivnosti enzimskog sustava (sustav oksidaza miješanih funkcija; OMF) te slabo metaboliziraju organska zagađivala kao što su PAH-ovi i PCB-i (Viarengo i Canesi, 1991; Porte i Albaiges, 1994; Kramer, 1994). Jedan od načina na koji školjkaši odstranjuju zagađivala iz tijela je za vrijeme perioda mriještenja (Fossato i Canzonier, 1976; Porte i Albaiges, 1994). Tada ispuštaju gamete koje su bogate lipidima. Međutim akumuliranjem zagađivala u organizmu može doći i do njihovog vezanja na makromolekule (Livingstone, 1991, 1992).

Do danas su na dagnjama razvijene brojne metode i tehnike praćenja molekularnih i staničnih pokazatelja stresa: praćenje potrošnje kisika (Widdows i Donkin, 1991; Snoeij i sur., 1987, Widdows i sur., 1989), promjene na trepetiljkama škrga, koje mogu biti uzrokovane otrovima dinoflagelata, Cu i TBT (Widdows i sur., 1979; Howelli sur., 1984; Snoeij i sur. 1987), mjerenje promjena u strukturi i funkciji membrana (Widdows i sur., 1987), praćenje stvaranja upalnog efekta uslijed izlaganja teškim metalima, nafti i N-nitrozo spojevima (Rasmussen, 1982; Sunila, 1988), indukcija metabolizirajućih enzima ksenobiotika faze I i II (Michel i sur., 1993) te praćenje genotoksičnih promjena u hemolimfi dagnji (Shugart, 1990; Bihari i sur.,

1990b, 1990c; Steinert, 1996).

Praćenje genotoksičnosti u dagnjama, do danas obuhvaća brojna istraživanja. U tkivu dagnje *Mytilus edulis* kao i u ostalim školjkašima otkriveni su mutageni spojevi, koji odgovaraju zagađenju određenih lokacija i sezoni (Moore i sur., 1989). Novija istraživanja su pokazala da dagnje *Mytilus edulis* u različitoj mjeri bioakumuliraju PAH-ove. Uspoređivanjem koncentracija PAH-ova u sedimentu s njihovom bioakumulacijom u tkivima dagnji i sa oštećenjem DNA (jednolančanim lomovima) hemocita dagnji mjerenim "Comet" testom, autori su zaključili da oštećenja DNA koja, nastaju odgovaraju zagađenju lokacija (Steinert i sur., 1998).

Probavne žlijezde školjkaša *Mytilus edulis*, *Mercenaria mercenaria* i *Crassostrea virginica* inkubacijama *in vitro* stvaraju ultimativni kancerogen BPDE (benz[a]piren-7,8-diol-9,10-epoksid) (Anderson, 1985; Stegeman, 1985), dok u Amesovom bakterijskom testu B[a]P ili 3-metilholantren ne pokazuju, odnosno minimalno pokazuju mutagenu aktivaciju (Anderson i Döös, 1983; Britvić i Kurelec, 1986; Marsh i sur., 1992). Biotransformacija mutagena BPDE uspoređena je s rezultatima dobivenim ³²P postlabelling" analizom adukata DNA. Inkubacijom homogenata probavne žlijezde dagnje *Mytilus galloprovincialis* s B[a]P zabilježena je slaba mrlja adukata (1 adukt na 1-4 x 10⁹ nukleotida) (Kurelec i sur., 1988), dok su za aromatske amine (aminoantracen, aminofluoren, acetil aminofluoren, N-hidroksi-2-acetil aminofluoren, aminobifenil i 4-amino-trans-stilben) koji oksidiraju u mutagene produkte (Anderson i Döös, 1983; Britvić i Kurelec, 1986; Kurelec i sur., 1985; Marsh i sur., 1992) zabilježeni adukti nastali aktivnošću mikrosomalne flavin-sadržavajuće monooksigenaze (Kurelec i sur., 1985). Tako npr. inkubacijom s AF, homogenati probavne žlijezde dagnje *M. galloprovincialis*, pokazuju jedan veći i jedan manji DNA adukt na 1-4 x 10⁸ nukleotida (Kurelec i sur., 1988). Inkubacijom subcelularne frakcije probavne žlijezde dagnje *Mytilus edulis*, nitroaromati, 4-nitrokinolin N-oksid (Garcia Martinez i sur., 1992) i 1-nitropiren (Marsh i sur., 1992) aktiviraju se u bakterijske mutagene. U juvenilnim dagnjama sakupljenim u neposrednoj blizini ispusta otpadnih voda rafinerije nafta uočeni su specifični DNA adukti (Kurelec i sur., 1990a, 1990b).

Formiranje specifičnih DNA adukata u škrgama dagnji *Mytilus galloprovincialis* uočeno je nakon njihovog izlaganja u vodi s različitim koncentracijama B[a]P tijekom 24 i 48 sati (Venier i Canova, 1996) ali i u probavnoj žlijezdi nakon hranjenja dagnji hranom kontaminiranom B[a]P tijekom 28 dana (Akcha i sur., 2000a, 2000b, 2000c).

Oštećenja DNA, kao krajnje točke djelovanja mutagenih spojeva, također su korištena za proučavanje mehanizama ksenobiotske aktivacije. Metodom alkalne elucije proučeno je djelovanje B[a]P i NQO, te je utvrđeno da potiču stvaranje alkalno-labilnih mjesta i jednolančanih lomova DNA u hemolimfi dagnje *Mytilus galloprovincialis*. Nastanak takvih oštećenja u DNA hemolimfe dagnje može se objasniti utjecajem slobodnih radikala nastalih sporom metaboličkom oksidacijom B[a]P (Bihari i sur., 1990b, 1990c, 1992; Batel i sur., 1993). Praćenjem primarnih oštećenja DNA metodom alkalnog filter eluiranja u stanicama škrge dagnji uočena je razlika u cjelovitosti DNA kod dagnji sa PAH-ovima onečišćenog područja Ligurijskog mora (Bolognesi i sur 1996), kao i povećanje količine jednolančanih lomova DNA u stanicama hemolimfe i škrge dagnji nakon njihovog izlaganja HgCl_2 i CuCl_2 (Bolognesi i sur., 1999).

Primjenom SCGE tehnike praćena su oštećenja DNA škrge dagnji *Mytilus galloprovincialis* sakupljenih u laguni Ortobelo (Tirensko more). Dobiveni rezultati ukazuju na značajne razlike u cjelovitosti DNA (povećan broj oštećenja DNA) škrge dagnji sakupljenih unutar lagune u odnosu na kontrolni uzorak kao i njihovu korelaciju s sniženom razinom indukcije sustava antioksidansa (Frenzilli i sur., 2001). S ciljem izučavanja učinka genotoksičnih agenasa u morskom ekološkom sustavu započelo se u Danskoj s praćenjem oštećenja DNA stanica škrge i hemolimfe dagnji *Mytilus edulis* navedenom metodom (Rank, 1999).

Posljedica bioaktivacije premutagena, ciklofosfamida, koji se aktivira pomoću citokroma P-450 je povećanje učestalosti zamjena sestrinskih kromatida u stadiju ličinke i zrelog organizma dagnje *Mytilus edulis* (Dixon i sur., 1985), za razliku od dagnje *Mytilus galloprovincialis* za koju nije zabilježena bioaktivacija tog premutagena (Galli i sur., 1988). Iako izlaganjem jaja dagnje *Mytilus galloprovincialis* (Brunetti i

sur., 1986) kao i ličinki dagnje *Mytilus edulis* (Dixon i Prosser, 1986) nitrilooctenoj kiselini i TBT oksidu nije u ranijim proučavanjima uočeno povećanja učestalosti zamjena sestrinskih kromatida, Jha i sur. (2000b) su kasnije opisali indukciju kromosomskih aberacija i zamjene sestrinskih kromatida u 12 sati starim embrijima dagnje *Mytilus edulis* nakon njihovog izlaganja TBT oksidu.

Indukcija kromosomskih aberacija utvrđena je u škrgama dagnji *Mytilus galloprovincialis* nakon njihove izloženosti vodi zagađenoj B[a]P (Al Sabti i Kurelec, 1985), a nastanak mikronukleusa nakon izlaganja dagnji mitomicinu C (Majone i sur., 1987).

Djelovanje genotoksičnih agenasa u dagnjama, praćeno je pojavom mikronukleusa u laboratorijskim i u uvjetima *in situ* (Brunetti i sur., 1988; Scarpato i sur., 1990). Učestalost mikronukleusa praćena je i u stanicama škrga prirodnih populacija dagnji *Mytilus galloprovincialis* (*in situ*) u venecijanskoj laguni (Brunetti i sur., 1988) te u hemocitima dagnji *Mytilus edulis* (Wriesberg, 1992). U prirodnoj populaciji dagnji *Mytilus galloprovincialis* sa zagađenog područja utvrđena je učestalost pojave mikronukleusa i do četiri puta veća nego u referentne populacije (Bolognesi i sur., 1996). Ti se rezultati podudaraju s rezultatima dobivenim inkubacijom dagnji s poznatim kancerogenima u laboratorijskim uvjetima (Scarpato, 1990b).

Prvotno nije bila utvrđena izravna veza zagađenja okoliša s razvojem neoplastičnih promjena u hemocitima dagnje *Mytilus edulis* (Mix, 1986). Međutim DNA izolirana iz tumora gonada školjki *Mya arenaria* i *Marcenaria spp.* sa herbicidima opterećenog područja sposobna je transformirati NIH3T3 stanice u kulturi te izazvati nastanak tumora u laboratorijskih miševa, što ukazuje na postojeću aktivaciju onkogeni u školjkama (Van Benden, 1994).

Citofluorometrijskim analizama je utvrđeno da embriji dagnje *Mytilus edulis* iz zagađenog područja pokazuju 25 % veću aneuploidiju (smanjenje broja kromosoma) u odnosu na embrija školjke s čistog područja, koje pokazuju 8 % aneuploidije (Dixon, 1982). Kao mogući sustav procjene popravka DNA predložena je i aktivnost DNA

polimeraze u izoliranim nukleusima probavne žlijezde dagnji (Accomando i sur., 1988).

Značajno povećanje količine primarnih oštećenja (lomova) DNA u škrgama kao i smanjena sposobnost neutralizacije peroksidnih radikala ($\text{ROO}\cdot$, $\cdot\text{OH}$) i peroksinitrita (HOONO) u probavnoj žlijezdi dagnji *Mytilus galloprovincialis* ukazala je na sudjelovanje reaktivnih spojeva kisika u modulaciji oštećenja DNA (Frenzilli i sur., 2001).

2.3.4. Pregled istraživanja genotoksičnosti u Jadranu

Dosadašnja kemijsko analitička istraživanja genotoksičnih zagađivala te primjena biomonitoringa (izloženosti i učinka) genotoksičnih zagađivala u Jadranskom moru nisu obimna. Picer je (2000) objavio revijalni rad o prisustvu PCB i DDT u jadranskoj morskoj vodi, zraku, sedimentu te nekim biljnim i životinjskim vrstama te ih usporedio s analitičkim podacima drugih autora za područje Jadrana i Mediterana. Neka od najznačajnijih istraživanja obavljena su u sjevernom Jadranu (venecijanska laguna i rovinjsko priobalje). Jedno od potonjih je i Linski kanal, koje se nalazi 9 km sjeverno uzduž obale od Rovinja prema Vrsaru, a iskorištava se kao uzgajalište kamenica, dagnji i riba (UNEP, 1988).

Utjecaj zagađivala na organizme rovinjskog priobalja utvrđen je degradacijom životnih zajednica što podrazumjeva nestanak vodećih i zamjenu vrsta izvorne zajednice tolerantnijim vrstama (Zavodnik, 1977). Stupanj zagađenja rovinjskog priobalja utvrđen je i mjerenjem toksičnosti sedimenta i vode (Bihari i sur., 1989), mjerenjem aktivnosti enzima benz[a]piren-monooksigenaze (BPMO) u jetri riba (Kurelec i sur., 1977; 1979), indukcije potencijala aktivacije potencijalno mutagenih spojeva u mutagene produkte pomoću postmitohondrijske frakcije jetre riba u SOS/*umu* testu (Bihari i sur., 1990a; Hamer i sur., 1997), određivanjem jednolančanih i dvolančanih lomova metodom odmotavanja DNA na hidroksiapatitu (Herbert i Zahn, 1989, 1990) i metodom alkalnog filtrar eluiranja (Bihari i sur., 1990b, 1990c, 1992; Vukmirović i sur., 1994), "³²P tehnikom" određivanja DNA adukata (Kurelec i sur., 1990a, 1990b), mjerenjem učestalosti kromosomskih aberacija (Al-Sabti i Kurelec, 1985) te Amesovim testom uz upotrebu ekvivalenata aktivnosti B[a]P (Zahn i sur., 1982) kao i tzv. "microtox" testom opće toksičnosti sedimenta i vode (Bihari i sur., 1989). Sa zagađenih lokacija (ispust "Tvornice duhana Rovinj" i ispred tvornice za preradu ribe "Mirna") utvrđene su povećane aktivnosti BPMO u jetri ribe babice *Blennius pavo* (Kurelec i sur., 1977), odnosno, u jetri cipla *Mugil auratus* (Kurelec i sur., 1979). Potencijal aktivacije kancerogena aflatoksina b₁ u SOS/*umu*-testu postmitohondrijskom frakcijom jetre (S9) ribe cipla *Mugil auratus* koje su uhvaćene ispred ispusta "Mirne" ukazuje na povećano opterećenje ksenobioticima u odnosu na referentne ribe iz Limskog kanala (Bihari i sur., 1990a). DNA adukti nazočni su kako u dagnji iz Limskog kanala tako i u dagnji sa ostalih lokacija, što je uputilo autore na zaključak da njihovo pojavljivanje ne ovisi o zagađenju (Kurelec i sur., 1990a). Jednolančani i dvolančani lomovi DNA hemolimfe prirodne populacije dagnji *Mytilus galloprovincialis*, s područja rovinjskog priobalja, pokazala su veću učestalost oštećenja DNA u područjima pod utjecajem urbanog i industrijskog otpada u odnosu na dagnje iz Limskog kanala (Herbert i Zahn, 1989; Vukmirović 1994). U dagnjama s područja Limskog kanala izmjerena je najniža učestalost kromosomskih aberacija (Al Sabti i Kurelec, 1985). Bihari i sur. (1990b, 1990c, 1992) su uz primjenu metode

alkalnog filter eluiranja testirali *in vivo* učinak NQO-a i B[a]P-a na DNA hemocita rakovice i dagnje. Isti autori ustanovili su inducibilnost AP mjesta i jednolančanih lomova u jetri gambuzije *Gambusia affinis* kao i u hemolimfi rakovice *Maya crispata* i dagnje *Mytilus galloprovincialis*. Praćenjem primarnih oštećenja DNA metodom alkalnog filter eluiranja u hemolimfi dagnji može se prosuditi o njihovoj izloženosti genotoksičnim agensima i u prirodnoj populaciji (Vukmirović i sur., 1994; Batel i sur., 1997). Uočena je razlika u cjelovitosti DNA tj. uočen je različit stupanj oštećenja DNA što je posljedica djelovanje smjese zagađivala iz industrijskih i urbanih otpadnih voda. Zapažene su statistički značajne razlike u oštećenjima DNA u hemolimfi dagnji s lokacija koje su pod utjecajem industrijskog i urbanog zagađenja u odnosu na DNA populacije dagnji s područja, koje nije opterećeno otpadnim vodama npr. u dagnjama iz Limskog kanala.

Na opterećenost pojedinih područja genotoksičnim zagađivalima ukazuje i povećana aktivnost enzimskog sustava oksidaza miješanih funkcija (etoksirezorufin-O-deetilaze) u jetri ribe pirke *Serranus scriba*. Prisustvo genotoksičnih agenasa izmjereno je pomoću SOS/*umu*-testa u uzorcima vode iz rovinjske luke i u otpadnoj vodi "Tvornice Duhana Rovinj", koja je prethodno koncentrirana pročišćenim diklorometanom i amberlitom XAD-7 (Hamer i sur., 1997). Ekstrakti morske vode uzete ispred "Tvornice Duhana Rovinj", iz rovinjske luke i ispred Tvornice za preradu ribe "Mirna" potiskuju aktivnost citokroma P450 1A i/ili inhibiraju EROD aktivnost u homogenatima jetre lubina *Dicentrarchus labrax* (Jakšić i sur., 1998).

Zbog velikog dotoka slatke vode rijeke Po i unosa velike količine organskog i anorganskog materijala venecijanska se laguna pokazala značajnim područjem za istraživanje učinka zagađivala na morski ekološki sustav. Utjecaj organskih zagađivala na indukciju enzimskog detoksikacijskog sustava (P4501A, EROD, superoksid dismutaze, NADPH citokrom c reduktaza, GSH) u probavnoj žlijezdi dagnji *Mytilus galloprovincialis* i ribe *Zosterisessor ophiocephalus* sa tog područja opisali su Livingstone i sur. (1995) te naznačili i sugerirali primjenu CYP1A kao biomarkera izloženosti riba organskom onečišćenju. Međutim, Solé i sur. (2000) su uočili da usljed

izloženosti organskim zagađivačima ne dolazi do povećanja razine ukupne količine CYP ili CYP 1A immunosupresivnih proteina u prirodnoj populaciji dagnji *Mytilus galloprovincialis* sakupljenih s područja venecijanske lagune, ali je primjećena povećana aktivnost benz[a]piren hidroksilaze u uzorcima prikupljenim unutar lagune u odnosu na referentnu lokaciju.

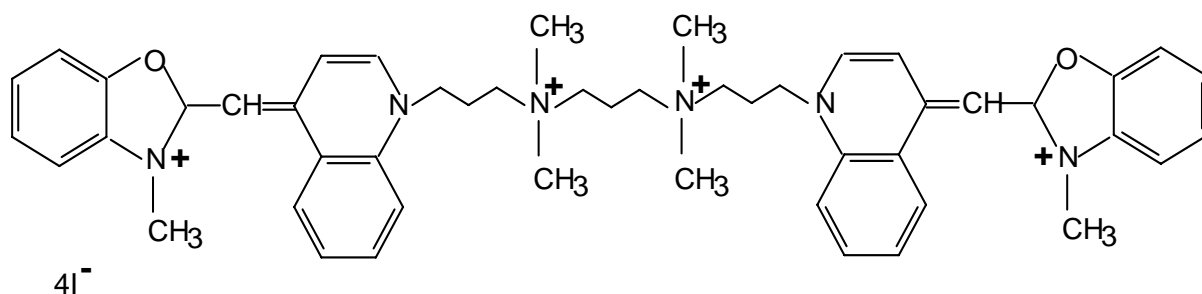
3. MATERIJALI I METODE

3.1. Kemikalije i otopine

Sve upotrebljavane kemikalije su analitičke čistoće ili molekularno biološke čistoće i to: B[a]P (B-1760, benz[a]piren), DMSO (D-5879, dimetilsulfoksid), EDTA (E-5134; etilendiaminotetraoctena kiselina), DNA teleće štitnjače (D-4764), DTT (D-5545, ditiotreitrol), $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (F-7002, željezo sulfat heptahidrat), 2-merkaptoetanol (M-6250, $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$), natrij hidroksid (S-8045, NaOH), NQO (N-8141, 4-nitrokinolin-N-oksidi), Tripsin (T-1426), Tris-HCl (T-7149; tris(hidroksmetil)aminometan hidroklorid), SDS (L-4390; natrij dodecil sulfat) te urea (U-5378) (Sigma, St. Louis, MO, SAD); bleomicin sulfat (Mack, Jllertissen, Njemačka); F-12K medij, MEM-Hanks medij, i RPMI-1640 medij (Seromed, Bichrom KG, Berlin, Njemačka); fluorokromatska bojila YOYO[®]-1 jodid (491/509) (Y-3601) i PicoGreen[®] (P-7581) (Molecular Probes, Eugene, OR, SAD); a kao standardne pH otopine za kalibraciju upotrebljavani su fosfatni pufer pH 7.01 (16259) i fosfat-NaOH pufer pH 12.00 (16257) (Kemika, Zagreb, Hrvatska). Tekući dušik proizveden je u Brodograđevnoj Industriji Uljanik (UTP, Pula, Hrvatska).

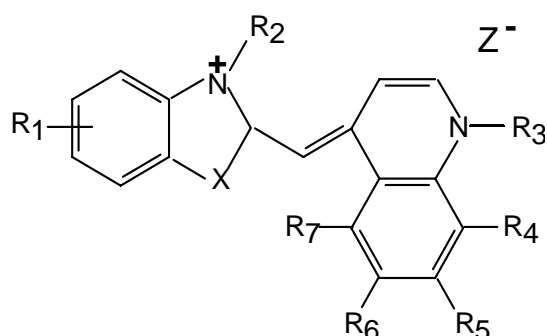
Fluorokromatska bojila (Molecular Probes Inc., Oregon, USA) koja su upotrebljavana u radu zbog određivanja količine DNA su nesimetrični cijaninski dimeri: PicoGreen[®] (502/523) (kemijska empirijska formula i podatak o Mr su nedostupni) i YOYO[®]-1 jodid (491/509) ($\text{C}_{49}\text{H}_{58}\text{I}_4\text{N}_6\text{O}_2$; Mr 1270.65) koji pokazuju visoku molarnu apsorpciju i ekstinkcijske koeficijente $>50000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ pri valnim duljinama vidljivog djela elektromagnetskog spektra. Imaju vrlo velike afinitete vezanja za nukleinske kiseline te pokazuju vrlo oštre emisijske signale i nisku razinu bazične fluorescencije kada nisu vezani za nukleinske kiseline, i čak 400 (YOYO[®]-1 jodid) ili >1000 (PicoGreen[®]) puta veću fluorescenciju u prisustvu nukleinskih kiselina. Vrlo su postojani i stabilni pri reakciji s nukleinskim kiselinama pri različitim pH vrijednostima i ionskoj jakosti u okolini te nisu podložni utjecaju proteina, natrij-dodecil sulfata, uree i dr., što sve zajedno rezultira velikom osjetljivošću i pri

kvalitativnom i kvantitativnom određivanju nukleinskih kiselina u širokom rasponu koncentracija (Rye i sur. 1993., Cosa i sur. 2000, 2001; Haugland 1996). YOYO[®]-1 jodid je simetrični cijaninski dimer sa 4 pozitivna naboja (**Slika 3**), a za molekulu DNA veže se na najmanje dva različita načina: interkalacijom, u slučaju kada je odnos količine bojila i nukleotidnih baza nizak, te eksternim vezanjem za lanac DNA kada je količina bojila znatno veća od količine nukleotidnih baza. Osim toga uočeno je i nastajanje intramolekularnih dimera sa YO-podjedinicama te je uočeno da raspad takvih struktura slijedi bieksponecijalnu kinetiku.



Slika 3. Strukturna formula YOYO-1 jodida

Apsorpcijski maksimumi slobodnog PicoGreen[®]-a (**Slika 4**) te kompleksi PicoGreen[®]-a s ds- i ss-DNA su vrlo bliski i nalaze se na 498, 503 i 501 nm, dok su emisijski maksimumi zabilježeni pri 528, 525 i 522 nm. Pomak tih apsorpcijskih i emisijskih maksimuma PicoGreen[®]-a vezanog za ss- i ds-DNA vrlo je malen i ovisi o steričkim faktorima tj. većem stupnju slobodne rotacije, pa je kod kompleksa sa ss-DNA nešto malo pomaknut k višim valnim duljinama. Fluorokromatsko bojilo PicoGreen[®] tvori postojani kompleks s ds-DNA (Haugland, 1996), dok je kompleks PicoGreen[®]-a i ss-DNA nepostojaniji te je njegovo vrijeme poluraspada (monoeksponecijalni raspad) znatno kraće od vremena poluraspada kompleksa PicoGreen[®]-a i ds-DNA. Stoga je PicoGreen[®] pogodan za određivanje odnosa prisutnih ss- i ds-DNA u uzorku. Naime, formiranje PicoGreen[®]-skog dimera koji je bitan za prijenos energije usljed čega dolazi do njegovog utruća, izraženije je kod kompleksa sa ss-DNA pa je stoga takav kompleks podložniji deaktivaciji i raspadu.



Slika 4. Strukturna formula PicoGreen[®]-a (X može biti S ili O, različiti substituenti mogu biti na pozicijama R₁ i R₂, a anioni mogu biti Cl⁻, I⁻, ClO₄⁻ ili različiti sulfonati).

U radu su korištene sljedeće otopine i puferi: CMFSW-E medij (Ca²⁺ Mg²⁺ Artificial Free Sea Water) (Rottman i sur., 1987); TE pufer pH 7.4 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, NaOH), 10%-tni DMSO u TE puferu pH 7.4; lizirajuća otopina pH 10.0 (4.5 M urea, 200 mM EDTA, 0.1 % SDS); otopina za denaturaciju dobivena miješanjem 20 mM otopine EDTA i 0.1 M NaOH u 20 mM EDTA tako da finalna koncentracija NaOH u 20 mM EDTA osigurava željenu pH vrijednost potrebnu za denaturaciju ds-DNA.

3.2. Izvori i priprema modelnih zagađivala

3.2.1. UV-C zračenje

Stratalinker[™] UV Crosslinker 1800 (5-8 W, 254 nm) (Stratagene[®], CA, USA) upotrebljen je kao izvor UV-C zračenja kultura HeLa stanica u rasponu doza od 0 do 1000 μJ×100/cm² (0-1000 J/m²).

3.2.2. γ -zračenje

Kao izvor γ -zračenja upotrebljavao se Gammacell 2000 instrument (Cs^{137} ; 7.7 rad/s, 1800 Ci) (Mølsgaard Medical, Danska) kojim smo ozračivali mišje limfocite, homogenate mišića i jetre miševa, stanice ovarija kineskog hrčka, humane limfocite i HeLa stanice te naposljetku stanice spužve *Suberites domuncula* različitim dozama zračenja.

3.2.3. Priprema i primjena otopine aktiviranog bleomicin-Fe(II) kompleksa

Bleomicini su glikopeptidni antibiotici izolirani iz *Streptomyces verticillus*. U originalnu ampulu koja sadrži 7-11 mg liofiliziranog bleomicin sulfata (aktivnost ekvivalentna količini od 15 mg bleomicina) doda se 5 ml destilirane vode i 75 μl 2-merkaptoetanol. Tako priređena otopina bleomicin sulfata (cca 3 mM) čuva se u tami na $+4^\circ\text{C}$, a potrebna količina pomiješa se s jednakim volumenom 6 mM FeSO_4 . Nastali bleomicin-Fe(II) kompleks je blage ljubičaste boje (Sausville i sur., 1978) te se razrijeđuje s 10.4 mM DTT i vodom u volumnom omjeru 1:1:1. Tako priređena 0.5 mM otopina aktiviranog bleomicin-Fe(II) kompleksa razrijeđuje se do radnih koncentracija neposredno prije upotrebe, tj. *in vitro* dodatka suspenzijama kultura humanih HeLa stanica, homogenatima tkiva jetre NMRI miševa, preparatu DNA gonada trpa *Holothuria tubulosa* te homogenatima škrga dagnji *Mytilus galloprovincialis*.

3.2.4. Priprema i primjena otopine NQO

4-nitrokinolin-N-oksid otopljen je u DMSO-u u koncentraciji od 1 mg/ml. Takva "stock" otopina čuva se na -20°C , a prije upotrebe se razrijeđuje do radnih koncentracija radi injektiranja dagnji u palijalnu tekućinu (prostor između plašta i stijenke ljuštore) ili dodavanja hranjivoj podlozi kulture mišjih limfoblasta (DBA/2; L5178Y) i humanih HeLa stanica.

3.2.5. Priprema i primjena otopine B[a]P

Benz[a]piren je otopljen u DMSO-u u koncentraciji od 1 mg/ml. Takva "stock" otopina čuva se na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, a prije injektiranja dagnji u palijalnu tekućinu razrijeđuje se do radnih koncentracija.

3.3. Organizmi, tkiva, kulture stanica i načini njihovog tretiranja

3.3.1. Humane stanice

3.3.1.1. Kultura humanih HeLa stanica

HeLa stanice su rasle u MEM-Hanks mediju (0.35 g/l NaHCO_3 , 20 mM HEPES, 20 mM L-glutamin) s 10 % fetalnog goveđeg seruma i 100 mg /l kanamicina pri temperaturi od $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ u vlažnoj atmosferi s 5% CO_2 . U pokusu su korištene stanice u eksponencijalnoj fazi rasta koje su bile izložene djelovanju 0 do 100 μg NQO-a / ml hranjive podloge tijekom 90 min. One stanice koje su bile izložene djelovanju UV-C zračenja (od 0 do 1000 $\mu\text{J}\times 100$) i γ -zračenja (od 0 do 500 rad) te bleomicin-Fe(II) kompleksa (od 0 do 83.3 μM) su neposredno prije izlaganja resuspendirane u 10 %-tnom DMSO-u u TE puferu pH 7.4. Za izvođenje same brze mikrometode (Fast micromethod[®]) stanice se razrijeđuju u TE puferu pH 7.4 do koncentracije od 3000 stanica /25 μl (1.2×10^5 stanica /ml).

3.3.1.2. Humani limfociti (HL-60)

Limfociti su iz venske krvi uz dodatak antikoagulansa S-Manovet[®] KE SARSTEEDT (do koncentracije kalij-EDTA od 1.6 mg / ml venske krvi) izolirani centrifugiranjem u gradijentu gustoće uporabom UNI-SEP kolona (Eldan Tech., Jerusalem, Izrael) po priloženom uputstvu. Nakon centrifugiranja (1500 g / 10 minuta / $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$) odijeljeni se limfociti (5×10^5 do 4×10^6 leukocita /ml) razrijeđuju u TE puferu

pH 7.4, na 4 °C do koncentracije od 3000 stanica /25 µl (1.2×10^5 stanica /ml). Tako pripravljene stanice izlagane su γ -zračenju (0-250 rad). Analizirani su odmah po završetku zračenja i nakon 2 sata čuvanja u mraku na sobnoj temperaturi radi usporedbe te uočavanja mehanizma popravka oštećenja DNA.

3.3.2. Stanice i homogenati tkiva laboratorijskih miševa

3.3.2.1. Limfoblasti L5178Y laboratorijskih miševa DBA/2

Limfoblasti su uzgajani u RPMI-1640 mediju s 10%-tnim goveđim fetalnim serumom na 37 °C u 5%-tnoj atmosferi CO₂. Neposredno prije zračenja resuspendirani su u 10%-tnom DMSO u TE puferu pH 7.4 do koncentracije od 2800-5500 odnosno 3000 stanica /25 µl (1.2×10^5 stanica /ml). Tako priređene otopine limfoblasta izlagane su dozama od 0 do 120 odnosno 500 rad γ -zračenja ili inkubirane 90 minuta u hranjivoj podlozi uz prisustvo 0 do 3 µM NQO.

3.3.2.2. Homogenat tkiva jetre laboratorijskih miševa NMRI

Laboratorijski miševi NMRI (Charles River, Sulzfeld, Njemačka) su žrtvovani te im je izdvojena jetra koja je spremljena i čuvana u tekućem dušiku. Tkivo jetre laboratorijskih miševa homogenizirano je u 10%-tnom DMSO u TE puferu pH 7.4 u tarioniku s tekućim dušikom. Otprilike 50 mg tkiva homogenizira se u 2 ml pufera u prethodno tekućim dušikom pothlađenom tarioniku. Smrznuti peleti se sakupe kušalicom te se otope na sobnoj temperaturi nakon čega se alikvotiraju i čuvaju na -80 °C ili razrijede do radne koncentracije od cca 25 µg tkiva /25 µl pufera. Razrijeđeni homogenati jetre izlagani su različitim dozama γ -zračenja (0-200 rad) odnosno djelovanju 0-16.7 µM bleomicin-Fe(II) kompleksa te su zatim analizirani.

3.3.2.3. Homogenat mišićnog tkiva laboratorijskih miševa NMRI

Mišićno tkivo laboratorijskih miševa NMRI homogenizira se, razrijeđuje i čuva kao i homogenat tkiva jetre (vidi: 3.3.2.2. Homogenat tkiva jetre laboratorijskih miševa NMRI). Razrijeđeni homogenati mišićnog tkiva izlagani su različitim dozama γ -zračenja (0-200 rad) te su zatim analizirani.

3.3.3. Stanice ovarija kineskog hrčka (CHO stanice)

CHO stanice su uzgajane na F-12K mediju s 10 % fetalnog govedeg seruma na temperaturi 37°C i atmosferi s 5% CO₂. Stanice su zatim resuspendirane u 10%-tnom DMSO u TE puferu pH 7.4 do koncentracije od 3000 stanica /25 μ l (1.2×10^5 stanica /ml) te izlagane djelovanju 0 do 1500 rad γ -zračenja.

3.3.4. Nativni izolat DNA iz gonada trpa *Holothuria tubulosa* (3567A)

Izvađene gonade trpa *Holothuria tubulosa* (Gmelin) (3567A) pomiješaju se s istim volumenom 2%-tne otopine SDS-a u 0.2 M EDTA pH 8.6-9.0 te se ovisno o dodatku proteinaze-K smjesa zagrije se na 50 odnosno na 96 °C. Takva otopina se razrijeđuje s otopinom 3 M NaCl i 0.05 M EDTA pH 8.6-9.0 dok se ne postigne optimalni viskozitet (2 cp) i homogenost otopine iz koje se DNA ekstrahira kloroformom, a sama DNA se iz kloroformske otopine izdvaja na mješalici uz vrlo polagano miješanje. Dobivena DNA otopljena je u TE puferu pH 7.4 do radnih koncentracija od 100 ng DNA/25 μ l te je izložena *in vitro* djelovanju 0-50 μ M bleomicin-Fe(II) kompleksa.

3.3.5. Stanice spužve *Suberites domuncula*

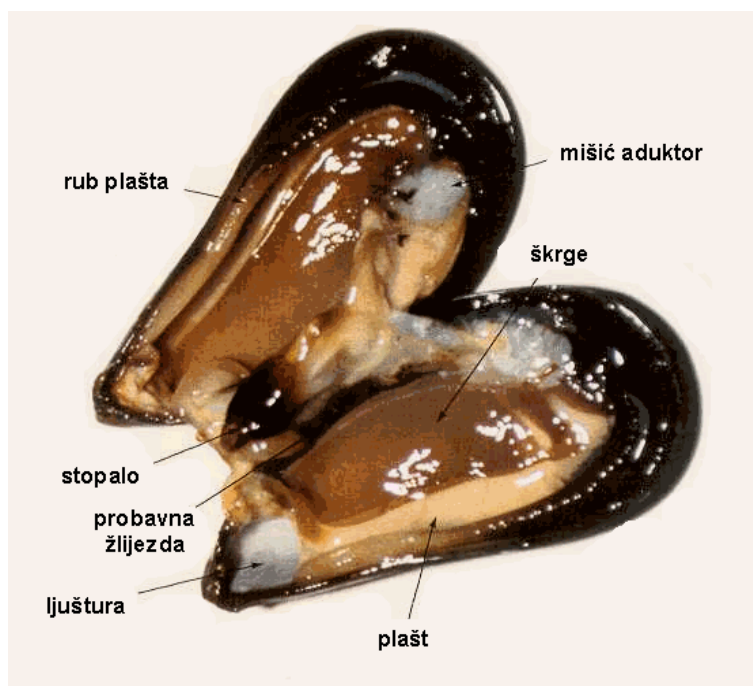
Spužve, *Suberites domuncula* (Olivi) izrezane su na male komadiće veličine 0.5-1 cm³ nakon čega je provedena disocijacija stanica u CMFSW-E mediju (2.5 mM EDTA, pH 8.1) uz antibiotike penicilin (1 IU/ml) i streptomycin (100 μ g/ml) u začepljenim 50

ml-skim kušalicama uz stalno lagano okretanje na sobnoj temperaturi kroz 40 minuta. Disocijacija stanica u CMSF-E mediju je ponovljena na taj način 2-3 puta nakon čega su sakupljeni supernatanti, tj. suspenzija stanica spužve, procijeđeni kroz najlonsku mrežicu (40 μm) koja je zatim zajedno se kušalicim isprana s CMSFW medijem, te sve zajedno centrifugirano pri 500g kroz 5 minuta. Tako izolirane stanice oprane su u CMSFW mediju (Müller i sur 1999) i resuspendirane do radne koncentracije stanica 5×10^5 stanica /ml TE pufera, pH 7.4 (12500 stanica u 25 μl odgovara cca 41.25 ng DNA), te izložene djelovanju 0 do 500 rad γ -zračenja. Stanice spužve *Suberites domuncula* sadrže prosječno oko 3.3 pg DNA /stanici kako su to pokazali Imsiecke i sur. (1995).

3.3.6. Homogenat škrga dagnje *Mytilus galloprovincialis*

Dagnje, *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) (**Slika 5**) sakupljane su s 24 različite postaje uzduž istočne obale Jadrana, od Limskog kanala na sjeverozapadu do luke Gruž na jugoistoku (**Slika 6**), i to četiri puta godišnje (ožujak, lipanj, kolovoz i listopad) neprekidno tijekom više godina (1998-2001). Prosječna veličina (duljina: 2-8 cm, visina: 1-3 cm i širina: 0,5-2,5 cm) i masa dagnji (5-25 g) varira na lokacijama tijekom godine, a uočen je i potpuni izostanak vrste na pojedinim, predhodno odbranim, pristupačnim i dagnjama nastanjenim mikrolokacijama. Radi određivanja oštećenja DNA u uvjetima miješanog zagađenja analizirana je prirodna populacija dagnji s lokacija koje su pod utjecajem otpadnih voda industrijskog i/ili urbanog porijekla (gradske luke, neposredna blizina industrijskih postrojenja, riječna ušća), ili s lokacija za koje se smatra da nisu pod nikakvim antropogenim utjecajem te nam u ovakvim istraživanjima služe kao referentne točke (**slika 6**). Uzorkovano je uvijek po 5 dagnji prosječnih biometrijskih vrijednosti (veličina i masa) sa svake lokacije. Odmah po uzorkovanju, dagnjama su odstranjene škrge, koje su pohranjene u tekući dušik. Otprilike 100 mg smrznutih škrga homogenizira se u 2 ml 10 %-tnog DMSO-a u TE puferu pH 7.4. u tarioniku s tekućim dušikom. Smrznuti peleti se sakupe

kušalicom i otope na sobnoj temperaturi nakon čega se alikvotiraju i čuvaju na -80°C . U laboratorijskim pokusima korištene su dagnje (test organizmi) iz uzgajališta u Lirskom kanalu koje je pod stalnom bakteriološkom i kemijskom kontrolom, komercijalnih težina od 20 do 25 g i dužina od 7 do 9 cm, te su prenesene u laboratorijski bazen s protočnom morskom vodom čija je temperatura odgovarala temperaturi mora. Dagnje su injektirane ispod plašta, izravno u palijalnu tekućinu različitim dozama modelnih zagađivala (0 do $20\ \mu\text{g}$ B[a]P odnosno 0 do $1\ \mu\text{g}$ NQO /g školjke), otopljenih u $50\ \mu\text{l}$ otapala DMSO-a, te inkubirane u bazenima s protočnom morskom vodom 90 minuta, dok su kontrolne dagnje ostale intaktne. Razrijeđeni homogenati škrge dagnji izlagani su *in vitro* djelovanju 0 do $83.8\ \mu\text{M}$ bleomicin-Fe(II) kompleksa.



Slika 5. Unutarnji organi dagnje *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck 1819).



Slika 6. Lokacije na kojima su uzorkovane dagnje na istočnoj obali Jadrana.

3.4. Brza mikrometoda (Fast Micromethod[®])

Brza mikrometoda (Fast mikrometod[®]) (Müller i sur., 1997; Batel i sur. 1999) zasniva se na sposobnosti fluorkromatskog pigmenta (PicoGreen[®], Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, SAD) da se s visokim afinitetom veže za ds-DNA dok je njegov afinitet u alkalnim uvjetima za ss-DNA, RNA i proteine bitno snižen. To omogućava direktno praćenje DNA denaturacije u alkalnoj sredini, tj. sniženje količine kompleksa pigment-dvolančana DNA odnosno opadanje vrijednosti fluorescencije (emisija 485 nm/ekscitacija 520 nm) tijekom vremena u lizatu kulture stanica ili homogenata tkiva bez predhodne izolacije i pročišćavanja same DNA, čime se izbjegava dodatna manipulacija uzorcima i oštećenje DNA te povećava osjetljivost same metode.

3.4.1. Priprema uzoraka

3.4.1.1. Nativna DNA

Nativna DNA izolirana iz gonada trpa *Holothuria tubulosa* razrijeđena je u TE puferu pH 7.4 do radne koncentracije od 2.2 µg/ml. U 450 µl alikvota tako pripremljenih otopina DNA dodavano je po 50 µl otopina bleomicin-Fe(II) kompleksa različitih koncentracija (od 0-500 µM).

3.4.1.2. Kulture stanica

Kulture stanica su neposredno pred analizu razrijeđene u 10%-tnom DMSO u TE puferu pH 7.4 do koncentracije od 2800, 5500 odnosno 3000 st/ml.

3.4.1.3. Homogenati tkiva

Homogenizacija uzorka tkiva (jetra, mišić, škrge) u tekućem dušiku provedena je tako da se u tarionik za homogenizaciju uzoraka ulije se cca 1 dcl tekućeg dušika te doda cca 50 do 100 mg tkiva i 2 ml 10%-tnog DMSO-a u TE puferu. Smjesa se čvrstim i brzim pokretima homogenizira do konačne evaporacije dušika i nastanka bijelog praha, koji se kušalicom sakupi i ostavi da se rastopi-odmrzne nakon čega se profiltrira kroz planktonsku mrežicu i spremi u tekući dušik ili u zamrzivač na -80°C .

3.4.2. Određivanje količine DNA u uzorku

Količina DNA u homogenatima tkiva škrge dagnje *Mytilus galloprovincialis* određena je uporabom fluorokromatskog YOYO[®] reagensa. Originalni YOYO[®]-1 jodid reagens razrijedi se 100 puta u 25 %-tnoj vodenoj otopini DMSO-a i tako čuva na -20°C . Ta se otopina razrijeđuje neposredno prije upotrebe 25 puta u 10%-tnoj otopini DMSO-a u TE puferu pH 7.4 tako da konačna koncentracija YOYO[®]-1 jodid reagensa bude 4×10^{-7} M. Za određivanje je neophodno prirediti i standardne otopine DNA u 10%-tnoj otopini DMSO-a u TE puferu koncentracija: 0, 50, 100, 200 300, 400 i 500 ng DNA /ml. 50 µl standarda DNA odnosno razrijeđenih uzorka kultura stanica ili

homogenata tkiva pipetira se u jažice mikroploče u koje se zatim doda po 50 μl YOYO[®]-1 jodid reagensa tako da konačna koncentracija YOYO[®]-1 jodid reagensa bude 2×10^{-7} M. Uzorci se ostave 10-15 minuta na sobnoj temperaturi a nakon toga se u njima mjeri fluorescencija pri ekscitaciji na 485 nm i emisiji pri 520 ili 538 nm. Ekstrapolacijom vrijednosti fluorescentnih jedinica u baždarni dijagram izračunaju se koncentracije DNA u uzorcima. Na osnovu dobivenih rezultata uzorci su razrijeđeni do radnih koncentracija od 100 ng DNA /ml odnosno 2.5 ng /25 μl . Ovisno o kvaliteti tkiva, odnosno velikim razlikama u mokroj masi škruga dagnji te količinom pufera koja je korištena pri homogenizaciji tkiva (cca 100 mg tkiva /2 ml 10%-tnog DMSO-a u TE puferu pH 7.4) dobivene vrijednosti količine DNA u uzorcima istog porijekla variraju od 50 do 500 ng DNA /ml 10 puta razrijeđenog homogenata, te su stoga homogenati tkiva škruga dagnji neposredno pred analizu razrijeđivalni 5 do 50 puta do radnih koncentracija od 100 ng /ml. Iz dobivenih vrijednosti izračunata je i količina DNA u škrgama dagnji i iznosi od 2-20 ng /mg mokre mase tkiva.

3.4.3. Liziranje stanica i fluorimetrijsko određivanje denaturirane DNA

25 μl uzorka (homogeniziranih i profiltriranih te spremljenih u tekući dušik ili na -80°C) i 25 μl lizirajuće otopine u kojoj je otopljeno i razrijeđeno fluorokromatsko bojilo PicoGreen[®] (1 ml lizirajuće otopine + 20 μl PicoGreen[®]-a) ispipetira se u jažice mikroploče i ostavi 30-ak minuta na 30°C . Određivanje ds-DNA u prisustvu ss-DNA, RNA i proteina moguće je primjenom fluorokromatskog bojila PicoGreen[®]-a i to u linearnom rasponu koncentracija od čak 25 pg do 1 μg DNA/ ml (Haugland, 1996). Nakon liziranja stanica u jažice se dodaje po 250 μl otopine NaOH u 20 mM EDTA pri čemu odmah dolazi do destabilizacije vodikovih veza i odvajanja lanaca DNA što se prati mjerenjem promjena fluorescencije uzorka u slijedećih 40-ak minuta u konstantnim vremenskim razmacima. Osjetljivost i linearni odgovor fluorescencije (ekstinkcija 485 nm / emisija 520 nm) uz primjenu mikroploča sa malim volumenom tj. količinom uzorka u denaturirajućim uvjetima (alkalni pH i visoka ionska jakost) određivani su uporabom spektrofluorimetra (Fluoroscant II ili Fluoroscant Ascent;

Labsystems, Finland). Nametnuti uvjeti pH vrijednosti, dodatkom otopine NaOH-20 mM EDTA, ovise o veličini genoma odnosno DNA ispitivane vrste organizama. Prije samog dodavanja otopine NaOH-20 mM EDTA u jažice s uzorcima neophodno je pripremiti otopinu svojstvene koncentracije NaOH u 20 mM EDTA koja će na koncu po dodatku u jažice rezultirati željenom pH vrijednošću koja varira od 12.4 za stanice i homogenate tkiva glodavaca i ljudi (sisavaca) do 11.5 za morske beskralješnjake.

3.4.4. Priprema otopine NaOH i pH uvjeta

Miješanjem 20 mM EDTA i 0.1 M NaOH u 20 mM EDTA u omjeru cca 1:1 dobije se otopina NaOH niže koncentracije od 0.1 M (u 20 mM EDTA) koja se dodaje u lizirani uzorak (po 250 μ l u svaku jažicu). Neposredno prije dodatka ove otopine u jažice, potrebno je u smjesu od 250 μ l TE-10% DMSO i 250 μ L otopine za liziranje dodati 2500 μ l ovako pripravljene otopine NaOH u 20 mM EDTA - da se provjeri da li se dobiva željeni finalni pH, te da se prema tome otopina NaOH u EDTA još razrijeđuje (s 20 mM EDTA) zbog snižavanja pH vrijednosti ili joj se dodaje još malo 0.1 M NaOH u 20 mM EDTA kako bi se postigla željena pH vrijednost.

3.4.5. Prikaz i obrada rezultata

Smanjenje količine kompleksa PicoGreen[®]-a i ds-DNA tijekom denaturacije u alkalnim uvjetima (pH 11.5 ili 12.4) praćeno je fluorimetrijski, a ovisno je o frekvenciji (učestalosti i raspodjeli) jednolančanih i/ili dvolančanih lomova DNA i postojanju alkalno-labilnih mjesta. Denaturacija kompleksa ds-DNA i PicoGreen[®]-a prati kinetiku prvaog reda (ovisna je o količini tog kompleksa) i opisana je funkcijom:

$$(1) F = ae^{-bt}$$

gdje **F** predstavlja frakciju kompleksa PicoGreen[®]-a i ds-DNA nakon vremena denaturacije **t**, a **b** konstantu brzine danaturacije ds-DNA odnosno kompleksa

PicoGreen[®]-a i ds-DNA. Parametar **a** predstavlja početnu količinu ds-DNA u uzorku tj. početnu količinu kompleksa ds-DNA i PicoGreen[®]-a. Logaritmiranjem gornja relacija prelazi u oblik:

$$(2) \ln F = -bt + \ln a$$

gdje je vrijednost **-b** nagib pravca koji govori o stupnju oštećenja DNA i proporcionalan je broju jednolančanih lomova DNA u uzorku (Rydberg, 1975).

Radi potpune interpretacije podataka potrebno je osim određivanja oblika denaturacijskih krivulja uočiti ovisnosti nagiba i oblika krivulja o količini DNA i pH vrijednosti denaturirajućeg medija kao i o dozi testirane tvari, vremenu indukcije i popravka oštećenja DNA. Ukoliko se povećanje denaturacije tj. nagiba krivulja detektira samo pri toksičnim dozama nekog umjetnog zagađivala ili se takovo povećanje ne uočava pri primjeni testiranih koncentracija i vremena indukcije nekog zagađivala onda se test smatra negativnim tj. testirana tvar pri datim uvjetima (način aplikacije, koncentracija, vrijeme indukcije) na pokazuje genotoksična svojstva. Nagibi denaturacijskih krivulja računati su (sukladno relaciji (2)) iz kvocijenta promjene fluorescentnih jedinica i vremenskog perioda u kojem je došlo do sniženja fluorescencije te su prikazani histogramima:

$$(3) \text{Nagib} = \frac{\Delta \text{Fluorescencije}}{t \text{ (vrijeme)}} \quad (\text{min}^{-1})$$

Iz praktičnih razloga nagibi denaturacijskih krivulja prikazani su u histogramima kao apsolutne vrijednosti.

Kako bi se usporedila cjelovitost DNA ispitivanih uzoraka s referentnim uzorkom korišteni su koeficijenti jednolančanih lomova, SSF vrijednosti (engl. “strand scission factor”) (Meyn i Jenkins, 1983) te su prikazani indukcijskim krivuljama ili histogramima. Što je veći broj alkalno-labilnih mjesta i lomova DNA brzina denaturacije DNA je veća. Koeficijenti jednolančanih lomova izračunavani su na osnovi vrijednosti fluorescencija odnosno relativnih količina ds-DNA prisutnih u promatranom i referentnom uzorku u odnosu na nulto vrijeme denaturacije nakon korekcije za slijepu probu. Referentna vrijednost predstavlja relativnu količinu ds-DNA u referentnom uzorku nakon odabranog vremena denaturacije. SSF-ovi su izračunati su iz formule:

$$(4) SSF = \log_{10} \frac{\% \text{ ds-DNA (uzorak)}}{\% \text{ ds-DNA (ref.)}}$$

odnosno:

$$(5) SSF = \log_{10} \frac{\text{RFU (uzorak)}}{\text{RFU (ref.)}}$$

nakon 5-10 minuta denaturacije. SSF vrijednosti jednake 0 govore o nepostojanju razlike u broju dodatnih lomova DNA lanaca i alkalno-labilnih mjesta ispitivane DNA u odnosu na referentni uzorak. SSF vrijednosti < 0 govore o povećanoj učestalosti alkalno-labilnih mjesta i lomova lanaca DNA u odnosu na referentni uzorak. Zbog jasnoće prezentacije histogrami prikazuju negativne SSF vrijednosti. Uzorci koji pokazuju povećanje SSF×(-1) vrijednosti imaju povećan broj alkalno-labilnih mjesta i/ili jednolančanih (ili čak i dvolančanih) lomova DNA u odnosu na referentni uzorak. Oni uzorci kod kojih su te vrijednosti statistički značajno niže u odnosu na referentni uzorak pokazuju da je njihova DNA prividno ili stvarno bolje cjelovitosti od DNA referentnog uzorka jer je denaturacija u ds-DNA u tim uzorcima tekla sporije. Uzrok tome mogu biti i drugi tipovi oštećenja DNA kao što su umrežavanje DNA i proteina (engl. "DNA-protein cross-linking") te DNA i DNA (engl. "inter-" i "intrastrand cross-

linking").

Kao referentni uzorci u biomonitoring istraživanju korišteni su uzorci sakupljeni na lokaciji Lim Sredina tj. SSF vrijednosti su izračunati logaritmiranjem odnosa fluorescencija kvadriplikata mjerenja u 3-5 uzoraka sa date lokacije (3-5 škrge iz 3-5 dagnji sa date lokacije) u odnosu na srednju vrijednost fluorescencije referentnog uzorka (3-5 škrge dagnji s referentne lokacije Lim Sredina). Na taj način uspoređena je cjelovitost DNA homogenata škrge dagnji s cjelovitošću DNA homogenata škrge dagnji s referentne lokacije za svako uzorkovanje posebno kako bi se izbjegle sezonske varijacije te utjecaj ostalih čimbenika prisutnih u okolišu.

Promotrene su i raspodjele dobivenih SSF vrijednosti homogenata škrge dagnji za svako pojedino uzorkovanje kako bi se ustvrdile eventualne pravilnosti i periodičnosti u dobivenim podacima.

U **tablici 2** prikazan je odnos negativnih SSF vrijednosti prema relativnoj količini (%) DNA visoke (ds-DNA) i niske (ss-DNA) cjelovitosti, odnosno neoštećene ss- i oštećene (denaturirane) ds-DNA, u uzorku u odnosu na neki referentni uzorak. Uočljivo je da negativne SSF vrijednosti od 0.07 do 1.0 obuhvaćaju široki raspon smanjenja cjelovitosti DNA (od 15 do 90 %) u odnosu na referentni uzorak DNA. Vrijednosti $SSF \times (-1)$ a od 0 do 0.05 govore u prilog nepostojanju odnosno vrlo malom povećanju broja lomova i/ili alkalno-labilnih mjesta u DNA uzorka u odnosu na referentni uzorak. Vrijednosti $SSF \times (-1)$ veće od 1.3 govore gotovo o sasvim denaturiranoj DNA u uzorku.

Histogramima su prikazane i učestalosti (relativni indeksi) pojavljivanja većeg stupnja oštećenja (smanjenja cjelovitosti) DNA u škragama dagnji sa odabranih lokacija jadranskog priobalja u odnosu na oštećenja uzrokovana *in vitro* djelovanjem bleomicin-Fe (II) kompleksa na homogenat škrge kontrolnih dagnji kako bi se uočile lokacije koje su pod značajnijim utjecajem genotoksičnih zagađivala.

Statistički značajne razlike između srednjih vrijednosti (aritmetičkih sredina) SSF-a uzoraka s pojedinih lokacija i SSF vrijednosti referentne lokacije u datom uzorkovanju dobivene su primjenom *t*-test-a, odnosno analizama varijance (ANOVA) i Tuckay-

evom (Tuckay HSD) metodom. Statističke razlike između dvije po dvije aritmetičke sredine uspoređujući pritom SSF vrijednosti referentne lokacije s ostalima se smatraju značajnima za $*p < 0.05$.

SSF × (-1)	RFJ uzorak / RFJ ref.	relativna količina (%) neoštećene DNA (visoke cjelovitosti) u uzorku u odnosu na referentni uzorak	relativna količina (%) oštećene DNA (niske cjelovitosti) u uzorku u odnosu na referentni uzorak
0,001	0,998	99,8	0,2
0,005	0,989	98,9	1,1
0,01	0,977	97,7	2,3
0,05	0,89	89,1	10,9
0,06	0,87	87,1	12,9
0,07	0,85	85,1	14,9
0,08	0,83	83,2	16,8
0,09	0,81	81,3	18,7
0,1	0,79	79,4	20,6
0,2	0,63	63,1	36,9
0,3	0,50	50,1	49,9
0,4	0,40	39,8	60,2
0,5	0,32	31,6	68,4
0,6	0,25	25,1	74,9
0,7	0,20	20,0	80,0
0,8	0,16	15,8	84,2
0,9	0,13	12,6	87,4
1	0,10	10,0	90,0
1,1	0,08	7,9	92,1
1,2	0,06	6,3	93,7
1,3	0,05	5,0	95,0
1,4	0,04	4,0	96,0
1,5	0,03	3,2	96,8
1,6	0,025	2,5	97,5
1,7	0,020	2,0	98,0
1,8	0,016	1,6	98,4
1,9	0,013	1,3	98,7
2	0,010	1,0	99,0

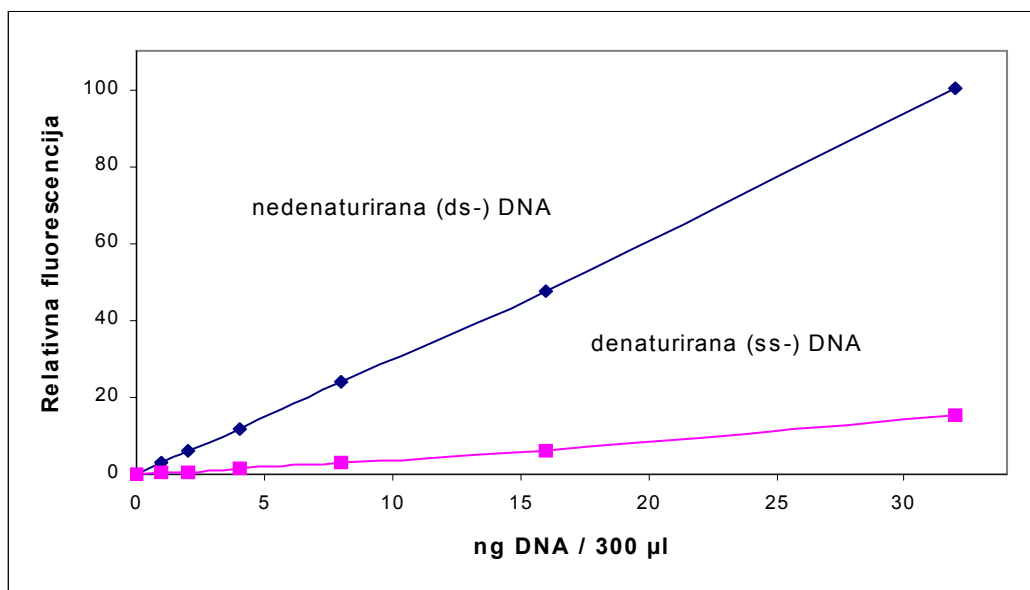
Tablica 2. Odnos negativnih vrijedosti SSF-a prema relativnoj količini (%) DNA visoke (ds-DNA) i niske (ss-DNA) cjelovitosti, odnosno neoštećene ss- i oštećene (denaturirane) ds-DNA, u uzorku u odnosu na referentni uzorak DNA.

4. REZULTATI

4.1. Optimalizacija primjene fluorokromatskog bojila PicoGreen[®]-a za određivanje cjelovitosti DNA u denaturirajućim uvjetima

4.1.1. Utjecaj količine DNA na fluorescenciju kompleksa DNA-PicoGreen[®] u alkalnim uvjetima

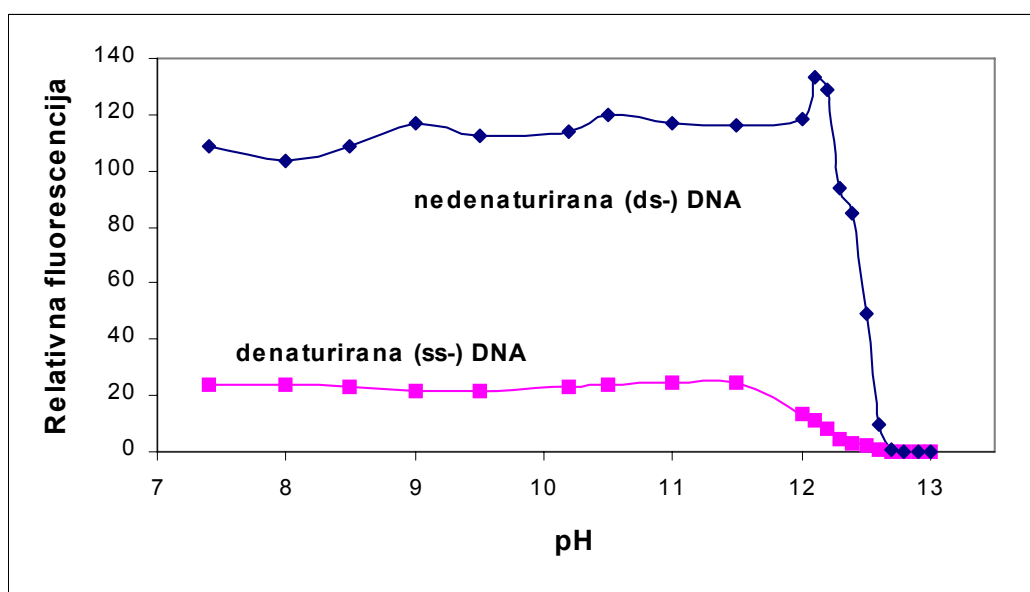
U svrhu određivanja oštećenja DNA brzom mikrometodom (Fast Micromethod[®]) bilo je potrebno najprije odrediti optimalnu količinu uzorka (DNA) koja će se koristiti u daljnjim istraživanjima. Sa **slike 7** jasno je vidljivo da denaturirana (ss-) DNA, koja je dobivena je denaturacijom tj. zagrijavanjem uzorka ds-DNA u kipućoj vodi kroz 10 minuta, daje znatno niže vrijednosti fluorescencije u odnosu na jednaku količinu nedenaturirane (ds-) DNA, pri čemu je dozní odgovor zabilježen za cijeli raspon upotrebljenih koncentracija DNA u uzorcima od 3.3 do 106.7 ng DNA /ml (1-32 ng DNA / 300 μ l reakcijske smjese). Rezultati potvrđuju visoku specifičnost fluorescentnog bojila Picogren[®]-a za ds-DNA, te ukazuju da je to svojstvo postojano i u alkalnim uvjetima. Analiza je provedena odmah po dodatku otopine za denaturaciju.



Slika 7. Krivulje fluorescencije ds- i ss-DNA (nedenaturirane i denaturirane DNA) teleće štitnjače u ovisnosti o koncentraciji DNA u uzorku pri pH 12.4.

4.1.2. Utjecaj pH vrijednosti denaturirajućeg medija na fluorescenciju kompleksa DNA-PicoGreen®

Uzorci DNA teleće štitnjače analizirani su i u puferima različitog alkaliteta nakon dodatka otopine NaOH u 20 mM EDTA. Kinetika denaturacije gotovo da i ne ovisi o promjenama pH vrijednosti medija od 7.5 do 11.5 nakon čega dolazi do povećanja brzine denaturacije kompleksa ss-DNA i PicoGreen®-a. Pri pH vrijednostima višim od 12.2 dolazi i do vrlo brze denaturacije ds-DNA te nestanka fluorescirajućeg kompleksa ds-DNA i PicoGreen®-a, tako da je pri pH vrijednosti denaturirajućeg medija od 12.6 kompletna ds-DNA denaturirana u ss- oblik, te ih je stoga nemoguće razlikovati (**Slika 8**). Upravo iz tih razloga za rutinske analize cjelovitosti DNA sisavaca i glodavaca odabrana je optimalna pH vrijednost medija od 12.4 pri kojoj je denaturacijska kinetika ds-DNA mjerljiva u relativno kratkom vremenskom periodu (20 do 60 minuta).

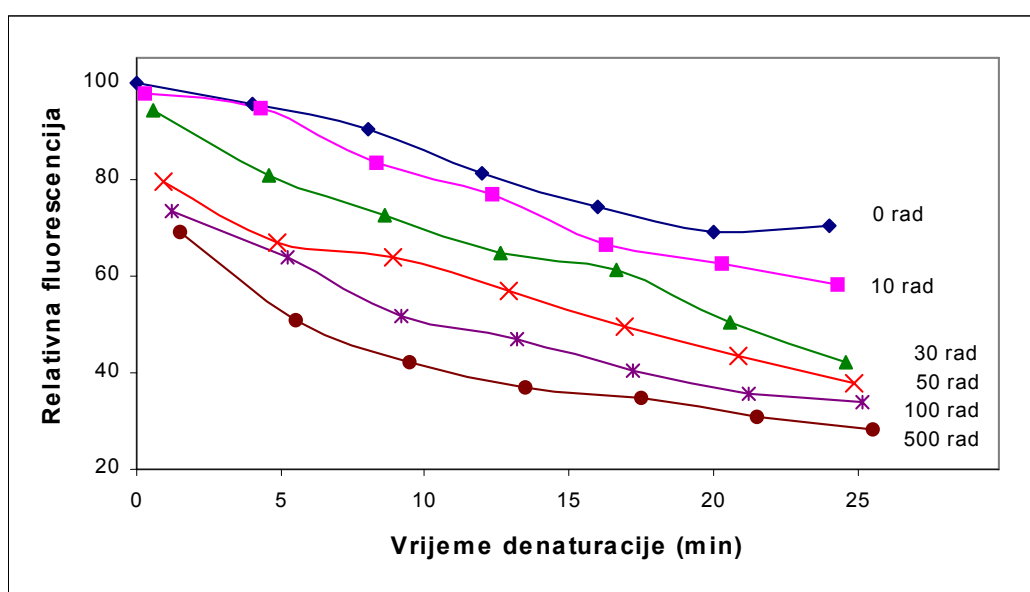


Slika 8. Utjecaj pH vrijednosti na relativnu vrijednost fluorescencije ds- i ss-DNA teleće štitnjače (30 ng DNA po jažici).

4.2. Razvoj i primjena brze mikrometode (Fast Micromethod®) na stanicama i tkivima sisavaca

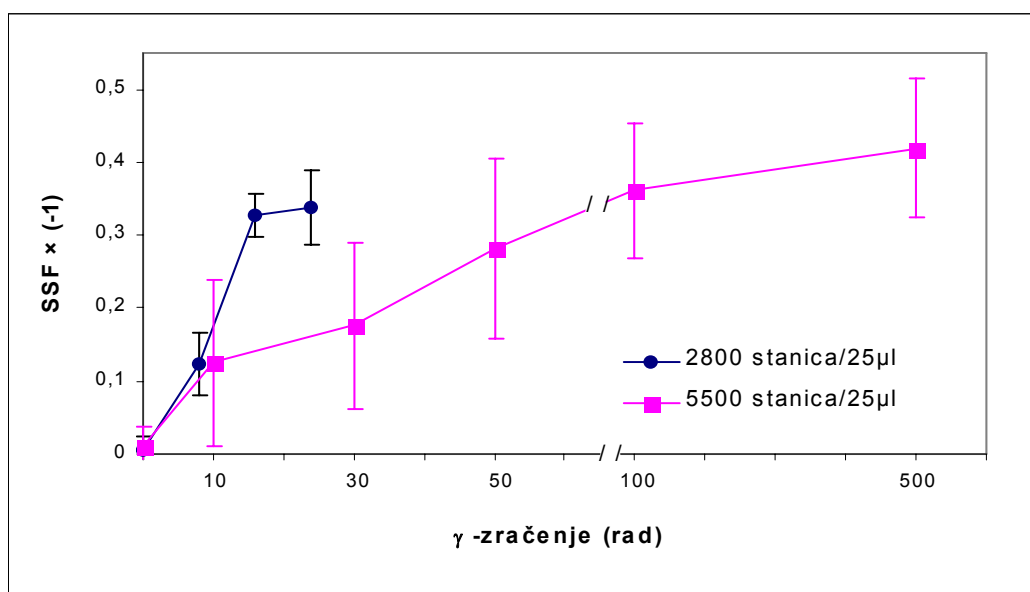
4.2.1. Limfoblasti L5178Y laboratorijskih miševa DBA/2

Različitim dozama γ -zračenja (0-500 rad) narušena je cjelovitost DNA mišjih limfoblasta (DBA/2; L5178). Nakon 20-ak minuta denaturacije manje od 30% DNA neozračenih stanica je denaturirano dok se povećanjem doze γ -zračenja povećavala i količina denaturirane DNA (**Slika 9**). Tako je npr. kod limfocita ozračenih dozom od 500 rad denaturirano oko 70 % DNA.



Slika 9. Krivulje denaturacije DNA mišjih limfoblasta (DBA/2; L5178Y) nakon ozračivanja stanica s različitim dozama γ -zračenja.

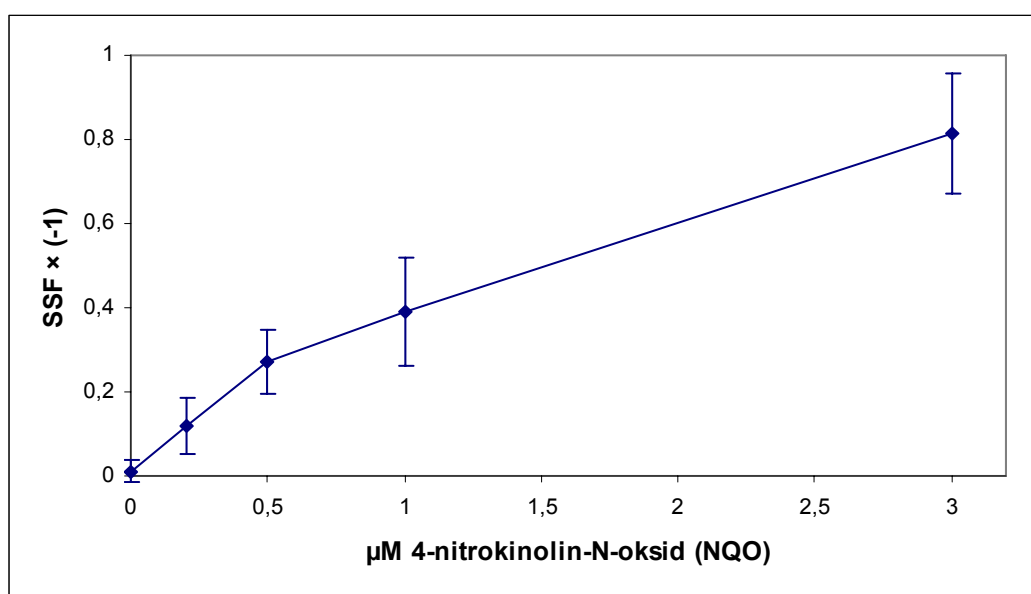
Pri optimalizaciji metode svakako je bilo značajno ustanoviti utjecaj koncentracije odnosno količine DNA na osjetljivost i preciznost mjerenja. U tu svrhu je upotrebjeno 2800 i 5500 stanica limfoblata po jažici mikroploče, pri čemu je veća osjetljivost postignuta kod uzorka s manje stanica, dok je kod uzorka s 5500 stanica po jažici moguće detektirati povećanje $SSF \times (-1)$ vrijednosti u širem rasponu doza γ -zračenja. Pri tome su zamjećene i veće standardne devijacije između kvadriplikata pojedinih uzoraka (**Slika 10**). Upravo stoga je u rutinskim eksperimentima neophodno uzimati uvijek istu količinu stanica (tj. količinu DNA) te je za daljnje pokuse izbrojano uvijek 3000 stanica po jažici mikroploče. Time se osigurava veća reproducibilnost i manje standardne devijacije među replikatima uzoraka.



Slika 10. Ovisnost $SSF \times (-1)$ vrijednosti DNA mišjih limfoblata (DBA/2; L5178Y) o dozi γ -zračenja. Stanice su ozračene i držane na ledu 10 minuta prije analize. Jažice sadržavaju 2800 ili 5500 stanica, a denaturacija DNA provedena je pri pH 12.4.

Standardne devijacije odnose se na najmanje 4 replikata.

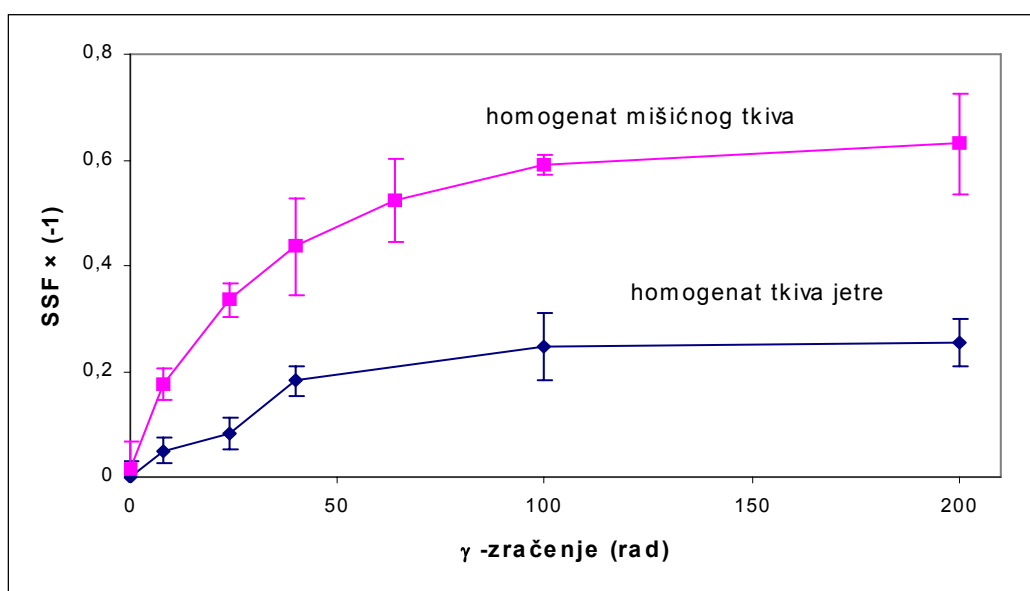
Učinak poznatog mutagena i kancerogena 4-nitrokinolin-N-oksida (NQO) na cjelovitost DNA mišjih limfocita također je praćen primjenom brze mikrometode (Fast Micromethod[®]) (**Slika 11**). Inkubacijom stanica (3000/25 μ l) s različitim dozama 4-nitrokinolin-N-oksida (0-3 μ M NQO) uočen je porast $SSF \times (-1)$ vrijednosti s povećanjem doze primijenjenog zagađivala. Povećanjem doze s 0 na 3 μ M opaža se i povećanje $SSF \times (-1)$ vrijednosti sa 0.011 ± 0.027 na 0.814 ± 0.141 .



Slika 11. Učinak 4-nitrokinolin-N-oksida (NQO) na cjelovitost DNA mišjih limfoblasta (DBA/2; L5178Y). Stanice su inkubirane u hranjivoj podlozi uz prisustvo mutagena 90 minuta, oprane s TE-puferom te odmah potom analizirane. Standardne devijacije odnose se na 4 replikata.

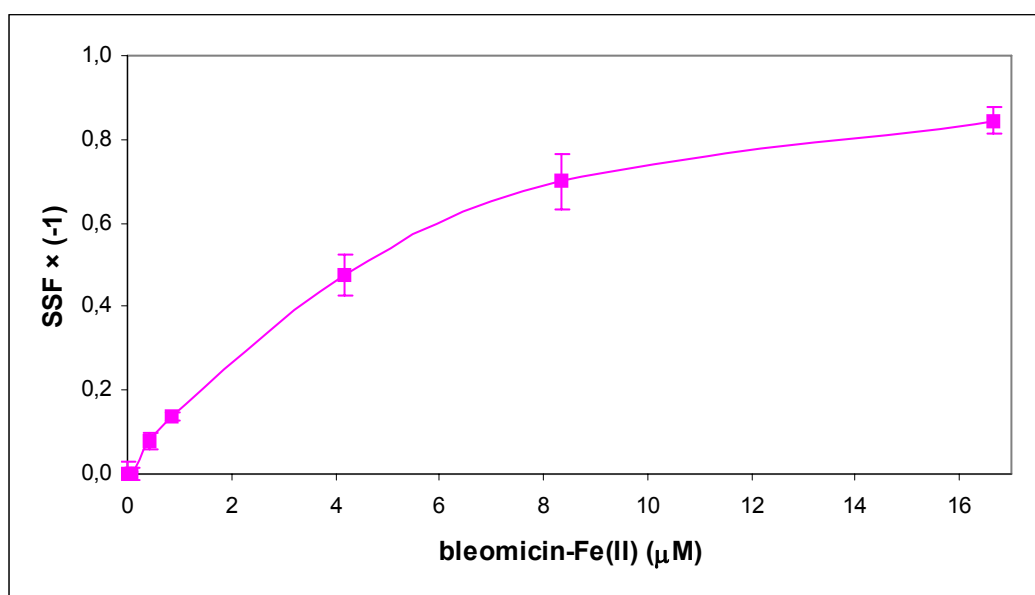
4.2.2. Homogenati tkiva jetre i mišića laboratorijskih miševa NMRI

Metoda se primjenila i na homogenate tkiva te su u tu svrhu homogenizirani mišićno tkivo i tkivo jetre NMRI miša. Homogenati su ozračeni γ -zrakama nakon čega je izmjeren dozni odgovor (engl. "dose response") do 50 rad primjenjene doze zračenja. Povećanjem doze zračenja na 100 rad vrijednosti, $SSF \times (-1)$ se ustaljuju na svojoj maksimalnoj vrijednosti: 0.630 ± 0.097 i 0.254 ± 0.044 za homogenate tkiva mišića odnosno jetre (**Slika 12**).



Slika 12. Cjelovitost DNA u homogenatima tkiva jetre i mišića laboratorijskih miševa NMRI nakon γ -zračenja. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti kvadrplikata mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama.

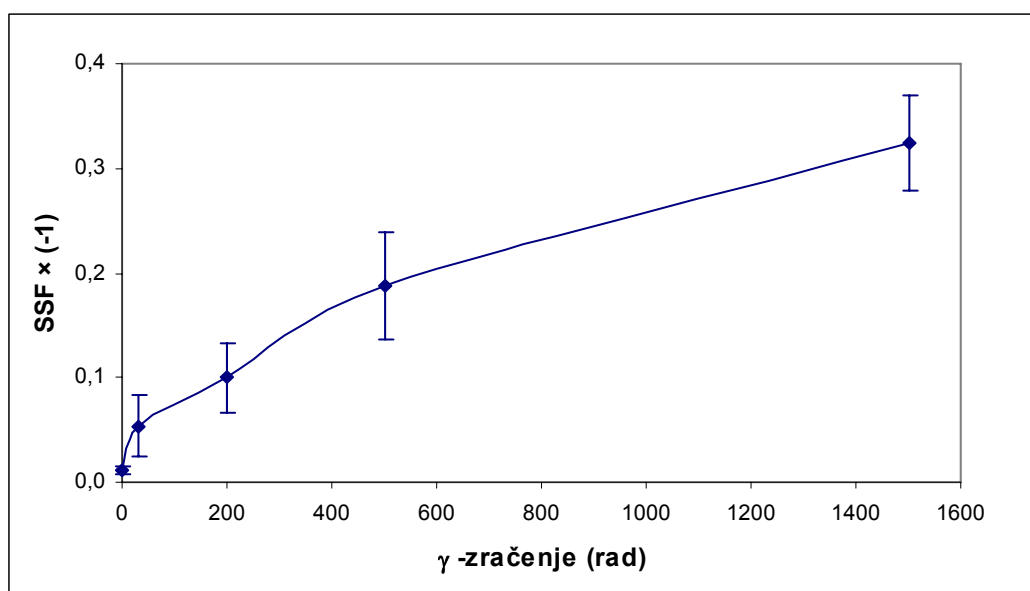
Budući da bleomicin-Fe(II) kompleks izaziva kemijski ekvivalentan učinak kao i γ -zračenje, tj. uzrokuje nastanak jednolančanih i dvolančanih lomova DNA primjenjen je *in vitro* u koncentracijama od 0 do 16.7 μM u svrhu dobivanja poznate količine lomova DNA. Povećanjem koncentracija bleomicin-Fe(II) kompleksa dolazi i do povećanja $\text{SSF} \times (-1)$ vrijednosti (**Slika 13**). To ukazuje na povećanje broja jednolančanih lomova i/ili alkalno-labilnih mjesta u homogenatu tkiva jetre laboratorijskog miša (NMRI). Primjenom najveće koncentracije bleomicin-Fe(II) kompleksa vrijednosti $\text{SSF} \times (-1)$ dostižu vrijednost od 0.845 ± 0.031 što ukazuje na 86%-tno smanjenje cjelovitosti DNA u odnosu na kontrolni uzorak. U daljnjem radu bleomicin-Fe(II) kompleks korišten je kao modelno *in vitro* zagađivalo koje uzrokuje smanjenje cjelovitosti DNA u kulturama humanih stanica, nativnom preparatu DNA iz gonada trpa te homogenatu škruga dagnji.



Slika 13. Cjelovitost DNA u homogenatima tkiva jetre NMRI miša nakon *in vitro* djelovanja bleomicin-Fe(II) kompleksa. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti kvadruplikata mjerenja sa pripadajućim standardnim devijacijama.

4.2.3. Stanice ovarija kineskog hrčka (CHO)

Stanice ovarija kineskog hrčka, koje su ozračivane različitim dozama γ -zračenja (0-1500 rad) pokazuju snižavanje cjelovitosti DNA tj. porast $SSF \times (-1)$ vrijednosti od 0.011 ± 0.004 za kontrolne, tj. neozračene stanice do 0.324 ± 0.045 za one ozračene najvišom dozom γ -zračenja (**Slika 14**). Porast $SSF \times (-1)$ vrijednosti predstavlja povećanje količine oštećene DNA za otprilike nešto više od 50%.

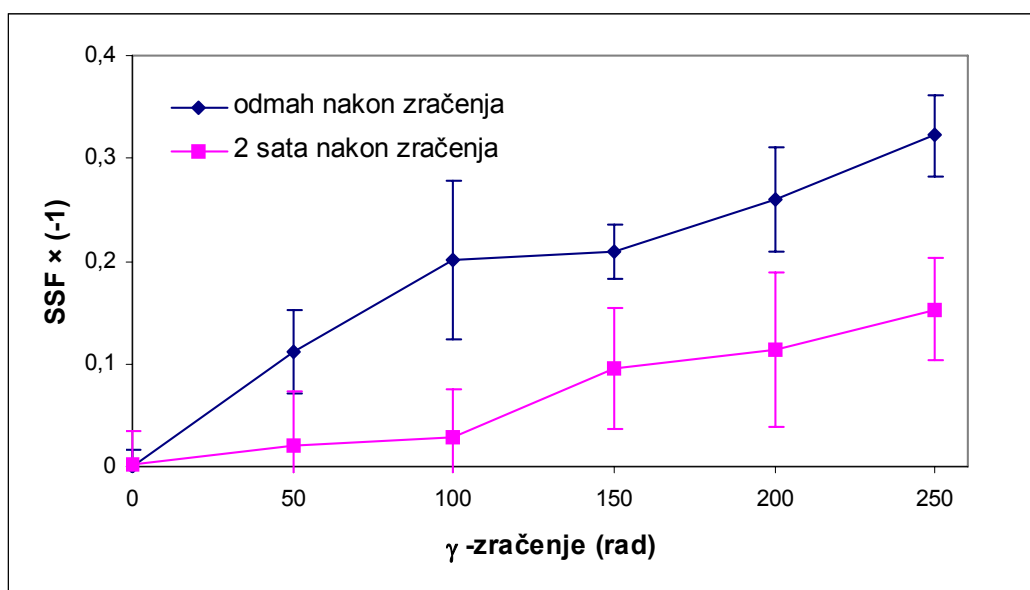


Slika 14. Stanice ovarija kineskog hrčka (CHO) izložene γ -zračenju (0-1500 rad).

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti kvadriplikata mjerenja sa pripadajućim standardnim devijacijama.

4.2.4. Humani limfociti HL-60

Humani limfociti HL-60 izloženi različitim dozama γ -zračenja, analizirani su odmah po zračenju te 2 sata nakon čuvanja u mraku na sobnoj temperaturi. Usporede li se dobiveni rezultati $SSF \times (-1)$ prikazani na **slici 15**, uočljivo je da je u limfocitima 2 sata po zračenju došlo do indukcije popravka DNA te da je razlika u količini popravljene DNA u odnosu na prvotno oštećenu DNA veća kod viših doza primjenjenog zračenja. Doza γ -zračenja od 250 rad uzrokuje povećanje $SSF \times (-1)$ vrijednosti do 0.332 ± 0.036 , a nakon aktivacije mehanizma popravka smanjuje se na vrijednost od 0.153 ± 0.050 .

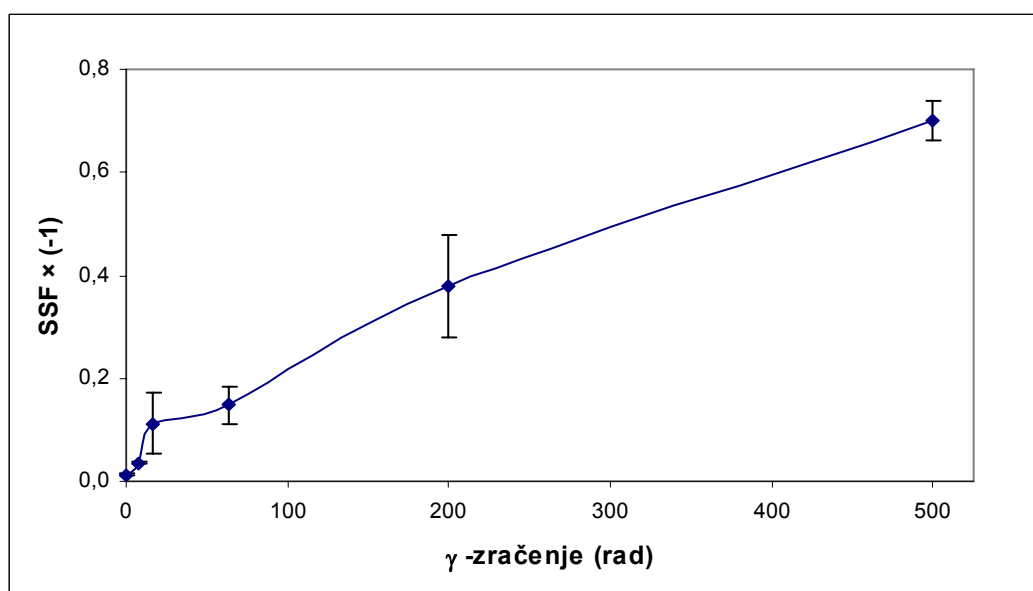


Slika 15. Učinak *in vitro* γ -zračenja na DNA humanih limfocita. Limfociti su ozračeni na ledu.

Donja krivulja pokazuje smanjenje DNA oštećenja nakon inkubacije limfocita kroz 2 sata na sobnoj temperaturi. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti kvadriplikata mjerenja sa pripadajućim standardnim devijacijama.

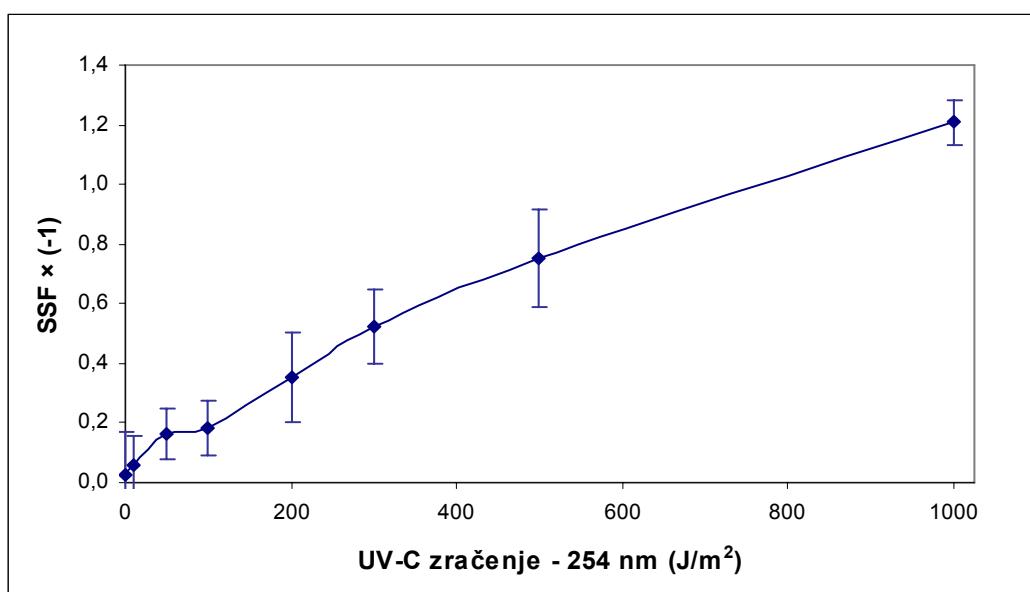
4.2.5. Kultura humanih HeLa stanica

Učinak γ -zračenja na kulturu humanih HeLa stanica prikazan je na **slici 16**. Na osnovi snižavanja fluorescencije tijekom nekoliko minuta denaturacije u alkalnom mediju uočljiv je dozni odgovor izračunatih $SSF \times (-1)$ vrijednosti za doze zračenja od 16 do 500 rad. Doza od 500 rad uzrokuje povećanje $SSF \times (-1)$ vrijednosti do 0.701 ± 0.039 , što predstavlja 80%-tnu narušenost cjelovitosti oštećene DNA u odnosu na neozračeni kontrolni uzorak.



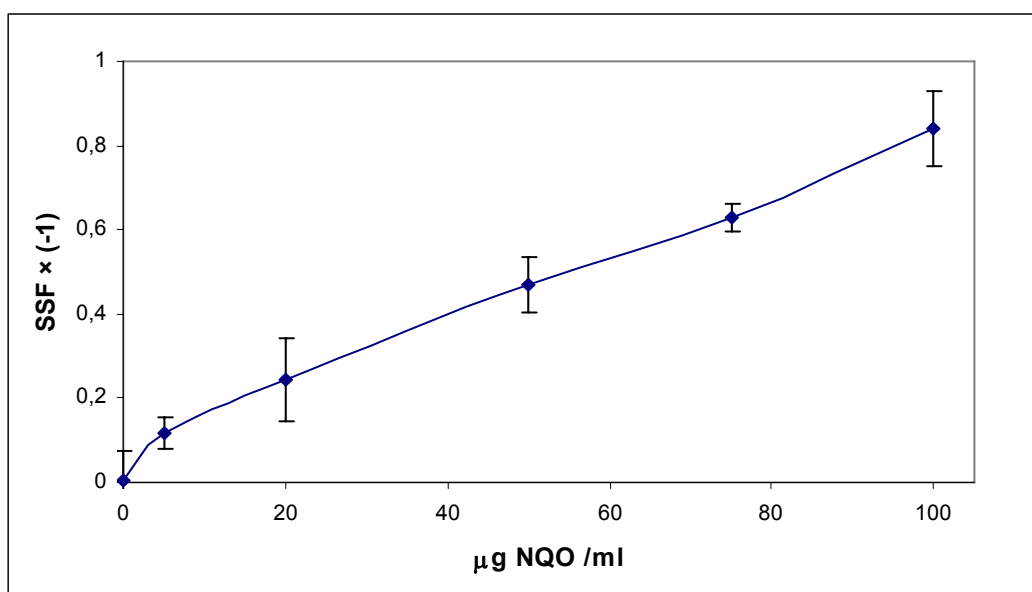
Slika 16. Učinak *in vitro* γ -zračenja na DNA HeLa stanica koje su ozračene na ledu dozama od 0-500 rad. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti kvadrplikata mjerenja sa pripadajućim standardnim devijacijama.

Na kulturu humanih HeLa stanica također je ispitan utjecaj UV-C zračenja (254 nm). Izračunate SSF vrijednosti pokazale su dozni odgovor u cijelom spektru primjenjenih doza zračenja (0-1500 J/m²) pri čemu je najviša doza prouzrokovala povećanje primarnih oštećenja te snižavanje cjelovitosti DNA od 93% (SSF×(-1) = 1.208 ± 0.077) u odnosu na kontrolni neozračeni uzorak (**Slika 17**).



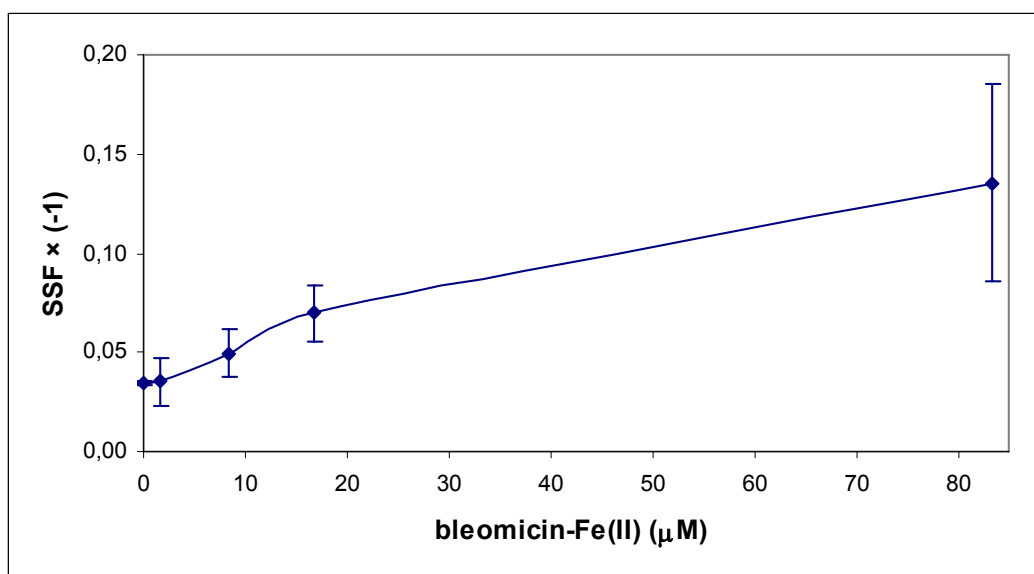
Slika 17. Učinak *in vitro* UV-C zračenja (254 nm) na DNA kulture HeLa stanica ozračenih na ledu dozama od 0 do 100 J/m². Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti kvadriplikata mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama.

Zatim je na kulturu humanih HeLa stanica ispitan *in vitro* učinak NQO-a u hranjivoj podlozi tijekom 90 minuta inkubacije na 37 °C i 5%-tnom atmosferom CO₂ (Slika 18). Povećanjem koncentracije NQO sa 0.005 na 0.1 µg /ml hranjive podloge primjećeno je i povećanje primarnih oštećenja DNA. tako su vrijednosti SSF×(-1) za najnižu koncentraciju NQO iznosile 0.117 ± 0.039 , a za najvišu koncentraciju 0.840 ± 0.090 odnosu na kontrolne HeLa stanice. Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti da inkubacijom HeLa stanica na hranjivoj podlozi s NQO-om nastaju dodatna oštećenja DNA čime se narušava njena cjelovitost (24 do 86 % u odnosu na kontrolni uzorak).



Slika 18. *In vitro* učinak različitih doza (0-100 µg /ml) 4-nitrokinolin-N-oksida (NQO) na DNA HeLa stanica nakon inkubacije u kulturi tijekom 90 minuta. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti kvadriplikata mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama.

Kako bi se unijela poznata količina oštećenja DNA HeLa stanice su izložene i *in vitro* djelovanju bleomicin-Fe(II) kompleksa (0-83 μM). **Slika 19** jasno pokazuje povećanje $\text{SSF} \times (-1)$ vrijednosti od 0.034 ± 0.001 za kontrolni uzorak na 0.136 ± 0.050 za uzorak s najvišom koncentracijom bleomicin-Fe(II) kompleksa.



Slika 19. Učinak različitih doza (0-83,3 μM) bleomicin-Fe(II) kompleksa na HeLa stanice.

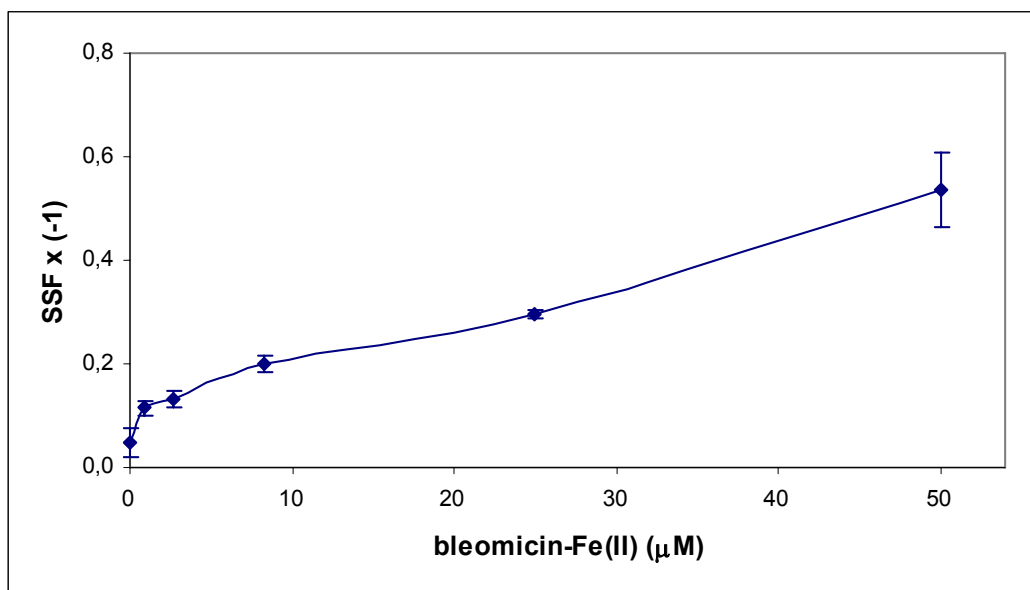
Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti kvadriplikata mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama.

4.3. Razvoj i primjena brze mikrometode (Fast Micromethod[®]) na morskim beskralješnjacima

Primjena brze mikrometode (Fast Micromethod[®]) na morskim beskralješnjacima zahtjevala je optimalizaciju dosadašnjih uvjeta rada na kulturama stanica i tkivima sisavaca u vidu odabira optimalne količine DNA, vremena i temperature liziranja, pH i ionske jakosti denaturirajućeg medija, te na koncu intervala praćenja promjene fluorescencije u uzorcima.

4.3.1. Nativni preparat DNA iz gonada trpa *Holothuria tubulosa* (3567A)

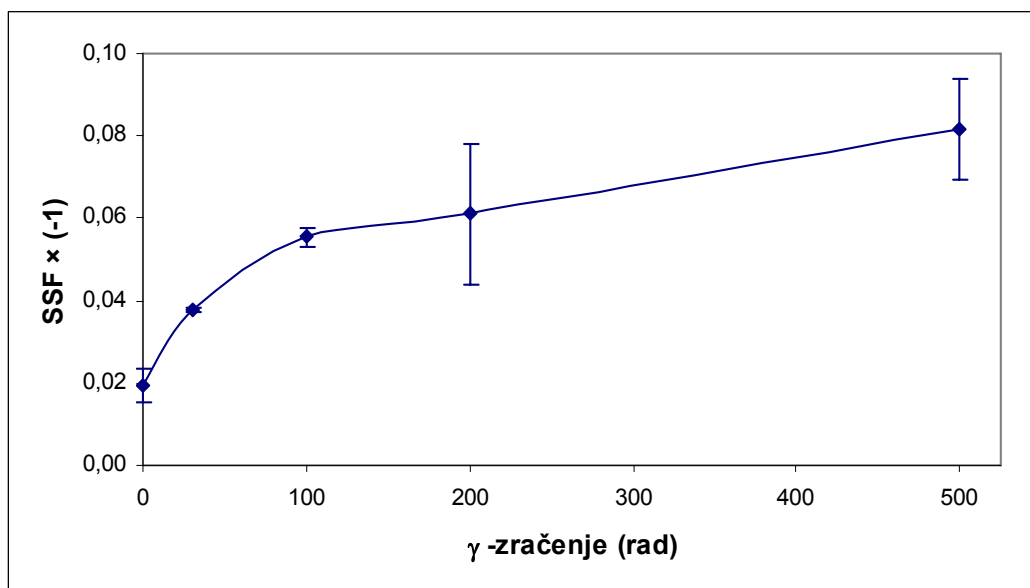
Utjecaj različitih doza bleomicin-Fe(II) kompleksa *in vitro* (0-50 μ M) na nastanak oštećenja (jednolančanih i/ili dvolančanih lomova) DNA izolirane iz gonada trpa *Holothuria tubulosa* (3567A) prikazan je na **slici 20**. Dobivene su SSF \times (-1) vrijednosti od 0.047 ± 0.028 za kontrolni netretirani uzorak pa do 0.537 ± 0.072 za najvišu primjenjenu koncentraciju bleomicin-Fe(II) kompleksa. Može se uočiti da znatno niže koncentracije bleomicin-Fe(II) kompleksa uzrokuju nastanak većeg broja jednolančanih i/ili dvolančanih lomova DNA u nativnom preparatu DNA gonada trpa *Holothuria tubulosa* te homogenatima tkiva jetre laboratorijskih miševa (NMRI) (**slika 13**) u odnosu na kulture humanih HeLa stanica (**slika 19**).



Slika 20. *In vitro* utjecaj bleomicin-Fe(II) kompleksa na indukciju lomova DNA izolirane iz gonada trpa *Holothuria tubulosa* (3567A). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti kvadriplikata mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama.

4.3.2. Stanice spužve *Suberites domuncula*

Stanice spužve *Suberites domuncula* ozračene su različitim dozama γ -zračenja (0-500 rad). **Slika 21** pokazuje dozni odgovor i neznatno povećanje u izračunatim $SSF \times (-1)$ vrijednostima od 0.002 ± 0.004 za kontrolni uzorak do 0.055 ± 0.002 za dozu od 100 rad, nakon čega se s povećanjem doze do 500 rad izračunate vrijednosti povećavaju na 0.082 ± 0.012 . Može se uočiti da i relativno visoke doze γ -zračenja uzrokuju nastanak znatno niže količine oštećenja DNA u odnosu na oštećenja DNA nastala u stanicama ovarija kineskog hrčka (**slika 14**) te kulturi HeLa stanica (**slika 16**), odnosno da i znatno niže doze zračenja (50-250 rad) primjenjene na humanim limfocitima (**slika 15**) homogenatima tkiva jetre i mišića (**slika 12**) te limfoblastima laboratorijskih miševa (**slika 10**) uzrokuju nastanak znatno većeg oštećenja DNA.



Slika 21. Učinak različitih doza (0-500 rad) γ -zračenja na DNA stanica spužve *Suberites domuncula*. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti kvadrplikata mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama.

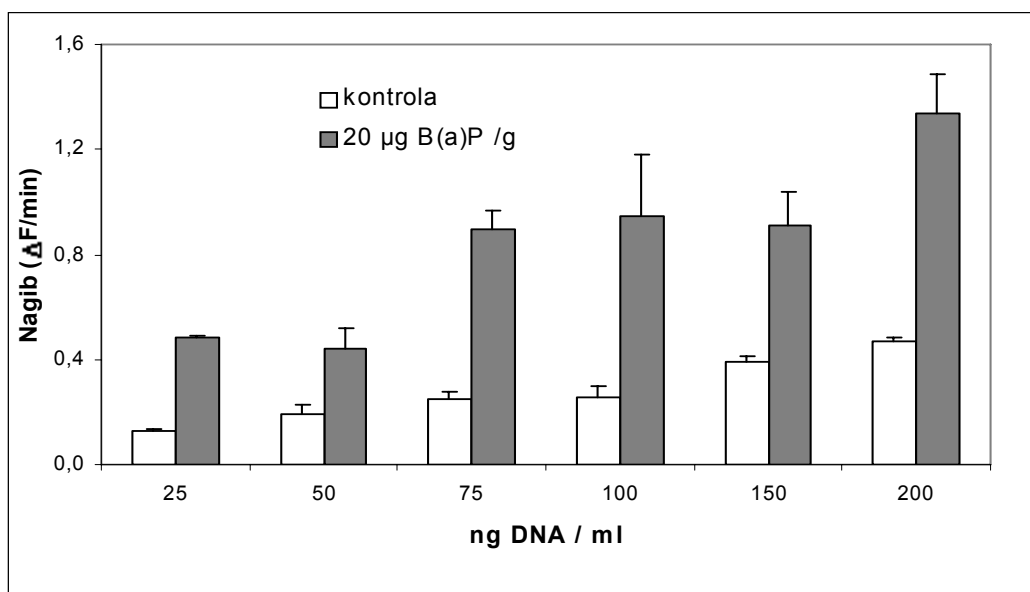
4.3.3. Homogenat škrga dagnje *Mytilus galloprovincialis*

Za određivanje cjelovitosti tj. oštećenja DNA u homogenatima škrga dagnji *Mytilus galloprovincialis* brzom mikrometodom (Fast Micromethod®) najprije je bilo potrebno odrediti optimalne uvjete denaturacije (vrijeme, temperatura, ionska jakost i napose pH vrijednost) te optimalnu količinu DNA u uzorku. Ujedno se uz upotrebu modelnih zagađivala u laboratorijskim pokusima odredio njihov učinak na DNA stanica škrga dagnji te usporedio s učinkom aktualnih genotoksičnih zagađivala miješanog tipa prisutnih na odabranim mikrolokacijama.

4.3.3.1. Ovisnost kinetike denaturacije ds-DNA o količini DNA i pH denaturirajućeg medija

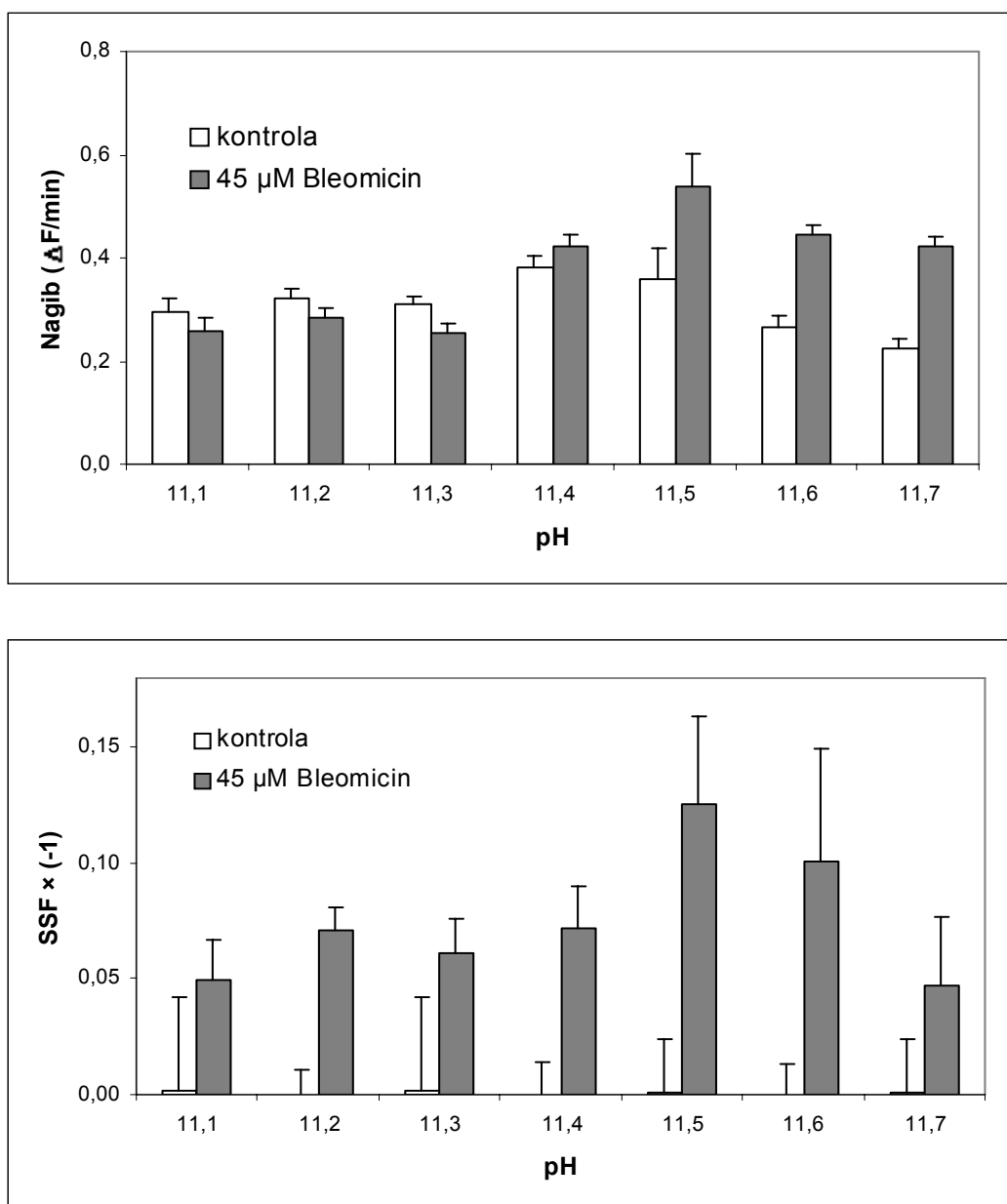
Ovisnost kinetike denaturacije DNA homogenata škrga dagnji o pH vrijednostima denaturirajućeg medija i količini DNA u uzorku istražena je u *in vitro* izvedenim pokusima s bleomicin-Fe(II) kompleksom kao i s B[a]P *in vivo* injektiranim dagnjama (Slika 22). U tim pokusima korišteni su promjenjivi pH uvjeti denaturirajućeg medija (11.0 - 11.7), kao i različita koncentracija DNA u jažicama mikroploča (25 - 200 ng DNA/ml).

Ustanovljeno je da je najpovoljnija količina same DNA u uzorku 100 ng DNA/ml kod koje je uočena najveća razlika u nagibima linearnih (početnih) djelova krivulja denaturacije homogenata škrga dagnji izloženih djelovanju 20 µgB[a]P-a/g školjke u odnosu na kontrolni uzorak; 0.942 ± 0.129 (4) min⁻¹ prema 0.256 ± 0.021 (4) min⁻¹ za kontrolu. Takva razlika u nagibima krivulja od cca 4 puta postojana je u rasponu koncentracija DNA od 75 do 150 ng/ml te se pri količini DNA od 200 ng/ml smanjuje



Slika 22. Utjecaj količine DNA u uzorku na nagibe linearnog (početnog) dijela denaturacijskih krivulja (nakom 5 minuta denaturacije pri pH 11.5) homogenata škrge kontrolnih i *in vivo* tretiranih dagnji sa 20 μg B[a]P /g dagnje nakon 2 sata inkubacije u bazenima s protočnom morskom vodom . Dobiveni rezultati prikazuju srednje vrijednosti i standardne derivacije od 4 replikata.

Nagibi linearnih (početnih) dijelova krivulja denaturacije DNA kontrolnog uzorka i homogenata škrge dagnje *in vitro* izloženog djelovanju 45 μM bleomicin-Fe(II) kompleksa, gdje je denaturacija ovisna o količini primarnih oštećenja DNA te proces denaturacije slijedi kinetiku prvog reda (vidi **sliku 9**), izračunati su iz odnosa razlika fluorescencija i vremena denaturacije izraženog u minutama, pokazuju najveće međusobne razlike pri pH vrijednosti denaturirajućeg medija od 11.5 kao i najviša dobivena razlika u izračunatim $SSF \times (-1)$ vrijednostima od 0.125 ± 0.038 (4) za tretirani uzorak u odnosu na 0.000 ± 0.023 za kontrolu (**Slike 23 a, b**).



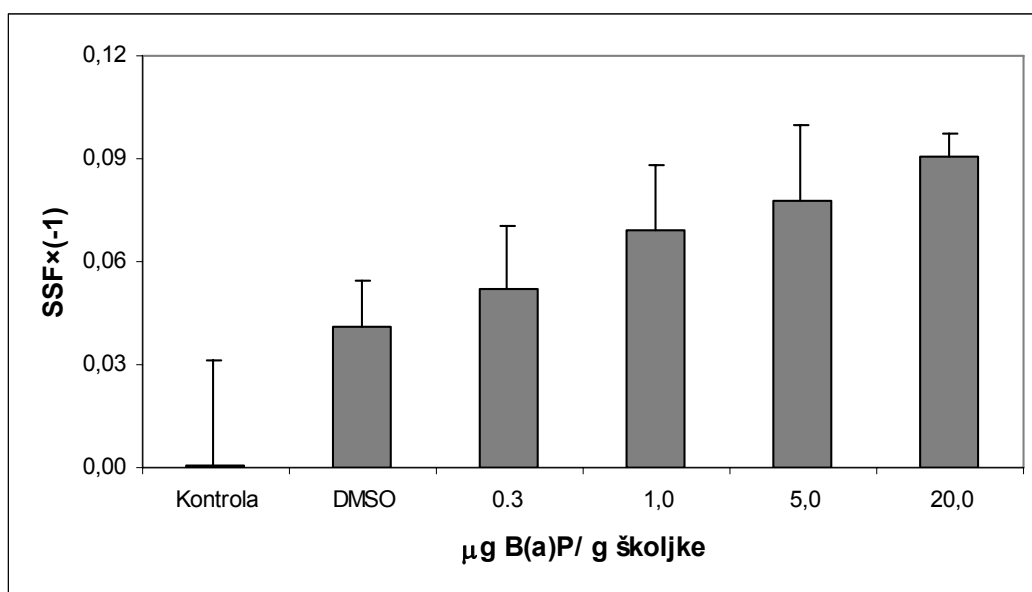
Slika 23. a) Utjecaj pH vrijednosti denaturirajućeg medija na nagibe linearnog (početnog) dijela denaturacijskih krivulja i **b)** $\text{SSF} \times (-1)$ vrijednosti homogenata škrva kontrolnih i *in vitro* tretiranih dagnji 4.5 μM bleomicin-Fe(II) kompleksom. Dobiveni rezultati prikazuju srednje vrijednosti i standardne devijacije od 4 replikata.

4.3.3.2. Utjecaj umjetnih zagađivala na oštećenja DNA

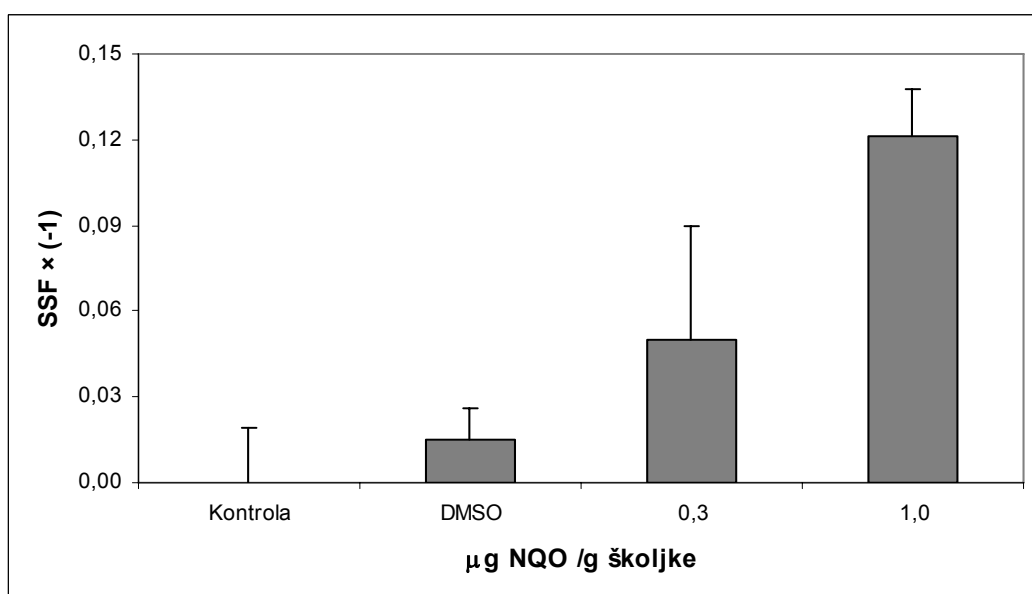
Utjecaj umjetnih zagađivala na nastanak oštećenja DNA, a samim tim i na kinetiku denaturacije kompleksa PicoGreen[®]-a i ds-DNA, izučavan je primjenom direktnih i/ili indirektnih mutagena/kancerogena benz[a]pirena (B[a]P) i 4-nitrokinolin-N-oksida (NQO).

Homogenati škrge dagnji injektiranih s različitim dozama B[a]P (od 0 do 20 μg B[a]P po gramu tjelesne težine školjke pokazuju dozni odgovor tj. porast koeficijenta jednolančanih lomova. Izračunate $\text{SSF} \times (-1)$ vrijednosti su za uzorak injektiran s 50 μl DMSO iznosile 0.041 ± 0.013 , a za najveću koncentraciju zagađivala otopljenom u istom volumenu otapala 0.090 ± 0.007 (**Slika 24**).

Homogenati škrge dagnji injektiranih s različitim dozama NQO-a (od 0 do 1 μg po gramu težine školjke) također pokazuju dozni odgovor tj. porast koeficijenta jednolančanih lomova, $\text{SSF} \times (-1)$ vrijednosti od 0.015 ± 0.012 za uzorak injektiran s 50 μl DMSO do 0.121 ± 0.016 za najveću koncentraciju zagađivala otopljenom u istom volumenu otapala (**Slika 25**).

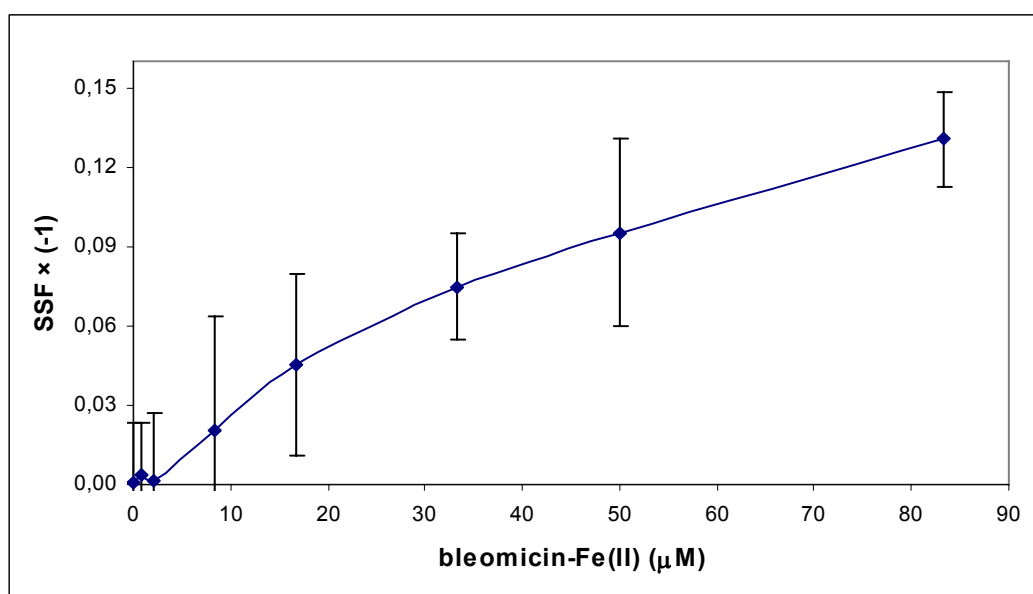


Slika 24. Učinak benzoapirena (B[a]P) na DNA homogenata škrga dagnji injektiranih različitim dozama B[a]P-a (0-20 µg/g školjke) nakon 90 minuta inkubacije u bazenima s protočnom morskom vodom. Rezultati prikazuju srednje vrijednosti i standardne devijacije od 4 mjerenja.



Slika 25. Učinak 4-nitrokinolin-N-oksida (NQO) na DNA homogenata dagnji injektiranih različitim dozama NQO-a (0-1 µg/g školjke) nakon 90 minuta inkubacije u bazenima s protočnom morskom vodom. Rezultati prikazuju srednje vrijednosti i standardne devijacije od 4 mjerenja.

S ciljem da se unese poznata količina lomova u DNA škrga dagnji njihovi homogenati izloženi su *in vitro* djelovanju bleomicin-Fe(II) kompleksa (0 do 83.3 μM). Na **slici 26** uočljiv je dozni odgovor tj. porast $\text{SSF} \times (-1)$ vrijednosti u odnosu na kontrolni uzorak pri čemu najviša primjenjena koncentracija od 83.3 μM bleomicin-Fe(II) kompleksa u datim laboratorijskim uvjetima pokazuje povećanje $\text{SSF} \times (-1)$ vrijednosti na 0.130 ± 0.018 tj. uzrokuje smanjenje cjelovitosti DNA za 16%.



Slika 26. *In vitro* učinak bleomicin-Fe(II) kompleksa (0-83.3 μM) na nastanak primarnih oštećenja - jednolančanih lomova DNA homogenata škrga dagnji. Rezultati prikazuju srednje vrijednosti i standardne devijacije 4 mjerenja.

4.3.3.3. Biomonitoring (Projekt Jadran)

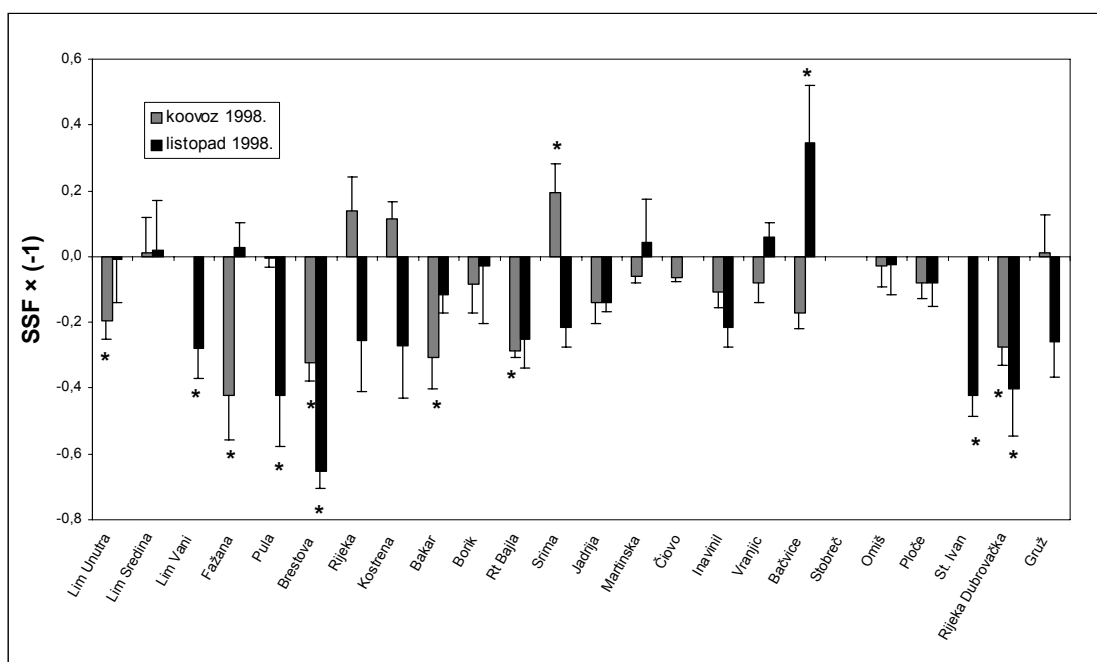
Brza mikrometoda (Fast Micromethod[®]) primijenjena je u biomonitoringu genotoksičnog zagađenja i učinka zagađivala miješanog tipa na sjeveroistočnoj obali Jadrana, od Limskog kanala na sjeverozapadu (44°58' N, 13°44' E) do luke Gruž na jugoistoku (42°39' N, 18°05' E) (vidi: Materijali i metode, **slika 6**). Dagnje su uzorkovane s 24 različite lokacije (tzv. engl. "hot spots") od kojih su neke pod utjecajem industrijskih otpadnih voda (Inavinil, Vranjic), komunalnih otpadnih voda (Pula, Vranjic), ili se nalaze u neposrednoj blizini lučica i brodskih pristaništa (Fažana, Pula, Brestova, Rijeka, Stobreč, Ploče, Rijeka Dubrovačka i Gruž) ili poljoprivrednih područja (Sveti Ivan), a neke od njih nalaze se i u neposrednoj blizini riječnih ušća (Martinska, Omiš, Sveti Ivan, Ploče i Rijeka Dubrovačka). Srednje pH vrijednosti morske vode tijekom više godina na mjestima uzorkovanja iznosile su 8.1 ± 0.06 . Izmjerene vrijednosti saliniteta su tijekom lipnja, kolovoza i listopada iznosile 31.78 ± 1.02 psu (engl. "**p**ractical **s**alinity **u**nits"), dok su u ožujku bile znatno niže i iznosile 25.95 ± 1.32 psu. Temperatura morske vode od lipnja do listopada bila 22.3 ± 2.3 odnosno tijekom ožujka 13.4 ± 1.0 °C. Značajnija odstupanja od prosječnih vrijednosti saliniteta i temperature morske vode zabilježena su na lokaciji Rijeka Dubrovačka. Srednje vrijednosti saliniteta iznosile su 6.59 ± 2.17 psu, a temperature 14.0 ± 1.3 °C u ožujku, te 18.6 ± 2.0 °C tijekom ostalih mjeseci uzorkovanja.

Dobiveni rezultati koji opisuju cjelovitost DNA škruga dagnji prikazani su histogramima kao srednje vrijednosti negativnih koeficijenata jednolančanih lamova (SSF-a) s pripadajućim standardnim devijacijama. (**Slika 27 a, b, c i d**).

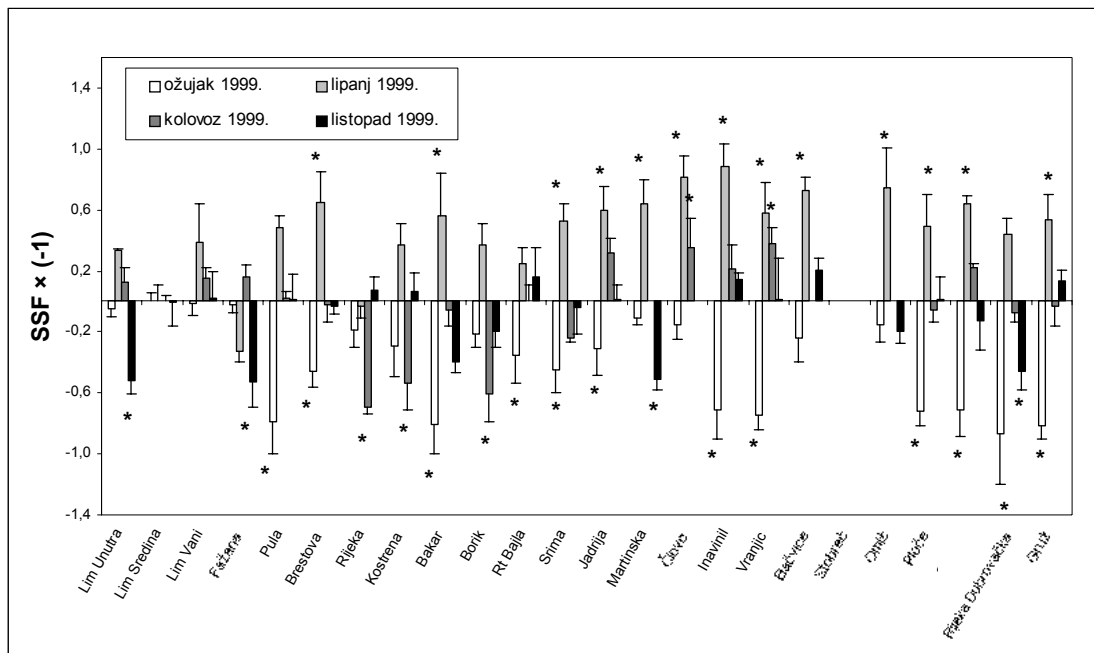
Dobivene srednje vrijednosti SSF-a za svaku od lokacija uspoređivane su sa srednjom vrijednošću SSF-a referentne lokacije (Lim Sredina) za svako uzorkovanje posebno te su na taj način određene lokacije kod kojih se SSF-ovi značajno razlikuju od vrijednosti SSF-a referentnog uzorka. Statistički značajne razlike SSF vrijednosti od referentnog uzorka naznačene su zvjezdicama iznad ili ispod X-osi histograma za svaku pripadajuću lokaciju.

Najviše značajnih razlika od SSF vrijednosti referentnog uzorka zabilježeno je u lipnju 1999. (na 13 lokacija), lipnju 2000. (na 18 lokacija) te kolovozu 2000. godine (na 12 lokacija) što ukazuje na velike negativne promjene u cjelovitosti DNA referentnog uzorka ili na postojanje sezonske varijacije na većem broju ispitivanih lokacija. Lokacije Vranjic, Inavinil, Srima i Bačvice, koje su uzorkovane 14, 13, 13 i 10 puta tijekom vremenskog perioda od kolovoza 1998. do listopada 2001. godine pokazuju značajno povećanje $SSF \times (-1)$ vrijednosti u čak 29, 31, 39 i 40 % uzoraka sa navedenih lokacija. Značajno sniženje srednjih $SSF \times (-1)$ vrijednosti u odnosu na referentni uzorak zabilježeno je u ožujku 1999. i to kod 12 uzoraka, a uzorci homogenata škrge dagnji s lokacije Rt Bajla, koji su uzorkovani 13 puta od kolovoza 1998. do listopada 2001. godine pokazuju niže $SSF \times (-1)$ vrijednosti u odnosu na referentni uzorak u 39% slučajeva.

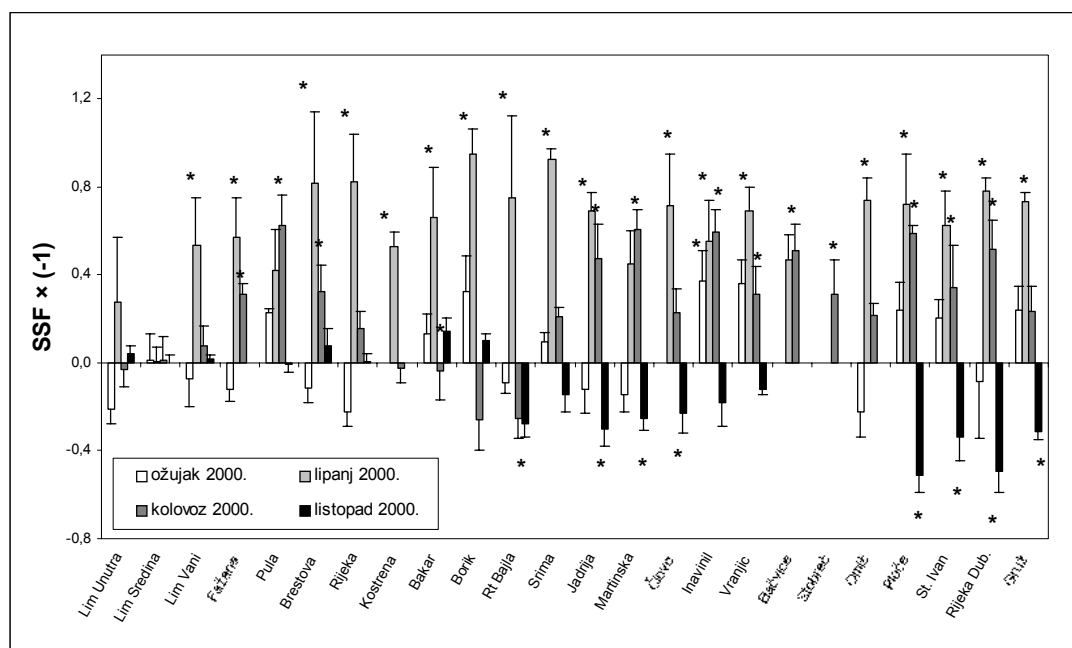
Najviše $SSF \times (-1)$ vrijednosti izmjerene u uzorcima iz lipnja 1999. godine zabilježene su na lokacijama Inavinil (0.882 ± 0.152), Čiovo (0.819 ± 0.138), Omiš (0.742 ± 0.265), Bačvice (0.726 ± 0.930) i Vranjic (0.581 ± 0.196) što ukazuje na povećanje DNA niske cjelovitosti za 87, 85, 82, 81 i 74% u odnosu na referentni uzorak (**Slika 27b**), dok su u lipnju 2000. godine $SSF \times (-1)$ vrijednosti na navedenim lokacijama iznosile 0.551 ± 0.187 , 0.714 ± 0.235 , 0.740 ± 0.103 , 0.471 ± 0.110 i 0.689 ± 0.112 ; odnosno povećanje količine DNA niske cjelovitosti u odnosu na referentnu iznosilo je 72, 81, 82, 66 i 80% (**Slika 27c**). Nasuprot tome u ožujku 1999. godine za 12 lokacija dobivene su niže $SSF \times (-1)$ vrijednosti u odnosu na referentni uzorak, od kojih njih 8 imaju vrijednosti od 0.712 do 0.867 (**Slika 27b**).



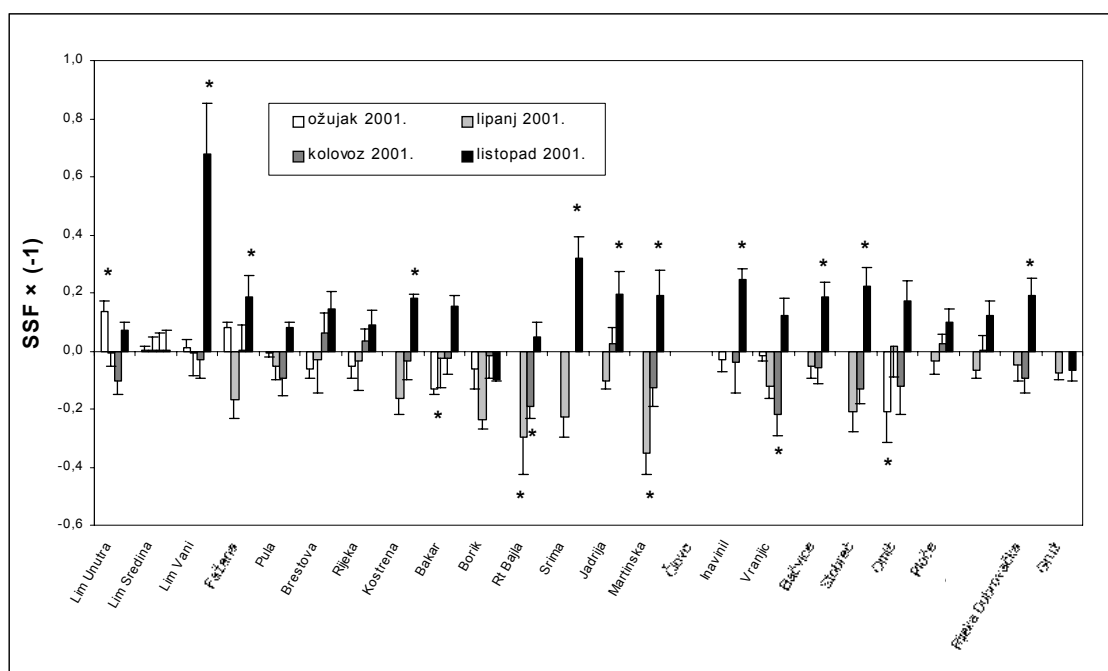
Slika 27. a) Negativne srednje vrijednosti koeficijenta jednolančanih lomova DNA homogenata škrga dagnji s prirodnih lokacija ([vidi](#): Materijali i metode, slika 6) tijekom 2 uzorkovanja u 1998. godini. Statistički značajna razlika u odnosu na referentni uzorak označena je zvjezdicom (*), $p < 0.05$.



Slika 27. b) Negativne srednje vrijednosti koeficijenta jednolančanih lomova DNA homogenata škrga dagnji s prirodnih lokacija ([vidi](#): Materijali i metode, slika 6) tijekom 4 uzorkovanja u 1999. godini. Statistički značajna razlika u odnosu na referentni uzorak označena je zvjezdicom (*), $p < 0.05$.

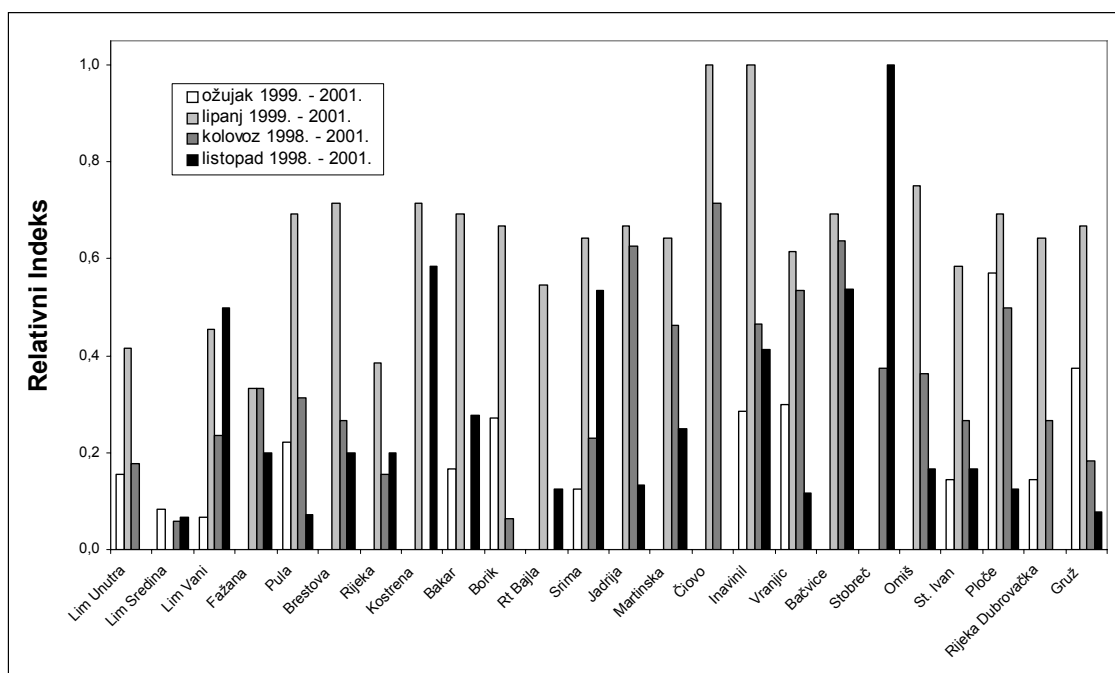


Slika 27. c) Negativne srednje vrijednosti koeficijenta jednolančanih lomova DNA homogenata škrga dagnji s prirodnih lokacija ([vidi](#): Materijali i metode, slika 6) tijekom 4 uzorkovanja u 2000. godini. Statistički značajna razlika u odnosu na referentni uzorak označena je zvjezdicom (*), $p < 0.05$.

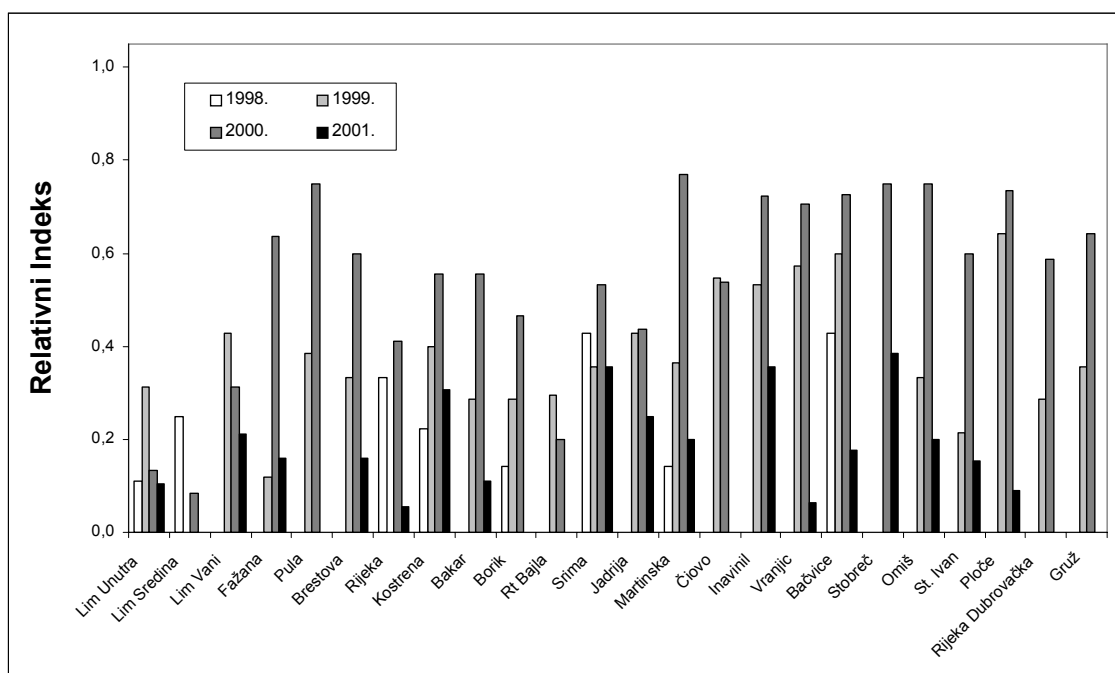


Slika 27. d) Negativne srednje vrijednosti koeficijenta jednolančanih lomova DNA homogenata škrga dagnji s prirodnih lokacija ([vidi](#): Materijali i metode, slika 6) tijekom 4 uzorkovanja u 2001. godini. Statistički značajna razlika u odnosu na referentni uzorak označena je zvjezdicom (*), $p < 0.05$.

Dobivene srednje $SSF \times (-1)$ vrijednosti svih uzoraka uspoređene su sa $SSF \times (-1)$ vrijednošću dobivenog usljed *in vitro* učinka $83.3 \mu\text{M}$ bleomicin-Fe(II) kompleksa na DNA homogenata škrge kontrolnih dagnji (0.128 ± 0.025) (**Slika 26**). Rezultati za dagnje uzorkovane od kolovoza 1998. do listopada 2001. godine prikazani su kao relativni indeksi učestalosti pojavljivanja većeg stupnja oštećenja cjelovitosti DNA od onog koje na DNA homogenata škrge kontrolnih dagnji uzrokuje $83.3 \mu\text{M}$ bleomicin-Fe(II) kompleks. Relativni indeksi učestalosti predstavljaju udio uzoraka sa $SSF \times (-1)$ vrijednostima većim od 0.128 ± 0.025 u ukupnom broju uzoraka za svaku lokaciju posebno te su takvi mjesečni i godišnji indeksi prikazani na **slikama 28 a i b**. Uočava se da je učestalost većeg smanjenja cjelovitosti DNA, u odnosu na smanjenje cjelovitosti DNA usljed *in vitro* djelovanja $83.3 \mu\text{M}$ bleomicin-Fe(II) kompleksa na homogenat škrge kontrolnih dagnji, bila najizraženija tijekom 1999. godine, te da su rezultati u mjesecu lipnju tijekom višegodišnjeg razdoblja također pokazivali najveću učestalost takvih pojava. Nasuprot tome, najmanja učestalost rezultata koji govore u prilog sniženoj cjelovitosti DNA većoj od one koju izaziva *in vitro* $83.3 \mu\text{M}$ bleomicin-Fe(II) kompleks na homogenat škrge kontrolnih dagnji, uočena je tijekom 2001. godine.

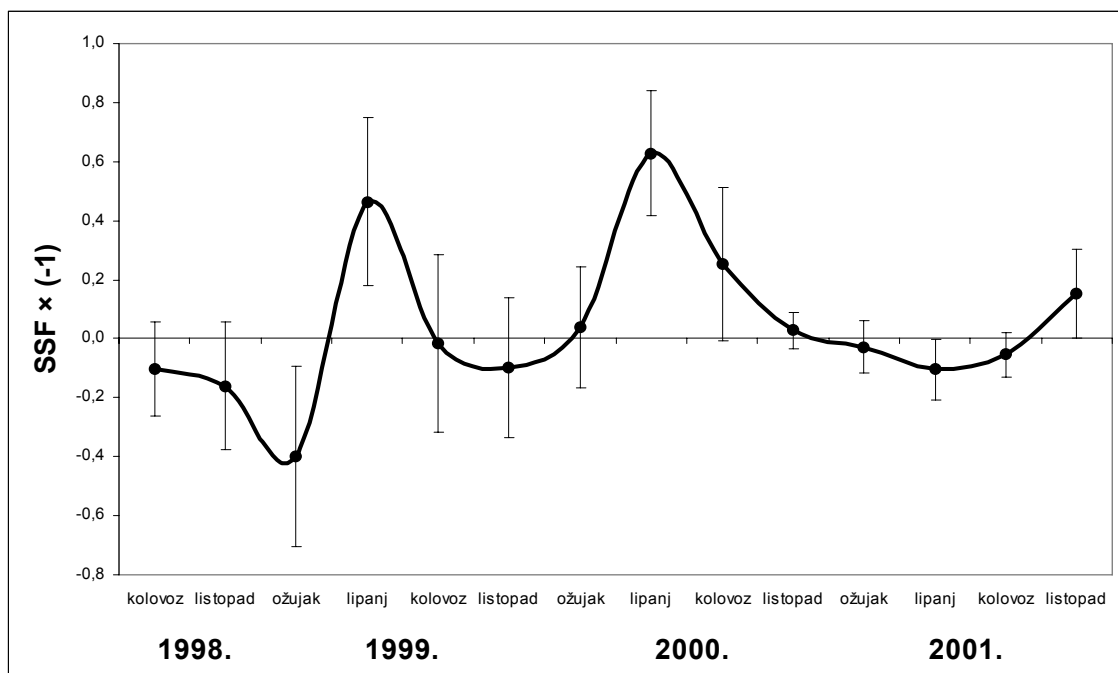


Slika 28. a) Relativni godišnji indeksi učestalosti (frekvencije) pojavljivanja SSF \times (-1) vrijednosti DNA homogenata škrga dagnji sa prirodnih lokacija većih od SSF \times (-1) vrijednosti (0.128 ± 0.025) dobivene usljed *in vitro* djelovanja 83.8 μ M bleomicin-Fe(II) kompleksa na homogenat škrga kontrolnih dagnji.

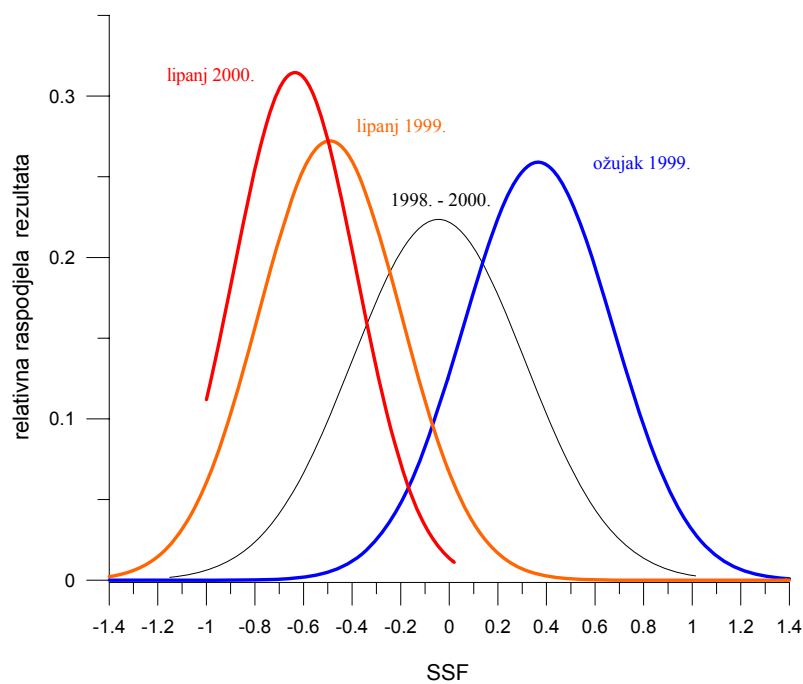


Slika 28. b) Relativni mjesečni indeksi učestalosti (frekvencije) pojavljivanja SSF \times (-1) vrijednosti DNA homogenata škrga dagnji sa prirodnih lokacija većih od SSF \times (-1) vrijednosti (0.128 ± 0.025) dobivene usljed *in vitro* djelovanja 83.8 μ M bleomicin-Fe(II) kompleksa na homogenat škrga kontrolnih dagnji.

Tijekom lipnja 1999. i 2000. godine izračunate vrijednosti bile su značajno više, a u ožujku 1999. godine niže, od zabilježenih prosječnih srednjih $SSF \times (-1)$ vrijednosti u odnosu na referentni uzorak (Lim Sredina). Stoga se sumnja u mogućnost postojanja sezonskih varijacija cjelovitosti DNA škruga dagnji ili se jednostavno radi o značajnim promjenama u cjelovitosti DNA škruga dagnji s referentne lokacije Lim Sredina tijekom navedenih mjeseci. Promjene u srednjim $SSF \times (-1)$ vrijednostima od kolovoza 1998. do listopada 2001. godine prikazane su na **Slici 29**. Raspodjela srednjih $SSF \times (-1)$ vrijednosti DNA homogenata škruga dagnji za uzorkovanja u ožujku 1999. te lipnju 1999. i 2000. godine kao i raspodjela svih izračunatih srednjih SSF vrijednosti u razdoblju od kolovoza 1998. do listopada 2001. godine prikazani su na **Slici 30**. Uočljiva je raspodjela srednjih SSF vrijednosti za ožujak 1999. godine u odnosu na raspodjelu svih srednjih SSF vrijednosti pomaknuta k višim (pozitivnim) SSF vrijednostima, a raspodijele srednjih SSF vrijednosti za lipanj 1999. i 2000. godine pomaknute su ka nižim (negativnim) SSF vrijednostima. Stoga bi bilo neophodno uz postojeći referentni uzorak upotrebljavati i poseban kontrolni uzorak homogenata škruga dagnji (ili ds-DNA visoke cjelovitosti nekog drugog izvora), koji će se koristiti kao interni standard pri višegodišnjem određivanju koeficijenata jednolančanih lomova DNA. Na taj bi način mogli odrediti radi li se o sezonskim varijacijama karakterističnim za populaciju dagnji ili se radi o specifičnim promjenama cjelovitosti DNA u uzorcima uzrokovanih učinkom genotoksičnih zagađivala na datim mikrolokacijama.



Slika 29. Sezonske promjene $SSF \times (-1)$ vrijednosti DNA škrga dagnji s prirodnih lokacija tijekom 14 uzorkovanja od kolovoza 1998. do listopada 2000. godine.



Slika 30. Relativna raspodjela srednjih SSF vrijednosti DNA škrga dagnji.

5. RASPRAVA

Usprkos rastućem zanimanju za problematiku određivanja genotoksičnih agensa u morskom ekološkom sustavu još uvijek nije dostignuta zadovoljavajuća razina procjene genotoksičnog rizika. Brojnim *in vitro* tehnikama kao što su Ames test (Ames i sur., 1973), Microtox test (Bulich i Isenberg, 1981) i Mutatox test (Kwan i sur., 1990) moguće je odrediti toksičnost i genotoksičnost nekog određenog zagađivala. Međutim, za procjenu ekotoksikološkog rizika potrebno je odrediti genotoksični učinak zagađivala na morske organizme, pri čemu je važno paziti na način i vrijeme izlaganja organizma zagađivalima prisutnim u moru, njihovom metabolizmu te indukciji oštećenja i popravka DNA u ciljanom tkivu/organu promatranog organizma. Zbog toga je važno razvijati *in vivo* metode na osnovu kojih je moguća stvarna procjena učinka zagađivala na dati organizam te na osnovu toga predvidjeti ukupni genotoksični rizik. Važno je osigurati i razviti takve testove koji će razlučiti te usporediti rizike koji nastaju djelovanjem zagađivala prirodnog porijekla i onih koji su u okolinu dospjeli antropogenim djelovanjem. Potrebno je također odrediti mjesta uzorkovanja te odabrati odgovarajuće vrste organizama te tkiva i organa koji će se koristiti u programima biološkog monitoringa. Da bi se procijenio utjecaj zagađivala antropogenog porijekla potrebno je proučiti podatke kemijske analize sakupljane kroz više godina i desetljeća te na osnovi uočenih promjena pretpostaviti koliki dio danas uočenih zagađivala potiče od ljudske djelatnosti, naročito na mjestima ušća rijeka, gradskih lučkih pristaništa te koliki je utjecaj industrijskih otpadnih voda.

Značajan broj oštećenja, tj. lomova lanaca DNA nastaje i tijekom njihovog određivanja usljed datih analitičkih uvjeta. Pri tom dolazi do prikrivanja stvarnog učinka zagađivala što sasvim sigurno snizuje osjetljivost primjenjene tehnike. Razvijeno je nekoliko metoda koje minimaliziraju neke od problema koji utječu na nastanak dodatnih oštećenja DNA. Tako npr. centrifugiranjem u alkalnom gradijentu saharoze (Dean i sur., 1966; Lett, 1981), pri $\text{pH} > 12.5$ dolazi do potpune denaturacije ds-DNA, a alkalno-labilna mjesta prelaze u jednolančane lomove, a kelatni agensi mogu djelovati kao oksidirajući ili reducirajući agensi, te je metodu vrlo teško primjeniti na različite izvore DNA. Alkalnim filter eluiranjem (Kohn i sur., 1976;

Kohn, 1991) se može odrediti količina ss-DNA ovisno o njihovoj veličini uz upotrebu filtera bez mehaničke fragmentacije uzorka. Međutim metoda je dugotrajna te se relativno mali broj uzoraka može simultano analizirati. Kako se ss-DNA određuje na osnovi kinetike elucije sa filtera primjena metode ovisi i o izvoru DNA odnosno njenoj kompleksnosti (duljini, proteinskoj organizaciji) te mogućnošću deproteinizacije kromatina. Nadalje, primjena alkalne denaturacije (pri pH > 12.5, nakon čega se pri neutralnom pH u svrhu renaturacije nastalih ss-DNA koristi ultrazvuk usljed čega se snizuje osjetljivost metode) i hidroksiapatitne kromatografije (Anhström i Erikson, 1973, 1981) kojom se odvajaju ss- od ds-DNA i na osnovi njihovih količina procjenjuje stupanj oštećenja DNA, ovisna je o izvoru DNA te o samoj alknoj denaturaciji uzorka DNA. Ova metoda omogućava istovremenu analizu velikog broja uzoraka ali zahtjeva više od 10^5 stanica po uzorku. Pri fluorescentnoj analizi DNA "odmotavanja" (engl. "unwinding") nakon neutralizacije uzorka za fluorimetrijsko određivanje količine ds-DNA, koristi se etidij-bromid koji je ujedno i kancerogen, a metoda zahtjeva veliku količinu ishodnog materijala, > 10^6 stanica, što je često vrlo teško osigurati. Primjena modernih tehnika određivanja lomova lanaca DNA u pojedinim izoliranim stanicama, kao što su primjena "Comet" tehnike (Ostling i Johanson, 1984; Singh i sur., 1988; Olive i sur., 1990) i protočne citofluorimetrije (Rydberg, 1984; Affengartner i Burkat, 1992) pokazuju prednosti u točnoj i ispravnoj procjeni učinka zagađivala na DNA svake pojedine stanice, ali su one dugotrajne te teško prilagodljive primjeni na različitim tkivima. Svaka od navedenih metoda i tehnika pokazuje i dodatna specifična ograničenja pri određivanju samo pojedinih vrsta oštećenja DNA, pri čemu su neke vrste oštećenja DNA zanemarene. Upravo iz tog razloga što do sada razvijene tehnike i metode određivanja oštećenja tj. cjelovitosti DNA nisu zadovoljavajuće sa stajališta rutinskih i jednostavnih načina primjene te su praćene poteškoćama prilikom analize velikog broja uzoraka kao i vremenom potrebnim za ukupnu analizu, potaknulo je razmišljanje o pokušaju primjene PicoGreen®-a (Haugland, 1996), fluorokromatskog bojila koje se specifično i postojano veže za ds-DNA, kao potencijalno pogodnog reagensa za razlučivanje udjela

DNA niske cjelovitosti u uzorku.

Najprije je proučen utjecaj količine DNA i pH uvjeta na intenzitet signala tj. emisiju svjetlosti nastalog kompleksa: PicoGreen[®]-a i DNA. Uočeno je da je PicoGreen[®] visokospecifičan za ds-DNA u vrlo širokom spektru koncentracija DNA u otopini te da je pogodan za primjenu i u uvjetima visokog alkaliteta i ionske jakosti (Batel i sur., 1999). Naime, zabilježen intenzitet fluorescencije nastalog kompleksa PicoGreen[®]-a i ds-DNA (nedenaturirana DNA teleće štitnjače) je u rasponu koncentracija od 3.3 do 106.7 ng /ml od 9.4 do 6.6 puta veći od kompleksa PicoGreen[®]-a i denaturirane DNA (ss-DNA), a ovisan je i o pH medija pri čemu je značajno naglo snižavanje intenziteta fluorescencije zabilježeno nakon povećanja pH iznad 12.2. Stoga je PicoGreen[®] odabran kao pogodan fluorokromatski reagens koji i pri visokim alkalnim uvjetima stvara stabilan i postojan kompleks s ds-DNA koji se fluorimetrijskim mjerenjem može kvantizirati. Osjetljivost metode i široki linearni raspon fluorimetrijskog signala omogućuju detekciju 1-32 ng DNA na 300 ul reakcijske smjese (3.3-106.7 ng /ml), a udio ss-DNA u ukupnoj fluorescenciji iznosi je od 10 - 13 %.

Postojano vezivanje PicoGreen[®]-a za ds-DNA i u alkalnoj sredini, u odnosu na kompleks sa ss-DNA, sve do vrlo visokih i konačno kritičnih vrijednosti pH medija (ovisno o vrsti tj. izvoru DNA) nakon čega dolazi do naglog povećanja denaturacije ds-DNA pri čemu PicoGreen[®] ostaje u kompleksu sa ss-DNA, koji je nepostojaniji te pokazuje znatno nižu razinu intenziteta fluorescencije, omogućilo je kreiranje i razvoj takve analitičke tehnike kod koje bi se u relativno kratkom vremenskom periodu mjerila cjelovitost DNA u uzorcima. U tu je svrhu uz uporabu PicoGreen[®]-a razvijana i optimalizirana brza mikrometoda (Fast Micromethod[®]) određivanja oštećenja DNA.

Kinetika denaturacije ds-DNA u alkalnoj sredini pri pH vrijednostima između 11.0 i 12.0 ovisi o vrlo malim promjenama pH vrijednosti medija kao i o veličini fragmenata ds-DNA (Erikson i sur., 1979; Yamanishi i sur., 1987). Takva "prijelazna regija" pH vrijednosti kod koje se odvija relativno spora i mjerljiva denaturacija ds-DNA nalazi se u tetrapropil amonij hidroksid - EDTA sadržavajućem mediju u području od 11.0 do 11.8, dok je kod NaOH sadržavajućeg medija ona pomaknuta za 0.5 pH jedinica ka višim vrijednostima (Kohn i sur., 1976) što je potvrđeno i ovim istraživanjima pri upotrebi DNA telećeg timusa. Konkretno, ujecaj pH na fluorescenciju naročito se uočava kod pH vrijednosti viših od 12.1 pri čemu dolazi do povećanja kinetike denaturacije ds-DNA a time i slabljenja fluorescentnog signala čime je smanjena i mogućnost razlikovanja ss- i ds-DNA vezanih s PicoGreen[®]-om tako da je na pH 12.6 gotovo nemoguće razlikovati ss- od ds-DNA. Stoga je i odabrana pH vrijednost denaturirajućeg medija za rad s stanicama i homogenatima tkiva sisavaca bila ono koja osigurava zadovoljavajuću kinetiku denaturacije i iznosila je 12.4.

Razvitak novih, bržih, sveobuhvatnijih metoda koje su i jednostavnije za izvedbu imperativ modernog pristupa primjene biomonitoringa tj. praćenja učinka genotoksičnih zagađivala na prirodne populacije. Opća tendencija u takvim nastojanjima je svakako i smanjenje volumena uzorka (manja količina ishodnog materijala: tkiva, stanica), skraćenje vremena potrebnog za analizu te široka primjenjivost metode na različite organizme. U tu je svrhu razvijena i optimalizirana brza mikrometoda (Fast Micromethod[®]) određivanja oštećenja tj. cjelovitosti DNA. Pri samom kreiranju analitičke procedure nastojalo se izbjeći uočene manjkavosti primjenjivanih analitičkih tehnika. Praćenjem kinetike denaturacije ds-DNA, koja je ovisna o njejoj cjelovitosti, u lizatu stanica ili još bolje homogenata tkiva pri alkalnim pH uvjetima kroz optimalni vremenski period bez predhodne izolcije i pročišćavanja same DNA, izbjegnuta je dodatna manipulacija uzorcima i oštećenje DNA te je povećana osjetljivost metode.

Osnovna ideja rada je bila omogućiti određivanje količine DNA visoke cjelovitosti u stanicama i homogenatima tkiva različitih organizama (sisavci te potom morski beskralješnjaci). Liziranje stanične membrane i organela provodilo se djelovanjem uree i SDS-a u alkalnoj sredini te se istovremeno omogućilo stvaranje kompleksa ds-DNA s fluorokromatskim bojilom PicoGreen[®]-om. Nakon toga slijedi kontrolirana reakcija "odmotavanja" DNA pri vrlo visokom pH medija pri čemu, ovisno o količini primarnih oštećenja DNA (lomovi lanaca, AP mjesta), dolazi do snižavanja količine kompleksa PicoGreen[®]-a i ds-DNA što se prati fluorimetrijski, tj. bilježi se opadanje fluorescencije tijekom vremena uz pretpostavku da DNA s manjom količinom primarnih oštećenja pokazuje postojanija svojstva u smislu deaktivacije kompleksa sa PicoGreen[®]-om tijekom nešto duljeg vremenskog perioda i u izrazito alkalnoj sredini.

Primjena brze mikrometode (Fast Micromethod[®]) isprobana je najprije na kulturi stanica ovarija kineskog hrčka (CHO stanice) i homogenatima tkiva i stanicama miševa (mišićno tkivo i tkivo jetre laboratorijskih miševa NMRI, te mišji DBA/2 limfoblasti L517Y), kao i na kulturama humanih stanica (HL-60 i HeLa stanice) radi razvoja modela i metodologije (Batel i sur., 1999). Nakon toga je radi procjene izloženosti morskih organizama genotoksičnim agensima u moru ova metoda prilagođena uvjetima rada s morskim beskralješnjacima (nativna DNA izolirana iz gonada trpa *Holothuria tubulosa*, stanice spužve *Suberites domuncula*, homogenat škrga dagnji *Mytilus galloprovincialis*).

Kao modelni, test i bioindikatorski organizam za biomonitoring istraživanja duž jadranske obale (Projekt Jadran) zbog svojih bioindikatorskih karakteristika izabrana je dagnja, dok su škrge dagnji zbog njihove kontinuirane izloženosti utjecaju zagađivala odabrane kao ciljano tkivo proučavanja cjelovitosti DNA. Na škrgama dagnji koje su bile izložene djelovanju zagađivala uočene su morfološke promjene, poput povećanja postlateralnih stanica (Rasmusen, 1982), dilatacija krvnih prostora (Sunila i Lindström, 1985) i prodor granularnih hemocita (Sunila, 1988).

Promjene na DNA i u mehanizmima i aktivaciji popravka nastalih oštećenja nastaju tijekom normalnih fizioloških procesa, zatim starenjem (zatajivanje mehanizama popravka DNA) te konačno i izlaganjem genotoksičnim zagađivačima (Shugart, 1990; Lindahl, 1993; Friedberg, 1995).

Brza mikrometoda (Fast Micromethod[®]) je najprije razvijena za primjenu na stanicama tkiva sisavaca (Batel i sur., 1999). Limfoblasti laboratorijskih miševa (L517Y, DBA/2) ozračeni γ -zrakama odnosno inkubirani u hranjivoj podlozi s 4-nitrokinolin-N-oksidiom (NQO) pokazuju porast broja primarnih oštećenja DNA ovisno o primjenjenoj dozi zračenja tj. kemijskog ksenobiotika. Uočen je i utjecaj same količine DNA tj. broja stanica korištenih u pokusu na osjetljivost fluorescentnog signala te je stoga važno odabrati onu količinu DNA odnosno, kod rutinskih analiza, okvirni broj stanica, koja će osigurati kako željenu osjetljivost tako i prihvatljivo rasipanje rezultata (nisku standardnu devijaciju). Moguće objašnjenje navedenog fenomena je ovisnost denaturacije DNA o količini prisutnih proteina u matriksu koji zbog umrežavanja s DNA znatno utječu na denaturaciju DNA usprkos uvjetima visokog pH i ionske jakosti (deproteinizirajući uvjeti). Inkubacijom mišjih limfoblasta u hranjivoj podlozi tijekom 90 minuta s poznatim kancerogenom NQO-om dolazi do interkaliranja kinolonske molekule između baznih parova DNA, nastanka kovalentnih adukata na baze DNA, te nastanka lomova lanaca DNA (Nagao i Sagimura, 1976) što je uočeno i u ovom radu povećanjem SSF $\times(-1)$ vrijednosti od 0.119 ± 0.066 do 0.814 ± 0.141 za doze od 0.2 odnosno 3 μM NQO-a (Batel i sur., 1999). Nadalje, i homogenati mišićnog tkiva i tkiva jetre laboratorijskih miševa NMRI ozračeni γ -zrakama pokazuju povećanje primarnih oštećenja DNA sve do dok ne dostignu maksimalne SSF $\times(-1)$ vrijednosti koje su postojane s daljnjim povećanjem primjenjene doze ksenobiotika, dok su homogenati jetre *in vitro* tretirani bleomicin-Fe(II) kompleksom povećanjem doze do 16 μM pokazali gotovo potpunu denaturaciju DNA (Batel i sur. 1999). Stanice ovarija kineskog hrčka izložene γ -zračenju također su pokazale pozitivan odgovor u smislu povećanja primarnih oštećenja DNA (Batel i sur. 1999).

Pokusi s kulturama humanih stanicama provedeni su na kulturi HeLa stanica izloženim γ - i UV-C zračenju, odnosno *in vitro* djelovanju NQO-a i bleomicin-Fe(II) kompleksa te su uspoređeni sa rezultatima tzv. "Comet" tehnike (Bihari i sur., 2002) pri čemu je uočena jednaka osjetljivost obje metode, ali je brzom mikrometodom (Fast Micromethod[®]) moguće mjeriti učinak šireg raspona koncentracija zagađivala. Tako je dozni odgovor (nastanak oštećenja DNA) brzom mikrometodom (Fast Micromethod[®]) zabilježen u rasponima γ -zračenja od 0 do 500 rad, UV-C zračenja od 0 do 1000 J/m² te inkubaciju HeLa stanica s 0-0.5 μ M NQO-a, dok su kod "Comet" tehnike ti rasponi kod kojih je zabilježeno povećanje SSF \times (-1) vrijednosti bili znatno uži i znosili 30-200 rad, 50-500 J/m² ali i nešto širi pri inkubaciji stanica s NQO-om u rasponu koncentracija od 0.1-1 μ M. Dozni odgovor zabilježen je i prilikom γ -zračenja humanih limfocita HL-60 (Batel i sur., 1999), a nešto niže vrijednosti SSF \times (-1) zabilježene su nakon inkubacije stanica kroz 2 sata na sobnoj temperaturi pri čemu dolazi do popravka zračenjem nastalih oštećenja DNA. Stoga primjena ove analitičke tehnike doprinosi izučavanju i praćenju i cjelovitosti DNA kod osoba koje su podvrgnute zračenju i kemoterapiji tj. agensima koji uzrokuju jednolančane i dvolančane lomove DNA (Chauvin i sur., 1998; Batel i sur., 1999). HeLa stanice izložene γ - i UV-C zračenju, odnosno djelovanju NQO-a i bleomicin-Fe(II) kompleksa također su pokazale da cjelovitost DNA ovisi o dozi (vremenu izlaganja, koncentraciji) genotoksičnih zagađivala.

Nakon razvoja metode na stanicama i homogenatima tkiva sisavaca, brza mikrometoda (Fast Micromethod[®]) u ovom je radu optimalizirana i primjenjena na morskim beskralješnjacima s ciljem procjene učinka genotoksičnih zagađivala u aktualnom zagađenju mora. Stoga je u radu najprije korišten nativni preparat DNA gonada trpa *Holothuria tubulosa*, radi optimalizacije lizirajućih (vrijeme, ionska jakost) i denaturirajućih uvjeta pri kojima dolazi do "odmotavanja" DNA (alkalni pH), s obzirom na jedostavniju organizacijsku strukturu genoma beskralješnjaka. I u ovom slučaju odabran je bleomicin-Fe(II) kompleks, 0-50 μ M, kako bi u *in vitro* pokusima na goloj DNA sa sigurnošću nastala mjerljiva oštećenja DNA tj. značajne razlike u

izjerenim fluorescencijama odnosno izračunatim koeficijentima jednolančanih lomova (SSF vrijednost od -0.537 za najvišu koncentraciju bleomicin-Fe(II) kompleksa, što ukazuje na 70%-tno sniženje količine DNA visoke cjelovitosti) te je tako potvrđena pretpostavka o nešto nižoj optimalnoj pH vrijednost od 11.5 pri "odmotavanju" tj denaturaciji ds-DNA morskih beskralješnjaka. Zatim je kao modelni organizam odabrana spužva *Suberites domuncula*, čije su izolirane stanice izložene utjecaju γ -zračenja (0-500 rad) te uz uvjete denaturacije prilagođene DNA morskih beskralješnjaka (pH 11.5) zabilježen dozni odgovor nastalih jednolančanih lomova.

Zbog već prethodno navedenih razloga kao modelni organizam odabrana je dagnja *Mytilus galloprovincialis*, a škrge dagnji kao modelno tkivo zbog svoje konstantne izloženosti kako toksičnim tako i genotoksičnim zagađivalima prisutnim u moru. Najprije je bilo neophodno proučiti utjecaj pH denaturirajućeg medija na kinetiku denaturacije ds-DNA te utjecaj količine DNA na profil denaturacijske krivulje (promjena nagiba krivulje tijekom vremena) pri čemu su kao modelna zagađivala korišteni *in vivo* B[a]P (20 μ g/g dagnje), i *in vitro* bleomicin-Fe(II) kompleks (45 μ M). Dobivene optimalne vrijednosti pH 11.5 te 100 ng DNA /ml korišteni su u daljnjem radu, kako pri primjeni umjetnih zagađivala tako i u biomonitoringu.

Usporedbom nagiba krivulja denaturacije ds-DNA, koja ovisi o njenoj cjelovitosti i slijedi kinetiku prvog reda, moguće je dobiti neupotrebljive rezultate jer bi uzorci sa značajno nižom cjelovitošću DNA davali prividno bolje rezultate (manji nagibi krivulja) od uzoraka s većom cjelovitošću DNA. Naime, kod uzoraka s vrlo niskom cjelovitošću DNA znatno su niže početne vrijednosti fluorescencije od referentnog uzorka te im već početkom denaturacije u alkalnoj sredini fluorescencija ne opada na isti način kao i kod uzoraka kod kojih je cjelovitost DNA bolja te su i nagibi tih krivulja manji. Isto tako, izračunavajući i snižavanje relativnih vrijednosti fluorescencije svakog od uzorka ne možemo dobro kvantitativno odrediti koliko je zapravo neki uzorak lošije i manje cjelovitosti DNA u odnosu na referentni, jer ukoliko se radi o uzorku s velikim brojem alkalno-labilnih mjesta i jednolančanih lomova u DNA on će već po početku denaturacije u alkalnoj sredini pokazivati vrlo male

vrijednosti fluorescencije iako je koncentracija DNA neupitna, te će smanjenje fluorescencije za npr. 10% od početne vrijednosti u odnosu na isto takvo relativno smanjenje fluorescencije u referentnom uzorku dovesti do zablude o kvaliteti cjelovitosti DNA promatranog uzorka. Stoga, iako su uočene razlike u nagibima krivlja denaturacije DNA homogenata škrga dagnji izloženih *in vivo* B[a]P (20 µg/g dagnje) i DNA homogenata škrga kontrolnih dagnji nije u radu primjenjivan takav način obrade rezultata.

Dagnje su zatim, kao test organizmi, bile izložene djelovanju različitih koncentracija modelnih genotoksičnih spojeva (B[a]P i NQO) u laboratorijskim uvjetima a promatran je i *in vitro* učinak različitih koncentracija bleomicin-Fe(II) kompleksa na DNA homogenata škrga kontrolnih dagnji. Na taj se način utvrdila i osjetljivost te preciznost same metode. Izračunate SSF \times (-1) vrijednosti za homogenate škrga dagnje injektiranih s 20 µg B[a]P /g iznosili su 0.090 \pm 0.007 (3), a onih injektiranih s 1 µg NQO /g 0.121 \pm 0.016 (3), dok je *in vitro* učinak 83,3 µM bleomicin-Fe(II) kompleksa na homogenat škrga kontrolnih dagnji izražen kao SSF \times (-1) vrijednost iznosi 0,130 \pm 0,018 (4), što ukazuje na povećanje količine DNA niske cjelovitosti za 19, 24 i 26 % u odnosu na referentne netretirane dagnje. Bihari i sur. (1990c) prethodno su primjenili metodu alkalnog filter eluiranja za određivanje oštećenja DNA stanica hemolimfe dagnji *Mytilus galloprovincialis* *in vivo* primjenom 5, 10 i 20 µg B[a]P-a odnosno NQO-a /g dagnji. Nakon injektiranja B[a]P i 1.5 sat inkubacije dagnji u bazenima s protočnom morskom vodom zabilježene SSF \times (-1) vrijednosti iznosile su: 0.052 \pm 0.013 (4), 0.091 \pm 0.019 (4), 0.180 \pm 0.027 (4) za navedene koncentracije zagađivala, a nakon 48 sati inkubacije uočeno je povećanje SSF \times (-1) vrijednosti za najnižu primjenjenu dozu odnosno smanjenje SSF \times (-1) vrijednosti za više koncentracije, te su iznosile: 0.096 \pm 0.029 (4), 0.012 \pm 0.008 (4) i 0.031 \pm 0.025 (4), što ukazuje na postojanje mahanizma popravka oštećene DNA. Slični rezultati dobiveni su i uz upotrebu NQO-a: nakon 1.5 sat inkubacije SSF \times (-1) vrijednosti iznosile su: 0.067 \pm 0.024 (4), 0.055 \pm 0.006 (4), 0.246 \pm 0.044 (4), nakon 24 sata: 0.103 \pm 0.020 (4), 0.135 \pm 0.010 (4), 0.100 \pm 0.010 (4), a nakon 5 dana

inkubacije: 0.043 ± 0.007 (4), 0.051 ± 0.012 , što ukazuje na nešto dulji vremenski period potreban za uspostavu popravka DNA odnosno opću toksičnost najviše koncentracije NQO-a jer su dagnje injektirane dozom od $20 \mu\text{g NQO /g}$ nakon 5 dana inkubacije uginule. Istu metodu primjenili su Batel i sur. (1994) te uz upotrebu 200, 400 i 800 nM bleomicin-Fe(II) kompleksa *in vitro* na stanicama hemolimfe dagnji dobivene su $\text{SSF} \times (-1)$ vrijednosti koje su iznosile 0.15, 0.20 i 0.28.

Kako je u uzorcima homogenata škrga dagnji (cca 100 mg mokre težine škrga u 2 ml pufera) upotrebom YOYO reagensa (fluorescencija: emisija 485 nm i ekscitacija 520 nm) određena količina DNA ($1-10 \mu\text{g DNA /ml}$ homogenata) prije samog određivanja cjelovitosti DNA brzom mikrometodom (Fast Micromethod[®]) homogenati koji su čuvani na -80°C , razrijeđivani su do radne koncentracije od 100 ng DNA po ml ($2.5 \text{ ng / jažici mikroploče}$) 10%-tnog DMSO-a u TE puferu pH 7.4. Time se je postigla jednolika količina ukupne DNA prisutne u svim jažicama mikroploča kao i u kvadriplikatima jednog te istog uzorka škrga pojedine dagnje s neke lokacije već i uopće kod svih uzoraka tijekom višegodišnjeg mjerenja ($2.5 \text{ ng / } 300 \mu\text{l}$ denaturacijske smjese pH 11.5 tj 8.33 ng DNA /ml). Međutim, cjelovitost same DNA bitno se razlikuje od uzorka do uzorka te su uočene i razlike u dobivenim SSF vrijednostima između pojedinih dagnji (homogenatima škrga) s iste lokacije i istog uzorkovanja. Naime, početne vrijednosti fluorescencije koje odgovaraju količini kompleksa PicoGreen[®]-a i ds-DNA variraju od uzorka do uzorka i ovise o količini DNA visoke cjelovitosti prisutne u uzorku, a izgleda i o sezonskim varijacijama svojstvenim svim uzorcima. Upravo je to dodatni razlog zbog kojeg je i primjenjeno izračunavanje tzv. koeficijenta jednolančanih lomova - SSF-a jer oni opisuju odnos između količine DNA visoke cjelovitosti (ds-DNA) prisutne u ispitivanim uzorcima u odnosu na ds-DNA u referentnom uzorku (homogenatu škrga dagnji sa referentne lokacije).

Kako je svaki organizam tj. jedinka karakterizirana specifičnim fiziološkim stanjem i kondicijom, na koje svakako utječu vanjski čimbenici moguće je ponekad i u grupi uzoraka sa iste lokacije u istom uzorkovanju naići na uzorke koji se svojom cjelovitošću DNA bitno razlikuju od dagnji iz iste grupe uzoraka. Uočeno je specifično sniženje vrijednosti SSF-a u lipnju 1999. i 2000. godine na gotovo svim postajama (**slike 27b i 27c**), dok je u ožujku 1998. godine (**slika 27a**) zabilježeno povećanje SSF vrijednosti, što uz postojeće razlike u cjelovitosti DNA u škrgama dagnji sa različitih lokacija u odnosu na referentni uzorak, ukazuje i na postojanje specifičnih sezonskih varijacija ili na smanjenje cjelovitosti DNA referentnog uzorka. Najugroženijim područjem pokazao se Kaštelanski zaljev (postaje Inavinil i Vranje) tj. šire splitsko područje (koje još obuhvaća i postaje Omiš, Bačvice i Čiovo) gdje su kod uzoraka homogenata škrge sa navedenih lokacija uočavane najviše SSF(-1) vrijednosti, posebno tijekom lipnja 1999. i 2000. godine.

Nadalje, usporedbom dobivenih SSF vrijednosti DNA homogenata škrge dagnji s prirodnih lokacija sa SSF vrijednošću dobivenog usljed učinka $83.3 \mu\text{M}$ bleomicin-Fe(II) kompleksa na DNA homogenata škrge kontrolnih dagnji uočava se da je tijekom 2000. godine najveća, a 1998. najmanja frekvencija uzoraka u kojih je relativna cjelovitost DNA jednaka ili manja od one u dagnji tretiranih navedenom koncentracijom zagađivala *in vitro* (**slika 28a**). Potvrda sezonskih varijacija koja je za lipanj karakterizirana pojavom većeg stupnja oštećenja DNA i/ili značajnom promjenom cjelovitosti DNA referentne populacije utvrđena je i povećanom frekvencijom uzoraka za koje su u lipnju 1999. i 2000., te kolovozu 2000. i listopadu 2001. godine, izračunate SSF vrijednosti bile manje od one dobivene usljed učinka navedenog zagađivala *in vitro*. Stoga je primjena internog standarda tj. uvođenje referentnog uzorka ds-DNA visoke cjelovitosti, koji bi se koristio pri svim mjerenjima imperativ pri daljnjim biomonitoring istraživanjima jer bi se na taj način moglo uočiti stvarno postojanje sezonskih varijacija u cjelovitosti DNA te izbjekao utjecaj zagađivala prisutnih u moru na referentnu DNA.

Usporedimo li dobivene rezultate s rezultatima određivanja primarnih oštećenja DNA metodom alkalnog filter eluiranja u morskih beskralješnjaka rovinjskog priobalja koja se već dulji niz godina primjenjuje u Zavodu za istraživanje mora u Rovinju (Batel i sur., 1994; Bihari i Batel, 1994; Vukmirović i sur., 1994), uočavaju se prednosti brze mikrometode (Fast Micromethod®). Ona je brža i jednostavnija za izvedbu, naročito kod velikog broja uzoraka sa više lokacija čime je njena primjena u biološkim postajama koje se bave biomonitoringom genotoksičnih zagađivala zanimljivija i opravdanija. Međutim, diskriminacija vrste primarnih oštećenja i određivanje umrežavanja DNA s DNA i/ili proteinima u homogenatu škrge dagnji nije dalo željene rezultate tako da su daljnja unaprijeđenja brze mikrometode (Fast Micromethod®) poželjna kako bi uz navedene prednosti postala široko primjenjivana u biomonitoring programima.

Ovaj rad pokazuje da je uz primjenu odgovarajućih modelnih genotoksičnih zagađivala na kulturama stanica i homogenatima tkiva brza mikrometoda (Fast Micromethod®) dovoljno osjetljiva, točna i precizna u određivanju cjelovitosti DNA. Primjenom brze mikrometode (Fast Micromethod®) dagnje mogu biti upotrijebljene kao test organizami, odnosno škrge dagnji, kao odabrani organ, pogodne su za ovakav način mjerenja oštećenja i popravka DNA te samim tim i za procjenu izloženosti dagnji genotoksičnim zagađivalima u moru. Procjena genotoksičnog rizika temelji se na proučavanju učestalosti primarnih oštećenja DNA (jednostruki i dvostruki lomovi DNA, AP mjesta) nastalih djelovanjem zagađivala kojima prethodi genotoksični stres te modulaciji popravka DNA. Na taj način u potpunosti je ostvaren cilj ovog istraživanja, a to je razvoj i prilagodba nove, relativno brze i jednostavne metode određivanja oštećenja, odnosno cjelovitosti DNA u kulturama stanica i homogenatima tkiva različitih organizama te njena primjena u biomonitoringu, odnosno utvrđivanju izloženosti prirodne populacije dagnji *Mytilus galloprovincialis* genotoksičnim zagađivalima i stupnju njihove ugroženosti u aktualnom zagađenju mora.

Istraživanja daju doprinos razvoju novog postupka i metode određivanja lomova dvostruke uzvojnice DNA, tj. optimalizaciju jednostavnije, brže i osjetljivije metode sa širokom primjenom; od analitičke kliničke uporabe do primjene u biomonitoringu. Razumijevanje i produbljavaње saznanja o osnovnim mehanizmima odgovora morskih beskralješnjaka na zagađenje genotoksinima može nam pomoći u odabiru markera biološkog učinka genotoksičnih zagađivala na organizme (tzv. molekularni biomarkeri), te boljem upoznavanju i razumijevanju utjecaja genotoksina na ugrožene vrste kao i za praćenje rasprostranjenosti genotoksičnih zagađivala u morskom ekološkom sustavu. Istraživanje daje pozitivan odgovor na pitanje primjenjivosti metode u biomonitoringu zagađivala, odabiru škrge dagnji kao ciljanog organa te same DNA kao molekularnog biomarkera odnosno krajnje točke učinka zagađivala. Dugoročno gledano, rezultati ovih istraživanja mogu se primjeniti u regulaciji upotrebe i planiranju prihvatljivih načina odlaganja tvari antropogenog podrijetla u okolišu, u ovom slučaju posebno genotoksina.

6. ZAKLJUČCI

1. Primjenom fluorokromatskog bojila PicoGreen[®]-a moguće je u denaturirajućem mediju (visoki alkalni pH i visoka ionska jakost) uz prisustvo ss-DNA, RNA i proteina preferencijalno određivanje ds-DNA.
2. Povećanjem pH denaturirajućeg medija iznad kritične vrijednosti, ovisno o izvoru DNA (sisavci, beskralješnjaci), specifična fluorescencija kompleksa ds-DNA i fluorokromatskog bojila PicoGreen[®]-a naglo opada.
3. Mala količina DNA (3000 stanica, 25 µg tkiva, 2.5 ng DNA) dovoljna je za određivanje cjelovitosti DNA brzom mikrometodom (Fast Micromethod[®]).
4. Brza mikrometoda (Fast Micromethod[®]) je razvijena testiranjem učinka modelnih zagađivala (UV-C i γ-zračenje, bleomicin-Fe(II) kompleks, NQO) na cjelovitost DNA limfoblasta i homogenata tkiva mišića i jetre laboratorijskih miševa, stanica ovarija kineskog hrčka (CHO stanice), kulture humanih limfocita (HL-60) i HeLa stanica.
5. Valjanost metode je testirana primjenom bleomicin-Fe(II) kompleksa na nativni preparat DNA izolirane iz gonada trpa *Holothuria tubulosa*, γ-zračenja na DNA stanice spužve *Suberites domunculate* te modelnih zagađivala (NQO, B[a]P, bleomicin-Fe(II) kompleksa) na DNA u homogenatima škrga dagnje *Mytilus galloprovincialis*.
6. Ustanovljeno je da primjenjena pH vrijednost denaturirajućih uvjeta u brzom mikrometodi (Fast Micromethod[®]) ovisi o strukturi DNA (sisavci, beskralješnjaci).

7. Primjenom brze mikrometode (Fast Micromethod[®]) za određivanje i praćenje oštećenja DNA u škrigama dagnje *Mytilus galloprovincialis* sakupljenih tijekom više godina (1998. - 2002.) s 24 različite lokacije uzduž istočne Jadranske obale, od Limskog kanala na sjeveru do Gruža na jugu, pokazuju da je područje kaštelanskog zaljeva (lokacije Inavinil i Vranjic) kao i šire splitsko područje najugroženije genotoksičnim agensima.

7. LITERATURA

- Accomando R., Viarengo A., Zoncheddu A., Orunesu M. (1988).** DNA polymerase activity in isolated nuclei from mussel digestive gland: a possible system for the evaluation of the rate of DNA repair induced by environmental genotoxic xenobiotics. *Aquat. Toxicol.* **11**, 396-397
- Accomando R., Viarengo A., Bordone R., Taningher M., Canesi L., Orunesu M. (1991).** A rapid method for detecting DNA strand breaks in *Mytilus galloprovincialis* Lam. Induced by genotoxic xenobiotic chemicals. *Int. J. Biochem.* **23**, 227-229
- Adams S. M., Shepard K. L., Gredley Jr. M. S., Jimenez B. D., Ryon M. G., Shugart L. R., McCarthy J. F. (1989).** The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress on fish. *Mar. Env. Res.* **28**, 459-464
- Affengartner I. M, Burkat W. (1992).** Assessment of radiation-induced DNA strand breaks and their repair in unlabeled cells. *Cytometry* **13**, 31-38
- Ahnström G., Erixon K. (1973).** Radiation induced strand breakage in DNA from mammalian cells. Strand separation in alkaline solution. *Int. J. Radiat. Biol.* **23**, 285-289
- Ahnström G., Erixon K. (1981).** Measurement of strand breaks by alkaline denaturation and hydroxyapatite chromatography. In: DNA repair. A laboratory manual of research procedures Vol.1, Part B, Eds. E. C. Friedberg, and P. C. Hanawalt, New York, Marcel Dekker, 403-418
- Akcha F., Izuel C., Venier P., Budzinski H., Bugerot T., Narbonne J. F. (2000a).** Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in benzo[a]pyrene-contaminated mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* **49**, 296-287
- Akcha F., Burgeot T., Budzinski H., Pfohl-Leszkowicz A., Narbonne J. F. (2000b).** Induction and elimination of bulky benzo[a]pyrene-related DNA adducts and 8-oxoGuo in mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed in vivo to B[a]P-contaminated food. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **205**, 195-206
- Akcha F., Ruiz S., Zamperion C., Venier P., Burgeot T., Cadet J., Narbonne J. F. (2000c).** Benzo[a]pyrene-induced DNA damage in *Mytilus galloprovincialis*, measurement of bulky DNA adducts and DNA oxidative damage in terms of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanine formation. *Biomarkers* **5**, 355-367
- Al-Sabti K., Kurelec B. (1985).** Induction of chromosomal aberrations in the mussel *Mytilus galloprovincialis* watch. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **35**, 660-665

- Ames B. N., Durston W. E., Yamasaki E., Lee F. D., (1973).** Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenate for activation and bacteria for detection. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **70**, 2281-2235
- Anderson S. L., Sadinski W., Shugart L., Brussard P., Depledge M., Ford T., Hose J., Stegeman J., Suk W., Wirgin I., Wogan G. (1994).** Genetic and molecular ecotoxicology: a research framework. Env. Health Perspect. **102**, 3-8
- Anderson S. L., Wild G. C. (1994).** Linking genotoxic responses and reproductive success in ecotoxicology. Env. Health Perspect. **102**, 9-12
- Anderson R. S., Döös J. E. (1983).** Activation of mammalian carcinogens to bacterial mutagens by microsomal enzymes from a pelecypod mollusk, *Mercenaria mercenaria*. Mutat. Res. **116**, 247-56
- Anderson R. S. (1985).** Biotransformation of benzo[a]pyrene by *Mercenaria mercenaria* and *Crassostrea virginica*. 3rd international symposium on responses of marine organisms to pollutants., Plymouth, 17-18 April
- Barry M. A., Eastman A. (1993).** Identification of deoxyribonuclease II as an endonuclease involved in apoptosis. Arch. Biochem. Biophys. **300**, 440-50
- Batel R., Bihari N., Kurelec B., Zahn R. K., Müller W. E. G. (1983).** Presence of mixed function oxygenase in some marine invertebrates. Thalasiasia Jugosl. **19**, 423-429
- 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. Anal. Biochem. **212**, 402-406
- Batel R., Vukmirović M., Jakšić Ž., Bihari, N. (1994).** Impact of pollution on DNA fragmentation in marine invertebrates. In: Use of aquatic invertebrates as tools for monitoring of environmental hazards., Ed. W. E. G. Müller, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York, 109-119
- Batel R., Bihari N., Fafandel M., Hamer B. (1997).** Biological effects of marine contaminants in the Rovinj area, Croatia (First year report), FAO/UNEP, Athena, 1-21
- Batel R., Jakšić Ž., Bihari N., Hamer B., Fafangel M., Chauvin C., Schröder H. C., Muller W. E. G., Zahn R. K. (1999).** A microplate assay for DNA damage determination (Fast Micromethod¹) in cell suspension and solid tissue. Anal. Biochem. **270**, 195-200

- Bayne B. L. (1976).** In: Marine mussels, their ecology and physiology. Ed. B. L. Bayne, Cambridge University Press, London, 506
- Bend J. R., James M. O., Dansette P. M. (1978).** In vitro metabolism of xenobiotic in some marine animals. *Ann. NY. Acad. Sci.* **277**, 505-521
- Bend J. R., James M. O. (1977).** Xenobiotic metabolism in marine and freshwater species. In: Biochemical and biophysical perspectives in marine biology., Vol. 4, Eds. D. C. Malins and J. R. Sorgent, Academic Press, London, 125-188
- Bickham J. W., Sandhu S., Hebert P. D. N., Chikhi L., Atwal R. (2000).** Effects of chemical contaminations on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Muttat. Res.* **463**, 33-51
- Bihari N., Najdek M., Floris R., Batel R., Zahn R. K. (1989).** Sediment toxicity assessment using bacterial bioluminescence, effect of unusual phytoplankton bloom. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **57**, 307-310
- Bihari N., Vukmirović M., Batel R., Zahn R. K. (1990a).** Application of the SOS *umu*-test in detection of pollution using fish liver S9 fraction. *Comp. Biochem. Physiol. C-Comp. Pharmacol. Toxicol.* **95**, 15-18
- Bihari N., Batel R., Zahn R. K. (1990b).** The use of alkaline elution procedure to measure DNA damage in crab hemolymph treated with benzo[a]pyrene. In: 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.*, Volume 5, Ed. E. Grandjean, Portfolio Publishing Company, The Woodlands, Texas, 121-127
- Bihari N., Batel R., Zahn R. K. (1990c).** DNA damage determination by the alkaline elution technique in the hemolymph of mussel *Mytilus galloprovincialis* treated 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.* **B102**, 419-424
- Bihari N., Batel R. (1994).** Alkaline elution of mussel DNA as a tool for determination of environmental contamination by genotoxins. In: Use of Aquatic Invertebrates as Tools for Monitoring of Environmental Hazards, Ed. W. E. G. Müller, Stuttgart; Jena, New York, G. Fisher Press, 35-48

- Bihari N., Batel R., Jakšić Ž., Müller W. E. G., Waldmann P., Zahn R. K. (2002).** Comparison between DNA damage in HeLa cells as measured by a Comet assay and Fast Micromethod®, Croat. Chem. Acta **75**, *in press*
- Black M. C., Ferrell J. R., Horning R. C., Martin L. K. (1986).** DNA strand breakage in freshwater mussels (*Anodonta grandis*) exposed to lead in the laboratory and field. Environ. Toxicol. Chem. **15**, 802-808
- Bolognesi C., Parrini M., Roggieri P., Ercolini C., Pellegrino C. (1992).** Carcinogenic and mutagenic pollutants: impact on marine organisms. Map. Tech. Rep. Ser. **69**, 113-121
- Bolognesi C., Rabboni R., Roggieri P. (1996).** Genotoxicity biomarkers in *M. galloprovincialis* as indicators of marine pollutants. Comp. Biochem. Physiol. **113C**, 319-323
- Bolognesi C., Landini E., Roggieri P., Fabrri R., Viarengo A. (1999).** Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in mussel, experimental studies. Env. Mol. Mutag. **33**, 287-292
- Bothner M. H., Takada H., Knight I. T., Hill R. T., Butman B., Farrington J. W., Colwell R. R., Grassle J. F. (1994).** Sewage contamination in sediments beneath a deep-ocean dump site off New York. Mar. Environ. Res. **38**, 43-59
- Bradly M. O., Sina J. F. (1984).** Methods of detecting carcinogens and mutagens with the alkaline elution/rat hepatocyte assay. In: Handbook of mutagenicity test procedures., Eds. B. J. Kibley, M. Legator, W. Nichols and C. Ramel, Elsevier. Sci. Publ. B. V., Amsterdam, 71-82
- Brambilla G., Carlo P., Finollo R., Bignone F. A., Ledda A., Cajelli E. (1983).** Viscosimetric detection of liver DNA fragmentation in rats treated with minimal doses of chemical carcinogens. Cancer Res. **43**, 202-209
- Bresler V., Bissinger V., Abelson A., Dizer H., Sturm A., Kratke R., Fishelson L., Hansen P. D. (1999).** Marine molluscs and fish as a biomarkers of pollution stress in littoral regions of the Red sea, Mediterranean sea and North sea. Helg. Mar. Res. **53**, 219-243
- Britvić S., Kurelec B. (1986).** Selective activation of carcinogenic aromatic amines to bacterial mutagens in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. Comp. Biochem. Physiol. C-Comp. Pharm. Toxicol. **85**, 111-114
- Brunetti R., Gola I., Majone F. (1986).** Sister-chromatide exchange in developing eggs of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. (Bivalvia). Mutat. Res. **174**, 207-211

- Brunetti R., Majone F., Gola I., Beltrame C. (1988).** The micronucleus test, examples of application to marine ecology. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **44**, 65-68
- Bulich A. A., Isenberg D. L. (1981).** Use of the luminescent bacterial system for the rapid assessment of aquatic toxicity. *Trans. Am. Instrument Soc.* **20**, 29-33
- Burgeot T., Bocquéné G., Porte C., Dimeet J., Santella R. M., Garcia de la Parra L. M., Pfohl-Leszkwicz A., Raoux C. Galani F. (1996).** Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **131**, 125-141
- Burton R. S. (1996).** Molecular tools in marine ecology. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **200**, 85-102
- Canova S., Degan P., Peters L. D., Livingstone D. R., Voltan R., Venier P. (1998).** Tissue dose, DNA adducts, oxidative damage and CYP1A-immunopositive proteins in mussel exposed to waterborne benzo[a]pyrene. *Mutat. Res.* **399**, 17-30
- Cerruti P. A. (1978).** Repairable damage in DNA. In: DNA repair mechanisms, Eds. P. C. Hanawalt, E. C. Friedberg and C. F. Fox, Academic Press Inc., New York, 1-14
- Chapman P. M. (1995).** Ecotoxicology and pollution - key issues. *Mar. Poll. Bul.* **31**, 167-177
- Chauvin C., Heidenreich E., Elmendorff-Dreikorn K., Slor H., Kutzner J., Batel R., Schröder H. C. (1998).** Lack of correlation between apoptosis and DNA single-strand breaks in X-irradiated human peripheral blood mononuclear cells in the course of ageing. *Mechan. Ageing Dev.* **106**, 117-128
- Clayton D. A. (1981).** Measurement of strand breaks in supercoiled DNA by electron microscopy In: DNA Repair, a manual of research procedures, Eds. E. C. Friedberg and P. C. Hanawalt, Marcel Dekker, New York, 419-424
- Cleaver J. E. (1984).** Methods for studying excision repair of eucaryotic DNA damaged by physical and chemical mutagens. In: Handbook of mutagenicity test procedures., Eds. B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols and C. Ramel, Elsevier Sci. Publ. B. V., Amsterdam, 33-69
- Cligen P. H., Arlett C. F., Roza L., Mori T., Nikado O., Green M. H. L. (1995).** Induction of cyclobutane dimers, pyrimidine(6-4)pyrimidone photoproducts and Dewar isomers by natural sunlight in normal human mononuclear cells. *Cancer Res.* **55**, 2245-2248
- Cook P. R., Brazell I. A. (1976).** Detection and repair of single-strand breaks in nuclear DNA. *Nature.* **263**, 679-82

- Coquerelle T., Bopp A., Kessler B., Hagen U. (1973).** Strand brakes and 5`endgroups in DNA irradiated thymocytes. *Int. J. Radiat. Biol.* **24**, 397-404
- Cosa G., Foscaneanu K. S., McLean J. R. N., McNamee J. P., Sciano J. C. (2000).** Direct determination of single-to-double stranded DNA ratio in solution applying time-resolved fluorescence measurements of dye-DNA complexes. *Chem. Commun.* **8**, 689-690
- Cosa G., Foscaneanu K. S., McLean J. R. N., Sciano J. C. (2001).** Photophysical properties of fluorescent DNA-dyes bound to single- and double-stranded DNA in aqueous buffered solution. *Photochem. Photobiol.* **73**, 585-599
- D'Andrea A. D., Hasteline W. (1978).** Sequence specific cleavage of DNA by antitumor antibiotics neocarzinostatin and bleomycin. *Proc. Acad. Sci. U. S. A.* **75**, 3608-3612
- Das R. K., Nanda N. K. (1986).** Induction of micronuclei in peripheral erythrocytes of fish *Heteropneustes fossilis* by mitomycin C and paper mill effluent. *Mutat. Res.* **175**, 67-71
- Dascalakis K. D., O' Connor T. P. (1995).** Distribution of chemical concentrations in us coastal and estuarine sediment. *Mar. Environ. Res.* **40**, 381-398
- Dean C. J., Feldschreiber P., Lett J. T. (1966).** Repair of x-ray damage to the deoxyribonucleic acid in *Micrococcus radiodurans*. *Nature* **209**, 49-52
- De Flora, S., Bagnasco, M., Zanacchi, P. (1991).** Genotoxic, carcinogenic and teratogenic hazards in marine environment, with special reference to the Mediterranean Sea. *Mutat. Res.* **258**, 285-320
- Depledge M. H. (1996).** Genetic ecotoxicology: an overview. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **200**, 57-66
- Depledge M. H. (1998).** The ecotoxicological significance of genotoxicity in marine invertebrates. *Mutat. Res.* **399**, 109-122
- Dixon D. R. (1982).** Aneuploidy in mussel embryos (*Mytilus edulis* L.) originating from a polluted dock. *Mar. Biol. Lett.* **3**, 155-161
- Dixon D. R., Clarke K. R. (1982).** Sister chromatid exchange - a sensitive method for detecting damage caused by exposure to environmental mutagens in the chromosomes of adult *Mytilus edulis*. *Mar. Biol. Letts.* **3**, 163-172

- Dixon D. R., Jones I. M., Harrison F. L. (1985).** Cytogenetic evidence of inducible process linked with metabolism of a xenobiotic chemical in adult and larval *Mytilus edulis*. *Sci. Total Environ.* **46**, 1-8
- Dixon D. R. , Favell N. (1986).** A comparative study of the chromosomes of *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis*. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* **66**, 219-228
- Dixon D. R. , Proser H. (1986).** An investigation of the genotoxic effects of an organotin antifouling compound (bis(tributyltin)oxide) on the chromosomes of the edible mussel, *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.* **8**, 185-195
- Dixon D. R. , McFadzen I. R. B. (1987).** Heterochromatin in the interphase nuclei of the common mussel *Mytilus edulis* L.. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **112**, 1-9
- Dixon D. R. , Wilson J. T., Pascoe P. L., Parry J. M. (1999).** Anaphase aberrations in the embryos of the marine tubeworm *Pomatoceros lamarckii* (polychaeta: Serpulidae): a new *in vivo* test assay for detecting aneugens and clastogens in the marine environment. *Mutagenesis* **14**, 375-383
- Dixon D. R., Wilson J. T. (2000).** Genetics and marine pollution. *Hydrobiologia* **420**, 29-43
- Drinkwater N. R., Miller E. C., Miller J. A. (1980).** Estimation of apurinic/apyrimidinic sites and phosphotriesters in deoxyribonucleic acid treated with electrophilic carcinogens and mutagens. *Biochemistry* **19**, 5087-5092
- D'Surney S. J., Shugart L. R., Theodorakis C. W. (2001).** Genetic markers and genotyping methodologies, an overview. *Ecotoxicology* **10**, 201-210
- Dunn B. P. (1991).** Carcinogen adducts as an indicator for the public health risk of consuming carcinogen-exposed fish and shellfish. *Environ. Health. Perspect.* **90**, 111-116
- Dunn B. P., Black J., Maccubbin A. (1987).** ³²P-postlabeling analysis of aromatic DNA adducts in fish from polluted areas. *Cancer Res.* **47**, 6543-6548
- Dunn B. P., San R. H. C. (1988).** HPLC enrichment of hydrophobic DNA-carcinogen adducts from enhanced sensitivity of ³²P-postlabeling analysis. *Carcinogenesis* **9**, 1055-1060
- Eastman A., Barry, M. A. (1992).** The origins of DNA breaks, a consequence of DNA damage, DNA repair, or apoptosis? *Cancer Invest.* **10**, 229-401.

- Enoch T., Norbury C. (1995).** Cellular responses to DNA damage - cell-cycle checkpoints, apoptosis and the roles of p53 and ATM. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 426-430
- EPA (1998).** Guidelines for ecological risk assessment. EPA/630/R-95/002F, U. S. Environmental Protection Agency, Washington, DC
- Erikson L. C., Ross W. E., Kohn K. W. (1979).** Isolation and purification of large quantities of DNA replication intermediates by pH step alkaline elution. *Chromosoma* **74**, 125-139
- Everaats J. M. (1995).** DNA integrity as a biomarker of marine pollution, strand breaks in seastar (*Asteria rubens*) and dub (*Limanda limanda*). *Mar. Poll. Bul.* **31**, 431-438
- Everaats J. M. (1997).** DNA integrity in *Asteria rubens* - a biomarker reflecting the pollution of the North sea. *J. Sea Res.* **37**, 123-129
- Everaats J. M., Sliederink H. M., den Besten P. J., Halbrook R. S., Shugart L. R. (1994).** Molecular responses as indicators of marine pollution, DNA damage and enzymes induction in *Limanda limanda* and *Asterias rubens*. *Env. Health Perspect.* **102**, 37-43
- Everaats J. M., Sarkar A. (1996).** DNA damage as a biomarker of marine pollution, strand breaks in seastar (*Asteria rubens*) from the North sea. *Water Sci. Technol.* **34**, 157-162
- Farber E., Sarma D. S. R. (1986).** Chemical carcinogenesis, The liver as a model. *Pathol. Immunopathol. Res.* **5**, 1-28
- Fortini P., Bignami M., Dogliotti E. (1990).** Evidence for AP site formation related to DNA-oxygen alkylation in CHO cells treated with ethylating agents. *Mutat. Res.* **236**, 129-37
- Fossato V. U., Canzonier W. J. (1976).** Hydrocarbon uptake and loss by *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* **36**, 243-250
- Fossi M. C. (1994).** Nondestructive biomarkers in ecotoxicology. *Env. Health Perspect.* **102**, 49-54
- Frenzilli G., Nigro M., Scarelli V., Gorbi S., Regoli F. (2001)** DNA integrity and total oxyradical scavenging capacity in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*: a field study in a high eutrophicated costal lagoon. *Aquat. Toxicol.* **53**, 19-32
- Friedberg E. C., Walker G. C., Wolfram S. (1995).** DNA damage. In: *DNA Repair and Mutagenesis*. ASM Press, Washington, D. C., 1-58

- Galiegue-Zouitina S., Bailleul B., Loucheux-Lefebvre M. H. (1985).** Adducts from in vivo action of the carcinogen 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide in rats and from in vitro reaction of 4-acetoxyaminoquinoline 1-oxide with DNA and polynucleotides. *Cancer Res.* **45**, 520-5
- Galli A., Del Chiaro D., Nieri R., Bronzzetti G. (1988).** Studies on cytochrome P-450 in *Mytilus galloprovincialis*: induction by Na-phenobarbital and ability to biotransform xenobiotics. *Mar. Biol.* **100**, 69-73
- Gamper H. B., Tung A. S. C., Straup K., Bartholomew J. C., Calvin M. (1977).** DNA strand scission by benzo[a]pyrene diol epoxides. *Science* **197**, 671-674
- Garcia Martinez P., Hajos A. K. D., Livingstone D. R., Winston G. W. (1992).** Metabolism and mutagenicity of 4-nitroquinoline –oxide by microsomes and cytosol of digestive gland of the mussel *Mytilus edulis*. Lam., Proc. 6th Int. Symp. on responses of marine organisms to pollution., Woods Hole, MA.,USA
- Gelboin H. V. (1980).** Benzo[a]pyrene metabolism, activation and carcinogenesis, Role and regulation of mixed function oxidase and related enzymes. *Physiol. Rev.* **60**, 1107-1166
- GESAMP (1977).** Impact of oil on the marine environment. IMPCO/FAO/UNESCO/WMO/WHO/IAEA/UNEP, joint group experts on the scientific aspects of marine pollution. Rep. Stud. GESAMP **6**, 1-250
- Goldberg E. D., Bowen V. T., Farrington J. W., Harvey G., Martin J. H., Parker P. L., Risebrough R. W., Robertson W., Schneider E., Gamble E. (1978).** The mussel watch. In: Environmental Conservation, the foundation of environmental conservation, La Jolla, CA, 101-125
- Gosling, E. (1992).** The Mussel *Mytilus*, Ecology, Physiology, Genetics and Developments in Aquatic Culture and Fishers Science, 25, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam
- Groopman J. D., Kensler T. W. (1999).** The light at the end of the tunnel for chemical-specific biomarkers, daylight or headlight? *Carcinogenesis* **20**, 1-11
- Gupta P., Sirover M. A. (1981).** Stimulation of the nuclear uracil DNA glycosilase in proliferating fibroblasts. *Cancer Res.* **41**, 3133-3136
- Gupta R. C., Reddy M. C., Randerath K. (1982).** ³²P-postlabeling analysis of nonradioactive aromatic carcinogen-DNA adducts. *Carcinogenesis* **3**, 1081-1092

- Haidle C. V. (1971).** Fragmentation of the deoxyribonucleic acid by bleomycin. *Mol. Pharmacol* **7**, 645-652
- Haigh J. D. (1996).** The impact of solar variability on climate. *Science* **272**, 981-984
- Hamer B., Bihari N., Reifferscheid G., Zahn R. K., Müller W. E. G., Batel R. (1997).** Evaluation of the SOS/umu-test post-treatment assay for the detection of genotoxic activities of pure compounds and complex environmental mixtures. *Mutat. Res.* **466**, 161-171
- Hansen P. D. (1994).** The potential applications of environmental effects monitoring tools. In: *Use of Aquatic Invertebrates as Tools for Monitoring of Environmental Hazards*, Ed. W. E. G. Müller, Gustav Fisher Press, Stuttgart - Jena - New York, 17-34
- Hanson P. J., Evans D. W., Colby D. R., Zdanowicz V. S. (1993).** Assessment of elemental contamination in estuarine and coastal environments based on geochemical and statistical modelling of sediments. *Mar. Environ. Res.* **36**, 237-266
- Harvey R. C. (1982).** Polycyclic hydrocarbons and cancer. *Am. Scientist.* **70**, 386-393
- Harvey J. S., Parry J. M. (1998a).** Application of the ³²P-postlabeling assay for the detection of DNA adducts - false positives and artefacts and their implication for environmental biomonitoring. *Aquat. Toxicol.* **440**, 293-308
- Harvey J. S., Parry J. M. (1988b).** The analysis of DNA adducts formation, removal and presence in the common mussel *Mytilus edulis* exposed to 4-nitroquinoline 1-oxide. *Mutat. Res.* **399**, 31-42
- Haugland R. P. (1996).** Nucleic acid detection. In: *Handbook of fluorescent probes and research chemicals.*, 6th edition, Ed. M. T. Z. Spence, Molecular Probes Inc., Eugene, OR, 143-178
- Heddle J. A. (1973).** A rapid in vivo test for chromosome damage. *Mutat. Res.* **18**, 187-192
- Helmer R. (1977).** Pollutants from land-based sources in the Mediterranean. *Ambio.* **6**, 312-316
- Henson P. (1978).** The presence of single stranded regions in mammalian DNA. *J. Mol. Biol.* **119**, 487
- Herbert A., Zahn R. K. (1989).** Monitoring DNA damage in *Mytilus galloprovincialis* and other aquatic animals I. Basic studies with a DNA unwinding technique. *Angew. Zoologie* **76**, 143 - 167

- Herbert A., Zahn R. K. (1990).** Monitoring DNA damage in *Mytilus galloprovincialis* and other aquatic animals II. Pollution effects on DNA denaturation characteristics. *Angew. Zoologie* **77**, 13 - 33
- Holdway D. A. (1996).** The role of biomarkers in risk assessment. *Hum. Ecol. Risk Assess.* **2**, 263-267
- Melancon M. J. (1995).** Bioindicators used in aquatic and terrestrial monitoring. In: Handbook of ecotoxicology., Eds. D. J. Hooftman, B. A. Rattner, G. A. Jr. Burton and J. Jr. Cairns, Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, 220-240
- Hooftman R. N., Vink G. J. (1981).** Cytogenic effects on the eastern mudminnow, *Umbra pygmae*, exposed to ethyl methanesulfonate, benzo[a]pyrene, and river water. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **5**, 261-269
- Hoofman R. N., De Raat W. K. (1982).** Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of eastern mudminnow *Umbra pygmae* by ethyl methansulphonate. *Mutat. Res.* **104**, 147-152
- Hose J. E. (1994).** Large-scale genotoxicity assessments in the marine environment. *Env. Health Perspect.* **102**, 29-32
- Howell R., Grant A. M., Maccoy N. E. J. (1984).** Effect of treatment with reserpine on the change in filtration rate of *Mytilus edulis* subjected to dissolved copper. *Mar. Pollut. Bull.* **15**, 436-439
- Imsiecke G., Custodio M., Borojevic R., Steffen R., Moustafa M. A., Müller W. E. G. (1995).** Genome size and chromosomes in marine sponges (*Suberites domuncula*, *Geodia cydonium*). *Cell Biol. Internat.* **19**; 995-1000
- Iqbal Z. M., Kohn K. W., Ewig R. A. W., Fornace A. J. Jr. (1976).** Single-strand scission and repair of DNA in mammalian cells by bleomycin. *Cancer Res.* **36**, 3834-3838
- Jakšić Ž., Bihari N., Muller W. E. G., Zahn R. K., Batel R. (1998).** Modulation of cytochrome P450 1A in sea bass liver by model substances and seawater extracts. *Aquat. Toxicol.* **40**, 265-273
- James M. O., Little P. J. (1984).** 3-methylcholantrene does not induce *in vitro* xenobiotic metabolism in spiny lobster hepatopancreas, or affect *in vivo* disposition of benzo[a]pyrene. *Comp. Biochem. Physiol.* **78C**, 241-245

- Jaylet A., Deparis P., Ferrier V., Grinfeld S., Siboulet R. (1986).** A new micronucleus test using peripheral blood erythrocytes of the newt *Pleurodeles waltl* to detect mutagens in fresh-water pollution. *Mutat. Res.* **164**, 245-257
- Jerina D. M., Daly J. W. (1974).** Arene oxides, a new aspect of drug metabolism. *Science.* **185**, 573-82
- Jha N. A., Hutchinson T. H., Mackay J. M., Elliott B. M., Dixon D. R. (1996).** Development of an *in vivo* genotoxicity assay using the marine worm *Platynereis dumerilli* (Polychaeta: Neridae). *Mutat. Res.* **359**, 141-150
- Jha N. A., Cheung V. V., Foulkes M. E., Hill S. J., Dpledge M. H. (2000a).** Detection of genotoxins in the marine environment, adoption and evaluation of an integrated approach using embryo-larval stages of the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Mutat. Res.* **464**, 213-228
- Jha N. A., Hager J. A., Hill S. J. (2000b).** Tributyltin induces cytogenetic damage in the early life stages of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Env. Mol. Mutag.* **35**, 343-350
- Takefuda T., Yamamoto H. (1978).** Modification of DNA by benzo[a]pyrene metabolite diol-epoxide r-7,t-8-dihydroxy-t-9,10-oxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **75**, 415-419
- Kerr J. F. R., Whyllie, A. H. i Currie, A. R. (1972).** Apoptosis, a basic biological phenomenon with wider implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239-245
- Kohn, K. W. (1991).** Principles and practice of DNA filter elution. *Pharmac. Ther.* **49**, 55-77
- Kohn K. W., Grimek-Ewig, R. A. (1973).** Alkaline elution analysis, a new approach to the study of DNA single-strand interruptions in cells. *Cancer Res.* **33**, 1849-1853
- Kohn K. W., Erickson L. C., Grimek-Ewig R. A., Friedman C. A. (1976).** Fractionation of DNA from mammalian cells by alkaline elution. *Biochemistry* **13**, 4629-4637
- 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**, 3834-3838
- Kohn K. W., Grimek-Ewig R. A., Erickson L. C., Zwelling L. A. (1981).** Measurement of strand breaks and cross-links by alkaline elution. In: DNA repair. A laboratory manual of research procedures, Vol.1, Part B, Eds. E. C. Friedberg and P. C. Hanawalt, New York, Marcel Dekker, 379-401

- Kramer K. J. M. (1994).** Biomonitoring of costal waters and estuaries. CRC Press., London, 361
- Kurelec B. (1992).** The genotoxic disease syndrome. *Mar. Environ. Res.* **35**, 341-348
- Kurelec B., Britvić S., Rijavec M., Müller, Zahn R. K. (1977).** Benzo[a]pyrene monooxygenase induction in marine fish-molecular response to oil pollution. *Mar. Biol.* **44**, 211-216
- Kurelec B., Matijašević Z., Rijavec M., Alačević M., Britvić S., Müller W. E. G., Zahn R. K. (1979).** Induction of benzo (a)pyrene monooxygenase in fish and the *Salmonella* test as a tool for detecting mutagenic/carcinogenic xenobiotics in the aquatic environment. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **21**, 799-807
- Kurelec B., Britvić S., Zahn R. K. (1985).** The activation of aromatic amines in some marine invertebrates. *Mar. Environ. Res.* **17**, 141-144
- Kurelec B., Chacko M., Gupta C. (1988).** Postlabeling analysis of carcinogen-DNA adducts in mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Environ. Res.* **24**, 317-320
- Kurelec B., Grag A., Krča S., Chacko M., Gupta C. (1989a).** Natural environment surpasses polluted environment in inducing DNA damage in fish. *Carcinogenesis* **10**, 1337-1339
- Kurelec B., Grag A., Krča S., Gupta C. (1989b).** DNA adducts as biomarkers in genotoxic risk assessment in the aquatic environment. *Mar. Environ. Res.* **28**, 317-321
- Kurelec B., Chacko M., Gupta R. C. (1990a).** Postlabeling analysis of carcinogen-DNA adducts in mussel (*Mytilus galloprovincialis*). In: 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, Volume 5, Ed. E. Grandjean, Portfolio Publishing Company, The Woodlands, Texas, 129-139
- Kurelec B., Garg A., Krča S., Chacko M., Gupta R.C. (1990b).** DNA adducts in marine mussel *Mytilus galloprovincialis* living in polluted and unpolluted environments. In: Biomarkers of environmental contamination, Eds. J. F. McCarthy and L. R. Shugart, Lewis Publishers, Boca Raton, 217-222
- Kwan K. K., Dutka B. J., Rao S. S., Liu D. (1990).** Mutatox test: a new test for monitoring environmental genotoxic agents. *Environ. Poll.* **65**, 323-332

- Lacorn M, Piechotta G., Simat T. J., Kammann U., Wosnoik W., Lang T., Müller W. E. G., Schröder H. C., Jenke H.-S., Steinhart H. (2001).** Annual Cycles of apoptosis, DNA strand brakes, heat shock proteins, and metallothionein isoforms in dab (*Limanda limanda*): influences of natural factors and consequences for biological effect monitoring. **6**, 108-126
- Lagadic L., Caquet T., Ramade F. (1994).** The role of biomarkers in environmental assessment (5). Invertebrate populations and communities. *Ecotoxicology* **3**, 193-208
- Laval J., Boiteux S., O'Connor T. R. (1990).** Physiological properties and repair of apurinic/apyrimidinic sites and imidazole ring-opened guanines in DNA. *Mutat. Res.* **233**, 73-79
- Leadon S. A., Stampfler M. R., Bartley J. (1988).** Production of oxidative DNA damage during the metabolic activation of benzo[a]pyrene in human mammary epithelial cells correlates with cell killing. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 4365-4368
- Lett J. T. (1981).** Measurement of single-strand breaks by sedimentation in alkaline sucrose gradients. In: *DNA repair. A laboratory manual of research procedures Vol.1, Part B*, Eds. E. C. Friedberg, and P. C. Hanawalt, New York, Marcel Dekker, 363-378
- Levin W., Wood A. W., Wislocki P. G., Chang R. L., Kapitulnik J., Mah H. D., Yagi H., Jerina D. M., Conney A. H. (1977).** Mutagenicity and carcinogenicity of benzo[a]pyrene and benzo(e)pyrene derivatives. In: *Polycyclic hydrocarbons and cancer, Vol.1*, Eds. H. V. Gelboin and P. O. P. Ts'o, Academic Press, New York
- Lindahl T. (1993).** Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* **362**, 709-715
- Lindahl T., Nyberg B. (1972).** Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* **11**, 3610-3618
- Lindahl T., Karlström O. (1973).** Heat-induced depyrimidination of deoxyribonucleic acid in neutral solution. *Biochemistry* **12**, 5151-5154
- Livingstone D. R. (1985).** Responses of the detoxication/toxication enzyme systems of mollusc to organic pollutants and xenobiotics. *Mar. Poll. Bull.* **16**, 158-164
- Livingstone D. R. (1991).** Organic xenobiotic metabolism in marine invertebrates. In: *Advances in Comparative and Environmental Physiology, Vol. 7*, Ed. R. Gilles, Springer-Verlag Berlin, 45-185

- Livingstone D. R. (1992).** Persistent pollutants in marine invertebrates. In: Persistent pollutants in Marine Ecosystems., Eds. C. H. Walker and D. R. Livingstone, SETAC Special Publication, Pergamon Press, Oxford, 3-34
- Livingstone D. R. (1993).** Biotechnology and pollution monitoring - use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **57**, 195-211
- Livingstone D. R., Lemaire P., Matthews A., Peters L. D., Porte C., Fitzpatrick P. J., Forlin L., Nasci C., Fossato V., Wootton N., Goldfarb P. (1995).** Assessment of the impact of organic pollutants on goby (*Zosterisessor ophiocephalus*) and mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from the Venice lagoon, Italy - biochemical studies. *Mar. Env. Res.* **39**, 235-240
- Livingstone D. R., Chipman J. K., Lowe D. M., Miner C., Mitchelmore C. L., Moore M. N., Peters L. D., Pipe R. K. (2000).** Development of biomarkers to detect the effects of organic pollution on aquatic invertebrates, recent molecular, genotoxic, cellular and immunological studies on common mussel (*Mytilus edulis* L.) and other mytilids. *Int. J. Environ. Poll.* **13**, 1-6
- Luoma S. N. (1996).** The developing framework of marine ecotoxicology, pollutants as a variable in marine ecosystems? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **200**, 29-56
- Maddock M. B., Northrup H., Ellingham T. J. (1986).** Induction of the sister-chromatid exchanges and chromosomal aberrations in hematopoietic tissue of marine fish following in vivo exposure to genotoxic carcinogens. *Mutat. Res.* **172**, 165-175
- Malins D. C., Haimanot R. (1991).** The etiology of cancer: Hydroxyl radical-induced DNA lesions in histologically normal livers of fish from a population with liver tumors. *Aquat. Toxicol.* **20**, 123-130
- Majone F. (1987).** Persistence of micronuclei in the marine mussel, *Mytilus galloprovincialis*, after treatment with mitomycin C. *Mutat. Res.* **191**, 157-161
- Marsh J. W., Chipman J. K., Livingstone D. R. (1992).** Activation of xenobiotics to reactive and mutagenic products by the marine invertebrates *Mytilus edulis*, *Carcinus means* and *Asterias rubens*. *Aquat. Toxicol.* **22**, 115-127
- Martin M., Severeid R. (1984).** Mussel Watch monitoring for the assessment of trace toxic constituents in California marine waters. In: Concepts in marine pollution measurements, Ed. H. H. White, Maryland Sea Grant College, University of Maryland, 291-323

- McCarthy J. F., Shugart L. R. (1990).** Biological markers of environmental contamination. Eds. J. F. McCarthy and L. R. Shugart, Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, 3-14
- McGrath R. A., Williams R. W. (1966).** Reconstruction in vivo of irradiated *Escherichia coli* deoxyribonucleic acid; the rejoining of broken pieces. *Nature* **212**, 534-535
- McKelvey-Martin V. J., Green M. H. L., Schmezer P., Pool-Zobel B. L., DeMeo M. P., Collins A. (1993).** The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutat. Res.* **288**, 47-63
- Meyen R E., Jenkins W. T. (1983).** Variation in normal and tumor tissue sensitivity of mice to ionizing radiation-induced DNA strand breaks in vivo. *Cancer Res.* **43**, 5668-5673
- Miller E. A. (1978).** Some current perspectives on chemical carcinogenesis in humans and experimental animals: presidential address. *Cancer Res.* **38**, 1479-1496
- Miller J. A., Miller E. C. (1971).** Chemical carcinogenesis, mechanisms and approaches to its control. *J. Natl. Cancer Inst.* **47**, 5-14
- Michel X. R., Suteau P., Robertson L. W., Narbonne J. F. (1993).** Effects of benzo[a]pyrene, 3,3',4,4'-tetrachlorbiphenil and 2,2',4,4',5,5'-hexachlorbiphenil on the xenobiotics-metabolizing enzymes in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Aquat. Toxicol.* **27**, 335-344
- Mitchelmore C. L., Chipman J. K., (1998a).** Detection of DNA strand breaks in brown trout (*Salmo trutta*) hepatocytes and blood cells using the single cell gel electrophoresis (comet) assay. *Aquat. Toxicol.* **41**, 161-182
- Mitchelmore C. L., Chipman J. K., (1998b).** DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutat. Res.* **399**, 135-147
- Mix M. C. (1986).** Cancerous diseases in aquatic animals and their association with environmental pollutants, A critical literature review. *Mar. Environ. Res.* **20**, 1-141
- Moore M. N. (1985).** Cellular responses to pollution. *Mar. Pollut. Bull.* **12**, 305-308
- Moore M. N. (1988).** Cellular and histopathological effects of a pollutant gradient-Summary. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **46**, 109-110
- Moore M. N., Livingstone D. R., Widdows J. (1989).** Hydrocarbons in marine molluscs, Biological effects and ecological consequences. In: *Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the marine environment*, Ed. U. Varanasi, CRC Press, Boca Raton, Florida, 291-328

- Müller W. E. G., Batel R., Zahn R. K., Bihari N., Schrooder H. C. (1997).** Mikro-Methode zur Schnellbestimmung von DNA-Schäden und deren Reparatur unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs PicoGreen und ihre Anwendung., Deutsche Patente Munchen, No. 19724781.4-41
- Nacci D., Jackim E. (1989).** Using the alkaline unwinding assay to detect DNA damage in laboratory and environmentally exposed cells and tissues. *Mar. Environ. Res.* **28**, 333-336
- Nacci D. E., Nelson S., Nelson W., Jackim E. (1992).** Application of the alkaline unwinding assay to detect DNA strand breaks in marine bivalves. *Mar. Envir. Res.* **33**, 38-100
- Nacci D. E., Cayula S., Jackim E. (1996).** Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. *Aquat. Toxicol.* **35**, 197-210
- Nagao M., Sugimura T. (1976).** Molecular biology of the carcinogen, 4-nitroquinoline-N-oxide. *Adv. Cancer Res.* **23**, 131-169
- Narbone J. F., Gallis J. L. (1979).** In vitro and in vivo effects of phenoclor DP6 on drug metabolising activity in mullet liver. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **23**, 344-348
- Narbone J. F., Suteau P. M., Daubese M., Audy C. (1987).** Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in mullets (*Chelon lobrosus*) treated by polychlorinated biphenyls. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **38**, 57-60
- Neff J. M., (1978).** Accumulation and release of polycyclic aromatic Hydrocarbons from water, food and sediment by marine animals. Symposium of carcinogenic polynuclear aromatic hydrocarbons in marine environment, August 14-18, Pensacola, Florida
- Obe G., Johannes C., Schulte-Frohlinde D. (1992).** DNA double-strand breaks induced by sparsely ionizing radiation and endonucleases as critical lesions for cell death, chromosomal aberrations, mutations and oncogenic transformation. *Mutagenesis* **7**, 3-12
- Oda Y., Nakamura S., Oki I., Kato T., Shinagawa H. (1985).** Evaluation of the new system (*umu*-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens. *Mutat. Res.* **147**, 219-229
- Olive P. L. (1988).** DNA precipitation assay: a rapid and simple method for detecting DNA damage in mammalian cells. *Environ. Molec. Mutagenesis* **11**, 487-495

- Olive P. L., Banath J. P., Durand R. E. (1990).** Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "Comet" assay. *Radiat. Res.* **122**, 86-94
- Ostling O., Johanson K. J. (1984).** Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochem. Res. Communicat.* **123**, 291-298
- Parodi S., Carlo P., Martelli A., Taningher M., Finollo R., Pala M., Giaretti W. (1981).** A circular channel crucible oscillating viscometer. Detection of DNA damage induced in vivo by exceedingly small doses of dimethylnitrosamine. *J. Mol. Biol.* **147**, 501-21
- Payne J. F. (1976).** Field evaluation of benzo[a]pyrene hydroxylase induction as a monitor for marine petroleum pollution. *Science* **191**, 945-946
- Payne J. F. (1977).** Mixed-function oxygenases in marine organisms in relation to petroleum hydrocarbon metabolism and detection. *Mar. Poll. Bull.* **8**, 112-116
- Payne J. F. (1984).** Mixed-function oxygenases in biological monitoring programs: review of potential usage in different phyla of aquatic animals. In: *Ecotoxicological testing for the marine environment.*, Eds. G. Penrose, E. Jaspers and C. Claus, State University, Ghent and Inst. Mar. Scient. Res., Bredene, 625-655
- Payne J. F., Penrose W. R. (1975).** Induction of aryl hydrocarbon (benzo[a]pyrene) hydrolase in fish by petroleum. *Bull. Pollut. Bull.* **19**, 235-238
- Petzold, G. L., Swenberg J. A. (1978).** Detection of DNA damage in vivo following exposure of rats to carcinogens. *Cancer Res.* **38**, 1589-1594
- Philips, D. H. (1983).** Fifty years of benzo[a]pyrene. *Nature* **303**, 472-478
- Philips, D. H. (1990).** Modern methods of DNA adduct determination. In: *Chemical Carcinogenesis and Mutagenesis I.*, Eds. C. S. Cooper and P. L. Grover, Springer-Verlag, KG, Berlin, 503-546
- Picer M. (2000).** DDT`s and PCB`s in the Adriatic sea. *Croatica Chem. Acta* **73**, 123-186
- Ploch S. A., Lee Y. -P., MacLean E., Di Giulio R. T. (1999).** Oxidative stress in liver of brown bullhead and channel catfish following exposure to *tetra*-buthil hydroperoxide. *Aquat. Toxicol.* **46**, 231-240

- Poirer M. C., Stanley J. R., Beckwith J. B., Weinstein I. B., Yuspa S. H. (1982).** Indirect immunofluorescent localization of benzo[a]pyrene adduced to nucleic acid in cultured mouse keratinocyte nuclei. *Carcinogenesis* **3**, 354-358
- Porte C., Albaiges J. (1994).** Bioaccumulation patterns of hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in bivalves, crustaceans, and fishes. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **26**, 273-281
- Povirk L. F., Wübker W., Köhnlein W., Hutchinson F. (1977).** DNA double-strand breaks and alkali-labile bonds produced by bleomycin. *Nucleic Acid Res.* **4**, 3573-3580
- Prein A. E., Thie G. M., Alink J. H., Koenman J. H., Poelis C. L. M. (1978).** Cytogenetic changes in fish exposed to water of the river Rhine. *Sci. Total. Environ.* **9**, 287-292
- Qu S. -X., Bai C. -L., Stacey N. H. (1997).** Determination of bulky DNA adducts in biomonitoring of carcinogenic chemical exposures: Features comparison of current techniques. *Biomarkers* **2**, 3-16
- Quillardet P., Hofnung M. (1985).** SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. *Mutat. Res.* **147**, 65-78
- Rank J. (1999).** Use of Comet assay on the blue mussel, *Mytilus edulis*, from coastal waters in Denmark. *Neoplasma* **46**, 9-10
- Rasmussen L. P. D. (1982).** Light microscopical studies of the acute effects of N-nitrosodimethylamine on the marine mussel, *Mytilus edulis*. *J. Invertebr. Pathol.* **39**, 66-80
- Reish D. J. , Oshida P. S., Mearns A. J., Ginn T. C. (1992).** Effects of pollution on saltwater organisms. *Water Envir. Res.* **64**, 599-610
- Rhaese H., Freese E. (1986).** Chemical analysis of DNA alternations I. Base liberation and backbone breakage of DNA and oligodeoxyadenylic acid induced by hydrogen peroxide and hydroxylamine. *Biochem. Biophys. Acta* **155**, 476-491
- Rhaese H., Freese E., Melzer M. (1986).** Chemical analysis of DNA alternations II. Alternation and liberation of bases of deoxynucleotides and deoxynucleosides induced by hydrogen peroxide and hydroxylamine. *Biochem. Biophys. Acta* **155**, 492-504
- Rydberg B. (1975).** The rate of strand separation in alkali of DNA of irradiated mammalian cells. *Rad. Res.* **61**, 274-87

- Rydberg B. (1984).** Detection of DNA strand brakes in single cells using flow cytometry. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.*, **46**, 521-527
- Rydberg B., Johansen K. J. (1988).** Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. In: DNA repair mechanisms, Eds. P. C. Hanwalt, E. C. Friedberg and C. F. Fox, Academic Press, New York, 465-468
- Rye H. S., Dabora J. M., Quesada M. A., Mathies R. A., Glazer A. N. (1993).** Fluorometric assay using dimeric dyes for double- and single-stranded DNA and RNA with picogram sensitivity. *Analyt. Biochem.* **208**, 144-150
- Sage E., Haseltine W. A. (1984).** High ratio of alkali-sensitive lesions to total DNA modification induced by benzo[a]pyrene diol epoxide. *J. Biol. Chem.* **259**, 98-102
- Sancar A., Sancar G. B. (1988).** DNA repair enzymes. *Annu. Rev. Biochem* **57**, 29-67
- Sanders B. M. (1993).** Stress proteins in aquatic organisms, an environmental perspective. *Crit. Rev. Toxicol.* **23**, 49-75
- Sanders B. M., Martin L. S. (1993).** Stress proteins as biomarkers of contaminant exposure in archived environmental samples. *Sci. Total Environ.* **139-140**, 459-70
- Sausville E. A., Peisach J., Horwitz S. B. (1978).** Effect of chelating agents and metal ions on the degradation of DNA by bleomycin. *Biochemistry* **17**, 2740-2746
- Savage J. K. R. (1993).** Update on target theory as applied to chromosome aberrations. *Envir. Mol. Mutagen.* **22**, 198-207
- Scarpato R., Migliore L., Barale R. (1990a).** The micronucleus assay in *Anodonta cygnea* for the detection of drinking water mutagenicity. *Mutat. Res.* **245**, 231-237
- Scarpato R., Migliore L., Cogneti-Alfinito G., Barale R. (1990b).** Induction of micronuclei in gill tissue of *Mytilus galloprovincialis* exposed to polluted marine waters. *Mar. Pol. Bull.* **21**, 74-80
- Schröder H. C., Hassanein H. M. A., Lauenroth S., Koziol C., Mohamed T. A.-A. A., Lacron M., Steinhart M., Batel R., Muller W. E. G. (1999a).** Induction of DNA strand brakes and expression of HSP70 and GRP78 homolog by cadmium in the marine sponge *Suberites domuncula*. *Arch. Env. Contam. Toxicol.* **36**, 47-55

- Schröder H. C., Batel R., Lauenroth S., Hassanein H. M. A., Lacron M., Sinat T., Steinhart H., Muller W. E. G. (1999b).** Induction of DNA damage and expression of heat shock protein HSP70 by polychlorinated biphenyls in the marine sponge *Suberites domuncula* Olivi. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **233**, 285-300
- Scmid W. (1977).** The micronucleus test. In: Handbook of mutagenicity test procedures., Eds. B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols and C. Ramel, Elsevier Sci. Publ. B. V., Amsterdam, 235-242
- Seawell P. C., Ganesan A. K. (1981).** Measurement of strand breaks in supercoiled DNA by gel electrophoresis. In: DNA repair, A manual of research procedures, Eds. E. C. Friedberg and P. C. Hanawalt, New York, Marcel Dekker, 425-430.
- Shinohara K., Cerutti P. A. (1977).** Excision repair of benzo[a]pyrene-deoxyguanosine adducts in baby hamster kidney 21/C13 cells and in secondary mouse embryo fibroblasts C57BL/6J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 979-83
- Shugart L. R. (1988).** Quantitation of chemically induced damage to DNA of aquatic organisms by alkaline unwinding assay. *Aquat. Toxicol.* **13**, 43-52
- Shugart, L. R. (1990).** Biological monitoring, Testing for genotoxicity. In: Biological markers of environmental contamination, Eds. J. F. McCarthy and L. R. Shugart, CRC Press Inc., Ch. 11, Lewis Pub., 2000 Corporate Bldv., N. W., Florida, 205-216
- Shugart L. R. (1998).** Structural damage to DNA in response to toxicant exposure. In: Genetics and Ecotoxicology, Ed. V. E. Forbes, Taylor and Francis Publishers, Philadelphia, 151-168
- Shugart, L. R. (2000).** DNA damage as a biomarker of exposure. *Ecotoxicology* **9**, 329-340
- Shugart, L. R., Bricham J., Jackim E., McMahon G., Ridley w. P., Stein J. E., Steinert S. A. (1992).** DNA alterations. In: Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Antropogenic Stress, Eds. R. J. Huggett, R. A. Kimerle, P. M. Mehrle and H. L. Bergma, Levis Pub. Inc., Boca Raton, Florida, 125-153
- Sidiqi M. A. , Bothe E. (1987).** Single- and double strand brake formation in DNA irradiated in aqueous solution: dependence on dose and radicals scavenger concentration. *Radiat. Res.* **112**, 449-463
- Sims P., Grover P. L., Swaisland A., Pal K., Hewer A. (1974).** Metabolic activation of benzo[a]pyrene proceeds by a diol-epoxide. *Nature* **252**, 326-8

- Sindermann C. J. (1996).** Ocean Pollution, Effects on living resources and humans. CRC Press, Boca Raton, Florida, 275
- 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. *Exp. Cell Res.* **175**, 184-191
- Snoeij N. J., Penninks A. H., Seinen W. (1987).** Biological activity of organotin compounds-an overview. *Environ. Res.* **44**, 335-353
- Soileau S. D. (1987).** Carcinogen-DNA adducts. Introduction, literature summary, and recommendations. EPA, Lockheed-EMSCO Inc., Las Vegas
- Solé M., Porte C., Biosca X., Mitchelmore C. L., Chipman J. K., Livingstone D. R., Albaigés J. (1996).** Effects of the “Aegean Sea” oil spill on biotransformation enzymes, oxidative stress and DNA-adducts in digestive gland of the mussel (*Mytilus edulis* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* **113C**, 257-265
- Solé M., Nasci C., Livingstone D. R. (2000).** Study of the biological impact of organic contaminants on mussels (*Mytilus galloprovincialis* L.) from the Venice Lagoon, Italy, responses of CYP1A-immunosuppressive protein and benzo[a]pyrene hydroxylase activity. *Biomarkers* **5**, 129-140
- Stegeman J. J. (1978).** Influence of environmental contamination on cytochrome P-450 MFO in fish: implication for recovery in the Wild Harbour marsh. *J. Fish Res. Board Can.* **35**, 668-674
- Stegeman J. J., Woodin B. R., Goksøyr A. (1988).** Apparent cytochrome P-450 induction as an indication of exposure to environmental chemicals in the flounder *Platichthys flesus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **46**, 55-60
- Steinert S. A. (1996).** Contribution of apoptosis to observed DNA damage in mussel cells. *Mar. Environ. Res.* **42**, 253-259
- Steinert S. A., Streib-Montee R., Leather J. M., Chadwick D. B. (1998).** DNA damage in mussels at sites in San Diego bay. *Mutat. Res.* **399**, 65-85
- Steinert S. A. (1999).** DNA damage as a bivalve biomarker. *Biomarkers* **4**, 492-496
- Stüber J. J., Zahn R. K. (1985).** Biochemical alterations induced in fish by acute kerosine-spillage. *Analit. Biochem.* **127**, 302-307

- Sunnila I., Lindström R. (1985).** The structure of the interfilamentar junction of the mussel *Mytilus edulis* L.) gill and its uncoupling by copper and cadmium exposures. *Comp. Biochem. Physiol.* **81C**, 267-272
- Sunila I. (1988).** Acute histological responses of the gill of the mussel, *Mytilus edulis*, to exposure by environmental pollutants. *J. Invertebr. Pathol.* **52**, 137-141
- Sweet L. I., Passino-Reader D. R., Meier P. G., Omann G. M. (1999).** Xenobiotic-induced apoptosis: significance and potential as a general biomarker of response. *Biomarkers* **4**, 237-253
- Taddei F., Scarcelli V., Frenzilli G., Nigro M. (2001).** Genotoxic hazard of pollutants in cetaceans: DNA damage and repair evaluated in the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) by the comet assay. *Mar. Poll. Bull.* **42**, 324-328
- Tahedl H., Häder D-P. (2001).** The use of image analysis in ecotoxicology. *Image analysis, Methods and applications*, 2nd edition. CRC Press. 447-458
- Takehita M., Grolman A. P., Ohtsubo E., Ohtsubo H. (1978).** Interaction of bleomycin with DNA. *Proc. Nat. acad. Sci. USA* **75**, 5983-5987
- Taylor J. H., Woods P. S., Hughes W. L. (1957).** The organisation and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labelled thymidine. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **43**, 122-128
- Teebor G. W., Brent T. P. (1981).** Measurement of alkali-labile sites. In: *DNA repair. A laboratory manual of research procedures*. Vol. 1., Part A., Eds. E. C. Friedberg, and P. C. Hanawalt, Marcel Dekker Inc., New York and Basel, 203-212
- Theodorakis C. W. (2001).** Integration of genotoxic and population genetic endpoints in biomonitoring and risk assessment. *Ecotoxicology* **10**, 245-256
- Theodorakis C. W., D'Surney S. J., Bicham J. W., Lyne T. B., Bradley B. P., Hawkins W. E., Farkas W. F., McCarthy J. F., Shugart L. R. (1992).** Sequential expression of biomarkers in bluegill sunfish exposed to contaminated sediment. *Ecotoxicology* **1**, 45-73
- Theodorakis C. W., D'Surney S. J., Shugart L. R. (1994).** Detection of genotoxic insult as a DNA strand breaks in fish blood cells by agarose gel electrophoresis. *Environm. Toxicol. Chem.* **13**, 1023-1031

- Theodorakis C. W., Shugart L. R. (1997).** Genetic ecotoxicology I: DNA integrity and reproduction in mosquitofish exposed *in situ* to radionuclides. *Ecotoxicology* **6**, 205-218
- Theodorakis C. W., Shugart L. R. (1998).** Genetic ecotoxicology II: population genetic structure in mosquitofish exposed *in situ* to radionuclides. *Ecotoxicology* **6**, 335-354
- Theodorakis C. W., Bickham J. W., Elbl T., Shugart L. R., Chesser R. K. (1998).** Genetics of radionuclide-contaminated mosquitofish populations and homology between *Gambusia affinis* and *G. holbrooki*. *Environm. Toxicol. Chem.* **17**, 1992-1998
- Theodorakis C. W., Shugart L. R. (1999).** the relationship between DNA strand breaks and genotype in mosquito fish exposed to radiation. *Ecotoxicology* **7**, 227-236
- Theodorakis C. W., Elbl T., Shugart L. R. (1999).** Genetic ecotoxicology IV: survival and DNA strand breakage is dependent on genotype in radionuclide-exposed mosquitofish. *Aquat. Toxicol.* **45**, 279-291
- Theodorakis C. W., Bickham J. W., Lamb T., Medica P. A., Lyne T. N. (2001).** Integration of genotoxicity and population genetic analyses in kangaroo rats (*Dipodomys merriami*) exposed to radionuclide contamination at the Nevada test site, USA. *Env. Toxicol. Chem.* **20**, 317-326
- Timbrell J. A. (1996).** MRC/IEH workshop on the use of biomarkers in environmental exposure assessment, Leicester, UK, 30 November - 1 December 1995. *Biomarkers* **1**, 67-70
- Tomei L. D., Shapiro J. P., Cope F. O. (1993).** Apoptosis in C3H/10T1/2 mouse embryonic cells, evidence for internucleosomal DNA modification in the absence of double-strand cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 853-857
- UNEP/ECE/UNIDO/FAO/WHO/IAEA (1984).** Pollutants from land-based sources in the Mediterranean. UNEP regional seas reports and studies, Athenas, 32
- UNEP (1988).** National monitoring programme of Yugoslavia, report for 1983-1986. MAP technical reports Series 23, Athens, 223
- Vähäkangas K., Pelkonen O. (1989).** Host variations in carcinogen metabolism and DNA repair. In: Genetic Epidemiology of Cancer, Eds. H. T. Lynch and T. Hirayama, CRC Press, Boca Raton, Florida, 35-54
- Van Beneden R. J. (1994).** Molecular analysis of bivalve tumors: models for environmental/genetic interactions. *Environ. Health Perspect.* **102**, 81-83

- Van der Gaag M. A., Van der Kerkoff J. F. J. (1985).** Mutagenicity testing of water with fish: a step forward to a reliable assay. *Sci. Total Environ.* **47**, 293-298
- Van Gestel C. A. M., Van Brummelen T. C. (1996).** Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology* **5**, 217-225
- Venier P., Canova S. (1996).** Formation of DNA adducts in the gill tissue of *Mytilus galloprovincialis* treated with benzo[a]pyrene. *Aquat. Toxicol.* **34**, 119-133
- Viarengo A., Canesi L. (1991).** Mussels as biological indicators of pollution. *Aquaculture* **94**, 225-243
- Viarengo A., Canesi L., Petrica M., Livingstone D. R. (1991).** Seasonal variations in the antioxidant defence systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. *Comp. Biochem. Physiol.* **100B**, 187-190
- Vitousek P. M., Mooney H. A., Lubchenka J., Melillo J. M. (1997).** Human domination of Earth's ecosystem. *Science* **277**, 494-499
- Vukmirović M., Bihari N., Zahn R. K., Muller W. E. G., Batel R. (1994).** DNA damage in marine mussel *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of environmental contamination. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **109**, 165-171
- Ward J. F. (1988).** DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells, identities, mechanisms of formation, and repair ability. *Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **35**, 95-125
- Ward J. F. (1990).** The yield of DNA double-strand breaks produced intracellularly by ionizing radiation, a review. *Int. J. Rad. Biol.* **57**, 1141-50
- Widdows J., Moore M. N., Lowe D. M., Salkeld P. N. (1979).** Some effects of dinoflagellate bloom (*Gyrodinium aureolum*) on the mussel, *Mytilus edulis*. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* **59**, 522-524
- Widdows J., Donkin P., Evans S. V. (1987).** Physiological responses of *Mytilus edulis* during chronic oil exposure and recovery. *Mar. Environ. Res.* **23**, 15-32
- Widdows J., Newell R. I. E., Mann R. (1989).** Effects of hypoxia and anoxia on survival, energy metabolism and feeding of oyster larvae (*Crassostrea virginica*, Gmelin). *Biol. Bull.* **177**, 154-166
- Widdows J., Donkin P. (1991).** Role of physiological energetics in ecotoxicology. *Copm. Biochem. Physiol.* **100C**, 69-75

- Williams R. T. (1974).** Inter-species variations in the metabolism of xenobiotics. *Biochem. Soc. Trans.* **231**, 503-510
- Wilson J. T., Pascoe P. L., parry J. M., Dixon D. R. (1998).** Evaluation of the comet assay as a method for the detection of DNA damage in the cells of a marine invertebrate, *Mytilus edulis* L. (Mollusca: Pelecypoda). *Mutat. Res.* **399**, 87-95
- Wriesberg M. N., Bilbo C. M., Splidd H., (1992).** Induction of the micronuclei in hemocytes of *Mytilus edulis* and statistical analysis. *Ecotoxicol. Envir. Safety* **23**, 191-205
- Würgler, F. E., Kramers, P. G. N. (1992).** Environmental effects of genotoxins (eco-genotoxicology). *Mutagenesis* **7**, 321-327
- Zahn R. K. (1991).** Primary deoxyribonucleic acid damage produce in the marine environment by pollution, assessment and possible consequences. In: *Ecotoxicology and the marine environment*, Eds. P. D. Abel and V. Axiak, Ellis Horwood, New York, London, 201-218
- Zahn R. K., Müller W. E. G., Kurelec B., Rijavec M., Michaelis M. L. (1981).** Single strand nicks. Cause or consequence of environmental damage and ageing. *Res. Mol. Biol.* **10**, 20-42
- Zahn R. K., Kurelec B., Zahn-Daimler G., Muller W. E. G., Rijavec M., Batel R., Given R., Pondeljok V., Beyer R. (1982).** The effect of benzo[a]pyrene on sponges as model organisms in marine pollution. *Chem. Biol. Interact.* **39**, 205-20
- Zavodnik D. (1977).** Benthic communities in the Adriatic Sea, reflects on pollution. *Thalasia Jugosl.* **13**, 211-436
- Xu L., Zheng G. J., Lam P. K. S., Richardson B. J. (1999).** Relationship between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and DNA adducts in green-lipped mussels (*Perna viridis*). *Ecotoxicology* **8**, 73-82

8. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 27. prosinca 1966. godine u Puli, gdje sam završio osnovnu i srednju medicinsku školu. Godine 1986. započeo sam sa studijem na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu, smjer biokemijsko inženjerstvo. Diplomski rad iz područja organske kemije, "Priprava i reakcije ferocenilmetilamonijevih soli" obranio sam 19. prosinca 1990. godine. Od 1. ožujka 1991. do 12. lipnja 1994. godine radio sam u Institutu "Ruđer Bošković", Centar za istraživanje mora - Rovinj, Laboratorij za morsku molekularnu biologiju. U jesen 1991. godine upisao sam postdiplomski studij iz prirodnih znanosti, na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, Sveučilita u Zagrebu. Magistarski rad s naslovom "Indukcija citokroma P-450 1A₁ u jetri lubina *Dicentrarchus labrax* (L.) obranio sam 20. prosinca 1993. godine i stekao zvanje magistra prirodnih znanosti iz područja kemija - oceanologija. Od 13. lipnja 1994. do 31. srpnja 1998. godine radio sam u Zavodu za javno zdravstvo Županije istarske u Puli, u Službi za zdravstvenu ekologiju, Odjelu za kontrolu kvalitete namirnca i predmeta opće uporabe, kao voditelj Laboratorija za kontrolu zdravstvene ispravnosti namirnca i predmeta opće uporabe na razvoju i primjeni kromatografskih metoda (GLC, HPLC) određivanja rezidua u namirnicama i predmetima opće uporabe. Od 1. rujna 1998. godine ponovno sam zaposlen u Institutu "Ruđer Bošković", Zavodu za istraživanje mora u Rovinju, u Laboratoriju za morsku molekularnu toksikologiju. Tijekom rada u Institutu "Ruđer Bošković" u više navrata sam boravio u Institutu za fiziološku kemiju, Sveučilišta u Mainzu, te na Akademiji znanosti i literature u Mainzu (AMMUG), Njemačka, na temelju znanstvene suradnje na projektima MZT RH "Utjecaj zagađenja na programirane biosinteze" i "Mehanizmi popravka i oštećenja DNA u morskih beskralješnjaka" (R. Batel: projekt 1-08-222, tema programa 00981306). Sudjelovao sam na nekoliko međunarodnih i domaćih stručno-znanstvenih skupova. Koautor sam nekoliko znanstvenih publikacija.

9. POPIS RADOVA

1. Batel R., Vukmirović M., **Jakšić Ž.**, Bihari N. (1994). Impact of pollution on DNA fragmentation in marine invertebrates. In: Use of Aquatic Invertebrates as Tools for Monitoring of Environmental Hazards, Ed. W. E. G. Müller, Gustav Fisher Verlag, Stuttgart - Jena - New York, 109-119
2. **Jakšić Ž.**, Bihari N., Müller W. E. G., Zahn R. K., Batel R. (1998). Modulation of cytochrome P450 1A in sea bass liver model substances and seawater extracts, *Aquatic Toxicol.* **40**, 256-273
3. Batel R., **Jakšić Ž.**, Bihari N., Hamer B., Fafangel M., Chauvin C., Schroder H. C., Müller W. E. G., Zahn R. K. (1999). A Microplate Assay for DNA Damage Determination (Fast Micromethod)¹ in Cell Suspensions and Solid Tissues, *Annal. Biochem.* **270**, 195-200
4. Mičić M., Bihari N., **Jakšić Ž.**, Müller W. E. G., Batel R. (2002). DNA damage and apoptosis in mussel *Mytilus galloprovincialis*, *Mar. Environ. Res.* **53**, 243-262
5. Bihari N., Hamer B., **Jakšić Ž.**, Fafangel M., Mičić M., Batel R. (2002). Application of alkaline elution, Fast micromethod and flow cytometry in detection of marine contamination, *Cell. Mol. Biol.* **48**, 373-377
6. Bihari N., Batel R., **Jakšić Ž.**, Müller W. E. G., Waldmann P., Zahn R. K. (2002). Comparison between DNA damage in HeLa cells as measured by a Comet assay and Fast Micromethod[®], *Croat. Chem. Acta* **75**, *in press*

**10. UČEŠĆE NA ZNANSTVENIM
SKUPOVIMA**

1. Bihari N., Hamer B., **Jakšić Ž.**, Fafangel M., Mičić M., Batel R. (2000). Application of alkaline elution, Fast micromethod and flow cytometry in detection of marine contamination, 3rd World-Congres on cellular and Molecular Biology Jena, 08. 10. - 13. 10. 2000.
Objavljeno u: Cell. Mol. Biol., Ed. R. J. Wegwman, Paris: C. M. B. Association, **46**, 19
2. **Jakšić Ž.**, Bihari N., Batel R. (2000). Fast Micromethod[®] as a tool for DNA damage determination in different cell lines and tissues - poster, Kongres hrvatskih biokemičara i molekularnih biologa uz međunarodno sudjelovanje HBD 2000. Zagreb, 13. 10. - 15. 10. 2000.
Objavljeno u: Program i knjiga sažetaka, Silver Jubilee Meeting of the Croatian Biochemical Society, Flogel Mirna (ur). Zagreb: Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 59
3. **Jakšić Ž.**, (2001). DNA Damage Determination in Gills of the Mussel *Mytilus galloprovincialis* Lam. (Molusca: Bivalvia) by Fast Micromethod[®] - poster, 36th CIESM Congress, Monte Carlo, Monaco, 24. 09. - 28. 09. 2001.
Objavljeno u: Rapport du 36e Congrès de la CIESM, 36th CIESM Congress Proceedings, Monte-Carlo (Monaco), Rapp. Comm. Int. Mer Médit., **36**, 193

4. **Jakšić Ž**, Batel R. (2002). DNA Damage Determination in Gills of the Mussel *Mytilus galloprovincialis* Lam. (Molusca: Bivalvia) by Fast Micromethod[®] - poster, Opatija, 09. 06. - 13. 06. 2002.

Objavljeno u: Book of abstarcts, 1st Croatian Congres on Molecular Life Science with intermnational participation, Jerka Dumić et. al (eds.), Zagreb: Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zgrebu, 95