

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Maja Kesić

CJELOVITOST DNA U STANICAMA LISTA I KORIJENA BOBA KAO POKAZATELJ
GENOTOKSIČNOSTI TALIJEVA(I) ACETATA

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 pod pomoćnim vodstvom dipl. inž. Petre Cvjetko. Predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja prof. biologije i kemije.

Najsrdačnije zahvaljujem prof. dr. sc. Mirjani Pavlica na strpljenju, pomoći i korisnim savjetima pri izradi diplomskog rada.

Posebno zahvaljujem dipl. inž. Petri Cvjetko na pomoći tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem i svojoj obitelji na podršci i razumijevanju tokom svih godina studija. Bez Vas ne bih bila ono što sam danas.

Maja

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

CJELOVITOST DNA U STANICAMA LISTA I KORIJENA BOBA KAO POKAZATELJ GENOTOKSIČNOSTI TALIJEVA(I) ACETATA

Maja Kesić

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

SAŽETAK

Talij je toksičan metal koji se iz okoliša može apsorbirati pomoću biljaka pa ugradnjom u hranidbene lance postaje dostupan višim organizmima uključujući i čovjeka. Razlog visoke toksičnosti talija leži u njegovom visokom afinitetu prema amino-, imino- i sulfidrilnim skupinama enzima te kemijskoj sličnosti kaliju.

Cilj ovog rada bio je istražiti primjenjivost celularnog komet-testa kao nespecifičnog biomarkera genotoksičnosti izlaganjem biljke *Vicia faba* L. različitim koncentracijama teškog metala talija u obliku talijeva(I) acetata. Da bi se potvrdila osjetljivost komet-testa korišten je modelni genotoksikant vodikov peroksid koji je na jezgrama stanica boba u uvjetima *in vitro* pokazao direktno genotoksično djelovanje. Biljke boba tri su dana izlagane u uvjetima *in vivo* različitim koncentracijama talijeva(I) acetata. Nakon tri dana talij(I) acetat izazvao je blago oštećenje molekule DNA u listu dok su oštećenja u korijenu bila nešto veća. Oštećenje DNA linearno je raslo s porastom koncentracije talija. Kako bi utvrdili mogući mehanizam djelovanja talija na molekulu DNA napravljen je i acelularni komet-test u uvjetima *in vitro* na jezgrama lista boba. Razlika u rezultatima dobivenim acelularnim i celularnim komet-testom ukazuje na indirektno oštećenje DNA uzrokovano talij(I) acetatom.

(32 stranica, 16 slika, 23 litaraturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici Biološkog odsjeka PMF-a, Rooseveltov trg 6

Ključne riječi: genotoksičnost/ komet-test/ talij(I) acetat/ vodikov peroksid/ *Vicia faba* L.

Voditelj: Prof. dr. sc. Mirjana Pavlica, izvanredni profesor

Pomoćni voditelj: Petra Cvjetko, dipl.ing.

Ocjenjivači: Prof. dr. sc. Mirjana Pavlica

Prof. dr. sc. Ines Radanović

Prof. dr. sc. Tajana Preočanin

Prof. dr. sc. Dubravka Matković-Čalogović

Rad prihvaćen: 14. Listopada 2009.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

DNA INTEGRITY IN BROAD BEAN LEAF AND ROOT CELLS AS AN INDICATOR OF THALLIUM(I) ACETATE GENOTOXICITY

Maja Kesić

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

ABSTRACT

Thallium is a toxic metal that can be absorbed from the environment by plants and embedding in the food chain becomes available for higher organisms including man. The reason for the high toxicity of thallium lies in its high affinity for amino-, imino- and sulfhydryl groups of enzymes and chemical similarity with potassium.

The goal of this work was to examine the applicability of the cellular comet assay as a non-specific genotoxicity biomarker exposing plants *Vicia faba* L. to a different concentrations of heavy metal thallium as thallium(I) acetate. In order to verify the comet assay sensitivity, hydrogen peroxide was used as a model genotoxicant, in *in vitro* conditions showing a direct genotoxic effect on broad bean cell nuclei. Broad bean plants were *in vivo* exposed to different concentrations of thallium(I) acetate for three days. After that period thallium(I) acetate caused mild damage to DNA molecules of broad bean leaves and greater damage to the root. DNA damages grew linearly as the concentration of thallium increased. An acellular comet assay was performed *in vitro* on broad bean leaf nuclei to determine possible mechanisms of thallium effects on DNA. The difference in TI-induced genotoxicity following both acellular and cellular exposure implies indirect DNA damage.

(32 pages, 16 figures, 23 references, original in Croatian language)

These deposited in Central biological library of Biology Department, Rooseveltov trg 6.

Keywords: genotoxicity/ comet-assay/ thallium(I) acetate/ hydrogen peroxide/ *Vicia faba* L.

Supervisor: Dr. Mirjana Pavlica, Assoc. Prof.

Assistant Supervisor: Petra Cvjetko, dipl. ing.

Reviewers: Mirjana Pavlica, PhD, Assist. Prof.

Ines Radanović, PhD, Assist. Prof.

Tajana Preočanin, PhD, Assoc. Prof.

Dubravka Matković-Čalogović, PhD, Full Prof.

Thesis accepted: October 14, 2009

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1. 1. BIOTESTOVI	2
1.1.1. GENOTOKSIČNOST	2
1.2. TEŠKI METALI	2
1.3. TALIJ	5
1.4. EKOTOKSIKOLOGIJA I BIOMONITORING	6
1.4.1. BIOMARKERI	8
1.5. KOMET-TEST	9
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	12
3. MATERIJAL I METODE	13
3.1. POKUSNI ORGANIZAM	13
3.1.1. BOB (<i>Vicia faba L.</i>)	13
3.2. TALIJEV(I) ACETAT	14
3.3. METODE	14
3.3.1. UZGOJ BOBA U KULTURI U UVJETIMA <i>in vitro</i>	14
3.3.2. IZLAGANJE BOBA TALIJEVOM(I) ACETATU U UVJETIMA <i>in vivo</i>	15
3.3.3. KOMET-TEST	16
3.3.3.1. IZLAGANJE BOBA TALIJEVOM(I) ACETATU U UVJETIMA <i>in vitro</i>	19
3.3.3.2. IZLAGANJE BOBA VODIKOVOM PEROKSIDU U UVJETIMA <i>in vitro</i>	19
3.3.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	20
4. REZULTATI	21
4.1. IZLAGANJE BOBA TALIJEVOM(I) ACETATU U UVJETIMA <i>in vivo</i>	21
4.2. IZLAGANJE JEZGRI BOBA U UVJETIMA <i>in vitro</i>	23
5. RASPRAVA	26
6. ZAKLJUČAK	30
7. LITERATURA	31

POPIS KRATICA I SIMBOLA

DDT	1,1,1-triklor-2,2-bis(p-klorfenil)etan
DMSO	dimetil sulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
EtBr	etidijev bromid
EDTA	etilendinitrotetraoctena kiselina
H ₂ O ₂	vodikov peroksid
KOH	kalijev hidroksid
LMP	agaroz niskog tališta
NaCl	natrijev klorid
NaOH	natrijev hidroksid
NMP	agaroz normalnog tališta
OH-	hidroksidni ion
PBS	fosfatni pufer
RNA	ribonukleinska kiselina
TRIS-HCl	Tris (hidroksimetil)-aminometan hidroklorid
TiOH	talijev(I) hidroksid

1. UVOD

Kao posljedica rasta ljudske populacije i industrijskog razvoja povećava se proizvodnja i odlaganje otpada. Velika većina tog otpada potencijalno je genotoksična i karcinogena, te njegovo zbrinjavanje predstavlja veliki izazov. Danas se zna da nije dovoljno samo odrediti prisutnost onečišćivača u okolišu, već je neophodno istražiti i njegove biološke i ekološke učinke. Budući da su biološki sustavi meta toksikanata, oni pružaju važne informacije koje nisu dostupne iz kemijske analize uzoraka okoliša i kao takvi mogli bi se koristiti kao dijagnostički alat za integrirano upravljanje okolišem. Stoga je važno da procjena biološkog odgovora bude sastavni dio za procjenu opasnosti i rizika određene tvari na okoliš.

Biljke su svakodnevno izložene različitim oblicima okolišnih ksenobiotika. Jedan od razloga je namjerna upotreba gnojiva i biljnih regulatora rasta te pesticida u agrokulturi, dok je drugi razlog onečišćenje zraka, vode i tla različitim antropogenim aktivnostima. Biljke kao takve predstavljaju dobre testne organizme za procjenu onečišćenja okoliša.

Zbog nemogućnosti testiranja svih kemikalija koje dospjevaju u okoliš, i zbog njihove mogućnosti da tvore različite toksične spojeve, predviđanje utjecaja onečišćenja na okoliš vrlo je složen i težak zadatak. Danas postoje mnoge metode rane detekcije negativnog učinka onečišćenja okoliša. Vrlo je bitno da takve metode budu što preciznije, brže, jednostavnije i jeftinije. Posljednjih godina takvu ulogu imaju jednostavni, brzi i osjetljivi testovi kao što je komet-test. Zbog toga je i našao veliku primjenu u ekotoksikološkim istraživanjima.

1.1. BIOTESTOVI

Biotestovi nam omogućuju praćenje i mjerenje reakcije živog organizma na određene poremećene uvjete okoliša (Melnjak 2009). Okolišni biotestovi općenito su širokog raspona istraživanja toksičnosti i procjene toksičnosti koji se provodi za identifikaciju relevantnih toksikanata. Testiranje se izvodi u laboratoriju u kontroliranim uvjetima, a kao test organizmi najčešće se koriste bakterije, biljke, životinje i stanične kulture *in vitro*.

1.1.1. GENOTOKSIČNOST

Genotoksičnost je pojam koji opisuje štetno djelovanje na stanični genetički materijal pri čemu se narušava njezin integritet. Genotoksične tvari su potencijalno mutageni ili kancerogeni, posebno one koje uzrokuju genske mutacije i doprinose razvoju tumora. To uključuje određene kemijske spojeve i određene vrste zračenja.

Oštećenje molekule DNA može biti i kemijsko i strukturno, a dovodi do nastanka mutacija. Nastanak mutacija može dovesti do štetnih posljedica na organizam (ili njegove potomke). Promjene u molekuli DNA mogu biti razni adukti, jednostruki i dvostruki lomovi lanaca, te depurinacija i unakrsne veze lanaca DNA te DNA i proteina.

Genotoksično djelovanje na spermije i jajašca može prenijeti genetičke promjene na potomke koji nikada nisu bili izloženi genotoksinima, a time se znatno može ugroziti vijabilnost i fertilitet populacije (http 5).

Da bi se utvrdilo genotoksično djelovanje neke tvari na citološkoj i molekularnoj razini, postoji široki spektar testova koji se primjenjuju za detekciju oštećenja u izloženim organizmima. Najpoznatiji su alkalna elucija, alkalno odmatanje, komet-test, kromosomske aberacije, mikronukleus-test i izmjena sestrinskih kromatida (Kupina 2009).

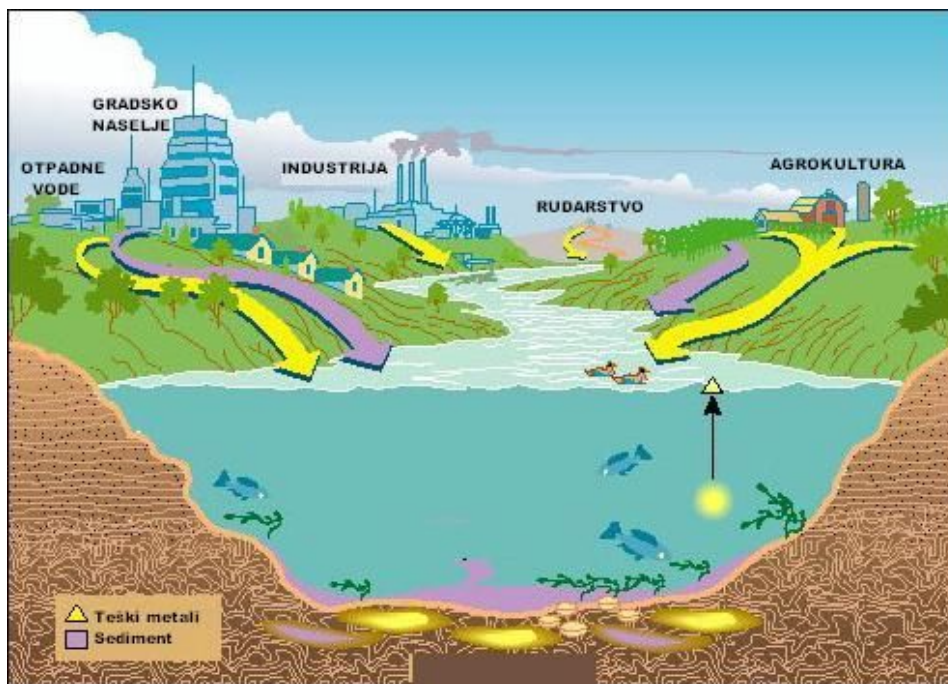
1.2. TEŠKI METALI

Pojam teški metali obuhvaća metale čija je gustoća veća od 5 g/cm^3 . Čitav niz ovih metala je u vidu elemenata u tragu neophodan - esencijalan za mnogobrojne funkcije u ljudskom organizmu, a njihov manjak dovodi do pojave ozbiljnih simptoma nedostatka. Najbolji primjeri su anemija kod manjka željeza, dijabetes kod manjka kroma, problemi u rastu kod manjka nikla. Kod nekih elemenata kao što su olovo, kadmij, živa, arsen i molibden je dokazano da u većim količinama imaju toksično djelovanje ([http 3](#)).

Pojam „teški metali“ korišten je u različitim publikacijama i zakonodavstvu vezano za grupu metala i polumetala koji se dovode u vezu s onečišćenjem okoliša i toksičnim djelovanjem. Kationi teških metala imaju važnu ulogu u složenim biokemijskim reakcijama poput fiksacije dušika kod biljaka, fotolizi vode u fotosintezi, staničnom disanju, katalizi redoks reakcija, preraspodjeli C-C veza, asimilaciji vodika, razgradnji ureje, transkripciji gena i cjelokupnom razvoju biljnog organizma. Pri većim koncentracijama ioni teških metala stvaraju nespecifične kompleksne komponente u stanicama koje izazivaju toksične učinke. Stupanj toksičnosti metala uvelike varira ovisno o pojedinom metalu i pojedinom organizmu ([http 4](#)).

Najčešće je pitanje toksičnosti zapravo samo pitanje količine, a ovaj raspon veoma varira kod svakog pojedinog elementa. Tako se dnevna neophodna količina kobalta, centralnog atoma vitamina B12 koji je neophodan u stvaranju eritrocita kreće oko $0,1 \text{ } \mu\text{g}$. U količinama od 25-30 mg/dan nastupaju simptomi otrovanja koji obuhvaćaju poteškoće gastrointestinalnog trakta te srčana i bubrežna oštećenja. Ostali elementi kao npr. talij, su u bilo kojoj količini otrovni ([http 3](#)).

Teški metali mogu u vidu finih čestica prašine dospjeti u atmosferu, odakle se talože u vodama i tlu. U vodama se brzo razrjeđuju i talože kao teško rastvorljivi karbonati, sulfati ili sulfidi na dnu vodenih površina. Kada se adsorpcijski kapacitet sedimenata iscrpi, raste koncentracija metalnih iona u vodi. Kruženje teških metala u prirodi veoma ovisi o promjenama kojima ovi metali podliježu ([http 3](#)) (slika 1).



Slika 1. Kruženje teških metala u prirodi.

Da bi imali bilo kakav fiziološki ili toksičan učinak teški metali moraju ući u stanicu. Postoje određeni uvjeti okoline kojima se pospješuje ili smanjuje pristupačnost teških metala za biljni organizam. Na te uvjete uvelike utječe i čovjek kao važna karika u lancu agrobiocenoze. Primjenom različitih gnojiva ti se uvjeti okoline mijenjaju, a time i pristupačnost tj. mogućnost ulaska teških metala u biljni organizam. Osim što mijenjaju uvjete okoline primijenjena gnojiva mogu i sama biti izvor teških metala koji su zastupljeni u balastu. Na taj način indirektno može doći i do ulaska teških metala u organizam sekundarne karike u prehrambenom lancu, a to su konzumenti, gdje pripada i čovjek. Teški metali direktno ili indirektno iniciraju oksidacijski stres, a oštećenja funkcionalnih komponenata posljedica su oksidacijskog učinka slobodnih radikala, vezivanja metala na funkcionalne grupe proteina i zamjene metalnih iona neophodnih za normalno funkcioniranje stanica (<http> 4).

1.3. TALIJ

Talij je jako toksičan metal sa atomskim brojem 81 i relativnom atomskom masom 204,37 (slika 2). Zbog svoje velike gustoće ($\rho = 11,83 \text{ g/cm}^3$), svrstan je u skupinu teških metala. Talij je mekan, srebrno-bijeli metal koji se može rezati nožem (slika 3). Talište mu je pri $304 \text{ }^\circ\text{C}$, a vrelište $1473 \text{ }^\circ\text{C}$ (Cvjetko i sur. 2009).



Slika 2. Svojstva talija.

Talij je široko rasprostranjen, ali u malim koncentracijama. U Zemljinoj kori, talij je sastavni dio sulfidnih ruda cinka, olova, željeza i bakra, sa prosječnom koncentracijom od 0,1-0,7 ppm. U prirodnim neonečišćenim vodama prosječna koncentracija talija je 0,03 ppm, dok u onečišćenim vodama u blizini rudnika dostiže i 100 ppm. Koncentracija talija u okolišu stalno je u porastu, uglavnom zbog antropogenog onečišćavanja, a najveći izvor onečišćenja su cementare i elektrane koje energiju dobivaju sagorijevanjem ugljena. Talij se također pojavljuje kao nusproizvod tijekom taljenja metalnih ruda cinka i olova (Babić i sur. 2009).

Talij se iz okoliša može apsorbirati pomoću biljaka pa ugradnjom u hranidbene lance postaje dostupan višim organizmima uključujući i čovjeka. Razlog visoke toksičnosti talija leži u njegovom visokom afinitetu prema amino-, imino- i sulfhidrilnim skupinama enzima te kemijskoj sličnosti kalija. Zbog sličnog ionskog radijusa stanična membrana ne razlikuje ione talija (Tl^+ ; ionski radijus 147 pm) od iona kalija (K^+ ; ionski radijus 133 pm) te oni imaju isti mehanizam prijenosa u stanicu (Radić i sur. 2009). Osim što interferira s ulaskom kalija u stanicu, talij utječe i na metaboličke procese oponašajući kalij. Dokazano je da sudjeluje u aktivaciji nekih enzima (Na^+/K^+ -ATP-aze, piruvat kinaze i aldehid dehidrogenaze), u stabilizaciji

ribosoma i kontrakciji mišića te da utječe na sintezu proteina, transportne mehanizme i mitozu (Galván- Arzate i Santamaria 1998).

Poznato je da talij u animalni organizam ulazi preko kože i sluznice, te ingestijom ili inhalacijom. Karakteristični simptomi trovanja talijem su letargija, ukočenost, trnci u rukama i nogama, zamagljenje vida, nerazgovijetan govor, opća slabost i gubitak kose i dlaka (Galván- Arzate i Santamaria 1998). Letalna doza talija za čovjeka iznosi 8 mg/kg (Kupina 2009).



Slika 3. Talij.

Svjetska zdravstvena organizacija je već 1973. predložila zabranu uporabe talija, no on se još uvijek koristi kao rodenticid, insekticid, pigment, impregnacijsko sredstvo, sredstvo za razdvajanje rudača i proizvodnju pirotehničkih sredstava zelene boje te u medicini. Danas se u medicini talij koristi kao radioaktivni izotop ^{201}Tl da bi se dijagnosticirale bolesti srca. Također je sve češća njegov upotreba u visokotehnološkim procesima kao što su proizvodnja poluvodiča, niskotemperaturnih termometara, optičkih kablova u telekomunikaciji. Prije se talij koristio u liječenju sifilisa, gonoreje, tuberkuloze, lišaja i drugih kožnih infekcija te kao depilacijsko sredstvo (Galván- Arzate i Santamaria 1998).

1.4. EKOTOKSIKOLOGIJA I BIOMONITORING

Onečišćenje okoliša je svaka kvantitativna i kvalitativna promjena fizikalnih, kemijskih i bioloških karakteristika osnovnih sastavnica okoliša (zrak, voda, tlo, hrana), što dovodi do narušavanja zakonitosti u ekosustavu, temeljenih na

mehanizmima samoregulacije. Te promjene djeluju na pogoršanje zdravstvenih, gospodarstvenih i drugih uvjeta života.

Ekotoksikologija proučava direktni ili indirektni učinak ksenobiotika na ekosustav, na sve žive organizme i njihovu organizaciju, odnos prema neživoj tvari, međusobne odnose i odnos prema čovjeku. Ekotoksikologija se bavi malim (subtoksičnim) koncentracijama onečišćivača u okolišu, koje su prije smatrane nevažnima, tako da se radi o relativno mladoj znanosti. 60-tih godina prošlog stoljeća u žitnicama Sjeverne Amerike ljudi su počeli obolijevati od tumora jetre, nakon čega se počelo povezivati uvjete okoliša i okolnosti s bolestima. Pokazalo se da je za to kriv DDT u malim, subakutnim dozama; posljedica - učestalija pojava tumora jetre. Do tog vremena su se ignorirali neki okolišni otrovi i sl., te se sve većinom baziralo na medicinskoj toksikologiji. Npr. u žitnicama, na područjima intenzivnog uzgoja voća, povrća i sl. koriste se pesticidima, pa više nema insektivornih ptica. Kukac koji je otrovan pesticidom ne umire odmah, nego postane trom i ne bježi od ptica, zbog čega predstavlja vrlo opasnog prijenosnika otrova prema drugim karikama u hranidbenom lancu (ptice). Čovjek je zadnja karika u hranidbenom lancu, hrani se otrovanim biljkama, kao i životinjama koje unutar organizma nakupljaju otrove. Subtoksične doze se stalnim zbrojem nakupljaju i zbrajaju unutar organizma; u analizi i detekciji vrlo malenih doza nastaju veliki problemi.

Ksenobiotik je svaka tvar koju nalazimo unutar organizma, a da se obično ne proizvodi niti se očekuje da će unutar njega biti prisutna. To mogu biti i tvari prisutne u mnogo višim koncentracijama od uobičajenih. Međutim, termin se u ekotoksikologiji koristi u kontekstu polutanata kao što su dioksini i poliklorirani bifenili, te njihovog učinka na živi svijet. Prirodni spojevi mogu također postati ksenobiotici ukoliko nađu put unutar drugog organizma.

Toksikant je otrovni ksenobiotik, a polutant tvar koja zagađuje. Polutanti mogu biti onečištači - neke kemijske, anorganske tvari, npr. DDT u vodi, kemikalije, fizikalni faktori (buka), teški metali (npr. olovo nakupljeno unutar organizma majke može se osloboditi laktacijom; teški metali se naročito nakupljaju u korijenu biljaka), te zagađivači - organski materijal (npr. prisutnost bakterije *E. coli* u vodi - fekalno zagađenje), biološki supstrati, krv, mikroorganizmi i sl. ([http 6](#)).

Tri glavna cilja ekotoksikologije su:

1. prikupljanje dovoljne količine podataka za procjenu okolišnog rizika i upravljanje okolišem
2. zadovoljenje zakonskih uvjeta za razvoj novih kemijskih spojeva i određivanje njihovih dozvoljenih koncentracija u okolišu
3. razvoj empirijskih ili teorijskih principa (paradigmi) za poboljšanje znanja o ponašanju i učinku kemikalija u živim sustavima (Sertić 2005).

Biomonitoring (skraćeno od biološki monitoring) kombinacija je kemijskih analiza i analiza biološke komponente okoliša te je kao takav najbolji način za procjenu učinaka štetnih tvari na ekosustav. Biomonitoring ili biološki nadzor je zbir analiza biološke komponente okoliša i njenih reakcija, koje pomažu otkrivanju promjena u okolišu uzrokovanih onečišćenjem te se koriste u kontroli stanja okoliša (Malović 2008).

1.4.1. BIOMARKERI

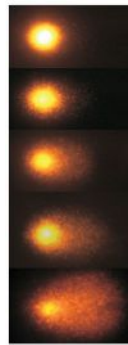
Biomarkeri su analize koje ukazuju na međudjelovanje biološke komponente i štetnog biološkog, kemijskog ili fizičkog djelovanja onečišćenja. Biomarkeri daju informaciju o odgovoru organizma na potencijalno štetne tvari na staničnoj i molekularnoj razini. Biomarkeri su izrazito osjetljivi pokazatelj djelovanja onečišćivača na organizam te omogućuju rani uvid u promjene koje mogu dovesti do oštećenja stanica, tkiva, jedinki te pogoršanja stanja ekosustava u cjelini (Malović 2008).

Kriteriji koje bi trebao zadovoljiti dobar biomarker su:

1. analiza/mjerenje mora biti pouzdano i što jednostavnije
2. prirodna razina/aktivnost biomarkera treba biti poznata kako bi se moglo razlučiti koje su promjene izazvane onečišćivačem u odnosu na normalne/prirodne varijabilnosti
3. treba dobro poznavati biologiju/fiziologiju proučavanog organizma kako bi se minimalizirali izvori prirodnih varijacija - rast i razvoj, reprodukcija, vrsta hrane
4. trebali bi biti poznati svi vanjski i unutrašnji faktori koji utječu na dobivene vrijednosti biomarkera
5. ne zahtjeva žrtvovanje proučavanih jedinki (Kupina 2009).

1.5. KOMET- TEST

Gel elektroforeza pojedinačnih jezgara, poznata i kao komet-test, mjeri oštećenja DNA iz pojedinačnih stanica, a zasniva se na migraciji denaturirane DNA u agaroznom gelu pod utjecajem električnog polja. Oštećena DNA putuje prema anodi dalje nego neoštećena DNA, dajući sliku koja nalikuje kometu (Tuteja i sur. 2009) (slika 4).



Slika 4. Različite razine oštećenja DNA u jezgrama nakon komet- testa.

Östling i Johanson su bili prvi koji su kvantificirali oštećenja DNA u stanicama koristeći se metodom komet-testa ili gel elektroforeze pojedinačnih jezgara (engl. single cell gel electrophoresis assay, SCGE). Međutim, u neutralnim uvjetima koje su koristili mogli su detektirati samo dvolančane lomove molekule DNA. Singh i sur. (1988, citirano prema Dhawan i sur. 2009) su razvili alkalnu verziju ($\text{pH} > 13$) komet-testa koja omogućuje detekciju dvolančanih i jednolančanih lomova, kao i alkalno-labilna mjesta, mjesta zakašnjelog popravka DNA te unakrsne veze između DNA i DNA te DNA i proteina.

Postoji nekoliko izvedbi komet-testa. Kada se odvija u alkalnim uvjetima (i odmatanje i elektroforeza pri $\text{pH} \geq 13$) radi se o alkalnom komet-testu. On detektira (ali ne razlikuje) jednolančane i dvolančane lomove, alkalno-labilna mjesta, mjesta zakašnjelog popravka DNA te unakrsne veze između DNA i DNA te DNA i proteina. Pri neutralnom komet-testu, odmatanje se vrši pri neutralnim ili blago alkalnim uvjetima, $\text{pH} 7-8$, a elektroforeza pri neutralnom pH . Ovom vrstom komet-testa mogu se detektirati dvolančani lomovi (Tuteja i sur. 2009).

Ovisno o cilju istraživanja te korištenju animalnog ili biljnog testnog organizma, razlikuje se nekoliko izvedbi komet-testa. Sve izvedbe imaju isto načelo i odvijaju se slijedećim redoslijedom:

1. uzgoj i izolacija stanica
2. ulaganje stanica u agarozni gel
3. liziranje stanica upotrebom detergenata i visoke koncentracije soli (time se uklanjaju stanični proteini što omogućava pokretljivost DNA fragmenata)
4. denaturacija DNA u alkalnim uvjetima
5. elektroforeza u neutralnom, blago alkalnim ili visoko alkalnim uvjetima
6. neutralizacija
7. bojanje jezgara fluorescencijskom bojom
8. mjerenje oštećenja pomoću fluorescencijskog mikroskopa i računalnog programa za analizu oštećenja DNA u pojedinačnim jezgrama.

Oštećena DNA putuje prema anodi dalje nego neoštećena DNA, dajući sliku koja nalikuje kometu. DNA koja putuje prema anodi vidljiva je kao "rep kometa", dok ostatak jezgre nalazi u "glavi". Rezultati se mogu prikazati sa nekoliko parametara, kao što su: dužina repa (udaljenost na koju su tijekom elektroforeze otputovali fragmenti DNA), postotak DNA u repu i repni moment (dužina repa x postotak DNA u repu) uz pomoć računalnog programa (Tuteja i sur. 2009) (slika 5).

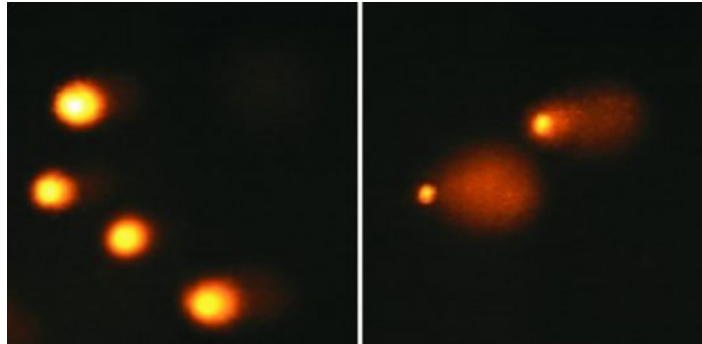


Slika 5. Analiza jezgara pomoću računalnog programa.

Tijekom proteklog desetljeća, komet-test je postao jedna od standardnih metoda za detekciju oštećenja DNA, te je našao svoju primjenu u genotoksičnom

testiranju, ekogenotoksikologiji, biomonitoringu, molekularnoj epidemiologiji, te također fundamentalnom istraživanju oštećenja i popravka DNA.

Također komet-testom se mogu detektirati stanice u apoptozi (programirana stanična smrt uzrokovana brojnim fiziološkim i fizičkim mehanizmima) koja se javlja kao posljedica visokog stupnja oštećenja ili kod umirućih stanica. U tom su slučaju glava i rep kometa potpuno odvojeni ili je jezgra raspršena (Collins 2004) (slika 6).



Slika 6. Izgled kontrolne jezgre (lijevo) i jezgre u apoptozi (desno) nakon komet-testa.

Prednosti komet-testa su: visoka osjetljivost detekcije oštećenja DNA (1 lom na 10^{10} po molekuli DNA), maleni broj stanica potrebnih za provođenje testa, ne zahtijeva mitotički aktivne stanice niti malobrojne i velike kromosome, jeftin, jednostavan, kratkotrajan (Dhawan i sur. 2009).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Različita geokemijska i antropogena aktivnost dovela je do povremenog onečišćenja okoliša talijem, ali intenzivna upotreba talija u industriji visoke tehnologije dovodi do onečišćenja na globalnoj razini. Zbog povećane koncentracije u okolišu talij postaje dostupan svim živim organizmima pa tako i čovjeku što rezultira ozbiljnim zdravstvenim problemima.

Talij postoji u dva oksidacijska stanja, kao trovalentni talij koji je stabilan u organskim spojevima, i kao jednovalentan talij koji je stabilniji u anorganskim spojevima.

Kako su kalij i talij jednovalentni ioni sličnih ionskih radijusa, membrana stanice ih ne može razlikovati. Kao analog kalija, talij ulazi u stanicu koristeći se transportnim mehanizmima kalija te ometa kalij-ovisne procese.

Ovim radom željela sam istražiti primjenjivost celularnog i acelularnog kometesta kao nespecifičnog biomarkera genotoksičnosti izlaganjem vrste *Vicia faba* L. različitim koncentracijama teškog metala talija u obliku talijeva(I) acetata. Na taj način se nastojalo utvrditi da li i na koji način talij oštećuje molekulu DNA (indirektno ili direktno) u stanicama korijena i lista boba.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. POKUSNI ORGANIZAM

U istraživanju genotoksičnog učinka talijeva(I) acetata kao test organizam koristila sam biljnu vrstu bob (*Vicia faba*, L.)

3.1.1. BOB (*Vicia faba*, L.)

Bob, *Vicia faba*, je jednogodišnja biljka sa uspravnom stabljikom, visine 0,3-2 m (slika 7). Dvosupnica je iz roda *Vicia*, grahorice, koji pripada porodici Fabaceae, mahunarke ili lepirnjače. Listovi su izmjenični, s listićima u obliku pera i za razliku od većine ostalih članova roda, bez vitica ili s rudimentalnim viticama. Cvijetovi su veliki, bijeli sa tamno ljubičastim oznakama, a nalaze se u pazušcima listova. Plod je mahuna. Glavni oprašivači su bumbari.



Slika 7. Bob, *Vicia faba* L.

Porijeklo boba je središnja Azija. Rasprostranjen je u Srednjoj Aziji, Mediteranu i Južnoj Americi. Sekundarni centri rasprostranjenosti su u Afganistanu i Etiopiji. Iako se bob uzgaja u mnogim zemljama, 60% ukupne svjetske proizvodnje dolazi iz Kine.

Bob se koristi kao izvor ljudske hrane u zemljama u razvoju kao i stočne hrane, uglavnom za svinje, konje, perad i golubove u industrijaliziranim zemljama. Može se koristiti kao povrće, bilo zeleno ili sušeno, svježe ili konzervirano. Slama se koristiti za izradu cigle i kao gorivo u dijelovima Sudana i Etiopije.

Podnosi nisku temperaturu te može prezimiti. Može tolerirati zimske temperature do $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ bez težih ozljeda, dok većina europskih jednogodišnjih sorti može tolerirati temperaturu i do $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tolerira gotovo bilo koji tip tla, no najbolje uspijeva na bogatoj ilovači. Optimalna temperatura za proizvodnju je u rasponu od $18 - 27\text{ }^{\circ}\text{C}$, a količina oborina od 650-1.000 mm godišnje (http 1).

Postoji više varijeteta, npr. bob, *Vicia faba* var. major i konjski bob, *V. faba* var. equina. U ovom istraživanju sam koristila varijetet *V. faba* var. aquadulce.

3.2. TALIJEV(I) ACETAT

Talijev(I) acetat, TlOOCOCH_3 , je toksični bijeli kristal. Topiv je u vodi, alkoholu te kloroformu. Talište mu je pri $129\text{-}131\text{ }^{\circ}\text{C}$, gustoća $3,68\text{ g/cm}^3$, a molekulska masa $263,43\text{ g/mol}$. Vodene otopine talijevog(I) acetata su bazične. Pohranjuje se pri temperaturi od $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (http 2).

3.3. METODE

3.3.1. UZGOJ BOBA U KULTURI U UVJETIMA *in vitro*

Sjemenke boba ostavila sam preko noći na sobnoj temperaturi u posudi sa destiliranom vodom kako bi nabubrile. Idući dan ogulila sam sjemenu lupinu, a sjemenke stavila na vlažan papir u velike Petrijeve posude. Petrijeve posude prekrila sam filter papirom kako bi sjemenke rasle u mraku (slika 8).



Slika 8. Uzgajanje sjemenki boba u komori.

Sjemenke su uzgajane u komori na temperaturi od 21 °C. Nakon 3-4 dana, kada su primarni korijeni narasli do veličine od 2-3 cm, uklonila sam vršni dio korijena, kako bi potakla razvoj sekundarnih korjenčića (slika 9).



Slika 9. Sekundarni korjenčići boba.

Tek kad su sekundarni korjenčići dosegli veličinu od oko 2 cm, biljke sam upotrijebila za pokus.

Nakon što su nekoliko dana rasle u Petrijevoj posudi, biljke sam premjestila u sterilne čaše napunjene destiliranom vodom. Biljke su rasle 10 dana u uvjetima dugog dana (16 h svjetla i 8 h tame) na temperaturi od 26 ± 2 °C te uz rasvjetu fluorescentnih cijevi [$90\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$].

3.3.2. IZLAGANJE BOBA TALIJEVOM(I) ACETATU U UVJETIMA *in vivo*

Tako dobivene biljke boba premjestila sam u sterilne čaše sa prethodno priređenim otopinama različitih koncentracija talijeva(I) acetata u 40 mL destilirane vode (slika 10).



Slika 10. Izlaganje biljaka otopinama talijeva(I) acetata.

U pokusu sam koristila otopine talijevog(I) acetata koncentracije 2, 4, 20 i 40 μM . Osim otopine talijeva(I) acetata, koristila sam i otopine kalijeva acetata i to 20 μM talijeva(I) acetata + 40 μM kalijeva acetata te 40 μM kalijeva acetata kako bi ocjenili učinak acetatnog iona. Biljke koje su rasle u 40 mL destilirane vode poslužile su kao negativna kontrola.

Zatim sam biljke u priređenim otopinama vratila u komoru gdje su držane 3 dana u uvjetima dugog dana (16 h svjetla i 8 h tame) na temperaturi od $26 \pm 2^\circ\text{C}$ uz rasvjetu fluorescentnih cijevi [$90\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$].

3.3.3. KOMET-TEST

Alkalna verzija celularnog (*in vivo*) i acelularnog (*in vitro*) komet-testa provedena je po metodi koju su opisali Gichner i sur. (2004) sa malim modifikacijama (20 min denaturacija, 15 min elektroforeza pri 1 V/cm, 300 mA).

Na djelomično brušeno predmetno stakalce (ESCO, Erie Scientific), uranjanjem u otopinu, nanjela sam prvi sloj agaroze, koji sadrži 1% agaroze (NMP, Sigma). Nakon toga, pričekala sam 15 min kako bi se gel polimerizirao.

Cijeli postupak izolacije jezgara radila sam na ledu kako bi se izbjegla mogućnost dodatnog oštećenja DNA. S lista biljke izdvojila sam komadić veličine 1,5x1,0 cm te prebacila u Petrijevu zdjelicu na ledu u koju sam prethodno stavila 240 μL pufera za izolaciju (Tris-HCl, pH 7,5). Komadić lista sam pomoću žileta mehanički

izrezala na tanke trake jer se na taj način oslobađaju jezgre iz stanice. Isti postupak ponovila sam i s korijenom biljke koji sam također mehanički sjeckala pomoću žileta.

Kako bi se što više jezgara nakupilo u puferu nagnula sam Petrijevu zdjelicu te mikropipetom izdvojila 120 μL uzorka i prenijela u Eppendorf tubicu u kojoj sam prethodno pripremila drugi sloj agaroze (100 μL 1%-tne agaroze LMP u fosfatnom puferu PBS, pH vrijednosti 7,0, temperature 42 $^{\circ}\text{C}$). 120 μL suspenzije i drugog sloja agaroze sam ponovo pomoću mikro-pipete izdvojila i prenijela na predmetno stakalce s prvim slojem agaroze te sve poklopila pokrovnim stakalcem. Zatim sam tako pripremljen uzorak prebacila u kadicu sa ledom na 15 min kako bi se agarozna što prije polimerizirala i jezgre fiksirale u gelu. Iako se na predmetna stakalca nanosi ukupno 3 sloja agaroze, izostavila sam treći sloj NMP agaroze i inkubacija u puferu za lizu (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl, 1%-tni Triton X-100, 10%-tni DMSO) jer nemaju učinak na kvalitetu i učinkovitost testa (Babić 2007).

Budući da sam izvodila alkalnu verziju komet-testa, pufer za elektroforezu sadržavao je 10 mM NaOH, 200 mM EDTA, pH vrijednosti iznad 13. Ohlađeni pufer (4 $^{\circ}\text{C}$) ulila sam u kadicu za elektroforezu (Biorad) te u nju horizontalno posložila predmetna stakalca sa kojih sam prethodno maknula pokrovnostakalca (slika 11). Zatim sam preparate prelila svježe pripremljenim hladnim puferom za elektroforezu. U tim uvjetima preparati stoje 10 min na +4 $^{\circ}\text{C}$ prije same elektroforeze kako bi se ostvarila alkalna denaturacija DNA.



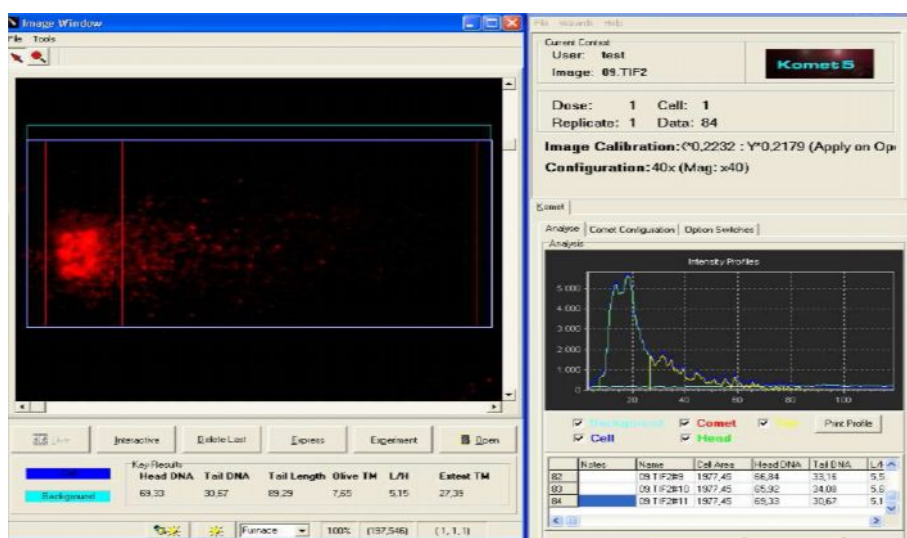
Slika 11. Kadica za uzorke.

Elektroforeza je provedena u istom puferu i u istim uvjetima, pri jakosti struje od 300 mA te naponu od 1 V/cm kroz 20 min. S obzirom da za vrijeme elektroforeze pod utjecajem struje raste i temperatura pufera, kadicu za elektroforezu sam obložila ledenim oblozima te pomoću njih održavala temperaturu stalnom.

Po završetku elektroforeze preparate sam neutralizirala 3 puta po 5 min u Tris-HCl puferu pH vrijednosti 7,5, isprala destiliranom vodom te ostavila da se osuše 24 sata na sobnoj temperaturi. Tako pripremljeni preparati mogu biti pohranjeni i nekoliko mjeseci u tami na sobnoj temperaturi.

Mikroskopska analiza rađena je pomoću fluorescencijskog mikroskopa Zeiss Axioplan (filter 09, ekscitacija kod valne duljine 520 nm, emisija kod valne duljine 610 nm). Prije mikroskopske analize preparate sam rehidrirala destiliranom vodom (10 min), te bojala fluorescentnom bojom etidij bromid u koncentraciji 10 µg/mL. Suvišak boje isprala sam kratkotrajnim uranjanjem stakalca u destiliranu vodu nakon čega sam preparate prekrila pokrovnim stakalcem. Tako pripremljene preparate pregledavala sam uz pomoć fluorescencijskog mikroskopa te fotografirala digitalnom kamerom pri povećanju objektiva od 40x. Za svaku koncentraciju talijeva(I) acetata napravila sam tri preparata te na svakom snimila po 50 jezgara.

Oštećenja u molekuli DNA nastala djelovanjem talijeva(I) acetata analizirala sam računalnim programom Komet (Komet version 5, Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, UK). Za procjenu oštećenja mjere se dužina repa, postotak DNA u repu i repni moment. Na temelju intenziteta fluorescencije program izračuna postotak DNA u repu. Repni moment izračunat je množenjem dužine repa i postotka DNA u repu (slika 12).



Slika 12. Analiza jezgara pomoću računalnog programa Komet 5 Kinetic Imaging.

3.3.1. IZLAGANJE BOBA TALIJEVOM(I) ACETATU U UVJETIMA *in vitro*

Kako bi istražila je li učinak monovalentnog talija na molekulu DNA boba direktan napravila sam acelularni komet-test. Jezgre sam izolirala iz lista boba te preparate priredila na isti način kao i za izvođenje komet-testa. Prije denaturacije i elektroforeze jezgre sam tretirala različitim koncentracijama otopine talijeva(I) acetata. Priredila sam otopine talijeva(I) acetata u Tris-HCl-u (pH 7,5) koncentracije: 2, 4, 20, 40, 200 μ M te 20 μ M otopine talijeva(I) acetata + 40 μ M otopine kalijeva acetata i 40 μ M otopine kalijeva acetata također u Tris-HCl-u.

Kao kontrolu sam koristila preparate izložene samo u 50 mL Tris-HCl-a (pH 7,5). Uzorke sam držala 2 h u mraku pri temperaturi od 4 °C. Nakon izlaganja preparate sam isprala 3 puta otopinom Tris-HCl-a kako bi se neutralizirao visoko bazični pufer u kojem se odvijala elektroforeza. U daljnjem postupku slijedila sam već opisani protokol za izvođenje komet-testa. Za svaku koncentraciju napravila sam po tri preparata te na svakom analizirala po 50 jezgara.

3.3.2. IZLAGANJE BOBA VODIKOVOM PEROKSIDU U UVJETIMA *in vitro*

Za usporedbu količine oštećene DNA molekule nastale djelovanjem talij(I) acetata, kao pozitivnu kontrolu u ovom istraživanju koristila sam vodikov peroksid. Štetni učinci H₂O₂ povezani su s njegovom ulogom u nastajanju oksidansa (slobodnih radikala O₂^{·-}, HO₂[·] i OH[·]). Slobodni radikali nastali unutar stanice mogu oksidirati biomolekule poput lipida, nukleinskih kiselina, proteina i ugljikohidrata. Nastalo oštećenje uzrokuje starenje i smrt stanice te ozljede tkiva (Pehnac 2006). Zbog navedenih svojstava vodikov peroksid izabran je u ovom istraživanju kao modelni oksidirajući genotoksikant.

Kako bi procjenila osjetljivost metode komet-testa, jezgre boba izložila sam 30% otopini H₂O₂ u rasponu koncentracija 0,2, 0,4, 0,8, 1,2 mM u Tris-HCl-u (pH 7,5). Kao kontrolnu skupinu upotrijebila sam preparate izložene Tris-HCl-u (pH 7,5). Uzorke sam držala 2 h u mraku pri temperaturi od 4 °C. U daljnjem postupku slijedila

sam već opisani protokol za izvođenje komet-testa. Za svaku koncentraciju napravila sam po tri preparata te na svakom analizirala po 50 jezgara.

3.5. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Za statističku obradu podataka korišten je računalni program Statistica for Windows 4.0. Podaci su uspoređivani neparametrijskim «Mann-Whitney U-testom» (kao neparametrijski student t-test). Vrijednosti oštećenja DNA dobivene komet-testom su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. Pri tumačenju rezultata statističke obrade kao značajni podaci su uzeti oni za koje je vrijedilo $p \leq 0,05$ (*), te $p \leq 0,01$ (**).

4. REZULTATI

4.1. IZLAGANJE BOBA TALIJEVOM(I) ACETATU U UVJETIMA *in vivo*

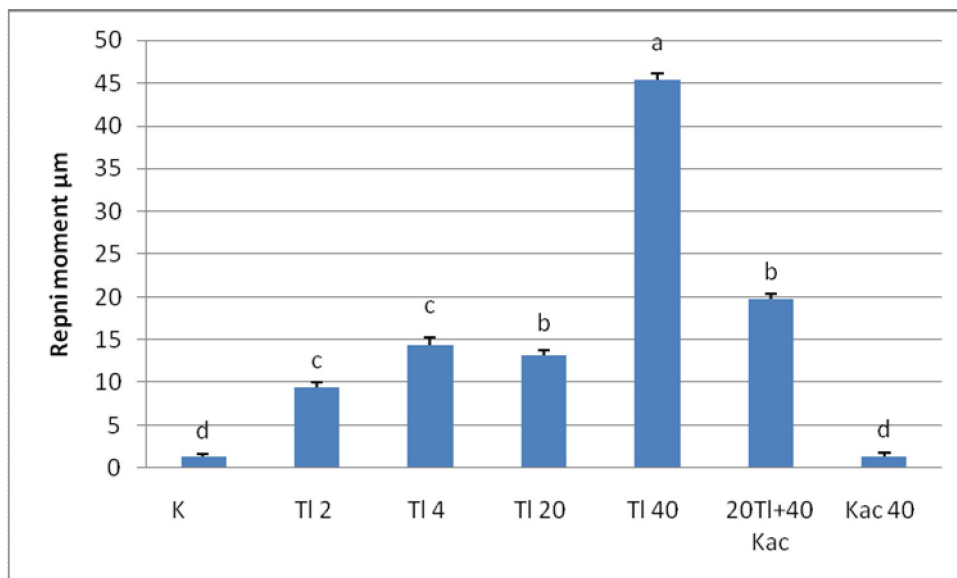
Razina oštećenja DNA u jezgrama stanica boba (*Vicia faba* var. *aquadulce*) nastalo djelovanjem talija prikazana je kao repni moment (umnožak duljine repa i postotka DNA u repu kometa).

Potencijalan genotoksičan učinak talija istražen je metodom celularnog komet-testa. Talij inducira oštećenja DNA u znatno većoj mjeri u korijenu boba nego u listu biljke te raste s porastom koncentracije talijeva(I) acetata.

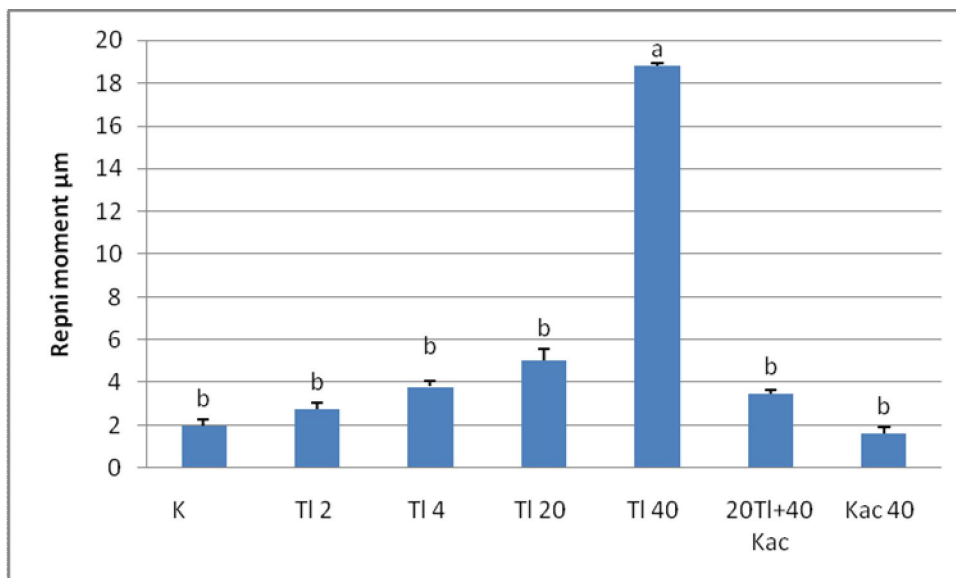
Rezultati celularnog komet-testa pokazali su da se nakon 72-satnog izlaganja boba rasponu koncentracija talijeva(I) acetata javlja oštećenje DNA u korijenu i listu biljke koje je linearno ovisno o koncentraciji (slike 13 i 14). Biljke tretirane najmanjom koncentracijom talijeva(I) acetata (2 μM) pokazuju blagi, ali statistički značajan porast repnog momenta (TM). Pri toj koncentraciji u korijenu se javlja porast TM za 7,4 puta (9,42 TM) u odnosu na kontrolni uzorak (1,28 TM), a u listu za 1,4 puta (2,75 TM) u odnosu na kontrolni uzorak (1,97 TM). Najveće oštećenje javlja se pri koncentraciji od 40 μM talijeva(I) acetata. Pri toj koncentraciji oštećenje u korijenu je 35,5 puta (45,39 TM), a oštećenje u listu 9,5 puta (18,78 TM) veće u odnosu na kontrolni uzorak. Na slici 13 se može uočiti veće oštećenje DNA pri koncentraciji od 4 μM nego pri 20 μM , ali ono nije statistički značajno.

Kao kontrolni uzorak korištena je 40 μM otopina kalijeva acetata koja nema genotoksični učinak, odnosno ne izaziva oštećenje molekule DNA.

Kako talij interferira s kalijem pri ulasku u stanice, proveden je i komet-test nakon izlaganja otopini talijeva(I) acetata (20 μM) i kalijeva acetata (40 μM). U korijenu je pri toj koncentraciji komet-test pokazao statistički značajno veće oštećenje molekule DNA za 15,4 puta (19,37 TM) nego otopina 20 μM talijeva(I) acetata koja oštećuje DNA za 10,2 puta (13,10 TM) u odnosu na kontrolu (1,28 TM), dok je u listu pri toj koncentraciji oštećenje 1,8 puta (3,49 TM), a od otopine 20 μM talijeva(I) acetata 2,5 puta (5,01 TM) u odnosu na kontrolni uzorak (1,97 TM) (slike 13 i 14).



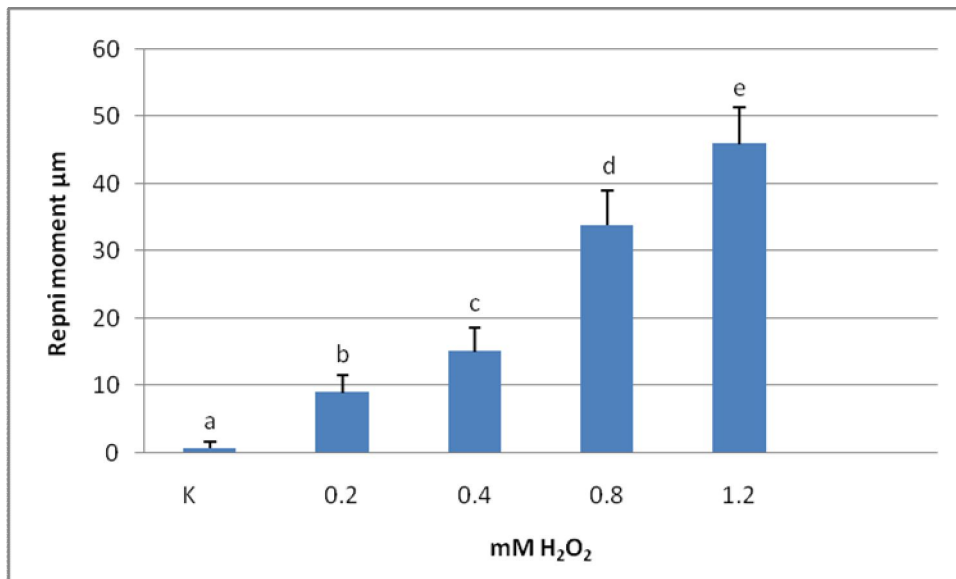
Slika 13. Oštećenje DNA (repni moment) u jezgrama stanica korijena boba mjereno komet-testom nakon 72-satnog izlaganja 0 (K), 2, 4, 20, 40 μM otopine talijeva(I) acetata te 20 μM talijeva(I) acetata + 40 μM kalijeva acetata i 40 μM kalijeva acetata u uvjetima *in vivo*. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($\leq 0,05$).



Slika 14. Oštećenje DNA (repni moment) u jezgrama stanica lista boba mjereno komet-testom nakon 72-satnog izlaganja 0 (K), 2, 4, 20, 40 μM otopine talijeva(I) acetata te 20 μM talijeva(I) acetata + 40 μM kalijeva acetata i 40 μM kalijeva acetata u uvjetima *in vivo*. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($\leq 0,05$).

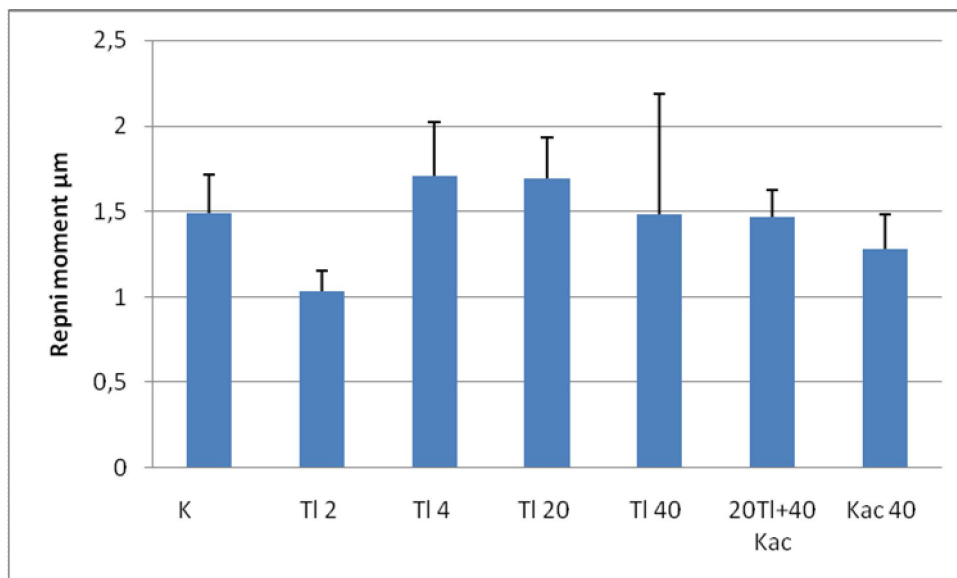
4.2. IZLAGANJE JEZGRI BOBA U UVJETIMA *in vitro*

Izmjeren je učinak vodikovog peroksida na jezgre stanica lista boba acelularnim komet-testom. Rezultati pokazuju doza-učinak vodikovog peroksida na jezgre stanica lista boba. Direktno oštećenje DNA uzrokovano povećanjem koncentracije vodikovog peroksida dovelo je do linearnog rasta repnog momenta u rasponu od $0,63 \pm 0,08$ do $45,9 \pm 0,44$ (slika 15).



Slika 15. Oštećenje DNA (repni moment) u jezgrama duhana mjereno komet-testom nakon dvosatnog izlaganja 0,2, 0,4, 0,8, 1,2 mM vodikovom peroksidu u uvjetima *in vitro*. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($\leq 0,05$).

Acelularni komet-test u rasponu korištenih koncentracija talijeva(I) acetata nije pokazao statistički značajan genotoksičan učinak na jezgre stanica lista boba (slika 16).



Slika 16. Oštećenje DNA (repni moment) u jezgrama stanica lista boba mjereno komet-testom nakon dvosatnog izlaganja 0 (K), 2, 4, 20, 40 μM otopine talijeva(I) acetata te 20 μM talijeva(I) acetata + 40 μM kalijeva acetata i 40 μM kalijeva acetata u uvjetima *in vitro*.

5. RASPRAVA

Biljni biotestovi pomažu u otkrivanju genotoksičnog onečišćenja u okolišu. Biljni sustavi mogu pružiti informacije o širokom rasponu genetičkih oštećenja, uključujući genske mutacije i kromosomske aberacije. Vrste *Vicia faba* i *Allium cepa* odavno se koriste za analizu kromosomskih aberacija kao i za mikronukleus-test. Tijekom proteklog desetljeća, komet-test se često primjenjuje na biljke (list, korijen i stabljiku) kao metoda za otkrivanje oštećenja DNA nastalog zbog kemikalija i teških metala prisutnih u zagađenom tlu (Dhawan i sur. 2009).

Postoji nekoliko razloga široke primjene biljaka kao testnih organizama: kratko generacijsko vrijeme, visoka osjetljivost, jednostavan uzgoj u laboratorijskim uvjetima. Također rezultati dobiveni na biljnim organizmima pokazuju visoku korelaciju s rezultatima na životinjskim organizmima.

U ovom istraživanju istraživana je genotoksičan učinak talij(I) acetata na biljku *Vicia faba* L.

Vicia faba je modelni organizam koji je često primjenjivan za određivanje oštećenja DNA komet-testom. Oštećenja DNA u stanicama korijena i lista boba istraživani su metodom neutralnog komet-testa kao i komet-testom u alkalnim uvjetima. Elektroforeza u alkalnim uvjetima pokazala se najosjetljivijom pri niskim koncentracijama, dok elektroforeza u neutralnim uvjetima daje najoptimalniji doza-odgovor u širokom stupnju koncentracija (Dhawan i sur. 2009).

Genotoksičan učinak može biti uvjetovan direktnim i indirektnim djelovanjem metala na molekulu DNA. Direktan učinak podrazumijeva interakciju metala s bazom, fosfatnom ili šećernom komponentom molekule DNA. Indirektan učinak na molekulu DNA češći je od direktnog, a temelji se na reakcijama s proteinima i drugim molekulama koje sudjeluju u održavanju strukture i funkcije molekule DNA (Kupina 2009). Za utvrđivanje prisutnosti indirektna i direktna toksičnosti talija na bobu koristila sam celularni odnosno acelularni komet-test.

Rezultati celularnog komet-testa pokazali su da se nakon 72-satnog izlaganja boba rasponu koncentracija talijeva(I) acetata javlja oštećenje DNA u korijenu biljke koje je linearno ovisno o koncentraciji (slika 13). Biljke tretirane najmanjom koncentracijom talijeva(I) acetata (2 μM) pokazuju blagi, ali statistički značajan porast repnog momenta (TM). Pri toj koncentraciji u korijenu se javlja porast repnog momenta za 7,4 puta (9,42 TM) u odnosu na kontrolni uzorak (1,28 TM). Pri sljedećoj koncentraciji od 4 μM repni moment se penje na 14,37 i pokazuje značajan skok naspram prethodne koncentracije. Koncentracija od 20 μM TIAc pokazuje manje

oštećenje od prethodne koncentracije, ali nije statistički značajno, i iznosi 13,10 TM te je veća od kontrole za 10,23 puta. Najveće oštećenje javlja se pri koncentraciji od 40 μM talijeva(I) acetata. Pri toj koncentraciji oštećenje u korijenu je 35,5 puta (45,39 TM) u odnosu na kontrolni uzorak. Istraživanje genotoksičnog utjecaja arsena koje su proveli Lin i sur. (2008) nakon tretmana od 14 dana, u korijenu boba pokazali su statistički značajan, ali ipak manji genotoksičan učinak od talija nakon 72 h. Arsen pri koncentraciji od 20 μM uzrokuje repni moment od 65,5 (1,6 puta veći od kontrole), a pri najvećoj koncentraciji od 40 μM uzrokuje TM od 131,6 (3,2 puta veći od kontrole).

U listu boba izloženih rasponu koncentracija talijeva(I) acetata također se primjećuje statistički značajan porast repnog momenta, ali su mu vrijednosti približno dvostruko manje od onih dobivenih u korijenu (slika 14). Tako je pri najmanjoj koncentraciji TIAc od 2 μM 2,75, a pri najvećoj koncentraciji od 40 μM 18,78. Vrijednosti koje su dobili Lin i sur. (2008) na jezgrama stanica boba izloženih arsenu nakon 14 dana pokazale su znatno veće oštećenje nego u korijenu te navode da je razlog tome što je u listu uzorak oštećenja DNA u skladu sa povećanjem kapaciteta antioksidativnih enzima. U korijenu, kapacitet enzima raste pri koncentraciji od 20 μM , ali se smanjuje pri većoj koncentraciji arsena (40 μM), što je moglo pridonjeti oksidacijskom stresu, a samim time i oštećenju DNA.

Lin i sur. (2008) navode da je genotoksičnost arsena u bobu posljedica povećanja reaktivnih vrsta kisika (ROS, *reactive oxygen species*) kao što su hidroksidni radikal, superoksidni radikal i vodikov peroksid. Arsen u stanicama iskorištava stanične antioksidanse i enzime te dolazi do poremećaja ravnoteže i nastupa stanje poznato kao «oksidacijski stres». U stanicama koje su pod oksidacijskim stresom javljaju se razna oštećenja DNA, proteina i lipida. Radić i sur. (2009) navode da je toksičnost teškog metala talija na bobu također posljedica povećanja reaktivnih vrsta kisika. Povećanje ROS-a može dovesti do znatnih promjena u strukturi stanice i inducirati proces mutageneze. U svom radu navode da talij uzrokuje oksidacijski stres koji je vidljiv po povećanju endogenog H_2O_2 , malondialdehida, razine karbonilnih grupa proteina te oštećenja molekule DNA. Moguće je da uzrokuje oksidacijski stres biljaka djelujući na fotosintetski transportni lanac elektrona što dovodi do povećanja proizvodnje ROS-a. Talij povećava koncentraciju H_2O_2 , što dovodi do promjena na lipidima i proteinima vidljivim iz povećane koncentracije malondialdehida i razine karbonilnih grupa proteina u korijenu i listu boba.

Rezultati celularnog komet-testa na vodenoj leći *Lemna minor* L. izloženoj sedam dana rasponu koncentracija talijeva(I) acetata, također su pokazali blagi, statistički značajan genotoksičan učinak talija. Tako pri koncentraciji od 2 μ M talijeva(I) acetata %DNA u repu iznosi 7,5% i veći je za 1,43 puta u odnosu na kontrolne biljke dok koncentracija od 10 mM TIAc uzrokuje 33% DNA u repu (Babić i sur. 2009).

Kako talij interferira s kalijem pri ulasku u stanice, proveden je i celularni komet-test u otopini koncentracije 20 μ M talijeva(I) acetata + 40 μ M kalijeva acetata. U korijenu je pri toj koncentraciji komet-test pokazao statistički značajno veće oštećenje molekule DNA za 15,4 puta (19,37 TM) nego otopina 20 μ M talijeva(I) acetata koja oštećuje DNA za 10,2 puta (13,10 TM) u odnosu na kontrolu (1,28 TM), dok je u listu pri toj koncentraciji oštećenje 1,8 puta (3,49 TM), a od otopine 20 μ M talijeva(I) acetata 2,5 puta (5,01 TM) u odnosu na kontrolni uzorak (1,97 TM). Talij negativno utječe na endogeni sadržaj kalija u mladicama boba, ali egzogeno dodan kalij održao je koncentraciju kalija u mladicama boba. Iako kalij pozitivno djeluje na toksičnost talija, Radić i sur. (2009) su došli do zaključka da bez obzira na dvostruko veću koncentraciju kalija u odnosu na talij, akumulacija talija u mladicama boba jednaka je kao i kod tretmana boba sa talijem koncentracije 20 μ M.

Acelularni komet-test u rasponu korištenih koncentracija talijeva(I) acetata nije pokazao statistički značajan genotoksičan učinak na jezgre stanica lista boba, što dovodi do zaključka da je toksičnost talija preferencijalna, ali indirektna, posredovana preko reaktivnih vrsta kisika (ROS). Rezultati se podudaraju s rezultatima na vodenoj leći u kojoj direktno izlaganje jezgri rasponu koncentracija talijeva(I) acetata nije pokazalo oštećenje molekule DNA (Babić i sur. 2009).

Kao pozitivna kontrola korišten je modelni genotoksikant vodikov peroksid koji je nakon acelularnog komet-testa pokazao značajan genotoksičan učinak s puno većim vrijednostima parametra za oštećenje DNA (repni moment) nego celularni komet-test s talijevim(I) acetatom (slika 15). Korištenjem tog modelnog genotoksikanta kao pozitivne kontrole potvrdili smo ujedno i osjetljivost komet-testa na bobu a u svrhu detekcije genotoksičnog učinka.

Komet-test je sada dobro uhodan test, a zbog svoje svestranosti dobio je važnu ulogu u toksikologiji za otkrivanje oštećenja DNA. To je pokazao sa svojom širokom primjenom u procjeni genotoksičnosti u biljnim i životinjskim modelima,

vodenim i kopnenim, u različitim organizmima, tkivima i vrstama stanica (Pavlica i sur. 2001, Klobučar i sur. 2008, Dhawan i sur. 2009).

6. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata istraživanja genotoksičnog učinka talijeva(I) acetata i vodikova peroksida komet-testom na vrstu *Vicia faba* var. aquadulce mogu zaključiti slijedeće:

1. Izlaganje jezgri stanica lista boba oksidirajućem genotoksikantu H₂O₂ u acelularnom komet-testu, rezultiralo je oštećenjem DNA te je potvrđena osjetljivost komet-testa za određivanje genotoksičnog oštećenja u biljnim stanicama.
2. Utvrđen je blagi genotoksični učinak talijeva(I) acetata u stanicama korijena i lista biljaka boba izloženih različitim koncentracijama talijeva(I) acetata tri dana u uvjetima *in vivo*.
3. Acelularni komet-test pokazao je da nema direktnog genotoksičnog djelovanja talijeva(I) acetata na jezgre stanica lista boba.
4. Bob, *Vicia faba* var. aquadulce se pokazao kao osjetljiv testni organizam za procjenu genotoksičnog učinka talij(I) acetata komet-testom.

7. 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., Pevalsek-Kozlina B., Pavlica M. (2009): Antioxidative response of *Lemna minor* plants exposed to thallium(I)-acetate. *Aquat Bot.*
- Collins A. R. (2004): The Comet Assay for DNA Damage and Repair. *Molecular biotechnology* 26.
- Cvjetko P., Cvjetko I., Pavlica M. (2009): Thallium Toxicity in Humans. *Arh Hig Rada Toksikol* (u tisku).
- Dhawan A., Bajpayee M., Parmar D. (2009): Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biol Toxicol* 25: 5– 32.
- Galvan-Arzate S., Santamaria A. (1998): Thallium toxicity. *Toxicol Lett* 99: 1-13.
- 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.
- Klobučar G.I.V., 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. *Sci Total Environ* 5: 765-771.
- Kupina A. (2009): Određivanje genotoksičnog učinka talijeva (I) acetata u duhanu komet testom, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Lin A., Zhang X., Zhu J-G., Zhao F-J. (2008): Arsenate- induced toxicity: effects on antioxidative enzymes and DNA damage in *Vicia faba*. *Enviro Toxicol Chem* 27: 413- 419.
- Malović L. (2008): Postojanost oksidativnog oštećenja DNA u hemocitima školjkaša *Unio pictorum* L., Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Melnjak A. (2009): Genotoksičan učinak talijeva(I) acetata na meristemske stanice boba (*Vicia faba* L.) i luka (*Allium cepa* L.), Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Pavlica M., Klobučar G.I.V., Mojaš N., Erben R., Papeš D. (2001): Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay. *Mutat Res* 490: 209-214.
- Pehnec G. (2006): Vodikov peroksid u troposferi, Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb, *Arh Hig Rada Toksikol*; 58:239-249.

Radić S., Cvjetko P., Glavaš K., Roje V., Pevalek-Kozlina B. and Pavlica M. (2009): Oxidative stress and DNA damage in broad bean (*Vicia faba* L.) seedlings induced by thallium. *Enviro Toxicol Chem* 28 (1): 189–196.

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

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.

Internet stranice:

1. <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/cropfactsheets/fababean.html>
2. <http://www.americanelements.com/tlac.html>
3. http://www.poliklinika-harni.hr teme/ekoteme/05teski_metali.asp
4. http://www.festivalznanosti.hr/2007/index.php?option=com_content&task=view&id=188&Itemid=70
5. <http://en.wikipedia.org/wiki/Genotoxicity>
6. <http://hr.wikipedia.org/wiki/Ekotoksikologija>