# Učinkovitost popravka DNA u prirodnim populacijama dagnje Mytilus galloprovincialis

**Smodlaka, Mirta**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2015**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:185341

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-28**

*Repository / Repozitorij:*

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
GEOLOŠKI ODSJEK

Mirta Smodlaka

# Učinkovitost popravka DNA u prirodnim populacijama dagnje *Mytilus galloprovincialis*

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2015.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF GEOLOGY

Mirta Smodlaka

# DNA repair capacity in natural mussel *Mytilus galloprovincialis* population

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2015

Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
GEOLOŠKI ODSJEK

Mirta Smodlaka

# Učinkovitost popravka DNA u prirodnim populacijama dagnje *Mytilus galloprovincialis*

DOKTORSKI RAD

Mentor: izv.prof.dr.sc. Maja Fafanđel

Zagreb, 2015.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF GEOLOGY

Mirta Smodlaka

# DNA repair capacity in natural mussel *Mytilus galloprovincialis* population

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Dr.sc. Maja Fafanđel

Zagreb, 2015

Ovaj rad predan je na ocjenu Vijeću poslijediplomskog doktorskog studija Oceanologije, Geološkog odsjeka Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, radi stjecanja akademskog stupnja doktora prirodnih znanosti, grana znanost o moru.

Ovaj je doktorski rad izrađen u Laboratoriju za morsku ekotoksikologiju Centra za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković u Rovinju, pod vodstvom izv.prof.dr.sc. Maje Fafanđel, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Oceanologije pri Geološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Rad je opremljen sredstvima Centra za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković u Rovinju i Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta Republike Hrvatske u programu Prirodni i antropogeni utjecaji na procese i ekološke odnose u Jadranskom moru na projektu Ekotoksični učinci onečišćenja na morske organizme, voditeljica: prof.dr.sc. Nevenka Bihari (šifra z-projekta 098-0982705-2725).

# ZAHVALA

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Maji Fafanđel, višoj znanstvenoj suradnici Instituta Ruđer Bošković, na ukazanom povjerenju, te stručnim savjetima tijekom izrade doktorskog rada.

Zahvaljujem voditeljici Laboratorija za morsku ekotoksikologiju prof. dr. sc. Nevenki Bihari na susretljivosti, strpljenju, brojnim vrijednim savjetima i velikoj pomoći tijekom izrade rada.

Zahvaljujem članovima povjerenstva prof. dr. sc. Nevenki Bihari, prof. Renatu Batelu, prof. dr. sc. Mirjani Pavlica i dr. sc. Marijani Erk na korisnim savjetima, brzini i poboljšanju ovog rukopisa.

Zahvaljujem mojim curama iz sobe Sandi Ravlić i Ani Baričević koje su bile uz mene tokom ove avanture.

Zahvaljujem dr. sc. Loreni Perić, dr. sc. Jeleni Godrijan i Marinu Korleviću na pomoći i podršci.

Zahvaljujem Anniki Batel na uzorkovanju i maštovitoj dostavi.

Zahvaljujem kolegama Danieli, Martinu, Mariji, Kseniji, Emini, Ines, Petri i Tini na zajedničkim raspravama i nesebičnoj pomoći kad god je bilo potrebno.

Zahvaljujem kolegama iz Centra za istraživanje mora koji su na bilo koji način doprinijeli izradi ovog rada.

Zahvaljujem svojim prijateljima.

Posebna zahvala ide mojoj obitelji koja je u svim trenucima tokom izrade ovog rada bila bezuvjetno uz mene. Volim vas.

Mirta Smodlaka

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Geološki odsjek

Doktorski rad

**Učinkovitost popravka DNA u prirodnim populacijama dagnje *Mytilus galloprovincialis***

MIRTA SMODLAKA

Centar za istraživanje mora, Institut Ruđer Bošković, G. Paliage 5, Rovinj

Popravak DNA je ključni mehanizam održavanja integriteta genoma i obrane od posljedica učinka genotoksičnih zagađivala. Sposobnost i brzina popravka predstavljaju važan biomarker za praćenje kvalitete morskog okoliša i postoji potreba za jednostavnom i ekonomičnom metodom mjerenja učinkovitosti popravka DNA u bioindikatorskim vrstama. Optimizacijom uvjeta za fluorimetrijsku detekciju 3D metodom u ovom radu je uspostavljen protokol za mjerenje učinkovitosti popravka DNA u probavnoj žlijezdi i škrgama dagnje *Mytilus galloprovincialis*. Utvrđeno je da učinkovitost popravka DNA u probavnoj žlijezdi dagnje je viša nego u škrgama, što ukazuje na tkivnu specifičnost popravka DNA, a njihova međusobna korelacija ukazuje na usklađeni odgovor ovih organa na prisutnost genotoksina. Integritet DNA u hemocitima dagnje *Mytilus galloprovincialis*, kao pokazatelj genotoksičnog pritiska okoliša, korelira s učinkovitosti popravka DNA probavne žlijezde, koja se razlikuje za populacije dagnje koje naseljavaju područja s različitim antropogenim pritiskom. Zaključuje se da je 3D metodom moguće sustavno praćenje genotoksičnog rizika u prirodnim populacijama dagnje, čime se može unaprijediti procjena genotoksičnog rizika u ekotoksikološkim studijama.

Rad je pohranjen u knjižnici Instituta Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, Zagreb.

(101 stranica, 23 slike, 6 tablica, 189 literaturnih navoda, jezik izvornika hrvatski)

**Ključne riječi**: Popravak DNA, cjelovitost DNA, genotoksičnost, dagnja, 3D metoda, protočna citometrija, Jadransko more

**Mentor:** Izv. prof. dr. sc. Maja Fafanđel, viši znanstveni suradnik, IRB

**Ocjenjivači:** Prof. dr. sc. Nevenka Bihari, znanstvena savjetnica, IRB
Prof. dr. sc. Renato Batel, znanstveni savjetnik, IRB
Prof. dr. sc. Mirjana Pavlica, PMF

**Rad prihvaćen:** 2.6.2015.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Geology

Doctoral thesis

**DNA repair capacity in natural mussel *Mytilus galloprovincialis* population**

MIRTA SMODLAKA

Centre for Marine Research, Ruđer Bošković Institute, G. Paliaga 5, Rovinj

DNA repair is a key mechanism for the genome integrity maintenance and defense against the consequences of genotoxic pollutants. The DNA repair capacity in marine bioindicator species is an important biomarker for the marine environment monitoring that demand a simple and economic method. Following optimization of the 3D method a new protocol was established that allows a fluorimetric measurement of the DNA repair capacity in the digestive gland and gills of mussel *Mytilus galloprovincialis* was tested. The DNA repair capacity in the digestive gland was higher than in the gills suggesting that DNA repair capacity is tissue specific. The correlation between the DNA repair capacities of investigated tissues indicates a coordinated response of the organism to genotoxic pressure. DNA repair capacity in digestive gland distinguished population living under different anthropogenic pressure as well as correlated with the DNA integrity in haemocytes as indicators of environmental genotoxic pressure. Introduction of the 3D method measurement of DNA repair capacity into the ecotoxicological studies could improve the assessment of the genotoxic risks in the marine environment.

This Dissertation is stored in the library of the Ruđer Bošković Institute - Zagreb, Bijenička cesta 54, Zagreb.

(101 pages, 23 figures, 6 tables, 189 references, original in Croatian)

**Keywords:** DNA repair, DNA integrity, genotoxicity, mussel, 3D assay, flow cytometry, Adriatic Sea

**Supervisor:** Maja Fafanđel, PhD, IRB

**Reviewers:** Prof. Nevenka Bihari, IRB
Prof. Renato Batel, IRB
Prof. Mirjana Pavlica, PMF

**Thesis accepted:** 2.6.2015.

# SADRŽAJ

POPIS KRATICA ..... VIII

1 UVOD ..... 2

1.1 Genotoksičnost ..... 4

1.1.1 Oštećenja DNA ..... 4

1.1.2 Popravak DNA ..... 8

1.2 Metode određivanja genotoksičnog učinka ..... 14

1.2.1 Određivanje cjelovitosti DNA u morskim organizmima ..... 14

1.2.1.1 Određivanje cjelovitosti DNA alkalnom eluacijom ..... 14

1.2.1.2 Određivanje cjelovitosti DNA *FAST* mikrometodom ..... 15

1.2.1.3 Određivanje cjelovitosti DNA protočnom citometrijom ..... 15

1.2.2 Određivanje popravka DNA ..... 16

1.2.2.1 Komet test ..... 16

1.2.2.2 3D metoda ..... 18

1.3 Popravak DNA u morskim organizmima ..... 19

1.4 Genotoksični učinak zagađivala kao pokazatelj stanja morskog okoliša ..... 21

1.5 Dagnja *Mytilus galloprovincialis* kao bioindikatorska vrsta ..... 29

2 CILJEVI ISTRAŽIVANJA ..... 33

3 MATERIJALI I METODE ..... 35

3.1 Kemikalije ..... 35

3.2 Organizmi i izolacija tkiva ..... 35

3.3 Priprema proteinskih ekstrakata ..... 38

3.3.1 Homogenizacija ..... 38

3.3.2 Određivanje koncentracije ukupnih proteina ..... 39

3.3.3 Izolacija jezgrenih i citoplazmatskih frakcija ..... 40

3.4 Mjerenje učinkovitosti popravka DNA ..... 41

3.4.1 Priprema supstrata ..... 41

3.4.1.1 Oštećenje supstrata (plazmidna DNA) ..... 41

3.4.1.2 Provjera oštećenja supstrata ..... 41

3.4.2 Prilagođavanje 3D metode za mjerenje učinkovitosti popravka DNA u tkivima dagnje ..... 42

3.4.2.1 Vezanje plazmida na mikroploču ..... 42

3.4.2.2 Reakcija popravka ..... 42

3.4.2.3 Detekcija ugrađenih obilježenih nukleotida ..... 43

3.5 Mjerenje integriteta genoma protočnom citometrijom ..... 44

3.6 Statistička obrada podatka ..... 44

4 REZULTATI ..... 46

4.1 Prilagodba metode određivanja *in vitro* popravka DNA za tkiva dagnje *Mytilus galloprovincialis* ..... 46

4.1.1 Utvrđivanje optimalnih uvjeta ..... 46

4.1.1.1 Provjera oštećenja supstrata ..... 46

4.1.1.2 Uvjeti reakcije ..... 48

4.1.1.3 Ovisnost fluorescencije o sastavu reakcijske smjese ..... 50

4.1.1.4 Testiranje učinkovitosti popravka DNA izoliranih frakcija ukupnih proteina, citoplazmatskih i jezgrenih proteina iz probavne žlijezde i škrga dagnje *Mytilus galloprovincialis* ..... 51

4.1.1.5 Optimalni uvjeti reakcije popravka DNA ..... 52

4.1.2 Testiranje optimalnih uvjeta ..... 53

4.1.2.1 Razina oštećenja supstrata ..... 53

4.1.2.2 Vrijeme inkubacije ..... 54

4.2 Učinkovitost mehanizma popravka DNA prirodnih populacija dagnje *Mytilus galloprovincialis* ..... 56

4.3 Cjelovitost DNA u hemocitima dagnje *Mytilus galloprovincialis* ..... 61

4.4 Odnos cjelovitosti i učinkovitosti popravka DNA za tkiva dagnje *Mytilus galloprovincialis* ..... 64

5 RASPRAVA ..... 69

6 ZAKLJUČAK ..... 78

7 LITERATURA ..... 80

8 ŽIVOTOPIS ..... VIII

# POPIS KRATICA

| | |
|---|---|
| DNA | deoksiribonukleinska kiselina |
| DMSO | dimetil sulfoksid |
| TRIS | Tris (hidroksimetil) aminometan |
| EDTA | etilendiamintetraoctena kiselina |
| PMSF | fenilmetansulfonilfluorid |
| PBS | fosfatni pufer |
| BSA | goveđi serum albumin |
| CPD | ciklobutanski pirimidinski dimeri |
| AP | apurinsko mjesto |
| UV | ultraljubičasto zračenje (eng. ultraviolet) |
| DIG | digokigenin |
| PAH | policiklički aromatski ugljikovodici |
| DDT | diklor – difenil - trikloretan |
| PCB | poliklorirani bifenili |
| DAPI | 4' – 6 – diaminido – 2 – fenil indol |
| 2,4 - D | 2,4 – diklorofenoksi octena kiselina |
| CV | koeficijent varijacije |
| NQO | 4-nitrokinolin-1-oksid |
| BaP | Benzo[a]piren |

# 1. UVOD

# 1 UVOD

Molekula DNA tijekom staničnog života podložna je brojnim napadima koji utječu na njenu strukturu, a takve strukturalne promjene često vode do mutacija ili čak stanične smrti (Wiseman i Halliwell, 1996). S kemijskog stajališta, molekula DNA pogodna je za održavanje genetičke informacije jer glavne kemijske veze u molekuli DNA, fosfodiesterska veza koja stvara okosnicu molekule DNA i N-glikozidna veza koja omogućava da se četiri baze vežu za okosnicu, su vrlo stabilne u fiziološkim uvjetima. Baze u molekuli DNA su također zaštićene jer su postavljene jedna iznad druge u središtu dvostruke zavojnice. Unatoč takvoj strukturi DNA se često mijenja i svaka takva promjena kemijske strukture smatra se oštećenjem DNA. Oštećenja na molekuli DNA mogu zaustaviti važne procese kao što su replikacija i transkripcija (Livneh, 2001). Nadalje, kao posljedica replikacije oštećene DNA može doći do promjena genetičke informacije uslijed pretvaranja oštećenja u mutacije koje mogu predstavljati opasnost za stanicu a na posljetku i za cijeli organizam. Da bi se prebrodili takvi događaji i da bi se sačuvala genetička informacija, stanice i organizmi razvili su mehanizme popravka različitih oštećenja DNA. Sposobnost stanica da prežive genotoksični stres povezan je izravno s njihovom sposobnošću popravka DNA (Wheeler i sur., 1992, Clancy, 2008, Warmerdam i Kanaar, 2010). U zadnjih nekoliko godina veliki napredak ostvaren je u razumijevanju različitih mehanizama popravka DNA, iako još uvijek postoje dijelovi koji su ostali nerazjašnjeni (Friedberg i sur., 2006, Kienzler i sur., 2013a, Calderon-Montano i sur., 2014). Srećom, u mnogim slučajevima nije potrebno prepoznavanje određenog mehanizma popravka DNA nego je ključna sposobnost popravka stanica ili određenog tkiva (Akcha i sur., 2000a, Ahmed i sur., 2011, Kienzler i sur., 2013a, Ventura i sur., 2013). Iz navedenih razloga sposobnost i brzina popravka DNA predstavljaju važne biomarkere, s indikacijskom i dijagnostičkom vrijednošću, koji se koriste u medicini i praćenju kvalitete okoliša (Gagne i sur., 2008, Nagel i sur., 2014).

Mora i oceani pokrivaju gotovo tri četvrtine naše planete, a napučenost obalnih krajeva raste čineći sve veći pritisak na priobalne morske ekosustave. Prisutnost različitih onečišćivala u moru ugrožava zdravlje morskog ekosustava i njegovih živih bogatstava. Među brojnim tvarima koje onečišćuju morski okoliš nalaze se kemikalije koje oštećuju DNA, tzv. genotoksini, koji se najčešće pojavljuju u složenim smjesama i nepoznatim koncentracijama. Tijekom svog života morski organizmi mogu doći u doticaj s genotoksinima te ih unijeti u svoje tijelo gdje će izravno ili nakon metaboličke aktivacije oštetiti njihovu DNA (Parry i sur., 1985). Određivanje biološkog učinka genotoksičnih agensa u morskim organizmima danas je usredotočeno na praćenje oštećenja molekule DNA dok je mehanizam popravka nedovoljno istražen. Istraživanja popravka DNA u prirodnim populacijama morskih organizama izloženim zagađenju mogu ukazati na opterećenost područja genotoksičnim zagađivalima. Za određivanje učinkovitosti popravka DNA uglavnom se koriste testovi koji ukazuju na smanjenje količine oštećenja u stanici s vremenom ili mjerenjem ekspresije gena uključenih u mehanizmima popravka DNA (Valdiglesias i sur., 2011). Oba pristupa daju kvalitetne podatke o popravku DNA ali uglavnom su postupci dugotrajni, relativno skupi i često je potrebna posebna oprema i obuka istraživaća. Iz tih razloga proizlazi potreba za jednostavnijom i jeftinijom metodom mjerenja učinkovitosti popravka DNA. Godinama je prisutna 3D metoda (Salles i sur., 1995), kemiluminescentna metoda u mikropločama za detekciju učinkovitosti popravka DNA staničnih kultura kralježnjaka. Prilagođavanje ove metode za mjerenje učinkovitosti popravka DNA morskih beskralješnjaka omogućit će, bez gubitka kvalitete rezultata, brže ali jednako vrijedne podatke o učinkovitosti popravka DNA kako za potrebe znanstvenih istraživanja mehanizama popravka u beskralješnjacima tako i za ekotoksikološke studije stanja morskog okoliša.

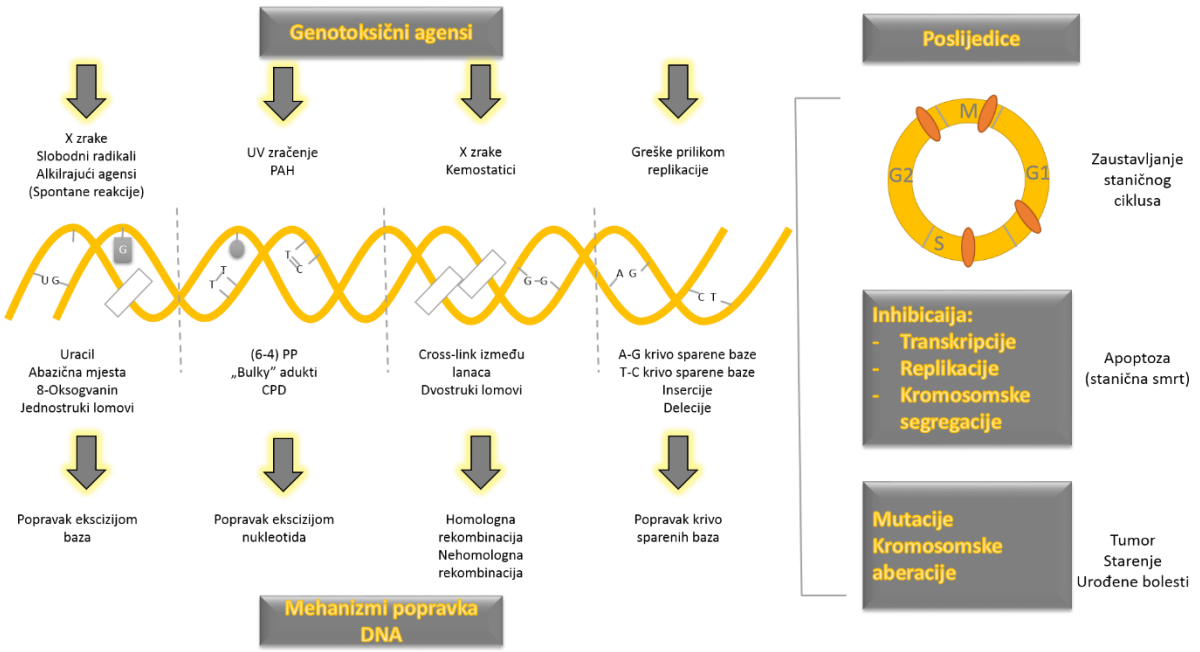
## 1.1 Genotoksičnost

Genotoksičnost se definira kao svojstvo kemijskog spoja da može oštetiti genetičku informaciju u stanici, a takvi spojevi nazivaju se genotoksini. Štetni učinak genotoksina posljedica je kemijskih interakcija koje narušavaju strukturu i mijenjaju nukleotidni slijed DNA. Genotoksini utječu na DNA izravno ili neizravno nakon što su se prethodno metabolički aktivirali. Mnogi stanični mehanizmi metaboličke transformacije rezultiraju stvaranjem reaktivnih elektrofilnih metabolita koji se vežu na nukleofilna mjesta makromolekula uzrokujući primarna oštećenja DNA. Posljedice ovih primarnih promjena DNA ne moraju biti opasne za stanicu s obzirom na mogućnost popravka nastalih oštećenja. Međutim, ako se ova oštećenja pravovremeno ne poprave, zadržavaju se unutar genoma, mogu se prenijeti na stanice kćeri ili pak dovesti do sekundarnih promjena DNA, kao što su kromosomske aberacije, zamjena sestrinskih kromatida i aktivacija onkogena što u konačnici rezultirati opasnim patološkim posljedicama (Harvey, 1982). Stabilnost genetičke informacije ostvaruje se održavanjem ravnotežnog stanja između nastanka oštećenja DNA i njihovog uklanjanja mehanizmima popravka DNA. Organizmi izloženi genotoksinima će imati pomak ravnotežnog stanja u smjeru oštećenja (Shugart i sur., 1992).

### 1.1.1 Oštećenja DNA

Osim što oštećenja DNA nastaju prirodnim pojavama (De Bont i Van Larebeke, 2004) genotoksične tvari mogu dodatno oštetiti molekulu DNA. Međutim većina tvari stvara odjednom nekoliko vrsta oštećenja DNA, a neke čak mogu prijeći iz jedne vrste u drugu vrstu oštećenja. Iz tih razloga spektar oštećenja je vrlo složen i često je nemoguće usredotočiti se na jednu vrstu oštećenja pojedinačno (Friedberg i sur., 2005) a njihove posljedice mogu imati odraz na molekularnoj, staničnoj i tkivnoj razini pa sve do populacije ili cijele zajednice (Jha, 2004) (Slika 1). Oštećenja DNA izazvana

genotoksičnim tvarima uključuju jednostruke i dvostruke lomove, modificirane baze, DNA – DNA *crosslink* i DNA – protein *crosslink* (Eastman i Barry, 1992).




Slika 1. Vrste oštećenja DNA izazvane genotoksičnim agensima i mehanizmi popravka DNA koji sudjeluju u njihovom popravku te njihove najčešće posljedice.

Jednostruki lomovi ili na engleskom *Single Strand Breaks (SSB)* najčešća su oštećenja DNA i najjednostavnija vrsta oštećenja DNA. Nastaju djelovanjem endogenih i egzogenih tvari koje različitim mehanizmima kidaju fosfodiestersku vezu. U slučajevima kada je fosfodiesterska veza hidrolizirana, novonastali 5' kraj je fosforiliran a 3' kraj sadrži deoksiribozilni dio sa slobodnim 3' – OH skupinom. Ova vrsta oštećenja ne aktivira specifičan mehanizam popravka i u većini slučajeva popravlja se ligacijom. U slučajevima kada nastanu 5'- OH i 3'- fofodeoksirobozil grupe nužna je dorada samih krajeva prije ligacije. Tada se aktiviraju 3' i 5' specifične endonukleaze koje razgrađuju kratke odsječke s obje strane da bi nastali 5'-fosfo i 3'-deoksiribozil krajevi, a DNA se popravi sintezom popunjava pukotine (*gap-filling synthesis*). Tijekom mehanizma

popravka DNA ili zbog drugih vrsta oštećenja DNA isto tako mogu nastati jednostruki lomovi. Kada se oštećene baze uklone s fosfodiestrske okosnice ostavljaju apurinska ili apirimidinska mjesta (*AP sites*) koja se naknadno pretvaraju u jednostruke lomove djelovanjem stanične AP endonukleaze. U postupcima popravka različitih adukata i međulančanih mostova prijelazna faza nastajanja jednostrukih lomova je opisana i može se koristiti za praćenje procesa popravka DNA. [pregledno iz Caldecott (2008)].

Zračenjem DNA UV svjetlom od 260 nm, valnom duljinom maksimuma apsorpcije molekule DNA, nastaju fotoprodukti. UV spektar je dio sunčeve svjetlosti, iako u manjem udjelu, i svi živi organizmi su permanentno izloženi tom zračenju, te je iz tih razloga učinak UV zračenja na DNA je od velikog interesa i intenzivno je istraživan. UV zračenje uzrokuje dvije glavne vrste fotoprodukata: ciklobutanske pirimidinske dimere i pirimidin-pirimidon (6-4) fosfoprodukte. Kada se molekula DNA ozrači UV svjetlom, susjedni pirimidini, i to najčešće timini, koji se nalaze jedan pored drugog sudjeluju u fotoreakciji u kojoj su njihove 5,6 dvostruke veze se saturiraju i stvara se četveročlani ciklobutanski prsten povezujući tako dva susjedna pirimidina. Pirimidinski ciklobutanski prsteni efektivno blokiraju i transkripciju i replikaciju DNA, iako oni ne uzrokuju značajne konformacijske promjene uzvojnice DNA. Drugu vrstu dimera čine pirimidin-pirimidon (6-4) fotoprodukti. Oni se stvaraju između $C^6$ jednog pirimidina i $C^4$ susjednog pirimidina. Ovaj fotoprodukt stvara veću distorziju konformacije molekule DNA. Ove dvije vrste fotoprodukta mogu se raspoznati po tome što su pirimidon fotoprodukti labilni u alkalnim uvjetima dok to ciklobutan dimeri nisu. Poznate su još neke vrste fotoprodukata ali njihova frekvencija je vrlo mala [pregledno iz Sinha i Häder (2002)].

Mnogi kemijski spojevi reagiraju s DNA dajući kao rezultat različite produkte. Oksidativni agensi – kao produkti staničnog metabolizma ili okolišnog porijekla, oksidiraju uglavnom purinske baze stvarajući kao produkt 8-oksopurin ili otvaraju njihov imidazolni prsten stvarajući formamidopirimidin. Alkalni agensi isto tako često reagiraju s molekulom DNA. U ovu skupinu spada vrlo velik broj kemikalija, od koji su

neke koje su monofunkcionalne, a neke bifunkcionalne. Mnogi atomi u sve četiri baze predstavljaju metu za elektrofilne alkalne spojeve i kao rezultat takvih reakcija dobiva se različita količina N- i O- alkiliranih baza kao i alkilfosfati u molekuli DNA. Zbog njihovog genotoksičnog učinka mnogi monofunkcionalni i bifunkcionalni alkilirajući agensi (npr. N-metil-N'nitro-N-nitrozogvanidin) koriste se u tumorskoj terapiji. [pregledno iz De Bont i Van Larebeke (2004)].

Druge kemikalije, kao što su monofunkcijonalni trioksaleni, $N^2$-acetil-2-aminofluoren, 4-nitrokvinolin 1-oksid i drugi, reagiraju s bazama DNA stvarajući klasu modifikacija koje se skupno nazivaju *bulky* adukti. U pravilu oni stvaraju značajne distorzije u DNA strukturi jer se modificirane baze ne mogu smjestiti unutar uobičajene dvostruke zavojnice. Mostovi između lanaca nastali djelovanjem bifunkcionalnih agensa koji reagiraju s dvije baze na istom DNA lancu mogu se isto tako svrstati u ovu vrstu oštećenja. Kao primjer može se uzeti cisplatina koja stvara mostove između 1,2 d (GpG) i 1,3d (GpXpG) gvaninskih baza na istom lancu DNA i stvara značajnu distorziju u dvostrukoj uzvojnici. (Bedard i Massey, 2006)

Iz konformacijskih i termodinamičkih razloga u dvolančanoj DNA gvanini su spareni s citozinima a timidini s adeninima stvarajući GC i AT bazne parove. Neslaganje (*mismatches*) nastaje kada se neke od tih baza spoje s nekomplementarnom bazom. Nekomplementarno sparivanje baza je vrlo mutageno jer će tijekom replikacije DNA jedna će kopija imati izvorni slijed DNA, dok će druga sadržavati novonastalu točkastu mutaciju. Neslaganje u većini slučajeva nastaje tijekom replikacije kada se u novonastajuće lance ugradi pogrešna baza tvoreći nekomplementarni bazni par. (McCulloch i Kunkel, 2008)

Oštećenja koja zahvaćaju oba lanca DNA zovu se dvolančani lomovi ili na engleskom *Double Strand DNA Breaks (DSB)* i međulančane veze ili na engleskom *Interstrand Cross-Links (ICL)*. Za razliku od oštećenja koja pogađaju samo jedan lanac i koja se mogu popraviti pomoću drugog nedirnutog lanca kao kalupa, oštećenja koja zahvaćaju oba lanca se mnogo teže popravljaju. DSB nastaju ionskim zračenjem i utjecajem

različitih kemijskih reagensa s klastogenim utjecajem. U pravilu ovi agensi stvaraju primarno jednolančane lomove, ali kad nastane veći broj jednolančanih lomova u neposrednoj blizini (klasteri oštećenja) a pogotovo jedan preko puta drugog tada nastaju dvostruki lomovi. Dvostruki lomovi su najopasnija oštećenja jer bilo koji dvostruki lom stvara novi kromosom s nezaštićenim krajevima telomera što vodi do kromosomskom rearanžmanu što izravno predstavlja opasnost za stabilnost genoma. Eukariotske stanice toleriraju samo nekoliko dvostrukih lomova po genomu, nakon čega aktiviraju proces apoptoze (Lees-Miller i Meek, 2003).

Međulančane veze nastaju kada agensi kao što su primjerice nitrogen i sulfur iperiti, ili cisplatina reagiraju s bazama na suprotnim lancima. Isto tako se mnogi kompleksni organski spojevi poput benzopirena i mnogi antibiotici kao što je mitomicin C se interkaliraju u dvostruku uzvojnicu DNA i stvaraju međulančane mostove. Ovakve vrste oštećenja teško je popraviti i u većini slučajeva više mehanizama popravka je uključeno u njihovo uklanjanje (Dronkert i Kanaar, 2001).

### 1.1.2 Popravak DNA

Ima slučajeva kada se popravak DNA odvija tako da se poništi oštećenje. U tu skupinu spada popravak dvostrukih lomova jednostavnom resintezom DNA i ponovnom ligacijom. Drugi primjer je poništenje pirimidinskih ciklobutanskih dimera pomoću fotoreaktivacije. U ovom slučaju dimeri se enzimatski monomeriziraju nakon osvjetljavanja. Enzimi koji obavljaju tu reakciju poznati su pod zajedničkim imenom fotoliaze jer se aktiviraju pomoću dugovalnog UV-a ili vidljivom svjetlošću (300-600 nm). Jako su rasprostranjeni u prirodi i izolirani su iz mnogobrojnih bakterija i eukariotskih stanica. Fotoliaze za sada još uvijek nisu pronađene u sisavaca što ukazuje da se ovakva aktivnost vjerojatno izgubila tijekom evolucije (Kienzler i sur., 2013b).

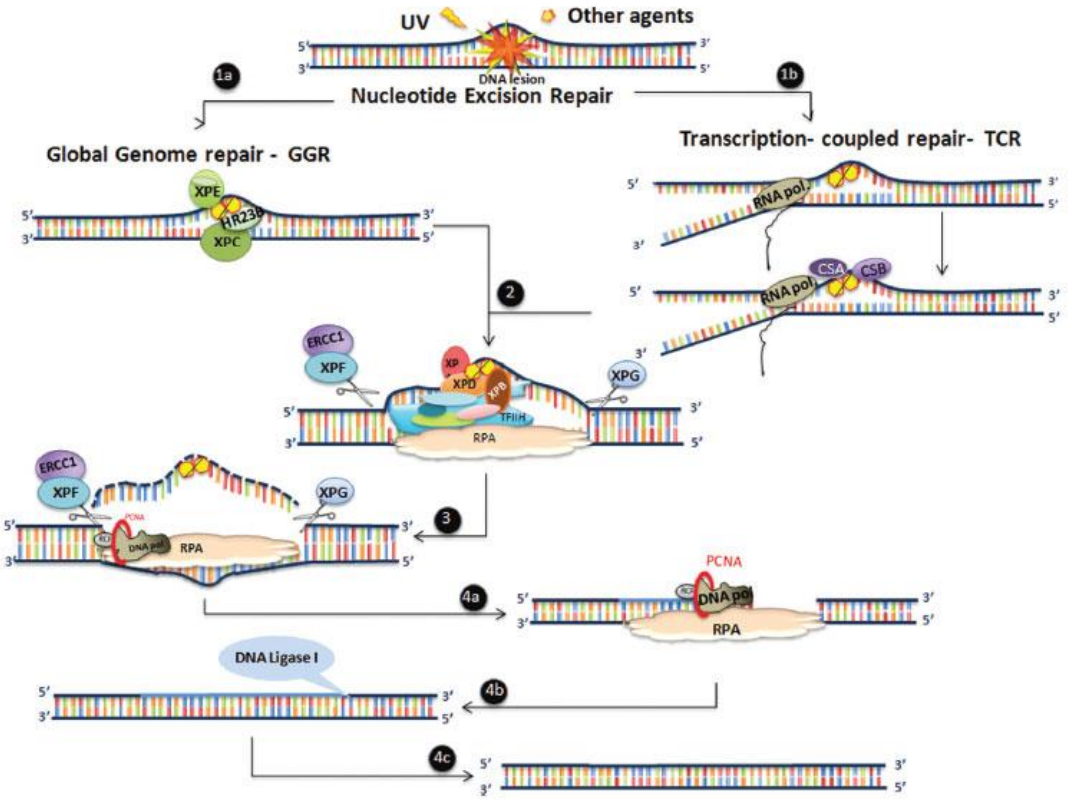
Još jedna poznata i univerzalna reakcija je dealkilacija $O^6$-alkilgvanina i $O^4$-alkiltimina koje obavljaju specifične DNA alkiltransferaze. Alkilirajući agensi u većini slučajeva

stvaraju N- i O- alkilirane baze. U prokariotskim i eukariotskim stanicama postoji enzimatski mehanizam koji može učinkovito ukloniti alkilnu skupinu s O-alkil derivata jer se $O^6$-alkil G se sparuje s T i $O^4$-alkil T se sparuje s G. Evolucijski, ovakvi prečaci su nastali kako bi se osigurao izravni i učinkoviti popravak takvih oštećenja i spriječile mutacije s negativnim utjecajem na organizam (Zharkov, 2008).

Ova vrsta popravka je prisutna u svim prokariotskim i eukariotskim stanicama. Pomoću ovog mehanizma se popravljaju manja oštećenja koja su većinom endogena, kao što su deaminacija citozina ili oksidacija gvanina. U BER (*Base Excision Repair*) popravku oštećena baza se izreže kao slobodna baza. Proces počinje s aktivacijom specifične DNA glikozilaze koja izreže oštećenu bazu s okosnice šećera i fosfata i ostavlja prazno AP (apurinsko ili apirimidinsko) mjesto. Nastalo AP mjesto se obradi da postane jednolančani lom ili urez nakon djelovanja AP endonukleaze, koja hidrolizira fosfodiestersku vezu 5' kraja AP mjesta. Nakon toga stanične endonukleaze uklanjaju preostali 5'-šećer oslobađajući mjesto za neoštećeni nukleotid koji se ugrađuje pomoću DNA polimeraze. Za kraj se DNA integritet vraća na način da se ligacijom poveže lanac (Wilson III i Bohr, 2007).

Najuniverzalniji i najrašireniji mehanizam popravka u prokariotskim i eukariotskim stanicama je popravak izrezivanjem nukleotida (NER, *Nucleotide Excision Repair*) (Feuerhahn i Egly, 2008, Fousteri i Mullenders, 2008, Shuck i sur., 2008). Ovom vrstom popravka uklanja se veliki broj oštećenja kao što su pirimidinski dimeri, mostovi, *bulky* adukti itd. Postoje dvije vrste ovog mehanizma: TCR (*Transcription Coupled Repair*) i GGR (*Global Genomic Repair*) (Slika 2). TCR se aktivira kada je oštećenje unutar aktivne transkripcijske regije. GGR se aktivira kada je oštećenje izvan te regije genoma. Ova dva puta se razlikuju po prvom koraku prepoznavanja DNA oštećenja. Pretpostavlja se da je u TCR putu signal aktivacije popravka zaustavljanje mašinerije transkripcije. Iz tih razloga kod ove vrste popravka ključni trenutak je da oštećenje onemogući daljnju transkripciju. U GGR putu učinkovitost prepoznavanja oštećenja je promjena strukture uzvojnice. Iz tih razloga oštećenja koja jako mijenjaju strukturu (izvijanja molekule,

odmotavanje ili ispupčenja i udubljenja) uzvojnice DNA se lakše poprave nego oštećenja koja ne stvaraju takve promjene (Atanassov i sur., 2004). NER popravak je u potpunosti rekonstruiran *in vitro* u bakterijskim i eukariotskim stanicama, i pojedini proteinski faktori i enzimi izolirani su i okarakterizirani. U bakterijama prepoznavanje i popravak oštećenja odrađuje kompleks tri proteina UvrA, UvrB i UvrC nazvan UvrABC kompleks. U eukariotskim stanicama je mehanizam kompleksniji. U ljudskim stanicama oštećenje prepoznaje XPC-HR23B kompleks, na kojem se veže transkripcijski faktor TFIIH koji ima helikaznu aktivnost i odmotava uzvojnicu DNA kod oštećenja. Jednolančana DNA se stabilizira pomoću RPA, proteina koji se veže na jednolančanu DNA, a XPA provjerava prisutnost oštećenja. XPG i XPF, koji posjeduju endonukleaznu aktivnost, stvaraju lomove na obje strane oštećenja i izrežu ga. Praznina se nadopuni pomoću pol δ. I na kraju ligacija je ostvarena pomoću enzima XRCC9/DNA ligase IIIα. (Feuerhahn i Egly, 2008, Fousteri i Mullenders, 2008, Shuck i sur., 2008).




Slika 2. NER (eng. *Nucleotide excision repair*) mehanizam popravka DNA

Krivo sparene baze mogu popraviti prokariotske i eukariotske stanice i većinom su posljedica replikacije. U tim slučajevima točna baza se nalazi u roditeljskom lancu dok se kriva nalazi u lancu kćeri. Krivo sparene baze se popravljaju mehanizmom koji se naziva popravak krivo sparenih baza, a ovaj mehanizam ima mnogo koraka koje dijeli s BER i NER popravcima. Kriva baza se ukloni izrezivanjem kao dio kratkog slijeda nukleotida (*short patch repair*) ili kao dio odsječka DNA koji može biti dug i do nekoliko kb (*long patch repair*). Nastala praznina se popuni sintezom DNA. U ovoj vrsti popravka ključni problem je kako prepoznati koja baza je točna a koja je kriva jer niti jedna od tih dviju baza nije oštećena. Mehanizam koji to omogućava je nazvan metil-reguliran popravak krivo sparenih baza. Prilikom DNA sinteze DNA nije metilirana. Specifičan uzorak metilacije DNA nastaje tek nekoliko sati nakon replikacije. Iz tih razloga u većini slučajeva roditeljski DNA lanac je metiliran dok je lanac kćer nemetiliran. „Mut“ proteini prepoznaju lance koji su metilirani kao roditeljske lance i izrezuju bazu koja se nalazi na suprotnom lancu. U bakteriji *Escherichia coli* (*E.coli*) tri Mut proteina, MutS, MutL i MutH odgovorni su za metil-reguliran popravak krivo sparenih baza. Kod ljudi otkriveni su homolozi MutS i MutL enzima, dok MutH nije pronađen (Li, 2008).

Dva rekombinacijska popravka su odgovorna za popravak dvolančanih lomova – nehomologni i homologni. Nehomologni rekombinacijski popravak (non-homologous end joining – NHEJ) je široko rasprostranjen popravak za spajanje dvolančanih lomova izravno spajajući dva DNA kraja. Poznato je da i neke bakterije imaju ovu vrstu popravka, ali specifičan je za eukariote uključujući i ljude gdje ima važnu ulogu u sazrijevanju B limfocita i T limfocita tj. u V(D)J rekombinaciji pri stvaranju imunološkog odgovora (Lieber i sur., 2004, Soulas-Sprauel i sur., 2007). NHEJ koristi kratke homologne privjeske na krajevima dvolančanih lomova. Kada takvi privjesci nisu prisutni onda se DNA prerađuje da bi nastali takvi krajevi. Takvi koraci mogu dovesti do promjene informacije u slijedu DNA stvarajući tako mutacije. Glavni proteini ovog mehanizma u višim eukariotima su XRCC4/LIG4 kompleks i DNA-ovisna protein

kinaza (DNA-PK) koja je sastavljena od DNA heterodimera koji se vežu na krajeve Ku70-Ku80 i katalitičke podjedinice DNA-PKcs. (West, 2003).

NHEJ u eukariota se koristi u stanicama koje se nalaze u mirujućoj fazi (G0) i kroz cijeli stanični ciklus, dok se homologni rekombinacijski popravak koristi pri popravku dvolančanih lomova stanica koje se nalaze u S i G2 fazi kada su prisutne obje sestrinske kromatide (Rothkamm i sur., 2003, Sonoda i sur., 2006). Istim tim popravkom se mogu popravljati i međulančani mostovi ICL (Dronkert i Kanaar, 2001, Niedernhofer i sur., 2005). Homologna rekombinacija je složen proces koji je sačuvan tijekom evolucije od bakterija sve do ljudi. Ovaj mehanizam zasniva se na izmjeni homolognih regija oštećene DNA i neoštećene DNA kao donora. Prvo se krajevi DNA dvolančanih lomova obrađuju specifičnom 5'- egzonukleazom da bi nastali goli 3' repovi. Nakon toga jednolančani 3' repovi napadaju dvolančane lance donorske DNA i stvaraju strukturu u obliku križa nazvanu Hollidayeva veza. Hollidayeva veza može putovati uzduž molekule DNA sve do homologne regije. U Hollidayevoj vezi svaki oštećeni lanac je sparen s neoštećenom homolognom regijom koja služi kao kalup za novu sintezu. Rješavanje Hollidayeve veze odvija se kidanjem obje međulančane veze pomoću egzonukleaze nazvane rezolvaza, stvarajući tako dvije nove molekule DNA a svaka sadrži jedan popravljeni DNA lanac i jedan komplementarni lanac nativne DNA.

U *E.coli* homologna rekombinacija popravlja dvolančane lomove pomoću RecA i RecBCD enzima. Ovi enzimi vežu se za krajeve dvolančanih lomova i s njihovom egzonukleaznom aktivnošću razgrađuju jedan od lanaca i stvaraju 3' rep. RecA se veže na jednolančani rep da bi se olakšao napad i stvaranje Hollidayeve veze. RuvB katalizira migraciju strukture duž molekule DNA u potrazi za homolognom regijom dok je razrješenje veze omogućeno RuvC proteinom. U homolognoj rekombinaciji kod eukariota uključeni su različiti setovi enzima, ali je opći mehanizam jednak onom u bakterija. MRN kompleks (Mre11, Rad50 i Nbs1) je prvi koji sjeda na oštećenje. Nekoliko koraka treba biti napravljeno da bi ovaj kompleks stvorio privjesak na 3' kraju koji je potreban za homolognu rekombinaciju. Eukariotska DNA prekrivena je

histonima i stvara nukleosome, prerađivanje kromatina odvija se u blizini lomova da bi se omogućio prilaz enzima koji sudjeluju u homolognoj rekombinaciji (Downs i sur., 2007). To je povezano s masivnom fosforilacijom histonske inačice H2AX nekoliko kb na obje strane lomova i predstavlja signal za dvolančane lomove (Rogakou i sur., 1998). RPA se nakon toga veže na jednolančane DNA repove i olakšava napad na homologni lanac stvarajući Hollidayevu vezu, koja se u sisavaca odvija pomoći rekombinaze Rad51 i s paralozima XRCC2, XRCC3, Rad51B, Rad51C i Rad51D (West, 2003). Novonastale praznine na jednolančanoj DNA popunjavaju se DNA sintezom i Hollidayeva se struktura rješava pomoću kompleksa Rad51C/XRCC3 (Liu i sur., 2008).

Kako bi se popravila DNA, pogotovo kod viših organizama, svi mehanizmi djeluju kao mreža popravaka, u nekim slučajevima se nadopunjuju dok nekada jedni preuzimaju popravak od drugih. Međulančani mostovi popravljaju se udruženim popravkom izrezivanjem nukleotida i homolognom rekombinacijom dok je za popravljanje dvolančanih lomova potrebno izmjenično djelovanje homologne i nehomologne rekombinacije ovisno u kojoj fazi staničnog ciklusa se stanice nalaze. Popravak izrezivanjem baze, popravak izrezivanjem nukleotida i popravak krivo sparenih baza često rade zajedno i u mnogim drugim slučajevima (Plosky i sur., 2002, Rothkamm i sur., 2003, Sonoda i sur., 2006).

## 1.2 Metode određivanja genotoksičnog učinka

### 1.2.1 Određivanje cjelovitosti DNA u morskim organizmima

Održavanje cjelovitosti DNA važno je za funkcioniranje, razvoj i preživljavanje vrsta što potvrđuje i mali broj stalnih mutacija u živim organizmima, jedna mutacija po genu u 200 000 godina (Alberts i sur., 2002). Ova ekstremna strukturalna stabilnost mora biti ostvarena dinamički, tj. postojanjem ravnotežnog stanja između oštećivanja DNA i popravljanja tih oštećenja. Genotoksične tvari koje dospiju u morski okoliš djeluju najprije na cjelovitost DNA morskih organizama. Iz tih razloga cjelovitost DNA ukazuje na stupanj zagađenja genotoksinima morskog okoliša (Shugart, 2000, Debenest i sur., 2013). Za samu procjenu izloženosti morskih organizama raznim onečišćenjima u moru potrebno je odabrati metodu koja će radi velikog broja uzoraka i trajnog sezonskog ispitivanja biti prihvatljiva s tehničkog i ekonomskog stajališta. Određivanje i praćenje oštećenja DNA može se neizravno pratiti mjerenjem količine DNA visoke cjelovitosti koja ukazuje na manji broj prisutnih primarnih oštećenja DNA. Ovakav pristup nije nepoznat u sustavnom praćenju stanja morskog ekosustava budući da je u istraživanjima na dagnji *Mytilus galloprovincialis* (Bihari i sur., 2005) i na školjkašu *Mya arenaria* (Debenest i sur., 2013) utvrđena visoka korelacija između oštećenja i cjelovitosti ukupne DNA.

#### 1.2.1.1 Određivanje cjelovitosti DNA alkalnom eluacijom

Alkalno eluiranje je česta metoda koja se koristi u biomonitoringu morskih organizama (Bihari i sur., 1992, Batel i sur., 1993, Bolognesi i sur., 1996, Bihari i sur., 2002). U ovoj metodi sporim propuštanjem alkalne otopine, pH ≥ 12,0 dolazi do odvajanja lanaca molekule DNA i njihovog eluiranja s filtra zavisno o duljini jednolančanih fragmenata. Mjerenjem količine DNA u eluatu i na filtru, izračunava se kao udio DNA koji se nalazi na filtru tijekom eluiranja. Brzina izlaženja DNA kroz filtar, izražava se kao postotak DNA koji nakon određenog vremena, odnosno volumena eluiranja preostaje na filteru. Brzina eluiranja varira od vrste do vrste, međutim DNA nižih vrsta eluira brže od DNA organizama na višoj taksonomskoj razini, bez obzira na oštećenje (Zahn, 1989). Ovom

metodom utvrđuje se nekoliko vrsta oštećenja DNA: jednolančani lomovi, alkalno – labilna mjesta, unakrsno vezanje lanaca DNA i unakrsno vezanje DNA i proteina. Metoda je veoma osjetljiva (utvrđuje jedno oštećenje DNA na $10^7$ nukleotida) međutim nedostatak ove metode predstavljaju trajanje analize i ograničeni broj uzoraka.

#### 1.2.1.2 Određivanje cjelovitosti DNA *FAST* mikrometodom

FAST mikrometoda korištena je za određivanje oštećenja DNA mjerenjem lomova DNA lanca u alkalnim uvjetima (Batel i sur., 1999). Metoda se zasniva na sposobnosti fluorokromatskog bojila da se u prisutnosti oštećenja DNA u alkalnim uvjetima veže za dvolančanu DNA. Takav pristup omogućava izravno praćenje denaturacije dvolančane DNA bez prethodne izolacije i pročišćavanja uzoraka. Prednost ove metode je brz i jednostavan način određivanja cjelovitosti DNA u maloj količini uzorka i mogućnost razlučivanja okoliša pod različitim antropogenim pritiskom (Bihari i sur., 2005). Nedostatak ove metode je što uvjeti denaturacije DNA molekule ovise o vrsti testiranog organizma (Jakšić i Batel, 2003)

#### 1.2.1.3 Određivanje cjelovitosti DNA protočnom citometrijom

Protočna citometrija je metoda kojom se analizira stanični ciklus i sadržaj DNA te ujedno omogućava i obradu velikog broja stanica u kratkom vremenu. Prednost ove metode je dobivanje podataka o pojedinačnim stanicama u populaciji (veličina stanice, sadržaj pigmenta, citoplazmatska granularnost, ukupni sadržaj proteina, DNA, RNA i kromosoma, unos kalcija, unutarstanični pH, sadržaj antigena na površini i unutar stanice). Načelo rada protočne citometrije temelji se na raspršivanju svjetlosti i fluorescenciji obojane (ili neobojane) stanice prolaskom kroz detektor koji pretvara taj signal u elektronski signal koji odgovara specifičnom parametru za određenu stanicu. Dobiveni podaci prikazuju se na računalu u grafičkom obliku. Sadržaj DNA može se pratiti pomoću interkalirajućih boja (propidijum jodid, etidijum bromid, akridin oranž) ili uz pomoć boja koje se vežu površinski na DNA (Hoechst 33342, DAPI, mitramicin)(Telford i sur., 1992). Zbog svoje visoke preciznosti protočna citometrija je metoda koja se danas sve češće koristi za određivanje sadržaja (Fafanđel i sur., 2008) i

genomskih obilježaja stanica u morskim beskralježnjacima. DNA se u $G_0/G_1$ fazi (faza mirovanja) pojavljuje kao šiljak koji predstavlja diploidni sadržaj DNA. Širina šiljka označava se kao koeficijent varijacije (CV) (Bihari i sur., 1999).

### 1.2.2 Određivanje popravka DNA

U sustavnom praćenju stanja morskog ekosustava najčešće se koristi Komet test (uz Mikronukleus test), s kojim je moguće pratiti smanjenje količine oštećenja DNA, odnosno dužine „repa“, u jednoj stanici nakon određenog vremena (Bolognesi i Cirillo, 2014). Za laboratorijska ispitivanja genotoksičnosti sve češće se koristi određivanje razine ekspresija gena uključenih u popravak DNA (Varotto i sur., 2013).

#### 1.2.2.1 Komet test

Primjena ove metode je većinom u ispitivanju genotoksičnosti, biomonitoringu, u istraživanjima oštećenja DNA ali Komet test, osim što ima važnu ulogu u mjerenju količine oštećenja DNA, često se koristi i za mjerenje učinkovitosti popravka DNA (Collins, 2004, Speit i Hartmann, 2006).

Komet test (eng. *Comet assay*) ili *Single Cell Gel Electrophoresis* (SCGE) je osjetljiva i brza tehnika za kvantifikaciju i analizu oštećenja DNA u pojedinačnim stanicama (Ostling i Johanson, 1984, Singh i sur., 1988). Karakteristična slika dobivenih rezultata podsjeća na komet gdje su jasno vidljivi glava i rep. Glava je sačinjena od ukupne DNA dok se u repu nalazi oštećena DNA (prisutni jednolančani ili dvolančani lomovi) ili fragmenti DNA. Ovaj test većinom se koristi na životinjskim eukariotskim stanicama iako postoje primjeri primjene ove metode na biljnim stanicama (Ventura i sur., 2013). Oštećenja DNA koja se detektiraju ovom metodom uzrokovana su jednostukim i dvostrukim lomovima lanaca, alkilirajućim modificiranim bazama, oštećenja

uzrokovana oksidativnim stresom te unakrsnim vezivanjem (*cross-linking*) s molekulom DNA ili proteinima (Tice i sur., 2000, Kumaravel i sur., 2009).

Izlaganje školjkaša poznatim genotoksikantima u laboratorijskim uvjetima često pokazuje pravilan učinak ovisan o dozi (Štambuk i sur., 2008, Banni i sur., 2010) što ukazuje na osjetljivost i primjenjivost metode. Ova metoda, osim što se koristi u laboratorijskim pokusima genotoksičnosti, može se uspješno koristiti i u sustavnom praćenju morskog ekosustava, gdje se organizmi izlažu prisutnom zagađenju u moru kao što su npr. policiklički aromatski ugljikovodici (PAH) (Michel i sur., 2013). Mnoga istraživanja ukazuju na visoku sezonsku varijabilnost oštećenja DNA mjerenog komet-testom kod prirodnih populacija (Frenzilli i sur., 2001, Klobučar i sur., 2008, Pisanelli i sur., 2009). Vrste roda *Mytilus* uspješno su korištene u biomonitoringu genotoksičnog učinka okolišnog onečišćenja komet-testom u mnogim istraživanjima (Frenzilli i sur., 2001, Nigro i sur., 2006).

Komet testa se kod vodenih organizama (morskih i slatkovodnih) počeo intenzivno koristiti prije desetak godina u istraživanju stanja okoliša (Lee i Steinert, 2003). Tkiva koja se najčešće koriste za analizu Komet testom su škrge, probavna žlijezda i hemolimfa. Kao idealno tkivo za analizu genotoksičnog učinka koristi se tkivo škrga jer su one prva barijera zaštite organizma od potencijalno genotoksičnih tvari. Takvo kruto tkivo stvara dodatne poteškoće za analizu Komet testom jer je potrebno prvo razdvojiti stanice što unosi dodatna oštećenja DNA. Rezultati dobiveni ovom metodom za detekciju i kvantifikaciju oštećenja DNA pokazali su je kao korisnu i kvalitetnu metodu u genotoksičnim istraživanjima. Nerijetko se ova metoda koristi i za određivanje učinka popravka DNA kod morskih beskralješnjaka (Frenzilli i sur., 2009). Iako se ova metoda koristi duži niz godina u istraživanju mora i to najčešće na dagnjama roda *Mytilus* sp., postoje razlike u proceduri između različitih laboratorija što otežava primjenu ove metode u standardnim sustavima praćenja kvalitete morskog okoliša (Lee i Steinert, 2003).

#### 1.2.2.2 3D metoda

3D metoda (*damaged DNA detection*) opisana u Salles i sur. (1995) omogućava detekciju oštećenja DNA prateći aktivnost popravka pojedinih proteinskih kompleksa iz pročišćenih staničnih ekstrakata ljudskog porijekla koji sudjeluju u mehanizmima popravka DNA (smjesa enzima popravka). Tijekom sinteze popravka DNA biotin – obilježeni nukleotid (dUTP – biotin) se ugrađuje u molekulu DNA. Takav obilježeni nukleotid biva prepoznat od enzimatskog markera koji je vezan za peroksidazu te emitira kemiluminescentni signal (RLU) koji se detektira pomoću luminometra. Intenzitet signala proporcionalan je broju popravljenih oštećenja. Kapacitet kemijskog spoja da oštećuje molekulu DNA mjeri se omjerom između signala tretirane DNA s kontrolnom netretiranom DNA. Signal dobiven od otapala (voda i DMSO) je osnovna vrijednost popravka (omjer = 1). Sve vrijednosti između 1 i 2 ukazuju na povećanje broja DNA oštećenja dok se vrijednosti iznad 2 smatraju značajnim i gdje ispitana molekula DNA pokazuje izravni genotoksični učinak. Razvoj *in vitro* testova popravka DNA s proteinskim ekstraktima ljudskog porijekla dovela je do novih spoznaja o mehanizmu popravka izrezivanja oštećene DNA (NER) koji izrezuje oštećeni nukelotid, ugrađuje neoštećeni nukleotid i spaja lance DNA. Ova metoda je prilagođena tako da se reakcija popravka odvija u mikropločama gdje je oštećeni supstrat vezan za podlogu dok se reakcija popravka izvodi u tekućoj fazi. U proteinskim ekstraktima koji se koriste u ovoj metodi nalaze se svi enzimi popravka BER i NER mehanizma što upućuje da se ovom metodom mogu detektirati svi oblici oštećenja molekule DNA (Salles i sur., 1995, Barret i sur., 1997). Postoje razne inačice ove *in vitro* metode s kojima je moguće ispitati antioksidativne tvari i inhibitore NER popravka, imunodetektirati enzime koji sudjeluju u mehanizmu popravka te detektirati alkilirane baze i mjeriti kinetiku popravka DNA (Salles i sur., 1999). 3D metoda korištena je i kod školjkaša *Pecten maximus* L. gdje su stanice probavne žlijezde korištene kao supstrat u ispitivanju različitih koncentracija nekoliko modelnih citoksičnih kemikalija (Le Pennec i Le Pennec, 2001). Nedostatak ove metode je što omogućava praćenje samo onih mehanizama popravka DNA koji uključuju ugradnju nukleotida.

## 1.3 Popravak DNA u morskim organizmima

Mehanizam popravka DNA u morskim organizmima je slabo istražen. Većina istraživanja genotoksičnih učinaka usredotočena je na oštećenje DNA (Mičić i sur., 2002, Lee i Steinert, 2003, Jung i sur., 2009, Yao i Somero, 2012, Svanfeldt i sur., 2014) dok je učinak na sposobnost popravka istražen samo u nekim morskim organizmima (Zahn i sur., 1983, Espina i Weis, 1995, Fafanđel i sur., 2001, Pruski i Dixon, 2002, Emmanouil i sur., 2007, Yao i Somero, 2013). Dosadašnja istraživanja ukazuju da je popravak DNA kod morskih organizmima sporiji nego kod sisavaca (Kienzler i sur., 2013a). Genotoksična zagađivala ne utječu samo na molekulu DNA i oštećuju je, nego u nekim slučajevima oštećuju i enzime popravka DNA. Tako, laboratorijski pokusi izlaganja dagnje *Mytilus edulis* različitim dozama kadmija i kroma u različitim vremenskim intervalima ukazuju na ovisnosti količine oštećenja o dozi. Metali ne uzrokuju samo oštećenja DNA nego, kao u slučaju kadmija, inhibiraju popravak DNA (Pruski i Dixon, 2002, Emmanouil i sur., 2007). Pokusi trovanja dagnje *Mytilus galloprovincialis* različitim dozama modelnih genotoksina NQO i BaP pokazali su da doze utječu na popravak oštećene DNA (Bihari i sur., 1990b). Metodom alkalnog eluiranja izmjerena su oštećenja DNA u hemocitima dagnje nakon trovanja s koncentracijama od 5 i 10 µg/g NQO-a te je ustanovljeno da je nakon 1.5 sati količina oštećenja narasla i bila je još viša nakon 24 sata, međutim nakon 5 dana količina oštećenja DNA pala je na početnu vrijednost. U slučaju trovanja dagnje s 20 µg/g NQO oštećenja DNA su također rasla nakon 1.5 sati međutim bila su niža nakon 24 sata što ukazuje da su oštećenja DNA popravljena, iako su nakon 5 dana sve dagnje uginule. Trovanjem jednakim dozama BaP – a nije došlo do smanjenja količine oštećenja DNA. Učinkovitost popravka može se razlikovati ovisno o oštećenju uzrokovanom genotoskičnim zagađivalima. Kod slatkovodnog školjkaša *Limnoperna fortunei* ustanovljen je 100% popravak DNA nakon laboratorijskih pokusa izlaganja pentaklorfenolu, dok nakon izlaganja drugim genotoksičnim zagađivalima (UV zračenje, bakar sulfat) popravak DNA nije bio tako učinkovit (Villela i sur., 2006). Prirodne populacije dagnje *Mytilus edulis* na lokacijama gdje je povišeno ionizirarajuće

zagađenje pokazale su, uz povećanu količinu oštećenja DNA, povišenu ekspresiju mRNA RAD51 gena koji sudjeljuje u popravku dvolančanih lomova DNA (AlAmri i sur., 2012).

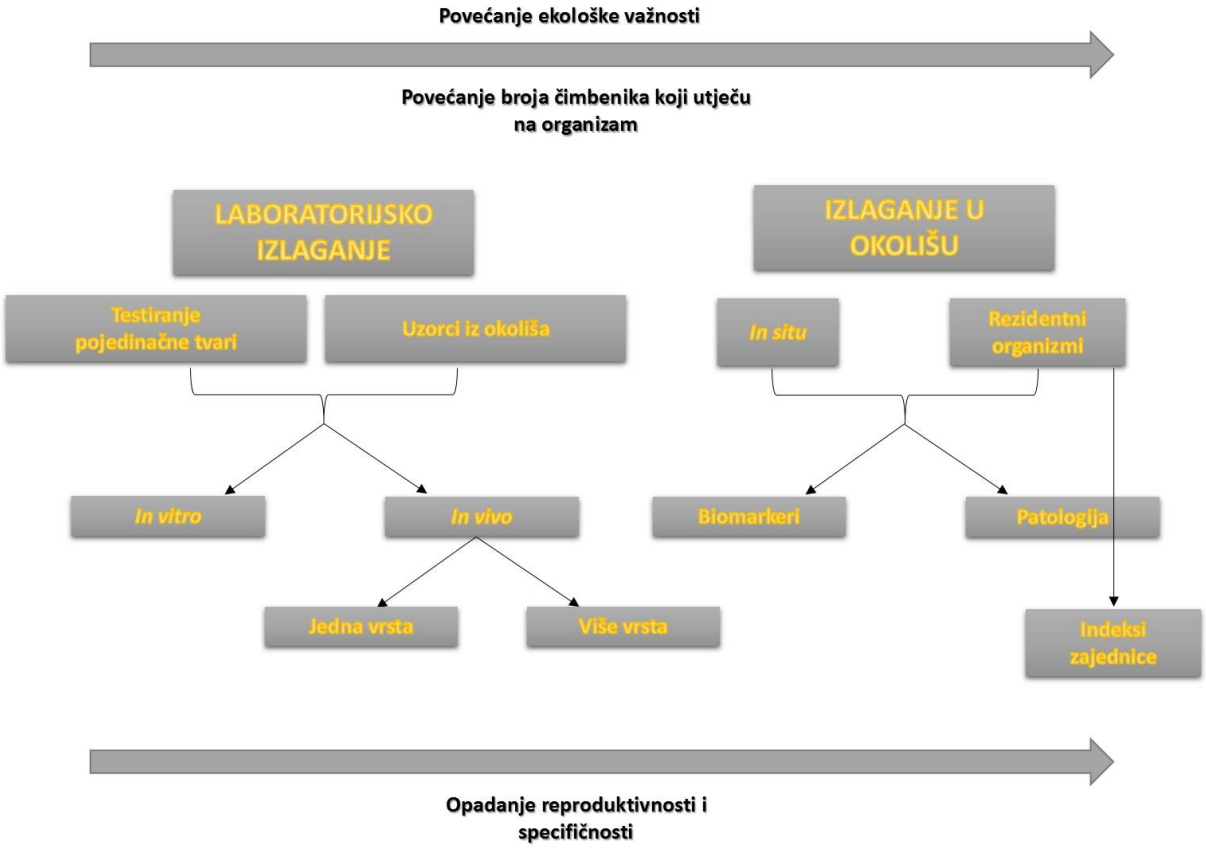
Istraživanje popravka DNA u morskim beskralježnjacima uz određivanje količine oštećenja DNA može doprinijeti ekotoksikološkim istraživanjima. Popravak DNA specifičan je za određene vrste, za različite razvojne stadije, za različita tkiva i za *in vitro* modele. Takva specifičnost može doprinijeti optimiziranju istraživačkih protokola i pomoći u razvoju genotoksičnih testova. Doprinos takvih testova mogao bi biti ključan i u istraživanjima sustavnog praćenja okoliša izborom najosjetljivijih i najznačajnijih vrsta i/ili tkiva na genotoksičnost. Istraživanje mehanizma popravka DNA može doprinijeti i u razvoju novih biomarkera genotoksičnosti. Isto tako mogao bi služiti kao nadopuna dobro uhodanim metodama praćenja oštećenja DNA (mjerenje primarnih oštećenja putem Komet testa i kromosomskih lezija putem mikronukleus testa).

## 1.4 Genotoksični učinak zagađivala kao pokazatelj stanja morskog okoliša

Morskom okolišu sve je veća prijetnja kontinuirani rast količine, brojnosti i raznolikosti kemikalija i njihovih kombinacija koja završavaju u njemu. Zagađenje je najintenzivnije u priobalnom području gdje je i najveći antropogeni pritisak (Daskalakis i O'Connor, 1995, White i Rasmussen, 1998, Howarth i sur., 2002) iako je poznato da se pojedina zagađivala mogu naći i u otvorenim vodama oceana (Davis, 1993, Bothner i sur., 1994). U relativno zatvorenim područjima kao što su priobalna područja, gdje je izmjena vodenih masa ograničena, morski organizmi su izloženi ne samo vanjskim stresovima nego i prirodnim stresorima kao što su temperatura, salinitet te kolebanje organskih i anorganskih tvari u moru. Efekt kemikalija na morske organizme ovisi o koncentraciji, toksičnosti, topljivosti, bioraspoloživosti te duljini izlaganja kao i o samoj osjetljivosti izloženog organizma. Za pojedine kemikalije procjena rizika za okoliš provodi se kombiniranjem procjene opasnosti i izloženosti (European-Commission, 2002).

Treba uzeti u obzir da nije moguće analizirati, otkriti i izmjeriti sve prisutne tvari u morskom okolišu, uključujući nove zagađivače i transformirane produkte, te je iz navedenih razloga postalo neophodno integrirati analize biološkog učinka zagađivala u sustavna praćenja morskog ekosustava. Takve analize mogu biti korisne u razvoju racionalnog, isplativog i učinkovitog sustavnog praćenja morskog ekosustava, povećati važnost ekosustavnog pristupa te povezati ekološke i kemijske informacije. Većina današnjih programa sustavnog praćenja morskog ekosustava oslanja se primarno na analizu raznih zagađivala u vodenom stupcu, sedimentu i u bioti. Danas sve veću važnost imaju biotestovi koji mogu dati informaciju o izlaganju zagađivalu ili učinku zagađivala na različitim razinama biološke organizacije, od molekule i stanice, tkiva i organa, jedinke, populacije i zajednice. Biotestovi se mogu provoditi pod standardiziranim uvjetima u laboratoriju pomoću *in vitro* sustava (stanica), *in vivo* sustava (organizam) i *micro, mesocosmos* sustava (jednostavne zajednice) ili kad je ekosustavna komponenta važna, *in situ* sustava (na terenu) gdje se procjenjuje izloženost

rezidentnih organizama koristeći biomarkere (molekularni, biokemijski, stanični i/ili fiziološke promjene) i histopatološke procjene te indeksi zajednice (Slika 3).




Slika 3. Različiti biološki pristupi za mjerenje toksičnosti kemikalija i njihovog učinka u morskom ekosustavu.

Toksičnost tvari koja se mjeri u laboratorijskim analizama ne uzima u obzir fizičko – kemijske te biološke stresore s kojima se organizmi susreću u njihovom prirodnom okruženju. Isto tako, takvi testovi ne uzimaju u obzir povremene pojave koje su itekako česte u morskom ekosustavu. Mjerenje izloženosti zagađivalu ili učinka zagađivala na prirodne populacije, bilo rezidentnih ili transplantiranih organizama, ima veći ekološki značaj od laboratorijskih testova jer su usmjereni na praćenje zdravlja divljih populacija.

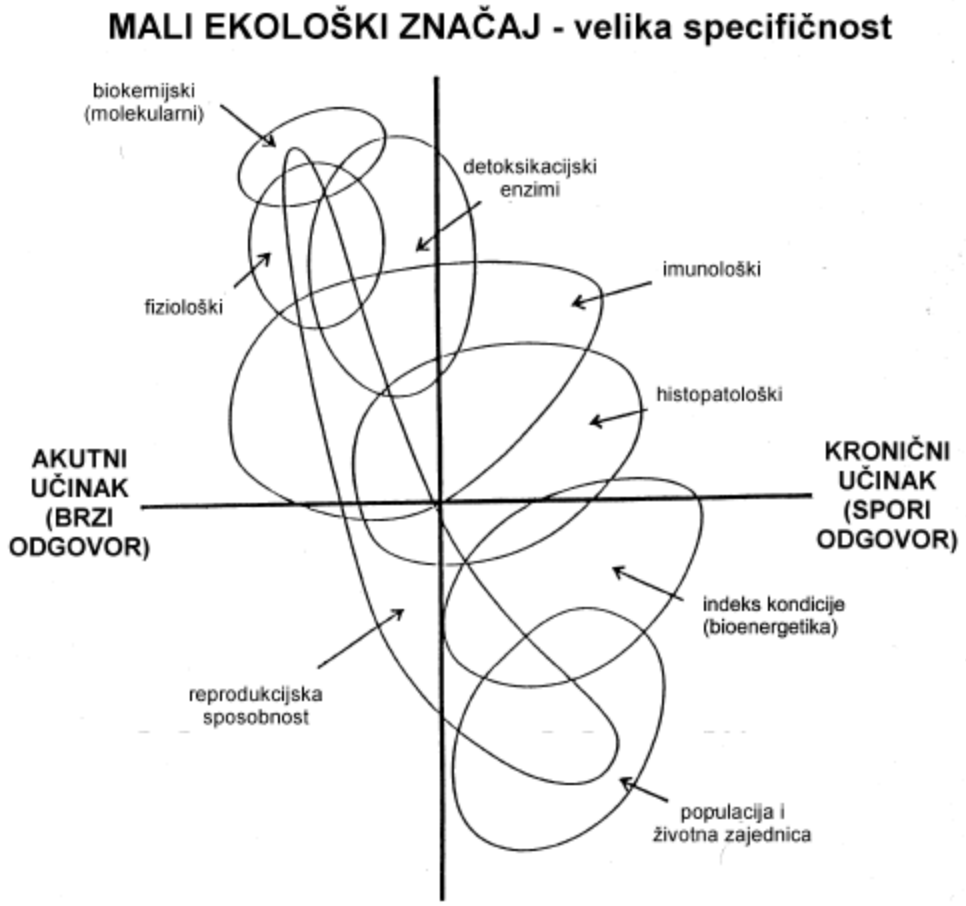
Postoji velik broj mogućih onečišćivača čiji efekt nije letalan ali utječu na ekološki fitnes pojedinih organizama ili, u najgorem slučaju, na cijelu populaciju. Specifični *in vitro* testovi učinka zagađivala omogućavaju brzu i osjetljivu detekciju kemijske aktivnosti u biološkim sustavima. Takvi testovi većinom su prilagođeni za rutinski posao u laboratoriju i za testiranje biološkog učinka zagađivala na staničnoj razini. Najčešće se koriste za provjeru uzoraka iz okoliša i identifikaciji „vrućih točaka“ (eng. *hot spots*), njihova prednost je što omogućuju testiranje kombiniranih učinaka mješavina kemikalija pri standardiziranim uvjetima. Ipak takve metode imaju nedostatak točne projekcije učinka zagađivala na više razine biološke organizacije.

Drugi često korišteni biotestovi su oni koji koriste *in vivo* sustave, gdje se cijeli organizam izlaže zagađivalu. Dvije su metode izlaganja, prvi je izravno ubrizgavanje ispitane tvari u organizam dok je drugi način izlaganje cijelog organizma uzorcima iz okoliša (voda ili sediment) ili njihovim ekstraktima. Standardizirani biotestovi koriste modelne organizme i mjere biološki učinak uzrokovan izlaganjem zagađivalu. Iako rezultate takvih testova nije moguće usporediti s testovima na drugim organizmima, njihova je prednost što je moguće kvantificirati učinke prouzrokovane ispitanim tvarima koje nisu pod utjecajem okolišnih stresora. Takvi testovi se rutinski koriste u istraživanjima procjene stanja okoliša. Baterije biotestova često se koriste u sustavnom praćenju okoliša i osnovni koncept takvih baterija je korištenje jednostavnog hranidbenog lanca gdje se ispituje učinak na najmanje tri vrste karakteristične za pojedinu trofičku razinu, česti primjer je skupina organizama koja sadrži primarnog proizvođača, filtrirajući organizam i potrošača.

*In situ* testovi su posrednici između testova u kontroliranim laboratorijskim uvjetima i realnih okolišnih uvjeta (Crane i Babut, 2007) te je njihova prednost što uzimaju u obzir utjecaj fizičko-kemijskih i bioloških stresora u okolišu. Ovakvi testovi integriraju kombinirani složeni učinak u okolišu i varijabilni učinak izlaganja toksičnim tvarima omogućavajući procjenu toksičnosti u okolišu. Takve metode su u većini slučajeva ne standardizirane.

Biomarkeri su važni za mjerenje subletalnog učinka kemikalija u prirodnim populacijama morskih organizama. Biomarkeri se mjere izravno u stanicama ili tkivu izloženih organizama, i tradicionalno se definiraju kao molekularne, biokemijske, fiziološke i stanične promjene uzrokovane vanjskim stresom (Huggett i sur., 1992). Biomarkeri izloženosti koriste se kod procjene količine kemijske tvari u organizmu. Pružaju informaciju o izloženosti kemikalijama te mogu pružati i informacije o različitim načinima izloženosti i njima pridruženom riziku. Biomarkeri izloženosti reflektiraju unutarnje koncentracije kemikalije/a ili metabolita, i mogu se primijeniti kao alati za pretraživanje specifičnih kemijskih skupina, na primjer, metalotioneina ili citokroma P 450 (CYP1A) kao pokazatelji povišenih koncentracija teških metala odnosno bioraspoloživih PAH – ova ili PCB –a (Stegeman i Lech, 1991, Roesijadi i Robinson, 1994). Biomarkeri učinka pokazuju štetan učinak ili funkcionalne promjene na razini organizma. Takvi signali mogu biti rano upozorenje o padu zdravlja organizma ili poremećaja okoliša. Jedan od takvih biomarkera je mjerenje vitelogenina, čija se količina povezuje s endokrinim i reproduktivnim poremećajem organizma. Njegova proizvodnja u organizmu je povećana kao odgovor na kemikalije sa specifičnim djelovanjem (estrogen) te je povezana s učincima na višim razinama biološke organizacije (Pampanin i sur., 2005, Kidd i sur., 2007).

Sama upotreba bioindikatora uključuje praćenje prirodnog stresnog odgovora radi procjene učinka zagađivala u okolišu i predviđanja ranih upozoravajućih pokazatelja te omogućavanja uvida u uzročni odnos između stresa i učinka u zajednici i cijelom ekosustavu na različite razine biološke organizacije (Slika 4). Vrlo je važno otkriti učinke vezane uz kemijske tvari prije nego što se pojave značajni učinci na razini populacije. Međutim, vrlo malo biomarkera trenutno pruža uvjerljiv dokaz o utjecaju određene vrste stresora u okolišu (Forbes i sur., 2006), pogotovo jer su odgovori vrlo često različiti ovisno o populaciji istraženih organizama ili o fizičkim stresorima okoliša (Van der Oost i sur., 2003). Za pronalazak zagađenja i definiranje "vrućih točaka" ili praćenje zdravlja organizma važna je upotreba baterije osjetljivih biomarkera koji pokrivaju široki spektar učinaka (Van der Oost i sur., 2003, Dagnino i sur., 2007).




Slika 4. Razine biološkog odgovora (biomarkera) u ovisnosti o vremenu nastanka učinka i ekološkoj značajnosti specifičnosti (Adams i sur., 1989)

Veliki udio u zagađenju morskog ekosustava imaju genotoksične i kancerogene tvari (Claxton i sur., 1998). Analitičke metode koje se koriste za praćenje genotoksičnosti u moru ne daju informacije o djelovanju genotoksičnih čimbenika na morske organizme. Iz tih razloga razvijene su brze i jednostavne metode kao što je Amesov test, SOS – Cromo test i SOS – umu test.

Testovi genotoksičnosti temeljeni su na interakciji mutagenih spojeva i molekule DNA koje mogu odrediti potencijalnu mutagenost nekog spoja ali ne i stupanj oštećenja DNA

uzrokovana tim istim spojevima. Za praćenje genotoksičnih promjena, odnosno primarnih oštećenja DNA, u morskim organizmima razvijene su metode kao što je denaturiranje DNA u alkalnim uvjetima (eng. *Alkaline unwinding*) (Accomando i sur., 1991, Viarengo i sur., 1991, Nacci i sur., 1992), alkalna eluacija (Bihari i sur., 1992, Bolognesi i sur., 1992, Vukmirović i sur., 1994), mikronukleus test (Bolognesi i Hayashi, 2011), komet test (Frenzilli i sur., 2009) i Fast mikrometoda (Batel i sur., 1999, Jakšić i Batel, 2003).

Unos zagađivala u morske organizme povećava se njihovom pristupačnosti u sedimentu i vodenom stupcu tj. lipofilnosti/hidrofobnosti i koncentracije. Akumulacija zagađivala u morskim organizmima razlikuje se od vrste do vrste i ovisi o ravnoteži brzine unosa i brzine metabolizma te samom uklanjanju zagađivala iz organizma (Nelson i Donkin, 1985, Widdows i Donkin, 1992). Poznato je da se zagađivala kao što su policiklički aromatski ugljikovodici (PAH) akumuliraju u najvećoj koncentraciji na dnu prehrambenog lanca u moru tj. u beskralješnjacima. Kod njih je brzina unosa veća od brzine metabolizma i njihovog uklanjanja iz organizma te se kao posljedica akumuliraju u organizmu. Akumulacija PAH – ova kod kralješnjaka nije tolika jer je brzina unosa jednaka brzini metabolizma i njihovog uklanjanja iz organizma. Pesticidi (DDT) i poliklorirani bifenili (PCB) se akumuliraju uzduž prehrambenog lanca te dostižu najveću koncentraciju u tkivima kralježnjaka (riba, ptica i morskih sisavaca) jer se relativno teško metaboliziraju (Livingstone, 1993).

Unosom toksičnih i/ili genotoksičnih tvari u morski ekosustav izaziva se povećana osjetljivost kod morskih organizama koji se moraju prilagoditi novonastaloj situaciji (Galletly i sur., 2007). Genotoksični čimbenici nestaju iz okoliša mnogo ranije od pojave prvih znakova oštećenja organizma koja su često vidljivi tek u slijedećim generacijama, za razliku od toksičnih čimbenika koji djeluju na organizme u minimalnim koncentracijama dok su prisutni u okolišu i uzrokuju oštećenja organizma samo u vremenu njihova izlaganja. (Connon i sur., 2012).

U posljednjih nekoliko godina, došlo je do povećane zabrinutosti jer određeni genotoksini u okolišu pokazuju vrlo agresivan način djelovanja. Naime, pri vrlo niskim razinama izloženosti oni izazivaju oštećenja molekule DNA u organizmima (Regoli i sur., 2004). Genotoksini uzrokujući oštećenja DNA u morskim organizmima što može pokrenuti kaskadu poteškoća na različitim razinama od molekularne, stanične i tkivne razine, preko organizma ili populacije pa sve do zajednice. DNA i citogenetičke promjene u morskih organizama nastale djelovanjem genotoksina mogu rezultirati s oštećenjem funkcije enzima ili općeg metabolizma, citotoksičnošću, imunotoksičnošću, abnormalnim razvojem, smanjenjem preživljavanja, rastom i reprodukcijskim potencijalom (Jha, 2004).

Dosadašnja istraživanja genotoksičnosti u morskom ekološkom sustavu kao dio cjelovitih istraživanja praćenja okoliša, zajedno uz primjenu kemijsko analitičkih tehnika, provedena su na brojnim vrstama riba i morskih beskralješnjaka. Istraživanja genotoksičnosti u morskom ekosustavu najčešća su na školjkašima. U tkivu dagnje *Mytilus edulis* kao i u ostalim školjkašima otkriveni su mutageni spojevi koji odgovaraju zagađenju određenih lokacija i/ili sezoni (Moore i sur., 1989). Dosadašnja istraživanja su pokazala da dagnje *Mytilus edulis* u različitoj mjeri bioakumuliraju PAH-ove. Uspoređivanjem koncentracija PAH-ova u sedimentu s njihovom bioakumulacijom u tkivima dagnje i s oštećenjem DNA (jednolančanim lomovima) hemocita dagnje mjerenim Komet testom, autori su zaključili da oštećenja DNA koja nastaju odgovaraju zagađenju lokacija (Steinert i sur., 1998). Formiranje specifičnih DNA adukata u škrgama dagnje *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 dagnje hranom kontaminiranom B[a]P tijekom 28 dana (Akcha i sur., 2000a, Akcha i sur., 2000b, Akcha i sur., 2000c). Oštećenja DNA, kao krajnje točke djelovanja mutagenih spojeva, također su korištena za proučavanje mehanizama aktivacije ksenobiotika. Metodom alkalne elucije proučeno je djelovanje B[a]P i NQO, te je utvrđeno da potiču stvaranje alkalnolabilnih 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., 1990a, Bihari i sur., 1990b, 1992, Batel i sur., 1993).

Praćenjem primarnih oštećenja DNA metodom alkalnog filtar eluiranja u stanicama škrga dagnje uočena je razlika u cjelovitosti DNA kod dagnje sa PAH-ovima onečišćenog područja (Vukmirović i sur., 1994, Bolognesi i sur., 1996), kao i povećanje količine jednolančanih lomova DNA u stanicama hemolimfe i škrga dagnje nakon njihovog izlaganja $HgCl_2$ i $CuCl_2$ (Bolognesi i sur., 1999). Primjenom SCGE tehnike praćena su oštećenja DNA škrga dagnje *Mytilus galloprovincialis*. Dobiveni rezultati ukazuju na značajne razlike u cjelovitosti DNA (povećan broj oštećenja DNA) škrga dagnje sakupljenih unutar lagune u odnosu na kontrolni uzorak kao i njihovu korelaciju sa sniženom razinom indukcije sustava antioksidansa (Frenzilli i sur., 2001). Djelovanje genotoksičnih agenasa u dagnjama, praćeno je pojavom mikronukleusa u laboratorijskim i u uvjetima *in situ* (Brunetti i sur., 1988, Scarpato i sur., 1990a). Učestalost mikronukleusa praćena je i u stanicama škrga prirodnih populacija dagnje *Mytilus galloprovincialis* (*in situ*) u venecijanskoj laguni (Brunetti i sur., 1988) te u hemocitima dagnje *Mytilus edulis* (Wrisberg i sur., 1992). U prirodnoj populaciji dagnje *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 dagnje s poznatim kancerogenima u laboratorijskim uvjetima (Scarpato i sur., 1990b). Navedena istraživanja genotoksičnih učinka u dagnje *Mytilus* sp. omogućila su da se koriste kao biomarkeri u sustavnom praćenju stanja morskog ekosustava (Bolognesi i Cirillo, 2014).

## 1.5 Dagnja *Mytilus galloprovincialis* kao bioindikatorska vrsta

Mediteranska dagnja *Mytilus galloprovincialis*, Lamarck 1819., (Slika 5) ima dugu povijest kao bioindikatorska vrsta za određivanja stanja obalnog morskog okoliša (Varotto i sur., 2013) te se pokazala kao pogodan biološki indikatorski organizam (Viarengo i Canesi, 1991). Fiziologija i ponašanje dagnje može biti pod utjecajem različitih okolišnih faktora koji mogu voditi do stresa koji potom utječe na rast, prehranu, reproduktivni ciklus i na opću homeostazu organizma. Takvi faktori mogu biti abiotski (salinitet, temperatura i izlaganje zraku) (Phillips, 1976a, b, Cossa i sur., 1979, Davies i Pirie, 1980) ili antropogene prirode (Livingstone, 1991).

Zahvaljujući dobrom poznavanju fiziologije i ponašanja dagnje u kombinaciji sa staničnim, biokemijskim, molekularnim i genetičkim spoznajama dagnja se svrstava u bioindikatorske vrste za istraživanje učinka zagađivala na okoliš i organizam (Moore, 1985, Viarengo i sur., 1997, Regoli, 1998). Dagnja se, uz to, lako prikuplja i održava u laboratorijskim uvjetima a izlaganje otopljenim i lipofilnim onečišćivačima čini ju idealnim organizmom za testiranje učinka toksičnih tvari (Viarengo i sur., 1997). Upotreba dagnje kao bioindikatorske vrste za određivanje prisutnosti ili učinka metala u tragovima ili organskih tvari smatra se korisnim alatom za procjenu rizika izlaganju zagađenju (Moore, 1985, Viarengo i sur., 1997, Regoli, 1998, De Lafontaine i sur., 2000, Bihari i sur., 2007).

Organizmi koji se koriste kao bioindikatorske vrste, odnosno dagnja, održavaju relativno stanje u okolišu u kojem su boravile. Široka rasprostranjenost, velika brojnost i sesilni način života svrstava ih u reprezentativne organizme određenog područja. Uz to, dagnje su konstantno prisutne u okolišu te se time omogućava ponavljanje uzorkovanja, samog mjerenja i istraživanje dugoročnih promjena u okolišu (biomonitoring). Dodatno obilježje koje čini dagnju dobrom bioindikatorskom vrstom je njena sposobnost akumulacije različitih zagađivala filtracijom velike količine vode (Livingstone i sur., 1989, Widdows i Donkin, 1992), ponekad i u vrlo visokim

koncentracijama (Simkiss i sur., 1982, Capuzzo, 1996), što olakšava detekciju toksičnih tvari iako je njihova stvarna koncentracija u okolišu niska.



Slika 5. Dagnja *Mytilus galloprovincialis*, Lamarck 1819.

Veliki broj dokaza danas ukazuje na to da dagnja djeluje kao homeostatski sustav modulirajući metabolizam, fiziologiju i / ili morfologiju kao izravan odgovor na promjene nastale u okolišu radi prilagodbe na novonastalo stanje i zato se često nalaze u ekstremnim okolišnim uvjetima (Luedeking i Koehler, 2004). Još jedna prednost je što je njihov prijenos i održavanje u različitim uvjetima podosta jednostavan i omogućava usporedbu zagađenih i nezagađenih područja što je omogućilo razvoj

*Mussel Watch* koncepta koji u Sjedinjenim Američkim Državama traje od 1986. godine (Goldberg, 1986). Sustavno praćenje morskog okoliša pomoću transplantiranih dagnji postavljenih u kavezima na dubini od 3 - 4 metra na vremensko razdoblje od 3 – 4 tjedna omogućava praćenje količine različitih toksičnih tvari u morskom okolišu dok još nije uspostavljena prilagodba organizma na nove uvjete, a te se iste tvari akumuliraju u tkivima dagnje. Ovakav pristup omogućava lakšu standardizaciju dobivenih rezultata jer postoji mogućnost usporedbe organizama iz iste populacije sa zagađenih i nezagađenih područja. Različite toksične tvari mogu imati drugačiji biološki poluživot u dagnjama (npr. danima – bakar i pesticidi, mjesecima i godinama – kadmij). Iz navedenih razloga kombinacija i integracija podataka dobivenih iz divljih i transplantiranih populacija dagnje mogu dovesti do bitnih zaključaka o vezi koncentracije toksičnih tvari u okolišu i njihovog biološkog učinka (Perić i sur., 2012b).

U Jadranu je dagnja najistraživaniji organizam u području ekotoksikologije i korištena je u mnogobrojnim biomonitoring istraživanjima (Bihari i sur., 2003, Jakšić i sur., 2005, Klobučar i sur., 2008, Kanduč i sur., 2011, Perić i sur., 2012a, Štambuk i sur., 2013), uključujući i desetogodišnje istraživanje utjecaja onečišćenja na morski ekosustav na hrvatskoj strani Jadrana - ″Projekt Jadran″. Uvođenje učinkovitosti popravka DNA u ekotoksikološke studije moglo bi doprinijeti unapređenju procjene genotoksičnog rizika u sustavnom praćenju morskog ekosustava.

# 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

# 2 CILJEVI ISTRAŽIVANJA

- Prilagoditi 3D metodu (Salles i sur., 1995) mjerenja učinkovitosti popravka DNA *in vitro* za tkiva dagnje *Mytilus galloprovincialis*
- Odrediti razinu učinkovitosti popravka u jedinkama dagnje iz prirodnih populacija
- Usporediti učinkovitost popravka DNA iz jedinki s neugroženih i potencijalno ugroženih područja
- Utvrditi odnos učinkovitog popravka DNA i integriteta genoma dagnje

# 3. MATERIJALI I METODE

# 3 MATERIJALI I METODE

## 3.1 Kemikalije

U radu su korištene slijedeće otopine i kemikalije: Tris, Tris-HCl, EDTA, Triton X-100, PMSF, BSA, DAPI, DMSO, bezvodni bakrov (II) sulfat $CuSO_4$, $Na_2CO_3$, natrij azid, Na-tartarat, SDS, Folin - Ciocalteu otopina. Sve ostale kemikalije upotrijebljene tijekom rada bile su analitičke čistoće (Kemika, Zagreb).

## 3.2 Organizmi i izolacija tkiva

U radu su korištene jedinke dagnje *Mytilus galloprovincilais,* Lamarck, 1819 (Mollusca: Bivlvia) (Slika 6), prosječne veličine 4±1 cm, za laboratorijske pokuse uzete su iz uzgajališta smještenog u Limskom kanalu, Istra, Hrvatska, koje se nalazi pod stalnom bakteriološkom i kemijskom kontrolom, te su prenesene u laboratorijski bazen s protočnom morskom vodom čija temperatura je odgovarala temperaturi mora radi aklimatizacije.



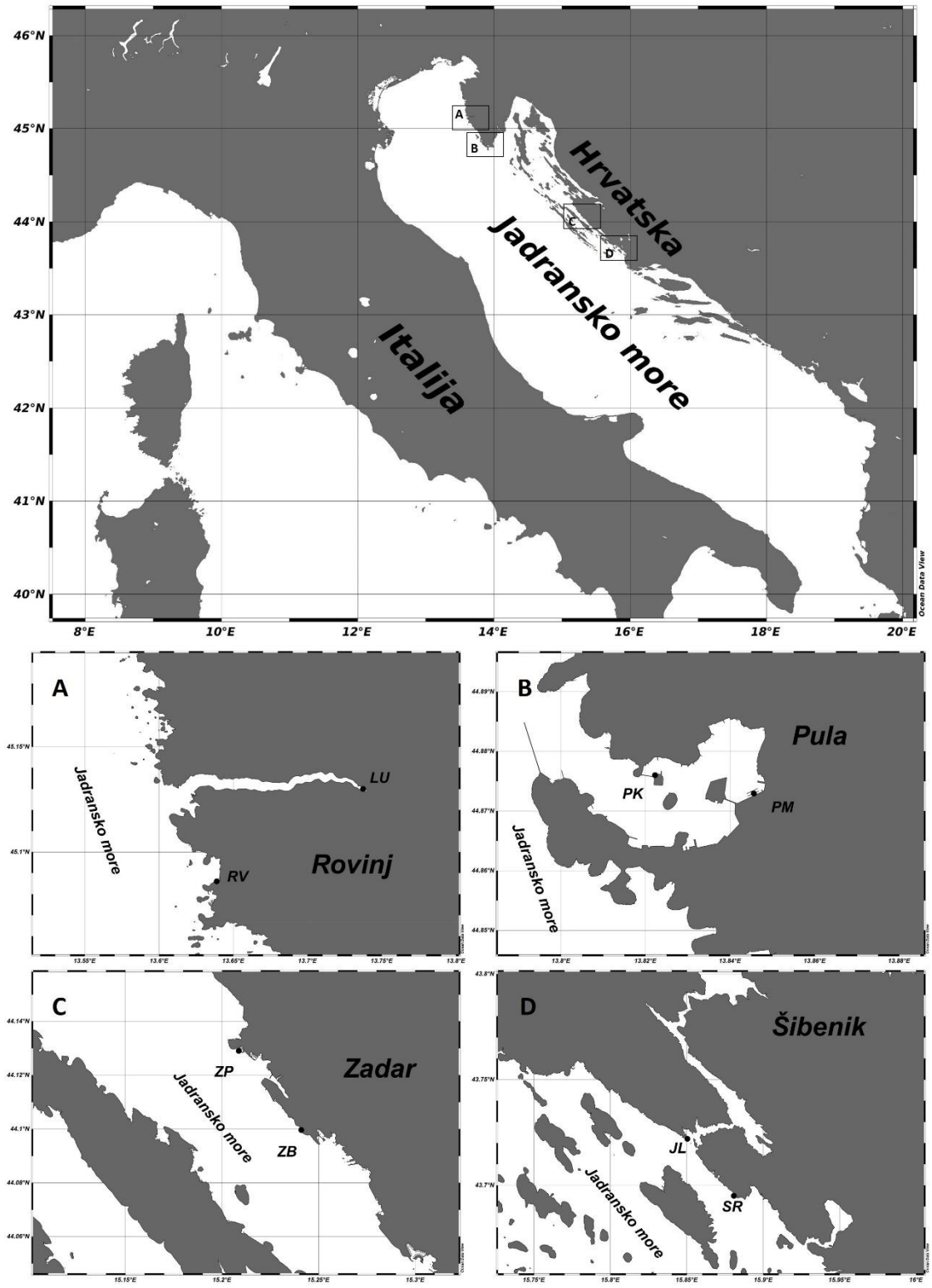
Slika 6. Unutrašnjost dagnje *Mytilus galloprovincialis*, Lamarck, 1819.

Učinkovitost popravka DNA i integriteta genoma analizirana je i u prirodnim populacijama s lokacija koje su pod utjecajem miješanog zagađenja (gradske luke, marine, industrijska postrojenja i poljoprivredni ispusti) i lokacija za koje se smatra da su pod minimalnim antropogenim utjecajem (Tablica 1). Uzorkovano je po 10 jedinki dagnje na svakoj lokaciji.

Tablica 1. Opis postaja

| **POSTAJA** | **KRATICA POSTAJE** | **KOORDINATE** | | |
|---|---|---|---|---|
| Lim uzgajalište | LU | 13.737604 E | 45.130250 N | Zaštićeno područje |
| Rovinj Valdibora | RV | 13.638952 E | 45.086014 N | Luka |
| Pula Marina | PM | 13.845450 E | 44.872774 N | Luka |
| Pula Katarina | PK | 13.822464 E | 44.876189 N | Urbano područje |
| Zadar Puntamika | ZP | 15.208745 E | 44.129311 N | Urbano područje |
| Zadar Punta Bajlo | ZB | 15.241006 E | 44.099963 N | Urbano područje |
| Jadrija Lanterna | JL | 15.850004 E | 43.721565 N | Urbano područje |
| Šibenik Solaris Resort | SR | 15.880550 E | 43.695011 N | Urbano područje |

Sakupljene su jedinke dagnje s ukupno sedam lokacija (Slika 7). Dagnje su sakupljene s tri lokacije u sjevernom Jadranu na zapadnoj strani istarske obale u rujnu 2014. godine i to s lokacija Rovinj Valdibora (RV), Pula Marina (PM) te Pula Katarina (PK). Organizmi s četiri lokacije u srednjem Jadranu sakupljeni su u kolovozu 2014. godine u zadarskom akvatoriju, Puntamika (ZP) i Rt Bajlo (ZB) te šibenskom akvatoriju, Jadrija Lanterna (JL) i Solaris Resort (SR) (Slika 7). Dagnje su nakon sakupljana odmah secirane; izvađena je hemolimfa iz aduktora dagnje *Mytilus galloprovincialis* (Slika 6). Na 100 µl hemolimfe dagnje dodano je 900 µl DAPI otopine (CyStain® one step, Partec, Njemačka) s 10 % DMSO (dimetil sulfoksid, Kemika, Hrvatska), a uzorci su potom zaleđeni u tekućem dušiku i pohranjeni na -80 °C. Tkiva škrga i probavne žlijezde (Slika 6) su odstranjeni te su također zaleđeni u tekućem dušiku i pohranjeni na -80 °C do daljnje analize.




Slika 7. Područja istraživanja, LU – Lim uzgajalište, RV – Rovinj Valdibora, PM – Pula Marina, PK – Pula Katerina, ZP – Zadar Puntamika, ZB – Zadar Borik, JL – Jadrija Lanterna, SR – Šibenik Solaris Resort

## 3.3 Priprema proteinskih ekstrakata

### 3.3.1 Homogenizacija

Za homogenizaciju škrga i probavne žlijezde isprobana su dva različita pufera kako bi se utvrdili najbolji uvjeti za mjerenje aktivnosti enzima za popravak DNA.

1. Homogenizacijski pufer A (s deterdžentom i EDTA): škrge i probavna žlijezda dagnje homogenizirane su u homogenizacijskom puferu A (10 mM Tris, 20 mM EDTA, 0.5 % Triton X-100, 2 mM PMSF, pH 8,00). U pufer je dodan koktel inhibitora proteaza (Roche Molecular Biochemicals Complete™ Solution for Protease Inhibition) po uputama proizvođača radi zaštite proteina popravka DNA u ekstraktima proteina. Pufer je dodan u omjeru 1 : 3 (w/v), tkivo je homogenizirano 30 sekundi na ledu pomoću Teflonskog homogenizatora (TEHTNICA, Železnički). Homogenati su zatim centrifugirani na 10 000 x *g*, 30 minuta na 4 °C. Dobiveni supernatant prebačen je u čistu mikrocentrifugnu tubicu te pohranjen na - 20 °C do daljnje analize.

2. Homogenizacijski pufer B (bez deterdženta i EDTA): tkiva škrga i probavne žlijezde pojedine dagnje homogenizirani su u homogenizacijskom puferu B (0,1 M Tris-HCl, pH 8,00). U homogenizacijski pufer prije same homogenizacije dodan je koktel inhibitora proteaza (Sigma*FAST*™ Protease Inhibitor Tablet) po uputama proizvođača. Pufer je dodan u omjeru 1:4 (w/v). Postupak homogenizacije tkiva bio je jednak onom opisanom u 1.

### 3.3.2 Određivanje koncentracije ukupnih proteina

Koncentracija ukupnih proteina u ekstraktima određena je pomoću dvije metode ovisno o homogenizacijskom puferu. Za određivanje količine proteina u ekstraktima koji sadrže homogenizacijski pufer A (10 mM Tris, 20 mM EDTA, 0,5% Triton X-100, 2 mM PMSF, pH 8,00) korištena je metoda po Lowry-u u mikrotitarskim pločama (Lowry i sur., 1951) jer Bradford reagens reagira s nizom deterdženata uključujući i Triton X-100. Za pripremu standarda BSA se otopio u 0,5 M NaOH, na ledu, da bi se dobio raspon koncentracija od 40 – 400 µg/ml. Uzorci su razrijeđeni 20 x i 30 x u 0,5 M NaOH te su odmah analizirani. Po 30 µl svakog uzorka i standarda se dodalo u jažicu prozirne 96-jažične mikotitarske ploče ravnog dna, volumena jažice od 300 µl (White 96-well Cliniplate, Thermo Scientific) u duplikatu. Otopina A (250 ml $dH_2O$, 0,15 g $CuSO_4$, 0,30 g Na - tartarata, 0,2 % natrij azid) pomiješana je s otopinom B (250 ml 0,2 M NaOH, 8 g $Na_2CO_3$, 1 g SDS) u omjeru 1 : 3. U svaku jažicu dodano je 100 µl A + B otopina te inkubirano na sobnoj temperaturi 30 minuta. Nakon inkubacije u svaku jažicu dodano je 150 µl otopine C (0,1 M Folin - Ciocalteu otopina) i inkubirano 30 minuta na sobnoj temperaturi. Absorbancija je očitana na ELISA čitaču (Labsystems) koristeći filter za 620 nm.

Za određivanje koncentracije ukupnih proteina u ekstraktima s homogenizacijskim puferom B (0,1 Tris-HCl, pH 8,00) korištena je Bradford metoda (Bradford, 1976). Koncentracija ukupnih proteina određena je Quick Start™ Bradford Protein Assay (Bio-Rad). U 96-jažičnoj prozirnoj mikrotitarskoj ploči, volumena 300 µl, dodani su standardi u rasponu koncentracija od 25 µg/ml do 1,25 µg/ml u duplikatu po 150 µl, i po 150 µl svakog uzorka razrijeđeni 200 x. U svaku jažicu dodano je 150 µl 1 x Bradford otopine i promiješano je pomoću mikropipete te inkubirano 30 minuta na sobnoj temperaturi. Absorbancija je mjerenja pomoću ELISA čitača (Labsystems) koristeći filter za 620 nm.

### 3.3.3 Izolacija jezgrenih i citoplazmatskih frakcija

Za izolaciju jezgrene i citoplazmatske frakcije proteina korišten je NE-PER Nuclear and cytoplasmic Extraction kit (Thermo Scientific, USA). 100 mg svježeg tkiva škrge odnosno probavne žlijezde usitnjeno je na male komadiće i stavljeno u mikrocentrifugne tubice. Tkivo je isprano s 10 mM PBS puferom, pH 7,4 nakon čega je slijedilo centrifugiranje na 500 x *g* 5 minuta. Nakon centrifugiranja pažljivo se uklonio sav supenatant ostavljajući talog suhim. Tkivo se potom homogeniziralo u Dounce homogenizatoru s 1000 µl CER I reagensa iz kita s dodanim koktelom inhibitora protaza (Roche Molecular Biochemicals Complete™ Solution for Protease Inhibition). Nakon dodavanja pufera uzorak se vorteksirao na najvećoj brzini 15 sekundi dok se cijeli talog ne resuspendira. Uzorak se ostavio na ledu 10 minuta. Nakon toga dodano je 55 µl ledenog CER II reagensa iz kita, vorteksiran je 5 sekundi na najvećoj brzini i centrifugiran na 16 000 x *g*, 5 minuta na + 4 °C. Supernatant u kojem se nalazi citoplazmatska frakcija proteina je odmah nakon centrifugiranja prebačen u novu rashlađenu microcentrifugnu tubicu i pohranjen na - 80 °C do daljnje analize. Talog je resuspendiran u 500 µl ledenog NER reagensa iz kita s dodatkom koktela inhibitora proteaza (Roche Molecular Biochemicals Complete™ Solution for Protease Inhibition). Uzorak je vorteksiran na najvećoj brzini 15 sekundi. Uzorak je ostavljen 10 minuta na ledu i ponovo vorteksiran, postupak se ponovio do ukupnog vremena od 40 minuta. Uzorak je centrifugiran na 16 000 x *g*, 10 minuta na + 4 °C. Supernatant je odmah prenesen u novu rashlađenu mikrocentrifugnu tubicu i pohranjen na – 80 °C do daljnje analize.

## 3.4 Mjerenje učinkovitosti popravka DNA

Kao supstrat za analizu učinkovitosti popravka DNA korištena je komercijalna plazmidna DNA i to plazmid pBR322 (Carl Roth GmbH, Njemačka), kao stock otopina korištena je otopina koncentracije 50 µg/ml.

### 3.4.1 Priprema supstrata

#### 3.4.1.1 Oštećenje supstrata (plazmidna DNA)

U prozirnim 96 – jažičnim mikrotitarskim pločama (White 96 - well Cliniplate, Thermo Scientific, USA) dodano je po 10 µl plazmidne DNA u TE puferu (10 mM Tris – HCl, 1 mM EDTA) koncentracije 50 µg/ml koji je ozračen dozama od 10 J $m^{-2}$ do 600 J $m^{-2}$ pomoću CX – 2 000 UV – crosslinkera od 8 W na valnoj duljini od 254 nm (UVP, USA). Odmah nakon zračenja plazmidna DNA je pohranjena – 20 °C.

#### 3.4.1.2 Provjera oštećenja supstrata

Plazmidna DNA pBR322 nalazi se u konformaciji superzavojnice. Zračenjem plazmida u UV-području (254 nm) na molekuli DNA se javljaju većinom oštećenja u obliku ciklobutanskih pirimidinskih dimera (CPD) koji predstavljaju supstrat za $T_4$ – endonukleazu V. Nakon enzimske reakcije na mjestu CPD-a nastaju jednostruki lomovi. Jedan jednostruki lom nastao u ozračenoj i s enzimom inkubiranoj plazmidnoj DNA dovodi do relaksacije superzavojnice i nastaje tzv. otvorena cirkularna DNA. U slučaju dva jednostruka loma u komplementarnim lancima molekule DNA plazmid se linearizira. Nakon izlaganja UV – zračenju 2,5 µl plazmidne DNA koncentracije 50 µg/ml inkubirano je 30 minuta na 37 °C s 10 µl $T_4$ – endonukleaza V (Fafanđel, 1997) u prozirnim mikrotitarskoj ploči. Odmah nakon inkubacije smjesa plazmidne DNA i enzima provjerena je elektroforezom na 1 % agaroznom gelu. Elektroforeze su vođene u TAE puferu (40 mM TRIS, 20 mM ledena octena kiselina, 1 mM EDTA pH 8,0) u gelovima koncentracije 1 %, pri konstantnom naponu od 100 V u trajanju od 45 minuta. Gelovi su potom inkubirani u otopini etidij bromida koncentracije 2 mg/L u trajanju od

15 minuta, te ispirani u destiliranoj vodi također u trajanju od 15 minuta. Gelovi su pregledani pod UV svjetlom (312 nm) i fotografirani digitalnim sustavom za dokumentaciju.

### 3.4.2 Prilagođavanje 3D metode za mjerenje učinkovitosti popravka DNA u tkivima dagnje

#### 3.4.2.1 Vezanje plazmida na mikroploču

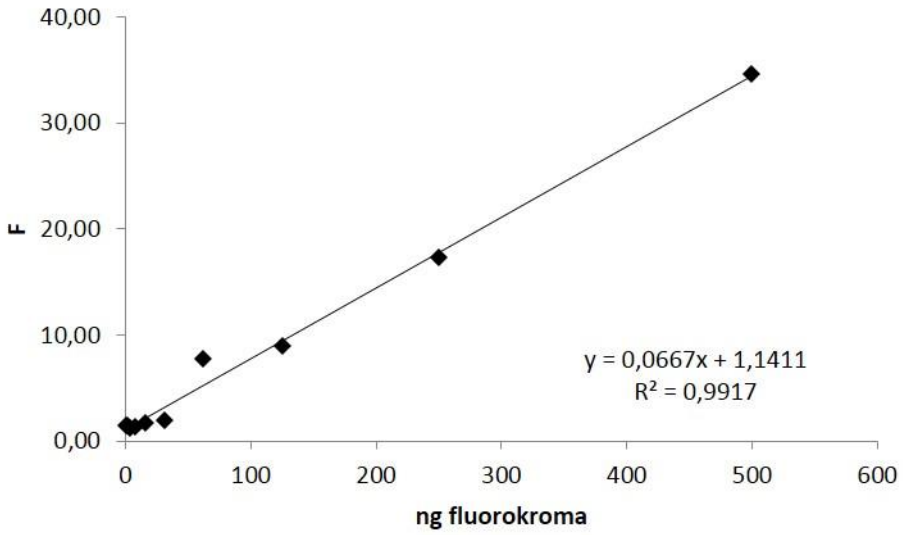
U svaku jažicu tamne mikrotitarske ploče (96 - Thermo Scientific) dodano je 50 µl poli-L-lizina, *Mr* 15 000 – 30 000 (Sigma, Njemačka) u PBS puferu (10 mM fosfata, 150 mM NaCl, pH 7,2), koje su pokrivene i ostavljene na + 4 °C preko noći. Jažice su isprane 2x s PBST (0.1% Tween 20) na sobnoj temperaturi. U svaku jažicu dodalo se 50 µl pBR322 plazmida koncentracije 1 µg/ml. Inkubirano je 30 minuta na + 30 °C uz laganu trešnju u Thermo Scientific mehaničkoj tresilici. Jažice su isprane dva puta s PBST-om prije slijedećeg koraka

#### 3.4.2.2 Reakcija popravka

Reakcijska smjesa u volumena 50 µl koja je sadržavala 150 µg proteina, 70 mM KCl u reakcijskom puferu s 40 mM Hepes-KOH (pH 7,6), 5 mM $MgCl_2$, 0,5 mM DTT, 10 mM fosfokreatin, 2,5 µg kreatin fosfokinaze, 2 mM EGTA, 18 µg BSA, 0,4 µM svakog dNTP-a (dGTP, dCTP i dATP) i 0,4 µM DIG - dUTP. Mikrotitarske ploče koje sadrže reakciju popravka inkubirane su 3 sata (odnosno 30 minuta, 1, 24 i 48 sati) na + 30 °C. Nakon inkubacije, jažice su isprane 3 x s PBST puferom. Osim uzoraka na ploču su dodane i kontrolne smjese, za negativnu kontrolnu reakciju korištena je reakcijska smjesa bez plazmida, dok je za pozitivnu kontrolu korištena umjesto uzorka smjesa humanih enzima popravka DNA (PreCR® Repair Mix, New England Lab Systems).

### 3.4.2.3 Detekcija ugrađenih obilježenih nukleotida

Nakon reakcije popravka i ispiranja, u jažice je dodano 1: 10 000 anti - DIG antitijela (Roche, Njemačka), odnosno 1:1000 i 1:5 000, konjugiran s alkalnom fosfatazom u omjeru od 1:10 000 u PBS puferu i 1 % BSA i 1 % deterdženta Tween 20. Inkubacija s antitijelom trajala je 30 minuta. Nakon inkubacije jažice su isprane tri puta s PBST puferom. U svaku jažicu dodano je 50 µl AttoPhosa® (Roche, Njemačka) po uputama proizvođača. Za kalibraciju instrumenta na ploču je stavljena i kalibracijska otopina (Roche, Njemačka) po uputama proizvođača. Dobiveni standardni pravac imao je vrijednost $R^2$ iznad 0,99 (Slika 8).




Slika 8. Kalibracijski pravac fluorokroma (AttoPhos®).

## 3.5 Mjerenje integriteta genoma protočnom citometrijom

Uzorci hemolimfe dagnje prethodno pohranjeni na – 80 °C, nakon odleđivanja, a prije same analize, filtrirani su kroz 30 μm filter. Za određivanje koeficijenta varijacije (CV) analizirano je 20 000 jezgri po jedinki. Ukupno je analizirano po 10 jedinki sa svake lokacije. Hemolimfa pojedine dagnje obojane DAPI bojom (Partec, Njemačka) (100 μl hemolimfe, 800 μl Cystain® otopine, 10% DMSO) analiziran je koristeći PAS III protočni citometar (Partec, Njemačka). Brzina protoka podešena je na 200 – 400 stanica/sekundi, uz pobudu živinom lampom (100 W) pri standardnim uvjetima (Partec, Njemačka) za detekciju DAPI signala (FL6). Za baždarenje instrumenta korišten je kao standard otopina eritrocita pastrve (Partec, Njemačka). Rezultati su prikazani kao box plot grafički prikaz.

## 3.6 Statistička obrada podatka

Statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između grupa podataka i kontrolnih vrijednosti određena je analizom varijance (ANOVA) i post – hoc Tukey Multiple Comparison testom. Srednja vrijednost i standardna devijacija te koeficijent varijacije izračunati su za svaki parametar. Korelacija je određena Pearson analizom korelacije i Spearmanovim koeficijentom korelacije gdje je uzeta u obzir statistička značajnost od $p < 0,05$. Sve statističke obrade provedene su pomoću programskog paketa Statistica (verzija 8.0, Francuska)

# 4. REZULTATI

# 4 REZULTATI

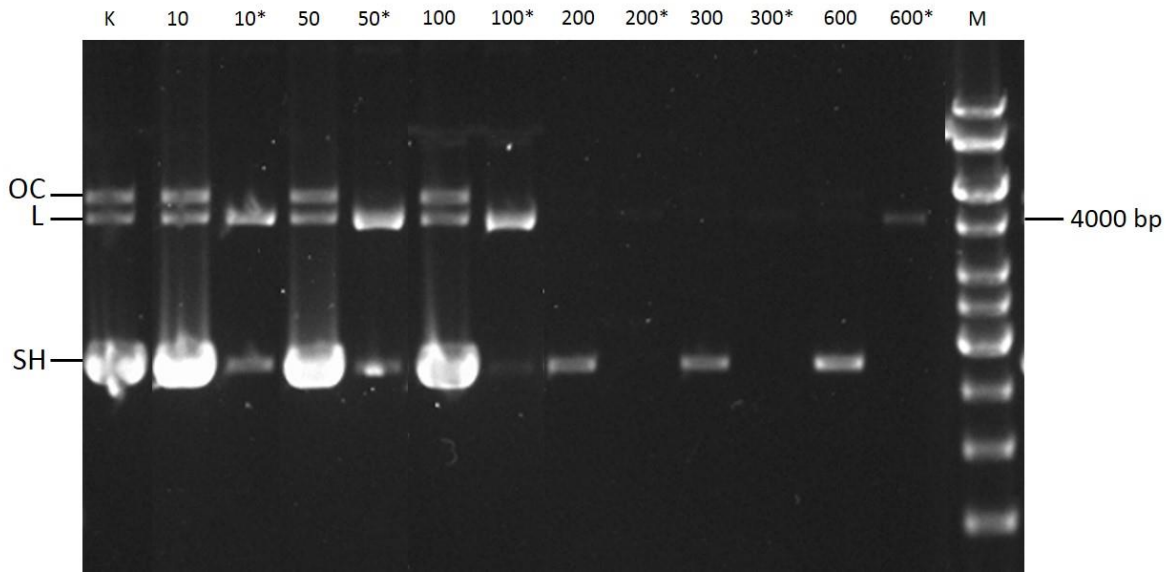
## 4.1 Prilagodba metode određivanja *in vitro* popravka DNA za tkiva dagnje *Mytilus galloprovincialis*

### 4.1.1 Utvrđivanje optimalnih uvjeta

#### 4.1.1.1 Provjera oštećenja supstrata

Prisutnost plazmidnih formi nastalih nakon UV zračenja i inkubacijom s $T_4$ endonukleazom V utvrdila se elektroforezom. Zbog razlike u pokretljivosti u električnom polju elektroforezom razdvojile su se vrpce. Plazmidna DNA oštećena je dozama od 10, 50, 100, 200, 300 i 600 J $m^{-2}$ UV zračenja i elektroforezom DNA u agaroznom gelu dobivena su sva tri oblika plazmidne DNA i to kružni relaksirani, linearni i superzavojnica (Slika 9). Najmanju pokretljivost imala je otvorena cirkularna DNA a najveću superzavojnica u stazi gdje se nalazio neoštećeni plazmid kao kontrola. U stazama 10, 50 i 100 vidljivi su također svi oblici plazmidne DNA. U stazama gdje su se nalazili plazmidi ozračeni dozama UV zračenja od 200, 300 i 600 J $m^{-2}$ vidljiv je samo oblik superzavojnice plazmida. U stazama označenim sa zvjezdicom (*) nalazili su se uzorci plazmida nakon inkubacije s $T_4$ endonukleazom V koja cijepa lanac isključivo na mjestima gdje su nastali CPD – ovi u dvostrukoj zavojnici te je kao rezultat vidljiv linearni oblik plazmida. Plazmid ozračen s 10, 50 i 100 J $m^{-2}$ dozama UV zračenja nakon inkubacije s enzimom pokazao je isključivo linearni oblik dok su oblici kružni relaksirani i superzavojnica izostali. U stazi 10* neznatno jačeg intenziteta je vrpca gdje se nalazi linearni oblik plazmida naspram vrpce u kojoj se nalazi oblik superzavojnice. U stazi 50* zamjećuju se isto tako dvije vrpce koje predstavljaju linearni oblik i oblik superzavojnice plazmida, a intenzitet vrpce koji označava linearni oblik je veći nego vrpca u kojem se nalazi oblik superzavojnice. U stazi 100* primjećuju se dvije jednake vrpce koje postoje u stazama 10* i 50* s time da je intenzitet vrpce koja predstavlja

linearni oblik mnogo veći nego onaj vrpce oblika superzavojnice. U stazama 200*, 300* i 600* vidljive su slabe vrpce na poziciji linearnog oblika.




Slika 9. Elektroforogram plazmidne DNA (pBR322) nakon UV zračenja. M – DNA marker; K – kontrola: komercijalna plazmidna DNA (pBR322); Staze 10, 50, 100, 200, 300 i 600 odgovaraju dozama UV zračenja u J $m^{-2}$. Staza 10*, 50*, 100*, 200*, 300* i 600* sadrže plazmid ozračen s 10, 50, 100, 200, 300 i 600 J $m^{-2}$ UV-a i pocijepane s $T_4$ endonukleazom V. OC – kružni oblik; L – linearni oblik; SH – superzavojnica.

#### 4.1.1.2 Uvjeti reakcije

Radi prilagodbe metode bilo je nužno ispitati uvjete reakcije. Ispitana su dva homogenizacijska pufera, količina volumena poli – L – lizina, šest različitih pufera za antitijela, koncentracije antitijela, način ispiranja jažica nakon svakog koraka te vremena inkubacije s AttoPhos®. U Tablica 2 prikazani su svi ispitani uvjeti, s oznakom + označeni su uvjeti koji su dali pozitivne rezultate dok su s oznakom – označeni oni koji nisu dali zadovoljavajuće rezultate. Od ispitanih pufera homogenizacijski pufer A pokazao je najveću količinu proteinskog ekstrakta. Premazivanje jažica s 50 µl poli – L – lizinom bilo je dovoljno za vezanje plazmidne DNA za podlogu. Antitijela u anti – DIG puferu su se najbolje vezala na obilježene nukleotide. Za detekciju obilježenih nukleotida bila je dovoljna koncentracija od 1 : 10 000 anti – DIG antitijela. Ispiranje jažica s PBS-om i dodatkom deterdženta Tween 20 dalo je najstabilniji signal fluorescencije. Oba ispitana vremena inkubacije s AttoPhosom® su dala podjednake signale fluorescencije.

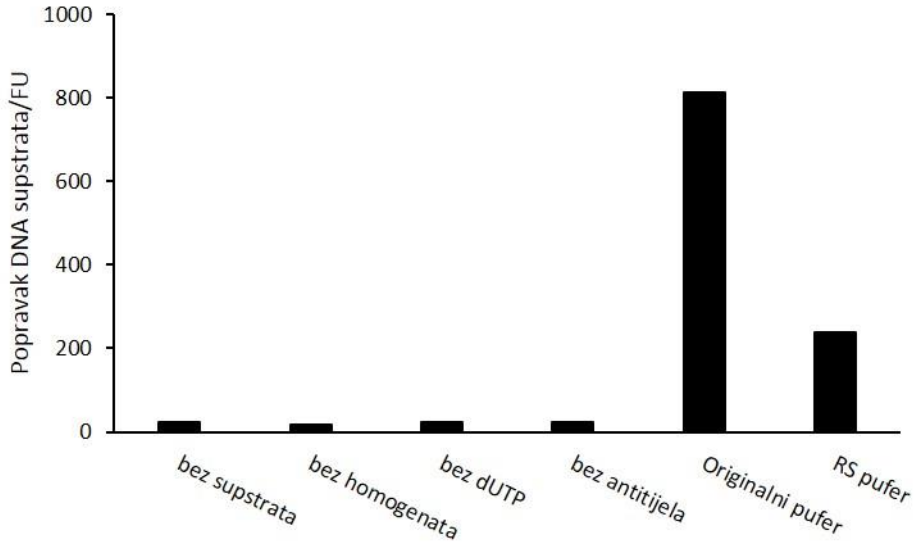
Tablica 2. Pregled svih ispitanih uvjeta reakcija za određivanje popravka DNA za tkiva dagnje.

| | | HOMOGENI-ZACIJSKI PUFER | | VOLUMEN PREMAZA | | PUFER ZA ANTITIJELA | | | | | | KONCENTRACIJE ANTITIJELA | | | ISPIRANJE JAŽICA / DETERDŽENT | | ATTOPHOS | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | A | B | 50 µl | 100 µl | O | O+T | N | N+T | B | B+T | 1:1000 | 1:5000 | 1:10000 | SA | BEZ | 30 | 60 |
| HOMOGENIZA-CIJSKI PUFER | A | | | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | + | + |
| | B | | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| VOLUMEN PREMAZA | 50 µl | + | - | | | + | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | + | + |
| | 100 µl | - | - | | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| PUFER ZA ANTITIJELA | O | + | - | + | - | | | | | | | - | - | + | + | - | + | + |
| | O+T | - | - | - | - | | | | | | | - | - | - | - | - | - | - |
| | N | - | - | - | - | | | | | | | - | - | - | - | - | - | - |
| | N+T | - | - | - | - | | | | | | | - | - | - | - | - | - | - |
| | B | - | - | - | - | | | | | | | - | - | - | - | - | - | - |
| | B+T | - | - | - | - | | | | | | | - | - | - | - | - | - | - |
| KONCENTRACIJA ANTITIJELA | 1:10000 | + | - | + | - | + | - | - | - | - | - | | | | + | - | + | + |
| | 1:5000 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | | | - | - | - | - |
| | 1:1000 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | | | - | - | - | - |
| ISPIRANJE JAŽICA / DETERDŽENT | SA | + | - | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | + | | | + | + |
| | BEZ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | | - | - |
| ATTOPHOS | 30 | + | - | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | | |
| | 60 | + | - | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | | |

A – homogenizacijski pufer A; B – homogenizacijski pufer B; O – Anti – DIG pufer; O+T – Anti – DIG pufer + 1% Tween 20; N – 0,5 M NaOH; N+T – 0,5 NaOH + 1% Tween 20; B – 1% BSA; B+T – 1% BSA + 1% Tween 20; 30 – 30 minuta inkubacije s AttoPhos-om; 60 – 60 minuta inkubacije s AttoPhosom®; +: pozitivna reakcija; - : negativna reakcija

#### 4.1.1.3 Ovisnost fluorescencije o sastavu reakcijske smjese

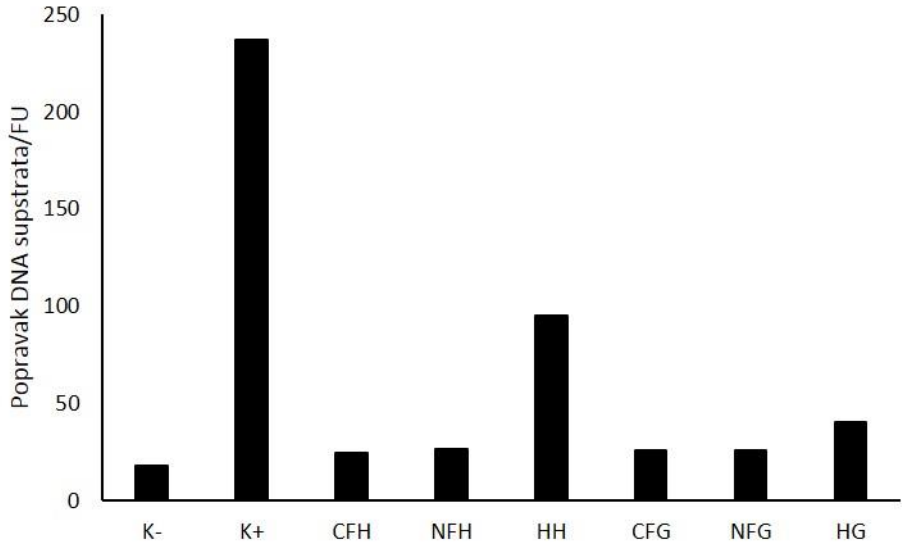
Za provjeru reakcije popravka DNA uvele su se negativna kontrola i pozitivna kontrola reakcije popravka DNA. Ispitane su četiri vrste negativne kontrole i dvije pozitivne kontrole (Slika 10). Kao negativna kontrola koristila se reakcijska smjesa koja nije sadržavala oštećeni supstrat, reakcija bez homogenata tkiva dagnje, reakcija koja nije sadržavala obilježene nukleotide i reakcija u kojoj nisu dodana antitijela za DIG obilježene nukleotide. Sve četiri negativne kontrole su imale fluorescenciju ispod 25. Kao pozitivna kontrola reakcije popravka DNA koristio se komercijalni ekstrakt humanih enzima mehanizma popravka DNA iz PreCR™ Repair Mix-a. Za reakciju popravka oštećenog supstrata pomoću ekstrakta humanih enzima mehanizma popravka DNA korišteno je dva pufera, originalni komercijalni ThermoPol reakcijski pufer iz PreCR™ kita i RS reakcijski pufer. Pozitivna kontrola pokazale je aktivnost u oba slučaja. Učinkovitost popravka DNA bila je tri puta veća u uzorcima s ekstraktom humanih enzima mehanizma popravka DNA s komercijalnim reakcijskim puferom od reakcije s RS reakcijskim puferom.




Slika 10. Ovisnost fluorescencije o sastavu reakcijske smjese.

#### 4.1.1.4 Testiranje učinkovitosti popravka DNA izoliranih frakcija ukupnih proteina, citoplazmatskih i jezgrenih proteina iz probavne žlijezde i škrga dagnje *Mytilus galloprovincialis*

Provjerena je učinkovitost popravka DNA različitih frakcija proteina i to jezgrene frakcije i citoplazmatske frakcije u škrgama i u probavnoj žlijezdi u odnosu na ukupnu frakciju izoliranih proteina tih istih tkiva dagnje (Slika 11.). Nakon reakcije popravka prilagođenom 3D metodom pokazalo se da je u jezgrenim i citoplazmatskim frakcijama, izoliranim iz probavne žlijezde, učinkovitost popravka DNA neznatno viša od negativne kontrole. Frakcija ukupnih proteina iz probavne žlijezde pokazala se kao najučinkovitija u popravljanju oštećene DNA. Učinkovitost popravka DNA u frakcijama citoplazmatskih i jezgrenih proteina iz škrga nije se razlikovala od učinkovitosti popravka DNA u negativnim kontrolama reakcije dok se u frakciji ukupnih proteina iz škrga pokazalo da postoji aktivnost popravka oštećene DNA.




Slika 11. Učinkovitost popravka DNA supstrata u izoliranim frakcijama staničnih proteina probavne žlijezde i škrga dagnje *Mytilus galloprovincialis*. K- - negativna kontrola; K+ - pozitivna kontrola; CFH – citoplazmatska frakcija proteina iz probavne žlijezde; NFH – jezgrena frakcija proteina iz probavne žlijezde; HH – frakcija ukupnih proteina iz probavne žlijezde; CFG – citoplazmatska frakcija proteina iz škrga; NFG – jezgrena frakcija proteina iz škrga; HG – frakcija ukupnih proteina iz škrga.

#### 4.1.1.5 Optimalni uvjeti reakcije popravka DNA

Nakon provjera svih uvjeta reakcije popravka DNA i testiranja učinkovitosti popravka DNA pojedinih proteinskih frakcija, negativnih i pozitivnih kontrola izabrani su uvjeti prikazani u Tablica 3. Za homogenizaciju tkiva škrge i probavne žlijezde koristio se pufer A. Potreban volumen za premazivanje jažica mikrotitarskih ploča je 50 µl. Kao najbolji inkubacijski pufer za anti – DIG antitijela izabran je anti – DIG pufer dok je njihova optimalna koncentracija 1: 10 000. Za ispiranje jažica najbolje rezultate je pokazao PBS pufer s dodatkom Tween 20 deterdženta. Za detekciju obilježenih nukleotida s AttoPhos® supstratom inkubacija je bila između 30 – 60 minuta. Za daljnje analize koristiti će se frakcije ukupnih proteina tkiva škrge i probavne žlijezde dagnje. Kao negativna kontrola reakcije popravka izabrana je reakcija koja ne sadrži homogenat tkiva, dok će se za pozitivnu kontrolu koristiti ekstrakt humanih enzima mehanizma popravka DNA u RS reakcijskom puferu.

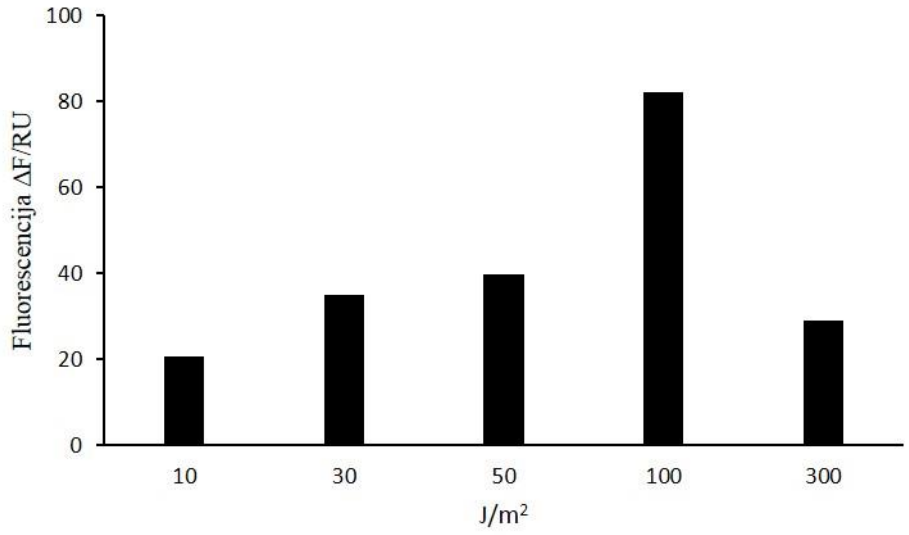
Tablica 3. Optimalni uvjeti reakcije popravka DNA

| UVJET | |
|---|---|
| Homogenizacijski pufer | Pufer A<br>(10 mM Tris, 20 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 2mM PMSF, pH 8.00) |
| Volumen premaza poli – L - lizina | 50 µl |
| Pufer za antitijela | Anti – DIG pufer<br>(100 mM Tris – HCl, 100 mM NaCl, pH 7.5) |
| Koncentracija antitijela | 1 : 10 000 |
| Ispiranje jažica | PBS + Tween 20 |
| Inkubacija AttoPhosom® | 30 minuta – 60 minuta |
| Negativna kontrola | Reakcija bez homogenata |
| Pozitivna kontrola | 1µl PrePCR u RS puferu |
| Proteinska frakcija | Homogenat ukupnih proteina |

### 4.1.2 Testiranje optimalnih uvjeta

#### 4.1.2.1 Razina oštećenja supstrata

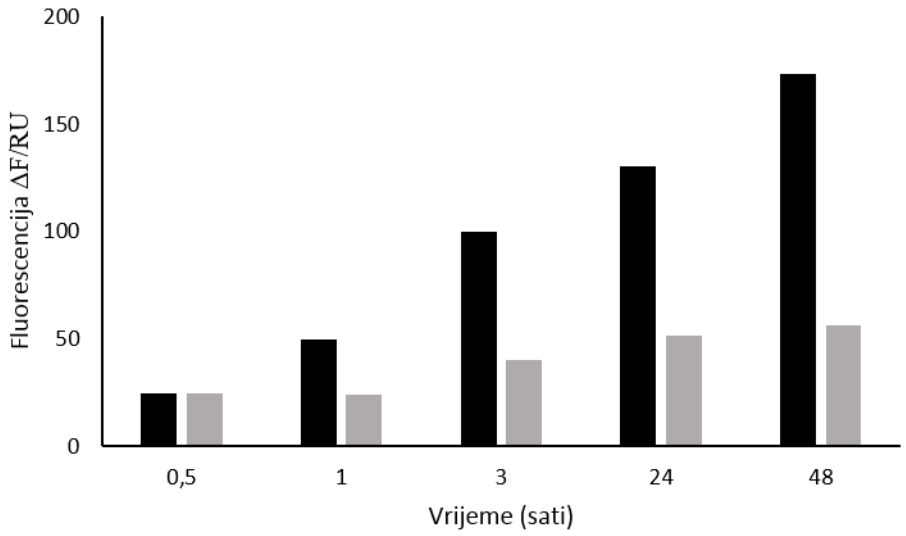
U svrhu određivanja popravka DNA prilagođenom 3D metodom bilo je potrebno najprije odrediti optimalnu količinu oštećenja supstrata za reakciju popravka DNA koja će se koristiti u daljnjim istraživanjima. Za svaku dozu oštećenja korišten je isti homeogenat probavne žlijezde dagnje. Sa Slika 12 jasno je vidljivo da s povećanjem oštećenja supstrata UV zračenjem do 100 J $m^{-2}$ raste i učinkovitost popravka. Kod niskih doza UV zračenja (10 – 50 J $m^{-2}$) učinkovitost reakcije popravka je bila niska. Najniža učinkovitost popravka dobivena je pri UV zračenju od 10 J $m^{-2}$. Kod doza od 30 J $m^{-2}$ i 50 J $m^{-2}$ dobivena je učinkovitost popravka između 40 i 50 RU izražena kao ΔF. Kod doze od 100 J $m^{-2}$ dobivena je najviša učinkovitost popravka. Pri visokim dozama UV zračenja, 300 J $m^{-2}$, učinkovitost popravka DNA bila je vrlo niska, ispod 40 RU. Popravak DNA linearno raste s razinom oštećenja do 100 J $m^{-2}$ nakon čega opada. Izabrana je doza koja će omogućiti najučinkovitiji popravak DNA i s time najveću osjetljivost.




Slika 12. Učinkovitost popravka probavne žlijezde dagnje za različita oštećenja supstrata.

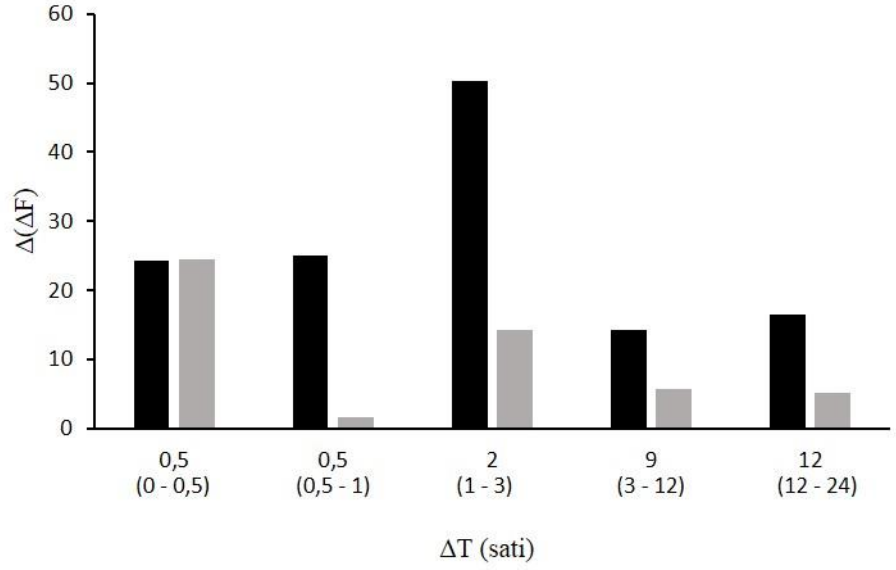
### 4.1.2.2 Vrijeme inkubacije

Radi određivanja optimalnih uvjeta mjerenja učinkovitosti popravka DNA ispitano je vrijeme inkubacije potrebno za reakciju popravka DNA. Reakcija popravka DNA praćena je u dva različita tkiva dagnje, u probavnoj žlijezdi i u škrgama. Učinkovitost popravka DNA izmjerena je nakon 30 minuta, 1, 3, 24 i 48 sati u oba tkiva (Slika 13). Nakon 30 minuta inkubacije zabilježena je najniža učinkovitost popravka u oba istražena tkiva. Nakon sat vremena inkubacije učinkovitost popravka DNA je porasla u uzorcima koji su sadržavali homogenate probavne žlijezde, dok je izmjerena učinkovitost popravka DNA u uzorcima s homogenatima škrga jednaka vrijednosti kao i nakon 30 minuta inkubacije. Viša razina učinkovitosti je izmjerena nakon 3 sata inkubacije u oba tkiva. Učinkovitost popravka DNA bila je znatno viša u uzorcima probavne žlijezde od škrga. Nakon 24 sata inkubacije učinkovitost popravka, izražena kao ΔF, je dodatno porasla i izmjereno je 130 RU u uzorcima homogenata probavne žlijezde te 50 RU u uzorcima homogenata škrga. Maksimalna učinkovitost popravka DNA izmjerena je nakon 48 sati inkubacije u oba tkiva. Za probavnu žlijezdu prosječna učinkovitost popravka iznosila je 174 RU, dok je za škrge iznosila 56 RU.




Slika 13. Ovisnost učinkovitosti popravka DNA probavne žlijezde (■) i škrga (□) dagnje o vremenu (0.5, 1, 3, 24 i 48 sati) reakcije popravka oštećenog (UV 100 J $m^{-2}$) supstrata DNA.

Na Slika 14 prikazana je dinamika popravka DNA u različitim intervalima. U prvom intervalu od 30 minuta popravak DNA u oba tkiva bio je jednak po učinkovitosti popravka DNA. U drugom intervalu od 30 minuta učinkovitost popravka DNA probavne žlijezde bila je jednaka učinkovitosti u prvom intervalu, dok je u škrgama bila znatno niža. U trećem intervalu učinkovitost popravka DNA probavne žlijezde je najviša dok je u škrgama učinkovitost popravka DNA niža nego u prvom intervalu. U četvrtom i petom intervalu učinkovitost popravka DNA probavne žlijezde i škrga bila je niska.

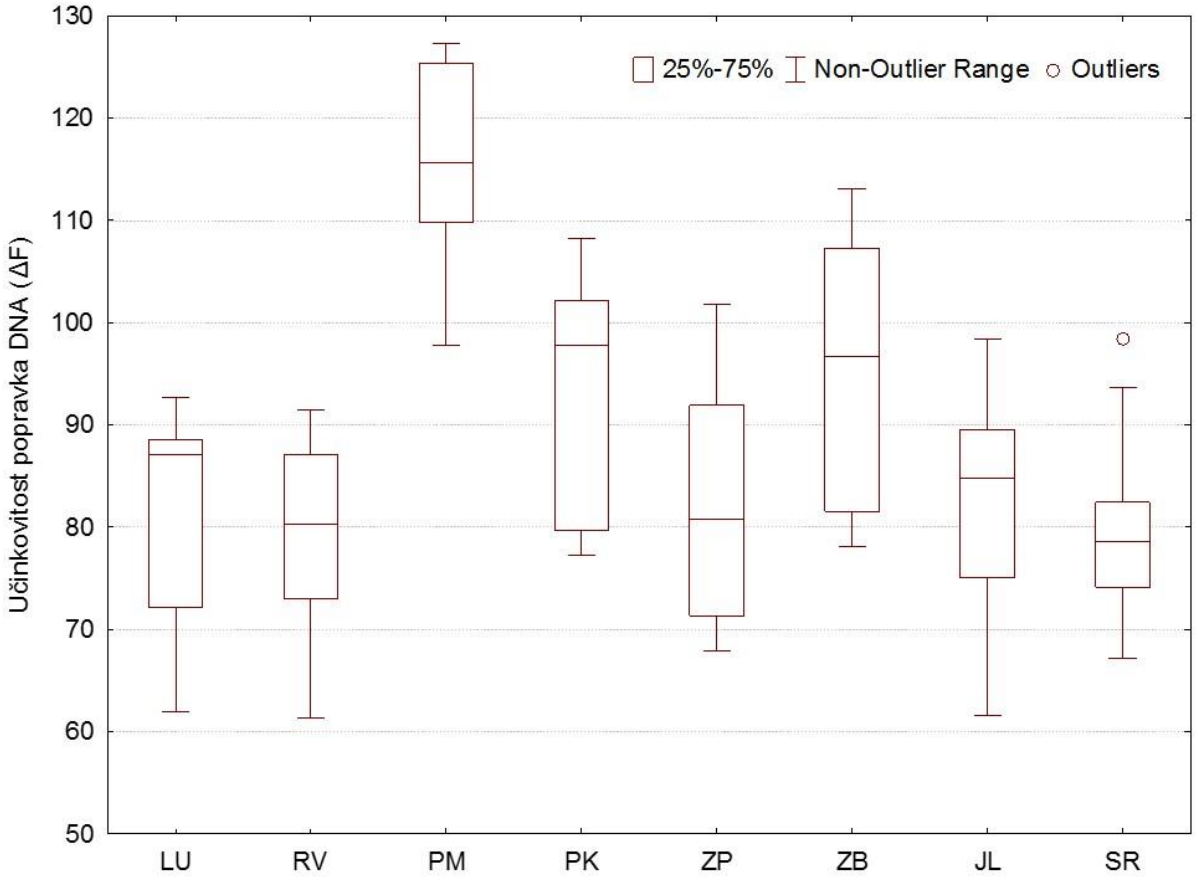



Slika 14. Dinamika tijekom popravka DNA probavne žlijezde (■) i škrga (□) dagnje u pojedinim vremenskim intervalima prikazanim na x osi reakcije popravka oštećenog (UV 100 J $m^{-2}$) DNA supstrata.

Za daljnje analize izabrano je da će se učinkovitost popravka DNA mjeriti nakon 3 sata inkubacije i da će se za oštećenje plazmidne DNA kao supstrata reakcije popravka DNA koristiti doza od 100 J $m^{-2}$.

## 4.2 Učinkovitost mehanizma popravka DNA prirodnih populacija dagnje *Mytilus galloprovincialis*

Prilagođenom 3D metodom izmjerena je učinkovitost popravka DNA probavne žlijezde dagnje *Mytilus galloprovincialis* s različitih lokacija u rovinjskom, pulskom, zadarskom i šibenskom priobalju koje su pod različitim antropogenim utjecajem (Slika 15).



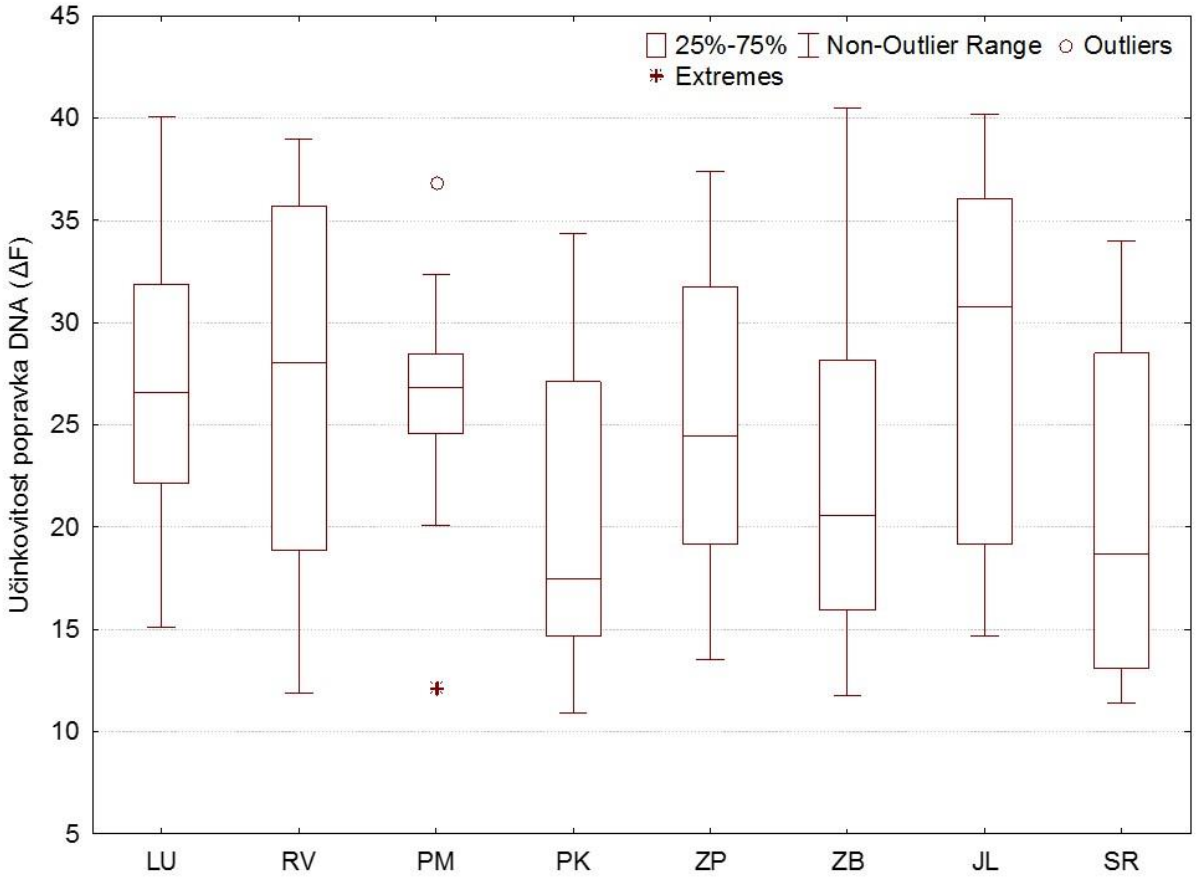

Slika 15. Učinkovitosti popravka DNA probavne žlijezde prirodnih populacija dagnje na istraženim postajama u rujnu 2014.; [−] Medijan; Outliers > 75%+1,5*(75%-25%).

U Tablica 4 prikazane su vrijednosti medijana i koeficijenata varijacije za pojedinu istraženu postaju te korelacija dviju vrijednosti za sjeverni i srednji Jadran. Učinkovitost popravka DNA izražena je kao ΔF. Medijan učinkovitosti popravka DNA na postaji LU iznosio je 87 RU. Za postaju RV medijan učinkovitosti popravka DNA iznosio je 80 RU. Najviša učinkovitost popravka DNA izmjerena je na postaji PM gdje njen medijan je bio 115 RU. Izmjerena učinkovitost popravka DNA na postaji PK iznosila je 97 RU dok je na postaji ZP iznosila 80 RU a na ZB 96,72 RU. Na postajama JL i SR izmjerena je učinkovitost popravka DNA od 84 RU odnosno 78 RU.

Tablica 4. Medijani i koeficijenti varijacije učinkovitosti popravka DNA probavne žlijezde prirodnih populacija dagnje na istraženim postajama te njihova korelacija.

| | POSTAJA | MEDIJAN | KOEFICIJENT VARIJACIJE | KORELACIJA KOEFICIJENTA VARIJACIJE I MEDIJANA |
|---|---|---|---|---|
| SJEVERNI JADRAN | LU | 87,07 | 12,53 | p > 0,05 |
| | RV | 80,36 | 12,92 | |
| | PM | 115,70 | 8,72 | |
| | PK | 97,83 | 13,10 | |
| SREDNJI JADRAN | ZP | 80,74 | 14,68 | p > 0,05 |
| | ZB | 96,72 | 13,83 | |
| | JL | 84,81 | 13,71 | |
| | SR | 78,64 | 12,44 | |

Osim u probavnoj žlijezdi dagnje izmjerena je učinkovitost popravka DNA i u škrgama istih jedinki na svim osam istraženih postaja (Slika 16). Na svim postajama izmjerena je niska učinkovitost popravka DNA škrga. Medijan učinkovitosti popravka DNA za LU postaju iznosi 26 RU, na postaji RV 28 RU, na PM postaji iznosi 26 RU dok na PK 17 RU. Na postaji ZP medijan izmjerene učinkovitosti popravka DNA iznosi 24 RU dok na ZB 20 RU. Najviši medijan izmjeren je na JL dok na SR je izmjereno 18 RU.



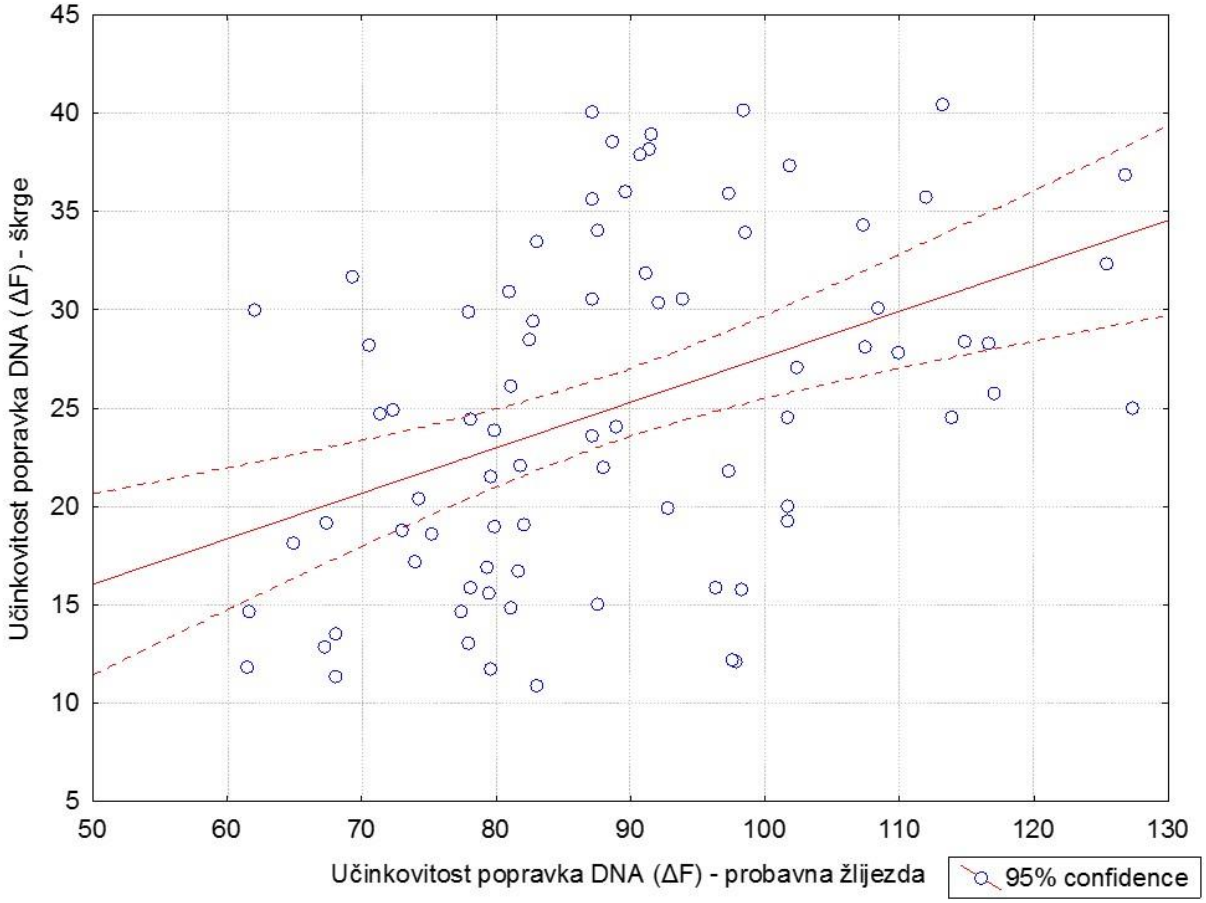

Slika 16. Učinkovitosti popravka DNA škrga prirodnih populacija dagnje na istraženim postajama u rujnu 2014. [−] Medijan; Outliers > 75%+1,5*(75%-25%); Extremes < 25%-2*1,5*(75%-25%).

U Tablica 5 prikazane su vrijednosti medijana i koeficijenata varijacije za pojedinu istraženu postaju. Nije pokazana korelacija između učinkovitosti popravka DNA postaja sjevernog odnosno srednjeg Jadrana gdje interindividualne razlike nisu vezane uz razinu popravka DNA.

Tablica 5. Medijani i koeficijenti varijacije izmjerene učinkovitosti popravka DNA škrga prirodnih populacija dagnje na istraženim postajama te njihova korelacija.

| | POSTAJA | MEDIJAN | KOEFICIJENT VARIJACIJE | KORELACIJA KOEFICIJENTA VARIJACIJE I MEDIJANA |
|---|---|---|---|---|
| SJEVERNI JADRAN | LU | 26,60 | 28,91 | p> 0,05 |
| | RV | 28,07 | 33,71 | |
| | PM | 26,84 | 25,64 | |
| | PK | 17,46 | 39,44 | |
| SREDNJI JADRAN | ZP | 24,44 | 31,42 | p> 0,05 |
| | ZB | 20,56 | 40,75 | |
| | JL | 30,80 | 30,13 | |
| | SR | 18,71 | 39,53 | |

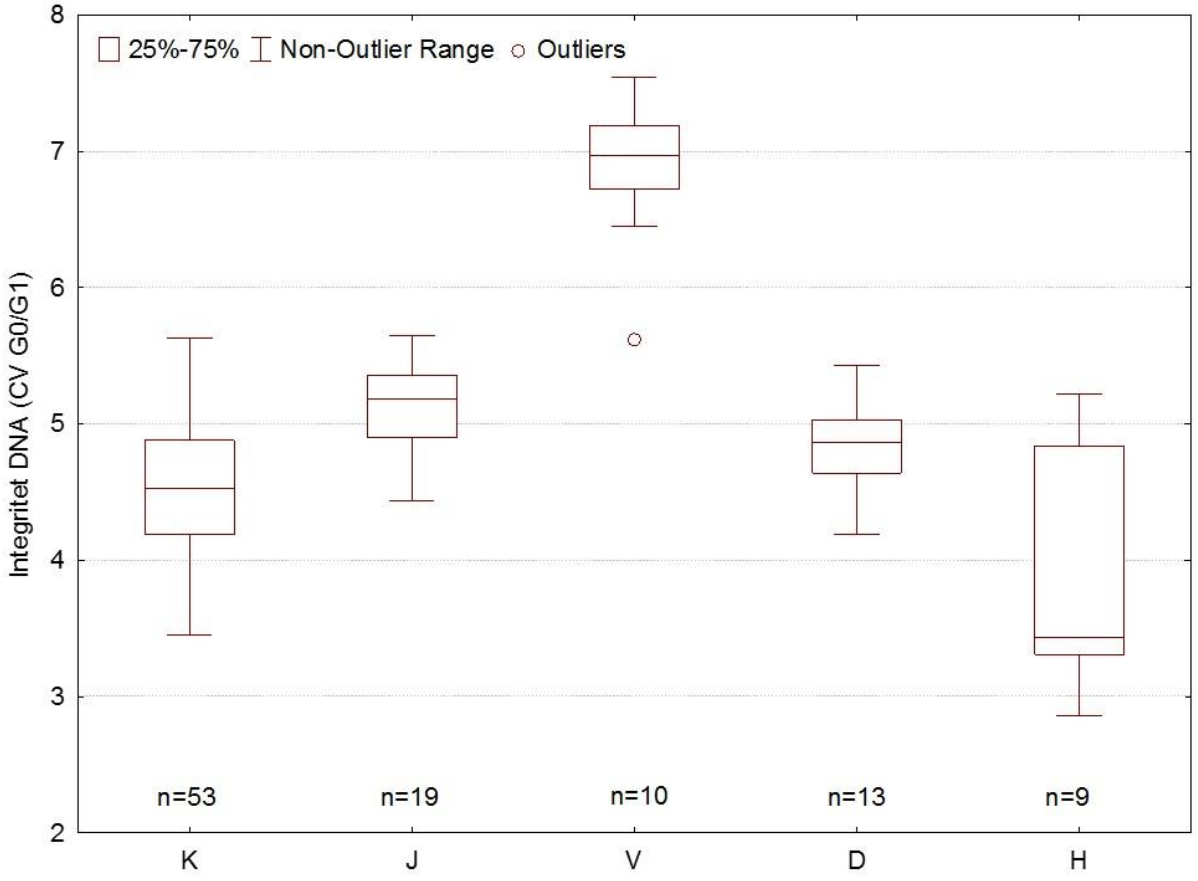
Korelacija između učinkovitosti popravka DNA probavne žlijezde i škrga (Slika 17) izračunata je Pearsonovom analizom korelacije te Spearmanovim koeficijentom korelacije koji iznosi 0,461 ($p < 0,05$). Takav koeficijent korelacije ukazuje na statistički značajnu korelaciju između učinkovitosti popravka DNA probavne žlijezde i škrga.




Slika 17. Korelacija između učinkovitosti popravka DNA probavne žlijezde i škrga dagnje *Mytilus galloprovincialis* s istraženih postaja; N = 80.
ΔF (škrge) = 4,4884 + 0,23125 * ΔF (probavna žlijezda); r = 0,42780 ($p < 0,05$).

## 4.3 Cjelovitost DNA u hemocitima dagnje *Mytilus galloprovincialis*

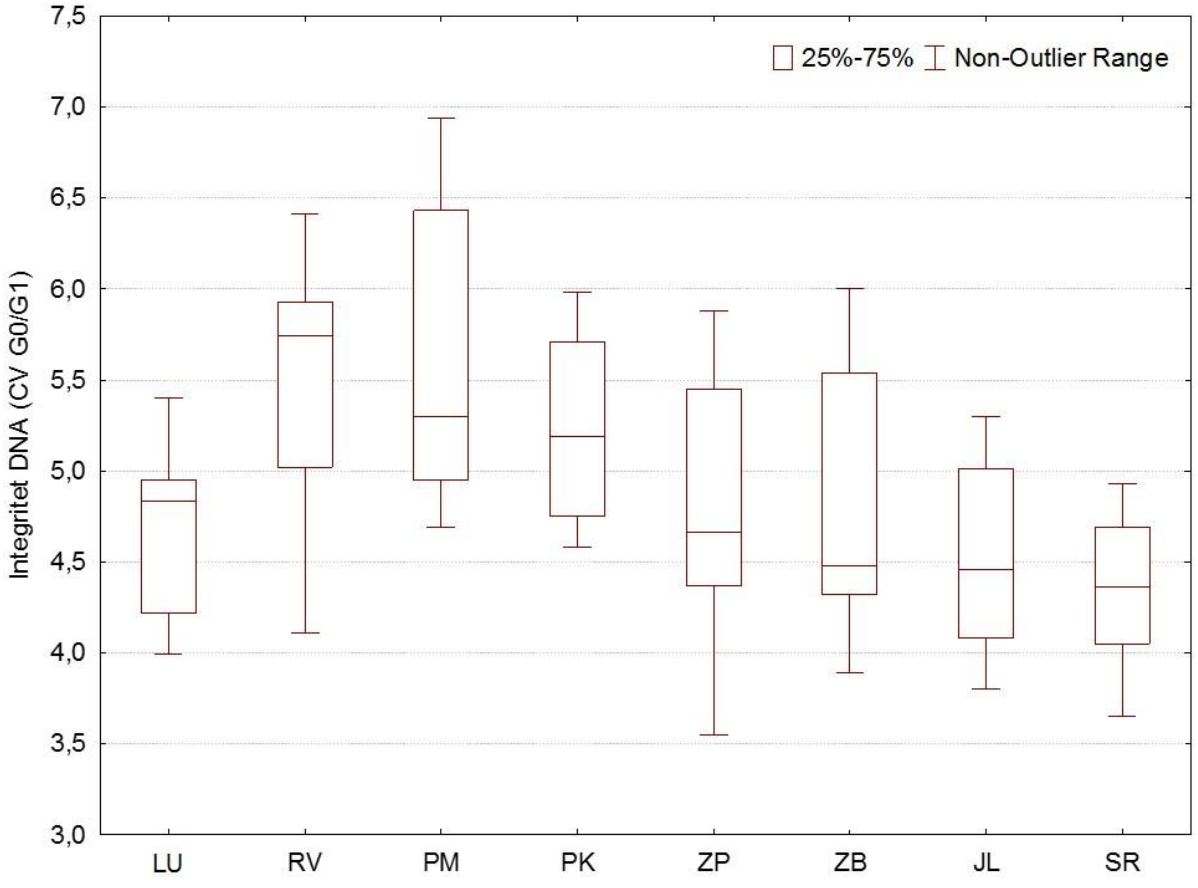
Za utvrđivanje integriteta DNA u hemocitima dagnje na različitim postajama korištena je protočna citometrija i analiziran je koeficijent varijacije (CV) količine DNA kao mjera integriteta genoma. Svi dostupni podaci koeficijenta varijacije za hemolimfu dagnje prijašnjih istraživanja Laboratorija za morsku ekotoksikologiju, Centra za istraživanje mora, Instituta Ruđer Bošković statistički su obrađeni. Statističkom obradom podataka na 53 jedinke dagnje iz uzgajališta u Limskom kanalu utvrđen je CV vrijednosti 4,56 ± 0,5 s intervalom pouzdanosti 4,43 – 4,68 (Slika 18).




Slika 18. Integritet DNA u hemocitima dagnje *Mytilus galloprovincialis* uzorkovanih na različitim postajama u razdoblju od 2004 - 2010. L – Limski kanal; J – 20 postaja na Jadranu, V – Vranjic, D – dagnje tretirane DMSO; H – dagnje tretirane herbicidom 2,4 – D; [−] Medijan; Outliers > 25%-1,5*(75%-25%)

Za hemolimfu dagnje (13 jedinki) s iste lokacije koja je tretirana DMSO utvrđena je CV vrijednost 4,85 s intervalom pouzdanosti 4,63 - 5,07. CV vrijednost za dagnje koje su bile izložene herbicidu (9 jedinki) iznosila je 3,94 s intervalom pouzdanosti 3,25 - 4,63. Za hemolimfu dagnje (19 jedinki) s 20 postaja u Jadranu utvrđena je CV vrijednost 5,11 s intervalom pouzdanosti 4,95 - 5,28. CV vrijednost za dagnje s postaje Vranjic (10 jedinki) koja je pod velikim pritiskom antropogenog zagađenja iznosila je 6,87 s intervalom pouzdanosti 6,48 – 7,25.

Analizom integriteta DNA protočnom citometrijom utvrđen je raspon integriteta DNA u hemocitima prirodnih populacija dagnje iz ovog istraživanja (Slika 19).




Slika 19. Integritet DNA u hemocitima prirodnih populacija dagnje na istraženim postajama u rujnu 2014.

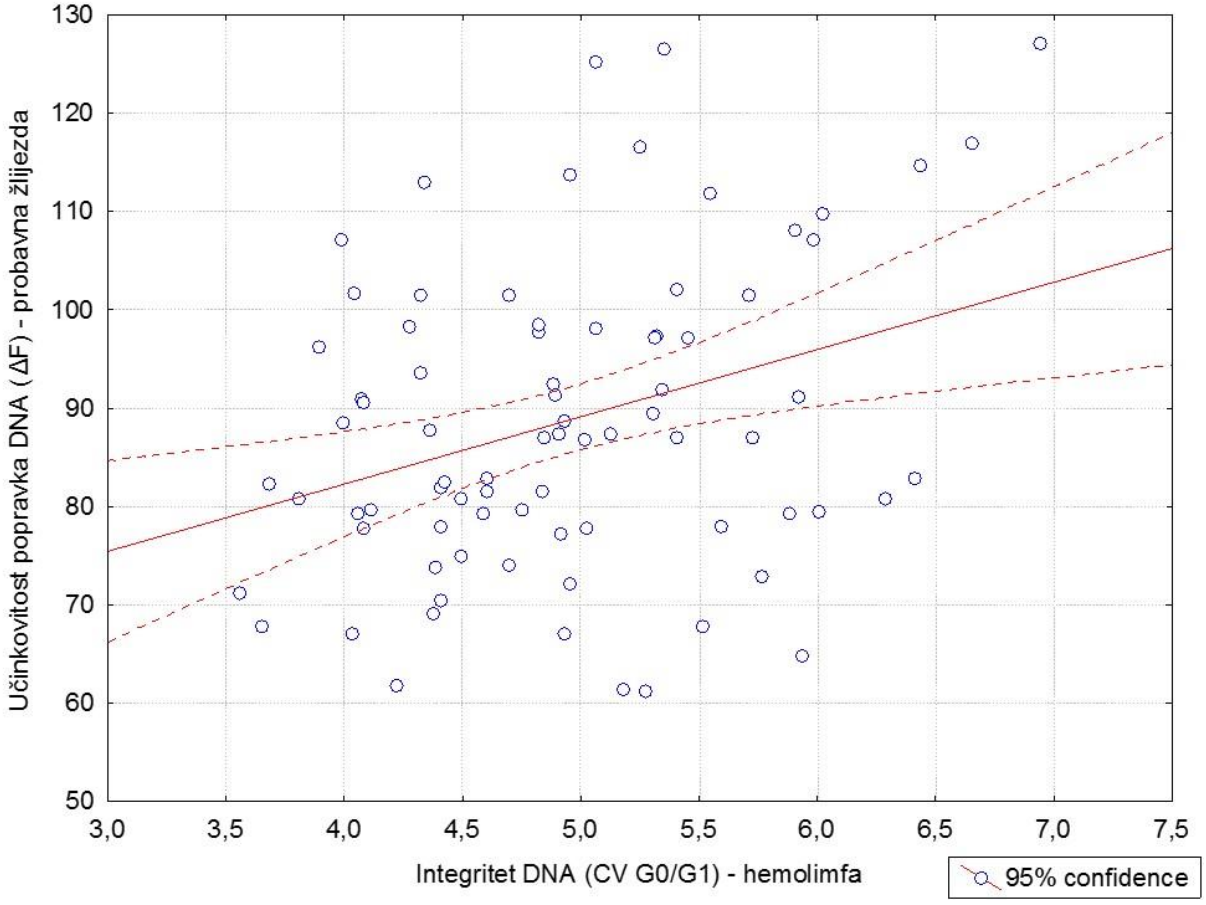
Integritet DNA u hemocitima na postaji PM bio je najniži. Na postajama RV i PK izmjeren je niži integritet DNA nego na referentnoj postaji LU. Ostale postaje su pokazale sličan integritet DNA (Tablica 6). Koeficijent varijacije za istražene postaje bio je u intervalu od 10,01 – 15,67. Nije pokazana statistički značajna korelacija između prirodnih populacija dagnje iz sjevernog Jadrana odnosno srednjeg Jadrana.

Tablica 6. Medijani i koeficijenti varijacije izmjerenog integriteta DNA hemocita prirodnih populacija dagnje na istraženim postajama te njihova korelacija.

| | POSTAJA | MEDIJAN | KOEFICIJENT VARIJACIJE | KORELACIJA KOEFICIJENTA VARIJACIJE I MEDIJANA |
|---|---|---|---|---|
| SJEVERNI JADRAN | LU | 4,83 | 10,12 | p > 0,05 |
| | RV | 5,74 | 12,77 | |
| | PM | 5,30 | 14,65 | |
| | PK | 5,19 | 10,01 | |
| SREDNJI JADRAN | ZP | 4,66 | 15,67 | p > 0,05 |
| | ZB | 4,48 | 15,64 | |
| | JL | 4,45 | 11,46 | |
| | SR | 4,36 | 10,32 | |

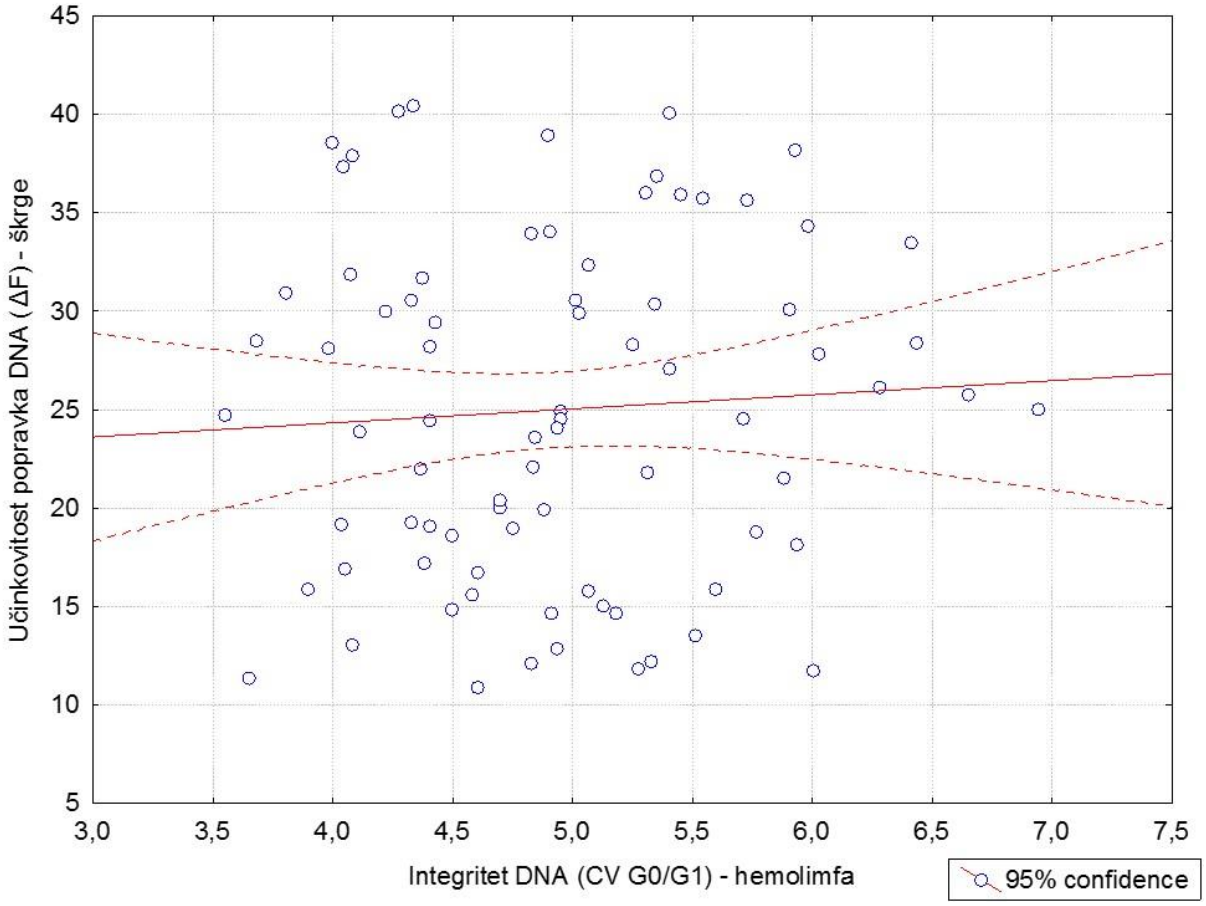
## 4.4 Odnos cjelovitosti i učinkovitosti popravka DNA za tkiva dagnje *Mytilus galloprovincialis*

Analizirana je korelacija između integriteta DNA i učinkovitosti popravka DNA u oba ispitana tkiva dagnje. Korelacija između integriteta DNA u hemocitima i učinkovitosti popravka DNA probavne žlijezde (Slika 20) izračunata je Pearsonovom analizom korelacije te Spearmanovim koeficijentom korelacije koji iznosi 0,249 ($p < 0,05$). Takav koeficijent korelacije ukazuje na statistički značajnu korelaciju između integriteta DNA u hemocitima i učinkovitosti popravka DNA probavne žlijezde.




Slika 20. Korelacija između integriteta DNA hemolimfe i učinkovitosti popravka DNA probavne žlijezde dagnje *Mytilus galloprovincialis* s istraženih postaja. N = 80.
ΔF = 54,917 + 6,8421 * CV; r= 0,32699 ($p < 0,05$)

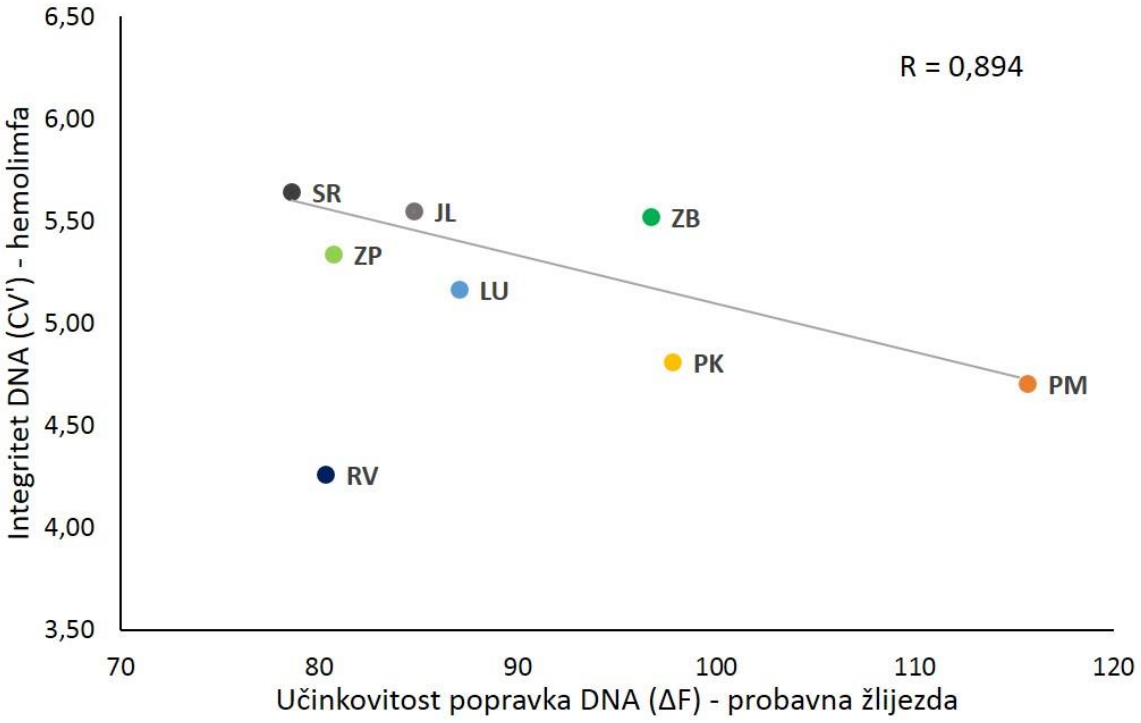
Usporedba i analiza korelacije između integriteta DNA hemocita i učinkovitosti popravka DNA škrga izračunata je Pearsonovim testom korelacije gdje nije pokazana statistički značajna ($p > 0,05$) korelacija između dva uspoređena parametra (Slika 21).




Slika 21. Korelacija između integriteta DNA hemolimfe i učinkovitosti popravka DNA škrga dagnje *Mytilus galloprovincialis* s istraženih postaja. N = 80.

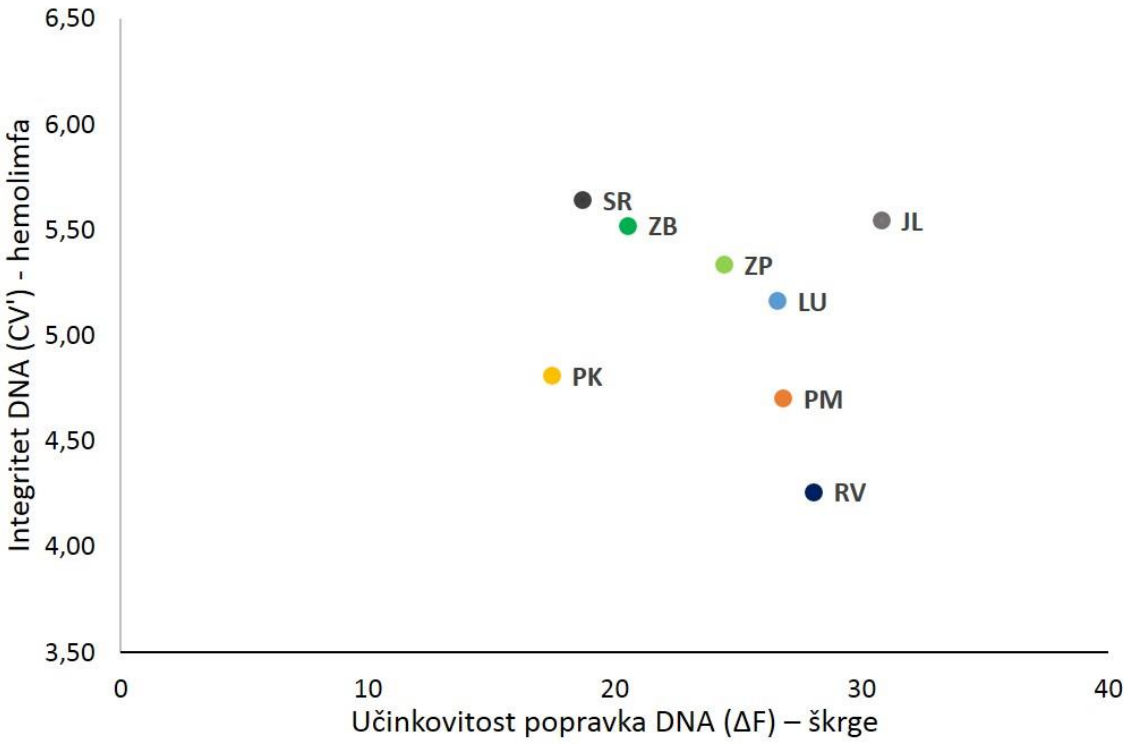
$\Delta F = 21,470 + 0,71444 * CV$; $r = 0,06316$ ($p > 0,05$)

Analizirana je ovisnost integriteta DNA hemocita i učinkovitosti popravka DNA probavne žlijezde za svaku pojedinačnu postaju (Slika 22). Iz grafičkog prikaza moguće je uočiti da postaja PM ima najučinkovitiji popravak DNA i najniži integritet DNA. Na postajama PK i ZB učinkovitost popravka DNA je slična, medijan ΔF iznosi 97,83 za PK postaju dok za ZB postaju je 96,72 ali se razlikuju u integritetu DNA, medijan CV' (CV' = - CV + 10) iznosi 4,81 za PK postaju, dok za ZB postaju on je 5,52. Postaje SR, JL, ZP i LU imaju medijan CV' oko 5,5, odnosno za SR iznosi 5,64, za JL 5,55, za ZP 5,34 i za LU 5,17. I učinkovitost popravka DNA im je u intervalu od 78 -87 za medijan ΔF ( SR = 78,64; JL = 84,81; ZP = 80,74 i LU = 87,07). Postaja RV se razlikuje od ostalih zbog niskog integriteta DNA te isto tako niske učinkovitosti popravka DNA, medijan CV' iznosi 4,26 dok medijan ΔF iznosi 80,36.




Slika 22. Ovisnost učinkovitosti popravka DNA probavne žlijezde i integriteta DNA hemolimfe dagnje na istraženim postajama; CV' = - CV (G0/G1)+10; R = 0,894 (bez RV).

Analizirana je i ovisnost integriteta DNA hemolimfe i učinkovitost popravka DNA škrga za svaku pojedinačnu postaju (Slika 23). Iz grafičkog prikaza moguće je uočiti da postaja JL ima najvišu učinkovitost popravka DNA i najviši integritet DNA (ΔF = 30,8). Na ostalim postajama nema značajne razlike između učinkovitosti popravka DNA škrga i integriteta DNA hemolimfe dagnje.




Slika 23. Ovisnost učinkovitosti popravka DNA škrga i integriteta DNA hemolimfe dagnje *Mytilus galloprovincialis* na istraženim postajama; CV' = - CV (G0/G1)+10

# 5. RASPRAVA

# 5 RASPRAVA

Rastući problem zagađenja morskog ekosustava toksičnim i genotoksičnim tvarima doveo je do razvitka velikog broja *in vitro* metoda određivanja toksičnog i genotoksičnog rizika. Radi procjene zdravstvenog stanja morskog ekosustava potrebna je procjena ekotoskikološkog rizika zagađivala za morske organizme i razvitak novih metoda koje će upotpuniti sliku stanja morskog ekosustava. Međutim većinom takve metode određuju toksičnost i genotoksičnost određenog zagađivala. Mjerenje učinka genotoksičnih tvari koje utječu na integritet DNA morskih organizama, u zadnjih nekoliko godina sve je češći element u procjeni stanja morskog ekosustava. Iako je integritet DNA morskih organizama u uskoj vezi s popravkom DNA, na žalost, procjena učinkovitosti popravka DNA još uvijek nije postala dio baterije biomarkera za procjenu stanja morskog ekosustava. Jedan od mogućih razloga tome nedostatak je jednostavne, ekonomične i brze metode mjerenja učinkovitosti popravka DNA u morskim organizmima. Potreba za jednostavnom metodom mjerenja učinkovitosti popravka DNA rezultirala je optimizacijom i prilagodbom 3D metode (Salles i sur., 1995) za tkiva dagnje *Mytilus galloprovincialis,* kao često korištenog bioindikatora u sustavnom praćenju kvalitete morskog ekosustava.

3D metoda koristi oštećeni plazmid kao supstrat za reakciju popravka DNA. Kako bi se uopće mjerila učinkovitost popravka DNA bilo je potrebno prvo provjeriti oštećenja supstrata nakon UV zračenja elektroforezom u agaru. Analizom je ustanovljeno da se kod komercijalnog plazmida pojavljuju oštećenja sva tri oblika plazmidne DNA (Hintermann i sur., 1981). Nakon UV zračenja plazmida različitim dozama od 10, 50, 100, 200, 300 i 600 J $m^{-2}$ rezultati nakon elektroforeze pokazuju da je plazmid nakon zračenja od 10, 50 i 100 J $m^{-2}$ zadržao sva tri oblika kao i kontrolni plazmid dok plazmid nakon ozračivanja s 200, 300 i 600 J $m^{-2}$ nije imao sva tri oblika nakon elektroforeze nego je bio slabo vidljiv oblik superzavojnice pokazujući da je razina oštećenja plazmida fragmentirala veliki broj molekula plazmida. Nakon inkubacije oštećenih plazmida s $T_4$ endonukleazom V nakon doza UV-a 10, 50 i 100 J $m^{-2}$ prevladava linearni oblik kao

rezultat cijepanja $T_4$ endonukleaza V na mjestima CPD – a (Yasuda i Sekiguchi, 1970, Ruven i sur., 1993) što ukazuje na razinu oštećenja koja će biti odgovarajuća za plazmid da bi bio supstrat za popravak DNA.

Daljnjim testiranjem različitih uvjeta pokazalo se da homogenizacijski pufer A, koji kao bitnu komponentu sadrži deterdžent, naspram pufera koji ne sadrži deterdžent, bolje homogenizira tkiva dagnje na način što su ti homogenati pokazali veću aktivnost popravka DNA. Deterdžent u homogenizacijskom puferu dodatno pročišćava uzorak od staničnih dijelova omogućavajući tako veću koncentraciju proteina u uzorku te s time veću enzimatsku aktivnost tijekom popravka DNA. Što se tiče vezivanja supstrata na krutu podlogu, testiranje volumena premaza od 50 µl i 100 µl pokazalo je različite rezultate. Viša aktivnost popravka kod volumena od 50 µl premaza nego kod reakcija s premazom od 100 µl pokazuje da je volumen od 100 µl prevelik za tu količinu supstrata, koja se u takvom slučaju veže na veću površinu i teže je dostupna za reakciju popravka DNA (Pfeifer, 1996, Ivanova i sur., 2002). Učinkovitost vezanja anti – DIG antitijela za obilježene nukleotide i smanjeno nespecifično vezanje antitijela postiglo se koncentracijom od 1 : 10 000 u Anti – DIG puferu. Dodavanjem deterdženta, odnosno BSA ili NaOH, u pufer za antitijela nije se smanjilo nespecifično vezanje antitijela na obilježene nukleotide. (Chevalier i sur., 1997, Rowan i sur., 2005). Provjera učinka ispiranja jažica s PBS puferom sa ili bez deterdženta, kako bi se smanjio zaostatak nevezanih DIG – dUTP i anti – DIG antitijela te smanjila detekcija neugrađenih obilježenih nukleotida, pokazala je da PBS pufer s deterdžentom uklanja zaostale komponente reakcije i tako omogućava stabilan signal fluorescencije. Rezultati ispitivanja vremena inkubacije s AttoPhos® supstratom mogu biti u intervalu od 30 – 60 minuta jer su pokazali da vrijeme inkubacije ne utječe na signal fluorescencije što je u skladu s literaturom (Cano i sur., 1992).

Za valjanost metode važne su pozitivne i negativne kontrole. Sve negativne kontrole, koje ne sadrže glavne komponente reakcije, pokazale su nisku fluorescenciju tako da je za daljnje pokuse izabrana negativna kontrola, koja u reakciji ne sadrži homogenat tkiva

dagnje. Kao pozitivna kontrola korišten je komercijalni ekstrakt humanih enzima mehanizma popravka DNA koji se inače koriste za popravak različitih oštećenja DNA uključujući CPD – ove (Cadet i sur., 2005, Pfeifer i sur., 2005). Reakcije popravka s ekstraktom humanim enzima popravka DNA u komercijalnom puferu i RS reakcijskom puferu dobiveni su visoki signali reakcije popravka DNA. Premda je najviši signal dobiven s komercijalnim puferom ukazujući na optimalne uvjete za djelovanje humanih enzima popravka DNA, radi pojednostavljenja protokola metode za daljnja istraživanja odabran je RS reakcijski pufer, koji je također dao visok signal.

Iako su enzimi popravka DNA lokalizirani u jezgrenoj frakciji proteina (Cool i Sirover, 1989, Shackelford i sur., 1999) utvrđena razlika između učinkovitosti popravka DNA frakcije ukupnih proteina i jezregnih te citoplazmatskih frakcija proteina. Rezultati ukazuju da količina enzima u jezgrenoj frakciji nakon postupka frakcioniranja nije dovoljna da bi se detektirala reakcija popravka DNA. Vrijednosti fluorescencije dobivene nakon reakcije popravka DNA kod jezgrenih i citoplazmatskih frakcija probavne žlijezde i škrga dagnje, bile su izuzetno niske tj. na razini fluorescencije negativne kontrole. Dobivene fluorescencije za frakcije ukupnih proteina iz oba tkiva bile su značajno više od negativne kontrole ukazujući na dovoljnu količinu enzima popravka DNA u ekstraktima za uklanjanje oštećenja DNA. Viša učinkovitost popravka DNA ekstrakta ukupnih proteina naspram jezgrenih frakcija proteina vjerojatno je posljedica gubitka enzima popravka DNA u koracima frakcioniranja (Paine i sur., 1983).

Ispitani optimalni uvjeti reakcije popravka DNA, obzirom na stupanj oštećenja plazmida, su pokazali da oštećenje plazmida izazvano UV dozama od 10 i 50 J $m^{-2}$ pokazuje nisku ugradnju nukleotida. Niska ugradnja nukleotida može biti posljedica niske količine oštećenja, koja nije dovoljna da bi se utvrdio aktivirani kapacitet mehanizma popravka DNA. Takvi slučajevi su česti i kod drugih organizama, gdje se također pokazalo da niske doze oštećenja ne aktiviraju maksimalno mehanizam popravka DNA (Fafanđel i sur., 2002). Kod plazmida oštećenog s UV dozom od 100 J $m^{-2}$ ugradnja nukleotida bila je znatno viša od negativne kontrole. Takav rezultat ukazuje

da je nastalo oštećenje DNA dovoljno da bi se povećala aktivnost popravka DNA. Kod oštećenja izazvanih dozom od 300 J $m^{-2}$ aktivnost popravka DNA bila je jako niska što je u skladu s prije opisanim rezultatima, gdje se dokazalo da je plazmidna DNA fragmentirana pri UV dozama od 300 J $m^{-2}$ onemogućavajući popravak oštećenja DNA (Jiang i sur., 2007).

Uočeno povećanje količine popravljene DNA s vremenom inkubacije za oba ispitana tkiva je u skladu s dosadašnjim istraživanjima učinkovitosti popravka DNA kod dagnje (Emmanouil i sur., 2007). Obzirom na dinamiku popravka DNA izabrano je vrijeme inkubacije za daljnje analize i to 3 sata, koje je pokazalo najveću brzinu popravka u vremenskom intervalu, koje bi zadovoljilo dovoljno osjetljivu diskriminaciju između populacija dagnje. Kratko vrijeme analize je nužan uvjet kako bi ova metoda bila pogodna za istraživanja praćenja stanja morskog ekosustava gdje je potrebno imati brzu i učinkovitu metodu s kojom se može ispitati veliki broj uzoraka.

Validacija metode provedena je za dagnje s osam lokacija iz sjevernog i srednjeg Jadrana za probavnu žlijezdu i škrge. Organi su izabrani na temelju njihove uloge. Probavna žlijezda je krajnji organ detoksikacije u beskralježnjacima (Livingstone, 1991) zbog njene višestruke funkcije od stanične i vanstanične pretvorbe metabolita (toksičnih ili ne toksičnih), pinocitoze, skladištenja metabolita i/ili njihovih derivata u stanicama i njihovog prijenosa u druge organe od mišića, plašta, gonada itd. Dosadašnja istraživanja doprinijela su današnjem razumijevanju glavnog sustava detoksikacije (Livingstone i Farrar, 1984, Fitzpatrick i sur., 1995, Sheehan i sur., 1995, Wootton i sur., 1995), dok su škrge glavni dio filtrirajućeg sustava pomoću kojeg se dagnja hrani i dišnog sustava dagnje i predstavlja prvu zaštitnu barijeru za genotoksične agense (Stegeman i Lech, 1991). Nakon analize dobivenih podataka rezultati su pokazali da se učinkovitost popravka DNA probavne žlijezde različitih prirodnih populacija dagnje razlikuje. Najviša učinkovitost popravka DNA uočena je u dagnje s postaje PM, što najvjerojatnije ukazuje da je aktivnost popravka DNA na toj lokaciji posljedično povišena zbog povećane razine oštećenja DNA. Pulska luka je pod velikim antropogenim pritiskom

(Perić i sur., 2012a, Štambuk i sur., 2013), a visoka koncentracija genotoksičnih tvari u okolišu dagnje uzrokuje povećanu razinu oštećenja DNA koja je inducirala mehanizam popravka DNA. U prijašnjim istraživanjima u populacijama dagnje s tog područja (Bihari i sur., 2005) detektirana su poznata primarna oštećenja DNA: alkalno – labilna mjesta, jednolančani lomovi, unakrsno povezivanje DNA i proteina te unakrsno povezivanje lanaca DNA (Batel i sur., 1993).

Povećanu aktivnost popravka DNA u odnosu na kontrolnu postaju LU su pokazale populacije dagnje s postaja PK i ZB. Postaja PK već je prije opisana kao potencijalno zagađena na osnovu kemijskih analiza metala u sedimentu i dagnji (Lipanović Landeka, 2010). Poznato je da teški metali toksično djeluju na organizme (Denton i sur., 1999, Perić i sur., 2012a) što povećava i količinu oštećenja DNA (Pan i sur., 2011, Almamoori i sur., 2014). Povećanjem količine oštećenja DNA povećava se i aktivnost popravka DNA (Bihari i sur., 1990b) i objašnjava povećani kapacitet popravka DNA. Između populacija dagnje s postaja LU, RV, ZP, JL i SR nema razlike u učinkovitosti popravka oštećenog supstrata. Postaja LU uzeta je kao referentna postaja jer je antropogena aktivnost u tom području smanjena pošto je to zaštićeno područje. Prijašnja istraživanja pokazala su da su oštećenja DNA u populaciji dagnje iz uzgajališta u Limskom kanalu vrlo niska i smatraju se posljedicom normalnih staničnih procesa (Vukmirović i sur., 1994, Bihari i sur., 2005, Jakšić i sur., 2005). Iz tih činjenica pretpostavka je da u okolišu analiziranih populacija dagnje nema prisutnosti genotoksičnih tvari, koje izravno oštećuju DNA, te je učinkovitost popravka DNA svedena na osnovnu metaboličku razinu. Rezultati potvrđuju da su zagađenja u većini slučajeva točkastog oblika te ne zahvaćaju veće geografsko područje (Jakšić i sur., 2005) jer nije pokazana korelacija između postaja na sjevernom Jadranu, odnosno postaja na srednjem Jadranu.

Analizom učinkovitosti popravka DNA škrga dagnje izmjerene su vrlo niske vrijednosti koje mogu biti posljedica niske aktivnosti popravka DNA u tom tkivu i, uspoređujući s probavnom žlijezdom, ukazuje da je razina popravka tkivno specifična. Poznato je da postoji različiti genotoksični odgovor u specifičnim stanicama i tkivima kao posljedica

interakcije između oštećenja DNA i učinkovitosti popravka DNA (Atanassov i sur., 2003). Škrge su organ koji izravno filtrira morsku vodu te sve toksične tvari prolaze kroz to tkivo, međutim u tom tkivu ne dolazi do metaboličke pretvorbe tih istih tvari (Stegeman i Lech, 1991, Akcha i sur., 2000a, Mičić i sur., 2001). Jedna od mogućnosti dobivenih niskih vrijednosti učinkovitosti popravka DNA škrga dagnje je i samo ograničenje metode. Koncentracija proteina u homogenatima škrga bila je vrlo niska, a u prijašnjim istraživanjima niska koncentracija proteina u homogenatima dovodila je do inhibicije reakcije popravka DNA (Salles i Provot, 1999).

Hemolimfa čini najveći udio mekog tkiva dagnje i najbrojnije stanice u tom tkivu su hemociti, koji kruže u otvorenom vaskularnom sustavu dagnje i neprekidno su izloženi zagađivalima u vodenom stupcu (Soares-da-Silva i sur., 2002). Hemolimfu je lako sakupiti bez da se ubije organizam i pruža suspenziju stanica koje se mogu odmah koristi za analizu protočnom citometrijom. DNA integritet u hemocitima može biti pokazatelj genotoksičnog utjecaja zagađenja na morski organizam (Bihari i sur., 2003). Odrediti utjecaj antropogenog pritiska na morske organizme ključna je komponenta ekotoksikoloških istraživanja gdje se prati sposobnost genotoksičnih tvari da oštete DNA molekulu.

Iz prijašnjih istraživanja utvrđeno je da je integritet DNA nizak na postaji pod visokim antropogenim pritiskom (Bihari i sur., 2003) i povećan je genotoksični utjecaj zagađivala na DNA (Klobučar i sur., 2008). U ovom radu utvrđeni integritet DNA hemolimfe populacija dagnje pokazao je da najniži integritet DNA imaju dagnje s lokacije PM što je u skladu s prijašnjim istraživanjima, gdje je ustanovljeno da je ta lokacija pod visokim antropogenim pritiskom te da je količina oštećenja viša nego na ostalim lokacijama uzduž Jadranske obale (Jakšić i sur., 2005). RV i PK pokazuju niži integritet DNA od populacije dagnje s kontrolne postaje, što može biti posljedica povećanog genotoksičnog oštećenja DNA (Vukmirović i sur., 1994) ili povećane metaboličke aktivnosti uslijed unutrašnjih ili vanjskih faktora (Thomas i sur., 2006). Visoki integritet DNA na ZP, ZB, JL i SR postajama ukazuje da su količine primarnih

oštećenja vrlo niske te da je cjelovitost DNA u skladu s prirodnim metaboličkim procesima unutar stanica (Burcham, 1999). Ustanovljena korelacija između cjelovitosti DNA u hemocitima i popravka DNA probavne žlijezde dagnje ukazuje da se povećanjem genotoksičnog pritiska povećava i aktivnost popravka DNA (Bihari i sur., 1990b). Usporedbom cjelovitosti DNA u hemocitima i popravka DNA škrga nema statistički značajne korelacije između dva parametra ujedno zbog vrlo niske učinkovitosti popravka DNA u tom tkivu, koja može biti posljedica specifičnosti tkiva (Atanassov i sur., 2003) ili utjecaja genotoksičnih tvari na samo tkivo (Mičić i sur., 2001). Uz fiziološke značajke moguće je da prilagođena 3D metoda mjerenja učinkovitosti popravka DNA škrga nije dovoljno osjetljiva da diskrimininira polpulacije izložene različitim genotoksičnim pritiscima.

Prilikom usporedbe učinkovitosti popravka DNA probavne žlijezde i integriteta DNA u hemocitima dagnje za svaku pojedinu istraženu postaju uočeno je da postaja PM ima najveću učinkovitost popravka DNA i najniži integritet DNA. Postaja PM nalazi se pod stalnim pritiskom antropogenih aktivnosti, pretežito industrijskog i urbanog otpada. Uzorkovane dagnje se nalaze u Pulskom zaljevu i to u blizini brodogradilišta „Uljanik“ i marine. Niski integritet DNA i visoka učinkovitost popravka DNA ukazuje da su jedinke neprestano pod pritiskom koji smanjuje integritet DNA te se time povećava učinkovitost popravka DNA. Povećana količina oštećenja DNA može biti posljedica genotoksičnih tvari koje se metaboliziraju u probavnoj žlijezdi te oštećuju DNA (Livingstone i Farrar, 1984). Na postajama ZB i PK integritet i popravak DNA se razlikuju od kontrolne postaje LU tako da im je viša učinkovitost popravka DNA dok je za postaju ZB integritet DNA sličan kontrolnoj postaji LU, a PK ima niži integritet DNA od kontrolne postaje. U slučaju ZB visoki integritet DNA može biti posljedica adaptacije populacije na utjecaj genotoksičnih tvari (Bickham i sur., 2000), dok je kod populacije s PK lokacije niži integritet DNA i povišena aktivnost popravka mogu biti posljedica oštećenja DNA te aktivacije mehanizma popravka (Bihari i sur., 1990b). Kod postaje RV je uočeno da je integritet DNA nizak, a da je učinkovitost popravka DNA isto tako niska. Ovakav slučaj ukazuje na sniženi integritet DNA bez utjecaja popravka DNA i to

najvjerojatnije zbog metaboličkih procesa koji smanjuju integritet DNA a ne zahtijevaju pokretanje mehanizma popravka DNA (Thomas i sur., 2006). Integritet DNA može biti smanjen zbog povećane replikacije ili transkripcije DNA, koji ne aktiviraju mehanizam popravka DNA. Takvi rezultati upućuju da je oštećenje DNA u dagnjama s RV postaje vrlo nisko. Populacije s postaje LU, ZP, JL i LU pokazuju istu količinu integriteta DNA i istu učinkovitost popravka DNA. Takav odnos između ova dva parametra može se definirati kao osnovno stanje oštećenja DNA i popravka DNA (Burcham, 1999).

Ovim istraživanjem se pokazalo da se uz primjenu mjerenja integriteta DNA dagnje i mjerenja učinkovitosti popravka DNA može procijeniti genotoksični rizik određenog područja koji je pod antropogenim pritiskom. Prilagodbom 3D metode za tkiva dagnje otvara se mogućnost korištenja učinkovitosti popravka DNA kao novog biomarkera u ekotoksikološkim studijama. Prednost ove metode je njena ekonomičnost jer ne koristi skupe kemikalije te ju je moguće koristiti u opsežnim istraživanjima praćenja morskog ekosustava. Ovu metodu uz to odlikuje i jednostavnost, jer osim što nije potrebna posebna laboratorijska oprema i obuka, cijela analiza se odvija u tri koraka što je isto tako čini vrlo brzom metodom jer je u nekoliko sati moguće dobiti rezultate. Velika prednost joj je i mogućnost analiziranja velikog broja uzoraka u samo jednom pokusu što je dodatno svrstava u pogodne metode za sustavno praćenje stanja morskog ekosustava. Osim osnovnih prednosti ove metode postoje veliki potencijali upotrebe ove metode u istraživanju popravka DNA morskih beskralježnjaka te njene upotrebe u ekotoskikološkim studijama (Salles i sur., 1999). Na taj način u potpunosti je ostvaren cilj ovoga rada, a to je razvoj i prilagodba brze i jednostavne metode određivanja učinkovitosti popravka DNA dagnje te njena primjena na prirodne populacije dagnje. Osjetljivost metode daje mogućnost diskriminacije i rangiranje populacija iz područja pod različitim pritiskom genotoksičnih tvari.

# 6. ZAKLJUČAK

# 6 ZAKLJUČAK

1. Optimizacijom uvjeta za fluorimetrijsku detekciju ugradnje obilježenih nukleotida za vrijeme popravka DNA utvrđen je protokol za mjerenje učinkovitosti popravka DNA u tkivima probavne žlijezde i škrga dagnje *Mytilus galloprovincialis* 3D metodom.

2. Učinkovitost popravka DNA u dagnji je tkivno specifična i u probavnoj žlijezdi je viša nego u škrgama.

3. Utvrđena je korelacija učinkovitosti popravka DNA između probavne žlijezde i škrga što ukazuje na usklađeni odgovor ovih organa na genotoksični pritisak.

4. Integritet DNA u hemocitima dagnje *Mytilus galloprovincialis* kao pokazatelj genotoksičnog pritiska okoliša korelira s učinkovitošću popravka DNA probavne žlijezde dagnje.

5. Učinkovitost popravka DNA probavne žlijezde dagnje razlikuje se za populacije dagnje koje nastanjuju u područjima s različitim antropogenim pritiskom.

6. 3D metoda omogućuje sustavno praćenje genotoksičnog rizika u prirodnim populacijama dagnje.

# 7. LITERATURA

# 7 LITERATURA

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. International Journal of Biochemistry. 23:227-229.

Adams, S., Shepard, K., Greeley, M., Jimenez, B., Ryon, M., Shugart, L., McCarthy, J., Hinton, D. (1989) The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress on fish. Marine Environmental Research. 28:459-464.

Ahmed, M.K., Habibullah-Al-Mamun, M., Hossain, M.A., Arif, M., Parvin, E., Akter, M.S., Khan, M.S., Islam, M.M. (2011) Assessing the genotoxic potentials of arsenic in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) using alkaline comet assay and micronucleus test. Chemosphere. 84:143-149.

Akcha, F., Burgeot, T., Budzinski, H., Pfohl-Leszkowicz, A., Narbonne, J.F. (2000a) Induction and elimination of bulky benzo[a]pyrene-related DNA adducts and 8-oxodGuo in mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed in vivo to B[a]P-contaminated feed. Marine Ecology Progress Series. 205:195-206.

Akcha, F., Izuel, C., Venier, P., Budzinski, H., Burgeot, T., Narbonne, J.F. (2000b) Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in benzo[a]pyrene-contaminated mussels, *Mytilus galloprovincialis*. Aquatic Toxicology. 49:269-287.

Akcha, F., Ruiz, S., Zampieron, C., Venier, P., Burgeot, T., Cadet, J., Narbonne, J. (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-deoxyguanosine formation. Biomarkers. 5:355-367.

AlAmri, O.D., Cundy, A.B., Di, Y., Jha, A.N., Rotchell, J.M. (2012) Ionizing radiation-induced DNA damage response identified in marine mussels, *Mytilus* sp. Environmental Pollution. 168:107-112.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002) Molecular biology of the cell. Garland Science, New York,

Almamoori, A.M., Salman, J.M., Randall Hughes, A. (2014) The effect of acute exposure of Zn and Pb on some Biochemical markers in Fresh Water Snail (*Viviparus bengalensis*). Mesopotamia Environmental Journal. 1:47-55.

Atanassov, B., Velkova, A., Mladenov, E., Anachkova, B., Russev, G. (2004) Comparison of the global genomic and transcription-coupled repair rates of different lesions in human cells. Zeitschrift fur Naturforschung C-Journal of Biosciences. 59:445-453.

Atanassov, B.S., Ninova, P.D., Anachkova, B.B., Russev, G.C. (2003) Relationship between DNA repair capacity and resistance to genotoxins in four human cell lines. Cancer Detection and Prevention. 27:24-29.

Banni, M., Negri, A., Dagnino, A., Jebali, J., Ameur, S., Boussetta, H. (2010) Acute effects of benzo[a]pyrene on digestive gland enzymatic biomarkers and DNA damage on mussel *Mytilus galloprovincialis*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 73:842-848.

Barret, J.M., Salles, B., Provot, C., Hill, B.T. (1997) Evaluation of DNA repair inhibition by antitumor or antibiotic drugs using a chemiluminescence microplate assay. Carcinogenesis. 18:2441-2445.

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. Analitical Biochemistry. 212:402-406.

Batel, R., Jakšić, Z., Bihari, N., Hamer, B., Fafanđel, M., Chauvin, C., Schröder, H.C., Müller, W.E.G., Zahn, R.K. (1999) A microplate assay for DNA damage determination (fast micromethod) in cell suspensions and solid tissues. Analytical Biochemistry. 270:195-200.

Bedard, L.L., Massey, T.E. (2006) Aflatoxin B 1-induced DNA damage and its repair. Cancer Letters. 241:174-183.

Bickham, J.W., Sandhu, S., Hebert, P.D., Chikhi, L., Athwal, R. (2000) Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. Mutation Research/Reviews in Mutation Research. 463:33-51.

Bihari, N., Batel, R., Zahn, R. (1990a) The use of alkaline elution procedure to measure DNA damage in crab haemolymph treated with benzo[a]pyrene. U: Grandjean, E., ed Carcinogenic, mutagenic, and taratogenic marine pollutants: impact on human health and the environment. vol. 5. Portfolio Publishing Company, The Woodlands, Texas, p. 121-128.

Bihari, N., Batel, R., Zahn, R.K. (1990b) DNA damage determination by the alkaline elution technique in the haemolymph of mussel *Mytilus galloprovincialis* treated with benzo[a]pyrene and 4-nitroquinoline-N-oxide. Aquatic Toxicology. 18:13-22.

Bihari, N., Batel, R., Zahn, R.K. (1992) Fractionation of DNA from marine invertebrate (*Maja crispata, Mytilus galloprovincialis*) haemolymph by alkaline elution. Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology. 102:419-424.

Bihari, N., Batel, R., Zahn, R.K. (1999) Flow cytometry in marine environmental research. Periodicum Biologorum. 101:151-155.

Bihari, N., Fafanđel, M., Piškur, V. (2007) Polycyclic aromatic hydrocarbons and ecotoxicological characterization of seawater, sediment, and mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Gulf of Rijeka, the Adriatic Sea, Croatia. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 52:379-387.

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

Bihari, N., Fafanđel, M., Jakšić, Ž., Pleše, B., Batel, R. (2005) Spatial distribution of DNA integrity in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, from the Adriatic Sea, Croatia. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 75:845-850.

Bihari, N., Hamer, B., Jaksić, Z., Fafanđel, M., Mičić, M., Batel, R. (2002) Application of alkaline elution, Fast Micromethod and flow cytometry in detection of marine contamination. Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France). 48:373-377.

Bolognesi, C., Hayashi, M. (2011) Micronucleus assay in aquatic animals. Mutagenesis. 26:205-213.

Bolognesi, C., Cirillo, S. (2014) Genotoxicity biomarkers in aquatic bioindicators. Zoology. 60:273-284.

Bolognesi, C., Rabboni, R., Roggieri, P. (1996) Genotoxicity biomarkers in *M. galloprovincialis* as indicators of marine pollutants. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology. 113:319-323.

Bolognesi, C., Parrini, M., Roggieri, P., Ercolini, C., Pellegrino, C. (1992) Carcinogenic and mutagenic pollutants: impact on marine organisms. MAP Technical Reports Series (UNEP).

Bolognesi, C., Landini, E., Roggieri, P., Fabbri, R., Viarengo, A. (1999) Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in mussels: experimental studies. Environmental and Molecular Mutagenesis. 33:287-292.

Bothner, M., Takada, H., Knight, I., Hill, R., Butman, B., Farrington, J., Colwell, R., Grassle, J. (1994) Sewage contamination in sediments beneath a deep-ocean dump site off New York. Marine Environmental Research. 38:43-59.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analitical Biochemistry. 72:248-254.

Brunetti, R., Majone, F., Gola, I., Beltrame, C. (1988) Micronucleus Test: Examples of Application to Marine Ecology. Marine Ecology Progress Series MESEDT. 44:

Burcham, P.C. (1999) Internal hazards: baseline DNA damage by endogenous products of normal metabolism. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 443:11-36.

Cadet, J., Sage, E., Douki, T. (2005) Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 571:3-17.

Caldecott, K.W. (2008) Single-strand break repair and genetic disease. Nature Reviews Genetics. 9:619-631.

Calderon-Montano, J.M., Burgos-Moron, E., Orta, M.L., Lopez-Lazaro, M. (2014) Effect of DNA Repair Deficiencies on the Cytotoxicity of Drugs Used in Cancer Therapy-A Review. Current Medicinal Chemistry. 21:3419-3454.

Cano, R.J., Torres, M., Klem, R., Palomares, J. (1992) DNA hybridization assay using ATTOPHOS, a fluorescent substrate for alkaline phosphatase. BioTechniques. 12:264-269.

Capuzzo, J. (1996) The bioaccumulation and biological effects of lipophilic organic contaminants. The Eastern Oyster Crassostrea virginica. MD Sea Grant Publication. 539-557.

Chevalier, J., Yi, J., Michel, O., Tang, X.-M. (1997) Biotin and digoxigenin as labels for light and electron microscopy in situ hybridization probes: where do we stand? Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 45:481-491.

Clancy, S. (2008) DNA damage & repair: mechanisms for maintaining DNA integrity. Nature Education. 1:103.

Claxton, L.D., Houk, V.S., Hughes, T.J. (1998) Genotoxicity of industrial wastes and effluents. Mutation Research/Reviews in Mutation Research. 410:237-243.

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

Connon, R.E., Geist, J., Werner, I. (2012) Effect-Based Tools for Monitoring and Predicting the Ecotoxicological Effects of Chemicals in the Aquatic Environment. Sensors (Basel, Switzerland). 12:12741-12771.

Cool, B.L., Sirover, M.A. (1989) Immunocytochemical localization of the base excision repair enzyme uracil DNA glycosylase in quiescent and proliferating normal human cells. Cancer Research. 49:3029-3036.

Cossa, D., Bourget, E., Piuze, J. (1979) Sexual maturation as a source of variation in the relationship between cadmium concentration and body weight of *Mytilus edulis* L. Marine Pollution Bulletin. 10:174-176.

Crane, M., Babut, M. (2007) Environmental quality standards for water framework directive priority substances: challenges and opportunities. Integrated Environmental Assessment and Managment. 3:290-296.

Dagnino, A., Allen, J., Moore, M., Broeg, K., Canesi, L., Viarengo, A. (2007) Development of an expert system for the integration of biomarker responses in mussels into an animal health index. Biomarkers. 12:155-172.

Daskalakis, K.D., O'Connor, T.P. (1995) Distribution of chemical concentrations in US coastal and estuarine sediment. Marine Environmental Research. 40:381-398.

Davies, I.M., Pirie, J.M. (1980) Evaluation of a “mussel watch” project for heavy metals in Scottish coastal waters. Marine Biology. 57:87-93.

Davis, W.J. (1993) Contamination of coastal versus open ocean surface waters: a brief meta-analysis. Marine Pollution Bulletin. 26:128-134.

De Bont, R., Van Larebeke, N. (2004) Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. Mutagenesis. 19:169-185.

De Lafontaine, Y., Gagne, F., Blaise, C., Costan, G., Gagnon, P., Chan, H.M. (2000) Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). Aquatic Toxicology. 50:51-71.

Debenest, T., Gagne, F., Burgeot, T., Blaise, C., Pellerin, J. (2013) DNA integrity assessment in hemocytes of soft-shell clams (*Mya arenaria*) in the Saguenay Fjord (Quebec, Canada). Environmental Science and Pollution Research International. 20:621-629.

Denton, G.R.W., Concepcion, L.P., Wood, R.H., Eflin, V.S., Pangelinan, G.T. (1999) Heavy Metals, PCBs and PAHs in Marine Organisms from Four Harbor Locations on Guam: a Pilot Study. Water and Environmental Research Institute of the Western Pacific, University of Guam. Report no. 87.

Downs, J.A., Nussenzweig, M.C., Nussenzweig, A. (2007) Chromatin dynamics and the preservation of genetic information. Nature. 447:951-958.

Dronkert, M.L., Kanaar, R. (2001) Repair of DNA interstrand cross-links. Mutation Research/DNA Repair. 486:217-247.

Eastman, A., Barry, M.A. (1992) The Origins of DNA Breaks: A Consequence of DNA Damage, DNA Repair, or Apoptosis? New Drugs. Cancer Investigation. 10:229-240.

Emmanouil, C., Sheehan, T.M.T., Chipman, J.K. (2007) Macromolecule oxidation and DNA repair in mussel (*Mytilus edulis* L.) gill following exposure to Cd and Cr(VI). Aquatic Toxicology. 82:27-35.

Espina, N.G., Weis, P. (1995) DNA Repair in fish from polluted estuaries. Marine Environmental Research. 39:309-312.

European-Commission. (2002) Guidance Document on Aquatic Ecotoxicology in the context of the Directive 91/414/EEC.

Fafanđel, M. (1997) Učinak ultraljubičastog zračenja na DNA planktonske vrste *Isochrysis galbana* Parke u monokulturi. University of Zagreb, Zagreb.

Fafanđel, M., Bihari, N., Müller, W.E.G., Batel, R. (2002) Accumulation and removal of cyclobutane pyrimidine dimers in *Isochrysis galbana* cells exposed to artificial UV and solar irradiation. Periodicum Biologorum. 104:451-456.

Fafanđel, M., Bihari, N., Smodlaka, M., Ravlić, S. (2008) Hemocytes/coelomocytes DNA content in five marine invertebrates: Cell cycles and genome sizes. Biologia (Lahore, Pakistan). 63:730-736.

Fafanđel, M., Bihari, N., Krajcar, V., Müller, W.E.G., Zahn, R.K., Batel, R. (2001) Specific detection of cyclobutane pyrimidine dimers in phytoplankton DNA by a non-radioactive assay based on T4-endonuclease V digestion. Science of the Total Environment. 277:149-159.

Feuerhahn, S., Egly, J.-M. (2008) Tools to study DNA repair: what's in the box? Trends in Genetics. 24:467-474.

Fitzpatrick, P.J., Sheehan, D., Livingstone, D.R. (1995) Studies on isoenzymes of glutathione S-transferase in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* with exposure to pollution. Marine Environmental Research. 39:241-244.

Forbes, V.E., Palmqvist, A., Bach, L. (2006) The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. Environmental Toxicology and Chemistry. 25:272-280.

Fousteri, M., Mullenders, L.H. (2008) Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. Cell Research. 18:73-84.

Frenzilli, G., Nigro, M., Lyons, B.P. (2009) The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. Mutation Research/Reviews in Mutation Research. 681:80-92.

Frenzilli, G., Nigro, M., Scarcelli, V., Gorbi, S., Regoli, F. (2001) DNA integrity and total oxyradical scavenging capacity in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*: a field study in a highly eutrophicated coastal lagoon. Aquatic Toxicology. 53:19-32.

Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W., Wood, R.D. (2005) DNA repair and mutagenesis. American Society for Microbiology Press,

Friedberg, E.C., Aguilera, A., Gellert, M., Hanawalt, P.C., Hays, J.B., Lehmann, A.R., Lindahl, T., Lowndes, N., Sarasin, A., Wood, R.D. (2006) DNA repair: From molecular mechanism to human disease. DNA Repair. 5:986-996.

Gagne, F., Burgeot, T., Hellou, J., St-Jean, S., Farcy, E., Blaise, C. (2008) Spatial variations in biomarkers of *Mytilus edulis* mussels at four polluted regions spanning the Northern Hemisphere. Environmental Research. 107:201-217.

Galletly, B.C., Blows, M.W., Marshall, D.J. (2007) Genetic mechanisms of pollution resistance in a marine invertebrate. Ecological Applications. 17:2290-2297.

Goldberg, E. (1986) The Mussel Watch concept. Environmental Monitoring and Assessment. 7:91-103.

Harvey, R.G. (1982) Polycyclic hydrocarbons and cancer. American Scientist. 70:386-393.

Hintermann, G., Fischer, H.M., Crameri, R., Hütter, R. (1981) Simple procedure for distinguishing CCC, OC, and L forms of plasmid DNA by agarose gel electrophoresis. Plasmid. 5:371-373.

Howarth, R.W., Sharpley, A., Walker, D. (2002) Sources of nutrient pollution to coastal waters in the United States: Implications for achieving coastal water quality goals. Estuaries. 25:656-676.

Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle Jr, P., Bergman, H.L. (1992) Biomarkers: biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. Lewis Publishers Boca Raton, FL,

Ivanova, E.P., Pham, D.K., Demyashev, G.M., Nicolau, D.V. (2002) Oligonucleotide/poly (l-lysine) complexes attachment on poly (styrene/maleic acid) and poly (styrene/maleic anhydride) polymeric surfaces. Pages 23-33. SPIE's International Symposium on Smart Materials, Nano-, and Micro-Smart Systems: International Society for Optics and Photonics.

Jakšić, Ž., Batel, R. (2003) DNA integrity determination in marine invertebrates by Fast Micromethod®. Aquatic Toxicology. 65:361-376.

Jakšić, Ž., Batel, R., Bihari, N., Mičić, M., Zahn, R.K. (2005) Adriatic coast as a microcosm for global genotoxic marine contamination - A long-term field study. Marine Pollution Bulletin. 50:1314-1327.

Jha, A.N. (2004) Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 552:1-17.

Jiang, Y., Ke, C., Mieczkowski, P.A., Marszalek, P.E. (2007) Detecting ultraviolet damage in single DNA molecules by atomic force microscopy. Biophysical Journal. 93:1758-1767.

Jung, D., Cho, Y., Collins, L.B., Swenberg, J.A., Di Giulio, R.T. (2009) Effects of benzo[a]pyrene on mitochondrial and nuclear DNA damage in Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*) from a creosote-contaminated and reference site. Aquatic Toxicology. 95:44-51.

Kanduč, T., Medaković, D., Hamer, B. (2011) *Mytilus galloprovincialis* as a bioindicator of environmental conditions: the case of the eastern coast of the Adriatic Sea. Isotopes in Environmental and Health Studies. 47:42-61.

Kidd, K.A., Blanchfield, P.J., Mills, K.H., Palace, V.P., Evans, R.E., Lazorchak, J.M., Flick, R.W. (2007) Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. Proceedings of the national academy of sciences. 104:8897-8901.

Kienzler, A., Bony, S., Devaux, A. (2013a) DNA repair activity in fish and interest in ecotoxicology: A review. Aquatic Toxicology. 134–135:47-56.

Kienzler, A., Tronchère, X., Devaux, A., Bony, S. (2013b) UV-induced Nucleotide Excision Repair (NER) and Photoreactivation Repair (PER) in two trout fish cell lines used in ecotoxicological assessment studies. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 125:51-55.

Klobučar, G.I., Štambuk, A., Hylland, K., Pavlica, M. (2008) Detection of DNA damage in haemocytes of *Mytilus galloprovincialis* in the coastal ecosystems of Kaštela and Trogir bays, Croatia. Science of the Total Environment. 405:330-337.

Kumaravel, T.S., Vilhar, B., Faux, S., Jha, A. (2009) Comet Assay measurements: a perspective. Cell Biology and Toxicology. 25:53-64.

Le Pennec, G., Le Pennec, M. (2001) Evaluation of the toxicity of chemical compounds using digestive acini of the bivalve mollusc *Pecten maximus* L. maintained alive in vitro. Aquatic Toxicology. 53:1-7.

Lee, R.F., Steinert, S. (2003) Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. Mutation Research. 544:43-64.

Lees-Miller, S.P., Meek, K. (2003) Repair of DNA double strand breaks by non-homologous end joining. Biochimie. 85:1161-1173.

Li, G.-M. (2008) Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. Cell Research. 18:85-98.

Lieber, M.R., Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K. (2004) The mechanism of vertebrate nonhomologous DNA end joining and its role in V(D)J recombination. DNA Repair. 3:817-826.

Lipanović Landeka, H. (2010) Opterećenost pulskog zaljeva metalima i njihov učinak na dagnju *Mytilus galloprovincialis*. University of Zagreb. 79.

Liu, H., Rudolf, J., Johnson, K.A., McMahon, S.A., Oke, M., Carter, L., McRobbie, A.-M., Brown, S.E., Naismith, J.H., White, M.F. (2008) Structure of the DNA repair helicase XPD. Cell. 133:801-812.

Livingstone, D., Kirchin, M., Wiseman, A. (1989) Cytochrome P-450 and oxidative metabolism in molluscs. Xenobiotica. 19:1041-1062.

Livingstone, D.R. (1991) Organic Xenobiotic Metabolism in Marine Invertebrates. Advances in Comparative and Environmental Physiology. vol. 7. Springer Berlin Heidelberg, p. 45-185.

Livingstone, D.R. (1993) Biotechnology and pollution monitoring: Use of molecular biomarkers in the aquatic environment. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 57:195-211.

Livingstone, D.R., Farrar, S.V. (1984) Tissue and subcellular distribution of enzyme activities of mixed-function oxygenase and benzo[a]pyrene metabolism in the common mussel *Mytilus edulis* L. Science of the Total Environment. 39:209-235.

Livneh, Z. (2001) DNA damage control by novel DNA polymerases: translesion replication and mutagenesis. Journal of Biological Chemistry. 276:25639-25642.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry. 193:265-275.

Luedeking, A., Koehler, A. (2004) Regulation of expression of multixenobiotic resistance (MXR) genes by environmental factors in the blue mussel *Mytilus edulis*. Aquatic Toxicology. 69:1-10.

McCulloch, S.D., Kunkel, T.A. (2008) The fidelity of DNA synthesis by eukaryotic replicative and translesion synthesis polymerases. Cell Research. 18:148-161.

Michel, C., Bourgeault, A., Gourlay-Francé, C., Palais, F., Geffard, A., Vincent-Hubert, F. (2013) Seasonal and PAH impact on DNA strand-break levels in gills of transplanted zebra mussels. Ecotoxicology and Environmental Safety. 92:18-26.

Mičić, M., Bihari, N., Labura, Ž., Müller, W.E.G., Batel, R. (2001) Induction of apoptosis in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis* by tri-n-butyltin chloride. Aquatic Toxicology. 55:61-73.

Mičić, M., Bihari, N., Jakšić, Ž., Müller, W.E.G., Batel, R. (2002) DNA damage and apoptosis in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Marine Environmental Research. 53:243-262.

Moore, M., Livingstone, D., Widdows, J. (1989) Hydrocarbons in marine mollusks: biological effects and ecological consequences. U: Varanasi, U., ed Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment. CRC Press, Inc., Boca Raton Florida, p. 291-328.

Moore, M.N. (1985) Cellular responses to pollutants. Marine Pollution Bulletin. 16:134-139.

Nacci, D., Nelson, S., Nelson, W., Jackim, E. (1992) Application of the DNA alkaline unwinding assay to detect DNA strand breaks in marine bivalves. Marine Environmental Research. 33:83-100.

Nagel, Z.D., Chaim, I.A., Samson, L.D. (2014) Inter-individual variation in DNA repair capacity: a need for multi-pathway functional assays to promote translational DNA repair research. DNA Repair (Amst). 19:199-213.

Nelson, A., Donkin, P. (1985) Processes of bioaccumulation: The importance of chemical speciation. Marine Pollution Bulletin. 16:164-169.

Niedernhofer, L.J., Lalai, A.S., Hoeijmakers, J.H. (2005) Fanconi anemia (cross) linked to DNA repair. Cell. 123:1191-1198.

Nigro, M., Falleni, A., Del Barga, I., Scarcelli, V., Lucchesi, P., Regoli, F., Frenzilli, G. (2006) Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: transplanted versus native mussels. Aquatic Toxicology. 77:339-347.

Ostling, O., Johanson, K.J. (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. Biochemical and Biophysical Research Communications. 123:291-298.

Paine, P.L., Austerberry, C.F., Desjarlais, L.J., Horowitz, S.B. (1983) Protein loss during nuclear isolation. The Journal of cell biology. 97:1240-1242.

Pampanin, D.M., Marangon, I., Volpato, E., Campesan, G., Nasci, C. (2005) Stress biomarkers and alkali-labile phosphate level in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) collected in the urban area of Venice (Venice Lagoon, Italy). Environmental Pollution. 136:103-107.

Pan, L., Liu, N., Zhang, H., Wang, J., Miao, J. (2011) Effects of heavy metal ions (Cu2+, Pb2+ and Cd2+) on DNA damage of the gills, hemocytes and hepatopancreas of marine crab, *Charybdis japonica*. Journal of Ocean University of China. 10:177-184.

Parry, J.M., Parry, E.M., Kadhim, M., Somers, A., Pour, M. (1985) The metabolism and genotoxicity of chemicals in marine organisms. Marine Environmental Research. 17:313-316.

Perić, L., Smodlaka Tanković, M., Ravlić, S. (2012a) Evaluation of marine water quality along North-Eastern Adriatic coast based on lysosomal membrane stability in mussels *Mytilus galloprovincialis* Lam. - A long term study. Acta Adriatica. 53:457-466.

Perić, L., Fafanđel, M., Glad, M., Bihari, N. (2012b) Heavy metals concentration and metallothionein content in resident and caged mussels *Mytilus galloprovincialis* from Rijeka Bay, Croatia. Fresenius Environmental Bulletin. 21:2785-2794.

Pfeifer, G.P. (1996) Technologies for detection of DNA damage and mutations. Springer Science & Business Media,

Pfeifer, G.P., You, Y.-H., Besaratinia, A. (2005) Mutations induced by ultraviolet light. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 571:19-31.

Phillips, D.J.H. (1976a) The common mussel *Mytilus edulis* as an indicator of pollution by zinc, cadmium, lead and copper. I. Effects of environmental variables on uptake of metals. Marine Biology. 38:59-69.

Phillips, D.J.H. (1976b) The common mussel *Mytilus edulis* as an indicator of pollution by zinc, cadmium, lead and copper. II. Relationship of metals in the mussel to those discharged by industry. Marine Biology. 38:71-80.

Pisanelli, B., Benedetti, M., Fattorini, D., Regoli, F. (2009) Seasonal and inter-annual variability of DNA integrity in mussels *Mytilus galloprovincialis:* a possible role for natural fluctuations of trace metal concentrations and oxidative biomarkers. Chemosphere. 77:1551-1557.

Plosky, B., Samson, L., Engelward, B.P., Gold, B., Schlaen, B., Millas, T., Magnotti, M., Schor, J., Scicchitano, D.A. (2002) Base excision repair and nucleotide excision repair contribute to the removal of N-methylpurines from active genes. DNA Repair. 1:683-696.

Pruski, A.M., Dixon, D.R. (2002) Effects of cadmium on nuclear integrity and DNA repair efficiency in the gill cells of *Mytilus edulis* L. Aquatic Toxicology. 57:127-137.

Regoli, F. (1998) Trace metals and antioxidant enzymes in gills and digestive gland of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 34:48-63.

Regoli, F., Frenzilli, G., Bocchetti, R., Annarumma, F., Scarcelli, V., Fattorini, D., Nigro, M. (2004) Time-course variations of oxyradical metabolism, DNA integrity and lysosomal

stability in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment. Aquatic Toxicology. 68:167-178.

Roesijadi, G., Robinson, W. (1994) Metal regulation in aquatic animals: mechanisms of uptake, accumulation and release. Aquatic Toxicology. 102:125-133.

Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., Bonner, W.M. (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. Journal of Biological Chemistry. 273:5858-5868.

Rothkamm, K., Krüger, I., Thompson, L.H., Löbrich, M. (2003) Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. Molecular and Cellular Biology. 23:5706-5715.

Rowan, A.K., Davenport, R.J., Snape, J.R., Fearnside, D., Barer, M.R., Curtis, T.P., Head, I.M. (2005) Development of a rapid assay for determining the relative abundance of bacteria. Applied and Environmental Microbiology. 71:8481-8490.

Ruven, H.J., Berg, R.J., Seelen, C.M.J., Dekkers, J.A., Lohman, P.H., Mullenders, L.H., van Zeeland, A.A. (1993) Ultraviolet-induced cyclobutane pyrimidine dimers are selectively removed from transcriptionally active genes in the epidermis of the hairless mouse. Cancer Research. 53:1642-1645.

Salles, B., Provot, C. (1999) In Vitro Chemiluminescence Assay to Measure Excision Repair in Cell Extracts. vol. 113. p. 393-401.

Salles, B., Rodrigo, G., Li, R.Y., Calsou, P. (1999) DNA damage excision repair in microplate wells with chemiluminescence detection: Development and perspectives. Biochimie. 81:53-58.

Salles, B., Provot, C., Calsou, P., Hennebelle, I., Gosset, I., Fournie, G.J. (1995) A chemiluminescent microplate assay to detect DNA damage induced by genotoxic treatments. Analytical Biochemistry. 232:37-42.

Scarpato, R., Migliore, L., Barale, R. (1990a) The micronucleus assay in *Anodonta cygnea* for the detection of drinking water mutagenicity. Mutation Research Letters. 245:231-237.

Scarpato, R., Migliore, L., Alfinito-Cognetti, G., Barale, R. (1990b) Induction of micronuclei in gill tissue of *Mytilus galloprovincialis* exposed to polluted marine waters. Marine Pollution Bulletin. 21:74-80.

Shackelford, D.A., Tobaru, T., Zhang, S., Zivin, J.A. (1999) Changes in expression of the DNA repair protein complex DNA-dependent protein kinase after ischemia and reperfusion. The Journal of neuroscience. 19:4727-4738.

Sheehan, D., McIntosh, J., Power, A., Fitzpatrick, P. (1995) Drug metabolizing enzymes of mussels as bioindicators of chemical pollution. Biochemical Society Transactions. 23:419-422.

Shuck, S.C., Short, E.A., Turchi, J.J. (2008) Eukaryotic nucleotide excision repair: from understanding mechanisms to influencing biology. Cell Res. 18:64-72.

Shugart, L.R. (2000) DNA damage as a biomarker of exposure. Ecotoxicology. 9:329-340.

Shugart, L.R., McCarthy, J.F., Halbrook, R.S. (1992) Biological markers of environmental and ecological contamination: an overview. Risk Analysis. 12:353-360.

Simkiss, K., Taylor, M., Mason, A. (1982) Metal detoxification and bioaccumulation in molluscs. Marine Biology Letters.

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Experimental Cell Research. 175:184-191.

Sinha, R.P., Häder, D.-P. (2002) UV-induced DNA damage and repair: a review. Photochemical & Photobiological Sciences. 1:225-236.

Soares-da-Silva, I.M., Ribeiro, J., Valongo, C., Pinto, R., Vilanova, M., Bleher, R., Machado, J. (2002) Cytometric, morphologic and enzymatic characterisation of

haemocytes in *Anodonta cygnea*. Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology. 132:541-553.

Sonoda, E., Hochegger, H., Saberi, A., Taniguchi, Y., Takeda, S. (2006) Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair. DNA Repair. 5:1021-1029.

Soulas-Sprauel, P., Rivera-Munoz, P., Malivert, L., Le Guyader, G., Abramowski, V., Revy, P., de Villartay, J. (2007) V (D) J and immunoglobulin class switch recombinations: a paradigm to study the regulation of DNA end-joining. Oncogene. 26:7780-7791.

Speit, G., Hartmann, A. (2006) The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. Methods in Molecular Biology. 314:275-286.

Stegeman, J.J., Lech, J.J. (1991) Cytochrome P-450 monooxygenase systems in aquatic species: carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure. Environmental Health Perspectives. 90:101-109.

Steinert, S.A., Streib-Montee, R., Leather, J.M., Chadwick, D.B. (1998) DNA damage in mussels at sites in San Diego Bay. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 399:65-85.

Svanfeldt, K., Lundqvist, L., Rabinowitz, C., Sköld, H.N., Rinkevich, B. (2014) Repair of UV-induced DNA damage in shallow water colonial marine species. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 452:40-46.

Štambuk, A., Pavlica, M., Malović, L., Klobučar, G. (2008) Persistence of DNA damage in the freshwater mussel *Unio pictorum* upon exposure to ethyl methanesulphonate and hydrogen peroxide. Environmental and Molecular Mutagenesis. 49:217-225.

Štambuk, A., Šrut, M., Šatović, Z., Tkalec, M., Klobučar, G.I.V. (2013) Gene flow vs. pollution pressure: Genetic diversity of *Mytilus galloprovincialis* in eastern Adriatic. Aquatic Toxicology. 136–137:22-31.

Telford, W.G., King, L.E., Fraker, P.J. (1992) Comparative evaluation of several DNA binding dyes in the detection of apoptosis-associated chromatin degradation by flow cytometry. Cytometry. 13:137-143.

Thomas, J.A., Welch, J.J., Woolfit, M., Bromham, L. (2006) There is no universal molecular clock for invertebrates, but rate variation does not scale with body size. Proceedings of the national academy of sciences. 103:7366-7371.

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F. (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environmental and Molecular Mutagenesis. 35:206-221.

Valdiglesias, V., Pasaro, E., Mendez, J., Laffon, B. (2011) Assays to determine DNA repair ability. Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences. 74:1094-1109.

Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P. (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environmental Toxicology and Pharmacology. 13:57-149.

Varotto, L., Domeneghetti, S., Rosani, U., Manfrin, C., Cajaraville, M.P., Raccanelli, S., Pallavicini, A., Venier, P. (2013) DNA Damage and Transcriptional Changes in the Gills of *Mytilus galloprovincialis* Exposed to Nanomolar Doses of Combined Metal Salts (Cd, Cu, Hg). PloS One. 8:

Venier, P., Canova, S. (1996) Formation of DNA adducts in the gill tissue of *Mytilus galloprovincialis* treated with benzo[a]pyrene. Aquatic Toxicology. 34:119-133.

Ventura, L., Giovannini, A., Savio, M., Donà, M., Macovei, A., Buttafava, A., Carbonera, D., Balestrazzi, A. (2013) Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay with plants: Research on DNA repair and ecogenotoxicity testing. Chemosphere. 92:1-9.

Viarengo, A., Canesi, L. (1991) Mussels as biological indicators of pollution. Aquaculture. 94:225-243.

Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F., Fabbri, R. (1997) A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. Marine Environmental Research. 44:69-84.

Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Livingstone, D., Orunesu, M. (1991) Age-related lipid peroxidation in the digestive gland of mussels: the role of the antioxidant defence systems. Experientia. 47:454-457.

Villela, I.V., de Oliveira, I.M., da Silva, J., Henriques, J.A.P. (2006) DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 605:78-86.

Vukmirović, M., Bihari, N., Zahn, R.K., Müller, W.E.G., Batel, R. (1994) DNA damage in marine mussel *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of environmental contamination. Marine Ecology Progress Series. 109:165-172.

Warmerdam, D.O., Kanaar, R. (2010) Dealing with DNA damage: relationships between checkpoint and repair pathways. Mutation Research/Reviews in Mutation Research. 704:2-11.

West, S.C. (2003) Molecular views of recombination proteins and their control. Nature Reviews Molecular cell biology. 4:435-445.

Wheeler, K.T., Hickman, R., Nelson, G.B., Moore, S.K., Wallen, C.A. (1992) Relationship between DNA damage, DNA repair, metabolic state and cell lethality. Radiation and Environmental Biophysics. 31:101-115.

White, P.A., Rasmussen, J.B. (1998) The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. Mutation Research/Reviews in Mutation Research. 410:223-236.

Widdows, J., Donkin, P. (1992) Mussels and environmental contaminants: bioaccumulation and physiological aspects. U: Gosling, E., ed The Mussel Mytilus: ecology, physiology, genetics, and culture. Elsevier Press, Amsterdam, p. 383-424.

Wilson III, D.M., Bohr, V.A. (2007) The mechanics of base excision repair, and its relationship to aging and disease. DNA Repair. 6:544-559.

Wiseman, H., Halliwell, B. (1996) Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. Biochemical Journal. 313:17-29.

Wootton, A.N., Herring, C., Spry, J.A., Wiseman, A., Livingstone, D.R., Goldfarb, P.S. (1995) Evidence for the existence of cytochrome P450 gene families (CYP1A, 3A, 4A, 11A) and modulation of gene expression (CYP1A) in the mussel *Mytilus* spp. Marine Environmental Research. 39:21-26.

Wrisberg, M., Bilbo, C.M., Spliid, H. (1992) Induction of micronuclei in hemocytes of *Mytilus edulis* and statistical analysis. Ecotoxicology and Environmental Safety. 23:191-205.

Yao, C.-L., Somero, G.N. (2013) Thermal stress and cellular signaling processes in hemocytes of native (*Mytilus californianus*) and invasive (*M. galloprovincialis*) mussels: Cell cycle regulation and DNA repair. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology. 165:159-168.

Yao, C.L., Somero, G.N. (2012) The impact of acute temperature stress on hemocytes of invasive and native mussels (*Mytilus galloprovincialis* and *Mytilus californianus*): DNA damage, membrane integrity, apoptosis and signaling pathways. Journal of Experimental Biology. 215:4267-4277.

Yasuda, S., Sekiguchi, M. (1970) T4 endonuclease involved in repair of DNA. Proceedings of the national academy of sciences. 67:1839-1845.

Zahn, R. (1989) DNA alterations by pollution and the problem of risk quantification. World Health Organization Regional Office for Europe and United Nations Environment Programme, Carcinogenic, Mutagenic, and Teratogenic Marine Pollutants: Impact on Human Health and the Environment, Advances in Applied Biotechnology Series. vol. 5. Portfolio The Woodlands, TX, p. 177-187.

Zahn, R.K., Zahn-Daimler, G., Müller, W., Michaelis, M.L., Kurelec, B., Rijavec, M., Batel, R., Bihari, N. (1983) DNA damage by PAH and repair in a marine sponge. Science of the Total Environment. 26:137-156.

Zharkov, D.O. (2008) Base excision DNA repair. Cellular and Molecular Life Sciences. 65:1544-1565.

# 8. ŽIVOTOPIS

# 8 ŽIVOTOPIS

Mirta Smodlaka rođena je 29. travnja 1983. u Puli, Hrvatska. Osnovnu školu na talijanskom jeziku završila je u Rovinju kao i opću gimnaziju. Godine 2001. upisala je studij molekularne biologije na Biološkom odsjeku, Prirodoslovno – matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirala je 2008. godine s diplomskim radom „Analiza staničnog ciklusa i određivanje sadržaja DNA u hemocitima / coelomocitima morskih beskralješnjaka protočnom citometrijom“ pod vodstvom mentorice prof. dr. sc. Nevenke Bihari (Centar za istraživanje mora, Instituta Ruđer Bošković, Rovinj).

Od 2008. zaposlena je u Centru za istraživanje mora, Instituta Ruđer Bošković u Laboratoriju za morsku ekotoksikologiju u Rovinju kao stručni suradnik na projektu. Godine 2009. upisuje poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij Oceanologije na Geološkom odsjeku, Prirodoslovno – matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Iste godine postaje znanstveni novak i pod vodstvom mentorice izv.prof.dr.sc. Maje Fafanđel izrađuje doktorski rad. Od 2008. sudjeluje u nastavi kao asistent na preddiplomskom studiju Znanosti o moru pri Sveučilištu Juraj Dobrile u Puli na kolegijima „Stanična i molekularna biologija“ i „Molekularna toksikologija i ekotoskikologija“. Od 2013. članica je „Hrvatskog biološkog društva“ i „Hrvatskog toksikološkog društva“.

Aktivno je radila na brojnim domaćim i stranim projektima. Sudjelovala je u vođenju nekolicine preddiplomskih, diplomskih i magistarskih radova. Bila je koordinator projekta MARELITT za Hrvatsku financiran sa strane Europske Komisije u sklopu kojega je sudjelovala na više međunarodnih sastanaka kao pozvani predavač. Boravila je tri mjeseca na Sveučilištu u Mainzu, Njemačka, radi suradnje na CoreShell FP7 projektu. Redovno je sudjelovala u organizaciji međunarodnih radionica, škola i kongresa, te aktivno promicala popularizaciju znanosti. Koautor je 5 znanstvenih radova, te brojnih priopćenja s domaćih i stranih znanstvenih skupova.

## POPIS RADOVA

Ravlić, S., Žućko, J., **Smodlaka Tanković, M.**, Fafanđel M., Bihari, N. (*in press*) Sequence analysis of novel CYP4 transcripts from *Mytilus galloprovincialis.* Environmental Toxicology and Pharmacology.

Fafanđel, M., Piljagić, J., **Smodlaka Tanković, M.**, Travizi, A., Bihari, N. (*in press*) Nutrients vs. Toxicity in sediment: a case study of semi-closed basin in Rijeka Bay, Croatia. Fresenius Environmental Bulletin.

Perić, L., **Smodlaka Tanković, M**., Ravlić, S. (2012) Evaluation of marine water quality along North-Eastern Adriatic coast based on lysosomal membrane stability in mussels *Mytilus galloprovincialis* Lam. - A long term study. Acta Adriatica. 53:457-466.

Fafanđel, M., Ravlić, S., **Smodlaka, M**., Bihari, N. (2010) Deoxyribonucleases (DNases) in the cortex and endosome from the marine sponge Tethya aurantium. Russian Journal of Marine Biology. 36:383-389.

Fafanđel, M., Bihari, N., **Smodlaka, M**., Ravlić, S. (2008) Hemocytes/coelomocytes DNA content in five marine invertebrates: Cell cycles and genome sizes. Biologia. 63:730-736. (glavni autor)

Usmeno priopćenje na međunarodnom znanstvenom skupu

- **Smodlaka Tanković, Mirta**; Stinga Perusco, V.; Godrijan, J.; Marić Pfannkuchen, D.; Pfannkuchen, M.: Marine plastic debris in the north – eastern Adriatic. MICRO 2015, Piran, Slovenia, 4. - 6.5.2015.
- **Smodlaka Tanković, Mirta** and Müller, Werner E.G.: How to write a scientific paper. Joint Summer School Bluegenics and CoreShell projects, Rovinj, Croatia, 16.-22.09.2014
- **Smodlaka Tanković**, **Mirta;** Živković, Sanja; Piljagić, Jasmina; Fafanđel, Maja: Ecotoxicological analysis of Rječina river and Bakar bay sediment. Abstracts of the 4th Croatian Congress of Toxicology (CROTOX 2012), Davor Želježić (ur.). Zagreb : IMI, 2012. 20-20
- **Smodlaka Tanković, Mirta** and Pfannkuchen, Martin: Marine litter retention project in Croatia, MARELITT Workshop, Brussels, Belgium, 13-15.5.2014.

Poster na međunarodnom znanstvenom skupu, prvi autor, ili koautor na usmenom priopćenju

- **Smodlaka, Mirta**; Ravlić, Sanda: Proliferative status determination of bentic invertebrates coelomocytes/hemocites. Rapp.Comm.int.Mer Medit. CIESM Scientific Committee (ur.). Monaco : CIESM, 2010. 403-403
- Schröder, Heinz C.; **Smodlaka Tanković, Mirta** and Müller, Werner E.G.: How to write a project proposal. Joint Summer School Bluegenics and CoreShell projects, Rovinj, Croatia, 16.-22.09.2014

Usmeno priopćenje ili poster na domaćem znanstvenom skupu, prvi autor

- **Smodlaka Tanković, Mirta:** Uklanjanje morskog otpada iz mora tokom redovnog ribolova. MARELITT Regional Workshop Croatia, Rovinj, Croatia, 30-31.10.2014.

- **Smodlaka Tanković, Mirta:** MARELITT Croatia. MARELITT Regional Workshop Italy, Sanremo, Italy, 20-21.10.2014.

Usmeno priopćenje ili poster na domaćem ili međunarodnom znanstvenom skupu, nije prvi autor

- Ravlić, Sanda; **Smodlaka, Mirta**; Bihari, Nevenka: Micronuclei detection in mussel tissue: Microscopy vs flow cytometry. EMBO Young Scientists Forum, Zagreb, Croatia, 15-17.6.2009.
- Ravlić, Sanda; **Smodlaka, Mirta**; Bihari, Nevenka: Mussel DNase activity as a new biomarker for environmental contamination: response to model pollutants. Rapp.Comm.int.Mer Medit. CIESM Scientific Committee (ur.). Monaco : CIESM, 2010. 305-305

Boravak i rad u eminentnim istraživačkim laboratorijima i grupama (minimalno mjesec dana)

- Boravak u inozemstvu u trajanju od 3 mjeseca, Njemačka, Mainz, NaonotecMARIN GmbH Medicinskog centra Sveučilišta Johannes Gutenberg radi suradnje na EU projektu *Marine nanobiotechnology: Manganase oxide-containing core-shell materials formed by proteins from marine organisms for biomedical and environmental applications*

Tečajevi, škole, radionice, međunarodne, u trajanju više od tri dana

- 9$^{th}$ International Summer School on Biophysics - Supramolecular Structure and Function, 16-28.9.2006 Rovinj, Croatia

Tečajevi, škole, radionice, domaće, u trajanju više od tri dana

- Radionica - Program praćenja stanja Jadranskog mora: Uspostava Sustava praćenja i promatranja za stalnu procjenu stanja Jadranskog mora, Rovinj, Hrvatska, 3. – 7.6.2013