

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Petar Brnjilović

**ODREĐIVANJE GENOTOKSIČNOG UČINKA TALIJEVA(I)
ACETATA U VODENOJ LEĆI *LEMNA MINOR* L. KOMET-
TESTOM**

Diplomski rad

Zagreb, 2009.

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof.dr.sc. Mirjane Pavlica i pomoćnim vodstvom dipl.inž. Petre Cvjetko.

Zahvaljujem:

***prof.dr.sc. Mirjani Pavlica** na razumijevanju, potpori i savjetima pri izradi ovog diplomskog rada*

***dipl.inž. Petri Cvjetko** na strpljenju i pomoći pri izvođenju praktičnog dijela ovog diplomskog rada*

***dr.sc. Mariji Babić** iz laboratorija za fiziologiju bilja Botaničkog zavoda na održavanju kultura vodene leće tijekom izrade ovog diplomskog rada*

***obitelji** na podršci, razumijevanju i strpljenju tijekom svih godina mog obrazovanja*

***prijateljima** na čiju pomoć sam uvijek mogao računati*

Petar

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

ODREĐIVANJE GENOTOKSIČNOG UČINKA TALIJEVA(I) ACETATA U VODENOJ LEĆI *Lemna minor* L. KOMET-TESTOM

Petar Brnjilović

Zavod za molekularnu biologiju
Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta
Sveučilišta u Zagrebu
Horvatovac 102a

SAŽETAK

Koncentracija teškog metala talija u okolišu kontinuirano raste, a kako ga biljke mogu apsorbirati tako talij putem hranidbenih lanaca postaje dostupan životinjama i čovjeku.

Cilj ovog istraživanja bio je pomoću komet-testa kao nespecifičnog biomarkera genotoksičnosti odrediti genotoksičan učinak talijeva(I) acetata u vodenoj leći *Lemna minor* L. Jezgre stanica vodene leće su prvo u uvjetima *in vitro* tretirane vodikovim peroksidom kao modelnim genotoksikantom čime je potvrđena osjetljivost komet-testa za utvrđivanje direktne genotoksičnosti na vodenoj leći.

Vodena leća je sedam dana izlagana u uvjetima *in vivo* različitim koncentracijama talijeva(I) acetata. Rezultati komet-testa pokazali su blagi genotoksični učinak dvaju najviših koncentracija talija.

Kako bi utvrdili djeluje li talij direktno ili indirektno na molekulu DNA izveden je i acelularni komet-test u uvjetima *in vitro* na jezgrama vodene leće. Rezultati dobiveni celularnim i acelularnim komet-testom ukazuju na indirektno oštećenje DNA uzrokovano talijevim(I) acetatom.

(45 stranice, 14 slike, 4 tablice, 47 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: *Lemna minor* L. / talijev(I) acetat / komet-test / vodikov peroksid / genotoksičnost

Voditelj: Dr. sc. Mirjana Pavlica, izv. prof.

Ocjenitelji: Dr. sc. Mirjana Pavlica, izv. prof.

Dr.sc. Davor Kovačević, izv. prof.

Dr.sc. Dubravka Matković-Čalogović, red. prof.

Doc.dr.sc. Ines Radanović, izv. prof.

Rad prihvaćen: 02.XII.2009.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

DETERMINATION OF THALLIUM(I) ACETATE GENOTOXICITY IN COMMON DUCKWEED *Lemna minor* L. BY COMET ASSAY

Petar Brnjilović

Department of Molecular Biology
Faculty of Science, University of Zagreb
Horvatovac 102a, Zagreb

ABSTRACT

Concentration of the heavy metal thallium in the environment has been continuously increasing. Since thallium can be absorbed by plants it becomes available for the higher organisms including men through food chains.

The main goal of this work was to determine genotoxicity of thallium(I) acetate by comet assay as a non-specific genotoxicity biomarker in common duckweed *Lemna minor* L. Duckweed cell nuclei in *in vitro* conditions were treated with hydrogen peroxide as a model genotoxicant in order to verify the comet assay sensitivity. Results are showing direct genotoxic effect.

Common duckweed plants were *in vivo* exposed to different thallium(I) acetate concentrations for seven days. The results of comet assay showed a mild genotoxicity of two highest concentrations of thallium.

In order to determine whether thallium directly or indirectly affect DNA an acellular comet assay was performed *in vitro* on common duckweed nuclei. Results following both cellular and acellular comet assays implies indirect DNA damage caused by thallium(I) acetate.

(45 pages, 14 figures, 4 tables, 47 references, original in: Croatian language)
Thesis deposited in Central biological library.

Key words: *Lemna minor* L. / thallium(I) acetate / comet assay / hydrogen peroxide/ genotoxicity

Supervisor: Mirjana Pavlica, PhD, Assoc. Prof.

Reviewers: Mirjana Pavlica, PhD, Assoc. Prof.

Davor Kovačević, PhD, Assoc. Prof.

Dubravka Matković-Čalogović, PhD, Full Prof.

Ines Radanović, PhD, Assoc. Prof.

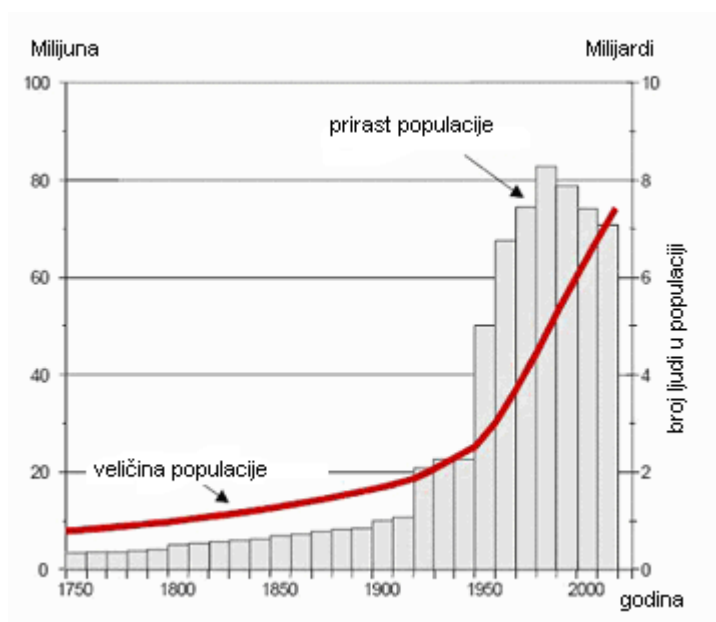
Thesis accepted: 2.XII.2009.

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1 METALI	3
1.1.1 TEŠKI METALI I NJIHOVA TOKSIČNOST	4
1.2 TALIJ	5
1.2.1 TOKSIČNOST TALIJA	9
1.3 EKOTOKSIKOLOGIJA	11
1.4 BIOTESTOVI	11
1.4.1 BIOMARKERI	12
1.4.2 GENOTOKSIČNOST	12
1.4.3 KOMET-TEST	13
1.5 CILJ ISTRAŽIVANJA	16
2. MATERIJALI I METODE	17
2.1 BILJNI MATERIJAL	18
2.2 KULTURA VODENE LEĆE (<i>Lemna minor</i> L.) U UVJETIMA <i>IN VITRO</i>	19
2.3 PROCJENA OŠTEĆENJA DNA KOMET-TESTOM	22
2.3.1 CELULARNI KOMET-TEST	22
2.3.2 ACELULARNI KOMET-TEST	24
2.4 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	25
3. REZULTATI	26
3.1 CELULARNI KOMET-TEST	28
3.2 ACELULARNI KOMET-TEST	31
4. RASPRAVA	34
5. ZAKLJUČAK	39
6. LITERATURA	41

1. UVOD

Bilo je potrebno samo 40 godina da se od 1950. godine ljudska populacija od 2,5 milijarde poveća dvostruko, dok je broj ljudi na Zemlji od 6 milijardi dostignut krajem 20. stoljeća (Slika 1.). Predviđanja su da će do kraja 21. stoljeća broj ljudi na Zemlji doseći broj od 8-12 milijardi ([http 1](#)).



Slika 1. Rast broja ljudi u populaciji od 1750.-2009. (preuzeto od [http 1](#))

Takvo povećanje ljudske populacije omogućeno je i razvojem poljoprivrede, industrije i tehnologije. Međutim, napredak upravo tih djelatnosti glavni je uzrok antropogenog onečišćenja okoliša. Među tvarima čija koncentracija u okolišu zbog antropogenog djelovanja raste značajnu ulogu imaju i teški metali. Zbog kumulativnog djelovanja i nemogućnosti eliminacije iz organizma čak i niske koncentracije teških metala predstavljaju opasnost za čovjekovo zdravlje. Čovjek je zadnja karika u hranidbenom lancu, hrani se otrovanim biljkama, kao i životinjama koje unutar organizma nakupljaju otrove. Male količine

otrova se stalnim nakupljaju zbrajaju unutar organizma, a u analizi i detekciji vrlo malenih doza nastaju veliki problemi.

Zadnjih se desetljeća javlja svijest o međusobnoj ovisnosti i povezanosti čovjeka i njegovog okoliša, tj. dolazi do spoznaja o utjecaju različitih tvari na organizme u okolišu i na zdravlje ljudi. Stoga se stalno radi na razvoju i usavršavanju različitih metoda i testova kojima se može brzo i precizno detektirati štetno djelovanje neke tvari.

1.1 METALI

Potreba za mineralima suočava biljnu stanicu s dva ključna problema: prvi je selekcija esencijalnih i ekskluzija neesencijalnih minerala, a drugi je održavanje optimalne koncentracije esencijalnih minerala u stanicama (Drost i sur. 2007). Da bi se biljka mogla normalno razvijati potrebno joj je 17 elemenata. Podijeljeni su prema količini koja je biljci potrebna na: makroelemente kojih ima devet i mikroelemente kojih ima osam. Neki je element esencijalan u biljnoj prehrani ako biljka ne može završiti svoj životni ciklus bez njega ili ako je on nezamjenjiv sastojak molekula nužnih za metabolizam tijekom normalnog razvitka biljke (Pevalek-Kozlina 2003). Ipak, kada su esencijalni minerali prisutni u višim koncentracijama od fizioloških mogu imati toksičan učinak.

Neki metali također spadaju u esencijane elemente, npr. magnezij, kalij, kalcij, željezo i cink. U biljci imaju različite funkcije: od aktivacije enzima i održavanja osmotske vrijednosti do omogućavanja normalnog odvijanja fotosinteze, a i sastavni su dijelovi mnogih važnih molekula kao što su klorofil i brojni enzimi. Njihov nedostatak rezultira inhibicijom rasta biljke, klorozom i nekrozom. Biljka posjeduje brojne mehanizme kojima održava optimalne koncentracije esencijalnih metala regulirajući njihov ulazak, izlazak i prijenos unutar stanice. U biljci postoje i prenositelji za

unos i izbacivanje metala, ali oni većinom nisu dovoljno specifični da bi razlikovali slične metale (Pevalek-Kozlina 2003). Ugradnja metala u biosisteme ovisi o kemijskim svojstvima metala, te njegovoj količini i dostupnosti. Za razliku od esencijalnih, za neesencijalnim elementima ne postoji potreba niti u jednoj fazi razvoja. Snažna industrijalizacija je posljednjih stotinjak godina mobilizirala u biosferu i takve, neesencijalne elemente od kojih neki spadaju u toksične metale. Biljke nemaju posebne mehanizme za unos neesencijalnih elemenata, ali oni ulaze u biljku preko prenositelja esencijalnih elemenata ponašajući se poput „oportunističkih autostopera“ (Dalton i sur. 2005). Kompetitivnim vezanjem na zajedničke prenositelje dolazi do smanjenog unosa esencijalnih elemenata (Shanker i sur. 2005).

1.1.1 TEŠKI METALI I NJIHOVA TOKSIČNOST

Metali se mogu podijeliti prema gustoći na: lake i teške. Laki su metali oni čija je gustoća manja od 5 g/cm^3 , kao što su aluminij, magnezij i kalcij. Teški metali imaju gustoću veću od 5 g/cm^3 (Habuš i sur. 1998). U skupini teških metala nalazi se preko 60 elemenata od kojih je većina neesencijalnih, primjerice: talij, živa, olovo itd., a neki su u malim koncentracijama vrlo toksični.

Čovjek je oduvijek okružen metalima. Oni prolaze biokemijski ciklus s različitim vremenom zadržavanja. U atmosferi se najčešće zadržavaju do nekoliko tjedana, u kopnenim vodama mjesecima i godinama, u oceanima tisućama godina, a u morskim sedimentima 10^8 godina (Habuš i sur. 1998). Koncentracija teških metala u okolišu kontinuirano raste trošenjem matičnih stijena i vulkanskim erupcijama te kao posljedica djelovanja čovjeka (rudarenjem, industrijskom proizvodnjom, izgaranjem fosilnih goriva, komunalnim otpadom, poljoprivredom i medicinom). Tako

se npr. uporabom pesticida i trošenjem automobilskih guma povisuje koncentracija kadmija, izgaranjem ugljena se oslobađaju arsen, živa, selen i talij, a komunalnim otpadom uz arsen oslobađaju se u okoliš krom, bakar i nikal (Mallick i Rai 2002). Teški metali u okolišu onečišćuju cjelokupnu biosferu: tlo, vodu i atmosferu, a zbog nemogućnosti kemijske i biološke razgradnje i kumulativnog učinka predstavljaju ozbiljan problem za živi svijet. Ugradnjom u hranidbene lance koncentracija metala u organizmu postaje višestruko veća od koncentracije metala u okolišu i ta se pojava naziva biomagnifikacija (Mishra i sur. 2007).

Visoke koncentracije teških metala izazivaju brojne anatomske, morfološke i fiziološke promjene u biljkama te utječu na metabolizam biljnih hormona, diobu i rast stanica. Općenito, toksičnost teških metala temelji se na direktnim i indirektnim oštećenjima staničnih struktura i procesa bitnih za normalno funkcioniranje stanica. Direktna oštećenja izazvana su vezanjem metala na funkcionalne skupine, zamjenom esencijalnih iona toksičnim metalima i promjenom aktivne konformacije biološki važnih molekula. Indirektna oštećenja obuhvaćaju oštećenja nastala uslijed sekundarnog stresa (npr. oksidacijskog) koji nastupa kada koncentracija nastalih toksičnih spojeva nadmaši obrambeni kapacitet stanice i pri tom u većoj ili manjoj mjeri oštećuju biološki važne molekule kao što su DNA, RNA, proteini, pigmenti i lipidi (Mallick 2004).

1.2 TALIJ

Talij (lat. *Thallium*) je kemijski element simbola Tl, a budući da je njegova gustoća $11,83 \text{ g/cm}^3$ pripada skupini teških metala. U periodnom sustavu elemenata nalazi se u 6. periodi i 13. grupi elemenata. Atomski broj mu iznosi 81, a relativna molekulska masa $204,3833 \text{ g/mol}$. Talište mu je pri $304 \text{ }^\circ\text{C}$, a vrelište na $1473 \text{ }^\circ\text{C}$. U prirodi dolazi u 2 oblika: oko

30% čini ^{203}Tl (202,97 g/mol) i 70% čini ^{205}Tl (204,97 g/mol). Elektronska konfiguracija vanjske ljuske talija ($4f^{14}5d^{10}6s^26p^1$) dozvoljava dva oksidacijska stanja: Tl^+ i Tl^{+3} . Iako trovalentni talij (Tl^{+3}) stvara stabilne komplekse on je izuzetno toksičan. Jednovalentni talij (Tl^+) je manje toksičan, ali predstavlja znatno veću opasnost za biljne i životinjske organizme jer su njegovi spojevi topivi i zbog toga biodostupniji (Babić 2007). Trovalentni talij nastaje zagrijavanjem jednovalentnog talija ili tretiranjem istoga koncentriranom nitratnom kiselinom (Emsley 2003).

Talij je srebrno sive boje (Slika 2.), veoma mekan pa se može rezati nožem a topljiv je u svim kiselinama, izrazito u nitratnoj (Emsley 2003). Nepostojan je na zraku jer brzo oksidira u talijev(I) oksid (Tl_2O) koji nastaje na površini metala, a pri povišenim temperaturama oksidira u talijev(III) oksid uz zeleni plamen (Cvjetko i sur. 2009). Zbog toga se čuva u petroleju. Po fizikalnim svojstvima sličan je olovu, a po kemijskim svojstvima srebru, živi, olovu i velikim alkalijskim metalima (Frattini 2005).



Bleiglanz, Sweetwater Mine/USA, Foto und Copyright: Thomas Seilnacht

Slika 2. Talij

Sir William Crookes (1832-1919) i Claude-Auguste Lamy (1820-1878) su slučajno i nezavisno jedan od drugog otkrili talij. Pri spaljivanju

otpada iz pogona za proizvodnju sulfatne kiseline u spektru je 1861. W. Crookes primijetio zelenu liniju koja je pripadala tada nepoznatom elementu. Zbog zelene boje spektra novome je elementu dao naziv talij (grč. Thallos- zeleni pupoljak). Godinu dana kasnije je zelenu liniju u spektru uočio i C.-A. Lamy (Cvjetko i sur. 2009). Talij je u prirodi široko rasprostranjen, ali u vrlo niskim koncentracijama (Tablica 1.). Spada u elemente u tragovima i vrlo je rijedak element u prirodi. Ipak se koncentracija tog metala posljednjih godina povećala oko 10 puta (John Peter i Viraraghavan 2005). Procijenjuje se da se godišnje mobilizira 2,000 do 5,000 t talija (Frattini 2005).

Tablica 1. Količina talija u okolišu (Emsley 2003)

TALIJ U OKOLIŠU	
ZEMLJINA KORA	0,6 ppm
TLO	0,02-2,8 ppm (uglavnom 0,1-0,3 ppm)
MORSKA VODA	10 ppt
ATMOSFERA	gotovo nula

Talij je sastavni dio sulfidnih ruda cinka, olova, željeza i bakra (Kazantzis 2000). Među najpoznatije minerale talija ubrajamo kruksit (Cu_7TlSe_4) i lorandit (TlAsS_2) (Melnjak 2009). Postoji nekoliko geoloških područja koja su prirodno bogata talijem gdje koncentracija u tlu iznosi i do 100 ppm. Područje Alšar na makedonsko-grčkoj granici je jedinstveno jer jedino sadrži ekonomski isplative količine talija u svojim rudačama (Frattini 2005).

Talij zbog svojih svojstava ubrajamo u najtoksičnije teške metale, ali ipak nema dovoljno znanstvenih studija o njegovom utjecaju. Razlog tome je i što su uobičajene analitičke metode nedovoljno osjetljive na prisutne male koncentracije talija. Zbog toga je potrebno usavršiti i razviti visokoosjetljive i pouzdane metode koje bi mogle detektirati i taj metal koji se nalazi u tragovima (Cvjetko i sur. 2009). Talijeve soli nemaju boju, okus ni miris pa su česti slučajevi njihove zloupotrebe. Tako je npr. Sadam Husein upravo talijem trovao svoje političke protivnike. Poznati su i primjeri slučajnih incidenata trovanja talijem. Tako se 1987. u Gvajani dogodio incident u kojem je stotine ljudi pokazivalo simptome trovanja talijem, a 44 ih je umrlo. Otrovali su se konzumiranjem mlijeka krava koje su se hranile melasom zatrovanom talijevim sulfatom koja se koristila kao rodenticid (Kupina 2009).

Dva su osnovna uzroka povećanja koncentracije talija u okolišu: ispiranje tala i stijena bogatih talijem (geokemijski uzrok) te djelovanje čovjeka. Danas su najveći izvori onečišćenja talijem cementare i elektrane koje energiju dobivaju sagorijevanjem ugljena (Kazantzis 2000, Wierzbicka i sur. 2004). Za sada su onečišćenja talijem uglavnom lokalnog karaktera, a predviđa se onečišćenje širih razmjera zbog sve veće uporabe talija u visokotehnološkim procesima.

Premda je Svjetska zdravstvena organizacija još 1973. predložila zabranu uporabe talija on se i danas koristi kao rodenticid, insekticid, pigment, impregnacijsko sredstvo, sredstvo za razdvajanje rudača i proizvodnju pirotehničkih sredstava te u medicini kao radioaktivni izotop ^{201}Tl za kontrast pri dijagnosticiranju bolesti srca i tumora. Prije se koristio i u liječenju sifilisa, gonoreje, tuberkuloze, lišaja i drugih kožnih infekcija te kao depilacijsko sredstvo (Babić 2007). Talij nije potreban živim organizmima niti u jednoj fazi razvoja.

1.2.1 TOKSIČNOST TALIJA

Istraživanja o učinku talija na životinjske i biljne organizme su rijetka zbog njegove visoke toksičnosti, a i zbog nemogućnosti detekcije klasičnim metodama (Cvjetko i sur. 2009). Dosadašnja znanja o učincima talija na animalne organizme dobivena su istraživanjem slučajeva trovanja ljudi i svega nekoliko istraživanja napravljenih na štakorima (Babić 2007). Zbog svega toga još nije poznat mehanizam toksičnosti jer talij na stanicu djeluje na više načina, tj. djeluje na više staničnih struktura (Cvjetko i sur. 2009). No rezultati istraživanja ipak ukazuju na poticanje oksidacijskog stresa uslijed smanjenja koncentracije glutaciona te poremećene detoksikacije vodikova peroksida. Nije moguće klasificirati talij kao mutagen, kancerogen ili teratogen (Babić i sur. 2009).

Talij se iz okoliša apsorbira pomoću biljaka i tako se ugrađuje u hranidbene lance, tj. postaje dostupan višim organizmima uključujući i čovjeka. Procjenjuje se da biljkama godišnje postane dostupno oko $2,4 \cdot 10^3$ tona talija (Frattini 2005). Zanimljiva su istraživanja čiji su rezultati pokazali da je talij iz antropogenih izvora dostupniji biljkama nego talij iz prirodnih izvora (Wierzbicka i sur. 2004), a Frattini (2005.) navodi da je talij oslobođen iz cementara biljkama čak 7,5 puta dostupniji od onog iz tla. Uzrok tome je što se prirodni talij uglavnom nalazi u teško dostupnim rezidualnim frakcijama tla dok se talij iz antropogenih izvora većinom zadržava u labilnim i izmjenjivim frakcijama (Babić 2007).

Dok Agencija za zaštitu okoliša (USEPA) preporuča da maksimalni dnevni unos talija ne bi smio iznositi više od 5 µg (premda se i 14 µg smatra prihvatljivim) procjenjuje se da prosječni dnevni unos talija putem povrća u ljudski organizam u SAD-u iznosi oko 7 µg. Do simptoma kronične talotoksikoze dolazi pri povećanom unosu (već oko 20 µg) kroz dulji period, a jednokratni unos od 8 mg/kg predstavlja letalnu dozu za čovjeka (Babić 2007). Talij se vremenom akumulira u organizmu (Tablica

2.), a najveće koncentracije se nalaze u bubrezima i jetri (Emsley 2003.). Osim ingestijom, talij u animalni organizam može ući preko kože i sluznice te inhalacijom. U intoksiciranim organizmima nađen je kao jednovalentni ion. U simptome trovanja ljudi talijem spadaju: tromost, nesvjestica, usporen govor, opća slabost i gubitak kose.

Tablica 2. Prosječna količina talija u ljudskom tijelu (Emsley 2003.)

TALIJ U LJUDSKOM TIJELU	
KRV	0,5 ppm
KOSTI	2 ppb
TKIVO	4-70 ppb (većina u mišićima)
UKUPNO U TIJELU	0,5 mg

USEPA uvrštava talij među 13 najtoksičnijih metala (Scheckel i sur. 2004). Izrazito je toksičan zbog njegovog velikog afiniteta prema amino-, imino- i sulfidrilnim skupinama enzima te kemijskoj sličnosti s ionima kalija. Naime, zbog male razlike u ionskom radijusu (radijus Tl^+ iznosi 147 pm, a radijus K^+ iznosi 133 pm) još su 1960. godine Mullins i Moore pretpostavili da plazmalema ne razlikuje K^+ od Tl^+ , a 1967. godine Ghering i Hammond (1967) su dokazali da je za aktivan unos talija odgovoran mehanizam za aktivan prijenos kalija. Osim interferencije pri ulasku u stanicu, talij utječe i na metaboličke procese oponašajući kalij. Sudjeluje u inhibiciji velikog broja enzimatskih reakcija (Na^+/K^+ -ATP-aze, piruvat kinaze i aldehid dehidrogenaze) i vitalnih procesa narušavajući ravnotežu u stanicama. Na staničnoj razini izaziva ultrastrukturne promjene membrana staničnih organela, a navodi se i njegov učinak na

segregaciju kromosoma što upućuje na poremećaje u diobenom vretenu (Babić 2007). Nedvojben je i njegov utjecaj na kožni, probavni, srčanožilni, reproduktivni i živčani sustav te sustav za izlučivanje (Cvjetko i sur. 2009).

1.3 EKOTOKSIKOLOGIJA

Pojam ekotoksikologija uveo je 1969. René Trutaut, a definirao ju je kao granu toksikologije koja se bavi istraživanjem toksičnih učinaka ksenobiotika prirodnog i antropogenog porijekla na sve sastavnice ekosistema (Truhaut 1977). To je interdisciplinarno područje toksikologije i ekofiziologije koja povezuje biološke, geografske i kemijske znanosti.

Ekotoksikologija proučava direktni ili indirektni učinak ksenobiotika na ekosistem, sve organizme i njihove organizacije, te međusobne odnose, odnose prema neživoj tvari i prema čovjeku. Termin ksenobiotik se u ekotoksikologiji koristi u kontekstu polutanta, tj. tvari koja zagađuje (kao što su dioksini i poliklorirani bifenili, ali isto tako i organski materijali). Toksikant je otrovni ksenobiotik.

1.4 BIOTESTOVI

U biotestove spada široki spektar testova za ispitivanje toksičnog učinka. Omogućuju nam praćenje i mjerenje reakcija organizma na određene poremećaje u okolišu. Testiranje se izvodi u laboratoriju u kontroliranim uvjetima, a kao test organizmi najčešće se koriste bakterije, biljke, životinje i stanične kulture *in vitro*.

1.4.1 BIOMARKERI

Izloženost ksenobiotcima i ostalim toksičnim tvarima te njihov utjecaj na živi organizam može se mjeriti biomarkerima. Biomarkeri daju informaciju o odgovoru organizma na potencijalno štetne tvari na staničnoj i molekularnoj razini. Radi se o mjerljivim signalima fizioloških, biokemijskih i histoloških promjena u staničnim i biokemijskim procesima, strukturama i funkcijama biološkog sustava pod djelovanjem ksenobiotika (http 1). Omogućuju rani uvid u promjene koje mogu dovesti do oštećenja stanica, tkiva, jedinki te pogoršanja stanja sustava u cjelini.

Dobar biomarker bi trebao zadovoljiti slijedeće kriterije:

- analiza/mjerenje mora biti pouzdano i što jednostavnije
- prirodna razina/aktivnost biomarkera treba biti poznata kako bi se moglo razlučiti koje su promjene izazvane onečišćivačem u odnosu na normalne/prirodne vrijednosti
- treba dobro poznavati biologiju proučavanog organizma kako bi se minimizirali izvori prirodnih varijacija
- trebali bi biti poznati svi vanjski i unutrašnji faktori koji utječu na dobivene vrijednosti biomarkera
- ne zahtijeva žrtvovanje proučavanih jedinki (http 1).

1.4.2 GENOTOKSIČNOST

Genotoksične tvari su one koje štetno djeluju na stanični genetički materijal, tj. oštećuju molekulu DNA ili/i kromosome. To su ksenobiotici koji svojim mutagenim i kancerogenim djelovanjem uzrokuju promjene u genomu.

Genotoksičnost se može očitovati kao:

a) OŠTEĆENJA MOLEKULE DNA

Ksenobiotici mogu uzrokovati jednostruke i dvostruke lomove lanaca, depurinaciju, adukte te unakrsne veze DNA-DNA i DNA-proteini (Steinert i sur. 1998). Ukoliko ih stanični mehanizmi ne poprave, takva oštećenja mogu uzrokovati niz posljedica na razini stanice, organa, jedinki i cijele populacije (Lee i Steinert 2003).

b) GENSKJE MUTACIJE

c) KROMOSOMSKE ABERACIJE

d) NEPRAVILNOSTI TIJEKOM MITOZE I MEJOZE

Za utvrđivanje genotoksičnosti koristi se široki spektar testova. Najpoznatiji su: test kromosomskih aberacija, izmjena sestrinskih kromatida, mikronukleus test, alkalna i neutralna elucija, komet-test te testovi za detekciju genskih mutacija ([http 2](#)).

1.4.3 KOMET-TEST

Komet-test (engl *single cell gel electrophoresis assay*, SCGE) je relativno jednostavna i osjetljiva metoda detekcije oštećenja molekule DNA u pojedinačnim stanicama eukariota. Otkako su Rydberg i Johanson 1978. razvili ovu metodu, i nakon što su ju Singh i suradnici 1988. usavršili (Rojas i sur. 1999), postala je standardna metoda za procjenu oštećenja DNA i primjenjuje se u testiranju genotoksičnosti, biomonitoringu i molekularnoj epidemiologiji.

Postupci pri izvođenju komet-testa izvode se slijedećim radoslijedom:

- uzgoj i izolacija stanica
- ulaganje stanica u agarozni gel

- liziranje stanica upotrebom detergenata i visoke koncentracije soli za uklanjanje staničnih proteina da bi se povećala pokretljivost fragmenata DNA
- denaturacija DNA u alkalnim uvjetima
- elektroforeza u neutralnim, blago alkalnim ili visoko alkalnim uvjetima
- neutralizacija
- bojanje jezgara fluorescencijskom bojom
- analiza oštećenja uz pomoć fluorescencijskog mikroskopa i računalnog programa.

Ovisno o cilju istraživanja, razlikujemo nekoliko izvedbi komet-testa:

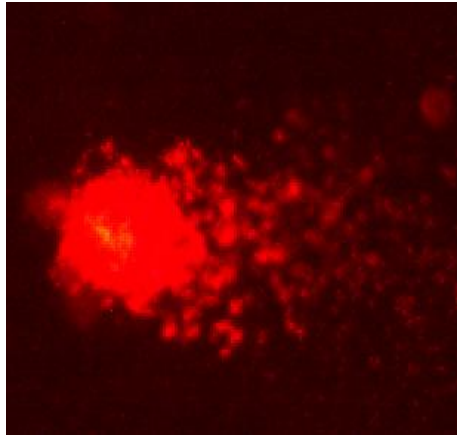
a) ALKALNI KOMET-TEST

Pri izvođenju alkalnog komet-testa i denaturacija i elektroforeza se odvijaju pri vrijednosti $\text{pH} \geq 13$. Alkalni komet-test detektira jednolančane i dvolančane lomove, ali ih ne razlikuje. Ukazuje i na alkalno-labilna mjesta, mjesta zakašnjelog popravka DNA i unakrsne veze DNA-DNA i DNA-protein.

b) NEUTRALNI KOMET-TEST

Pri ovom testu denaturacija DNA se odvija pri neutralnim ili blago alkalnim uvjetima (pH 7-8), a elektroforeza pri neutralnom pH . Ovom vrstom mogu se detektirati dvolančani lomovi (Tuteja i sur. 2009).

Nakon liziranja i denaturacije u alkalnim uvjetima, oštećeni dijelovi DNA molekule se otpuštaju iz jezgre i tijekom elektroforeze putuju kroz električno polje prema pozitivno nabijenoj anodi. Jezgre pri tome gube svoj cjeloviti oblik i prelaze u strukture nalik kometu koje se sastoje od „glave“ i „repa“ (Slika 3.). Sposobnost migriranja DNA fragmenata ovisi o veličini fragmenata i o broju njezinih isprekidanih krajeva. Povećanjem broja lomova nastaju fragmenti koji slobodnije migriraju u rep kometa pa se on povećava razmjerno s oštećenjem molekule DNA (Sertić 2005).

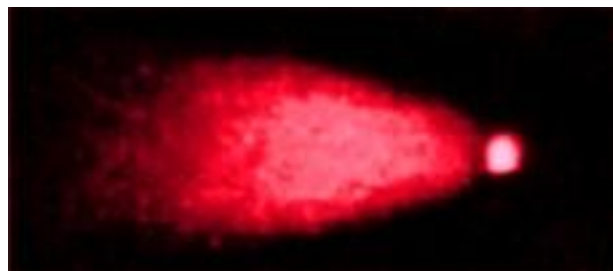


Slika 3. Jezgra lista vodene leće tretirane s 8 mM EMS-om vidljiva fluorescencijskim mikroskopom nakon komet-testa

Oštećenja DNA se procjenjuju pomoću:

- mjerenja dužine repa, tj. udaljenosti na koju su migrirali fragmenti DNA
- postotak DNA u repu
- repni moment koji definiramo kao umnožak dužine repa i postotka DNA u repu.

Komet-testom mogu se detektirati i stanice u apoptozi, tj. stanice koje su u stadiju programirane stanične smrti uzrokovane brojnim fiziološkim i fizičkim mehanizmima. U tom slučaju glava i rep kometa su potpuno odvojeni, a jezgra može biti raspršena (Collins 2004) (Slika 4.).



Slika 4. Izgled jezgre u apoptozi nakon komet-testa (preuzeto sa: <http> 3)

Komet-test ima mnoge prednosti pred ostalim citogenetičkim metodama za detekciju genotoksičnosti:

- jeftin, jednostavan i kratkotrajan
- ne zahtijeva mitotički aktivne stanice ni malobrojne i velike kromosome
- primjenjiv je na bilo koji tip eukariotskih stanica
- za provođenje testa je potreban mali broj stanica
- otkriva oštećenje u pojedinim stanicama
- visoka osjetljivost s mogućnošću detekcije jednog loma na 10^{10} Da (Kupina 2009)

1.5 CILJ ISTRAŽIVANJA

Povećani interes za istraživanje toksičnosti talija posljednjih godina rezultat je povremenih intoksikacija širom svijeta kao i povećana upotreba talija u visokotehnološkim procesima. Kako koncentracija talija u vodama ponekad nadmašuje koncentraciju olova i kadmija kojih je toksičnost puno istraženija i poznatija, opasnost od trovanja talijem često je i veća od očekivane (Lin i sur. 2001). Budući da talij može zamijeniti kalij u biogeokemijskim sustavima potrebno je istražiti njegov unos, bioakumulaciju i učinak na biološke sustave (Babić 2007).

Istraživanje u sklopu ovog diplomskog rada provedeno je na vodenoj leći *Lemna minor* L. Budući da vodeni makrofiti akumuliraju značajne količine teških metala sve se češće koriste u istraživanju učinaka onečišćenja teškim metalima i fitoremedijaciji (Vajpayee i sur. 2006).

Cilj ovog istraživanja bio je istražiti prikladnost primjene komet-testa kao nespecifičnog biomarkera genotoksičnosti na vodenoj leći (*Lemna minor* L.) izloženoj različitim koncentracijama talijeva(I) acetata.

2. MATERIJALI I METODE

2.1 BILJNI MATERIJAL

Vodena leća *Lemna minor* L. (Slika 5.) je vrsta sa kozmopolitskim rasprostranjenjem. Nastanjuje slatke i bočate, stajaće ili sporotekuće vode (Slika 6.) svih geografskih širina osim krajnjeg juga.



Slika 5. Vodena leća (preuzeto sa <http> 4.)

Radi se o slobodnoplutajućoj vodenoj biljci sa jednim, dva ili tri lista ovalnog oblika, 1-8 mm dugački i 0,6-5 mm široki. Svaki list ima svoj korjenčić duljine 1-2 cm koji je uronjen u vodu. Listovi se mogu i odvojiti i tada predstavljaju odvojene jedinice. Listovi su svijetlo zelene boje sa tri, a rjeđe 5 provodnih žila i malim zračnim prostorom koji omogućava plutanje biljke. Razmnožava se uglavnom nespolnim dijeljenjem, a rijetko cvjeta.

Raste u vodi bogatoj nutrijentima, pri pH između 5 i 9 (ali optimalno 6,5-7,5), temperaturi između 6 i 33 °C. Rast kolonija je izuzetno brz i na

staništu u povoljnim uvjetima u kratkom vremenu stvaraju gusti zeleni pokrov (Slika 6.).



Slika 6. Kolonija vodene leće na jezeru (preuzeto sa <http> 4.)

Zbog visokog sadržaja proteina hrana je brojnim životinjskim vrstama zbog čega se onečišćenje kojemu je izložena može brzo proširiti na ostale sudionike prehrambenih lanaca u kojima sudjeluje (Babić 2007). Vrsta *Lemna minor* je vodeni makrofit koji se učestalo rabi u ekotoksikološkim istraživanjima. Još od 1930-ih rabi se u detekciji fitotoksičnosti pesticida, teških metala, surfaktanata (Babić 2007). Tvar čiji se učinak želi istražiti vodena leća prima listićima izravno iz tekuće podloge u koju je tvar dodana.

2.2 KULTURA VODENE LEĆE (*Lemna minor* L.) U UVJETIMA *IN VITRO*

Vodena leća korištena u ovim pokusima potječe iz Botaničkog vrta Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Prije uzgoja

na hranjivoj podlozi PS (Pirson i Seidel 1950) biljke su sterilizirane (Krajnčić i Devidé 1980). Sastav hranjive podloge prikazan je tablicom 3. Pomoću kalijeva hidroksida sam podesio pH vrijednost hranjive podloge na 4,55. Za održavanje kultura sam rabio Erlenmeyerove tikvice obujma 300 ml koje sam napunio sa po 150 ml hranjive podloge, začepio vatom i aluminijskom folijom te na kraju sterilizirao autoklaviranjem (120 °C; 0,15 MPa; 18 minuta). Pojedinačne zdrave kolonije sam uzeo iz kulture za održavanje (hranjiva podloga PS koja sadrži EDTA) i nasadio na modificiranu tekuću podlogu za izvođenje testa. Modificirana podloga PS ne sadrži EDTA, ali joj je dodan talijev(I) acetat (Tablica 4.) (osim za uzgoj kontrolnih biljaka u čiju hranjivu podlogu PS nije dodan talijev(I) acetat). Biljke na kojima sam istraživao učinak talija nasadio sam u Erlenmeyerove tikvice volumena 300 ml koje sam napunio s oko 150 ml tekuće hranidbene podloge za izvođenje testa s dodatkom talijeva(I) acetata koncentracija: 0,2; 0,5; 1,0 i 2,0 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Da bi isključili mogućnost djelovanja acetata na vodenu leću sva su istraživanja provedena i na biljkama uzgojenim na modificiranoj hranjivoj podlozi PS s dodatkom 2,0 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ kalijeva acetata umjesto talijeva(I) acetata. U nekoliko Erlenmeyerovih tikvica s vodenom lećom nisam dodavao ni talijev(I) acetat ni kalijev acetat i ta skupina biljaka služila mi je kao negativna kontrola. Postupak presađivanja biljaka izvodio sam u laminaru (komori s horizontalnom strujom zraka) koristeći pribor, Erlenmeyerove tikvice i podloge prethodno sterilizirane u autoklavu na 121 °C, pri 15 MPa kroz 18 minuta. Nakon presađivanja biljke su inkubirane u klimakomori u uvjetima dugog dana (16 sati svjetla i 8 sati tame) na temperaturi 24 ± 1 °C uz rasvjetu bijelih fluorescentnih svjetiljki ($90 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) tijekom 7 dana.

Tablica 3. Sastav hranjive podloge PS

MAKROELEMENTI	mmol dm⁻³
KNO ₃	3,95
KH ₂ PO ₄	1,47
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1,21
CaCl ₂ · 2H ₂ O	5,46
MIKROELEMENTI	mmol dm⁻³
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,0015
H ₃ BO ₃	0,0081
Na ₂ -EDTA · 2H ₂ O *	0,049 *
željezni citrat	0,02
ORGANSKI DODACI	mmol dm⁻³
saharoza	29,2
asparagin	0,66

Tablica 4. Svojstva talija i talijeva(I) acetata

NAZIV	KEMIJSKA FORMULA	M_r (g mol⁻¹)	GUSTOĆA (g cm⁻³)	TALIŠTE (°C)	TOPIVOST U VODI
talij	Tl	204,38	11,85	303,5	netopiv
Talijev(I) acetat	TlC ₂ H ₃ O ₂	263,43	3,765	131	vrlo topiv

2.3 PROCJENA OŠTEĆENJA DNA KOMET-TESTOM

Genotoksično svojstvo neke tvari može biti posljedica njenog direktnog ili indirektnog učinka na molekulu DNA. Kako bi odredili da li je djelovanje talijevog(I) acetata direktno i/ili indirektno izveo sam i celularni i acelularni komet-test.

Da bi definirao vrijeme potrebno za denaturaciju i elektroforezu molekule DNA proveo sam optimizaciju eksperimentalnih uvjeta u sklopu „halo“- testa. Optimizacijom su istraženi slijedeći uvjeti:

- a) 20 minuta denaturacije i elektroforeze (10 + 10)
- b) 45 minuta denaturacije i elektroforeze (15 + 30)
- c) 60 minuta denaturacije i elektroforeze (20 + 40).

2.3.1 CELULARNI KOMET-TEST

Na kontrolnim uzorcima i uzorcima biljaka koji su sedam dana izlagani talijevom(I) acetatu proveo sam komet-test po metodi koju su opisali Gichner i sur. (2000).

Prije same izolacije jezgara pripremio sam djelomično brušena predmetna stakalca (ESCO, Erie Scientific) na koja se nanosi ukupno tri sloja agaroze različitih tališta. Prvi sloj sam načinio tako da sam stakalca uranjao u vodenu otopinu 1%-tne agaroze NMP i pustio da se polimerizira minimalno 15 minuta na sobnoj temperaturi.

Postupak izolacije jezgara provodio sam na ledu da bi se smanjila mogućnost dodatnog oštećenja DNA. U plastičnu Petrijevu zdjelicu dodao sam 200 µl hladnog pufera za izolaciju jezgara (400 mmol/dm^3 Tris/HCl

pufer, pH 7,5) i listiće vodene leće koje sam potom mehanički usitnio žiletom kako bi se jezgre oslobodile iz stanica. Petrijevu zdjelicu sam nagnuo kako bi se jezgre nakupile u puferu da bi ih što više prenio na predmetno stakalce. Pomoću mikropipete sam prenio 60 μ l uzorka iz Petrijeve zdjelice u Eppendorf tubicu u kojoj se već nalazi 60 μ l drugog sloja agaroze, tj. 100 μ l 1%-tne agaroze LMP u fosfatnom puferu PBS (8,5g/l NaCl; 0,85 g Na₂HPO₄; 0,54 g/l KH₂PO₄), pH vrijednosti 7,0, temperature 42 °C. Iz Eppendorf tubice sam mikropipetom prebacio 100 μ l uzorka na predmetno stakalce s prvim slojem agaroze i poklopio pokrovnim stakalcem i stavio sve zajedno na led oko 15 minuta da bi se agarozna brže polimerizirala i jezgre fiksirale u gelu. Treći sloj agaroze (0,5%-tna agarozna niskog tališta) kao i inkubaciju u puferu za lizu (2,5 mol dm⁻³ NaCl; 100 mmol/dm³ EDTA; 10 mmol/dm³ Tris/HCl; 1 %-tni Triton X-100, 10 %-tni DMSO) sam izostavio jer nemaju učinak na kvalitetu i učinkovitost testa (Babić 2007).

Nakon uklanjanja pokrovnih stakalaca preparate sam poslao u kadicu za horizontalnu elektroforezu (Biorad) u kojoj se nalazio svježe pripremljeni pufer za elektroforezu koji je sadržavao 10 mmol/dm³ NaOH, 200 mmol/dm³ EDTA, pH vrijednosti iznad 13. U tom puferu za elektroforezu prvo je provedena alkalna denaturacija DNA kroz 10 minuta na 4 °C, a nakon toga elektroforeza (u istom puferu) u trajanju od 20 minuta pri jakosti struje od 300 mA i 26 V. Obzirom da tijekom elektroforeze raste temperatura pufera, kadicu za elektroforezu sam obložio ledenim oblozima. Nakon elektroforeze preparate sam izvadio iz kadice i isprao 3 puta po 5 minuta u Tris/HCl puferu pH 7,5 da bi ih neutralizirao. Nakon sušenja na sobnoj temperaturi tako pripremljeni preparati mogu biti pohranjeni i nekoliko mjeseci u tami na sobnoj temperaturi. Neposredno prije analiziranja preparate sam rehidrirao destiliranom vodom i obojao nakapavanjem oko 70 μ l po preparatu

otopine fluorescencijske boje etidijevog bromida u koncentraciji 10 µg/ml i na kraju ih prekrrio pokrovnim stakalcem. Slijedilo je pregledavanje preparata fluorescencijskim mikroskopom Zeiss Axioplan (filter 09; ekscitacija 520 nm, emisija 610 nm) spojenim na računalo. Jezgre sam snimio digitalnom kamerom kod povećanja objektiva 40x, a analizirao sam ih računalnim programom Komet (Komet version 5, Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, UK). Za procjenu oštećenja DNA mjere se sljedeći parametri: dužina repa, postotak DNA u repu i repni moment. Postotak DNA u repu se izračunava na temelju intenziteta fluorescencije u repu, a repni moment izračunat je množenjem dužine repa i postotka DNA u repu. Za svaku koncentraciju talijeva(I) acetata analizirao sam 50 jezgara po preparatu iz tri neovisna pokusa.

Kao pozitivnu kontrolu proveo sam tretman i analizu vodenih leća izloženih etil metansulfonatu (EMS) u koncentracijama: 0, 2, 4, 6, 8 i 10 mmol/dm³ u trajanju od sat vremena.

2.3.2 ACELULARNI KOMET-TEST

Da bih istražio da li je djelovanje talijeva(I) acetata na molekulu DNA direktno ili indirektno bilo je potrebno napraviti i acelularni komet-test. Izolirane jezgre iz listova vodene leće i preparate sam pripremio na isti način kao i za izvođenje celularnog komet-testa, ali sam jezgre prije denaturacije i elektroforeze izlagao različitim koncentracijama otopine talijeva(I) acetata u Tris/HCl: 0,2; 0,5; 1; 2 µmol/dm³. Za kontrolnu skupinu sam upotrijebio preparate izložene samo 50 ml Tris/HCl. Uzorke sam stavio u tamu 2 sata pri temperaturi od 4 °C. Nakon tame sam preparate 3 puta isprao otopinom Tris/HCl (pH=7,5) da bi neutralizirao bazični pufer u kojem se odvijala elektroforeza. Analizirao sam po 50 jezgara sa svakog preparata, a za svaku koncentraciju pripremio sam po

tri preparata. Daljnji postupak za izvođenje komet-testa je isti kao u već opisanom protokolu.

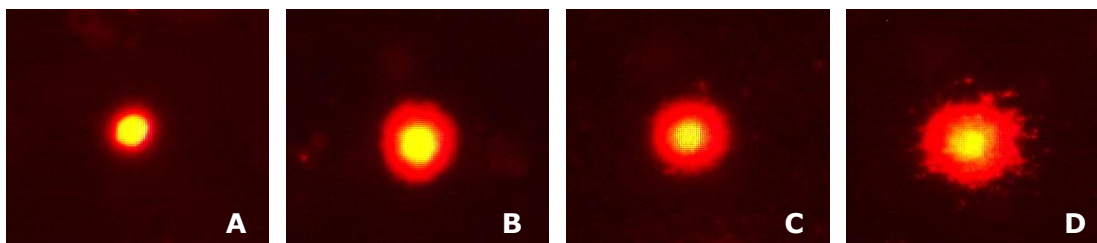
Kao pozitivna kontrola su poslužile jezgre tretirane različitim koncentracijama 30 %-tnog vodikovog peroksida. Preparati su pripremljeni na isti način kao i za izvođenje celularnog komet-testa, ali s jezgrama netretiranih vodenih leća starih 7 dana. Gotove preparate sam uronio u Petrijeve zdjelice s otopina vodikova peroksida koncentracija: 0,2; 0,4; 0,8; i 1,2 mmol/dm³ u Tris/HCl pri pH 7,5. Jezgre izložene samo 50 ml Tris/HCl-u poslužile su mi kao negativna kontrola. Uzorke sam čuvao 2 sata u mraku pri 4 °C. Denaturacija, elektroforeza, fiksacija, bojanje, analiza i fotografiranje preparata proveo sam kao i pri provođenju celularnog komet-testa. Za svaku koncentraciju sam pripremio po tri preparata te sa svakog analizirao 50 jezgara.

2.4 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Za statističku obradu podataka koristio sam računalni program Statistica for Windows 4.0. Dobivene podatke sam usporedio neparametrijskim „Mann-Whitney U-testom“(kao neparametrijski student t-test). Vrijednosti oštećenja DNA dobivene komet-testom su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. Statistički značajni su rezultati koji se razlikuju na razini $p \leq 0,05$, a označeni su različitim slovima.

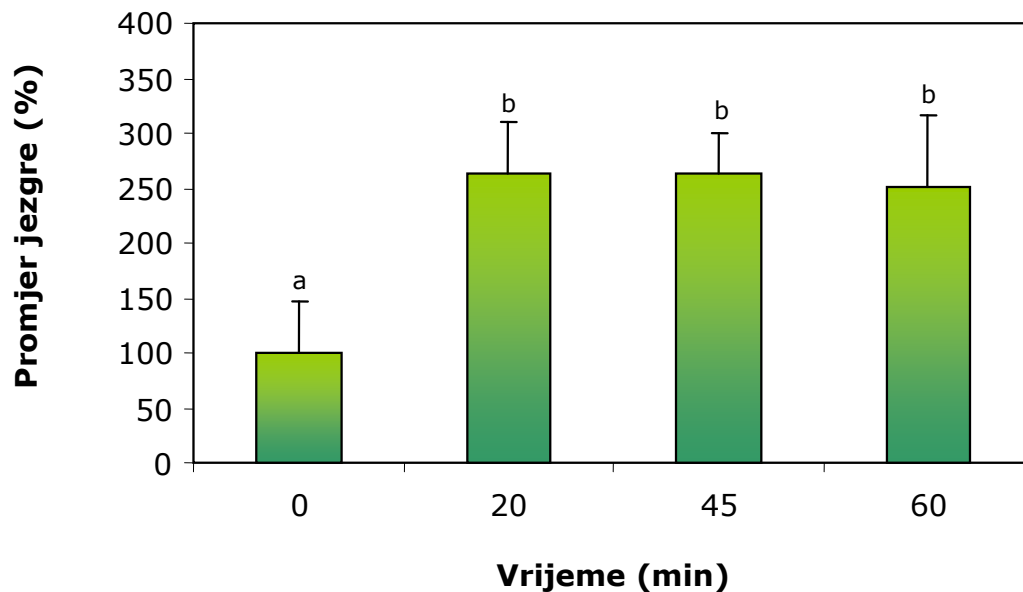
3. REZULTATI

Uvjete denaturacije optimizirao sam uz pomoć "Halo" – testa. Na slici 7. su prikazane jezgre različitih promjera odmah nakon izolacije te nakon 20, 45 i 60 minuta u alkalnom puferu pH>13. Vidljivo je da je maksimalno odmotavanje molekule DNA nastupilo već nakon 20 minuta.



Slika 7. Izolirane jezgre vodene leće u agarozu inkubirane (A) 0 min, (B) 20 min, (C) 45 min i (D) 60 min u alkalnom puferu.

Podaci ukazuju da je prosječni promjer jezgara nakon 20 minuta u alkalnom puferu 2,6 puta veći od netretiranih jezgara (slika 8.). "Halo"-testom sam utvrdio da cjelokupni komet-test može trajati minimalno 20 minuta, jer je u tom vremenu postignuta maksimalna denaturacija. Kao optimalno vrijeme uzeto je 30 minuta, od čega se 10 minuta odvija odmatanje, a ostalih 20 minuta teče elektroforetsko razdvajanje.

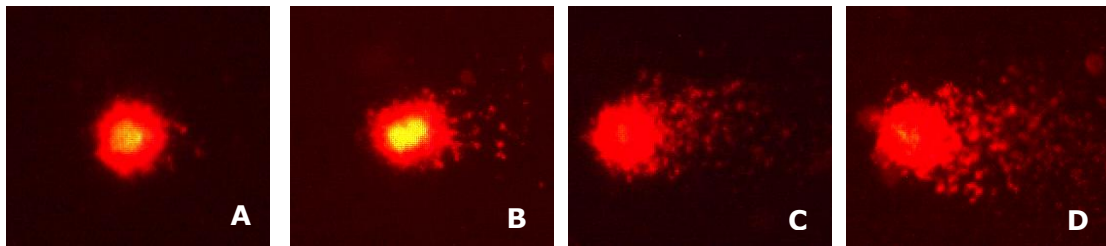


Slika 8. Promjer jezgara u listovima vodene leće tretirane alkalnim puferom. Rezultati predstavljaju srednju vrijednost \pm standardna pogreška promjera 50 jezgara. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,005$).

3.1 CELULARNI KOMET-TEST

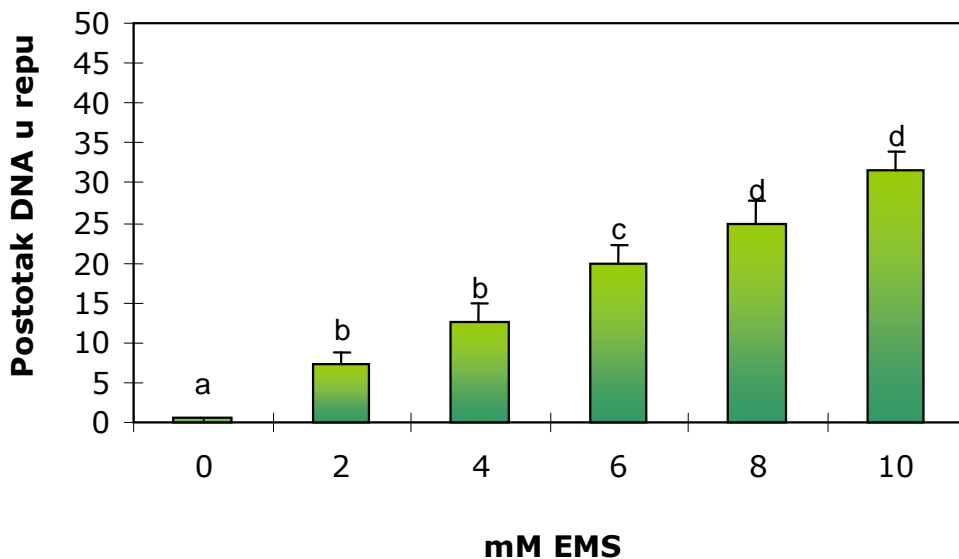
Oštećenje DNA u jezgrama stanica vodene leće (*Lemna minor* L.) nakon djelovanja talija prikazano je kao postotak DNA koja je tijekom elektroforeze migrirala u rep kometa (%DNA u repu). Koristio sam tu vrijednost jer je, za razliku od duljine repa i repnog momenta, pod manjim utjecajem uvjeta u kojima se test provodi (vrijeme denaturacije i elektroforeze) (Mitchelmore i sur. 1998.).

Kao pozitivnu kontrolu oštećenja molekule DNA *in vivo* koristio sam jezgre stanica listova vodenih leća tretiranih sat vremena alkilirajućim agensom etil metansulfonatom (EMS) (Slika 9.)



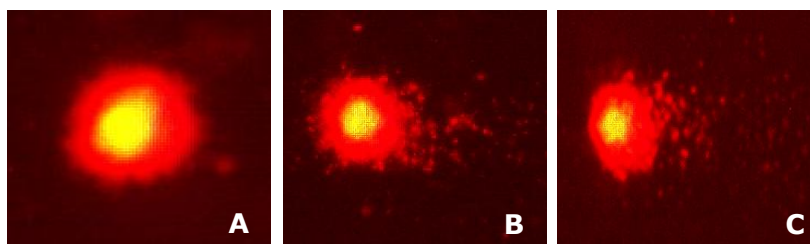
Slika 9. Jezgre kontrolnih listova vodene leće (A) i listova tretiranih EMS-om u koncentracijama 2 mM (B), 6 mM (C) i 8 mM (D).

Rezultati celularnog komet-testa pokazuju da već i najmanja koncentracija EMS-a izaziva šesterostruki porast postotka DNA u repu (Slika 10.). Genotoksični učinak je linearno rastao povećanjem koncentracije EMS-a. U jezgrama stanica listova vodenih leća tretiranih s 10 mM EMS-om postotak DNA u repu je čak 24 puta veći nego u kontrolnim jezgrama (Slika 10.).



Slika 10. Postotak DNA u repu iz jezgara listova vodene leće nakon sat vremena tretmana EMS-om. Rezultati predstavljaju srednju vrijednost \pm standardna pogreška 50 jezgara. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički razlikuju ($p < 0,05$).

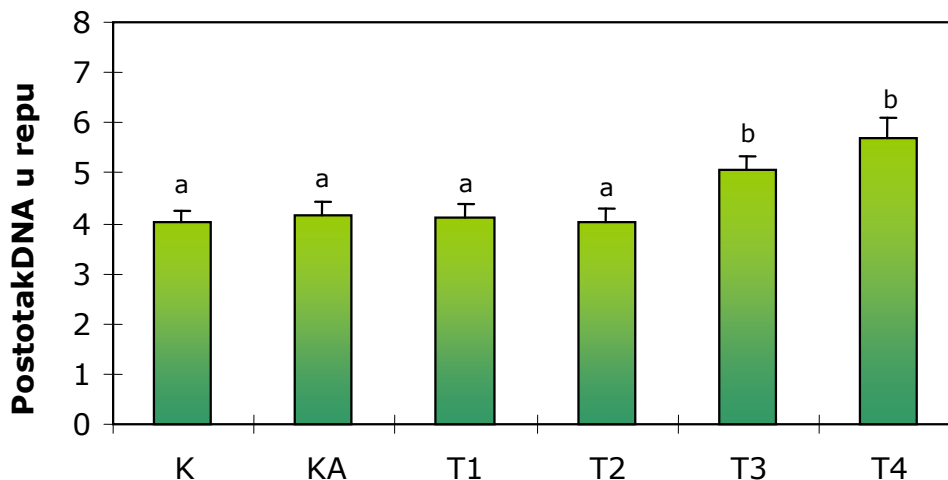
Učinak talijeva(I) acetata na molekulu DNA procijenjen je komet-testom nakon sedam dana uzgoja na hranjivoj podlozi PS kojoj je dodan talijev(I) acetat u različitim koncentracijama (Slika 11.).



Slika 11. Jezgre listova vodene leće: (A) kontrola, (B) tretirane 1,0 μM i (C) 2,0 μM talijevm(I) acetatom.

Rezultati komet-testa *in vivo* na biljkama izloženim talijevu(I) acetatu pokazuju da je postotak DNA u repu porastao za 1,27 puta kod biljaka tretiranih s 1,0 μM u usporedbi s kontrolnim biljkama. Kod biljaka tretiranih s 2,0 μM talijevim(I) acetatom to povećanje iznosi 1,43. Iz slike 12. vidljivo je da je porast postotka DNA u repu blag, ali statistički značajan za tretmane talijem koncentracija 1 i 2 μM .

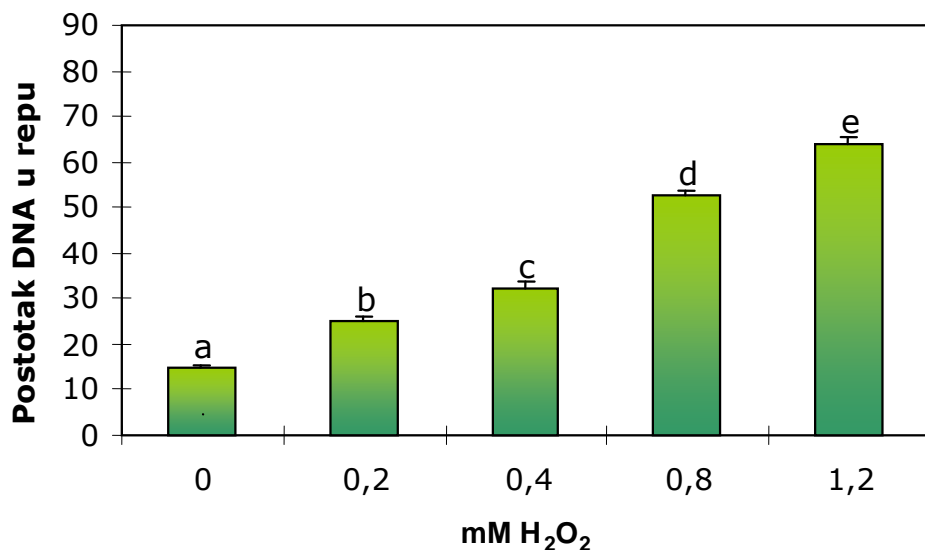
Da bi se isključila mogućnost da acetat djeluje na DNA, jezgre biljaka izloženih kalijevom acetatu su također bile podvrgnute komet-testu. Na slici 12. možemo vidjeti da ne postoji statistički značajna razlika između postotka DNA u repu kod netretiranih biljaka (K) i biljaka tretiranih 2,0 μM kalijevim acetatom (KA).



Slika 12. Oštećenje DNA (prikazano kao %DNA u repu) u jezgrama vodenih leća tretiranih različitim koncentracijama talijeva(I) acetata (T1=0,2; T2=0,5; T3=1; T4=2 μ M; KA = kalijev acetat). Rezultati predstavljaju srednju vrijednost \pm standardna pogreška 50 jezgara. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički razlikuju ($p < 0,05$).

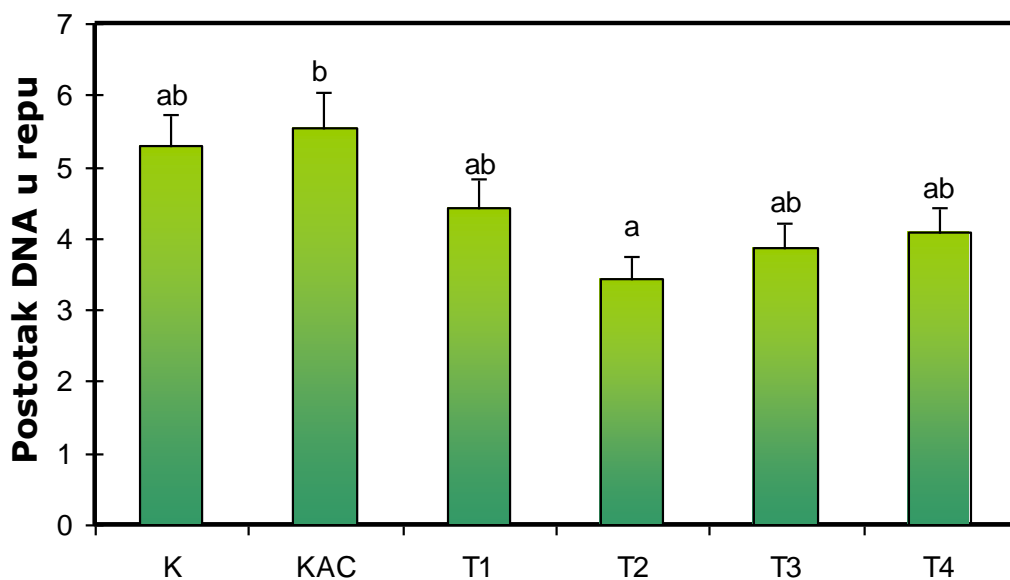
3.2 ACELULARNI KOMET-TEST

Kao pozitivnu kontrolu u acelularnom komet-testu koristio sam jezgre vodenih leća tretirane vodikovim peroksidom. Rezultati su pokazali da značajna oštećenja DNA nastaju pri dvosatnom izlaganju i najmanjim koncentracijama vodikovog peroksida. U jezgrama tretiranim s 0,2 mM vodikovog peroksida postotak DNA u repu se povećao za 1,7 puta, a pri tretmanu s 1,2 mM vodikovim peroksidom za čak 4,2 puta u odnosu na netretirane jezgre (Slika 13.).



Slika 13. Oštećenje DNA u repu jezgara vodene leće tretirane vodikovim peroksidom. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički razlikuju ($p < 0,05$).

Kako bih bi utvrdio djeluje li talijev(I) acetat na molekulu DNA direktno i/ili indirektno jezgre vodene leće sam izlagao i različitim koncentracijama talija u uvjetima *in vitro*. Rezultati komet-testa koji su prikazani na slici 14. ukazuju da ne postoji statistički značajna razlika između postotka DNA u repu kod kontrolnih biljaka i biljaka tretiranih kalijevim acetatom te onih koje su tretirane talijem.



Slika 14. Oštećenje DNA (prikazano kao %DNA u repu) u jezgrama vodenih leća tretiranih različitim koncentracijama talijeva(I) acetata (T1=0,2; T2=0,5; T3=1; T4=2 μ M; KA = kalijev acetat) u uvjetima *in vitro*. Rezultati predstavljaju srednju vrijednost \pm standardna pogreška 50 jezgara. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički razlikuju ($p < 0,05$).

4. RASPRAVA

Ovim istraživanjem nastojao sam utvrditi prikladnost korištenja komet-testa za dokazivanje genotoksičnosti teškog metala talija u vodenoj leći te istražiti da li je genotoksičnost posljedica direktnog ili indirektnog učinka. Za talij zadnjih godina postoji povećani interes zbog povećavanja njegove koncentracije u okolišu, a nedovoljan je broj studija koji istražuju njegov utjecaj kao jednog od teških metala na biljke, životinje i ekosistem u cjelini. Testiranje genotoksičnosti teških metala važno je pri procjeni ugroženosti biološke raznolikosti i općeg stanja ekosistema.

Biljke posjeduju brojne prednosti za istraživanje genotoksičnog učinka teških metala. Uzgoj biljaka u laboratorijskim uvjetima je puno jednostavniji od uzgoja animalnih organizama, imaju kratko generacijsko vrijeme, visoko su osjetljive, pokazuju morfološke, fiziološke, biokemijske i kromosomske promjene koje se mogu mjeriti u kratkom roku nakon izlaganja stresnim uvjetima. Zbog visoke korelacije s rezultatima dobivenim na životinjskim organizmima biljni se testovi sve više koriste i u procjeni karcinogenosti pojedinih tvari. Podaci dobiveni analizom komet-testa izvedenom na jezgrama izoliranim iz listova ukazuju da takvi testovi mogu biti prikladni za biomonitoring *in situ* (Gichner i sur. 2000). Osim što se biljnim testovima može otkriti mutagenost neke tvari, oni se mogu koristiti i za otkrivanje promutagena. 1968. je dokazana mutacija u vrste *Arabidopsis thaliana* izazvana djelovanjem nitrozoamina koji je inače promutagen, što ukazuje na to da biljke imaju enzimske sustave za aktivaciju promutagena (Gichner i sur. 2008).

Genotoksičan učinak može biti uvjetovan direktnim i/ili indirektnim djelovanjem teških metala na molekulu DNA. Direktni učinak podrazumijeva interakciju metala s bazom, fosfatom ili šećerom molekule DNA. Utvrđeno je da se kadmij veže na baze (gvanin, adenin i timin) (Gichner i sur. 2004), a olovo na fosfatne skupine (Vajpaayee i sur.

2006). Indirektan učinak na molekulu DNA je češći od direktnog (Babić 2007), a temelji se na reakcijama s proteinima i drugim molekulama koje sudjeluju u održavanju strukture i funkcije molekule DNA. Za kadmij su Giaginis i sur. (2006) utvrdili da se veže za proteine i mijenja konformaciju proteina koji sudjeluju u popravku DNA. Još jedan uzrok indirektnoj toksičnosti kadmija leži u činjenici da kadmij u stanicama iskorištava stanične antioksidanse i enzime, posebno one koji sadrže tiolnu skupinu te dolazi do poremećaja ravnoteže i nastupa „oksidacijski stres“ te nastaju razna oštećenja proteina, lipida i molekula DNA (Gichner i sur. 2004).

Prije izvođenja komet testa, za svaku vrstu na kojoj se istraživanje obavlja, potrebno je odrediti optimalno vrijeme denaturacije molekule DNA. "Halo"-testom utvrdio sam da je optimalno vrijeme za denaturaciju DNA kod vodene leće 20 minuta. Da bih povećao osjetljivost testa denaturaciju sam ipak provodio 30 minuta (10 minuta se DNA denaturirala, a 20 minuta se provodila elektroforeza). Kod drugih vrsta je to vrijeme različito, npr. kod vrste *Calamagrostis epigejos* najbolji odgovor je dobiven nakon 60 minuta denaturacije (30 minuta odmotavanja i 30 minuta elektroforeze, Ptáček i sur. 2002), kod vrste *Vicia faba* L. optimalno je vrijeme 35 minuta (20 minuta odmotavanja i 15 minuta elektroforeze, Kesić 2009).

Za utvrđivanje indirektna ili direktna genotoksičnosti talija u vodenoj leći koristio sam celularni i acelularni komet-test.

Rezultati celularnog komet-testa na vodenoj leći pokazali su da talijev(I) acetat u nižim koncentracijama (0,2 i 0,5 μM) nije uzrokovao oštećenje molekule DNA, dok su tretmani s 1,0 i 2,0 μM talijevim(I) acetatom rezultirali povećanjem postotka DNA u repu i to za 1% i 1,5% u odnosu na kontrolne biljke. Još prije je dokazano da koncentracija talija od 0,5 μM ima subletalni učinak na vodenu leću (Lin i sur. 2001) te da se

biljka dobro oporavlja nakon prijenosa na podlogu bez talija. Biljke uzgojene na višim koncentracijama talija izgubile su sposobnost oporavka (Kwan i Smith 1988). Na drugim testnim biljkama također je uočeno povećanje postotka DNA u repu sa povećanjem koncentracije talijevog(I) acetata. Rezultati celularnog komet-testa na duhanu su pokazali da nakon 72-satnog izlaganja taliju duhana postoji blagi, ali statistički značajan porast postotka DNA u repu kometa, dok je najveće oštećenje DNA vidljivo pri koncentraciji od 40 μ M talijeva(I) acetata. Pri toj koncentraciji je oštećenje u korijenu 3,4 puta, odnosno 11,9% veće u odnosu na kontrolni uzorak (Kupina 2009).

Kao pozitivnu kontrolu celularnog komet-testa koristio sam alkilirajući agens EMS. Postotak DNA u repu je linearno rastao povećanjem koncentracije EMS-a, pa je pri najvećoj koncentraciji (10 mM) postotak u repu bio čak 24 puta veći nego u netretiranim jezgrama. Genotoksičnost EMS-a potvrdio je svojim istraživanjima i Gichner i sur. 2000. Korištenjem EMS-a, kao poznatog genotoksikanta potvrdili smo i osjetljivost komet-testa na vodenoj leći za detekciju genotoksičnog učinka.

Iz rezultata acelularnog testa provedenog na biljkama čije su jezgre bile izložene modelnom oksidirajućem agensu vodikovom peroksidu vidljive su puno veće vrijednosti parametara za oštećenje DNA nego one dobivene analizom celularnih i acelularnih komet-testova nakon tretmana s talijevim(I) acetatom. Mutageni učinak vodikova peroksida već su prije potvrdili Stavreva i Gichner (2002) i Mancini i sur. (2006).

Za razliku od celularnog komet-testa, rezultati acelularnog ili *in vitro* testa ne ukazuju na genotoksični učinak. Ta činjenica upućuje na to da do oštećenja molekule DNA pod utjecajem talija dolazi indirektno, tj. da su oštećenja detektirana komet-testom posredovana staničnim procesima. Genotoksičnost utvrđena celularnim komet-testom vjerojatno

je posljedica oksidacijskog stresa uzrokovanog izlaganjem biljaka dvjema najvišim koncentracijama talija (Babić i sur. 2009). U pokusima s kadmijem genotoksičnost utvrđena celularnim komet-testom također ukazuje na indirektan učinak na DNA koji je posljedica povišenih sadržaja reaktivnih oblika kisika što je rezultiralo i povišenom peroksidacijom lipida (Valverde i sur. 2001). Gichner i sur. (2004) su pokazali da kadmij u rasponu koncentracija 0,2-1,6 mM u celularnom komet-testu pokazuje veliki porast repnog momenta od 6 μm (kontrola) do 42 μm pri najvećoj koncentraciji kadmija, a vrijednosti repnog momenta nakon acelularnog testa pri najvećim koncentracijama iznosile su samo 12 μm što također ukazuje na indirektan genotoksični učinak.

Rezultati naših istraživanja pokazali su blagi genotoksični učinak talija na vodenoj leći posredovan slobodnim radikalima kisika dakle oksidacijskim stresom. Također je potvrđena osjetljivost komet-testa na biljnom organizmu za utvrđivanje najranijih oštećenja molekule DNA te opravdanost njegove uporabe u biomonitoringu onečišćenog okoliša.

5. ZAKLJUČAK

Vodena leća (*Lemna minor* L.) pokazala se kao osjetljiv organizam za procjenu genotoksičnosti vrlo niskih koncentracija talijeva(I) acetata u hranjivoj podlozi, pa je pogodan materijal za istraživanje učinka talija. Morfološke promjene koje su uočljive kod vodene leće tretirane talijem su: inhibiran rast listova i korijena, razdvajanje kolonija u pojedinačne biljke i kloroza.

Kada su izolirane jezgre tretirane poznatim oksidirajućim genotoksikantom, vodikovim peroksidom uočeno je oštećenje DNA koje je linearno raslo sa koncentracijom. Time je potvrđena osjetljivost komet-testa za određivanje nespecifičnog genotoksičnog oštećenja.

Nije utvrđen genotoksični učinak talijeva(I) acetata u stanicama izloženim talijevom(I) acetatu *in vitro*, ali u *in vivo* uvjetima je zabilježen blagi genotoksični učinak. Zbog toga zaključujem da postoji mogućnost da je genotoksični učinak posredovan oksidacijskim stresom uzrokovanim prisutnošću talija.

6. LITERATURA

Babić M (2007) Učinak talijeva(I) acetata na vodenu leću *Lemna minor* L. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Babić M, Radić S, Cvjetko P, Roje V, Pevalek-Kozlina M, Pavlica M (2009) Antioxidative response of *Lemna minor* plants exposed to thallium(I)-acetate. *Aquat Bot* 91: 166-172

Collins AR (2004): The Comet Assay for DNA Damage and Repair. *Mol Biotechnol* 26: ?

Cvjetko P, Cvjetko I, Pavlica M (2009) Thallium Toxicity in Humans. *Arh Hig Rada Toksikol* (u tisku)

Dalton TP, He L, Wang B, Miller MI, Jin L, Stringer KF, Chang X, Baxter CS, Nebert DW (2005) Identification of mouse SLC39A8 as the transporter responsible for cadmium-induced toxicity in the testis. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 3401-3406

Drost W, Matzke M, Backhaus T (2007) Heavy metal toxicity to *Lemna minor*: studies on the time dependence of growth inhibition and the recovery after exposure. *Chemosphere* 67: 36-43

Emsley J (2003) Nature's Building blocks. An A-Z Guide to the Elements. Oxford University Press, Oxford

Frattini P (2005): Thallium properties and behaviour – A literature study. Geological survey of Finland, GTK

Gehring PJ, Hammond PB (1967) The interrelationship between thallium and potassium in animals. *J Pharmacol Exp Ther* 155: 187-201

Giaginis C, Gatzidou E, Theocharis S (2006) DNA repair systems as targets of cadmium toxicity. *Toxicol App Pharmacol* 213: 282-290

Gichner T, Lovecka P, Vrchotova B (2008) Genomic damage induced in tobacco plants by chlorobenzoic acids- Metabolic products of polychlorinated biphenyls. *Mutat Res* 657: 140-145

Gichner T, Patkova Z, Szakova J, Demnerova K (2004) A cadmium induced DNA damage, somatic mutations or homologous recombination in tobacco leaves. *Mutat Res* 559: 49-57

Gichner T, Ptáček O, Stavreva DA, Wagner ED, Plewa MJ (2000) A comparison of DNA repair using the comet assay in tobacco seedlings after exposure to alkylating agents or ionizing radiation. *Mutat Res* 470: 1-9

Habuš, Stričević i Tomašević (1998) *Anorganska kemija*. Profil, Zagreb

John Peter AL, Viraraghavan T (2005) Thallium: a review of public health and environmental concerns. *Environment International* 31: 493-501

Kazantzis G (2000) Thallium in the environment and health effects. *Environ Geochem Health* 22: 275-280

Kesić M (2009) Cjelovitost DNA u stanicama lista i korijena boba kao pokazatelj genotoksičnosti talijeva(I) acetata. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Krajnčič B, Devidé Z (1980) Report on photoperiodic responses in *Lemnaceae* from Slovenia. *Berichte des Geobot. Inst. ETH, Stiftung Rübél, Zürich*, 47: 75-86

Kupina A (2009) Određivanje genotoksičnog učinka talijeva (I) acetate u duhanu komet testom, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Kwan KHM, Smith S (1988) The effect of thallium on the growth of *Lemna minor* and plant tissue concentrations in relation to both exposure and toxicity. *Environ Pollut* 52: 203-219

Lee RF, Steinert S (2003) Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and fresh water) animals. *Mutat Res* 544: 43-64

Lin TS, Nriagu J, Wang XQ (2001) Thallium concentration in lake trout from Lake Michigan. *Bull Environ Contam Toxicol* 67: 921-925

Mallick N, Rai LC (2002) Physiological responses of non-vascular plants to heavy metals. U: *Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants*. Prasad MNV, Strzałka K (ur). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Boston, London, str 112-148

Mallick N (2004) Copper-induced oxidative stress in the chlorophycean microalga *Chlorella vulgaris*: response of the antioxidant system. J Plant Physiol 161: 591-597

Mancini A, Buschini A, Restivo FM, Rossi C, Poli P (2006) Oxidative stress as DNA damage in different transgenic tobacco plants. Plant Sci 170: 845-852

Melnjak A (2009) Genotoksičan učinag talijeva(I) acetate na meristemske stanice bobica (*Vicia faba* L.) i luka (*Allium cepa* L.), Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Mishra VK, Upadhyaya AR, Pandey SK, Tripathi BD (2007) Heavy metal pollution induced due to coal mining effluent on surrounding aquatic ecosystem and its management through naturally occurring aquatic macrophytes. Bioresour Technol (u tisku), doi:10.1016/j.biotech.2007.03.010

Mitchelmore CL, Birmelin C, Livingstone DR, Chipman K (1998) DNA strand breaking in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. Mutat Res 339: 135-147

Mullins LJ, Moore RD (1960) The movement of thallium ions in muscle. J Gen Microbiol 99: 317-324

Pevalek-Kozlina B (2003) Fiziologija bilja, Profil International, Zagreb

Pirson A, Seidel F (1950) Zell- und stoffwechselphysiologische Untersuchungen an der Wurzel von *Lemna minor* unter besonderer Berücksichtigung von Kalium- und Kalziummangel. Plant 38: 431-473

Ptáček O, Mühlfeldová Z, Dostálek J, Čechák T, Gichner T (2002) Monitoring DNA damage in wood small-reed (*Calamagrostis epigejos*) plants growing in a sediment reservoir with substrates from uranium mining. J Environ Monit 4: 592-595

Rojas E, Lopez MC, Valverde M (1999) Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. J Chromat B: 225-254

Scheckel KG, Lombi E, Rock SA, McLaughlin MJ (2004) *In vivo* synchrotron study of thallium speciation and compartmentation in *Iberis intermedia*. Environ Sci Technol 38: 5095-5100

Sertić M (2005) Procjena genotoksičnosti kopnenih voda testovima komet i mikronukleus na eritrocitima šarana. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Shanker AK, Cervantes C, Loza-Tavera H, Avudainayagam S (2005) Chromium toxicity in plants. *Environ Int* 31: 739–753

Stavreva DA, Gichner T (2002) DNA damage induced by hydrogen peroxide in cultured tobacco cells is dependent on the cell growth stage. *Mutat Res* 514: 147-152

Steinert SA, Streib Montee R, Lether JM, Chadwick D B (1998): DNA damage in mussels at sites in San Diego Bay. *Mutat Res* 399: 65-85

Truhaut R (1977) Eco-Toxicology - Objectives, Principles and Perspectives, *Ecotoxicol Environ Saf* 1(2) : 151–173

Tuteja N, Ahmad P, Panda B B, Tuteja R (2009) Genotoxic stress in plants: Shedding light on DNA damage, repair and DNA repair helicases. *Mutat Res* 681: 134– 149

Vajpayee P, Dhawan A, Shanker R (2006) Evaluation of the alkaline comet assay conducted with the wetlands plant *Bacopa monnieri* L. as a model for ecogenotoxicity assesment. *Environ Mol Mut* 47 (u tisku), doi 10.1002/em.20217

Valverde M, Trejo C, Rojas, E (2001) Is the capacity of lead acetate and cadmium chloride to induce genotoxic damage due to direct DNA-metal interaction? *Mutagenesis* 16: 265-270

Wierzbicka M, Szarek-Lukaszewska G, Grodzinska K (2004) Highly toxic thallium in plants from the vicinity of Olkusz (Poland). *Ecotoxicol Environ Saf* 59: 84-88

Internet stranice:

http 1: <http://learn.uci.edu/oo/>

http 2: <http://www.biol.pmf.hr/~gklobuca/rakovi/indeks.htm>

http 3: <http://kueltzlab.ucdavis.edu/Projects.cfm>

http 4: http://en.wikipedia.org/wiki/Lemna_minor