Testovi genotoksičnosti u biomonitoringu okoliša

Cota, Anja Sima

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

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:217:021301

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-19**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

TESTOVI GENOTOKSIČNOSTI U BIOMONITORINGU OKOLIŠA

GENOTOXICITY TESTS IN BIOMONITORING OF THE ENVIRONMENT

SEMINARSKI RAD

Anja Sima Cota
Preddiplomski studij znanosti o okolišu
(Undergraduate Study of Environmental Sciences)
Mentor: dr. sc. Mirjana Pavlica

Zagreb, 2016.

SADRŽAJ

1. UVOD 2
2. GENOTOKSIČNOST TVARI 2
3. PREDMETI ISTRAŽIVANJA 3
4. TEST ORGANIZMI 4
5. TESTOVI GENOTOKSIČNOSTI 5
   5.1 TEST KROMOSOMSKIH ABERACIJA 5
   5.2 KOMET-TEST 7
   5.3 MIKRONUKLEUS TEST 8
   5.4 OSTALI TESTOVI 10
6. ULOGA U BIOMONITORINGU OKOLIŠA 11
7. ZAKLJUČAK 12
8. LITERATURA 14
9. SAŽETAK 17
10. SUMMARY 17

1. UVOD

Od davnih vremena povijesti čovječanstva, moguće je pratiti razvoj korištenja raznih kemikalija za najrazličitije svrhe: liječenje raznih povreda i bolesti, proizvodnju hrane, pročišćavanje vode, osiguravanje isplativog poljoprivrednog uroda, itd., ali se ideja o potencijalnim štetnim učincima korištenih tvari javila relativno kasno. Začeci moderne toksikologije pojavili su se tek u prvim desetljećima 19. stoljeća, kada su moguće štetne posljedice za okoliš i čovjeka postale javna briga (Thompson, 2005).

Opaženo je da postoji nekoliko vrsta toksičnosti tvari, a genotoksičnost se pokazala izuzetno zabrinjavajućom zbog činjenice da izaziva oštećenja genetičkog materijala. Genetička toksikologija je kao znanstvena disciplina priznata 1969. godine kada Alexander Hollaender i nekoliko svjetski priznatih genetičara upozoravaju na mogući negativni učinak kemikalija na genetički materijal organizama (Brusick, 1987).

Danas je opće je poznato da promjene genetičkog materijala organizma mogu dovesti do poremećaja u normalnom funkcioniranju jedinke, izazivajući tumore i razne druge bolesti. Ukoliko su oštećene germinativne stanice, šteta će utjecaj imati ne samo na jedinku, već i na njeno potomstvo, bilo prijenosom oštećenja na potomke, bilo smanjenjem fertilnosti jedinke, što će dovesti do smanjenja populacije.

Genetička toksikologija kroz relativno kratko razdoblje razvija cijeli spektar testova sa mnogobrojnim modifikacijama za što bolje procjenjivanje učinka genotoksičnosti tvari na biološku komponentu okoliša. U današnjem svijetu, ovi testovi postali su nezaobilazan element u zaštiti ljudi i okoliša.

2. GENOTOKSIČNOST TVARI

Genotoksičnost je definirana kao sposobnost tvari da izazove oštećenje molekule DNA (engl. **d**eoxy**r**ibonucleic **a**cid) organizma. Genotoksične tvari uključuju zračenja i kemijske tvari (Shah, 2012).

Interakcija genotoksične tvari s genetičkim materijalom može uzrokovati: aneuploidiju (promjena broja pojedinačnih kromosoma; dodatak ili gubitak kromosoma),

klastogenezu (gubitak dijela kromosoma) te mutagenezu (delecija ili adicija malog broja parova baza) (Timbrell, 2004.).

Molekula DNA u stanici kontrolira sve procese i osobine, te je zbog toga njezin integritet ključan za normalno funkcioniranje. Upravo iz tog razloga, stanice razvijaju nekoliko mehanizama za preveniranje ekspresije mutacija.

Oštećenje molekule DNA može biti popravljeno ekscizijskim popravkom, što uključuje uklanjanje oštećenog segmenta enzimima i sintezu novog lanca pri čemu se koristi komplementarni lanac kao kalup (Timbrell, 2004). Za 'vraćanje na staro' potreban je protein/enzim koji će prepoznati oštećenje DNA i katalizirati popravak, te tako vratiti molekulu u početno stanje (Memisoglu i Samson, 2001). To se obavlja, primjerice, popravkom alkilirajućih oštećenja pomoću enzima alkiltransferaza i dioksigenaza (Eker i sur., 2009). Postreplikacijski popravak odvija se nakon replikacije, a također se oslanja na sistem ekscizije, odnosno izrezivanje krivo sparenih baza.

Dok jednostanični organizmi na ovaj tip oštećenja odgovaraju isključivo mehanizmima popravka DNA, stanice višestaničnih organizama, u slučaju da je popravak molekule neisplativ, imaju i mogućnost apoptoze, tj. programirane stanične smrti (Norbury i Zhivotovsky, 2004).

3. PREDMETI ISTRAŽIVANJA

Područje istraživanja genetičke toksikologije zaista je raznovrsno. Kao najviše istraživani problemi ističu se djelovanje ionizirajućeg zračenja, čija su istraživanja bila od posebnog značaja nakon nuklearnih nesreća u Černobilu (1987.) i Fukushimi (2011.), te djelovanje različitih organskih tvari (npr. benzen, etilen oksid, formaldehid, itd.) (Bonassi i sur., 2005). Od anorganskih tvari, teški metali predstavljaju za istraživanje vrlo zanimljivu i kompleksnu skupinu mutagena, zbog činjenice da unutar stanice mogu imati nekoliko 'meta' (Mateuca i sur., 2006).

U današnje vrijeme, sve se više istražuju pesticidi, koji će, zbog svog kompleksnog kemijskog sastava koji im omogućuje dugo zadržavanje u okolišu, predstavljati problem još dugo vremena. Genetička oštećenja rezultat su izloženosti velikoj količini

pesticida s kojom se danas susrećemo, uzevši u obzir njihovo intenzivno korištenje i/ili često nedovoljne mjere zaštite (Bolognesi, 2003).

4. TEST ORGANIZMI

Izbor test organizma ovisi o samome testu te o vrsti testa koji se izvodi. U ovim istraživanjima moguće je korištenje različitih organizama, od jednostaničnih prokariota (bakterije), do jednostaničnih (kvasci) i višestaničnih eukariota poput biljaka, školjkaša i riba, i sisavaca.

Testovi genotoksičnosti koji koriste bakterije su brzi, lako izvedivi, široko primjenjivi, visoko osjetljivi i lako ponovljivi. Od otkrića *Salmonella* mikrosomalnog testa mutagenosti ili Ames-testa u sedamdesetim godinama prošlog stoljeća, ovaj aspekt testiranja genotoksičnosti se brzo razvija (Reifferscheid i Buchinger, 2010).

U testovima genotoksičnosti koriste se često animalni modeli koji na izloženost genotoksičnom djelovanju reagiraju slično kao ljudi. Najčešće su to sisavci, a izbor modelnog organizma ovisi o dva faktora: anatomska i fiziološka sličnost ljudskom organizmu te ekonomska isplativost. Najčešće se koriste glodavci, a posebna istraživanjima ponekad zahtijevaju testiranje čak i na primatima (Brusick, 1987). Danas se *in vivo* testovi sve više smatraju nehumanima, te se zbog zaštite prava životinja i bioetike sve češće koriste samo testovi na kulturama animalnih stanica. Prednost ovog tipa testova jest činjenica da se na ovaj način se mogu testirati ne samo životinjske, već i ljudske stanice.

Za monitoring vodenih okoliša, najčešće se koriste beskralježnjaci i kralježnjaci pa su tako školjkaši i ribe jeftin, pouzdan, visoko osjetljiv i ekonomičan odabir (Osman, 2014).

Biljke su također izvrstan izbor test organizama. Allium-test je najpopularniji biljni test genotoksičnosti, zbog malog broja velikih kromosoma vrste *Allium cepa* (2n=16), te prisutnosti sistema miješanih oksidaza, što je povoljno u detekciji promutagena kao i zbog primjenjivosti dobivenih rezultata na ljudski organizam. Promutageni su tvari koje se pod utjecajem staničnog metabolizma pretvaraju u mutagene (Leme i

Marin-Morales, 2009).

Osim običnog crvenog luka *A. cepa*, češnjaka *A. sativum* i dr. u Allium-testu se koriste i druge biljne vrste poput boba, *Vicia faba*; kukuruza, *Zea mays*; *Tradescantia sp*., duhana, *Nicotiana tabacum*; vrste *Crepis capillaris*, ječma, *Hordeum vulgare* i dr. Ono što biljke čini pogodnima za korištenje u ovim testovima jest niska cijena, lako rukovanje i kratko trajanje testa (Leme i Marin-Morales, 2009). Također, biljke se osim testiranja genotoksičnih tvari u laboratoriju, mogu koristiti i u prirodnom okolišu; primjerice, ako biljke uzgajamo na kontaminiranom području na taj način ih izlažemo realnim uvjetima okoliša.

5. TESTOVI GENOTOKSIČNOSTI

Osnovna ideja testova genotoksičnosti jest da će odgovor promatranog organizma na izloženost genotoksičnoj tvari biti reprezentativan i primjenjiv za ostale organizme koji žive u kontamiranom području. Još uvijek nije razrađen test koji bi predstavljao sve biološke skupine u ekosistemu (Thompson, 2005).

Testovi genotoksičnosti mogu se izvoditi u uvjetima *in vivo* i *in vitro*. *In vitro* testovi se izvode u laboratorijskim, kontroliranim uvjetima izvan živog organizma, na staničnim kulturama. Jedan od glavnih nedostataka ovoga testa je nemogućnost stvaranja uvjeta identičnih onima u živom organizmu (uvjeti *in vivo*). Zbog toga može doći do odstupanja rezultata u živom organizmu i *in vitro* testu (http://mpkb.org).

Generalno gledajući, svaki test genotoksičnosti mora zadovoljiti nekoliko kriterija: rezultati testa moraju biti primjenjivi na ljude, test treba biti ponovljiv, ekonomičan i jednostavan, a kao modelni organizmi poželjni su oni s kratkim životnim ciklusom, kako bi vrijeme izvođenja testa bilo što kraće.

Razvojem genetičke toksikologije, nastao je cijeli niz testova genotoksičnosti za potrebe biomonitoringa odnosno praćenja stanja okoliša na različitim razinama biološke organizacije, a u ovom radu navedeno je nekoliko najčešće korištenih testova genotoksičnosti.

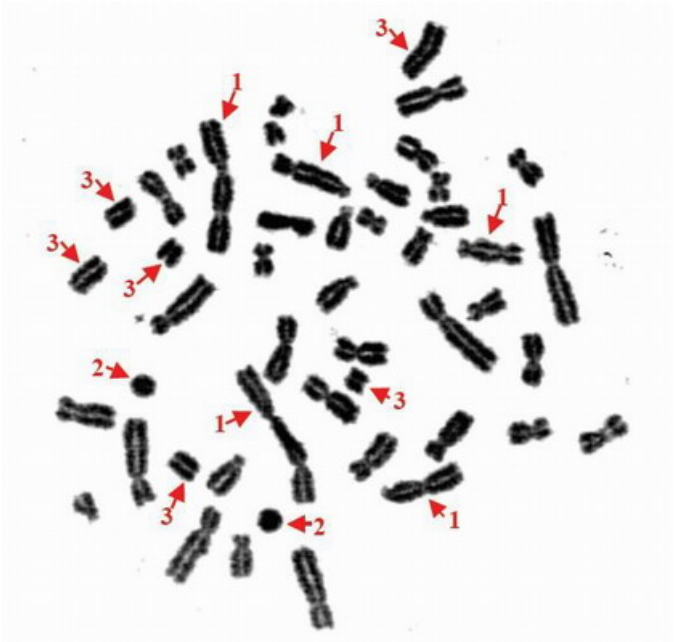
5.1 TEST KROMOSOMSKIH ABERACIJA

Kromosomske aberacije su sve promjene u strukturi kromosoma koje mogu nastati spontano ili kao rezultat izloženosti zračenjima ili kemijskim genotoksinima. U ovom testu, mitoza se zaustavlja u metafazi mitotičkim inhibitorom kolhicinom, te se promatraju promjene strukture kromosoma.

Kromosomske aberacije koje se evidentiraju ovim testom jesu: prstenasti ili ring kromosom (promjerice dva kromosoma čiji su se krajevi zalijepili te nastaje prstenasti oblik kromosoma), acentrik (kromosom koji nema centromere, nastao lomom) te dicentrik (kromosom sa dvije centromere, nastao spajanjem ljepljivih krajeva dva kromosoma) (slika 1).

Test kromosomskih aberacija u limfocitima periferne krvi koristi se već 30 godina kao biomarker izloženosti genotoksičnim kancerogenim tvarima. Povećana frekvencija kromosomskih aberacija predstavlja povećani rizik od nastanka raka (Mateuca i sur., 2006).

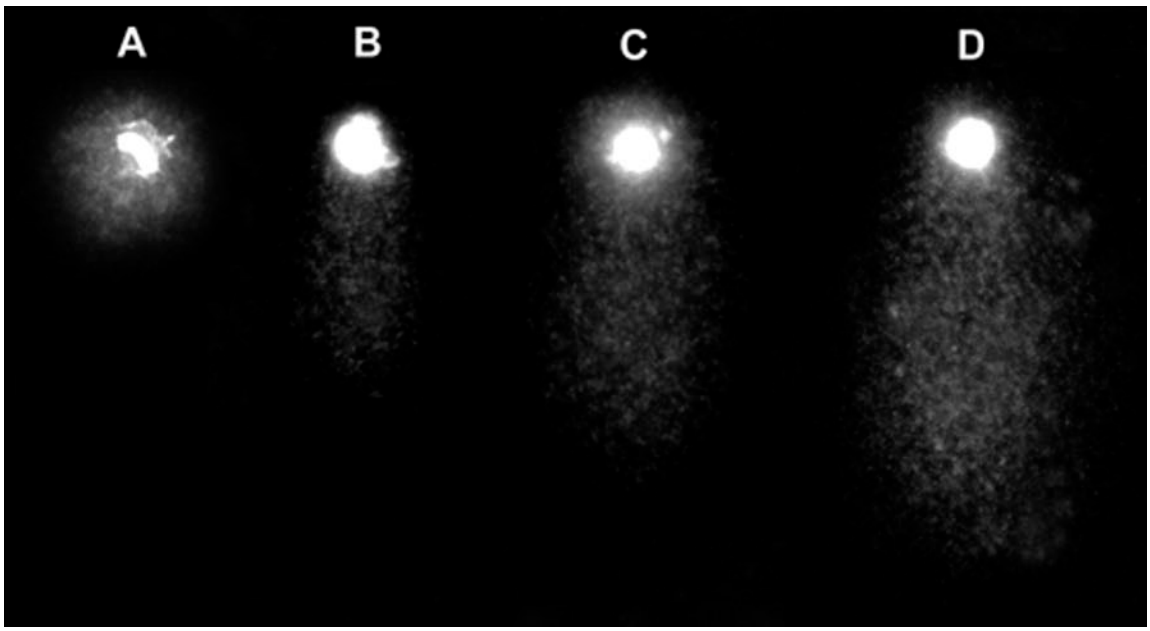
Ovaj test koristi se u uvjetima *in vivo*, u koštanoj srži glodavaca, i *in vitro*, koristeći kulturu ljudskih limfocita (Mateuca i sur., 2006). Za ljude je od posebnog značaja jer se koristi za kontrolu profesionalne izloženosti.



Slika 1: Reprezentativna slika kromosomskih aberacija: dicentrika (1), ring kromosoma (2) i acentrika (3). Uzorak je dobiven iz limfocita osoba izloženih visokim koncentracijama ^{60}Co (preuzeto iz: Cao i sur., 2013).

5.2 KOMET-TEST

Ovaj test svoje ime duguje karakterističnom obliku jezgre koji podsjeća na komet (slika 2). Komet-test je mikrogel elektroforeza jezgara u kojoj oštećena DNA migrira prema anodi. To je vidljivo u obliku 'repa' kometa, koji predstavlja segmente oštećene DNA. Po njemu je moguće zaključiti koliki je stupanj oštećenja DNA - što je rep duži, oštećenje je veće. Neoštećena DNA vidljiva je u obliku glave kometa (slika 2A).

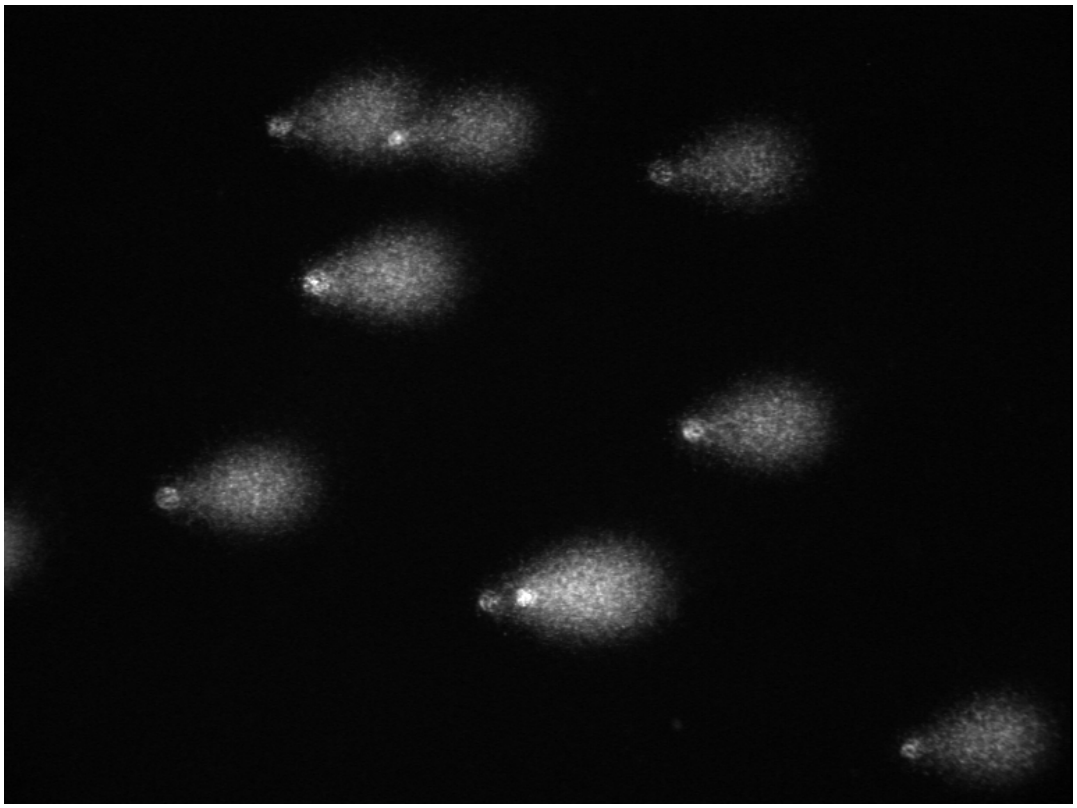


Slika 2: Jezgre HeLa stanica nakon komet testa. Slika prikazuje jezgre bez oštećenja (A), te jezgre s različitim stupnjem oštećenja; blago (B), umjereno (C) i teško oštećenje (D) (preuzeto sa: http://jhc.sagepub.com/).

Komet-testom je, osim jednolančanih i dvolančanih lomova molekule DNA, te alkalno labilnih mjesta koja prelaze u lom, moguće detektirati i staničnu smrt, odnosno apoptozu. Apoptoza se očituje u karakterističnom obliku kometa s malom glavom i velikim repom (slika 3) (Tice i sur., 2000).

Komet-test se danas sve više koristi u biomonitoringu. Mogućnost primjene na različita tkiva i/ili stanice, visoka osjetljivost, potreba za malim brojem stanica po uzorku, te kratko trajanje testa i jednostavan protokol prednosti su ovog testa (Brendler-Schwaab, 2005).

Izvođenje testa moguće je u uvjetima *in vitro* (na stanicama uzgojenim u kontroliranim uvjetima u laboratoriju) ili u uvjetima *in vivo* (uzorak iz živog organizma). Ovisno o uzorku koji se promatra i oštećenju koje se detektira, moguće je mijenjati uvjete izvođenja testa, kao što su vrijednost pH, koncentracija agaroze i uvjeti elektroforeze (vrijeme, temperatura i voltaža) (Collins i sur., 2014).



Slika 3: Reprezentativna slika stanica/jezgara u apoptozi detektiranih komet testom. (preuzeto sa: https://microbiology.utmb.edu)

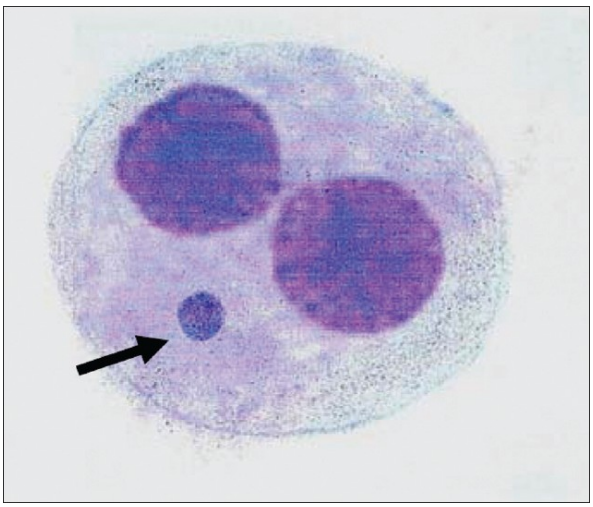
5.3 MIKRONUKLEUS TEST

Mikronukleus (Howell–Jolly tjelešce) je acentrični kromosomski fragment ili

cijeli kromosom koji je zaostao nakon mitoze te se vidi u citoplazmi stanice kćeri tijekom interfaze kao mala dodatna jezgra. Mikronukleusom se detektira aneugeni ili klastogeni učinak. Tvari s aneugenim učinkom djeluju na diobu stanice i diobeno vreteno, te dovode do aneuploidije (Luzhna i sur., 2013). Primjerice, nepravilnom diobom može doći do gubitka kromosoma, te jedna stanica kćer postaje monosomik, a druga ostaje normalna. Taj 'izgubljeni' kromosom može se vidjeti kao mikronukleus u interfazi stanice kćeri (Parry i sur., 2002). Tvari s klastogenim učinkom mijenjaju strukturu kromosoma. U ovom slučaju, mikronukleus je acentrik nastao uslijed lomova kromosoma. Klastogeni mehanizam nastajanja mikronukleusa još uvijek se detaljno istražuje, a vjeruje se da će bolje poznavanje interakcije gena za različite frekvencije mikronukleusa pomoći u biomonitoringu bolesti i predviđanju efekata genotoksičnih tvari (Luzhna i sur., 2013).

Izvođenje ovog testa moguće je također u uvjetima *in vivo* i *in vitro*, a test je popularan zbog brzog izvođenja i lake detekcije/analize. Velika frekvencija mikronukleusa u bijelim krvnim stanicama čovjeka indicira oštećenu slezenu ili 'odsutnu' slezenu (Nagarathna i sur., 2013), odnosno slezenu koja je ili u potpunosti odsutna ili ne obavlja svoje uobičajene funkcije (http://emedicine.medscape.com).

Vjeruje se da mikronukleusi predstavljaju inicijalnu fazu u razvoju genomske nestabilnosti i tumorigeneze. Jedinke koje imaju predispozicije za rak lakše formiraju mikronukleuse, što ovu metodu čini pogodnom za predviđanje nastanka te bolesti. (Luzhna i sur., 2013).



Slika 3: Reprezentativna slika mikronukleusa. Limfociti periferne krvi, obojeni Giemsa bojom. Strelica pokazuje mikronukleus (preuzeto iz: Kabalar i sur., 2012).

5.4 OSTALI TESTOVI

Zbog svojih mnogobrojnih prednosti, komet-test, test kromosomskih aberacija i mikronukleus-test najčešće su korišteni testovi u ovoj grani toksikologije, no osim njih postoji još mnogo testova za detekciju genotoksičnosti.

Test izmjene sestrinskih kromatida (SCE, engl. **s**ister **c**hromatid **e**xchange) je biomarker učinka, a uključuje detekciju simetrične i aismetrične izmjene sestrinskih kromatida jednog kromosoma tijekom S faze, a najčešće se koriste stanice ljudskih limfocita periferne krvi. Kako bi izmjena sestrinskih kromatida bila vidljiva, potrebno je koristiti BrdU (bromodeoksiuridin), analog timina. Izmjene sestrinskih kromatida povezane su s rekombinacijskim popravkom.

Stanice se uzgajaju na bromdeoksiuridinu kroz dva stanična ciklusa. U prometafazi druge mitoze dodaje se inhibitor (primjerice kolcemid) koji sprječava formaciju diobenog vretena. U drugoj metafazi, kromatida u kojoj je ugrađen bromdeoksiuridin je svijetla, a druga je tamna, te su njihove izmjene dobro vidljive (slika 4) (http://www.crios.be). Vizualizacija izmjena kromatida omogućena je flourescentnim bojama, Giemsa bojom ili tvarima koje imunološkim reakcijama mogu detektirati BrdU (Latt i Schreck, 1980). Veliki nedostaci ovog testa su dužina trajanja i nemogućnost detekcije mutacija (http://www.crios.be). Ipak metoda je osjetljivija od metode analize kromosomskih aberacija.

Slika 4: Reprezentativna slika izmjenjenih sestrinskih kromatida (označeno strelicom) u stanici izloženoj testu izmjene sestrinskih kromatida (preuzeto iz: Priya i sur., 2014).

UmuC-test je bakterijski test koji se temelji na činjenici da tvari koje oštećuju DNA induciraju ekspresiju umu operona, koji je odgovoran za mutagenezu. *UmuC* gen je spojen sa genom *lacZ* koji kodira sintezu enzima ß galaktozidaze - to znači da je njegovu ekspresiju moguće mjeriti upravo pomoću aktivnosti ß galaktozidaze, koja se detektira spektrofotometrijski (Oda i sur., 1985).

SOS kromo-test djeluje na principu sličnome umuC testu. *LacZ,* gen za sintezu ß galaktozidaze, zbog fuzije operona nalazi se pod kontrolom *sfiA* gena. Ovaj bakterijski test baziran je na genotoksinima koji induciraju SOS odgovor na oštećenja bakterijske DNA tj. funkciju sftA, seriju događaja u stanici kao što su popravci i mutagene aktivnosti stanice, indukciju profaga i zaustavljanje diobe stanice, i to u roku od samo nekoliko sati. U SOS kromo-testu aktivnost ß galaktozidaze mjeri se jednostavnim kolorimetrijskim testom (Quillardet i sur., 1982).

Allium test se, osim za detekciju citogenetičkih promjena kao što su kromosomske aberacije, može koristiti i za detekciju citotoksičnog učinka analizom mitotskog indeksa i inhibicije rasta korjenčića te promjene njihove morfologije (Liman i sur.,

2011).

6. ULOGA U BIOMONITORINGU OKOLIŠA

Biomonitoring je praćenje stanja u okolišu na razini ekosistema, zajednice, populacije, jedinke, tkiva ili stanice, te mjerenje utjecaja ksenobiotika na osobine organizma (npr. mortalitet, nastanak tumora, genetičke promjene itd.). Biomarkeri su mjerljivi signali prisutnosti tih potencijalno toksičnih ksenobiotika, te su kao takvi koristan alat za procjenjivanje izloženosti i učinka koje toksične tvari imaju na stanične i biokemijske procese (Picado i sur., 2007). Mogu se podijeliti u dvije generalne kategorije, biomarkere izloženosti i biomarkere učinka.

Biomarkeri izloženosti su produkti intergracije ksenobiotika i mete koja može biti ili molekula ili stanica unutar organizma. Oni se koriste kako bi se predvidjela doza izloženosti koja rezultira oštećenjem ili bolešću. Biomarkeri učinka su mjerljive biokemijske, fiziološke i druge promjene u organizmu koje se javljaju kao odgovor organizma na izloženost toksičnoj tvari (Hamza-Chaffai, 2014).

U današnje vrijeme, testovi genotoksičnosti dio su gotovo svih aspekata biomonitoringa.

Oni se koriste za procjenjivanje kancerogenosti novih tvari (npr. lijekova i pesticida) prije izlaska na tržište, te kontrolu tvari koje su već na tržištu. Pozitivan rezultat testova genotoksičnosti tvar definira kao genotoksičnu ili mutagenu, te dovodi do njezina povlačenja sa tržišta (Nagarathna i sur.l, 2013).

Kako narušeni intergritet molekule DNA često dovodi do nastajanja raka, mnogi testovi genotoksičnosti (npr. Ames- test, različiti *in vitro* i *in vivo* testovi mutagenosti i genotoksičnosti...) razvijeni su upravo kako bi se detektirala sposobnost tvari da izazove oštećenje DNA koje bi moglo potaknuti nastajanje raka (Nagarathna i sur., 2013).

Pravilnim i pravovremenim monitoringom genotoksičnih tvari moguće ih je ili ukloniti iz naše okoline, ili njihov efekt minimalizirati. U tu svrhu koriste se antiklastogeni, tj. antimutageni (tvari koje suprimiraju ili inhibiraju mutagenezu djelujući na mehanizam

diobe stanice) i dezmutageni (tvari koje uništavaju ili inaktiviraju mutagene te stoga oštećuju manji broj stanica) (Nagarathna i sur., 2013).

Testovima genotoksičnosti može se također analizirati okoliš i populacije koje ga nastanjuju nakon nuklearnih katastrofa (Fukushima i Černobil), te različita staništa kontaminirana genotoksinima.

7. ZAKLJUČAK

Uzevši u obzir današnji tempo života i razvoja znanosti, život bez testova genotoksičnosti je nezamisliv. Osnovna uloga ovih testova je zaštita ljudskog genetičkog materijala od oštećenja te preveniranje nastanka bolesti. Rezultati testova genotoksičnosti omogućavaju bolju kontrolu ispuštanja genotoksičnih tvari u okoliš te igraju bitnu ulogu u monitoringu profesionalne izloženosti zračenju i ostalim genotoksičnim tvarima. Oni se vrlo često izvode na životinjama te predstavljaju osjetljiv alat za monitoring genotoksičnosti u nekom okolišu. Primjerice, školjkaši akumuliraju polutante u svoja tkiva bez pokazivanja vidljivog štetnog učinka (Hamza-Chaffai, 2014), te je pomoću njih moguće obavljati monitoring voda. Za biomonitoring tla, moguće je koristiti *Lumbricidae* (gujavice) koje se kreću kroz tlo te daju i vremensku (akumulacija) i prostornu informaciju o toksičnim tvarima (Lapuente i sur., 2015).

Prednosti ovih testova su evidentne, a jedna od najvećih mana jest činjenica da mogu detektirati oštećenje DNA, ali često ne i pravog uzročnika tog oštećenja. Oni su danas neizostavni u biomonitoringu okoliša, te je sigurno da će se nastaviti razvijati i poboljšavati osiguravajući bolju kvalitetu života.

8. LITERATURA

1. Bolognesi C., 2003.: Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies, *Mutation Research* 543, 251–272
2. Bonassi, S:, Ugolini, D., Kirsch-Volders, M., Strömberg, U., Vermeulen, R., Tucker, J. D., 2005.: Human population studies with cytogenetic biomarkers: review of the literature and future prospectives, *Environmental and Molecular Mutagenesis* 45, 258–270
3. Brendler-Schwaab, S., Hartmann, A., Pfuhler, S., Speit, G., 2005.: The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing, *Mutagenesis* vol. 20, 245–254
4. Brusick, D., 1987.: Principles of Genetic Toxicology, Plenum Press, New York, 1–13
5. Cao, J., Zhang, J., Wang, Y., Du, L. Q., Xu, C., Wang, Q., Liu, J. X., Su, X., Fan, F. Y., Liu, Q., Fan, S. Y., 2013.: Cytogenetic Abnormalities in Lymphocytes from Victims Exposed to Cobalt-60 Radiation, *International Journal of Molecular Sciences* 14, 17525–17535
6. Collins, A. R., Yamani, N. E., Lorenzo, Y., Shaposhnikov, S., Brunborg, G., Azqueta, A., 2014.: Controlling variation in the comet assay, *Frontiers in Genetics* 5, 1–7
7. Eker A. P. M., Quayle C., Chaves I., van der Horst G. T. J., 2009.: DNA Repair in Mammalian Cells: Direct DNA damage reversal: elegant solutions for nasty problems, *Cellular and Molecular Life Sciences* 66, 968–980
8. Hamza-Chaffai, A., 2014.: Usefulness of Bioindicators and Biomarkers in Pollution Biomonitoring, *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries* 3, 19–26
9. Kabalar, M. E., Karaman, A., Aylu, B., Özmen, A. S., Erdem, I., 2012.: Genetic alterations in benign, preneoplastic and malignant breast lesions, *The Indian Journal of Pathology and Microbiology* 55, 319–325
10. Lapuente, J., Lourenço, J., Mendo, S. A., Borràs, M., Martins, M. G., Costa, P. M.,

Pacheco, M., 2015.: The Comet Assay and its applications in the field of ecotoxicology: a mature tool that continues to expand its perspectives, *Frontiers in Genetics* 6, 1–20

11. Latt, S., Schreck, R. R., 1980.: Sister Chromatid Exchange Analysis, *The American Journal of Human Genetics* 32, 297–313
12. Leme, D. M., Marin-Morales, M. A., 2009.: Allium cepa test in environmental monitoring: A review on its application, *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 682, 71–81
13. Liman, R., Ciğerci, I. H., Akyıl, D., Eren, Y., Konuk, M., 2011.: Determination of genotoxicity of Fenaminosulf by Allium and Comet tests, *Pesticide Biochemistry and Physiology* 99, 61–64
14. Luzhna, L., Kathiria, P., Kovalchuk, O., 2013.: Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond, *Frontiers in Genetics* 131
15. Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P. V., Decordier, I., Kirsch-Volders, M., 2006.: Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring, Biochimie 88, 1515–1531
16. Memisoglu, A., Samson, L. D. 2001.: DNA Repair by Reversal of Damage, eLS.
17. Nagarathna, P.K.M., Johnson W. M., Reddy, P. S., Reena, K., 2013.: Review on Genotoxicity, its Molecular Mechanisms and Prevention, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 22, 236–243
18. Norbury, C. J., Zhivotovsky, B., 2004.: DNA damage-induced apoptosis, *Oncogene* 23, 2797–2808
19. Oda, Y., Nakamura, S., Oki, I., Kato, T., Shinagawa, H., 1985.: Evaluation of the new system (umu-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens, *Mutation Research* 147, 219–229
20. Osman, A. G. M., 2014.: Genotoxicity Tests and Their Contributions in Aquatic Environmental Research, *Journal of Environmental Protection* 5, 1391–1399
21. Parry, E. M., Parry, J. M., Corso, C., Doherty, A., Haddad, F., Hermine, T. F., Johnson, G., Kayani, M., Quick, E., Warr, T., Williamson, J., 2002.: Detection and characterization of mechanisms of action of aneugenic chemicals, *Mutagenesis* 6, 509–521

22. Picado, A., Bebianno, M. J., Costa, M. H., i sur., 2007.: Biomarkers: a strategic tool in the assessment of environmental quality of coastal waters, *Hydrobiologia* 587, 79–87
23. Priya, E. L., Ranganathan K., Rao U. D. K., Elizabeth, J., George, M. D., Kavitha, W., 2014.: A study of sister chromatid exchange in patients with dental amalgam restorations, *Indian Journal of Dental Research* 25, 772–776
24. Quillardet, P., Huisman, O., D'Ari, R., Hofnung, M., 1982.: SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in Escherichia coli K-12 to measure genotoxicity, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 79, 5971–5975
25. Reifferscheid, G., Buchinger, S., 2010.: Cell-based genotoxicity testing: genetically modified and genetically engineered bacteria in environmental genotoxicology, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 118, 85–111
26. Shah, S. U., 2012.: Importance of Genotoxicity & S2A guidelines for genotoxicity testing for pharmaceuticals, *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences* 1, 43–54
27. Thompson K. C., Wadhia K., Loibner A. P., 2005.: Environmental Toxicity Testing, CRC Press, Boca Raton, Florida, 2–10
28. 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
29. Timbrell, J., 2004.: Principles of Biochemical Toxicology, Taylor & Francis e-Library, 233–243
30. http://www.crios.be/genotoxicitytests/sister_chromatid_exchange_test.htm
31. http://emedicine.medscape.com/article/885226-overview
32. http://jhc.sagepub.com/content/59/7/655/F2.expansion.html
33. https://microbiology.utmb.edu/tccf/services/comet.html
34. http://mpkb.org/home/patients/assessing_literature/in_vitro_studies

9. SAŽETAK

Sa brzim industrijskim i tehnološkim napretkom čovječanstva, naš okoliš i živi organizmi koji ga nastanjuju su izloženi različitim vrstama toksičnosti; najzabrinjavajuća je genotoksičnost zbog svoje sposobnosti da izazove štetu genetičkog materijala koja se, ovisno o stanici u kojoj nastaje, može prenijeti na sljedeće generacije. Potreba za monitoringom genotoksičnosti prepoznata je u dvadesetom stoljeću i od tada se razvio cijeli spektar izuzetno efikasnih testova genotoksičnosti.

U ovome radu izložen je kratki pregled najkorištenijih testova genotoksičnosti i njihovih svojstava, te je objašnjena njihova uloga u biomonitoring okoliša.

10. SUMMARY

With the rapid industrial and technological development of the human race, our environment and living organisms inhabiting it are exposed to various kinds of toxicities; genotoxicity being the most concerning due to its ability to cause damage of genetic material, which can, depending on the cell affected, be passed onto the next generation. The need for genotoxicity to be monitored has been recognised in the 20th century, and since then a whole spectrum of extremely effective genotoxicity tests has been developed.

In this work, a short review of the most used genotoxicity tests and their properties has been presented, along with the explanation of their role in biomonitoring of the environment.