

UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET

Rajko B. Martinović

**PROMJENLJIVOST SRČANOG RITMA I  
OŠTEĆENJE DNK U HEMOCITAMA KOD  
MEDITERANSKE DAGNJE *Mytilus  
galloprovincialis* L. KAO BIOMARKERI  
ZAGAĐENJA MORA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY

Rajko B. Martinović

**HEART RATE VARIATION AND DNA  
DAMAGE IN HAEMOCYTES OF THE  
MEDITERRANEAN MUSSEL *Mytilus  
galloprovincialis* L. AS BIOMARKERS OF  
MARINE POLLUTION**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

## **MENTORI I ČLANOVI KOMISIJE**

### **Mentori:**

Dr Zoran Gačić, naučni savjetnik, Institut za multidisciplinarna istraživanja, Univerzitet u Beogradu

Dr Stoimir Kolarević, naučni saradnik, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

### **Komisija:**

Dr Branka Vuković-Gačić, redovni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Mirko Đurović, naučni saradnik, Institut za biologiju mora, Univerzitet Crne Gore

Dr Pavle Anđus, redovni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane \_\_\_\_\_2018.godine

*Ova doktorska disertacija rađena je na Institutu za biologiju mora u Kotoru Univerziteta Crne Gore, Katedri za mikrobiologiju, Centru za genotoksikologiju i ekogenotoksikologiju, Biološkog fakulteta, kao i Institutu za multidisciplinarne studije, Univerziteta u Beogradu u okviru projekata:*

*KOTOR – Kompleksno istraživanje ekosistema obalnog mora Crne Gore, projekat Ministarstva nauke Crne Gore*

*Program monitoringa stanja morskog ekosistema priobalnog mora Crne Gore (u okviru MED POL programa), Agencija za zaštitu životne sredine, Crna gora*

*TENECOPORT – Transnational ENhancement of ECOPORT8 network - IPA SEE Programme Project, projekat Evropske Unije*

*Academic Synapsing in the Balkans – DAAD Akademischer Neuaufbau Südosteuropa, projekat Njemačke službe za akademsku razmjenu*

*Monitoring i biomonitoring kvaliteta vode za marikulturu i procjena prirodnih resursa školjaka u Bokokotorskom zalivu, projekat Ministarstva poljoprivrede i ruralnog razvoja Crne Gore*

*Veliku zahvalnost dugujem mentoru dr Zoranu Gačiću na stručnom vođenju tokom istraživanja kao i izrade ove disertacije. Hvala na strpljenju i što sam u svakom trenutku mogao da računam na Vašu pomoć u radu.*

*Na ovom mjestu želim da pomenem mentora prof. dr Zorana Kljajića, koji nažalost više nije među nama, jer osjećam veliku zahvalnost što je osmislio i vodio veći dio istraživanja u okviru ove disertacije.*

*Veliko hvala mentoru dr Stoimiru Kolareviću, koji je značajno doprinio izvođenju eksperimenata, obradi rezultata i unaprijedio kvalitet mojih naučnih radova.*

*Zahvalnost dugujem prof. dr Branki Vuković Gačić što je omogućila realizaciju jednog dijela istraživanja. Hvala Vam na korekcijama i sugestijama koje su značajno unaprijedile kvalitet ove disertacije.*

*Zahvaljujem se prof. dr Pavlu Anđusu, koji je vodio teorijski dio mojih doktorskih studija na katedri za Opštu fiziologiju i biofiziku.*

*Zahvaljujem se Istraživačkom centru za ekološku bezbjednost iz Sankt Peterburga, Ruske Akademije Nauka (SRCES-RAS), kompaniji Alliance Group iz Moskve, Rusija i Agenciji za zaštitu životne sredine Crne Gore koji su obezbijedili eksperimentalnu jedinicu za fiziološki dio istraživanja.*

*Prof. Sergey V. Kholodkevich i Anton S. Kurakin iz SRCES-RAS su omogućili da savladam princip rada eksperimentalne jedinice za fiziološki dio istraživanja, na čemu sam im zahvalan.*

*Želio bih da se zahvalim mojim koleginicama dr Margareti Kračun Kolarević, Jovani Kostić i Sandri Jokanović na velikoj pomoći pri eksperimentalnom radu.*

*Zahvaljujem se direktoru Instituta za biologiju mora dr Mirku Đuroviću, rukovodiocu laboratorije za Hemiju mora i okeanografiju, dr Danijeli Joksimović, koleginicama Ani Castelli i Mileni Mitrić, kolegama Branu Lazareviću, dr Zdravku Ikici, Vladanu Vukoviću i svima koji su doprinijeli izradi ove disertacije.*

*Veliku zahvalnost dugujem mojoj porodici za podršku koju su mi pružili. Mojoj Ani, Andrei i Stefanu dugujem najveću zahvalnost.*

## **Promjenljivost srčanog ritma i oštećenje DNK u hemocitama kod mediteranske dagnje *Mytilus galloprovincialis* L. kao biomarkeri zagađenja mora**

### **Izvod**

Integrirani pristup biomonitoringa koji uključuje bateriju biotestova, omogućava pouzdaniju detekciju različitih vrsta organskog i neorganskog zagađenja u cilju procjene stanja u morskom ekosistemu.

U ovom radu je praćen uticaj hemijskih stresora na srčani ritam mediteranske dagnje pri kratkotrajnim tretmanima *ex situ*. Pošto biomarkeri na ćelijskom i molekularnom nivou imaju veću specifičnost, u cilju unaprijeđenja pouzdanosti i praktične primjenljivosti srčanog ritma kao fiziološkog biomarkera, urađeni su i produženi tretmani dagnji, takođe *ex situ*, u kojima su uporedno analizirani srčani ritam i oštećenja DNK u hemocitama mediteranske dagnje.

Pri kratkotrajnim tretmanima, ispitivan je uticaj promjene u salinitetu morske vode na srčani ritam dagnji koji je praćen fotopletizmografski, fiber-optic metodom. Takođe, ispitivan je odgovor srčanog ritma dagnje pri izlaganju kadmijum hloridu, dizel gorivu, naftnom disperzantu Superdispersant-25 i dispergovanom dizelu, pri čemu je potvrđena sposobnost dagnji da detektuju stres u ranoj fazi.

Prilikom produženih tretmana dagnji, uporedno sa praćenjem srčanog ritma, procijenjen je genotoksični potencijal kadmijum hlorida kao model mutagena, dizel goriva, Superdispersant-25, benzo(a)pirena i tributil kalaj hlorida kao zagađivača čija kontrola je od velikog značaja. Uz komet test koji je služio za procjenu oštećenja DNK, genotoksični potencijal tributil kalaj hlorida, analiziran je mikronukleus testom i prokariotskim SOS/*umuC* testu *in vitro*. Dobijeni rezultati su pokazali da je dispergovani dizel mnogo opasniji po školjke usljed veće dostupnosti njegovih sastojaka. Rezultati praćenja srčanog ritma pri tretmanima tributil kalaj hloridom mogu se povezati sa podacima dobijenim u genotoksikološkim testovima što ukazuje da bi se srčani ritam dagnji mogao koristiti kao pouzdan biomarker u detekciji zagađenja porijeklom od organokalajnih jedinjenja.

Na osnovu rezultata dobijenih pri kratkotrajnim i produženim tretmanima organskim i neorganskim zagađivačima, srčani ritam mediteranske dagnje se može preporučiti za korišćenje kao sastavni dio integrisanog pristupa u biomonitoringu zagađenja mora.

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Ekofiziologija

**UDK broj:** [594.124+591.112.1]:574.64(043.3)

**Ključne riječi:** srčani ritam, oštećenje DNK, mediteranska dagnja, *Mytilus galloprovincialis*, biomarkeri, zagađenje mora

**Heart rate variation and DNA damage in haemocytes of the Mediterranean mussel  
*Mytilus galloprovincialis* L. as biomarkers of marine pollution**

**Abstract**

Integrated biomonitoring approach that includes a battery of bioassays, enables more reliable detection of different types of organic and inorganic pollutants which would improve the evaluation of the state of the marine ecosystem.

In this study, the influence of short-term treatments by chemical stressors on the heart rate of the Mediterranean mussel was monitored *ex situ*. Since cellular and molecular biomarkers are characterized by higher specificity, extended treatments for comparative analyses of the heart rate and DNA damage in haemocytes were performed to improve reliability and applicability of the Mediterranean mussel's heart rate as a physiological biomarker.

Fiber-optic method, based on photoplethysmography, was applied for studying the influence of variations in seawater salinity on the heart rate of mussels. The influence of cadmium chloride, diesel oil, oil dispersant Superdispersant-25 and dispersed diesel oil was studied as well, whereby the ability of mussel's heart rate to detect stress at an early stage was confirmed.

Comparative analyses of mussel's heart rate and genotoxic potential of cadmium chloride as a model mutagen, diesel oil, Superdispersant-25, benzo(a)pyrene and tributyltin as pollutants of importance to control, in extended treatments were assessed. Comet assay was used for the assessment of DNA damage. Moreover, genotoxic potential of tributyltin was assessed *in vitro* by micronucleus test and prokaryotic SOS/*umuC* assay. The results indicated that dispersed diesel oil was more harmful for mussels due to enhanced availability of its compounds. Heart rate results obtained in tributyltin chloride treatments can be linked to the data obtained in genotoxicological assays indicating that mussels' heart rate could be used as a reliable biomarker for detection of organotin pollution.



The results obtained in short-term and extended treatments by organic and inorganic pollutants indicated that heart rate of the Mediterranean mussel can be included as a part of the integrated approach of marine pollution biomonitoring.

**Research field:** Biology

**Specific research field:** Ecophysiology

**UDC No.:** [594.124+591.112.1]:574.64(043.3)

**Key words:** heart rate, DNA damage, Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, biomarkers, marine pollution

## Spisak skraćenica korišćenih u tekstu

4NQO – 4-Nitrohinolin

A/D – eng. analog to digital

AO – akridin oranž

B(a)P – eng. benzo(a)pyrene – benzopiren

CV – koeficijent varijacije

DMSO – dimetil sulfoksid

DSB – eng. double-strand breaks – dvolančani prekidi

EB – etidijum bromid

EDTA – eng. Ethylenediaminetetraacetic acid

EKG – elektrokardiografija

HH – eng. Hedgehogs – jedra sa velikim oštećenjem

HRV – eng. Heart Rate Variability – varijabilnost srčanog ritma

IMO – eng. International Maritime Organization – Međunarodna pomorska organizacija

LMP – eng. Low Melting Point

MN – frekvencija mikronukleusa

MRI – eng. Magnetic Resonance Imaging – oslikavanje magnetnom rezonancom

NMP – eng. Normal Melting Point

ONPG – 2-nitrofenil-β-d-galaktopiranozid

PAH – eng. polycyclic aromatic hydrocarbons – policiklični aromatični ugljovodonici

PBS – eng. Phosphate Buffered Saline Solution

PCB – eng. polychlorinated biphenyles – polihlorovani bifenili

POP – eng. Persistent Organic Pollutants – perzistentni organski zagađivači

PPG – eng. Photoplethysmography – fotopletizmografija

ppm – eng. Parts Per Million

rpm – eng. Rounds Per Minute

S-25 – eng. Superdispersant-25

SCE – eng. Sister chromatid exchange – razmjena između sestrinskih hromatida

SCGE – eng. Single Cell Gel Electrophoresis – elektroforeza pojedinačnih ćelija

SD – standardna devijacija

Si – stopa indukcije

SR – srčani ritam

Sr – stopa rasta

SSB – eng. single-strand breaks – jednolančani prekidi

TBT – eng. tributyltin – tributil kalaj

TBT-Cl – eng. tributyltin chloride – tributil kalaj hlorid

TI –eng. Tail Intensity

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1. ZAGAĐENJE MORA .....	1
1.1.2. Perzistentni organski zagađivači .....	2
1.1.2.1. Policiklični aromatični ugljovodonici (PAH).....	2
1.1.2.2. Surfaktanti .....	3
1.1.2.3. Organokalajna jedinjenja.....	4
1.1.3. Metali .....	5
1.1.4. Nutrijenti .....	6
1.2. MEDITERANSKA DAGNJA KAO BIOINDIKATOR ZAGAĐENJA .....	6
1.3. TESTOVI ZA DETEKCIJU DNK OŠTEĆENJA .....	7
1.3.1. SOS/ <i>umuC</i> test za detekciju oštećenja DNK.....	8
1.3.2. Komet test za detekciju oštećenja DNK.....	9
1.3.3. Mikronukleus test za detekciju oštećenja DNK.....	10
1.4. SRČANI RITAM DAGNJE KAO BIOMARKER.....	11
1.5. SRČANI RITAM I OŠTEĆENJE DNK U HEMOCITAMA MEDITERANSKE DAGNJE PRI KRATKOTRAJNOM I PRODUŽENOM IZLAGANJU ODABRANIM ZAGAĐIVAČIMA .....	13
<b>2. CILJEVI.....</b>	<b>15</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE.....</b>	<b>16</b>
3.1. MATERIJAL .....	16
3.1.1. Hemijske supstance .....	16
3.1.2. Rastvori .....	16
3.2. PRAĆENJE UTICAJA STRESORA NA SRČANI RITAM DAGNJE PRILIKOM KRATKOTRAJNOG IZLAGANJA .....	20
3.2.1. Uzorkovanje .....	20
3.2.2. Tretmani jedinki .....	23
3.2.2.1. Uticaj promjene saliniteta morske vode na srčani ritam dagnji.....	23
3.2.2.2. Uticaj CdCl <sub>2</sub> na srčani ritam dagnji .....	23
3.2.2.3. Uticaj dizel goriva i Superdispersant-25 na srčani ritam dagnje .....	24
3.3. UPOREDNE ANALIZE PRAĆENJA SRČANOG RITMA DAGNJI I GENOTOKSIČNOSTI PRILIKOM PRODUŽENOG IZLAGANJA.....	24
3.3.1. Uzorkovanje .....	24
3.3.2. Produženo izlaganje dizel gorivu i S-25 .....	25
3.3.2.1. Rastvori.....	25
3.3.2.1. Izlaganje za analizu srčanog ritma.....	25
3.3.2.2. Izlaganje za procjenu genotoksičnosti.....	26
3.3.3. Produženo izlaganje TBT-Cl.....	26
3.3.3.1. Rastvori.....	26

3.3.3.2. Izlaganje za analizu srčanog ritma.....	27
3.3.3.3. Izlaganje za procjenu genotoksičnosti.....	27
3.4. METODE.....	28
3.4.1. Aklimacija.....	28
3.4.2. Fiber-optic metod za praćenje i analizu srčanog ritma beskičmenjaka.....	29
3.4.3. Uzorkovanje hemolimfe.....	32
3.4.4. Diferencijalno bojenje ćelija akridin oranž/etidijum bromid (AO/EB).....	33
3.4.5. Komet test.....	33
3.4.6. Mikronukleus test.....	34
3.4.7. SOS/ <i>umuC</i> .....	35
3.4.8. Statističke analize.....	36
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>38</b>
4.1. UTICAJ STRESORA NA SRČANI RITAM DAGNJE PRILIKOM KRATKOTRAJNOG IZLAGANJA.....	38
4.1.1. Fizičko – hemijski parametri morske vode na lokalitetima Stoliv, Dobrota 1 i Dobrota 2.....	39
4.1.2. Uticaj kratkotrajne promjene saliniteta morske vode na srčani ritam dagnji.....	40
4.1.3. Uticaj CdCl <sub>2</sub> na srčani ritam dagnji prilikom kratkotrajnog izlaganja.....	42
4.1.4. Uticaj dizel goriva i S-25 na srčani ritam dagnji prilikom kratkotrajnog izlaganja.....	44
4.2. UPOREDNE ANALIZE PRAĆENJA SRČANOG RITMA DAGNJI I GENOTOKSIČNOSTI PRILIKOM PRODUŽENOG IZLAGANJA STRESORIMA.....	46
4.2.1. Fizičko-hemijski parametri morske vode na lokalitetu Dobrota 1.....	46
4.2.2. Uticaj dizel goriva i S-25 prilikom produženog izlaganja.....	48
4.2.2.1. Uticaj dizel goriva i S-25 na srčani ritam dagnji prilikom produženog izlaganja.....	48
4.2.2.2. Uticaj dizel goriva i S-25 na preživljavanje ćelija i oštećenje DNK u hemocitama dagnji prilikom produženog izlaganja.....	53
4.2.2.2.1. Uticaj dizel goriva i S-25 na vijabilnost hemocita dagnji.....	53
4.2.2.2.2. Uticaj dizel goriva i S-25 na nivo oštećenja DNK molekula u hemocitama dagnji - komet test.....	54
4.2.3. Uticaj TBT-Cl prilikom produženog izlaganja.....	55
4.2.3.1. Uticaj TBT-Cl na srčani ritam dagnje prilikom produženog izlaganja.....	56
4.2.3.2. Uticaj TBT-Cl na nivo oštećenja DNK molekula u hemocitama dagnji i indukciju mutageneze u prokariotskom modelu prilikom produženog izlaganja.....	59
4.2.3.2.1. Uticaj TBT-Cl na vijabilnost hemocita dagnji.....	60
4.2.3.2.2. Uticaj TBT-Cl na nivo oštećenja DNK molekula u hemocitama dagnji – komet test.....	61

4.2.3.2.3. Uticaj TBT-Cl na nivo oštećenja DNK molekula u hemocitama dagnji – mikronukleus test.....	63
4.2.3.2.4. Procjena gentoksičnog potencijala TBT-Cl u akvarijumskoj vodi SOS/ <i>umuC</i> testom.....	64
<b>5. DISKUSIJA.....</b>	<b>67</b>
5.1. PRAĆENJE UTICAJA STRESORA NA SRČANI RITAM DAGNJE PRILIKOM KRATKOTRAJNOG IZLAGANJA.....	67
5.2. UPOREDNE ANALIZE PRAĆENJA SRČANOG RITMA DAGNJI I GENOTOKSIČNOSTI PRILIKOM PRODUŽENOG IZLAGANJA STRESORIMA.....	70
5.2.1. Uticaj dizel goriva i S-25 prilikom produženog izlaganja.....	70
5.2.1.1. Uticaj dizel goriva i S-25 na srčani ritam dagnji prilikom produženog izlaganja.....	71
5.2.1.2 Uticaj dizel goriva i S-25 na nivo oštećenja DNK molekula u hemocitama dagnje prilikom produženog izlaganja.....	72
5.2.2. Uticaj TBT-Cl prilikom produženog izlaganja.....	74
5.2.2.1. Uticaj TBT-Cl na srčani ritam dagnje prilikom produženog izlaganja.....	75
5.2.2.2. Uticaj TBT-Cl na nivo oštećenja DNK molekula u hemocitama dagnji i indukciju mutageneze u prokariotskom modelu prilikom produženog izlaganja.....	76
5.2.2.3. Opšte poređenje između primijenjenih biotestova.....	78
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>80</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>82</b>

# UVOD

### 1. Uvod

Obalni djelovi svjetskog mora i velikih rijeka odlikuju se najvećom gustom stanovništva pa je u tim oblastima antropogeni pritisak najizraženiji. S obzirom da svjetsko more predstavlja krajnje odredište ukupnog zagađenja sa kopna, u cilju očuvanja životne sredine i održivog korišćenja mora kao resursa, neophodan je kontinuirani razvoj i unaprijeđenje metodologije praćenja kvaliteta morske vode. Oktobra 2015, preporuka UNEP/MAP Mediteranskog akcionog plana (MAP) pod okriljem UN programa za životnu sredinu (UNEP), bila je da mediteranske zemlje naprave strategiju na osnovu koje će se pored klasičnih hemijskih metoda, proširiti i dalje razvijati upotreba bioloških metoda za procjenu stanja ekosistema.

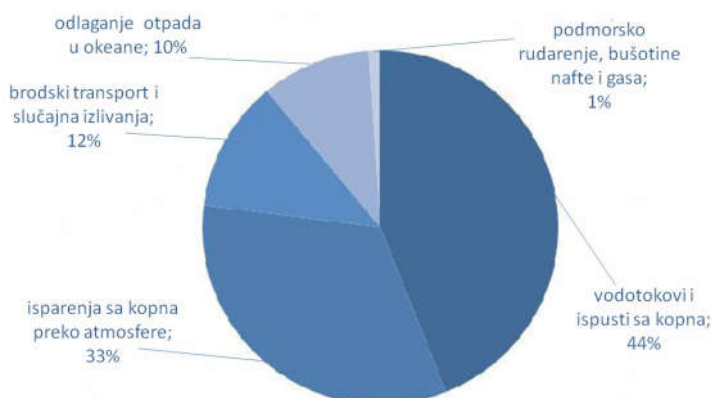
Da bi se dobio što realniji uvid u stanje morskog ekosistema potrebno je imati integrisani pristup koji uključuje bateriju biotestova sprovedenih od molekularnog pa do najvišeg nivoa funkcionalne organizacije ispitivanog organizma.

#### 1.1. Zagađenje mora

Najveći dio zagađenja koje dopijeva u more porijeklom je sa kopna, od toga značajan procenat čine pražnjenja i ispusti koji dolaze vodenim putevima (44%) ili isparenjima koja se prenose putem atmosfere (33%), 12% ukupnog zagađenja nastaje pomorskim aktivnostima i nezgodama na moru, odlaganje raznog smeća i otpadnih voda čini 10%, dok svega 1% zagađenja potiče od podvodnih rudarenja i bušotina za naftu i gas (**Slika 1.1.**; Potters, 2013).

Postoji više načina za podjelu zagađivača, prema fizičko-hemijskom sastavu (organski, neorganski), fizičkom stanju (čvrsti i rastvoreni), postojanosti (biorazgradivi, perzistentni) i izvoru zagađenja (tačkasti, netačkasti) (Potters, 2013). Najznačajniji organski zagađivači mora su nafta i derivati, kao i perzistentni organski zagađivači, dok se u važne neorganske zagađivače ubrajaju metali i nutrijenti odnosno hranljive soli.





Slika 1.1. Udio različitih izvora zagađenja u morskom ekosistemu (Potters, 2013)

### 1.1.2. Perzistentni organski zagađivači

Perzistentni organski zagađivači (eng. persistent organic pollutants – POP) su jedinjenja koja su uglavnom antropogenog porijekla, otporna su na razgradnju fotolizom, hemijsku transformaciju i biološki tretman (Edulee, 2001). U dužem vremenskom periodu opstaju u morskom ekosistemu, talože se u sedimentima i akumuliraju u tkivu pri čemu dovode do trovanja organizama. Mnogi POP su genotoksični jer mogu modifikovati strukturu i cjelovitost DNK molekula (Shugart, 1995), pri čemu može doći do mutagenoze (mijenjanja genetičke informacija), teratogeneze (poremećaja u razvoju), klastogeneze (prekida hromozoma) i kancerogeneze (stvaranja tumora) (Siu i sar., 2004a). Prema podjeli Albaigés (2005), prvu grupu čine organohlorni pesticidi DDT, aldrin, dieldrin, hlordan, polihlorovani bifenili (eng. polychlorinated bifenyles – PCB), dioksini i furani, dok se u drugu grupu ubrajaju policiklični aromatični ugljovodonici (eng. polycyclic aromatic hydrocarbons - PAH), surfaktanti i organokalajna jedinjenja.

#### 1.1.2.1. Policiklični aromatični ugljovodonici (PAH)

PAH su jedinjenja nastala u procesu nepotpunog sagorijevanja organskog materijala u prirodnim procesima, a mogu nastati i antropogenim djelovanjem (Yu, 2002), i imaju kancerogeno i mutageno dejstvo (Luch, 2005). Plava dagnja (*Mytilus edulis*) ima nisku

sposobnost razgradnje PAH-ova što dovodi do bioakumulacije u tkivima, pa je u literaturi najčešće korišćena kao model za njihovo proučavanje (Hylland, 2006). Benzo(a)piren (B(a)P) je PAH koji ima visoku molekulsku masu, njegov kancerogeni potencijal pokazan je u brojnim studijama sprovedenim na različitim životinjama (Juhasz i Naidu, 2000). PAH-ovi se nalaze u različitim količinama u fosilnim gorivima kao što su nafta, zemni gas i ugalj.

Velika potražnja za naftom i derivatima, uslovala je njihovu pojačanu proizvodnju, transport i upotrebu, pa je ponekad neizbježno ispuštanje nafte u more. Pored ranijih nezgoda velikih razmjera, uključujući potonuća tankera ili eksplozija na bušotinama, svakodnevno dolazi do izlivanja manjih količina nafte i derivata u životnu sredinu, što na globalnom nivou nije zanemarljivo (Schmidt-Etkin, 2001). Dizel gorivo, kao najzastupljeniji derivat nafte, može imati ozbiljne posljedice po životnu sredinu mora jer se uglavnom sastoji od visoko razgradivih jedinjenja i PAH-ova niže molekulske mase koji su dostupniji organizmima (Fingas, 2011).

### **1.1.2.2. Surfaktanti**

Surfaktanti (površinski aktivne supstance) se ubrajaju u novonastale ili novo otkrivene zagađivače (eng. emerging pollutants), odnosno jedinjenja koja trenutno nisu obuhvaćena regulativama o kvalitetu vode i za koja se sumnja da predstavljaju opasnost po životnu sredinu (La Farre i sar., 2008). Surfaktanti, kao aktivne komponente i različiti tipovi rastvarača su sastavni djelovi naftnih disperzanata koji se koriste pri hemijskom tretmanu naftnih mrlja da bi povećali nivo razgradnje nafte u vodi (GESAMP, 1993). Prema podacima iz ranije studije Wells (1984), nafta i derivati nafte imaju veći nivo akutne toksičnosti po organizme u poređenju sa naftnim disperzantima. Zbog brojnih posljedica, nastalih nakon kasnijeg masovnog korišćenja disperzanata, u pitanje se dovodi opravdanost njihove primjene u životnoj sredini.

Toksična svojstva disperzanata su postala dobro poznata 2010. nakon nezgode na bušotini nafte „Deepwater Horizon“ u Meksičkom zalivu. Negativan uticaj disperzanata po životnu sredinu je veoma značajan, što je dokumentovano u pregledu 38 ekotoksikoloških

studija (Wise i Wise, 2011). Većina studija koje se bave štetnim dejstvom disperzanata, uključuje disperzante starije generacije koje sadrže rastvarače na bazi PAH-ova, nasuprot novijim formulama (treća generacija disperzanata) koje sadrže glikolne etre, pa se smatra da su manje toksične po životnu sredinu (European Maritime Safety Agency, 2009). S druge strane, 5 proizvoda treće generacije disperzanata, čak i u niskoj koncentraciji štetni su po rane stupnjeve razvoja dvije vrste koralna, što dovodi u pitanje njihovu *in situ* primjenu u blizini koralnih grebena (Epstein i sar., 2000).

Superdispersant-25 (S-25) pripada novijoj generaciji naftnih disperzanata i ima sve potrebne dozvole za primjenu na morima, plažama i kamenitim obalama (Oil Slick Dispersants Ltd, 2014), a koristi se u zoni Jadranskog mora. Međutim, studija Scarlet i sar. (2005) pokazala je toksični efekat S-25 kod *Anemonia viridis* (LC50 – 20 ppm), *Corophium volutator* (LC50 – 260 ppm) i *Zostera marina* (LC50 – 386 ppm). U studiji De Flora i sar. (1985) pokazan je genotoksični potencijal 3 često korišćena disperzanta na osnovu bakterioloških testova. Studija Wise i sar. (2014) ukazala je na citotoksični i genotoksični potencijal naftnih disperzanata Corexit 9500 i Corexit 9527 u primarnim kulturama ćelija fibroblasta kože kod ulješure. Generalno, iako ima podataka koji ukazuju na štetno dejstvo S-25, nema dostupne literature koja obuhvata njihov uticaj na fiziologiju morskih organizama i genotoksični potencijal.

### **1.1.2.3. Organokalajna jedinjenja**

Jedinjenja koja sadrže bar jednu vezu atoma ugljenika i kalaja ubrajaju se u organokalajna jedinjenja. Pored primjene u proizvodnji plastike, organokalajna jedinjenja su jedna od najefikasnijih grupa biocida koji se koriste za spriječavanje razvoja organizama koji obrastaju čvrste predmete u vodi (Champ i Seligman, 1996). Najčešće korišćen biocid iz ove grupe je tributil kalaj (eng. Tributyltin – TBT). Velika pažnja u istraživanjima morskog ekosistema posvećena je TBT, biocidnoj komponenti protivobraštajnih boja koje imaju važan ekonomski značaj za plovila i infrastrukturu u vodenoj sredini. TBT izaziva čitav niz različitih štetnih posljedica po životinje u vodi, od kojih je najpoznatiji endokrini poremećaj – imposeks, koji se javlja kod morskih puževa i dovodi do steriliteta ženki koje

poprimaju polne karakteristike mužjaka (Matthiessen i Gibbs 1998; Axiak i sar., 2003; Domínguez-Ojeda i sar., 2015), zatim neurotoksičnosti kod riba (Zhang i sar., 2008; Li i sar., 2015) i raznih poremećaja u njihovom razvoju (Wu i sar., 2014). Takođe, potvrđena je bioakumulacija u tkivima školjki, riba i sisara (Iwata i sar., 1995; Regoli i sar., 2001; Dwivedi i Trombetta, 2003). Ovi podaci idu u prilog tvrdnji da je TBT najtoksičnija supstanca koja je sa namjerom unešena u more (Goldberg, 1986). Iako je 2003. god., od strane Međunarodne Pomorske Organizacije (eng. International Maritime Organization - IMO), na globalnom nivou zabranjena upotreba protivobraštajnih boja koje sadrže TBT, određene zemlje u razvoju i zemlje koje nisu članice IMO, nastavile su da proizvode ovaj biocid (Antizar-Ladislao, 2008). Zabrana korišćenja TBT se poštuje samo u 40 % slučajeva i pošto se TBT ubraja u POP, predstavljajući problem za životnu sredinu mora još duži niz godina (Chapman i Guillette, 2013).

U dostupnoj literaturi, samo studija Nicholson (2003) se bavi ispitivanjem uticaja protivobraštajnih boja koje sadrže TBT na srčani ritam (SR) morskih školjki, a nedostaju i podaci o direktnom dejstvu TBT na SR morskih beskičmenjaka *in vivo*.

Genotoksični potencijal jedinjenja TBT proučavan je kod prokariota i eukariota. Studije sprovedene u prokariotskim sistemima pokazuju nedovoljno podataka o mutagenosti ovih jedinjenja (Hamasaki i sar., 1992, 1993), s druge strane genotoksični potencijal TBT je veoma dobro dokumentovan na različitim vodenim organizmima, kao što su morski crvi (Hagger i sar., 2002), razne vrste riba (Cipriano i sar., 2004; Micael i sar., 2007; Tiano i sar., 2001) i školjke (Hagger i sar., 2005). Uprkos velikom interesovanju za ovu grupu zagađivača, još uvijek u potpunosti nisu razjašnjeni molekularni mehanizmi genotoksičnog dejstva TBT.

### 1.1.3. Metali

Metali se prirodno nalaze u životnoj sredini mora, pri čemu može doći do povećanja njihove koncentracije antropogenim uticajem. Prisutni su u vodi, sedimentu i tkivima morskih organizama. Neki od njih su od suštinskog značaja za održavanje vitalnih funkcija pa se nazivaju esencijalnim i nisu štetni ukoliko njihove koncentracije ne prelaze prag

osjetljivosti organizma. S druge strane, neesencijalni metali kao što su olovo, živa i kadmijum mogu biti toksični u tragovima (Jakimska i sar., 2011).

Kadmijum se u morskoj vodi najčešće nalazi u kompleksima sa hloridima (Rainbow, 1985), akumulira se u tkivu organizama i gradi komplekse sa metalotioneinima (Jakimska i sar., 2011). Kadmijum ima široku upotrebu, indukuje brojne poremećaje, neki od njih su jednolančani prekidi DNK jer dovodi do oksidativnog stresa (Waisberg i sar., 2003), smanjena mogućnost popravke oštećenja DNK, povećana mutageneza i smrt ćelije (Bertin i Averbeck, 2006).

### 1.1.4. Nutrijenti

Povećana koncentracija nutrijenata, odnosno hranljivih soli (amonijum joni, nitrati, nitriti i fosfati) u moru, porijeklom iz raznih ispusta sa kopna, dovodi do eutrofikacije, odnosno uslovljava pojačan razvoj planktonskih algi, a time i potrošnju rastvorenog kiseonika i smanjivanje providnosti što doprinosi pogoršanju kvaliteta morske vode. Takođe, postoji interferencija zasićenja vode nutrijentima sa razvojem patogenih bakterija, što može dovesti do infektivnih oboljenja kod organizama koji usvajaju nutrijente i putem lanaca ishrane uticati na stabilnost ekosistema (Smith i Schindler, 2009). Bokokotorski zaliv je izložen prilivu kopnenih voda bogatih hranljivim solima, pa je određivanje njihove koncentracije značajno kod proučavanja dagnji čija se ishrana zasniva na filtriranju vode.

### 1.2. Mediteranska dagnja kao bioindikator zagađenja

Mediteranska dagnja *Mytilus galloprovincialis* L. (Slika 1.2.) je kosmopolitska vrsta, hrani se filtriranjem vode, ima sesilan način života i sposobnost akumuliranja zagađivača pa se često koristi u procjeni nivoa zagađenja spoljne sredine i uticaja različitih polutanata (Lionetto et al., 2003; Regoli et al., 2004; Vlahogianni et al., 2007; Moschino i sar., 2011; Spada i sar., 2013).

Dagnje su morski organizmi koji naseljavaju zonu plime i osjeke, izloženi su čestim i značajnim promjenama u temperaturi i salinitetu površinskog dijela vodenog stuba.

Njihova sposobnost da prevaziđu i opstanu pod promjenljivim uslovima životne sredine, čini ih veoma pogodnim modelom za proučavanje fiziologije mekušaca, kao i za razvoj novih tehnologija koje imaju primjenu u otkrivanju zagađenja mora.



Slika 1.2. Mediteranska dagnja *Mytilus galloprovincialis* L.

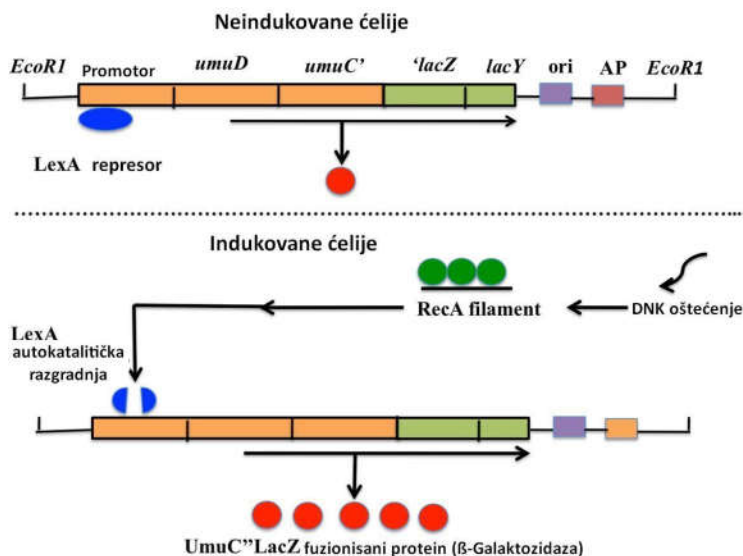
### 1.3. Testovi za detekciju DNK oštećenja

Genotoksični agensi indukuju različita oštećenja DNK molekula koja obuhvataju i jednolančane (eng. single-strand breaks - SSB) i dvolančane (eng. double-stranded breaks - DSB) prekide (Barnard i sar., 2013). Uprkos visokoj efikasnosti reparacije, može doći do nastanka složenih promjena, što može biti smrtonosno za ćeliju. Primjenom različitih testova moguće je detektovati oštećenje DNK na molekularnom, genskom i hromozomskom nivou, kao i na nivou čitavog organizma.

### 1.3.1. SOS/*umuC* test za detekciju oštećenja DNK

Prokariotski SOS/*umuC* test na bakteriji *Salmonella typhimurium* TA1535 pSK1002, spada u grupu testova za detekciju oštećenja DNK na nivou molekula. U ovom testu prati se sposobnost genotoksičnog agensa da indukuje ekspresiju jednog od SOS gena, *umuC* gena, odgovornog za „error prone“ reparaciju i mutagenezu kod bakterija (Oda i sar., 1985). Radi proučavanja regulacije *umuC* gena koji je pod kontrolom *lexA* i *recA* gena, konstruisan je plazmid koji sadrži *umu* operon fuzionisan sa *lacZ* genom. (Hideo i sar., 1983). Pri indukciji SOS odgovora, eksprimira se *umuC*’*lacZ* fuzionisani gen koji je pod kontrolom *umuDC* promotora, pri čemu nastaje UmuC’LacZ fuzionisani protein, pošto taj protein ima  $\beta$ -galaktozidaznu aktivnost moguće je odrediti i nivo ekspresije *umuC* gena kolorimetrijskim mjerenjem ove aktivnosti (Slika 1.3.; Oda, 2016).

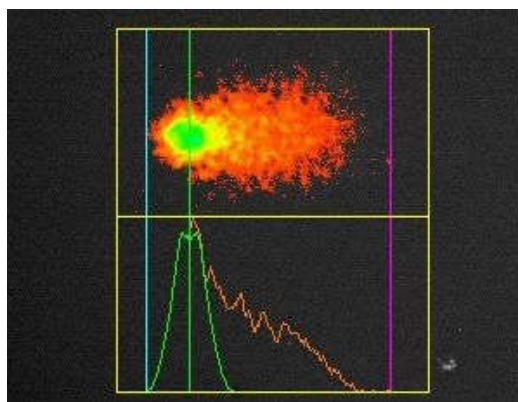
Usljed nedostatka podataka iz literature, teško je zaključiti da li sastojci TBT imaju sposobnost mutageneze. Na osnovu rezultata studije Jovanović i sar. (2017), u pitanje se dovodi osjetljivost *in vitro* testova, uključujući SOS/*umuC* test, pri čemu nije otkriven genotoksični potencijal ispitivanih uzoraka, slaba osjetljivost zapažena je i pri izlaganju B(a)P, korišćenom kao pozitivna kontrola.



Slika 1.3. Princip *umu* testa na osnovu *umuC*’*lacZ* fuzionisanog gena (Oda, 2016).

### 1.3.2. Komet test za detekciju oštećenja DNK

Komet test ili elektroforeza pojedinačnih ćelija (eng. *single cell gel electrophoresis - SCGE*), je jedna od najznačajnijih metoda za procjenu genotoksičnosti kod različitih organizama, uključujući i akvatične, koja detektuje oštećenje DNK na molekularnom nivou (Dixon et al., 2002; Chen i sar., 2007; Picado i sar., 2007; Kolarević et al., 2013; Sunjog et al., 2014). Značajne faze u toku izvođenja alkalnog komet testa su održavanje uzoraka na ledu radi usporavanja procesa u ćeliji, čime se smanjuje nivo reparacije DNK, zatim razgradnja ćelijske membrane, raskidanje vodoničnih veza i rasplitanje lanaca DNK pod uticajem visoke pH. Komet test je osjetljiva i brza tehnika koja se zasniva na migraciji denaturisane DNK u toku elektroforeze. Test pokazuje rane znake oštećenja genetičkog materijala (Jha, 2008). Takođe, prednost komet testa u primjeni kod akvatičnih organizama je što se oštećenje DNK može mjeriti na nivou individualnih ćelija, pri čemu je manji broj dovoljan za analizu na bilo kom tipu eukariotske ćelije (Leroy, 1996; Lee i Steinert, 2003) i na prokariotskom modelu (Singh i sar., 1999). Oštećena jedra (komete) mogu se vizuelno analizirati klasifikujući komete na osnovu stepena oštećenja ili korišćenjem računarskog programa Comet IV Computer Software (Perceptive Instruments, UK; **Slika 1.4.**). Komet testom se detektuju prekidi lanaca, alkalno labilna mjesta i oksidativna oštećenja, dok se za precizniju detekciju oksidovanih baza koriste bakterijski enzimi koji prevode ovaj tip oštećenja u prekide lanaca (Dhawan i sar., 2009).



**Slika 1.4.** Hemocita sa oštećenjem DNK prikazana korišćenjem računarskog programa Comet IV Computer Software (Perceptive Instruments, UK)



Pošto smrt ćelije ujedno dovodi do oštećenja DNK, prije analize genotoksičnog potencijala neke supstance komet testom, određuje se preživljavanje ćelija u kontrolnoj grupi jedinki, koje za *in vivo* testove mora biti >70-80% da bi se isključio citotoksični efekat (Tice i sar., 2000). Za bojenje DNK u komet testu, kao i pri određivanju vijabilnosti ćelija mogu se koristiti fluorescentne boje akridin oranž (AO) i etidijum bromid (EB). Vijabilnost ćelija može se odrediti i „trypan blue“ testom koji omogućava isključivo bojenje mrtvih ćelija koje se na mikroskopu uočavaju bez korišćenja fluorescencije (Strober, 2001).

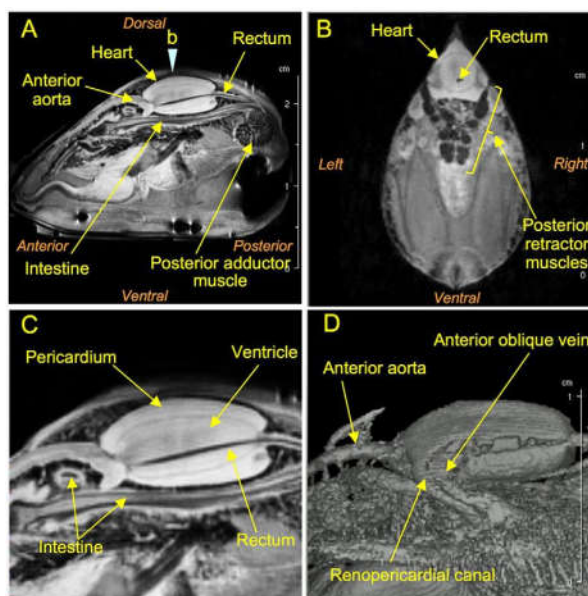
Pošto se inter-specijska varijabilnost ispoljava u različitom unosu, akumulaciji i metabolizmu zagađivača, kao i efikasnosti DNK reparacije pri odgovoru na zagađivače, povezivanje komet testa sa drugim biološkim odgovorima koji uključuju poremećaje fizioloških procesa, važno je radi holističkog pristupa procjene uticaja zagađenja na ekosistem (Jha, 2008).

### **1.3.3. Mikronukleus test za detekciju oštećenja DNK**

Za detekciju trajnog oštećenja genetičkog materijala koristi se mikronukleus test, biomarker koji pokazuje akumulirano oštećenje DNK u toku životnog ciklusa ćelije (Bolognesi i Fenech, 2012). Mikronukleusi su strukture koje nastaju kondenzovanjem fragmenata, ili čitavih hromozoma, koji su izostavljeni iz glavnog nukleusa tokom anafaze (Al-Sabti, 1995). Zapažena je dozna zavisnost koncentracije raznih polutanta i frekvencije mikronukleusa nakon dugotrajnog izlaganja pod laboratorijskim uslovima, bez značajnog mortaliteta (Bolognesi i Cirillo, 2014). Mikronukleus test je primijenjen u mnogim studijama na morskim školjkama (Pavlica i sar., 2000; Dailianis i sar., 2003; Magni i sar., 2006; Koukouzika i Dimitriadis, 2008; Dallas i sar., 2013) i uvršten je u UNEP/MAP program kao osnovni biomarker genotoksičnosti. Rezultati komet i mikronukleus testa obično pokazuju dobru međusobnu korelaciju.

#### 1.4. Srčani ritam dagnje kao biomarker

Srca školjki i sisara imaju niz zajedničkih osobina, neke od njih su kontraktilna mašinerija, električna svojstva miocita, kao i uloga mitohondrija u snabdijevanju energijom (Sosnowska i sar., 2013), što ukazuje na pristojan nivo organizacije srčanog sistema školjki. Mediteranska dagnja im otvoren cirkulatorni sistem, srce se sastoji od jedne komore i dvije pretkomore koje su okružene perikardijalnom dupljom (**Slika 1.5.**); pokazano je da je ukupna zapremina hemolimfe u srcu konstantna (Seo i sar., 2014). Pored sprovodnih ćelija koje imaju spontanu depolarizaciju, ulogu u kontroli aktivnosti srca imaju ekscitatorni serotonergični i inhibitorni adrenergični neuroni visceralne ganglije (Kuwasawa i Hill, 1997; Curtis, 1999).



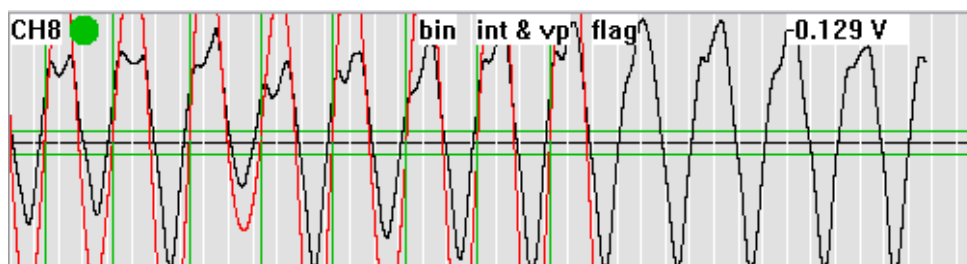
**Slika 1.5.** Slike žive mediteranske dagnje *M. galloprovincialis*, prikazane pomoću T<sub>2</sub> oslikavanja magnetnom rezonancom (eng. Magnetic Resonance Imaging - MRI). A) Medijalno - longitudinalna slika; vrh strelice označen sa b pokazuje mjesto isječka za transverzalnu sliku (B), C) Medijalno – longitudinalna slika oblasti srca, D) 3D rekonstruisana slika srca i sudova (Seo i sar., 2014).

SR je fiziološki biomarker i predstavlja broj kontrakcija, odnosno broj otkucaja srca po minutu. Promjenljivost (varijabilnost) obrasca SR, razlikuje se od parametra

varijabilnost SR (eng. Heart rate variability – HRV; Curtis i sar. 2000), koji predstavlja trajanje srčanih intervala, odnosno perioda između dva otkucaja srca.

Promjene u obrascu SR morskih beskičmenjaka, rakova i mekušaca koriste se kao fiziološki biomarker pri izlaganju različitim izvorima zagađenja (Bamber i Depledge, 1997b; Chelazzi i sar., 2004). Jedini način direktnog mjerenja SR školjki je invazivni elektrofiziološki pristup koji uključuje bušenje ljuštura da bi se olakšao pristup elektrodama srcu (Helm i Trueman, 1967; DeFur i Mangum, 1979; Braby i Somero, 2006). S druge strane, fotopletizmografija (eng. Photoplethismography - PPG), kao način mjerenja SR, nije invazivna i zasniva na optičkoj detekciji ritmičkih promjena u krvnim sudovima koje potiču od kontraktilne aktivnosti srca (Allen, 2007).

SR dagnji koji se prati PPG tehnologijom ima potencijal za primjenu u biomonitoringu (Galloway i sar., 2002; Hagger i sar., 2010; Prusina i sar., 2014; Martinović i sar., 2016). Prednosti PPG pristupa za praćenje SR su što ne dovodi do stresa kod ispitivanog organizma, pogodan je za dugotrajno mjerenje i može se primijeniti *in situ* (Aagaard, 1996; Styrihave, 2003). PPG koja uključuje primjenu infra-crvene svjetlosti za neinvazivno praćenje SR vodenih beskičmenjaka prvi je predstavio Depledge (1984) i kasnije unaprijedio i razvio CAPMON sistem (Depledge i Andersen, 1990), kao najčešće korišćen metod u novijoj literaturi. Slična tehnologija, zasnovana na neinvazivnom fiber-optic metodu, preporučuje se kao sistem za rano upozoravanje od opasnosti kontaminacije vodenog ekosistema (Kholodkevich i sar, 2008). Na **slici 1.6.** prikazan je signal SR (fotopletizmogram) mediteranske dagnje, dobijen fiber-optic metodom korišćenjem računarskog programa VarPulse.



**Slika 1.6.** Signal srčanog ritma mediteranske dagnje *M. galloprovincialis* L. dobijen fiber-optic metodom korišćenjem računarskog programa VarPulse

Ograničenje fiber-optic metoda za praćenje SR je što se može primijeniti samo na beskičmenjacima sa čvrstim tjelesnim omotačem (Kholodkevich i sar., 2017) i ne predstavlja direktan način mjerenja SR. Na osnovu signala SR raka *Pontastacus leptodactylus*, dobijenih uporednim mjerenjem elektrokardiografijom (EKG) i fiber-optic metodom, pokazano je da se pokalapaju faze sistole (grčenja) i dijastole (opuštanja) srca, što ide u prilog pouzdanosti PPG tehnologije (Fedotov i sar., 2009).

Iako promjene obrasca SR akvatičnih organizama pokazuju potencijal za biomonitoring, malo se zna o osjetljivosti ovog fiziološkog biomarkera prema različitim grupama zagađivača.

### **1.5. Srčani ritam i oštećenje DNK u hemocitama mediteranske dagnje pri kratkotrajnom i produženom izlaganju odabranim zagađivačima**

Predmet istraživanja ovog rada je neinvazivno praćenje SR mediteranske dagnje fiber-optic metodom *ex situ* pri kratkotrajnom izlaganju, kao i uporedna analiza SR i oštećenja molekula DNK alkalnim komet testom i mikronukleus testom u hemocitama dagnji u produženom izlaganju odabranim organskim i neorganskim zagađivačima i to: dizel gorivu, naftnom disperzantu S-25, tributil kalaj hloridu, B(a)P i kadmijum horidu. Procjena kvaliteta vode na lokalitetima Stoliv, Dobrota 1 i Dobrota 2 vršena je na osnovu fizičko-hemijskih parametara.

Proučavanje SR dagnji uzorkovanih sa lokaliteta Stoliv, Dobrota 1 i Dobrota 2 u kratkotrajnom izlaganju *ex situ* obuhvata tri studije:

- Promjenljivost saliniteta morske vode je detektovana na osnovu SR dagnji
- Ispitivanje uticaja dizel goriva, dispergovanog dizela i S-25
- Ispitivanje uticaja kadmijum hlorida

Uporedno proučavanje SR i oštećenja DNK dagnji uzorkovanih sa lokaliteta Dobrota 1 u produženom izlaganju *ex situ* obuhvata dvije studije:

- Uticaj dizel goriva, dispergovanog dizela, S-25 i kadmijum hlorida na SR i oštećenje DNK u hemocitama dagnji određeno komet testom
- Uticaj tributil kalaj hlorida i B(a)P na SR i oštećenje DNK u hemocitama dagnji određeno komet i mikronukleus testovima, kao i uticaj na DNK oštećenje procijenjeno prokariotskim SOS/*umuC* testom *in vitro*

CILJEVI

### 2. Ciljevi

Sa konstantnim povećanjem antropogenog uticaja na akvatične ekosisteme javlja se potreba za razvojem sistema ranog upozoravanja, koji bi ukazivao na prisustvo ksenobiotika u životnoj sredini prije dostizanja njihove kritične koncentracije. Praćenjem vitalnih parametara, uključujući srčani ritam, može se dobiti informacija o zdravstvenom stanju jedinke na nivou organizma kao cjeline. Visok nivo osjetljivosti fizioloških biomarkera i mogućnost ranog upozoravanja na opasnost od kontaminacije, ukazuje da bi se SR mediteranske dagnje, zajedno sa drugim biomarkerima mogao koristiti u procjeni zagađenja mora. Biomarkeri na ćelijskom i molekularnom nivou imaju veću specifičnost, uporedna analiza SR i oštećenja DNK u hemocitama mediteranske dagnje može unaprijediti pouzdanost i praktičnu primjenljivost SR kao fiziološkog biomarkera. U skladu sa navedenim konkretni ciljevi rada su:

- Procjeniti kvalitet morske vode na lokalitetima Stoliv, Dobrota 1 i Dobrota 2 u Bokokotorskom zalivu mjerenjem fizičko-hemijskih parametara
- Analizirati SR mediteranske dagnje pod uticajem variranja saliniteta morske vode
- Analizirati SR mediteranske dagnje pod uticajem B(a)P, kadmijum hlorida, TBT-Cl, dizel goriva, naftnog disperzanta S-25 i dispergovanog dizela u *ex situ* tretmanima
- Ispitati genotoksični potencijal naftnog disperzanta S-25, dispergovanog dizela i kadmijum hlorida komet testom na hemocitama mediteranske dagnje u *ex situ* tretmanima
- Ispitati genotoksični potencijal TBT-Cl i B(a)P prokariotskim SOS/*umuC* testom, komet i mikronukleus testovima na hemocitama mediteranske dagnje u *ex situ* tretmanima
- Ispitati korelaciju između SR i nivoa oštećenja molekula DNK u hemocitama mediteranske dagnje prilikom *ex situ* tretmana

# MATERIJAL I METODE



### 3. Materijal i Metode

#### 3.1. Materijal

##### 3.1.1 Hemijske supstance

Dizel gorivo (benzinska pumpa „EKO“ Kotor, Crna Gora)

S-25 (Superdispersant-25) (UNI AMERICAS L.L.C. Slidell, Louisiana, USA)

TBT-Cl (Tributil kalaj hlorid) (CAS Number 1461-22-9, 96%; Sigma-Aldrich, USA)

DMSO (NRK Inženjering, Beograd, Srbija)

##### 3.1.2. Rastvori

###### Rastvor I - za lizu (pH 10)

**Potrebno za 1 L rastvora:**

NaCl „Carlo Erba Reagents” (Milano, Italy).....146,6 g

EDTA „Sigma“ (St.Louis, MO, USA).....37,2 g

Tris „Sigma“ (St.Louis, MO, USA).....1,21 g

dH<sub>2</sub>O.....do 1.000 mL

Triton X-100 “Sigma” (St. Louis, MO, USA)

**Nakon podešavanja pH dodaje se 1% Triton X-100 i snažno se promiješa.**

###### Rastvor II - za denaturaciju i elektroforezu (pH 13)

Potrebno za 1 L rastvora:

10 M NaOH “Superlab” (Belgrade, Serbia).....30mL

0,2 M EDTA „Sigma“ (St.Louis, MO, USA).....5 mL

dH<sub>2</sub>O.....965 mL

Ne podešavati pH.

###### 10 M NaOH

Potrebno za 500 mL rastvora:

NaOH “ Superlab” (Belgrade, Serbia).....200 g

dH<sub>2</sub>O.....do 500 mL

### **0,2 M EDTA**

Potrebno za 500 mL rastvora:

EDTA „Sigma“ (St.Louis, MO, USA).....37,2 g  
dH<sub>2</sub>O.....do 500 mL

### **Rasvor III - za neutralizaciju (pH 7,5)**

Potrebno za 1 L rastvora:

Tris „Sigma“ (St.Louis, MO, USA).....48,44 g  
dH<sub>2</sub>O.....do 1.000 mL

Nakon podešavanja pH rastvore čuvati u frižideru.

### **1% NMP za prvi sloj**

Potrebno za 100 mL rastvora:

NMP „Eurobio“ (France).....1 g  
dH<sub>2</sub>O.....99 mL

### **1% NMP za drugi sloj**

Potrebno za 100 mL rastvora:

NMP „Eurobio“ (France).....1 g  
1xPBS „The Cell Culture Company“ (Austria).....99 mL

### **1% LMP**

Potrebno za 100 mL rastvora:

LMP „Bio-Rad Laboratories“ (CA, USA).....1 g  
1xPBS „The Cell Culture Company“ (Austria).....99 mL

### **1xPBS**

Potrebno za 1 L rastvora:

10x PBS.....100 mL  
sterilna dH<sub>2</sub>O.....900 mL

**Etidijum bromid SI**

10 mg/mL, „Sigma“ (St.Louis, MO, USA)

**Akridin oranž SI**

10 mg/mL, „Sigma“ (St.Louis, MO, USA)

**Akridin oranž/etidijum bromid**

Potrebno za 1 mL rastvora:

Akridin oranž SI.....	10 µL
etidijum bromid.....	10 µL
dH <sub>2</sub> O.....	980 µL

**Akridin oranž za komet**

2 µg/mL, „Sigma“ (St.Louis, MO, USA)

**CdCl<sub>2</sub> (Kadmijum hlorid) primarni stok 10 mg/mL**

CdCl <sub>2</sub> (E. Merck, Darmstadt, Germany).....	10 mg
dH <sub>2</sub> O.....	do 1 mL

**10xTGA, za 100ml:**

Tripton (Lab M, UK) .....	10 g
NaCl.....	5 g
HEPES (SIGMA, USA) .....	11,9 g
Bidestilovana voda.....	80 ml

Sve sastojke rastopiti u destilovanoj vodi i dotjerati pH na 7,0±0,2, sterilisati u autoklavu (121°C, 20 min). Odmjeriti 2 g glukoze (D(+)-glucose (anhydrous) (SIGMA, USA) i rastopiti u 20 ml destilovane vode. Sterilisati u autoklavu pa je dodati u 1x TGA (980 ml).

Nakon što se sterilisani 1x TGA ohladi dodaje se 50 mg ampicilina na 1000 ml 1x TGA. Ovako pripremljen 1x TGA čuva se na -20°C do 4 nedjelje.

### **10x TGA medijum sa kofaktorima (modifikovana metoda) (100ml):**

Trypton (Lab M, UK) .....	10 g
NaCl.....	5 g
KCl (Zdravlje Leskovac, Srbija) .....	2,46 g
MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O (SIGMA, USA) .....	1,63 g
HEPES (SIGMA, USA) .....	11,9 g
Bidestilovana voda.....	980 ml

Sve sastojke rastopiti u destilovanoj vodi i dotjerati pH na 7,0±0,2, i sterilisati u autoklavu (121°C, 20 min). Posebno odmjeriti 2g glukoze (D(+)-glucose (anhydrous)) i rastopiti u 20 ml destilovane vode. Sterilisati u autoklavu pa dodati u 10x TGA (80 ml). Nakon što se 10x TGA ohladi dodati 50 mg ampicilina na 100 ml 1x TGA. Ovako pripremljen 10x TGA čuva se na -20°C do 4 nedjelje.

### **S9 enzim**

S9-SD jetre pacova indukovana arochlorom (Moltox, USA). Koncentracija proteina u liofilizatu 36,4 mg/ml, zapremina 2,1 ml.

### **4NQO (SIGMA, USA)**

Primarni stok je 10 mg/ml u vodi

### **B(a)P (SIGMA, USA)**

Primarni stok je 10 mg/ml u DMSO

### **B-pufer:**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O (SIGMA, USA).....	20,18 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O (Superlab, Beograd) .....	5,5 g

## Materijal i metode

---

KCl (Zdravlje Leskovac) .....	0,75 g
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O (SIGMA, USA) .....	0,25 g
Betamerkaptoetanol (SIGMA, USA) .....	20 ml

### **Reagens za prekidanje reakcije (1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>):**

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (Alkaloid Skoplje, Makedonija).....	105,99 g
Bidestilovana voda.....	10000 ml

### **ONPG:**

ONPG (Germany Boehringer wannhein GMBH).....	45 mg
Fosfatni pufer.....	10 ml

45 mg ONPG rastopiti u 10 ml fosfatnog pufera. ONPG se slabo topi, pa se priprema ranije i čuva na hladnom (4°C).

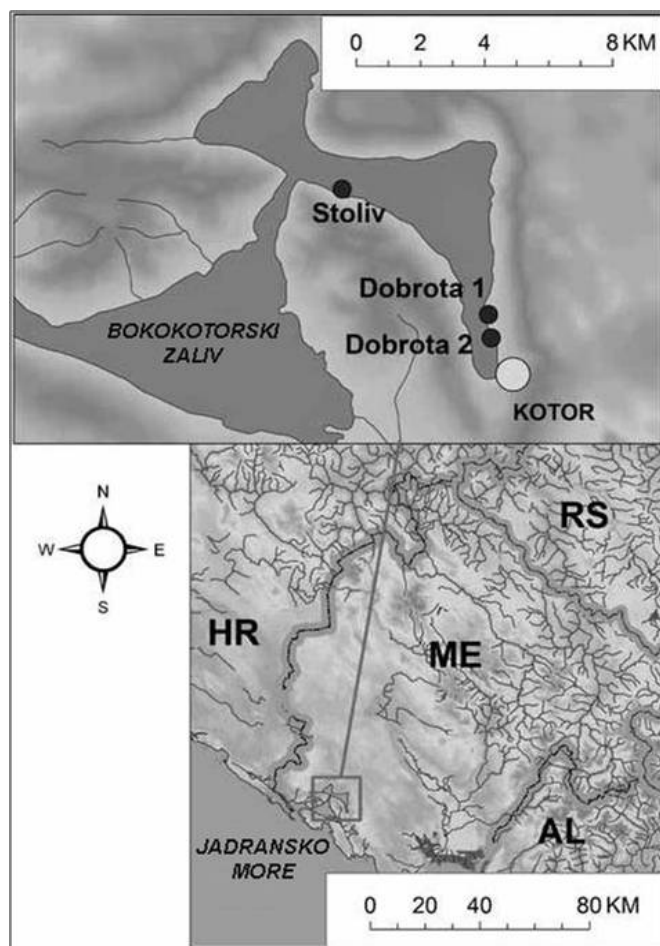
## **3.2. Praćenje uticaja stresora na srčani ritam dagnje prilikom kratkotrajnog izlaganja**

### **3.2.1. Uzorkovanje**

Za eksperimente ispitivanja uticaja promjene saliniteta na srčani ritam (SR), uzorkovano je po 20 dagnji sa tri lokaliteta u Bokokotorskom zalivu, Crna Gora (**Slika 3.1.**): Stoliv (N 42° 28' 19.70" E 18° 42' 19.16"), Dobrota 1 (N 42° 26' 12.52" E 18° 45' 50.29") i Dobrota 2 (N 42° 26' 9.55" E 18° 45' 53.04"). Bokokotorski zaliv nalazi se u jugoistočnom dijelu Jadranskog mora. Sastoji se od spoljašnjeg dijela koji čine Tivatski i Hercegovski zaliv, koji je tjesnacem Verige spojen sa unutrašnjim dijelom koji obuhvata Kotorski i Risanski zaliv. Usljed pojačanog priliva kopnenih voda u toku zimskih mjeseci, dolazi do značajnih odstupanja u temperaturi i salinitetu mora.

U cilju određivanja fizičko – hemijskih parametara, na mjestima uzorkovanja izmjereni su temperatura i salinitet morske vode pomoću WTW sonde Multi 350i. Takođe, na mjestu uzorkovanja određene su vrijednosti nutrijenata kao što su nitrati, nitriti,

amonijum, fosfati, silikati, ukupni azot i ukupni, prema metodama Parsons i sar. (1985) i Degobbis i sar.(1986).

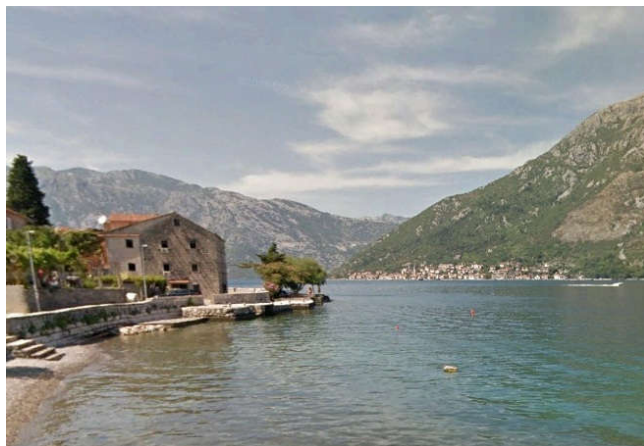


Slika 3.1. Mapa lokaliteta uzorkovanja dagnji

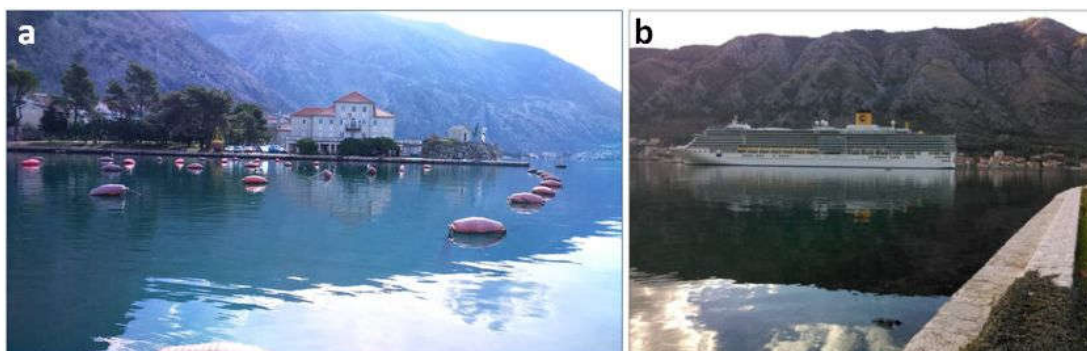
Na osnovu poznatih izvora zagađenja u ispitivanoj oblasti, kao i blizine glavne luke, područje Stoliva (Slika 3.2.) prepoznato je kao referentno. Lokaliteti Dobrota 1 (Slika 3.3.a) i Dobrota 2 (Slika 3.3.b) su pod antropogenim pritiskom jer su znatno bliže luci Kotor koja je izložena pojačanom pomorskom saobraćaju velikih turističkih brodova, posebno u ljetnjem periodu. Takođe, radi se o lokalitetima koji su smješteni u gusto naseljenoj oblasti, nasuprot Stolivu koji je značajno manje naseljen pa je u manjem obimu izložen zagađenju.

Za ispitivanje uticaja  $\text{CdCl}_2$  na SR, uzorkovano je tri grupe od po 20 dagnji sa lokaliteta Dobrota 1 (**Slika 3.3.a**). Sa ljuštura je uklonjen obraštaj i odvojene su u grupe dužine od 40 – 60 mm.

Četiri grupe od po 20 jedinki uzorkovano je na lokalitetu Dobrota 1 sa dubine 2-3 metra i postavljene u akvarijum sa morskom vodom, radi ispitivanja uticaja dizel goriva i S-25 na SR. Zatim, školjke su sortirane po dužini (60-70 mm), pri čemu su uklonjeni obraštajni organizmi sa kapaka ljušture.



**Slika 3.2.** Lokalitet Stoliv (izvor: Google Earth)



**Slika 3.3.** Lokaliteti uzorkovanja: a) Dobrota 1 i b) Dobrota 2

### **3.2.2. Tretmani jedinki**

#### **3.2.2.1. Uticaj promjene saliniteta morske vode na srčani ritam dagnji**

Nakon uzorkovanja, jedinke Mediteranske dagnje postavljene su u akvarijume sa morskom vodom pod laboratorijskim uslovima radi aklimacije, pri temperaturi od  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ . Za lokalitete Stoliv i Dobrota 1 vrijednost saliniteta u akvarijumima bila je ista kao i na lokalitetima uzorkovanja (Stoliv – 35,8 ‰; Dobrota 1 – 22,2 ‰). Na lokalitetu Dobrota 2, izmjereno je 4,9 ‰, pa je salinitet u akvarijumu podešen na 12,9 ‰ dodatkom morske soli. Razlog je bio otežano registrovanje signala SR pri niskom salinitetu. Narednog dana, dagnje su očišćene od obraštaja i obrađene pomoću papira za suvo pjeskarenje. Pod navedenim uslovima dagnje su održavane 24 h, zatim, voda u akvarijumu zamijenjena je sa 10 L morske vode istih fizičko-hemijskih karakteristika koja je bila pripremljena prethodnog dana. Nakon toga, otpočelo je istovremeno praćenje SR osam dagnji.

Izlaganje je obavljeno po uputstvu iz Kholodkevich i sar. (2011). Po dostizanju bazalnog nivoa SR (stabilan srčani ritam bez velikih odstupanja od srednje vrijednosti broja otkucaja po min.) u trajanju od najmanje 1 h, u akvarijum je dodato 10 L destilovane vode pri čemu je salinitet morske vode smanjen za oko 50 % i nova vrijednost je izmjerena pomoću WTW sonde Multi 350i. Takvi uslovi održavani su 1 h, zatim, nakon preračunavanja, u akvarijum je dodat rastvor morske soli kako bi salinitet dostigao vrijednost koju je imao prije dodatka destilovane vode. Praćenje SR je nastavljeno sve do uspostavljanja vrijednosti bez većih odstupanja unutar grupe dagnji.

#### **3.2.2.2. Uticaj $\text{CdCl}_2$ na srčani ritam dagnji**

Školjke su postavljene u akvarijume pod laboratorijskim uslovima na aklimaciju od najmanje 12 h, pri temperaturi  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  i salinitetu  $20 \pm 1$  ‰. Nakon aklimacije, pod istim uslovima, počelo je registrovanje SR 2-3 h prije izlaganja da bi se odredio bazalni nivo SR dagnji. Bazalni nivo SR je važan kao referentna tačka za analizu mogućih varijacija izazvanih kasnijim uticajem primijenjenih supstanci. Zatim, u tri odvojena eksperimenta,



pomoću automatske pipete, u akvarijume sa 10 L morske vode dodato je 40, 400 i 1000  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  rastvorenog u destilovanoj vodi, da bi se dobile finalne koncentracije 4, 40 i 100  $\mu\text{M}$ . Tretmani su trajali po 2 h, zatim je supstanca isprana i u akvarijum je dodata čista morska voda. Vrijeme oporavka SR nakon stresa izazvanog  $\text{CdCl}_2$ , računato je na osnovu grafika sa rezultatima, kao vrijeme potrebno za obnavljanje vrijednosti SR prije eksperimentalnih promjena (Kholodkevich i sar., 2011).

### **3.2.2.3. Uticaj dizel goriva i Superdispersant-25 na srčani ritam dagnje**

Nakon uzorkovanja dagnje su postavljene u akvarijum pod laboratorijskim uslovima (temperatura  $21\pm 1^\circ\text{C}$  i salinitet  $20\pm 1$  ‰) radi aklimacije od 72 h. Zatim, da bi se odredio bazalni nivo SR, registrovanje SR počelo je 2-3 h prije izlaganja.

Pripremljeno je četiri koncentracije: 10.000  $\mu\text{L}$  dizel goriva, 20  $\mu\text{L}$  i 2000  $\mu\text{L}$  naftnog disperzanta Superdispersant-25 (S-25), dispergovano dizel gorivo (100  $\mu\text{L}$  dizel goriva + 100  $\mu\text{L}$  S-25). Dispergovano dizel gorivo pripremljeno je u rastvoru destilovane vode u odnosu 1:10 i postavljeno na mehaničku tresilicu radi brže disperzije. U četiri odvojena eksperimenta, supstance su dodate u akvarijume sa po 10 L morske vode da bi se dobile finalne koncentracije od 1000  $\mu\text{L/L}$  dizel goriva, 2  $\mu\text{L/L}$  i 200  $\mu\text{L/L}$  S-25, kao i mješavine (10  $\mu\text{L/L}$  dizel goriva + 10  $\mu\text{L/L}$  S-25), pri čemu je izlaganje trajalo 2 h. Nakon tretmana, voda u akvarijumu zamijenjena je čistom morskom vodom. Vrijeme oporavka SR nakon stresa izazvanog pogoršanjem uslova u morskoj vodi, računato je po uputstvu Kholodkevich i sar. (2011).

## **3.3. Uporedne analize praćenja srčanog ritma dagnji i genotoksičnosti prilikom produženog izlaganja**

### **3.3.1. Uzorkovanje**

Za eksperimente sa produženim izlaganjem dizel gorivu i S-25, uzorkovano je 240 dagnji u avgustu 2014., dok je za eksperimente sa TBT-Cl, 380 jedinki uzorkovano istog

mjeseca 2015. godine. Dagnje su uzorkovane u Bokokotorskom zalivu na lokalitetu Dobrota 1 (Slika 3.3.a), pri čemu su na mjestu uzorkovanja izmjereni temperatura, salinitet i rastvoreni kiseonik pomoću multiparametarske sonde WTW Multi 350i, radi procjene kvalitete vode na osnovu fizičko-hemijskih parametara. Takođe, određene su koncentracije nutrijenata: nitrati, nitriti, amonijum, fosfati, silikati, ukupni azot i ukupni fosfor, metodama po (Parsons i sar., 1985; Degobbis i sar., 1986).

### **3.3.2. Produženo izlaganje dizel gorivu i S-25**

#### **3.3.2.1. Rastvori**

Dan prije početka izlaganja, primarni rastvori su pripremljeni i označeni sledećim redom: dizel gorivo u koncentracijama D1' (1000 µL/L) i D2' (10.000 µL/L), S-25 u koncentracijama S1' (50 µL/L) i S2' (500 µL/L). Primarne mješavine dispergovanog dizel goriva pripremljene su i označene kao: M1' (dizel gorivo 1000 µL/L + S-25 50 µL/L) i M2' (dizel gorivo 10.000 µL/L + S-25 500 µL/L). Odnos dizel goriva i S-25 u mješavinama dispergovanog dizel goriva pripremljen je na osnovu uputstva proizvođača disperzanta (Oil slick dispersants ltd, 2014). Primarni rastvori su pripremljeni u morskoj vodi uzorkovanoj sa lokaliteta Dobrota 1 (mjesto uzorkovanja školjki) u konačnoj zapremini od 800 mL i postavljeni u mehaničku tresilicu u plastičnim posudama na 24 h kako bi došlo do mehaničke disperzije.

#### **3.3.2.1. Izlaganje za analizu srčanog ritma**

Analize SR obavljene su u 8 odvojenih eksperimenata. Za svaki pojedinačno, osam dagnji je smješteno u akvarijume sa 7,2 L morske vode pri konstantnoj temperaturi od  $21 \pm 1^\circ\text{C}$  i salinitetu  $25 \pm 1\%$ . Primarni rastvori supstanci (po 800 mL za svaki eksperiment) pripremljeni su kao što je prethodno opisano i dodati u akvarijum sa pričvršćenim školjkama kako bi se dobilo: dizel gorivo u finalnoj nominalnoj koncentraciji D1 (100 µL/L) i D2 (1000 µL/L), S-25 u koncentracijama S1 (5 µL/L) i S2 (50 µL/L), mješavine

dispergovanog dizel goriva u koncentracijama M1 (dizel gorivo 100  $\mu\text{L/L}$  + S-25 5  $\mu\text{L/L}$ ) i M2 (dizel gorivo 1000  $\mu\text{L/L}$  + S-25 50  $\mu\text{L/L}$ ). Za negativnu kontrolu dodato je 800 mL morske vode sa mjesta uzorkovanja Dobrota 1. Za pozitivnu kontrolu, dodato je 800 mL sa 400  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  da bi se dobila finalna nominalna koncentracija 40  $\mu\text{M}$ . Jedinke su izlagane 72 h pri konstantnoj temperaturi od  $21\pm 1^\circ\text{C}$  u statičkom sistemu i nisu bile hranjene kako bi se izbjegla moguća interakcija između ispitivane supstance i hrane.

Prije dodatka supstanci, izmjerena je vrijednost SR u čistoj morskoj vodi u trajanju oko 3 h (period predtretmana) da bi se definisala referentna tačka za moguće promjene SR u toku izlaganja. Nakon izlaganja, supstance su isprane čistom morskom vodom kako bi uočili reakciju životinja nakon uklanjanja ispitivanih supstanci iz sistema, pri čemu je SR mjeren najmanje 3 h (period nakon tretmana).

### **3.3.2.2. Izlaganje za procjenu genotoksičnosti**

Za procjenu genotoksičnosti, tretmani su rađeni u dva odvojena eksperimenta. Dagnje sa očuvanim bisusnim nitima odvojene su u 8 grupa po 10 jedinki pri čemu je svaka grupa bila postavljena u akvarijum od 15 L koji je sadržao 7,2 L morske vode sa mjesta uzorkovanja Dobrota 1. Prije dodavanja ispitivanih supstanci, sve jedinke su provjerene da li su pričvršćene za dno akvarijuma bisusnim nitima. Hemijski tretman i njegovo trajanje isti je kao i tretman korišćen za analize SR.

U toku tretmana, provjeravano je preživljavanje školjki na svakih 12 h pomoću mehaničkog podsticanja zatvaranja ljuštore. Ukoliko školjka nije odgovarala na mehaničko podsticanje zatvaranja ljuštore, izvađena je iz akvarijuma i isključena iz eksperimenta.

### **3.3.3. Produženo izlaganje TBT-Cl**

#### **3.3.3.1. Rastvori**

Nakon aklimacije, TBT-Cl je rastvoren 10x u DMSO i dodat u akvarijum kako bi se dobile finalne koncentracije od 10, 100 i 1000  $\mu\text{g/L}$ . Pošto je finalna koncentracija za

DMSO u akvarijumu bila ekstremno niska (0,0008%), kontrola rastvarača nije bila uključena u istraživanje. Za negativnu kontrolu korišćen je akvarijum sa čistom morskom vodom uzorkovanom sa mjesta Dobrota 1. Kao pozitivna kontrola korišćen je B(a)P, takođe rastvoren u DMSO, pri čemu je dodat u akvarijum da bi se dobila finalna koncentracija od 50 µg/L.

### **3.3.3.2. Izlaganje za analizu srčanog ritma**

Sprovedeno je 5 eksperimenata prilikom analiza SR dagnji pod uticajem TBT-Cl. Za svaki je pripremljen po jedan akvarijum sa 10 L morske vode i 16 dagnji uz stalnu aeraciju pri konstantnoj temperaturi od  $21\pm 1^{\circ}\text{C}$  i salinitetu  $32\pm 1$  ‰. Polovina ovih školjki bila je uključena u mjerenje SR, dok su drugih 8 jedinki korišćene kao pomoćne. Koncentracije primijenjenih supstanci za tretmane odgovaraju istim upotrijebljenim za komet i mikronukleus test, pri čemu je u eksperimentu sa negativnom kontrolom korišćena samo morska voda. Vrijeme izlaganja za sve eksperimente bilo je 96 h, izuzev za najvišu koncentraciju TBT-Cl, pri čemu je tretman prekinut nakon 72 h. Prije dodatka supstanci, SR je registrovan u periodu predtretmana. Nakon izlaganja, supstance su isprane čistom morskom vodom i registrovan je SR u periodu nakon tretmana.

### **3.3.3.3. Izlaganje za procjenu genotoksičnosti**

Dagnje sa bisusnim nitima odvojene su u pet grupa po 30 jedinki pri čemu je svaka grupa bila postavljena u staklene akvarijume od po 20 L morske vode uzorkovane sa lokaliteta Dobrota 1 (**Slika 3.4.**). Školjke su ostavljene da se aklimatizuju na laboratorijske uslove na 24 h. Prije dodavanja ispitivanih supstanci, jedinke su provjeravane da li su pričvršćene bisusnim nitima za dno akvarijuma. Tretmani su izvedeni u dva odvojena eksperimenta (prvi i drugi eksperiment dalje u tekstu).



**Slika 3.4.** Tretmani dagnji u akvarijumima

Jedinke su izlagane pri konstantnoj temperaturi od  $21 \pm 1^\circ\text{C}$  u statičkom sistemu na 96 h pri čemu nisu hranjene kako bi se izbjegla interakcija između ispitivane supstance i hrane. Kontrolne tačke za analize bile su nakon 24, 48, 72 i 96 h u toku tretmana. Kao što je prikazano na **slici 4.10.**, na svakoj kontrolnoj tački, iz svakog akvarijuma je uzimano po 6 jedinki za analize (preživljavanje ćelija, komet i mikronukleus test) i zamijenjeno sa 6 novih jedinki pakovanih u plastične mreže (promjera okca  $0,5 \text{ cm}^2$ ), kako bi se razlikovale od grupe dagnji pripremljenih na početku. U slučaju uginuća u toku tretmana, korišćene su pomoćne školjke. Eksperimenti sa najvišom koncentracijom TBT-Cl ( $1000 \mu\text{g/L}$ ) su zaustavljeni nakon 72 h usljed visoke stope smrtnosti u prethodna 24 h izlaganja (period od 72 - 96 h).

### **3.4. Metode**

#### **3.4.1. Aklimacija**

Prije kratkotrajnih tretmana promjene saliniteta morske vode, tri grupe dagnji sa ispitivanih lokaliteta postavljene su u akvarijume radi aklimacije u trajanju od 24 h pri konstantnoj temperaturi  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ . Aklimacija dagnji sa lokaliteta Stoliv i Dobrota 1 vršena je pri vrijednostima saliniteta sa mjesta uzorkovanja, koje su iznosile 35,8 i 22,2 ‰. Na

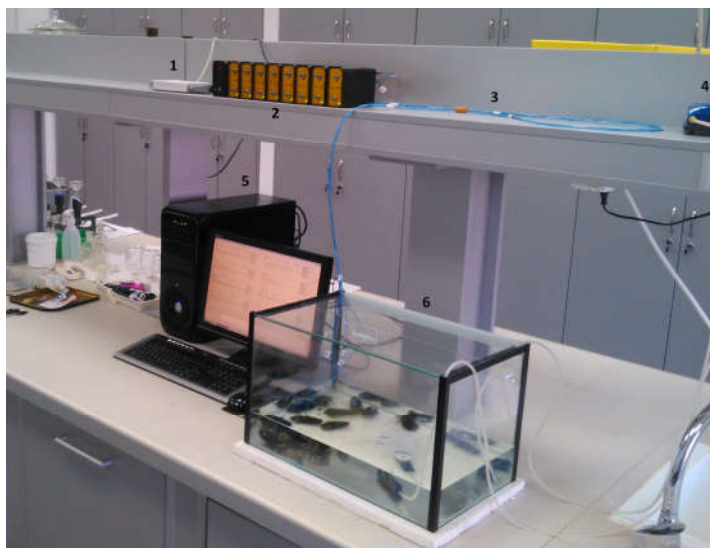
lokalitetu Dobrota 2, zbog niske vrijednosti od 4,9 ‰, salinitet je podešen na 12,9 ‰ dodatkom morske soli. Razlog je bio otežano registrovanje signala SR pri niskom salinitetu.

Prije kratkotrajnih tretmana sa  $\text{CdCl}_2$ , školjke su postavljene na aklimaciju od najmanje 12 h u akvarijume sa morskom vodom pod laboratorijskim uslovima pri konstantnoj temperaturi  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  i salinitetu koji je podešen na  $20 \pm 1\text{‰}$ . Aklimacija pred kratkotrajno izalganje dizel gorivu i S-25 trajala je 72 h pod istim uslovima.

Aklimacija dagnji za sve eksperimente sa produženim tretmanima trajala je 24 h pri konstantnoj temperaturi  $21 \pm 1^\circ\text{C}$  i salinitetu 25 ‰ za tretmane sa dizel gorivom i S-25, dok je za tretmane sa TBT-Cl salinitet bio 32 ‰.

### 3.4.2. Fiber-optic metod za praćenje i analizu srčanog ritma beskičmenjaka

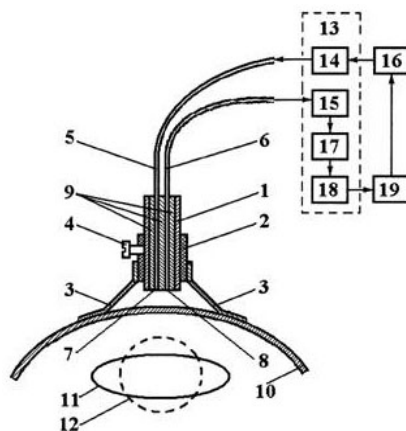
Eksperimenti praćenja SR mediteranske dagnje rađeni su pomoću neinvazivnog fiber-optic metoda razvijenog 1999. godine u Istraživačkom centru za ekološku bezbjednost, Ruska Akademija nauka, Sankt Peterburg, Rusija (Fedotov i sar., 2000). Metod je patentirao Sergey V. Kholodkevich (Kholodkevich i sar. 2013) i zasnovan je na fotopletizmografiji (eng. photoplethysmography – PPG). PPG tehnologija obuhvata optičku



**Slika 3.6.** Postavka eksperimenta za praćenje srčanog ritma dagnji: 1 – A/D pretvarač, 2 – laserska fotopletizmograf jedinica, 3 – optički kablovi, 4 – pumpa za aeraciju, 5 – računar, 6 – akvarijum sa dagnjama

detekciju ritmičnih promjena u krvnim sudovima koje potiču od kontraktilne aktivnosti srca (Allen, 2007), odnosno promjena u intenzitetu svjetlosti odbijene ili sprovedene kroz tkivo, na osnovu čega se može dobiti informacija o otkucajima srca (Tamura i sar., 2014).

Eksperimentalna jedinica sadrži 8 fotopletizmografa (PPG uređaja), koji omogućavaju istovremeno praćenje SR kod 8 jedinki (**Slika 3.6.**). U svakom PPG uređaju nalazi se izvor i prijemnik (fotodetektor) infracrvene svjetlosti, od kojih vodi par optičkih kablova koji na svom završetku grade senzor težine oko 2 grama, postavljen u kućište (**Slika 3.7. i 3.8.**).



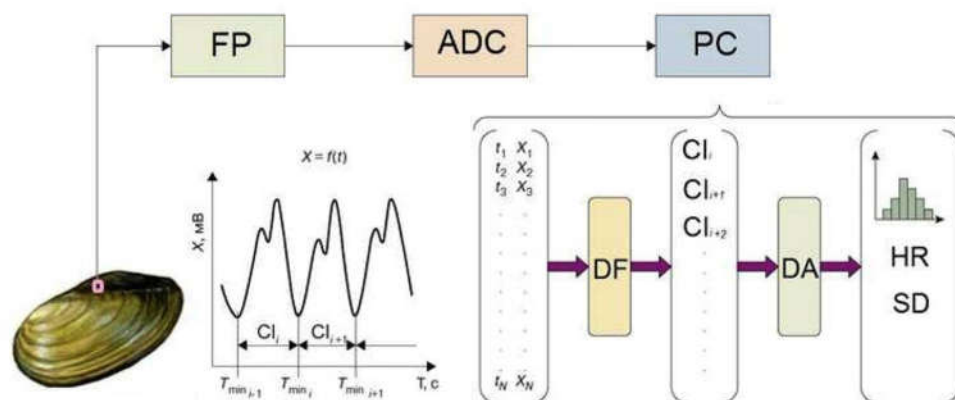
**Slika 3.7.** Shema poprečnog presjeka kućišta i držača za senzor sa blok dijagramom komponenti fiber-optic metoda : 1 – kućište, 2 – cilindar držača, 3 – režanj držača, 4 – zavrtnaj, 5 – prenosno optičko vlakno, 6 – prijemno optičko vlakno, 7 – izlazni kraj, 8 – ulazni kraj, 9 – dijelovi kućišta za podršku vlaknima, 10 – tjelesni omotač ispitivane životinje, 11 – srce u fazi dijastole, 12 – srce u fazi sistole, 13 – filter digitalnog signala, 14 – izvor optičke svjetlosti, 15 – prijemnik optičke svjetlosti, 16 – napajanje, 17 – pojačivač, 18 – A/D pretvarač, 19 – računar (Kholodkevich i sar., 2013).

Nakon uklanjanja obraštajnih organizama sa kapaka ljuštore, dagnje su obrađene pomoću papira za suvo pjeskarenje, zatim, senzor je prislonjen iznad oblasti srca (**Slika 3.8.a**), kako bi se pronašao signal SR praćen na monitoru računara. Po dobijanju ponavljajućeg signala SR, držač senzora sa zavrtnjem, spojen je dvokomponentnim epoksidnim lijepkom za obilježeno mjesto na ljušturi (**Slika 3.8.b**), nakon sušenja lijepka, senzor je pričvršćen za držač pomoću odvijača (**Slika 3.8.c**).



**Slika 3.8.** A) Traženje signala, B) Lijepljenje držača za senzor, C) dagnja sa povezanim senzorom

Signal SR je dobijen putem prenosnog optičkog kabela, izlaganjem srca školjke infracrvenoj svjetlosti koja ima sposobnost prolaska kroz ljušturu, pri čemu odbijena svjetlost, sadrži informaciju o kontraktilnoj aktivnosti srca i odlazi u fotodetektor PPG uređaja putem prijemnog optičkog kabela na senzoru (**Slika 3.7.**). Nakon neophodnog pojačavanja, filtriranja i pretvaranja signala iz analognog u digitalni oblik pomoću A/D pretvarača, signal je poslat u računar, pri čemu se na ekranu uočava u formi fotopletizmograma (Kholodkevich i sar., 2017; **Slika 3.9.**).



**Slika 3.9.** Blok dijagram fiber – optic metoda i automatska obrada srčanog ritma školjki na primjeru *Anodonta anatina*. Skraćenice: FP – fotopletizmograf, ADC – A/D pretvarač, PC – računar (eng. Personal computer), DF – digitalni filter, DA – analiza raspodjele (eng. Distribution analysis). Prikazane su glavne faze obrade podataka uzoraka srčanih intervala – CI (eng. Cardiac interval;  $CI, n < 50$ ), HR – prosječni srčani ritam (eng. Heart rate), SD – standardna devijacija (Kholodkevich i sar., 2017).



Originalni računarski program VarPulse očitava podatke sa A/D pretvarača odnosno obrađuje početni signal sa fotopletizmografa, primjenjuje digitalne filtere i detektuje srčane intervale u realnom vremenu (sakuplja uzorke srčanih intervala i računa ih do podešenog okvira; **Slika 3.9.**), obrađuje statističke karakteristike SR, frekvenciju i čuva podatke na disku računara (Kholodkevich i sar., 2008).

Pored SR, kao pokazatelj nivoa stresa, uveden je parametar dHR koji predstavlja prosječnu razliku u odgovoru SR u odnosu na period predtretmana (vrijednost SR izmjerena u čistoj morskoj vodi prije izlaganja zagađenju). dHR je računat po formuli;

$$dHR = |Hr_i - \text{prosjeck } Hr_{c1}|,$$

pri čemu  $Hr_i$  predstavlja SR mjeren u  $i$  – periodu sa pauzom od 10 sekundi između perioda, dok  $Hr_{c1}$  predstavlja SR registrovan u periodu predtretmana.

### 3.4.3. Uzorkovanje hemolimfe

Nakon izlaganja, hemolimfa je uzorkovana iz mišića aduktora dagnje pomoću šprica od 3 mL sa hipodermalnom iglom 26G (**Slika 3.10.**). Hemolimfa iz 2-3 jedinke je “pulovana” u mikrotubama na ledu da bi se dobio 1 mL uzorka (ukupno 4 mL za grupu od 10 životinja). Uzorci su centrifugirani u trajanju od 10 min. pri 500 rpm na temperaturi od 4°C; suspenzija ćelija napravljena je u 60  $\mu$ L preostalog supernatanta. Zatim je pripremljena ćelijska suspenzija podvrgnuta komet testu.



**Slika 3.10.** Uzorkovanje hemolimfe

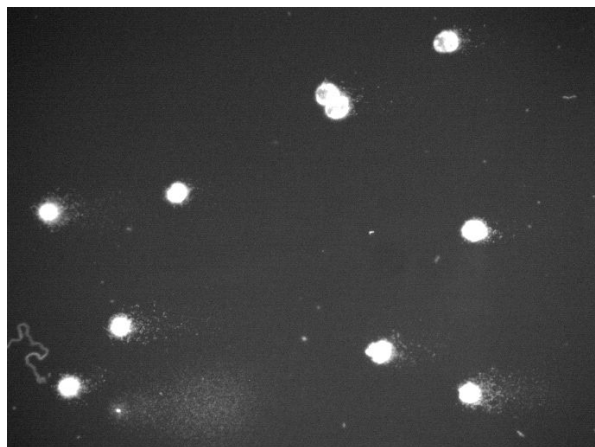
#### **3.4.4. Diferencijalno bojenje ćelija akridin oranž/etidijum bromid (AO/EB)**

Diferencijalno bojenje pomoću mješavine boja akridin oranž (AO) i etidijum bromid (EB), korišćeno je za određivanje preživljavanja hemocita dagnji na osnovu cjelovitosti membrane. AO prolazi kroz membranu, tako da boji jedra živih ćelija koja su pod mikroskopom zeleno obojena, s druge strane, EB nema sposobnost prolaska kroz membranu i boji jedra ćelija čija cjelovitost membrane je narušena, pa se pod mikroskopom uočavaju jedra uginulih ćelija narandžasto – crvene boje (Squier i Cohen, 2001). Pripremljeno je 2  $\mu\text{L}$  AO/EB i dodato u 20  $\mu\text{L}$  suspenzije ćelija koja je. Zatim, suspenzija je postavljena na mikroskopsku pločicu i prekrivena pokrovnim staklom. Ćelije su analizirane na fluorescentnom mikroskopu (Leica, DMLS, Austria) pod uveličanjem 400 $\times$ , filterom za ekscitaciju 510–560 nm i barijernim filterom 590 nm.

#### **3.4.5. Komet test**

Procedura alkalnog kometa testa izvedena je pod žutim svjetlom kao što su opisali Singh i sar. (1988) i Kolarević i sar. (2013). Mikroskopske pločice prethodno su bile presvučene sa 1% NMP (eng. Normal Melting Point) agaroze i sušene na vazduhu 24 h. Zatim, postavljeno je 80  $\mu\text{L}$  1% NMP preko postojećeg 1% NMP sloja da bi se napravio drugi pomoćni sloj koji je pomoću pokrovnog stakla proširen po pločici. Pločica je držana na ledu 5 min. da bi došlo do potpune polimerizacije agaroze. Po uklanjanju pokrovnih stakala, 30  $\mu\text{L}$  prethodno pripremljene ćelijske suspenzije blago je promiješano sa 70  $\mu\text{L}$  1% LMP (eng. Low Melting Point) agaroze (37°C) i pomoću automatske pipete dodato na pomoćni sloj 1% NMP agaroze i prekriveno pokrovnim staklom. Nakon inkubacije od 5 min. na 4°C, uklonjena su pokrovna stakla i pločice su uronjene u svježe napravljen hladan (4°C) pufer za lizu u trajanju od 1 h. Zatim su pločice postavljene u posudu za elektroforezu koja sadrži hladan (4°C) alkalni pufer za elektroforezu na 20 min., kako bi došlo do denaturacije DNK. Elektroforeza je izvedena pri 0,75 V/cm i 300 mA u trajanju od 20 min. na 4°C. Nakon elektroforeze, pločice su smještene na 15 min. u svježe pripremljen pufer za neutralizaciju. Zatim, pločice su fiksirane hladnim metanolom (15

min. na 4°C) i osušene na vazduhu u mraku. Bojenje je obavljeno sa 20 µL rastvora etidijum bromida (2 µg/mL) po pločici.



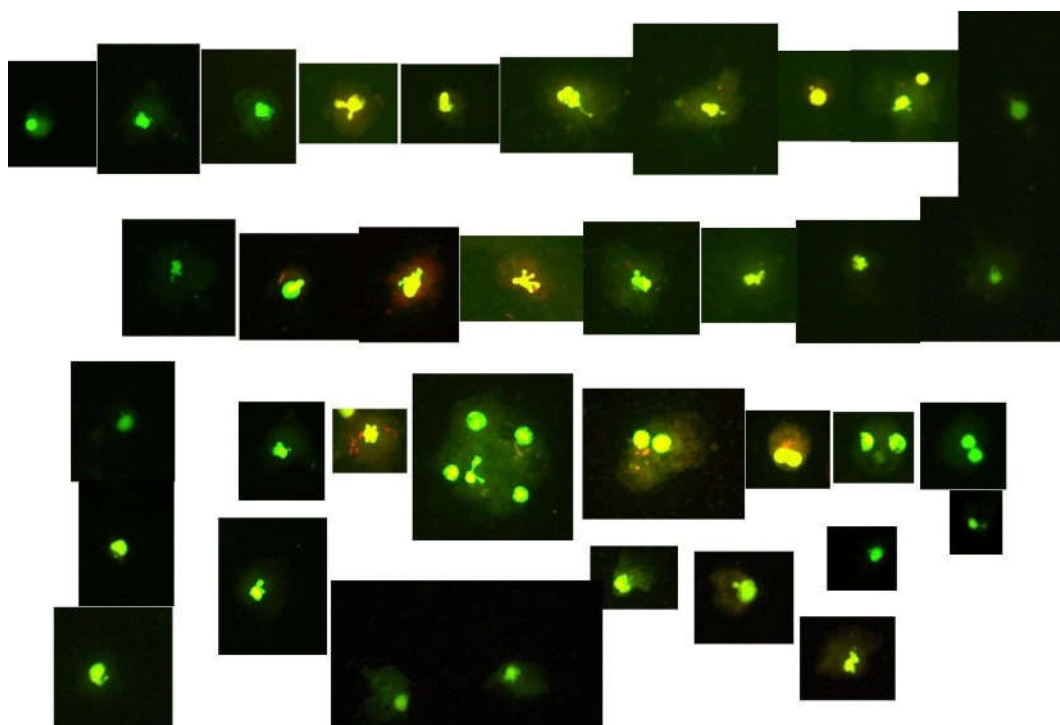
**Slika 3.11.** Jedra hemocita dagnji

Pločice su analizirane na fluorescentnom mikroskopu (Leica, DMLS, Austria, pod uveličanjem 400×, filter za ekscitaciju 510–560 nm, barijerni filter 590 nm). Mikroskopske slike kometa (**Slika 3.11.**) izbrojene su pomoću softverskog paketa Comet IV Computer Software (Perceptive Instruments, UK). Analizirano je 50 jedara po preparatu, pri čemu je kao mjera oštećenja DNK korišćen parametar koji označava procenat fluorescencije u repu komete - TI%. Veoma oštećena jedra u kojima se nivo oštećenja DNK nije mogao kvalitetno procijeniti, definisana kao jedra sa velikim oštećenjem – HH%, brojana su pomoću HH alata dostupnog u Comet Assay IV software. Učestalost HH% računata je na 100 analiziranih jedara.

### **3.4.6. Mikronukleus test**

Mikroskopski preparati za mikronukleus test (**Slika 3.12**) pripremljeni su po proceduri Baršiene i sar. (2006), uz podešavanja za hemolimfu po uputstvu Štraser i sar. (2011). Za svaki uzorak, hemolimfa je “pulovana” od 6 jedinki iz jedne grupe kako bi se dobio 1 mL. Uzorak je fiksiran sirćetnom kiselinom/methanol u odnosu 1 : 3. Suspenzije su centrifugirane pri 1500 rpm 5 min. i peleti su isprani tri puta sa fiksativom. Za svaki

uzorak, pripremljena su po tri preparata tako što se 100  $\mu\text{L}$  fiksirane ćelijske suspenzije razlije po pločici. Pločice su sušene na vazduhu 24 h, obojene sa akridin oranž (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) i analizirane pod uveličanjem 400x uz brojanje frekvencije mikronukleusa (MN) pod suvim uveličanjem od 1000x. Sa svakog preparata proučavano je po 1000 ćelija (3000 po uzorku). Mikronukleusi su brojani po kriterijumu iz Hagger i sar. (2005), prečnik mikronukleusa bio je između 1/3 i 1/10 prečnika glavnog jedra.



3.12. Hemocite dagnji za kvantifikaciju mikronukleusa

### 3.4.7. SOS/*umuC*

U toku svih tretmana nakon 24, 48, 72 i 96 h uzet je po jedan uzorak vode od po 10 mL iz svakog akvarijuma i zamrznut na  $-20^{\circ}\text{C}$ . Test je sproveden sa rastvorima TBT-Cl u finalnoj koncentraciji od 1, 10 i 100  $\mu\text{g}/\text{L}$ , koji su pripremljeni u osmotski podešenom PBS (1000 mosm) i kasnije sa uzorcima vode iz akvarijuma profiltrirani kroz pore veličine 2  $\mu\text{m}$ . Test je izveden na osnovu protokola Žegura i sar. (2009), uz nekoliko izmjena. Prekonoćna kultura *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 razblažena je 10 puta sa

svježim TGA medijumom i inkubirana na 37°C na 1,5 h uz aeraciju do postizanja faze eksponencijalnog rasta. Izlaganje je obavljeno u mikrotitarskim pločama dodavanjem 180 µL vode ili rastvora TBT-Cl, 20 µL (10 x TGA) i 70 µL bakterijske kulture, ili u slučaju eksprimenata sa metaboličkom aktivacijom 180 µL uzorka vode, ili rastvora TBT-Cl, 20 µL (10 x TGA sa kofaktorima) i 70 µL S9 mješavine bakterijske kulture pripremljene prema uputstvu iz ISO standarda (ISO, 2000). 4-NQO (finalna koncentracija 0,5 µg/mL) korišćena je kao pozitivna kontrola u eksperimentima bez metaboličke aktivacije, dok je B(a)P (finalna koncentracija 10 µg/mL) korišćen kao pozitivna kontrola u eksperimentima sa metaboličkom aktivacijom. Pri eksperimentima sa TBT-Cl u PBS-u, osmotski podešen PBS (1000 mosm) korišćen je kao negativna kontrola, dok je pri eksperimentima sa vodom iz akvarijuma kao negativna kontrola upotrijebljena voda iz kontrolnog akvarijuma. Mikrotitarske ploče su inkubirane na 37°C, 2 h uz aeraciju. Nakon izlaganja, mješavina je 10 puta razblažena u svježem TGA medijumu u novim mikrotitarskim pločama i inkubirana na još 2 h. Stopa rasta bakterija određena je mjerenjem apsorbance na 600 nm na čitaču mikrotitarske ploče. β-galaktozidazna aktivnost određena je korišćenjem ONPG supstrata u trajanju od 20 min. na 25°C.

Apsorpcija je mjerena na 405 nm uz upotrebu referentnog rastvora bez bakterija. Stopa bakterijskog rasta računata je primjenom sledećeg obrazca:

$$G = \text{uzorak OD600/kontrola OD600.}$$

Stopa rasta (Sr) niža od 0,75, što predstavlja 25% inhibicije biomase, uzeta je kao pokazatelj citotoksičnosti.

Stopa indukcije (Si) računata je po obrascu:

$$\text{uzorak OD405}/(\text{kontrola OD405} * G).$$

Stopa indukcije 1,5 uzeta je kao prag na kome je uzorak smatran genotoksičnim (ISO, 2000).

### 3.4.8. Statističke analize

Statističke analize rezultata dobijenih u eksperimentima urađene su pomoću programskog paketa Statistica 6.0 Software (StatSoft, inc.). Za provjeru da li rezultati

komet testa imaju normalnu raspodjelu, prije statističkih analiza korišćen je Kolmogorov-Smirnov test. S obzirom da podaci nisu bili u skladu sa zahtjevima primjene parametarskih testova, razlike između svake grupe i odgovarajuće negativne kontrole ispitivani su pomoću Mann-Whitney U testa. Imajući u vidu veličinu grupa, korišćen je Studentov t-test ( $p < 0,05$ ) pri ispitivanju značajnosti za vijabilnost ćelija, frekvenciju HH% i frekvenciju MN. Analize korelacije urađene su pomoću Pearson -ovog testa sa nivoom značajnosti  $p < 0,05$  (u rezultatima eksperimenata sa TBT-Cl) kao i Spearman-ovog testa sa nivoom značajnosti  $p < 0,05$ . (u rezultatima eksperimenata sa dizel gorivom i S-25).

# REZULTATI

### 4. Rezultati

Jedan od ciljeva praćenja SR bio je ispitivanje početne reakcije životinje na prisustvo stresora i mjerenje kasnijeg oporavka od stresa prilikom kratkotrajnog izlaganja. Međutim, u prirodnim uslovima, trajanje zagađenja obično je duže pa su organizmi koji su izloženi, prinuđeni da aktiviraju unutrašnje mehanizme koji im omogućavaju da prevaziđu nepovoljne uslove.

Prema tome, dobijeni rezultati mogu se podijeliti na praćenje SR dagnje, kao fiziološkog biomarkera pri kratkotrajnom izlaganju promjeni u salinitetu morske vode, CdCl<sub>2</sub>, dizel gorivu i S-25 i na uporedne analize SR i oštećenja DNK u hemocitama dagnji kao molekularnih biomarkera, određivanih pomoću alkalnog komet testa u produženom izlaganju *ex situ* primijenjenim supstancama: CdCl<sub>2</sub>, dizel gorivo, S-25, PAH (B(a)P) i POP (TBT-Cl).

U cilju određivanja trajnih posljedica zagađenja porijeklom od POP-a na primjeru TBT-Cl, uveden je i mikronukleus test. Pored biomarkera dagnje, genotoksični potencijal TBT-Cl, ispitivan je na prokariotskom modelu korišćenjem SOS/*umuC* testa *in vitro*.

#### 4.1. Uticaj stresora na srčani ritam dagnje prilikom kratkotrajnog izlaganja

Radena su ispitivanja uticaja kratkotrajne promjene u salinitetu morske vode na SR dagnje *ex situ*, pri čemu je utvrđen potencijal “fiber-optic” metoda za otkrivanje prisustva zagađenja. Takođe, vršena su kratkotrajna izlaganja dagnji zagađenju porijeklom od teških metala, kao model je korišćen CdCl<sub>2</sub>. Ispitivan je i uticaj zagađenja koje potiče od naftnih derivata na SR dagnji, sa ciljem utvrđivanja potencijalnih razlika u oporavku SR izazvanim pojedinačnim uticajima dizel goriva i disperzanta za naftu S-25 i samog dispergovanog dizel goriva.



#### 4.1.1. Fizičko – hemijski parametri morske vode na lokalitetima Stoliv, Dobrota 1 i Dobrota 2

Za eksperimente u kojima je ispitivan kratkotrajni uticaj promjene saliniteta morske vode na SR, uzorkovane su 3 grupe dagnji sa lokaliteta Stoliv, Dobrota 1 i Dobrota 2. Tom prilikom, radi određivanja fizičko – hemijskih parametara, uzorkovana je morska voda sa površine i izmjereni su temperatura, salinitet i rasvoreni kiseonik, *in situ*, pomoću sonde WTW Multi 350i (Tabela 4.1.). Određivanje nutrijenata sa mjesta uzorkovanja kao što su nitrati, nitriti, amonijum, fosfati, silikati, ukupni azot i ukupni fosfor vršeno je prema metodama Parsons i sar. (1985) i Degobbis i sar.(1986). Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 4.1. Vrijednost saliniteta površine mora u Stolivu od 35,8 ‰ kao i Dobroti 1 22,2 ‰ u oktobru, više su u odnosu na lokalitet Dobrota 2 gdje je izmjereno svega 4,9 ‰ u novembru 2012. god. Niža vrijednost saliniteta kao i više koncentracije nitrata, fosfata i silikata na lokalitetu Dobrota 2 u odnosu na Stoliv i Dobrotu 1, uslovljene su pojačanim prilivom kopnenih voda putem padavina, pritoka i podvodnih izvora. Dobijeni rezultati u saglasnosti su sa podacima iz studije Krivokapić i sar. (2011), gdje je pokazana značajna negativna korelacija vrijednosti saliniteta u odnosu na koncentracije nitrata i silikata u Bokokotorskom zalivu.

**Tabela 4.1.** Fizičko - hemijski parametri morske vode na lokalitetima Stoliv, Dobrota 1 i Dobrota 2

Lokaliteti	Stoliv	Dobrota 1	Dobrota 2
Period uzorkovanja	Oktobar 2012	Oktobar 2012	Novembar 2012
Temperatura (°C)	18,1	17	13,1
Salinitet (‰)	35,8	22,2	4,9
Kiseonik (mg/L)	7,08	7,9	7,25
Nitrati (µmol/L)	1,675	4,405	15,794
Nitriti (µmol/L)	0,099	0,019	0,019
Fosfati (µmol/L)	0,178	0,223	0,445
Silikati (µmol/L)	3,604	4,404	16,416
Ukupni fosfor (µmol/L)	0,235	0,188	0,376
Ukupni azot (µmol/L)	7,775	1,178	0,334

Za grupe eksperimenata koje obuhvataju kratkotrajno izlaganja dagnji  $\text{CdCl}_2$ , kao i dizel gorivu i S-25, dagnje su uzorkovane sa lokaliteta Dobrota 1, pri čemu je za svaki eksperiment, temperatura održavana na  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  i salinitet na  $20 \pm 1$  ‰.

### 4.1.2. Uticaj kratkotrajne promjene saliniteta morske vode na srčani ritam dagnji

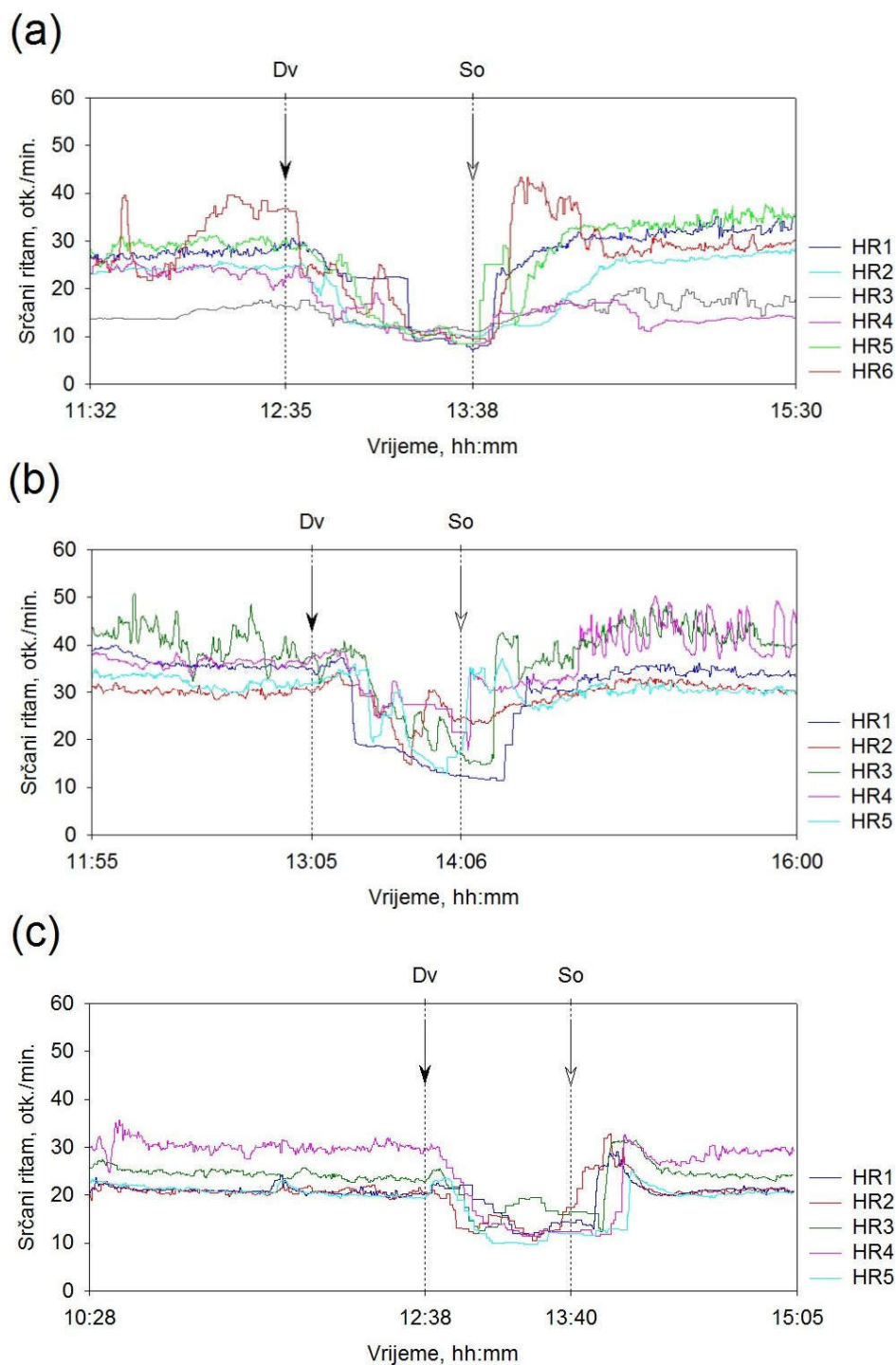
Kako bi se ispitala osjetljivost i primjenljivost korišćenja Mediteranske dagnje kao modela sa potencijalom za biomonitoring, urađena je studija praćenja promjene obrasca SR na kvalitet morske vode. Cilj je bio ispitivanje osjetljivosti ovog fiziološkog biomarkera, pokazatelja zdravstvenog stanja, i mogućnost njegove primjene u procjeni kvaliteta morske vode. Na lokalitetima Stoliv i Dobrota 1 vrijednosti saliniteta površine mora iznosile su 35,8 i 22,2 ‰ (**tabela 4.1.**). Na lokalitetu Dobrota 2, zbog niske vrijednosti od 4,9 ‰, salinitet je podešen na 12,9 ‰ dodatkom morske soli. Lokalitet Stoliv je korišćen kao referentno mjesto u odnosu na lokalitete Dobrota 1 i 2 koji su zbog blizine glavne luke i uvećane koncentracije stanovništva izložene većem antropogenom pritisku.

Prije dodatka destilovane vode, izmjerena je vrijednost SR u trajanju od oko 2 h (period predtretmana), da bi se definisala referentna tačka za moguće promjene SR u toku izlaganja. Po dodatku morske soli, SR je mjereno najmanje 2 h (period nakon tretmana), kako bi uočili reakciju životinja.

U sva tri eksperimenta, nakon nagle promjene saliniteta morske vode u akvarijumima, dodatkom destilovane vode (prva strelica; **Slika 4.1.**), došlo je do pada vrijednosti SR unutar tri grupe ispitivanih dagnji. Niži SR održao se u toku 1 h izlaganja, da bi po dodatku morske soli (druga strelica; **Slika 4.1.**) koja je potrebna za obnavljanje vrijednosti saliniteta iz predtretmana, došlo do porasta SR dagnji.

Vrijeme oporavka SR i koeficijent varijacije (CV) unutar grupe ispitivanih dagnji korišćeni su kao biomarkeri. Izračunavanje vremena oporavka od stresa za svaku školjku zasnivalo se na graficima (**Slika 4.1.**) i mjereno je od trenutka dodavanja morske soli u akvarijum sve do postizanja vrijednosti SR dagnji koje su imale u predtretmanu. CV predstavlja međusobnu promjenljivost SR unutar grupe životinja i računat je 1 h nakon izlaganja.

## Rezultati



**Slika 4.1.** Srčani ritam unutar grupe dagnji (*M. galloprovincialis* L.) uzorkovanih sa lokaliteta a) Stoliv, b) Dobrota 1 c) Dobrota 2, u predtretmanu, u toku izlaganja destilovanoj vodi i nakon dodatka morske soli: Strelice (slijeva) pokazuju trenutak početka i prestanka izlaganja. Skraćenice: So – morska so, Dv – destilovana voda, HR (eng. heart rate) – srčani ritam

Najniža prosječna vrijednost oporavka SR od 49,7 min, izmjerena je unutar grupe dagnji uzorkovanih na lokalitetu Stoliv. Prosječna vrijednost oporavka SR kod školjki uzorkovanih sa lokacije Dobrota 1 bila je 60, dok je na lokaciji Dobrota 2 iznosila 52,4 min. Što se tiče CV, najveća vrijednost unutar grupe školjki bila je 0,35 u Stolivu. Primjetno je odstupanje u odnosu na vrijednosti CV iz Dobrote 1 koja je iznosila 0,15 i Dobrote 2 sa 0,16. Smatra se da visoka vrijednost CV unutar ispitivane grupe životinja ukazuje da je ispitivani lokalitet pod uticajem zagađenja.

### 4.1.3. Uticaj CdCl<sub>2</sub> na srčani ritam dagnji prilikom kratkotrajnog izlaganja

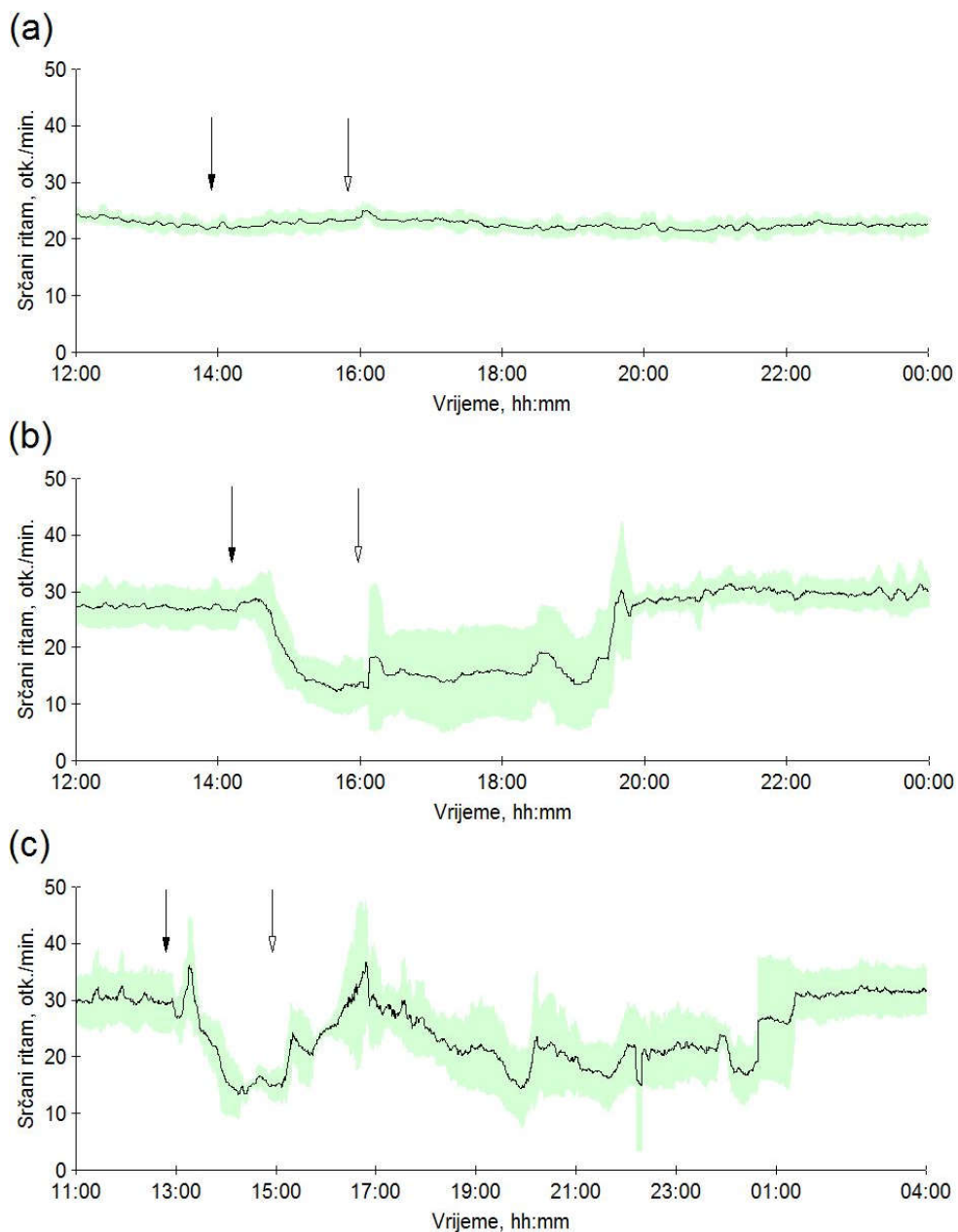
CdCl<sub>2</sub> korišćen je kao pogodan model za ispitivanje uticaja teških metala na SR dagnji, kao i za mogućnosti “fiber-optic” metoda u detekciji zagađenja morske vode. Dagnje su po uzorkovanju sa lokaliteta Dobrota 1 odvojene u tri grupe koje su nakon aklimacije u akvarijumu pod laboratorijskim uslovima poslužile za ispitivanje uticaja 4, 40 i 100 µM CdCl<sub>2</sub>.

Nije bilo promjene SR unutar grupe dagnji pri izlaganju 4 µM CdCl<sub>2</sub>. Bazalni nivo SR bio je stabilan u toku tretmana koji je trajao 2 h (**Slika 4.2.a**).

Nakon primjene 40 µM CdCl<sub>2</sub>, došlo je do oštrog pada prosječne vrijednosti SR unutar grupe od 7 dagnji sa 26,7 na 12,5 otk./min. kao posljedica reakcije stresa (**Slika 4.2.b**). Takođe, primjećena je i reakcija zatvaranja ljuštore kod svih jedinki. Nakon tretmana koji je trajao 2 h, po ispiranju supstance iz akvarijuma došlo do blagog porasta SR. Međutim, iako je supstanca uklonjena iz sistema, ovako niske vrijednosti SR u odnosu na vrijednosti registrovane u predtretmanu, održale su se 3 h i 49 min, nakon čega je SR počeo da raste. Prosječno vrijeme oporavka unutar grupe od 7 dagnji iznosilo je 5 h i 18 min. Ljuštore školjki ostale su zatvorene dugo po ispiranju CdCl<sub>2</sub>. Jedna jedinka nije preživjela tretman i isključena je iz rezultata.

Najviša koncentracija CdCl<sub>2</sub> (100 µM) izazvala je brzu reakciju u vidu kratkotrajnog porasta prosječne vrijednosti SR u grupi od 5 dagnji, sa 29,5 na 35,8 otk./min, a zatim je oštro pala na svega 13,5 otk./min što je manje od 50 % od početne

## Rezultati



**Slika 4.2.** Prosječni srčani ritam unutar grupe dagnji (*M. galloprovincialis* L.) sa standardnom devijacijom (SD) u predtretmanu, u toku izlaganja i periodu nakon tretmana a) 4 μM, b) 40 μM i c) 100 μM CdCl<sub>2</sub>.

Strelice (slijeva) pokazuju trenutke početka i prestanka hemijskog tretmana.

vrijednosti (**Slika 4.2.c**). Nakon 2 h izlaganja, primjećen je porast SR čija je vrijednost u dužem periodu bila nestabilna. Prosječno vrijeme oporavka za 5 ispitivanih dagnji iznosilo

je 10 h i 37 min. Pri dodatku ovako visoke koncentracije toksina došlo je do zatvaranja ljuštura kod svih dagnji.

#### **4.1.4. Uticaj dizel goriva i S-25 na srčani ritam dagnji prilikom kratkotrajnog izlaganja**

Zbog sve većeg značaja na globalnom nivou i učestalih zagađenja naftom i derivatima, dizel gorivo i S-25 odabrani su za ispitivanje uticaja na SR dagnje. Nakon 72h aklimacije, rađeno je kratkotrajno izlaganje od 2 h u četiri odvojena eksperimenta, pri čemu je u akvarijum sa morskom vodom dodato 1000  $\mu\text{L/L}$  dizel goriva, 2  $\mu\text{L/L}$  i 200  $\mu\text{L/L}$  S-25, kao i mješavine (10  $\mu\text{L/L}$  dizel goriva + 10  $\mu\text{L/L}$  S-25).

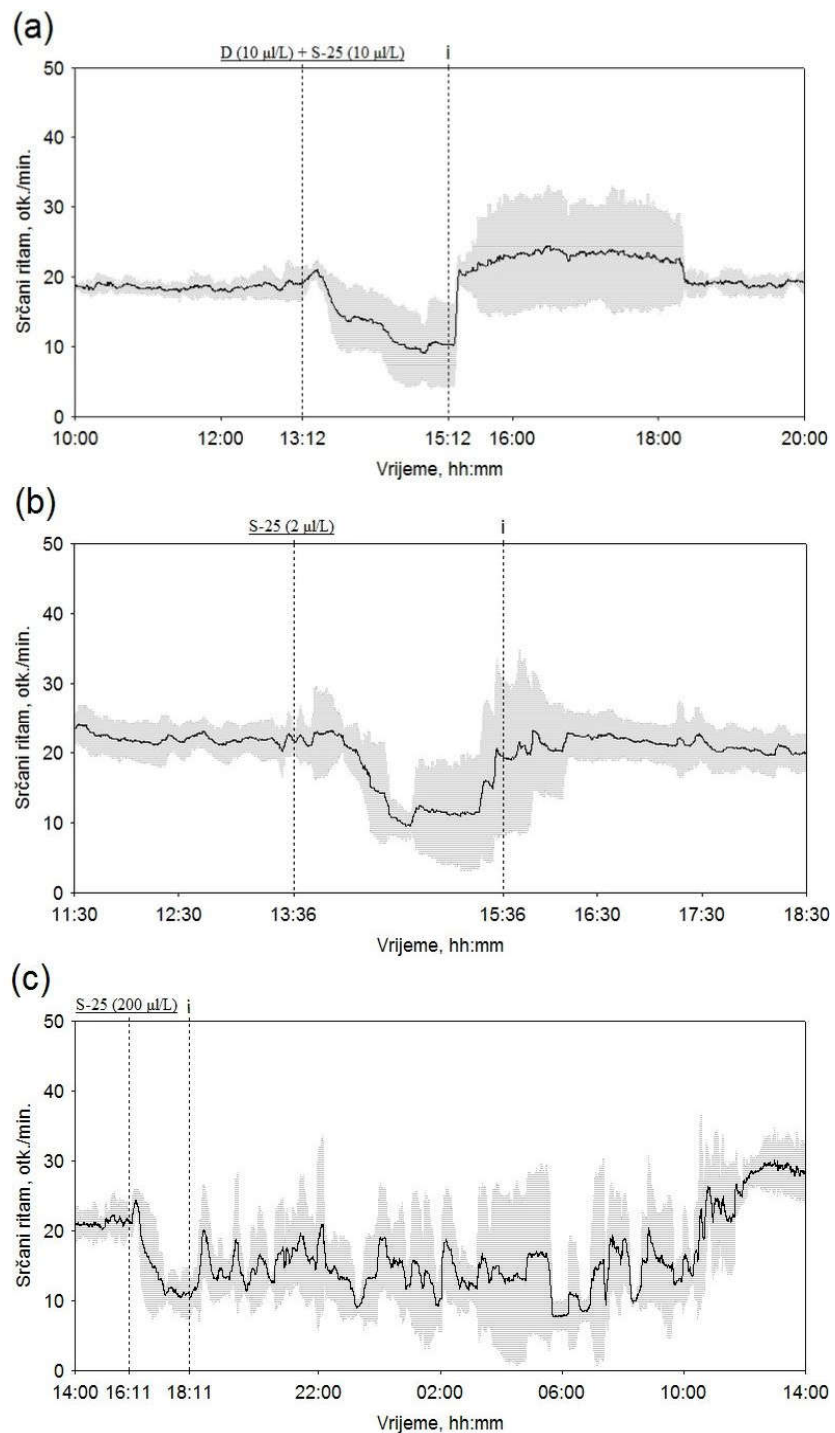
Pri dodatku 1000  $\mu\text{L/L}$  dizel goriva u akvarijum, nije bilo promjena SR unutar grupe dagnji. SR je bio na bazalnom nivou u toku izlaganja. Ista situacija zapažena je prilikom ispitivanja uticaja 4  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  (**Slika 4.3.a**), pa u ovom slučaju rezultati nisu prikazani.

Dizel gorivo u koncentraciji 10  $\mu\text{L/L}$ , dispergovano istom koncentracijom naftnog disperzanta S-25, izazvalo je smanjenje SR školjki. Prosječna vrijednost SR u predtretmanu unutar grupe od osam dagnji bila je stabilna na 18,7 otk./min sa nižom SD (**Slika 4.3.a**). U toku izlaganja (između isprekidanih linija **Slika 4.3.**), primijećen je blagi porast SR, šest minuta nakon primjene supstance, pri čemu je došlo do snižavanja do minimalne vrijednosti od 9,1 otk./min, koja je bila dvostruko niža od prosječne vrijednosti SR u predtretmanu. Nakon ispiranja, SR je bio naglo povišen sa značajno višom SD. Vrijeme oporavka računato je kao period od trenutka ispiranja do postizanja stabilnog SR sa nižom SD i iznosilo je 3 h i 12 min.

Najniža koncentracija S-25 koja je uticala na SR školjki bila je 2  $\mu\text{L/L}$ . Takođe, primijećen je veliki pad SR sa 23,1 na 9,6 otk./min, praćen višim vrijednostima SD (**Slika 4.3.b**). Prije trenutka ispiranja, prosječna vrijednost SR bila je povećana do 20,2 otk./min usljed spontanog početka oporavka SR. Nakon ispiranja, vrijeme oporavka je bilo 46 min.

Nakon primjene 200  $\mu\text{L/L}$  S-25, početna vrijednost SR porasla je na kratko, da bi kasnije naglo pala sa 23,2 na svega 10,4 otk./min. (**Slika 4.3.c**). U toku tretmana, usljed

## Rezultati



**Slika 4.3.** Prosječni srčani ritam unutar grupe dagnji (*M. galloprovincialis* L.) sa standardnom devijacijom (SD), u predtretmanu, u toku izlaganja i periodu nakon tretmana a) mješavine dizel goriva (10 µL/L) i S-25 (10 µL/L) b) S-25 (5 µL/L) c) S-25 (200 µL/L). Skraćenice: D – dizel gorivo, S-25 – Superdispersant-25, i – ispiranje

visoke koncentracije i snažne aktivnosti S-25 nastala je velika količina pjene u akvarijumu. Po ispiranju, SR je imao opadajući trend sa značajnim odstupanjima u toku dužeg perioda. Takođe, SD je bila visoka i nestabilna. Oporavak SR bio je produžen i iznosio je 18 h i 40 min.

### **4.2. Uporedne analize praćenja srčanog ritma dagnji i genotoksičnosti prilikom produženog izlaganja stresorima**

Kako bi se prikazali što realniji podaci o promjenljivosti SR, obavljen je i produženi tretman dagnji CdCl<sub>2</sub>, dizel gorivom, S-25, PAH (B(a)P) i POP (TBT-Cl), takođe *ex situ*. Kadmijum je uključen u dalja istraživanja kao model polutant, dok su dizel gorivo, disperzant za naftu i TBT-Cl odabrani kao zagađivači čija kontrola je od velikog značaja za životnu sredinu mora.

U okviru produženog izlaganja dagnji odabranim zagađivačima, uporedno sa SR praćeno je i oštećenje DNK molekula u tretiranim jedinkama. Uz komet test koji je služio kao osnovni metod za određivanje oštećenja DNK, genotoksični potencijal TBT-Cl, takođe je analiziran mikronukleus testom kao i na prokariotskom modelu korišćenjem SOS/*umuC* testa *in vitro*.

Dodatni biomarkeri dagnje, kao i prokariotski model za ispitivanje genotoksičnosti, uvedeni su da bi se ukazalo na moguću povezanost između fizioloških biomarkera, koji su generalno nespecifični, sa molekularnim biomarkerima čija kvantifikacija može pokazati privremene ili trajne posljedice štetnog dejstva ispitivanih supstanci.

#### **4.2.1. Fizičko-hemijski parametri morske vode na lokalitetu Dobrota 1**

Na lokalitetu uzorkovanja dagnji, Dobrota 1 u Bokokotorskom zalivu, pri dubini od 2-3 metra, izvršena je procjena kvaliteta morske vode na osnovu fizičko – hemijskih parametara. Za eksperimente koji uključuju produženo izlaganje dagnji dizel gorivu i S-25, kao i TBT-Cl, rađenih u toku ljeta 2014., odnosno 2015. god., izmjereni su temperatura,



## Rezultati

salinitet i rastvoreni kiseonik *in situ* (**tabela 4.2**), pomoću WTW sonde Multi 350i. Uzorkovanje je obavljeno u toku avgusta zbog izraženijeg antropogenog pritiska usljed turističke sezone, odnosno pogoršanja kvaliteta vode u priobalnom dijelu mora. Takođe, u toku ljetnjih mjeseci zapažene su stabilne vrijednosti saliniteta u Bokokotorskom zalivu (Bellafiore i sar., 2011), što može biti važno uzimajući u obzir značajan uticaj promjene saliniteta na SR školjki iz porodice Mytilidae (Bakhmet i sar., 2005; Sarà i De Piro, 2011).

**Tabela 4.2.** Fizičko - hemijski parametri morske vode na lokalitetu Dobrota 1 u toku avgusta 2014. i 2015. god.

Lokalitet	Dobrota 1	Dobrota 1
Period uzorkovanja	Avgust 2014	Avgust 2015
Temperatura (°C)	22	22
Salinitet (‰)	31	32
Kiseonik (mg/L)	8,1	8,1
Nitrati (µmol/L)	1,429	2,505
Nitriti (µmol/L)	0,089	0,047
Fosfati (µmol/L)	0,178	0,141
Silikati (µmol/L)	2,012	1,982
Ukupni fosfor (µmol/L)	0,289	0,256
Ukupni azot (µmol/L)	9,012	6,539

Mjesto uzorkovanja može se smatrati kao relativno nezagađeno i već je korišćeno kao referentno mjesto za različite biomarkere u prethodnim studijama (Da Ros i sar., 2011; Héberger i sar., 2014).

Takođe, izvršena je i analiza nutrijenata u vodi da bi se uzeo u obzir mogući uticaj pogoršanja kvaliteta mora na dagnje. Određivanje nutrijenata na mjestu uzorkovanja kao što su nitrati, nitriti, amonijum, fosfati, silikati, ukupni azot i ukupni fosfor vršeno je prema metodama Parsons i sar. (1985) i Degobbis i sar. (1986). Dobijeni rezultati prikazani su u **tabeli 4.2**. Koncentracije nutrijenata na lokalitetu Dobrota 1 u ispitivanim periodima bile su niske. Takođe, niske koncentracije nutrijenata u toku ljetnjih mjeseci u studiji Krivokapić i sar. (2009), objašnjene su visokom providnošću mora koja omogućava bolji prodor svjetlosti, kao i odsustvom cvjetanja fitoplanktona što ukazuje na oligotrofne uslove u toku ljeta.

#### **4.2.2. Uticaj dizel goriva i S-25 prilikom produženog izlaganja**

Pošto je na osnovu dobijenih rezultata, zapažen značajan uticaj S-25 na SR dagnji, a sa druge strane nije bilo reakcije pri dodatku dizel goriva u akvarijum pri kratkotrajnom izlaganju, u narednim eksperimentima, obavljani su produženi tretmani uz prethodnu mehaničku disperziju dizel goriva u morskoj vodi. Trajanje tretmana od 72 h, odabrano je kao svrsishodno na osnovu studije Barron i Ka'aihue, (2003), pa je uzeto da je to optimalan period koji je potreban da se potencijalno zagađenje mora, porijeklom od naftnih derivata, ukloni prirodnim putem, odnosno kretanjem vodene mase. Takođe, kako bi se simulirali uslovi zagađenja nastali kao posljedica nezgode na moru, u eksperimentima je korišćeno mehanički dispergovano dizel gorivo u morskoj vodi, kao i mehanički dispergovane mješavine dizel goriva i S-25. Kao pozitivna kontrola korišćen je  $\text{CdCl}_2$ . Za negativnu kontrolu korišćena je grupa jedinki u akvarijumu sa čistom morskom vodom.

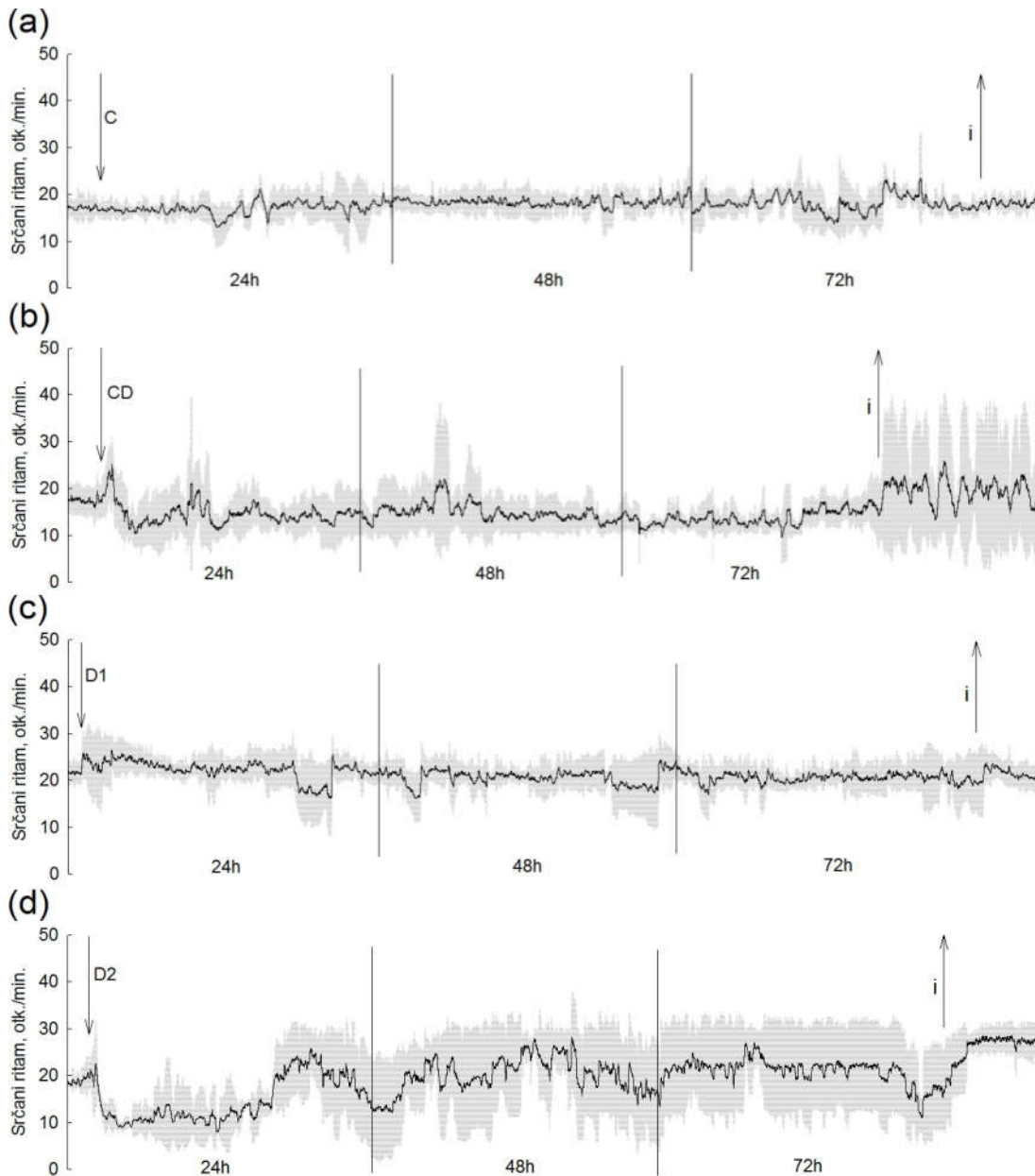
Pošto u dostupnoj literaturi nema podataka o genotoksičnosti S-25, uporedo sa eksperimentima analize SR, urađeni su tretmani istim rastvorima, u trajanju od 72 h u odvojenim akvarijumima, za analizu oštećenja DNK u hemocitama dagnji komet testom. U akvarijume je dodato dizel gorivo u finalnoj nominalnoj koncentraciji D1 (100  $\mu\text{L/L}$ ) i D2 (1000  $\mu\text{L/L}$ ), S-25 u koncentracijama S1 (5  $\mu\text{L/L}$ ) i S2 (50  $\mu\text{L/L}$ ), mješavine dispergovanog dizel goriva u koncentracijama M1 (dizel gorivo 100  $\mu\text{L/L}$  + S-25 5  $\mu\text{L/L}$ ) i M2 (dizel gorivo 1000  $\mu\text{L/L}$  + S-25 50  $\mu\text{L/L}$ ). Za negativnu kontrolu dodato je 800 mL morske vode sa mjesta uzorkovanja Dobrota 1, dok je za pozitivnu kontrolu dodato 40  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ .

##### **4.2.2.1. Uticaj dizel goriva i S-25 na srčani ritam dagnji prilikom produženog izlaganja**

Analiza SR u produženom izlaganju dizel gorivu, S-25 i  $\text{CdCl}_2$ , urađena je u 8 odvojenih eksperimenata, pri čemu je za pozitivnu kontrolu korišćen  $\text{CdCl}_2$ , dok su za negativnu kontrolu dagnje svo vrijeme boravile u akvarijumu sa čistom morskom vodom. SR je praćen 2-3 h prije izlaganja (period predtretmana) kako bi se definisao bazalni nivo u odnosu na koji bi se mogle pratiti kasnije nastale promjene. Takođe, nakon ispiranja

## Rezultati

supstanci iz akvarijuma, SR je mjereno (period nakon tretmana) da bi se registrovao njegov oporavak.



**Slika 4.4.** Prosječni srčani ritam unutar grupe dagnji (*M. galloprovincialis* L.) sa standardnom devijacijom (SD): a) C u čistoj morskoj vodi, u predtretmanu, u toku izlaganja i posttretmanu; b) CD (40 µM), c) D<sub>1</sub> (100 µL/L), d) D<sub>2</sub> (1000 µL/L); Skraćenice: C – kontrola, CD – CdCl<sub>2</sub>, D – dizel gorivo, i – ispiranje. Strelice ukazuju na trenutke početka i kraja izlaganja.

Pored SR, kao pokazatelj nivoa stresa, uveden je parametar dHR koji predstavlja prosječnu razliku u odgovoru SR u odnosu na period predtretmana (vrijednost SR izmjerena u čistoj morskoj vodi prije izlaganja zagađenju).

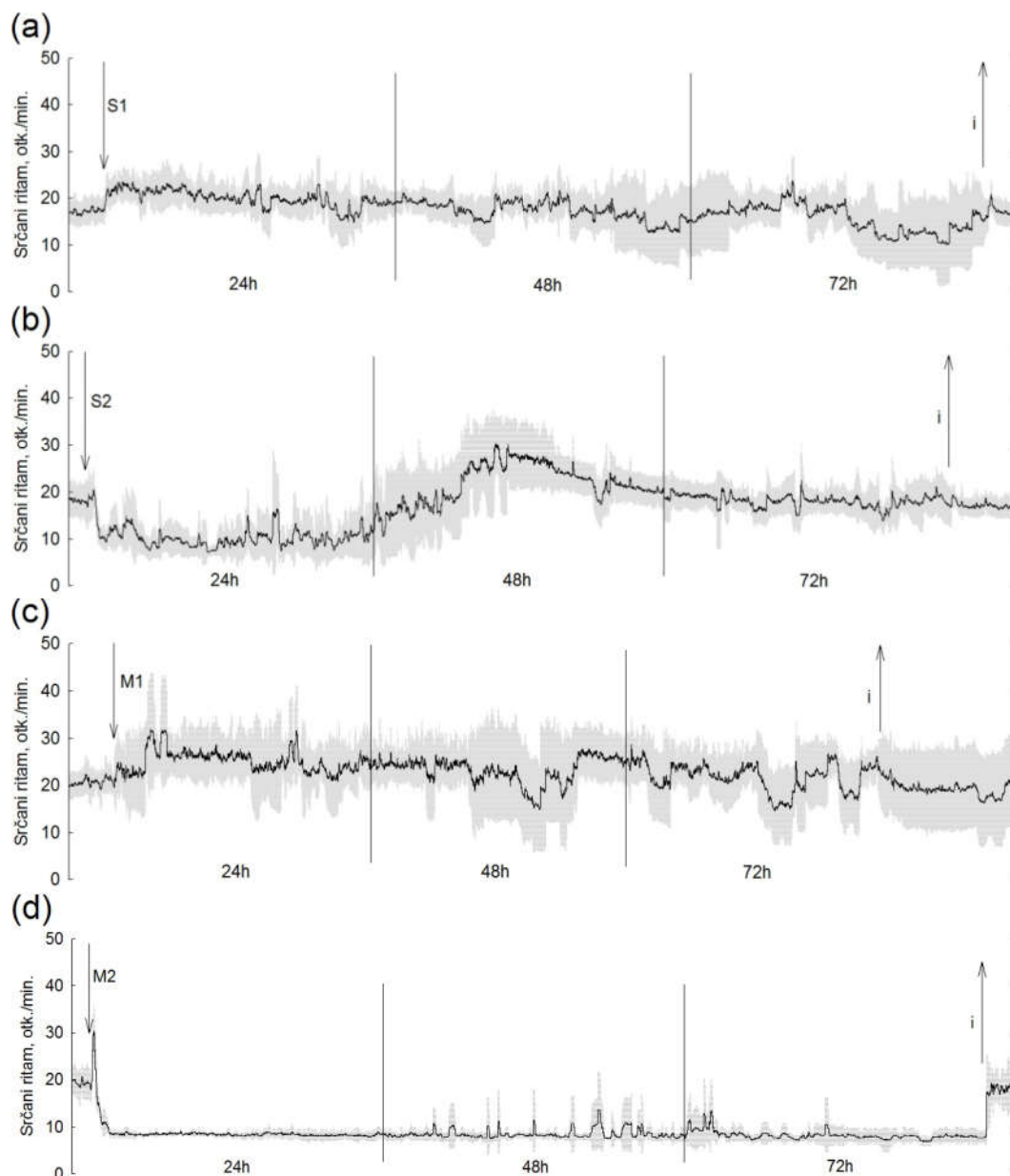
Rezultati dobijeni za kontrole i tretmane dizel gorivom objedinjeni su na **slici 4.4.**, dok su rezultati izlaganja S-25 i dispergovanom dizel gorivu prikazani na **slici 4.5.** Na **slici 4.6.** predstavljen je dHR u odnosu na vrijednost bazalnog nivoa SR u predtretmanu, u toku izlaganja i periodu nakon tretmana.

Rezultati za negativnu kontrolu bili su očekivani. Prosječna vrijednost SR bila je uglavnom stabilna u toku 72 h sa niskom SD. Takođe, CdCl<sub>2</sub> (CD) koji smo koristili kao pozitivnu kontrolu uticao je na porast prosječne vrijednosti SR sa 16,5 na 24,4 otk./min, a zatim i pad do 10,7 otk./min što je bilo očekivano na osnovu rezultata kratkotrajnog izlaganja (**Slika 4.4.**). Dalje izlaganje CdCl<sub>2</sub> dovelo je do promjenljivosti SR. Parametar dHR pokazao je da nije bilo velikih odstupanja u SR u toku negativne kontrole, s druge strane, pri pozitivnoj kontroli jasno se uočavaju razlike prije tretmana, u toku izlaganja i po ispiranju supstance (**Slika 4.6.a**).

Obije koncentracije dizel goriva uslovile su promjene u obrascu SR unutar dvije grupe dagnji. Nakon što je postignut bazalni nivo SR od 21,8 otk./min primijenjena je niža koncentracija D<sub>1</sub> (prva strelica; **Slika 4.4.c**). Prosječna vrijednost SR kod osam školjki naglo je porasla do 26,3 otk./min. U toku narednih 72 h izlaganja primijećena je promjenljivost SR i SD uz periode stabilnosti oba parametra. Ispiranje (druga strelica; **Slika 4.4.c**) je dovelo do stabilnog obrasca SR sa niskom SD. Izlaganje dagnji D<sub>2</sub>, na samom početku uticalo je na blagi porast prosječne vrijednosti SR sa 18,5 na 22,2 otk./min. Nakon toga, uslijedio je značajan pad na svega 9,6 otk./min praćen promjenljivom SD. Ove vrijednosti su se održale u narednih 11 h i 37 min sa maksimumom od 14,5 otk./min. Zatim, SR je naglo porastao na 25,4 otk./min. Ostatak izlaganja odlikovao se veoma visokom SD i promjenljivim SR. Nakon ispiranja, prosječna vrijednost SR bila je veoma stabilna na višim vrijednostima. Na osnovu dHR, zapaža se da je pri izlaganju D<sub>2</sub>, prosječni SR u odnosu na period predtretmana imao veća odstupanja u poređenju sa D<sub>1</sub> (**Slika 4.6.a**).

Niža koncentracija S-25 (S<sub>1</sub>), uslovlila je povećanje prosječne vrijednosti SR sa 17,8 na 21,9 otk./min. U narednih 72 h došlo je do značajne promjenljivosti SR. Takođe, trećeg

## Rezultati

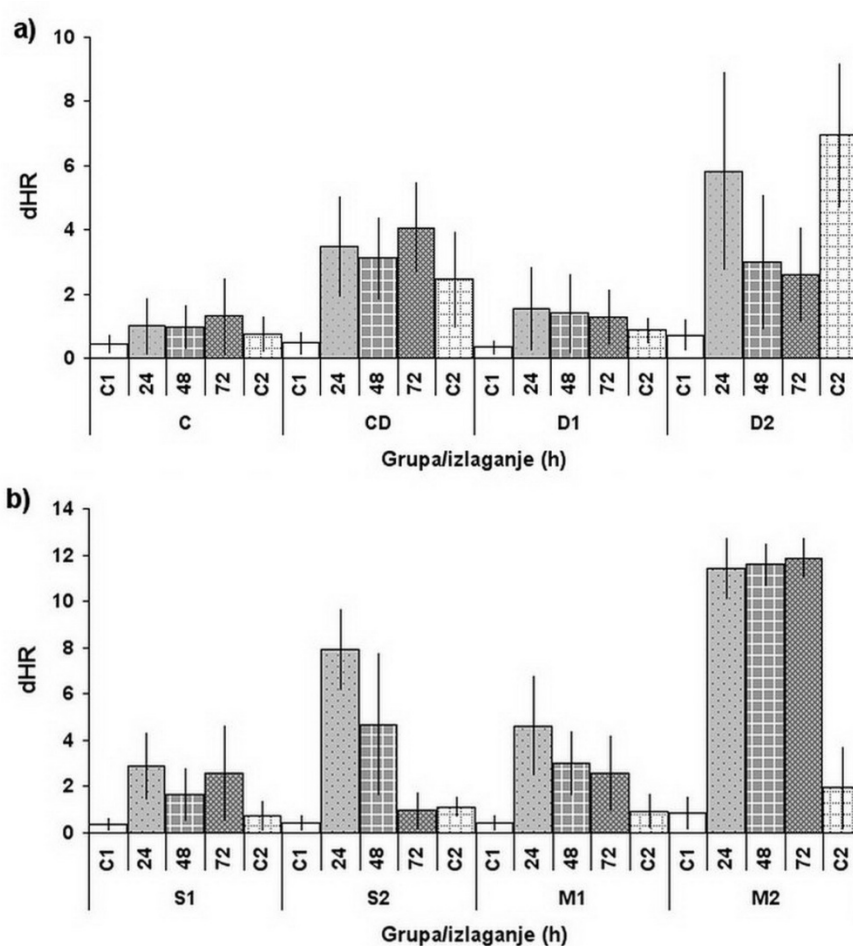


**Slika 4.5.** Prosječni srčani ritam unutar grupe dagnji (*M. galloprovincialis* L.) sa standardnom devijacijom (SD) u predtretmanu, u toku izlaganja i periodu nakon tretmana: a) S<sub>1</sub> (5 µL/L), b) S<sub>2</sub> (50 µL/L), c) M<sub>1</sub> (dizel gorivo 100 µL/L + S-25 5 µL/L), d) M<sub>2</sub> (dizel gorivo 1000 µL/L + S-25 50 µL/L); Skraćenice: S-25 – Superdispersant-25, M – mješavina dizel goriva i S-25, i – ispiranje. Strelice ukazuju na trenutke početka i prestanka hemijskog tretmana.

dana izlaganja, zabilježen je veoma veliki opseg vrijednosti SD. Ispiranje je uslovalo stabilan SR pri vrijednosti 16,5 otk./min uz nisku SD. Na samom početku primjene S<sub>2</sub>,

## Rezultati

bazalni nivo prosječnog SR bio je blago povećan sa 17,5 na 20,2 otk./min. Zatim je SR naglo opalo do 10 otk./min i uglavnom se zadržao na nižim vrijednostima u toku prvih 24 h. Narednog dana, došlo je do postepenog porasta SR sa maksimumom od 29,8 otk./min. Nakon ispiranja, prosječna vrijednost SR bila je stabilna sa niskom SD. Najveće odstupanje dHR kod obje koncentracije disperzanta bilo je u prvih 24 h izlaganja, da bi se vrijednost kasnije smanjila i nakon izlaganja (C<sub>2</sub>) bila u granicama dHR u predtretmanu (C<sub>1</sub>; **Slika 4.6.b**).



**Slika 4.6.** Prosječna razlika srčanog ritma (dHR) unutar grupe dagnji (*M. galloprovincialis* L.): a) u predtretmanu (C<sub>1</sub>), kontroli (C), u toku izlaganja CD, D<sub>1</sub> (5 μL/L), D<sub>2</sub> (50 μL/L) i u periodu nakon tretmana (C<sub>2</sub>); b) u predtretmanu (C<sub>1</sub>), u toku izlaganja S<sub>1</sub> (5 μL/L), S<sub>2</sub> (50 μL/L), M<sub>1</sub> (dizel gorivo 100 μL/L + S-25 5 μL/L), M<sub>2</sub> (dizel gorivo 1000 μL/L + S-25 50 μL/L) i u periodu nakon tretmana (C<sub>2</sub>). Vrijednosti predstavljaju prosjek ± SD. Skraćenice: CD – kadmijum hlorid, D – dizel gorivo, S-25 – Superdispersant-25, M – mješavina dizel goriva i S-25.

Izlaganje nižoj koncentraciji dispergovanog dizel goriva ( $M_1$ ) uslovalo je porast prosječne vrijednosti SR sa 19,7 na 24,2 otk./min. U narednih 72 h, primjećena je promjenljivost SR. Ispiranje je dovelo do stabilnog SR sa visokom SD. Primjena  $M_2$  uticala je na značajan porast prosječne vrijednosti SR sa 18,7 na 30 otk./min, nakon čega je uslijedio nagli pad do svega 8,3 otk./min. Ovako niske vrijednosti SR praćene neočekivano niskom SD zadržale su se sve do kraja izlaganja. Po ispiranju supstance prosječna vrijednost SR naglo je porasla do 18,4 otk./min uz visoku SD (**Slika 4.5.**).

Vrijednost dHR bila je najveća u prvih 24 h pri tretmanu sa  $M_1$ , da bi se u narednom periodu postepeno smanjivala. Pri izlaganju  $M_2$ , dHR je bio visok sve do prestanka tretmana, nakon čega je došlo do oštrog pada vrijednosti u granicama  $C_1$  (**Slika 4.6.b.**).

### **4.2.2.2. Uticaj dizel goriva i S-25 na preživljavanje ćelija i oštećenje DNK u hemocitama dagnji prilikom produženog izlaganja**

Izlaganje za procjenu genotoksičnosti dizel goriva, S-25 i  $CdCl_2$ , sprovedeno je u 2 odvojena eksperimenta (eksperiment 1 i eksperiment 2, u daljem tekstu). Za svaki od njih, dagnje su odvojene u 8 grupa po 10 jedinki, svaka grupa bila je postavljena u akvarijum sa morskom vodom uzetom sa mjesta uzorkovanja Dobrota 1. Nakon aklimacije, obavljani su tretmani prethodno navedenim supstancama u trajanju od 72 h.

#### **4.2.2.2.1. Uticaj dizel goriva i S-25 na vijabilnost hemocita dagnji**

Nakon tretmana, uzorkovana je hemolimfa iz mišića aduktora dagnji, da bi se na osnovu preživljavanja dobili podaci o citotoksičnosti. Rezultati testa preživljavanja ćelija prikazani su u **tabeli 4.3.** Smanjeno preživljavanje hemocita primijećano je samo za tretmane sa  $CdCl_2$  (29% smanjenja).

## Rezultati

**Tabela 4.3.** Procenat živih hemocita u tretiranim školjkama u odnosu na školjke iz negativne kontrole

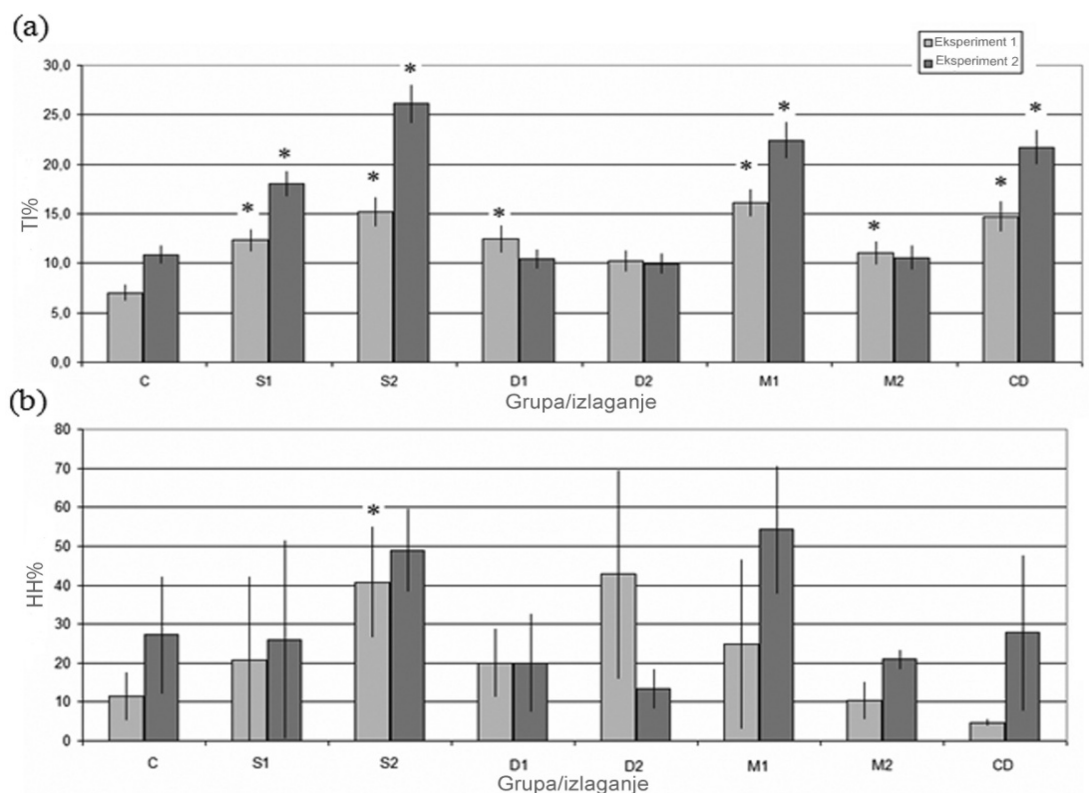
	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	CD
Eksperiment 1	89%	96%	99%	100%	100%	100%	85%
Eksperiment 2	94%	93%	93%	100%	92%	100%	58%
Sr. vrijednost	91%	95%	96%	100%	96%	100%	71%

### 4.2.2.2.2. Uticaj dizel goriva i S-25 na nivo oštećenja DNK molekula u hemocitama dagnji - komet test

Parametri genotoksičnosti koji su analizirani bili su TI% i HH%. Rezultati komet testa objedinjeni su na **slici 4.7**. Značajan porast TI% primijećen je za obje koncentracije S-25. Uticaj dizel goriva bio je zapažen samo za koncentraciju D<sub>1</sub> i samo u eksperimentu 1. Koncentracija M<sub>1</sub> dovela je do značajnog porasta oštećenja DNK u oba eksperimenta. Značajan porast oštećenja DNK indukovala je koncentracija M<sub>2</sub> samo u prvom eksperimentu ali je indukcija bila značajno niža u poređenju sa S<sub>2</sub>, D<sub>2</sub> i M<sub>1</sub> tretmanima. U oba eksperimenta CdCl<sub>2</sub> je indukovao značajno oštećenje DNK (**Slika 4.7.a**).

Najviši procenat HH% u oba eksperimenta zapažen je u grupama koje su bile izložene S<sub>2</sub> (**Slika 4.7.b**). Povišen procenat javio se takođe za D<sub>2</sub> u prvom, kao i M<sub>1</sub> u drugom eksperimentu. Izuzev koncentracije D<sub>2</sub>, zapažaju se slični trendovi među oštećenjima DNK u kometama i frekvencije jedara sa velikim oštećenjem što je potvrđeno značajnom korelacijom TI% i HH% ( $r_{ex1} = 0.54$ ,  $r_{ex2} = 0.95$ ).





**Slika 4.7.** (a) Nivo oštećenja DNK procijenjen na osnovu intenziteta repa (eng. Tail intensity – TI%; srednja vrijednost ± SE), (b) frekvencije kometa sa velikim oštećenjem (HH%, eng. Hedgehogs; prosjek ± SD ) u hemocitama *M. galloprovincialis*, nakon izlaganja S-25 u koncentracijama S<sub>1</sub> i S<sub>2</sub>; dizel gorivu u koncentracijama D<sub>1</sub> i D<sub>2</sub> i mješavinama M<sub>1</sub> i M<sub>2</sub>; CD – kadmijum hlorid (40 μM). \*p<0.05.

#### 4.2.3. Uticaj TBT-Cl prilikom produženog izlaganja

U daljem radu je testiran efekat tributil kalaj hlorida (TBT-Cl), biocidne komponente boja, koje se koriste u zaštiti plovila sa poznatim toksičnim i genotoksičnim potencijalom. Paralelno sa praćenjem uticaja na SR, u odvojenim eksperimentima, obavljena su produžena izlaganja dagnji istim koncentracijama TBT-Cl, radi određivanja nivoa oštećenja DNK u hemocitama pomoću komet testa i mikronukleus testa. B(a)P koji je korišćen kao pozitivna kontrola dok je za negativnu kontrolu uzet akvarijum sa čistom morskom vodom. Uporedo sa navedenim koncentracijama, uzeti su uzorci morske vode iz akvarijuma i testiran je mutageni potencijal TBT-Cl na prokariotskom modelu SOS/*umuC* testu *in vitro*.

#### 4.2.3.1. Uticaj TBT-Cl na srčani ritam dagnje prilikom produženog izlaganja

Urađeno je 5 eksperimenata pri kojima je praćen uticaj tri koncentracije TBT-Cl (10, 100 i 1000 µg/L) na SR dagnji. Za svaki eksperiment postavljeno je po 16 dagnji u akvarijum, pri čemu je 8 jedinki bilo uključeno u mjerenje SR dok je druga polovina služila kao pomoćna. Tretmani su trajali 96 h, SR je registrovan prije izlaganja (predtretman), u toku izlaganja i nakon ispiranja suspcanci (period nakon tretmana). Pored SR, kao pokazatelj nivoa stresa, uveden je parametar dHR koji predstavlja prosječnu razliku u odgovoru SR u odnosu na period predtretmana (poglavlje 4.2.1.2)

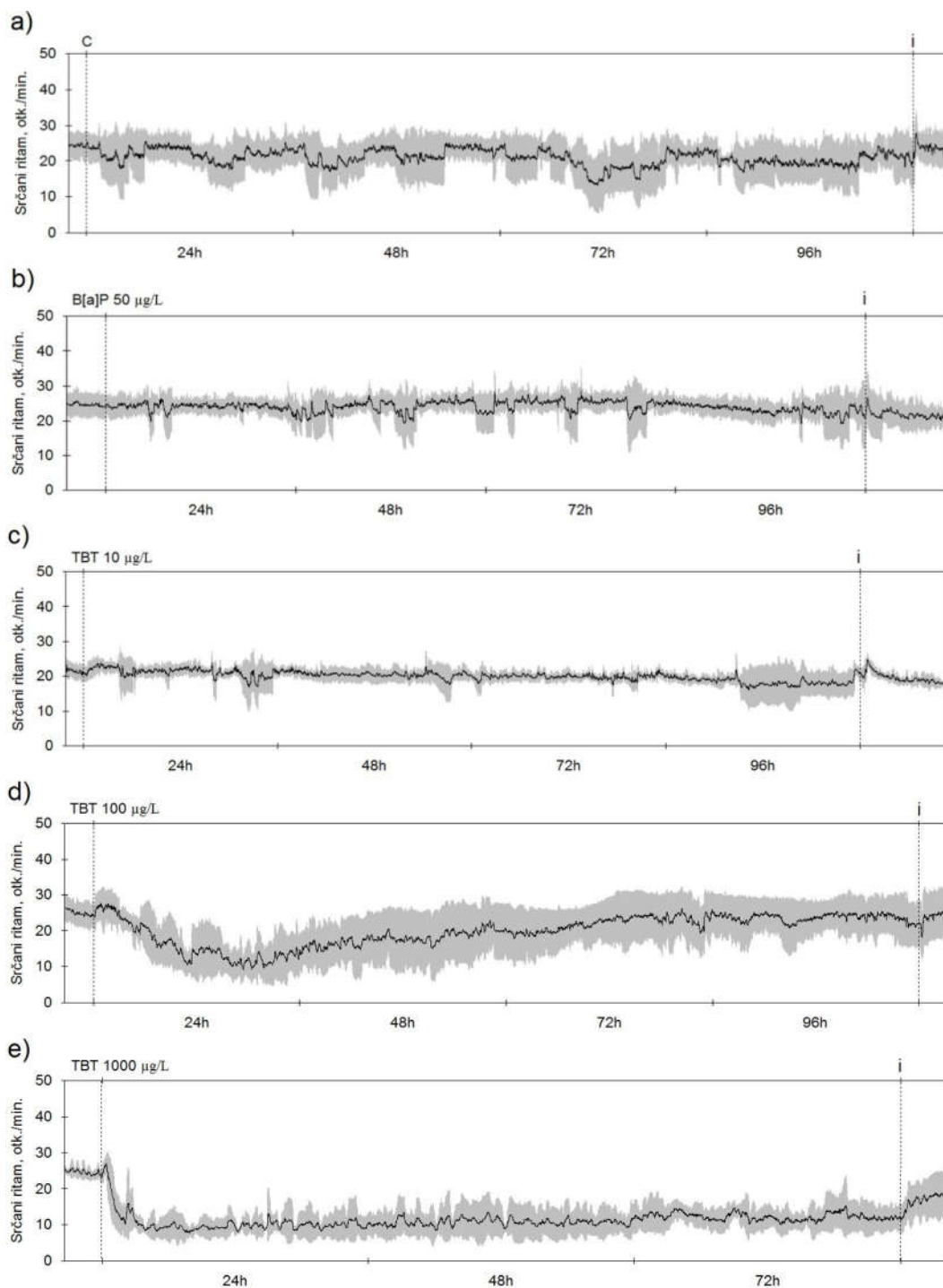
Rezultati praćenja SR prikazani su na **slici 4.8.**, dok je dHR u odnosu na vrijednost bazalnog nivoa SR u predtretmanu, u toku izlaganja i periodu nakon tretmana na **slici 4.9.** Odnosi SR među jedinkama unutar grupe dagnji predstavljeni su pomoću SD. U čistoj morskoj vodi, primjećena je promjenljivost SR kod svih 8 jedinki (**Slika 4.8.a**), što je ujedno uzrok promjena u obrascu prosječne vrijednosti SR na slici. Ipak, registrovani su i duži periodi u kojima je vrijednost SR bila stabilna u toku 96 h.

Nakon izlaganja B(a)P nije bilo promjena u prosječnoj vrijednosti SR (**Slika 4.8.b**). Obrazac SR zadržao se na bazalnom nivou u toku dužeg perioda. Povremeno, dolazilo je do promjenljivosti SR, koja je bila sličnog opsega kao u prethodnom slučaju u uslovima čiste morske vode. U toku perioda nakon tretmana, SR bio je stabilan.

Najniža koncentracija TBT-Cl bila je 10 µg/L. Na samom početku izlaganja došlo je do povećanja prosječne vrijednosti SR za 10 % (**Slika 4.8.c**). Obrazac SR i SD bili su stabilni i imali su minimalna odstupanja u toku 96 h. Ispiranje je dovelo do porasta SR sa 19 na 25 otk./min da bi kasnije došlo do povratka vrijednosti na bazalni nivo.

Tretmani sa 10 i 100 puta višom koncentracijom izazvali su značajan odogovor SR. Uticaj 100 µg/L TBT-Cl izazvao je povećanje SR za 10 % (**Slika 4.8.d**). Nakon toga, SR je ostao na vrijednosti od oko 20 otk./min. u narednih 5 h. Neočekivano, obrazac SR počeo je postepeno da opada sve do 11 otk./min. u narednih 6 h. Niža vrijednost SR održala se do kraja prvih 24 h izlaganja TBT-Cl. Sledećeg dana, SR se postepeno povećao do vrijednosti bazalnog nivoa, praćen višom SD do kraja tretmana. Iako je vrijednost dHR u periodu

## Rezultati

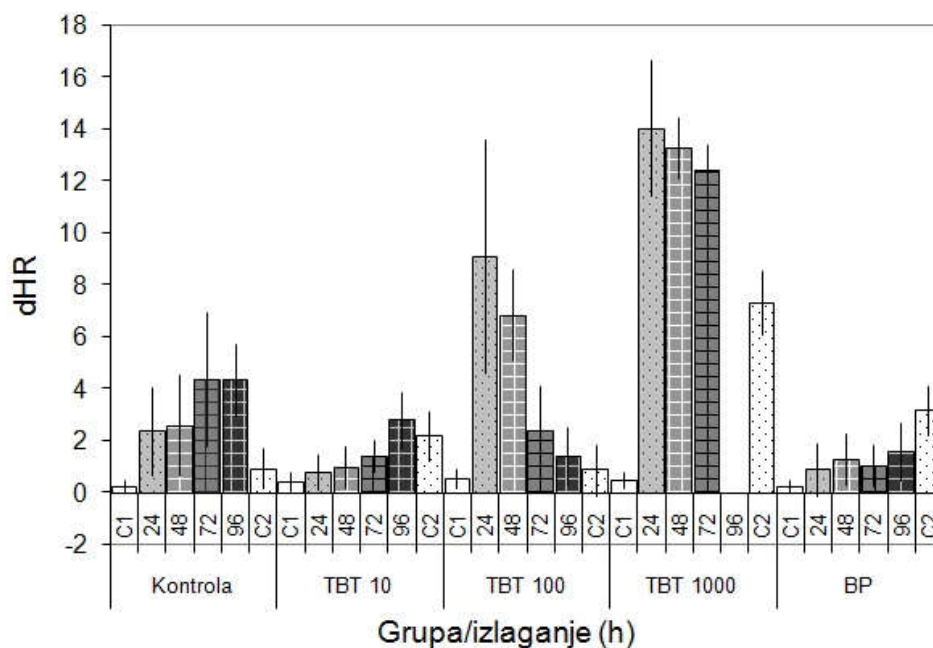


**Slika 4.8.** Prosječan srčani ritam dagnje *M. galloprovincialis* L. sa SD u a) čistoj morskoj vodi kao negativna kontrola, u predtretmanu, u toku izlaganja i u periodu nakon tretmana, b) 50 µg/L B(a)P kao pozitivna kontrola, c) 10, d) 100 i e) 1000 µg/L TBT-Cl; Skraćenice: SD – standardna devijacija, C – kontrola, B(a)P – benzo(a)piren, i – ispiranje, h – sati, TBT – (eng. tributyltin) - TBT-Cl

nakon tretmana bila značajno viša u poređenju sa predtretmanom, treba napomenuti da su ove vrijednosti bile u sličnom opsegu (**Slika 4.9.**).

Odgovor prosječnog SR na 1000  $\mu\text{g/L}$  TBT-Cl, takođe je bio povišen za oko 10 % na samom početku tretmana, ali nasuprot srednjoj primijenjenoj koncentraciji, primijećen je oštar pad SR sa 25 na svega 9 otk./min. (**Slika 4.8.e**). Prosječna vrijednost SR bila je oko 10 otk./min sve do kraja tretmana. Nakon 72 h supstanca je ispiranjem uklonjena iz akvarijuma. Po ispiranju, prosječna vrijednost SR dostigla je 18 otk./min i ostala na istom nivou. Vrijednost dHR bila je značajno viša u toku izlaganja, takođe bila je i visoka u periodu nakon tretmana u odnosu na predtretman (**Slika 4.9.**). Odlučili smo da uklonimo supstancu iz akvarijuma dan ranije usljed smanjenog preživljavanja jedinki.

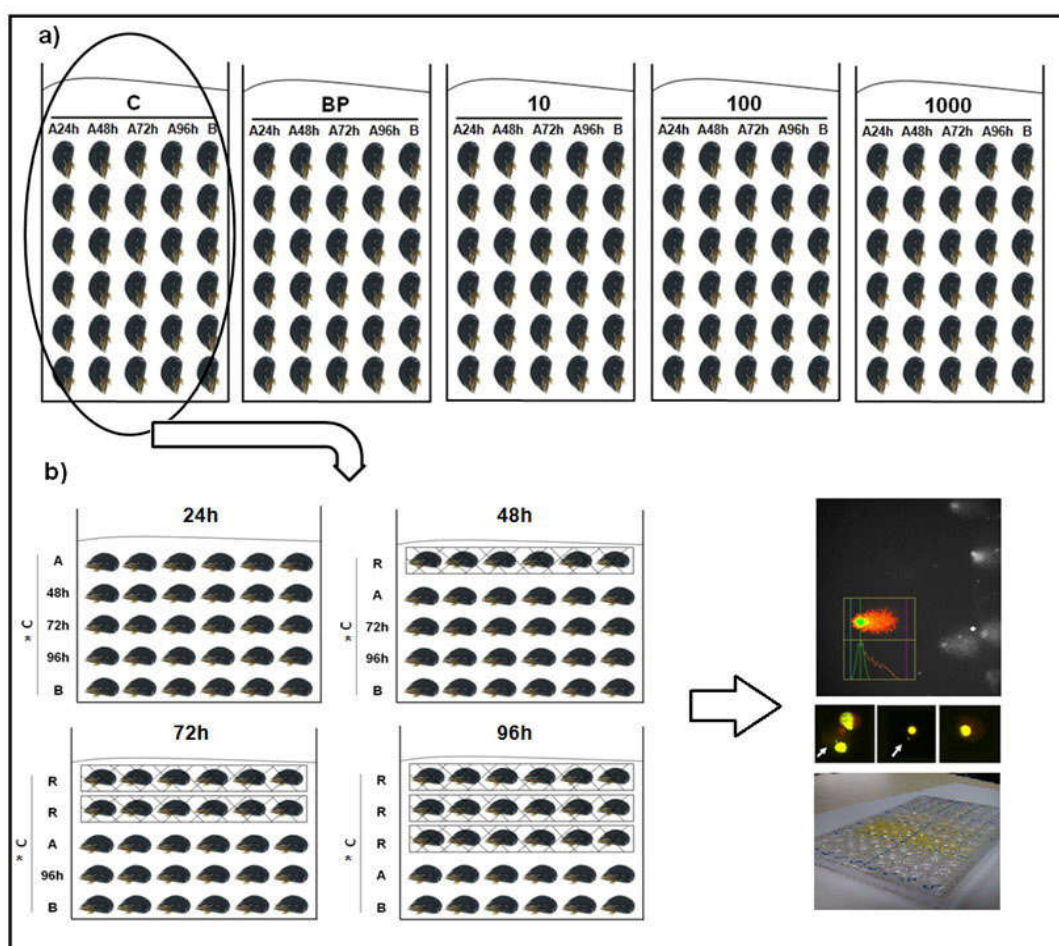
Povezivanje pomoću bisusnih niti za dno akvarijuma bilo je održano u toku dodatka najniže koncentracije TBT-Cl, što je bio slučaj nakon eksperimenata sa B(a)P i negativne kontrole. S druge strane, školjke su bile pričvršćene za površinu dna slabijim intenzitetom u toku tretmana i po ispiranju najviše koncentracije TBT-Cl.



**Slika 4.9.** Prosječna razlika srčanog ritma (dHR) unutar grupe dagnji (*M. galloprovincialis* L.) u kontroli (C), predtretmanu (C<sub>1</sub>), u toku izlaganja 10, 100 i 1000  $\mu\text{g/L}$  TBT-Cl, 50  $\mu\text{g/L}$  B(a)P (benzo(a)piren) i u periodu nakon tretmana (C<sub>2</sub>); prikazane su srednje vrijednosti  $\pm$  SD

#### 4.2.3.2. Uticaj TBT-Cl na nivo oštećenja DNK molekula u hemocitama dagnji i indukciju mutagenoze u prokariotskom modelu prilikom produženog izlaganja

Dagnje su odvojene u pet grupa po 30 jedinki pri čemu je svaka grupa bila postavljena u staklene akvarijume sa po 20 L morske vode. Tretmani su vršeni u dva odvojena eksperimenta (prvi i drugi eksperiment dalje u tekstu).



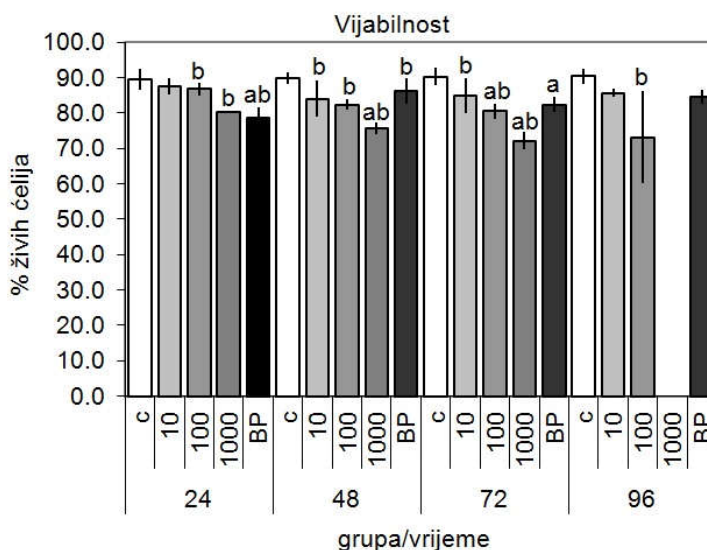
**Slika 4.10.** Postavka eksperimenta za procjenu genotoksičnosti TBT-Cl: a) shema akvarijuma sa školjkama, b) shema dinamike uzorkovanja prikazana na primjeru kontrolnog akvarijuma. \*C – akvarijum negativne kontrole nakon kontrolnih tačaka na 24, 48, 72 i 96 h, isti postupak je sproveden istovremeno za druge akvarijume. Skraćenice: A – školjke za analizu, B – pomoćne školjke, R – školjke u plastičnim mrežama za zamjenu, C – negativna kontrola, BP – B(a)P (50 µg/L) kao pozitivna kontrola, TBT-Cl u koncentracijama (10, 100, 1000 µg/L).

Jedinke su izlagane pri konstantnoj temperaturi od  $21 \pm 1^\circ\text{C}$  u statičkom sistemu 96 h. Kontrolne tačke za analize bile su nakon 24, 48, 72 i 96 h u toku tretmana (**Slika 4.10.**) Na svakoj kontrolnoj tački, iz svakog akvarijuma uzimano je po 6 jedinki za analize (citotoksičnost, komet i mikronukleus test).

Iz svakog akvarijuma u kome je rađen tretman dagnji uzeti su uzorci vode za analizu mutagenog potencijala SOS/*umuC* testom.

#### 4.2.3.2.1. Uticaj TBT-Cl na vijabilnost hemocita dagnji

Citotoksični potencijal TBT-Cl ispitivan je na osnovu stabilnosti membrane hemocita „trypan blue“ bojenjem, pri čemu se obojene ćelije smatraju mrtvim. Poređenjem sa odgovarajućom kontrolom, u oba eksperimenta 1000  $\mu\text{g/L}$  TBT-Cl doveo je do značajnog pada preživljavanja ćelija nakon 48 i 72 h izlaganja (**Slika 4.11.**).



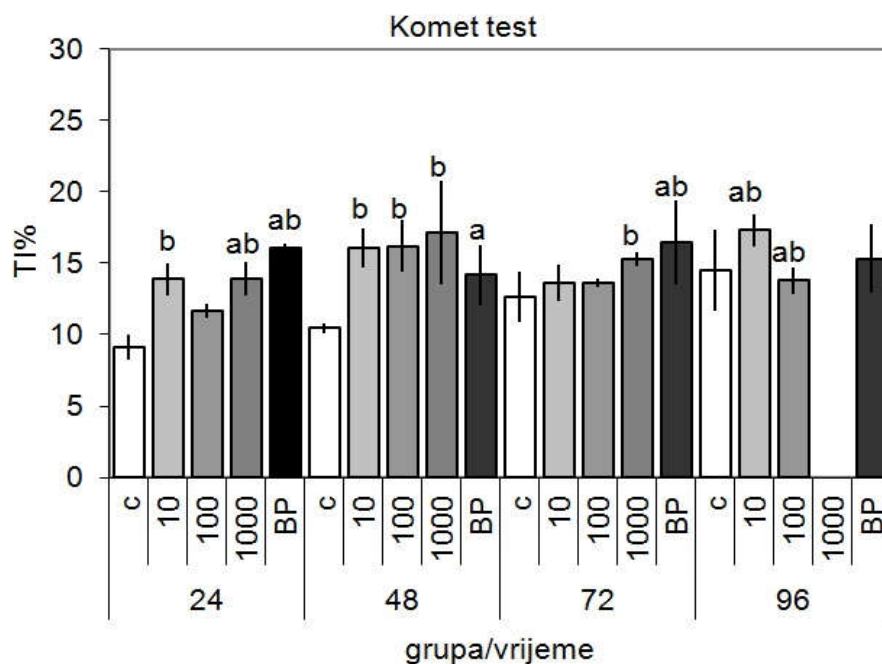
**Slika 4.11.** Uticaj TBT-Cl (10-1000  $\mu\text{g/L}$ ) i B(a)P (50  $\mu\text{g/L}$ ) na preživljavanje hemocita *M. galloprovincialis*. Vrijednosti predstavljaju prosjek  $\pm$  SE dva nezavisna eksperimenta; C – kontrola, BP – B(a)P; a – značajnost u poređenju sa odgovarajućom kontrolom u prvom eksperimentu, b – značajnost u poređenju sa odgovarajućom kontrolom u drugom eksperimentu ( $p < 0.05$ ).

Takođe, 100  $\mu\text{g/L}$  TBT-Cl značajano je redukovalo vijabilnost nakon 72 h izlaganja u oba eksperimenta, dok je nakon 96 h došlo do značajnog smanjenja vijabilnosti ćelija samo u

drugom eksperimentu. Uticaj najniže ispitivane koncentracije TBT-Cl od 10  $\mu\text{g/L}$  zapažen je samo u drugom eksperimentu, nakon 48 i 72 h.

#### 4.2.3.2.2. Uticaj TBT-Cl na nivo oštećenja DNK molekula u hemocitama dagnji – komet test

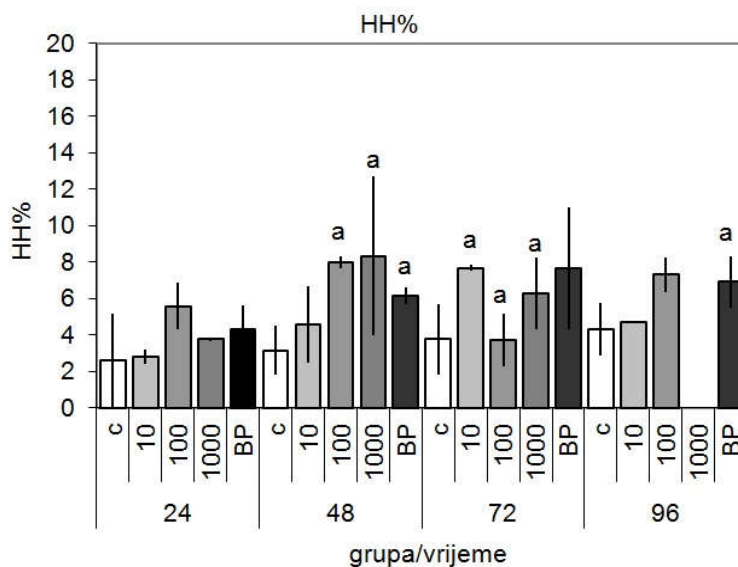
Genotoksičnost je procijenjena na osnovu parametara TI% i HH%. Dobijeni rezultati za komet test prikazani su na **slici 4.12**. Nakon 24 h izlaganja, primijećen je značajan porast oštećenja DNK u grupi izloženoj 10  $\mu\text{g/L}$  (samo u drugom eksperimentu) i u grupama izloženim 1000  $\mu\text{g/L}$  TBT-Cl (u oba eksperimenta). U svim grupama izloženim TBT-Cl došlo je do porasta oštećenja DNK nakon 48 h izlaganja, međutim statistički značajna razlika, zapažena je samo u drugom eksperimentu.



**Slika 4.12.** Uticaj TBT-Cl (10-1000  $\mu\text{g/L}$ ) i B(a)P (50  $\mu\text{g/L}$ ) na nivo oštećenja DNK procijenjen na osnovu TI%; Vrijednosti predstavljaju prosjek  $\pm$  SE dva nezavisna eksperimenta; C – kontrola, BP – B(a)P; a – značajnost u poređenju sa odgovarajućom kontrolom u prvom eksperimentu, b – značajnost u poređenju sa odgovarajućom kontrolom u drugom eksperimentu ( $p < 0.05$ ).

U grupi izloženoj koncentraciji od 1000  $\mu\text{g/L}$ , još uvijek je bio prisutan značajan porast oštećenja DNK (drugi eksperiment). Nakon 96 h, u oba eksperimenta nivo oštećenja

DNK bio je značajno viši u grupama izloženim 10 µg/L i 100 µg/L u poređenju sa kontrolom. Tretmani B(a)P doveli su do značajnog porasta nivoa oštećenja DNK nakon 24 i 72 h u oba eksperimenta i nakon 48 h u prvom eksperimentu. Ni u jednom eksperimentu, nije zapažen značajan porast nakon 96h

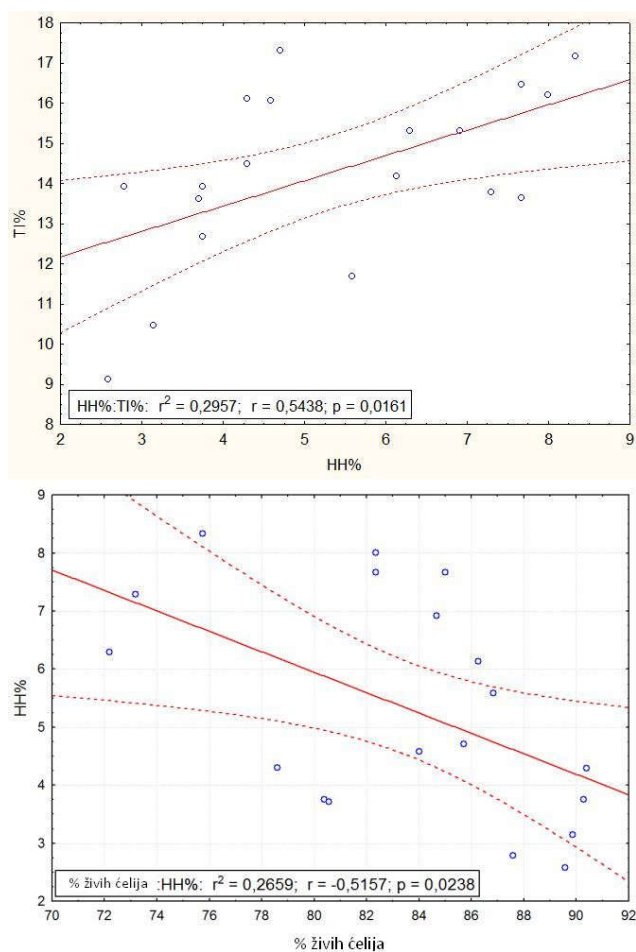


**Slika 4.13.** Uticaj TBT-Cl (10-1000 µg/L) i B(a)P (50 µg/L) na frekvenciju jedara sa velikim oštećenjem (HH%); vrijednosti predstavljaju prosjek ± SE dva nezavisna eksperimenta; C – kontrola, BP – B(a)P; a – značajnost u poređenju sa odgovarajućom kontrolom u prvom eksperimentu, b – značajnost u poređenju sa odgovarajućom kontrolom u drugom eksperimentu ( $p < 0.05$ ).

Značajan porast HH% bio je zapažen samo u prvom eksperimentu koji kompenzuje razlike primijećene između prvog i drugog eksperimenta na osnovu vrijednosti TI% (**Slika 4.13.**). Zapažena je značajna pozitivna korelacija između podataka za vrijednosti TI% i HH% (**Slika 4.14.A**). Nakon 48 h izlaganja, koncentracije od 100 i 1000 µg/L dovele su do značajno većeg broja HH% u poređenju sa kontrolom. Nakon 72 h zapažen je značajan porast HH% za sve koncentracije TBT-Cl. Poređenjem podataka preživljavanja ćelija i HH%, zapažena je značajna negativna korelacija (**Slika 4.14.B**).



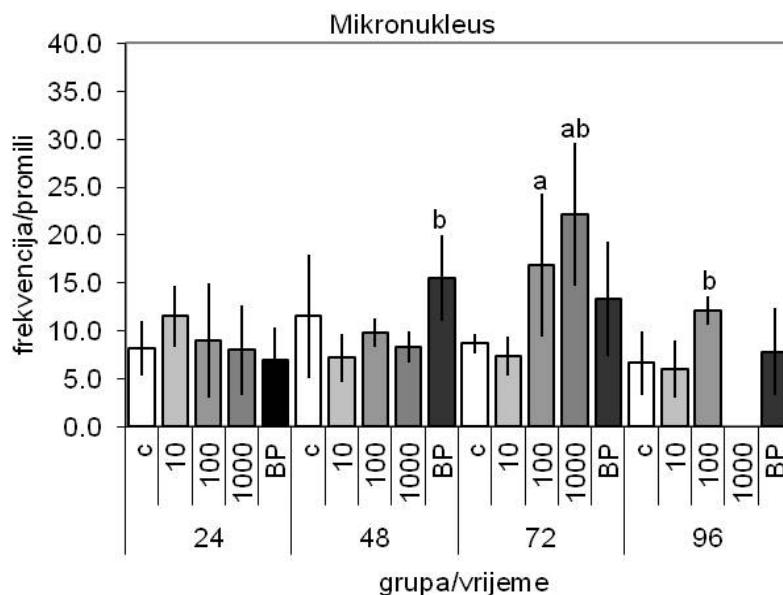
## Rezultati



**Slika 4.14.** Odnos između frekvencije jedara sa velikim oštećenjem (HH%) i (A) TI% i (B) preživljavanja ćelija; tačke predstavljaju prosječne vrijednosti dobijene u dva odvojena eksperimenta.

### 4.2.3.2.3. Uticaj TBT-Cl na nivo oštećenja DNK molekula u hemocitama dagnji – mikronukleus test

U poređenju sa odgovarajućom kontrolom, u oba eksperimenta TBT-Cl (1000  $\mu\text{g/L}$ ) doveo je do značajnog porasta MN nakon 72 h izlaganja (**Slika 4.15.**). Takođe, uticaj 100  $\mu\text{g/L}$  TBT-Cl pokazan je nakon 72 h (prvi eksperiment i nakon 96 h (drugi eksperiment). BP je izazvao značajan porast MN samo nakon 48 h (drugi eksperiment).



**Slika 4.15.** Uticaj TBT-Cl (10-1000 µg/L) i B(a)P (50 µg/L) na indukciju formi mikronukleusa u hemocitama *M. galloprovincialis*. Vrijednosti predstavljaju prosjek ± SE dva nezavisna eksperimenta; C – kontrola, BP – B(a)P; a – značajnost u poređenju sa odgovarajućom kontrolom u prvom eksperimentu, b – značajnost u poređenju sa odgovarajućom kontrolom u drugom eksperimentu ( $p < 0.05$ ).

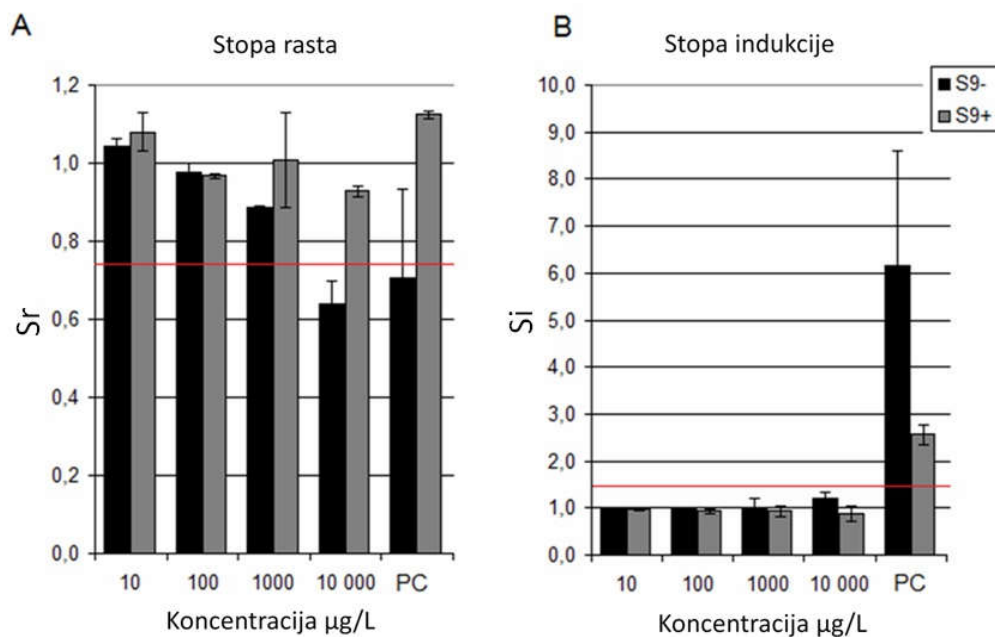
#### 4.2.3.2.4. Procjena gentoksičnog potencijala TBT-Cl u akvarijumskoj vodi SOS/*umuC* testom

TBT-Cl je testiran *in vitro* u SOS/*umuC* testu. Kao što je prikazano na **slici 4.16.B.** nijedna od ispitivanih koncentracija rastvora TBT-Cl pripremljena u PBS – u nije imala uticaj na indukciju SOS odgovora.

Međutim, primijećen je pad biomase ćelija koji je bio zavisao od primijenjene doze (**Slika 4.16.A**). Pošto je inhibicija rasta bila veća od 25%, primijećen je citotoksični potencijal pri koncentraciji od 10.000 µg/L. Takođe, SOS/*umuC* test izveden je na uzorcima vode iz akvarijuma u kojim je rađen tretman kako bi se predstavio potencijalni uticaj izlaganju TBT-Cl u životnoj sredini. Uzorci su sakupljeni iz svih akvarijuma nakon 24, 48, 72 i 96 h izlaganja. Kao što je to bio slučaj u testu izvedenom *in vitro*, nijedan uzorak nije pokazao

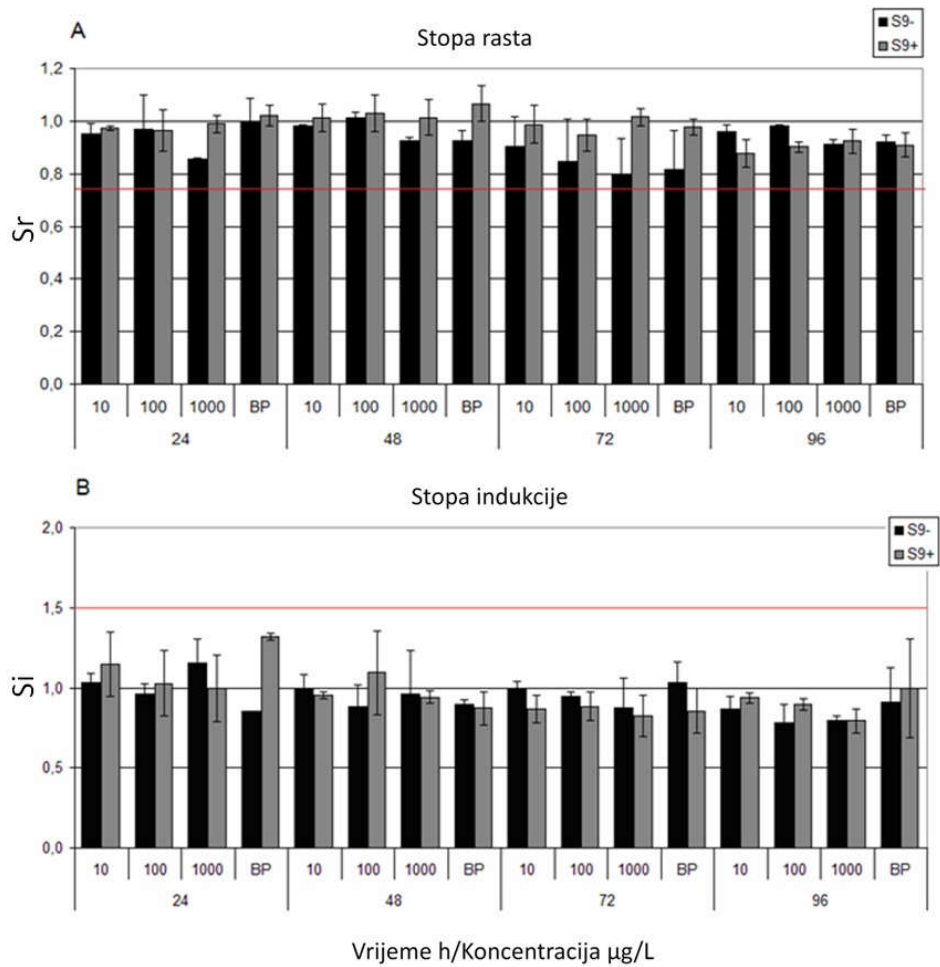
## Rezultati

sposobnost indukcije SOS odgovora (**Slika 4.17.B**). Pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji TBT-Cl (1000  $\mu\text{g/mL}$ ), bio je jasno izražen uticaj na rast bakterija (**Slika 4.17.A**).



**Slika 4.16.** Uticaj TBT-Cl na rast (A) i stopu indukcije SOS (B); Vrijednosti predstavljaju prosjek  $\pm$  SD dva nezavisna eksperimenta; PC – pozitivna kontrola 4NQO/B(a)P; crvena linija predstavlja vrijednost praga za stopu indukcije (1.5) i inhibiciju rasta (0.75)

## Rezultati



**Slika 4.17.** Uticaj uzoraka vode iz akvarijuma na rast (A) i stopu SOS indukcije (B). Vrijednosti predstavljaju prosjek  $\pm$  SD dva nezavisna eksperimenta; BP – B(a)P; crvena linija predstavlja vrijednost praga za stopu indukcije (1.5) i inhibiciju rasta (0.75).

# DISKUSIJA

## 5. Diskusija

U ovom radu, istraživanja se mogu podijeliti na dvije cjeline. Prva cjelina obuhvata ispitivanja kratkotrajnog uticaja promjenljivosti u salinitetu morske vode na SR mediteranske dagnje. Takođe, analizirano je dejstvo teških metala na primjeru kadmijum hlorida, kao i zagađenja porijeklom od dizel goriva i disperzanta za naftu S-25 na SR navedenih školjki.

Pošto je potvrđen potencijal SR dagnje kao biomarkera zagađenja, obavljena je studija produženog izlaganja navedenim supstancama. U ovoj grupi istraživanja, uvedeni su dodatni biomarkeri koji se koriste za procjenu genotoksičnosti da bi ispitali povezanost SR dagnje kao fiziološkog biomarkera sa DNK oštećenjem kao molekularnim biomarkerom koji se često koristi pri praćenju zagađenja životne sredine (Kolarević, 2014). Rezultati studije kratkotrajnog izlaganja korišćeni su kao smjernice za konstrukciju testova produženog tretmana. Za pozitivne kontrole u testovima odabrani su CdCl<sub>2</sub> i B(a)P kao model mutageni za koje postoje literaturni podaci o uticaju i na SR i oštećenje DNK u dagnjama. Uvedena je i mehanička disperzija nafte u morskoj vodi prije samog tretmana. U literaturi nema podataka o uticaju S-25 na oštećenja DNK pa je uporedo sa analizama SR praćena i genotoksičnost pomoću komet testa. Urađeni su tretmani tributil kalaj hloridom, kao polutantom čija kontrola je od velikog značaja za životnu sredinu mora. Uporedo sa analizama SR praćen je efekat ovog zagađivača komet i mikronukleus testovima. Takođe, mutageni potencijal TBT-Cl procijenjen je i na prokariotskom modelu u SOS/*umuC* *in vitro* testu.

### 5.1. Praćenje uticaja stresora na srčani ritam dagnje prilikom kratkotrajnog izlaganja

Pomoću neinvazivnog “fiber-optic” metoda za praćenje srčanog ritma vodenih beskičmenjaka (Fedotov i sar., 2000), moguće je dobiti podatke o broju otkucaja srca po minuti u intervalima od 10 sekundi. Prema tome, čak i kratkotrajna odstupanja u obrascu SR, nastala pod uticajem prirodnih promjena u životnoj sredini ili antropogenim djelovanjem, mogu biti prikazana u realnom vremenu (Kholodkevich i sar., 2008).

Praćenjem SR dagnji pomoću fiber-optic metoda, potvrđena je sposobnost da detektuju stres pri kratkotrajnom izlaganju promjenama u salinitetu morske vode, kadmijum hloridu, kao i zagađenju dizel gorivom i S-25.

Pri ispitivanju uticaja promjenljivosti saliniteta mora, najniža vrijednost prosječnog vremena oporavka SR izmjerena u Stolivu (referentno mjesto) u odnosu na vremena oporavka dagnji sa lokaliteta Dobrota 1 i 2, ide u prilog stavu da bi se primijenjeni metod mogao koristiti za detekciju stresa. U studiji Kholodkevich i sar. (2011), navedeno je da ukoliko prosječne vrijednosti oporavka SR dagnji na proučavanim lokalitetima nisu veće za više od 50% u odnosu na vrijednost oporavka SR sa referentnog lokaliteta, smatra se da je na tim mjestima dobar kvalitet vode. S obzirom da vrijednosti prosječnog vremena oporavka SR za školjke uzorkovane sa lokaliteta Dobrota 1 i 2, prevazilaze vrijednosti izračunate kod jedinki sa referentnog mjesta, može se reći da je potvrđeno prisustvo stresa. U studiji Kholodkevich i sar. (2011), vrijednosti CV kod školjki sa referentnih lokaliteta bile su u opsegu od 0,1 – 0,3. Prema tome, na osnovu vrijednosti CV od 0,35 kod dagnji sa lokaliteta Stoliv, iako je viša u odnosu na lokalitete Dobrota 1 i 2, ne može se tvrditi da se radi o prisustvu stresa.

Metod bi trebalo dalje testirati u cilju unapređenja i primjene kao sistema za rano upozoravanje na prisustvo stresa. Potrebno je proširiti istraživanje na različite vrste, kao i na niz lokaliteta koji su pod uticajem različitih tipova stresa.

Smatra se da je kadmijum jedan od najopasnijih zagađivača životne sredine jer dovodi do povećanog rizika za razvoj kancerogenih oboljenja (Alessandria i sar., 2012), pri čemu može uticati na stabilnost genoma stvaranjem reaktivnih vrsta kiseonika (eng. ROS – reactive oxygen species) u ćelijama (Kolarević i sar., 2013). U studiji Schuwerack i sar. (2007) proučavan je uticaj 200 µg CdCl<sub>2</sub> na SR slatkovodnog raka *Potamonautes warreni* u trajanju od 3 nedjelje pri čemu nije bilo promjene vrijednosti SR. Takođe, tretman sa 50 µg CdCl<sub>2</sub> u trajanju od 20 dana nije imao uticaj na SR ostrige *Crassostrea virginica* (Lannig i sar., 2008). S druge strane, u studiji Bakhmet i sar. (2012), pri izlaganju plave dagnje *M. edulis* sa 10, 100 i 500 µg/L CdCl<sub>2</sub> zapažen je porast vrijednosti SR nakon trećeg dana tretmana.

U našoj studiji, jedan od razloga za odsustvo odgovora SR dagnji prilikom tretmana sa najnižom koncentracijom  $\text{CdCl}_2$  ( $4 \mu\text{M} \approx 733 \mu\text{g}$ ), mogao bi biti kratkotrajno izlaganje. Primjena srednje ( $40 \mu\text{M}$ ) i najviše koncentracije ( $100 \mu\text{M}$ )  $\text{CdCl}_2$  dovela je do pada prosječne vrijednosti SR unutar obje grupe školjki, koji se zadržao u toku tretmana i dugo po ispiranju supstance iz akvarijuma, što je uticalo na znatno duže vrijeme oporavka SR kod obje grupe. Takođe, vrijeme oporavka SR pri tretmanu sa  $100 \mu\text{M}$  bilo je dvostruko duže u odnosu na grupu dagnji izloženih  $40 \mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ . To ukazuje da je povećana koncentracija zagađivača u akvarijumu uzrok produženog vremena za oporavak SR. U postojećoj literaturi ima nekoliko ponuđenih objašnjenja za dugotrajno smanjenje SR školjki u toku izlaganja različitim toksičnim zagađivačima. Zatvaranje kapaka ljuštore mediteranske dagnje usljed smanjene potrošnje kiseonika, kao razlog za pad SR, predstavio je Kholodkevich i sar. (2009). S druge strane, Curtis i sar. (2001), ukazali su da stimulacija inhibitornih holinergičnih nerava srca plave dagnje utiče na smanjenje SR.

Što se tiče eksperimenata sa uticajem zagađenja dizel gorivom i S-25, primijećeno je odsustvo odgovora SR u primjeni  $1000 \mu\text{L/L}$  dizel goriva bez prethodne mehaničke disperzije u morskoj vodi, što bi takođe moglo biti pripisano relativno kratkom periodu izlaganja kao i smanjenoj rastvorljivosti. Prilikom primjene najniže koncentracije S-25 došlo je do značajnog odgovora SR dagnje, što može biti dokaz za visoku toksičnost naftnog disperzanta. Dugotrajna promjenljivost SR pri dodatku  $200 \mu\text{L/L}$  S-25 može se pripisati nedovoljnom ispiranju supstance što je uslovalo veliku količinu pjene u akvarijumu. Iz tog razloga, vrijednost SR iz predtretmana, postignuta je tek nakon perioda potrebnog da školjke isfiltriraju vodu u akvarijumu. Prema tome, smatramo da bi upotrebu S-25 i sličnih supstanci trebalo smanjiti. U studiji Bakhmet i sar. (2009), dugotrajno izlaganje zagađenju naftom dovelo je do promjenljivosti SR kod *M. edulis*.

Razlog za smanjenje vrijednosti SR u primjeni dispergovanog dizel goriva i S-25 mogao biti zatvaranje ljuštore školjke i takođe uticaj štetnih sastojaka koje sadrži S-25. Međutim, spontani oporavak SR, zapažen po dodatku najniže doze S-25 ( $2 \mu\text{L/L}$ ), ukazuje da uprkos prisustvu zagađivača, školjke mogu prevazići stres što vodi ka zaključku da S-25 ima mehanizam dejstva koji ne pogađa neurofiziološke puteve.



U kombinaciji sa dizel gorivom, S-25 je doveo do dužeg vremena oporavka od stresa u odnosu na odvojenu primjenu. Nakon disperzije, dizel gorivo je postalo dostupnije tkivu školjke i uprkos niskoj koncentraciji moglo je doprinijeti reakciji srca.

Ne može se tvrditi da dizel gorivo bez prethodne mehaničke disperzije u morskoj vodi nije štetno po školjke iako nakon 2 h izlaganja nije došlo do promjene SR. Treba uzeti u obzir da izlivi nafte pored uticaja na hemijske parametre znatno alteriraju i fizičke parametre u životnoj sredini i predstavljaju ozbiljan problem zbog njihovog direktnog uticaja na ekosistem u cjelini.

Brz odgovor SR školjki na pogoršanje uslova životne sredine, otkriven pomoću PPG tehnologije, mogao bi postati važno sredstvo za proučavanje uticaja štetnih supstanci koje su prisutne u lukama.

## **5.2. Uporedne analize praćenja srčanog ritma dagnji i genotoksičnosti prilikom produženog izlaganja stresorima**

### **5.2.1. Uticaj dizel goriva i S-25 prilikom produženog izlaganja**

U toku produženog izlaganja dagnji, ispitivali smo uticaje disperzanta za naftu S-25, dizel goriva i dispergovanog dizel goriva. U postavci eksperimenta, pokušali smo da stvorimo uslove mogućeg zagađenja životne sredine. Zato su prije izlaganja pripremljene mješavine supstanci sa morskom vodom uz upotrebu mehaničke tresilice kako bi se simulirali uticaji talasa. Zagađenja dizel gorivom u većini slučajeva su lokalnog karaktera pri čemu je živi svijet u vodenoj sredini povremeno izložen visokim količinama disperzanata. Koristili smo najveću koncentraciju disperzanta koja se može primijeniti kod izlaganja u akvarijumu, a da pritom ne dođe do stvaranja velike količine mjehurića usljed aeracije. Primijenjene koncentracije dizel goriva, uzete su u odnosu na odabrane koncentracije disperzanta, (pridržavajući se odnosa zapremina 1:20, disperzant : dizel gorivo). Imajući u vidu trajanje, odnosno zadržavanje zagađenja u stvarnim *in situ* uslovima, dobijeno na osnovu evaluacije metoda za ispitivanje toksičnosti naftnih

disperzanata u studiji Barron i Ka'aihue, (2003), odabrali smo period od 72 h kao optimalan za izlaganje u eksperimentima.

### **5.2.1.1. Uticaj dizel goriva i S-25 na srčani ritam dagnji prilikom produženog izlaganja**

U našoj studiji, sve supstance koje su testirane bile su brzo otkrivene pomoću promjene u prosječnoj vrijednosti SR unutar grupe školjki, dok se u čistoj morskoj vodi takve promjene nisu desile.  $\text{CdCl}_2$  (40  $\mu\text{M}$ ) je korišćen kao pozitivna kontrola pošto je ranije zapažen pad SR izazvan istom koncentracijom (Martinović i sar., 2013). Takođe, pokazali smo poremećaj SR kod *M. galloprovincialis*, nastao kao posljedica primjene S-25 i dispergovanog dizel goriva u toku dvosatnog izlaganja (Martinović i sar., 2015a). Niža koncentracija disperzanta  $S_1$  (5  $\mu\text{L/L}$ ) dovela je do blagog povećanja prosječne vrijednosti SR na samom početku tretmana, dok je u studiji Martinović i sar. (2015a), kratkotrajno izlaganje 2,5x manjoj koncentraciji S-25 (2  $\mu\text{L/L}$ ), koja prije tretmana nije bila podvrgnuta mehaničkoj disperziji u morskoj vodi, izazvalo značajan pad SR unutar grupe dagnji. Prema tome, talasi u moru mogu umanjiti uticaj disperzanta na SR dagnje. Uprkos primjeni mehaničke tresilice i razblaživanju u morskoj vodi prije izlaganja, viša koncentracija disperzanta  $S_2$  (50  $\mu\text{L/L}$ ) dovela je do pada prosječne vrijednosti SR unutar grupe školjki. Stres izazvan primjenom  $S_2$  bio je prisutan u toku cijelog perioda izlaganja usljed veoma visoke promjenljivosti SR i SD sve do ispiranja supstance.

Rezultati zagađenja dizel gorivom za dvije ispitivane koncentracije analogni su dejstvu disperzanata.  $D_1$  (100  $\mu\text{L/L}$ ) je izazvala porast nivoa SR od 20%, kasnije nastala promjenljivost SR nije bila velika usljed niže koncentracije. S druge strane,  $D_2$  (1000  $\mu\text{L/L}$ ) je dovela do pada SR koji je praćen značajnim odstupanjima koja bi se mogla pripisati sastojcima dizel goriva. Odgovor SR na koncentraciju  $M_1$  (dizel gorivo 100  $\mu\text{L/L}$  + S-25 5  $\mu\text{L/L}$ ) je pored početnog povećanja doveo do visoke promjenljivosti SR u odnosu na odvojene primjene  $D_1$  (100  $\mu\text{L/L}$ ) i  $S_1$  (5  $\mu\text{L/L}$ ), vjerovatno usljed veće dostupnosti sastojaka dizel goriva školjkama nakon disperzije. Odstupanja SR kod *M. edulis*, kao

odgovor na uticaj zagađenja naftom opisane su kao adaptacija školjki na izlaganje stresu (Bakhmet i sar., 2009).

Smatramo da ostajanje SR na nižim vrijednostima u toku cjelokupnog perioda izlaganja koncentraciji M<sub>2</sub> (dizel gorivo 1000 µL/L + S-25 50 µL/L), praćeno brzim oporavkom nakon ispiranja, ukazuje na nedostatak fiziološkog mehanizma pomoću koga bi se prevazišlo zagađenje dispergovanim dizel gorivom. U ovom slučaju, školjke bi mogle aktivirati druge mehanizme zaštite kao što je smanjenje nivoa filtracije ili zatvaranje ljuštore što može poslužiti kao objašnjenje za neočekivano nisko oštećenje DNK u oba izlaganja sa M<sub>2</sub>, iako je primijenjena visoka koncentracija. Uzajamna reakcija (interferencija) zatvaranja ljuštore i nivoa odgovora, rađena na školjkama *Perna viridis* izloženoj mješavini PAH-ova i hlorovanih pesticida bila je tema proučavanja u studijama Siu i sar. (2004b), kao i u studiji Mersch i sar. (1996) sprovedenoj na *Dreissena polymorpha* pri izlaganju klastogenima. Štaviše, da bi se izbjegle teme povezane sa zatvaranjem ljuštore, u nekim genotoksikološkim studijama, primijenjena je mehanička zaštita zatvaranja ljuštore (Wilson i sar., 1998; Pruski i Dixon, 2002). Međutim, pri izlaganjima D<sub>2</sub> i S<sub>2</sub>, zapažen je oporavak obrasca SR nakon zadržavanja na vrijednostima blizu 9 otk./min. Promjenljivost SR koja se kasnije javila može se smatrati strategijom adaptacije koja za posljedicu ima visok nivo oštećenja DNK dobijen u genotoksikološkim studijama.

### **5.2.1.2 Uticaj dizel goriva i S-25 na nivo oštećenja DNK molekula u hemocitama dagnje prilikom produženog izlaganja**

Za procjenu nivoa oštećenja DNK u hemocitama dagnji koristili smo komet test. Da bi izbjegli moguću interferenciju sa citotoksičnošću (Tice i sar., 2000; Collins, 2004; Lovell i Otori, 2008; Frenzilli i sar., 2009), procijenili smo uticaj izlaganja na preživljavanje hemocita. Ni jedna od testiranih koncentracija S-25, dizel goriva ili mješavina, nije imala značajan uticaj na preživljavanje hemocita što dodatno potvrđuje rezultate dobijene komet testom.

Izlaganje  $\text{CdCl}_2$  korišćeno je kao pozitivna kontrola jer je njegov genotoksični potencijal pokazan i kod drugih akvatičnih organizama (Dabas i sar., 2014; Harabawy i Mosleh, 2014). Na osnovu podataka studije na slatkovodnim školjkama *Unio pictorum* i *Unio tumidus*, kod kojih je doveo do značajnog porasta oštećenja DNK u toku *in vivo* izlaganja (Gačić i sar., 2014) odabrana je koncentraciji od 40  $\mu\text{M}$ .

Naši rezultati ukazuju da su ispitivane koncentracije S-25 (5 i 50  $\mu\text{L/L}$ ), koje su niže od drugih toksičnih koncentracija u literaturi, imale uticaj na nivo oštećenja DNK u hemocitama. U studiji Scarlett i sar. (2005), pokazano je da izlaganje koncentraciji od 250 ppm (250  $\mu\text{L/L}$ ) nije imalo toksično dejstvo kod školjke *M. edulis* ali je dovelo do zatvaranja kapaka ljušture. S-25 je mješavina glikola i rastvarača glikolnih etara, kombinovan sa jonskim i anjonskim površinski aktivnim supstancama (AFI, 2003). Studija Elias i sar. (1996) ukazala je da kratkotrajno izlaganje glikolnim etrima može dovesti do genotoksičnog uticaja kod humanih limfocita, dok je u studiji Aye i sar. (2010) sprovedenoj na ćelijama ovarijuma kineskog hrčka, pokazano da propilen glikol može izazvati oštećenje DNK mjereno komet testom.

Izlaganje dizel gorivu nije dovelo do značajnog povećanja oštećenja DNK sa izuzetkom koncentracije  $D_1$  u prvom eksperimentu. Povećanje frekvencije jedara sa velikim oštećenjem bilo je zapaženo samo za koncentraciju  $D_2$  (1000  $\mu\text{L/L}$ ) i to u drugom eksperimentu ali nisu uočene promjene drugih parametara. Studije Vanzella i sar. (2007) i Santos i sar. (2010) su pokazale da frakcija dizel goriva koja je rastvorljiva u vodi može imati genotoksični potencijal, ali u koncentracijama koje su nekoliko puta više od onih primijenjenih u našoj studiji.

Izlaganje mješavini  $M_1$  dovelo je do povećanja oštećenja DNK u poređenju sa kontrolom, ali i u odnosu na grupe koje su bile izložene  $S_1$  (5  $\mu\text{L/L}$ ) i grupe izlagane  $D_1$  (100  $\mu\text{L/L}$ ). Takođe, zapaženo je i povećanje učestalosti jedara sa velikim oštećenjem. Studija Polli i sar. (2014) pokazala je da je sirova nafta dispergovana hemijskim disperzantima imala veću sposobnost izazivanja apoptoze u polnim ćelijama valjkastog crva *Cenorabdites elegans* u odnosu na odvojenu primjenu sirove nafte i disperzanta. Povećanje toksičnosti sirove nafte dispergovane hemijskim disperzantom uočeno je takođe i kod kalifornijske pastrmke (Ramachandran i sar., 2014). Ovakve studije su pokrenule

temu znatno povećane biodostupnosti policikličnih aromatičnih ugljovodonika (eng. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons – PAH) u vodenoj frakciji kao posljedica upotrebe disperzanata. PAH – ovi su dobro poznati po toksičnim i genotoksičnim svojstvima i zbog toga su prepoznati kao opasne supstance visokog prioriteta u vodenim ekosistemima (Cachot i sar., 2006; Inunza i sar., 2006; Barbee i sar., 2008). Izlaganje mješavini M<sub>2</sub> (dizel gorivo 1000 µL/L + S-25 50 µL/L) nije dovelo do bilo kakvog povećanja parametara komet testa u poređenju sa negativnom kontrolom, što ukazuje na moguću interferenciju sa zatvaranjem kapaka ljuštore, što je moglo imati uticaj na nivo izloženosti životinja ispitivanoj supstanci. Upravo je iz tog razloga praćen SR kao pokazatelj nivoa izloženosti stresu kod dagnji i moguće adaptacije na stres u toku tretmana odabranim jedinjnjima. SR školjki porodice Mytilidae korišćen je kao pokazatelj stresa pri odgovoru na zagađenje mora u studijama koje uključuju više biomarkera (Astley i sar., 1999; Halldórsson i sar., 2008; Turja i sar., 2014). Pad vrijednosti SR praćen zatvaranjem ljuštore *M. galloprovincialis* pri izlaganju zagađivačima pokazan je u studiji Kholodkevich i sar. (2009). Takođe, zatvaranje ljuštore kod iste vrste, uz blokadu ulaznog ili izlaznog sifona, dovelo je do aktivacije anaerobnog metabolizma kao adaptacije na stres (De Vooy, 1991).

Dobijeni rezultati su pokazali da S-25 i dizel gorivo mogu imati štetno dejstvo po mediteransku dagnju. Takođe, naši rezultati pokazuju da zadržavanje SR na nižim vrijednostima i povremeno zatvaranje kapaka ljuštore predstavlja mehanizam zaštite kod morskih školjki koji značajno smanjuje štetno dejstvo u toku kratkotrajnog izlaganja ispitivanim zagađivačima. Dobijeni rezultati pokazuju da je dispergovano dizel gorivo mnogo opasnije za morske organizme.

### **5.2.2. Uticaj TBT-Cl prilikom produženog izlaganja**

Prilikom ispitivanja uticaja produženog izlaganja TBT-Cl, praćenje SR se odvijalo u kontinuitetu 96 h, a promjene u postavci eksperimenta omogućile su uporednu procjenu nivoa stresa na osnovu fizioloških i molekularnih biomarkera na svaka 24 h. Uz komet test koji je korišćen kao osnovni pokazatelj genotoksičnosti, primijenjen je i mikronukleus test radi procjene trajnih oštećenja DNK u hemocitama dagnji. Pored biomarkera dagnje, istom

dinamikom ispitivana je i mutagenost TBT-Cl na prokariotskom modelu *SOS/umuC* testom.

#### **5.2.2.1. Uticaj TBT-Cl na srčani ritam dagnje prilikom produženog izlaganja**

Promjenljivost SR dagnji u čistoj morskoj vodi koja je korišćena kao negativna kontrola, potiče uglavnom od kratkotrajnih ali značajnih smanjenja vrijednosti SR. Pored sličnih smanjenja SR, Bakhmet i Khalaman (2006), opisali su prestanak rada srca plave dagnje u čistoj morskoj vodi bez spoljnog uticaja. Periodi smanjenja SR kod plave dagnje, takođe u čistoj morskoj vodi, poklapaju se sa zatvaranjem ljuštore (Curtis i sar., 2000).

Primjena B(a)P nije uticala na SR školjki na početku tretmana. Jedan od razloga zbog koga B(a)P nije izazvao zapažene promjene SR, mogao bi biti drugačiji način dejstva ovog zagađivača. Bamber i Depledge (1997a) pokazali su da 20 µg/L B(a)P, primijenjeno putem unosa hrane, nije dovelo do poremećaja SR obalnog raka *Carcinus maenas* u toku osmodnevnog izlaganja. Pored toga, studija Halldórsson i sar. (2008), je pokazala da se nakon 3 h tretmana na 100 µg/L B(a)P, SR plavih dagnji, uzorkovanih sa čistih lokaliteta održava na istom nivou.

S obzirom da je 10 µg/L TBT-Cl izazvalo manja odstupanja prosječne vrijednosti SR u odnosu na period predtretmana, smatramo da je to koncentracija koja bi mogla biti blizu praga detekcije na osnovu praćenja promjene obrasca SR dagnji. Na osnovu podataka iz literature, koncentracije TBT niže od 10 µg/L smatraju se visoko toksičnim u vodenoj sredini (Alzieu, 2000).

Kasniji pad SR dagnji do koga je došlo 5h po dodatku 100 µg/L TBT-Cl mogao je nastati usljed nedovoljne i dugotrajne detoksikacije koja se nije mogla obaviti za kratko vrijeme. Međutim, kasnije u toku tretmana došlo je do obnavljanja vrijednosti SR iz predtretmana što ukazuje da školjke imaju sposobnost da održe stabilan SR uprkos značajnoj količini zagađivača.

Pri tretmanu sa 1000 µg/L TBT-Cl, nije došlo do potpunog oporavka SR što može biti posljedica lošeg zdravstvenog stanja školjki uslovljenog ekstremno visokom koncentracijom zagađivača. Značajna bradikardija, zapažena sve do kraja izlaganja

dispergovanim dizel gorivom mogla bi biti posljedica nedostatka fizioloških mehanizama kod školjki koji bi im omogućili da prevaziđu ovakav tip zagađenja (Martinović i sar., 2015b). Promjenljivost SR koja se javila može biti u vezi sa teškim metalom kalajem koji ulazi u sastav TBT-Cl. Prethodne studije ukazale su da promjene obrasca SR mogu biti uslovljene drugim teškim metalima kao što su bakar (Grace i Gainey, 1987; Brown i sar., 2004) i kadmijum (Bakhmet i sar., 2012; Martinović i sar., 2013).

Naši rezultati, dobijeni stalnim praćenjem SR ukazuju da odgovor na stres uslovljen određenom supstancom ne bi trebalo posmatrati isključivo kao povećanje ili smanjenje SR. Odgovor zavisi od primijenjene koncentracije, kao i od uslova životne sredine koji mogu uticati na zdravstveno stanje školjke i dovesti do izmijenjenog odgovora SR na stres.

### **5.2.2.2. Uticaj TBT-Cl na nivo oštećenja DNK molekula u hemocitama dagnji i indukciju mutageneze u prokariotskom modelu prilikom produženog izlaganja**

Podaci o preživljavanju hemocita školjki izlaganih TBT-Cl su potvrdili citotoksični potencijal ove supstance. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa studijom Nakatsu i sar. (2007) koji su pokazali da TBT-Cl u sličnom opsegu koncentracija izaziva citotoksičnost i sposobnost indukcije apoptoze kod pacova u feohromocitoma PC12 ćelijama. Takođe, slični podaci predstavljeni su u studiji Urushibara i sar. (2009), gdje pokazuju da TBT može biti posrednik u ćelijskoj smrti preko kaspazno zavisnih puteva kod kalifornijske pastrmke u RTG-2 ćelijama.

Dejstvo TBT-Cl na subćelijskom nivou otkriveno je pomoću komet i mikronukleus testa. Mikronukleus test predstavlja biomarker efekta i dodat je u ovo istraživanje da bi se odredila trajna oštećenja DNK pod uticajem TBT-Cl, nasuprot komet testu koji je biomarker izlaganja, odnosno ukazuje na trenutne posljedice po strukturu DNK. U savremenoj literaturi dostupni su podaci o genotoksičnom potencijalu TBT koji su dobijeni pod različitim uslovima izlaganja (od 24 h do hroničnog izlaganja u trajanju od četiri mjeseca) za širok spektar organizama. U studiji Morales i sar. (2013), pokazano je da izlaganje larvi Diptera TBT, u trajanju od 24 h, može dovesti do oštećenja DNK u ng/L koncentraciji dok je u studiji Falcioni i sar. (2008) pokazano da izlaganje leukocita pacova

TBT-Cl dovodi do značajnog porasta oštećenja DNK određenog pomoću komet testa. Što se tiče podataka dobijenih kod vodenih organizama, Tiano i sar. (2001) pokazali su jasno genotoksično dejstvo na eritrocite pastrmke, dok su Hagger i sar. (2002) ukazali na genotoksični potencijal TBT određen metodom učestalosti razmjene između sestrinskih hromatida (eng. Sister chromatid exchange – SCE) i citotoksični potencijal TBT kod morskih crva. U studiji Cipriano i sar. (2004), zapaženo je da TBT dovodi do hromozomskih aberacija kod neotropkih riba, dok je studija Micael i sar. (2007) pokazala da TBT dovodi do abnormalnosti jedra kod zebrice *Danio rerio*. Prilikom izlaganja koja smo primijenili, koristili smo širok opseg koncentracija TBT-Cl, počevši sa koncentracijom čije dejstvo nije bilo zapaženo na osnovu proučavanih biomarkera, sve do koncentracija koje su bile letalne u toku 96 h izlaganja.

U studiji Hagger i sar. (2005) TBT oksid doveo je do porasta oštećenja DNK u hemocitama mediteranske dagnje koje je otkriveno pomoću komet testa kao i mikronukleus testa nakon 7 dana izlaganja, ali pri koncentracijama nižim od onih koje smo mi ispitivali primjenom TBT-Cl. Na osnovu nama dostupne literature, samo se studija Kergosien i Rice (1998) bavi uporednim dejstvom TBT oksida i TBT-Cl. U toj studiji, autori su ukazali na značajno višu citotoksičnost TBT oksida u poređenju sa TBT-Cl, koji su proučavani na makrofagama *in vitro* ali mehanizam koji dovodi do razlike, za sad ostaje nepoznat.

Kao mogući pokazatelj apoptoze praćena je frekvencija jedra sa velikim oštećenjem (HH%) na svakoj pločici pripremljenoj za komet test (Hartmann i Speit, 1997). Analiza korelacije, pokazala je da pri izlaganju TBT, postoji bliska veza između oštećenja DNK, apoptoze i citotoksičnosti. Prema studiji Roos i Kaina (2006), nagomilavanje nepopravljenih oštećenja, postepeno dovodi do apoptoze. Dokaz se takođe može naći i u drugim studijama, na primjer studija Châtel i sar. (2011) je pokazala da TBT može biti uzrok oštećenja DNK i apoptoze (mjereno pomoću mikrometode) kod mediteranske dagnje čak i nakon 1 h izlaganja. Okoro i sar. (2015), zapazili su da izlaganje TBT vodi nestabilnosti membrane lizozoma kod hemocita mediteranske dagnje i da je to događaj koji je u bliskom odnosu sa pojavom apoptoze (Johansson i sar., 2010).

U studiji Hamasaki i sar. (1992), mutageni potencijal TBT oksida i TBT-Cl bio je otkriven pomoću *rec* testa (eng. *rec*-assay) ali nije bio potvrđen u SOS hromotestu. Ista



grupa naučnika (Hamasaki i sar. 1993) ukazala je na mutageni potencijal oba jedinjenja u Ejmsovom testu (eng. Ames test) sa sojem TA100. U toku ispitivanja mutagenosti, najveći problem predstavlja snažan antibakterijski potencijal proučavanih jedinjenja i upotreba metaboličke konverzije kao što su sistemi mikrozomalne monoooksigenaze koji vode do dealkilacije ili defenilacije TBT i konverzije u DBT i MBT (Kimmel i sar. 1977). U našem slučaju, podaci koji su dobijeni u SOS/*umuC* testu ukazuju na nedostatak mutagenog potencijala TBT u opsegu ispitivanih koncentracija. Međutim, zapaženo je dozno zavisno smanjenje u ćelijskoj biomasi što ukazuje na citotoksični potencijal TBT.

### 5.2.2.3. Opšte poređenje između primijenjenih biotestova

Ako uporedimo podatke dobijene pomoću testova na genotoksičnost sa podacima o promjenljivosti SR, zapažaju se brojne sličnosti. Iako to nije bilo očekivano, primijetili smo značajnu promjenljivost dHR u kontroli. Sličan trend promjenljivosti nivoa oštećenja DNK otkriven je pomoću komet testa. Trebalo bi uzeti u obzir da školjke nisu hranjene u toku izlaganja i da je izlaganje sprovedeno u uslovima statičkog sistema. Ovakvi uslovi mogu dovesti do taloženja proizvoda metabolizma u akvarijumu, što zajedno sa gladovanjem može usloviti reakciju stresa. Studija Gudimov i sar. (2009) pokazala je da dugotrajno gladovanje *M. edulis* može biti razlog za promjene SR u laboratorijskim uslovima zbog bliskog položaja sistema za varenje i srčanog sistema.

Najveća vrijednost za dHR kod grupa izloženih TBT-Cl zapažena je u toku prvih 48 h izlaganja. Rezultati komet testa pokazali su najveće razlike među izlaganim grupama i njihovim kontrolama u odgovarajućem periodu (prvih 48 h). Prema tome, izlaganje u trajanju od 72 h dovelo je do najveće frekvencije mikronukleusa što ukazuje da se kod tih životinja javilo trajno oštećenje DNK. Kao dodatna potvrda uticaja stresa, kod ovih životinja dHR u periodu nakon izlaganja bio je značajno viši u odnosu na period prije izlaganja.

Ne bi trebalo zanemariti da uprkos dobijenom genotoksičnom potencijalu B(a)P, nije registrovan zapažen odgovor SR. Ovo može ukazati na različitu osjetljivost SR kao

fiziološkog biomarkera u otkrivanju raznih tipova zagađenja, što postavlja temelj našim budućim istraživanjima.

Primijenjena baterija biotestova potvrdila je genotoksični i citotoksični potencijal TBT-Cl u hemocitama mediteranske dagnje. Pri izlaganju TBT-Cl, zapažene su bliske veze između oštećenja DNK, apoptoze i citotoksičnosti. Promjenljivosti SR otkrivene pri tretmanima sa TBT-Cl mogu se povezati sa podacima dobijenim pri genotoksikološkim testovima, što ukazuje da se SR može smatrati pouzdanim fiziološkim biomarkerom za otkrivanje prisustva organokalajnih jedinjenja.

# ZAKLJUČCI

### 6. Zaključci

- Pri kratkotrajnom izlaganju promjenama u salinitetu morske vode potvrđena je sposobnost dagnji da detektuju stres na osnovu srčanog ritma, mjenog fiber-optic metodom. U cilju unaprijeđenja metoda u indikaciji zagađenja mora potrebno je sprovesti dalja testiranja metoda, uz uključivanje različitih morskih mekušaca i rakova, kao i lokaliteta koji su pod uticajem različitih vrsta stresa.
- Pokazano je da prilikom kratkotrajnog tretmana dagnji kadmijum hloridom povećanje koncentracije zagađivača produžava vrijeme potrebno za obnavljanje vrijednosti SR dobijenog u predtretmanu.
- Primjena mehaničke disperzije u morskoj vodi prije tretmana dagnji, ukazuje da bi talasi u moru mogli umanjiti štetan uticaj Superdispersant-25 na srčani ritam školjki.
- Superdispersant-25 dovodi do poremećaja srčanog ritma i genotoksičnosti u hemocitama dagnji što ukazuje da je neophodno ograničiti njegovu primjenu, posebno u djelovima mora koji duboko zalaze u kopno i odlikuju se nižim nivom razmjene vodene mase.
- Visoka promjenljivost obrasca srčanog ritma i porast oštećenja DNK u hemocitama dagnji pri tretmanu dispergovanim dizelom u odnosu na odvojenu primjenu dizela i Superdispersant-25, može se pripisati štetnom dejstvu sastojaka dizel goriva usljed veće dostupnosti školjkama nakon disperzije, što pokazuje da je dispergovani dizel mnogo opasniji za morske organizme.
- Usljed nedostatka fiziološkog mehanizma kojim bi se prevazišlo zagađenje, dugotrajna bradikardija i povremeno zatvaranje kapaka ljuštore predstavljaju mehanizam zaštite kod morskih školjki koji značajno umanjuje štetno dejstvo u toku izlaganja visokim koncentracijama zagađivača.
- Uprkos dobijenom genotoksičnom potencijalu benzo(a)pirena, na osnovu oštećenja DNK u hemocitama, nije registrovan zapažen odgovor srčanog ritma dagnji. Ovo može ukazati na različitu osjetljivost srčanog ritma kao fiziološkog biomarkera u

otkrivanju različitih tipova zagađenja, što predstavlja osnov za naša buduća istraživanja.

- Odgovor srčanog ritma na stres uslovljen određenom supstancom, zavisi od primijenjene koncentracije, kao i od uslova životne sredine koji mogu uticati na zdravstveno stanje školjke i dovesti do izmijenjenog odgovora.
- Promjenljivost srčanog ritma otkrivena pri izlaganju tributil kalaj hloridu može se povezati sa podacima dobijenim u genotoksikološkim testovima, što ukazuje da se srčani ritam može smatrati pouzdanim fiziološkim biomarkerom za otkrivanje prisustva organokalajnih jedinjenja.
- Na osnovu rezultata dobijenih pri kratkotrajnim i produženim tretmanima organskim i neorganskim zagađivačima, može se zaključiti da bi šira primjena srčanog ritma dagnje kao fiziološkog biomarkera unaprijedila integrisani pristup u biomonitoringu zagađenja mora.

# LITERATURA

## 7. Literatura

- Aagaard, A. (1996). In situ variation in heart rate of the shore crab *Carcinus maenas* in relation to environmental factors and physiological condition. *Marine Biology*, 125(4), 765-772.
- Albaigés, J. (2005). Persistent organic pollutants in the Mediterranean Sea. In *The Mediterranean Sea* (pp. 89-149). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Alessandria, I., Pennisi, M., Cataudella, E., Frazzetto, P. M., Malaguarnera, M., Rampello, L., & Rampello, L. (2012). Neurotoxicity in cadmium-exposed workers. *Acta medica mediterranea*, 28, 253.
- Allen, J. (2007). Photoplethysmography and its application in clinical physiological measurement. *Physiological measurement*, 28(3), R1.
- Al-Sabti, K. (1995). An in vitro binucleated blocked hepatic cell technique for genotoxicity testing in fish. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 335(2), 109-120.
- Alzieu, C. (2000). Environmental impact of TBT: the French experience. *Science of the Total Environment*, 258(1), 99-102.
- Antizar-Ladislao, B. (2008). Environmental levels, toxicity and human exposure to tributyltin (TBT)-contaminated marine environment. A review. *Environment international*, 34(2), 292-308.
- Astley, K. N., Meigh, H. C., Glegg, G. A., Braven, J., Depledge, M. H. (1999). Multi-variate analysis of biomarker responses in *Mytilus edulis* and *Carcinus maenas* from the Tees Estuary (UK). *Marine Pollution Bulletin*, 39(1), 145-154.
- Axiak, V., Micallef, D., Muscat, J., Vella, A., Mintoff, B. (2003). Imposex as a biomonitoring tool for marine pollution by tributyltin: some further observations. *Environment International*, 28(8), 743-749.

- Aye, M., Di Giorgio, C., De Mo, M., Botta, A., Perrin, J., Courbiere, B. (2010). Assessment of the genotoxicity of three cryoprotectants used for human oocyte vitrification: dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propylene glycol. *Food and chemical toxicology*, 48(7), 1905-1912.
- Ayles Fernie International (2003) Superdispersant-25 Safety Data Sheet. Kent, UK
- Bakhmet, I. N., Kantserova, N. P., Lysenko, L. A., Nemova, N. N. (2012). Effect of copper and cadmium ions on heart function and calpain activity in blue mussel *Mytilus edulis*. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 47(11), 1528-1535.
- Bakhmet, I. N., Fokina, N. N., Nefedova, Z. A., Nemova, N. N. (2009). Physiological-biochemical properties of blue mussel *Mytilus edulis* adaptation to oil contamination. *Environmental monitoring and assessment*, 155(1), 581-591.
- Bakhmet, I. N., Khalaman. V. V. (2006): Heart rate variation patterns in some representatives of Bivalvia. *Biology Bulletin* 33.3: 276-280.
- Bakhmet, I. N., Berger, V. J., Khalaman, V. V. (2005). The effect of salinity change on the heart rate of *Mytilus edulis* specimens from different ecological zones. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 318(2), 121-126.
- Bamber, S. D., Depledge, M. H. (1997a). Responses of shore crabs to physiological challenges following exposure to selected environmental contaminants. *Aquatic Toxicology*, 40(1), 79-92.
- Bamber, S. D., Depledge, M. H. (1997b). Evaluation of changes in the adaptive physiology of shore crabs (*Carcinus maenas*) as an indicator of pollution in estuarine environments. *Marine Biology*, 129(4), 667-672.
- Barbee, G. C., Barich, J., Duncan, B., Bickham, J. W., Matson, C. W., Hintze, C. J., Autenrieth, R. L., Zhou, G., McDonald, M. J., Cizmas, L., Norton, D., Donnelly K.C. (2008). In situ biomonitoring of PAH-contaminated sediments using juvenile



coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Ecotoxicology and environmental safety*, 71(2), 454-464.

Barnard, S., Bouffler, S., Rothkamm, K. (2013). The shape of the radiation dose response for DNA double-strand break induction and repair. *Genome integrity*, 4(1), 1.

Barron, M. G., Ka'ahue, L. (2003). Critical evaluation of CROSERF test methods for oil dispersant toxicity testing under subarctic conditions. *Marine pollution bulletin*, 46(9), 1191-1199.

Baršienė, J., Schiedek, D., Rybakovas, A., Šyvokienė, J., Kopecka, J., Förlin, L. (2006). Cytogenetic and cytotoxic effects in gill cells of the blue mussel *Mytilus* spp. from different zones of the Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 53(8), 469-478.

Bellafiore, D., Guarnieri, A., Grilli, F., Penna, P., Bortoluzzi, G., Giglio, F., Pinardi, N. (2011). Study of the hydrodynamical processes in the Boka Kotorska Bay with a finite element model. *Dynamics of atmospheres and oceans*, 52(1-2), 298-321.

Bertin, G., Averbeck, D. (2006). Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie*, 88(11), 1549-1559.

Bolognesi, C., Cirillo, S. (2014). Genotoxicity biomarkers in aquatic bioindicators. *Current Zoology*, 60(2), 273-284.

Bolognesi, C., Fenech, M. (2012). Mussel micronucleus cytome assay. *Nature protocols*, 7(6), 1125.

Braby, C. E., Somero, G. N. (2006). Following the heart: temperature and salinity effects on heart rate in native and invasive species of blue mussels (genus *Mytilus*). *Journal of Experimental Biology*, 209(13), 2554-2566.

Brown, R. J., Galloway, T. S., Lowe, D., Browne, M. A., Dissanayake, A., Jones, M. B., Depledge, M. H. (2004). Differential sensitivity of three marine invertebrates to copper assessed using multiple biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 66(3), 267-278.

- Cachot, J., Geffard, O., Augagneur, S., Lacroix, S., Le Menach, K., Peluhet, L., Couteau, J., Denier, X., Devier, M.H., Pottier, D., Budzinski, H. (2006). Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). *Aquatic toxicology*, 79(3), 257-267.
- Champ, M. A., Seligman, P. F. (1996). An introduction to organotin compounds and their use in antifouling coatings. In *Organotin* (pp. 1-25). Springer, Dordrecht.
- Chapman, R. W., Guillette, L. J. (2013). Contaminants and impoSEX: transcriptomics of contaminant-induced sex change. *Molecular ecology*, 22(6), 1485-1487.
- Châtel, A., Hamer, B., Jakšić, Ž., Vucelić, V., Talarmin, H., Dorange, G., Schröder, H.C., Müller, W. E. G. (2011). Induction of apoptosis in mussel *Mytilus galloprovincialis* gills by model cytotoxic agents. *Ecotoxicology*, 20(8), 2030-2041.
- Chelazzi, G., De Pirro, M., Williams, G. A. (2004). Different cardiac response to copper in limpets from metal polluted and clean shores of Hong Kong. *Marine environmental research*, 58(1), 83-93.
- Chen, Y., Chen, H., Wu, Y., Li, Z., Sun, L., Qu, M., Kong, Z. (2007). Toxicity evaluation of Meiliang Bay, Lake Taihu, China—a drinking water source. *Hydrobiologia*, 581(1), 297-303.
- Cipriano, R. R., Ribeiro, C. A. O., Cestari, M. M., Fenocchio, A. S. (2004). Evaluation of the effects of tributyltin (TBT) on chromosomes of the neotropical fish *Astyanax* sp. (Pisces, Tetraodonidae). *Cytologia*, 69(2), 187-190.
- Collins, A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular biotechnology*, 26(3), 249.
- Curtis, T. M., Williamson, R., Depledge, M. H. (2001). The initial mode of action of copper on the cardiac physiology of the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Aquatic toxicology*, 52(1), 29-38.

- Curtis, T. M., Williamson, R., Depledge, M. H. (2000). Simultaneous, long-term monitoring of valve and cardiac activity in the blue mussel *Mytilus edulis* exposed to copper. *Marine Biology*, 136(5), 837-846.
- Curtis, T. M., Depledge, M. H., Williamson, R. (1999). Voltage-activated currents in cardiac myocytes of the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 124(2), 231-241.
- Dabas, A., Nagpure, N. S., Mishra, R. M., Kushwaha, B., Kumar, R., Kumar, P. (2014). Investigation of cadmium-induced genotoxicity and oxidative stress response in indian major carp, *Labeo rohita*. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 20(2), 510-526.
- Dailianis, S., Domouhtsidou, G. P., Raftopoulou, E., Kaloyianni, M., Dimitriadis, V. K. (2003). Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and a signal transduction molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L.), in pollution monitoring. *Marine Environmental Research*, 56(4), 443-470.
- Dallas, L. J., Bean, T. P., Turner, A., Lyons, B. P., Jha, A. N. (2013). Oxidative DNA damage may not mediate Ni-induced genotoxicity in marine mussels: assessment of genotoxic biomarkers and transcriptional responses of key stress genes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 754(1), 22-31.
- Da Ros, L., Moschino, V., Macic, V., Schintu, M. (2011). An ecotoxicological approach for the Boka Kotorska Bay (south-eastern Adriatic Sea): first evaluation of lysosomal responses and metallothionein induction in mussels. *Marine Pollution Bulletin*, 63(5), 326-333.
- De Flora, S., De Renzi, G. P., Camoirano, A., Astengo, M., Basso, C., Znacchi, P., Bennicelli, C. (1985). Genotoxicity assay of oil dispersants in bacteria (mutation, differential lethality, SOS DNA-repair) and yeast (mitotic crossing-over). *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 158(1-2), 19-30.

- DeFur, P. L., Mangum, C. P. (1979). The effects of environmental variables on the heart rates of invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 62(2), 283-294.
- Degobbis, D., Donazzolo, R., Ivancic, I., Pavoni, B. (1986). Nutrient analyses in natural waters: A critical revision. *Annali di Chimica*, 76(5), 179-194.
- Depledge, M. H., Andersen, B. B. (1990). A computer-aided physiological monitoring system for continuous, long-term recording of cardiac activity in selected invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 96(4), 473-477.
- Depledge, M. H. (1984). Photoplethysmography—a non-invasive technique for monitoring heart beat and ventilation rate in decapod crustaceans. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 77(2), 369-371.
- De Voys, C. G. N. (1991). Anaerobic metabolism in sublittoral living *Mytilus galloprovincialis* in the Mediterranean—IV. Role of amino acids in adaptation to low salinities during anaerobiosis and aerobiosis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 100(2), 423-431.
- Dhawan, A., Bajpayee, M., Parmar, D. (2009). Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell biology and toxicology*, 25(1), 5-32.
- Dixon, D. R., Pruski, A. M., Dixon, L. R., Jha, A. N. (2002). Marine invertebrate ecogenotoxicology: a methodological overview. *Mutagenesis*, 17(6), 495-507.
- Domínguez-Ojeda, D., Patrón-Soberano, O. A., Nieto-Navarro, J. T., Robledo-Marengo, M. D. L., Velázquez-Fernández, J. B. (2015). Imposex en *Plicopurpura pansa* (Neogastropoda: Thaididae) en Nayarit y Sinaloa, México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 86(2), 531-534.

- Dwivedi, J., Trombetta, L. D. (2006). Acute toxicity and bioaccumulation of tributyltin in tissues of *Urolophus jamaicensis* (yellow stingray). *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 69(14), 1311-1323.
- Eduljee, G. H. (2001). Budget and Source Inventories. In *Persistent Organic Pollutants* (pp. 1-28). Springer, Boston, MA.
- Elias, Z., Daniere, M. C., Marande, A. M., Poirot, O., Terzetti, F., Schneider, O. (1996). Genotoxic and/or epigenetic effects of some glycol ethers: Results of different short-term tests. *Occupational Hygiene[OCCUP. HYG.]*, 2(1-6).
- Epstein, N., Bak, R. P. M., Rinkevich, B. (2000). Toxicity of third generation dispersants and dispersed Egyptian crude oil on Red Sea coral larvae. *Marine Pollution Bulletin*, 40(6), 497-503.
- European Maritime Safety Agency (2009) Manual on the applicability of oil spill dispersants. <http://www.emsa.europa.eu/opr-documents/item/719-manual-on-the-applicability-of-oil-spill-dispersants.html>
- Falcioni, M. L., Pellei, M., Gabbianelli, R. (2008). Interaction of tributyltin (IV) chloride and a related complex [Bu<sub>3</sub>Sn (LSM)] with rat leukocytes and erythrocytes: effect on DNA and on plasma membrane. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 653(1), 57-62.
- Fedotov, V. P., Zhuravlev, V. L., Khalatov, A. N., Kholodkevich, S. V. (2009). Comparative analysis of heart activity of the crayfish *Pontastacus leptodactylus* by methods of plethysmography and electrocardiography. *Journal of evolutionary biochemistry and physiology*, 45(4), 527.
- Fedotov, V. P., Kholodkevich, S. V., Stochilo, A. G. (2000). Study of contractile activity of the crayfish heart with the aid of a new non-invasive technique. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 36(3), 288-293.

- Fingas, M. (2011). An overview of in-situ burning. In *Oil spill science and technology* (pp. 737-903).
- Frenzilli, G., Nigro, M., Lyons, B. P. (2009). The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 681(1), 80-92.
- Galloway, T. S., Sanger, R. C., Smith, K. L., Fillmann, G., Readman, J. W., Ford, T. E., Depledge, M. H. (2002). Rapid assessment of marine pollution using multiple biomarkers and chemical immunoassays. *Environmental science & technology*, 36(10), 2219-2226.
- Gačić, Z., Kolarević, S., Sunjog, K., Kračun-Kolarević, M., Paunović, M., Knežević-Vukčević, J., Vuković-Gačić, B. (2014). The impact of in vivo and in vitro exposure to base analogue 5-FU on the level of DNA damage in haemocytes of freshwater mussels *Unio pictorum* and *Unio tumidus*. *Environmental Pollution*, 191, 145-150.
- GESAMP (Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution) (1993). Impact of oil and related chemicals and wastes on the marine environment. Reports and Studies of GESAMP 50:1–180.
- Goldberg, E. D. (1986). TBT: an environmental dilemma. *Environment: Science and Policy for Sustainable Development*, 28(8), 17-44.
- Grace, A. L., Gainey, L. F. (1987). The effects of copper on the heart rate and filtration rate of *Mytilus edulis*. *Marine pollution bulletin*, 18(2), 87-91.
- Gudimov, A. V. (2009). Cardiac activity and behavior of blue mussels from the Barents Sea under controlled conditions. In *Doklady Biological Sciences* (Vol. 427, No. 1, pp. 335-338). MAIK Nauka/Interperiodica.
- Hagger, J. A., Lowe, D., Dissanayake, A., Jones, M. B., Galloway, T. S. (2010). The influence of seasonality on biomarker responses in *Mytilus edulis*. *Ecotoxicology*, 19(5), 953-962.

- Hagger, J. A., Depledge, M. H., Galloway, T. S. (2005). Toxicity of tributyltin in the marine mollusc *Mytilus edulis*. *Marine Pollution Bulletin*, 51(8), 811-816.
- Hagger, J. A., Fisher, A. S., Hill, S. J., Depledge, M. H., Jha, A. N. (2002). Genotoxic, cytotoxic and ontogenetic effects of tri-n-butyltin on the marine worm, *Platynereis dumerilii* (Polychaeta: Nereidae). *Aquatic Toxicology*, 57(4), 243-255.
- Halldórsson, H. P., De Pirro, M., Romano, C., Svavarsson, J., Sarà, G. (2008). Immediate biomarker responses to benzo [a] pyrene in polluted and unpolluted populations of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.) at high-latitudes. *Environment international*, 34(4), 483-489.
- Hamasaki, T., Sato, T., Nagase, H., Kito, H. (1992). The genotoxicity of organotin compounds in SOS chromotest and rec-assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 280(3), 195-203.
- Hamasaki, T., Sato, T., Nagase, H., Kito, H. (1993). The mutagenicity of organotin compounds as environmental pollutants. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 300(3), 265-271.
- Harabawy, A. S., Mosleh, Y. Y. (2014). The role of vitamins A, C, E and selenium as antioxidants against genotoxicity and cytotoxicity of cadmium, copper, lead and zinc on erythrocytes of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 104, 28-35.
- Hartmann, A., Speit, G. (1997). The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicology letters*, 90(2), 183-188.
- Héberger, K., Kolarević, S., Kračun-Kolarević, M., Sunjog, K., Gačić, Z., Kljajić, Z., Mitrić, M., Vuković-Gačić, B. (2014). Evaluation of single-cell gel electrophoresis data: Combination of variance analysis with sum of ranking differences. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 771, 15-22.

- Helm, M. M., Trueman, E. R. (1967). The effect of exposure on the heart rate of the mussel, *Mytilus edulis* L. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 21(1), 171-177.
- Hideo, S., Takeshi, K., Tsuneo, I., Kozo, M., Atsuo, N. (1983). Cloning and characterization of the umu operon responsible for inducible mutagenesis in *Escherichia coli*. *Gene*, 23(2), 167-174.
- Hylland, K. (2006). Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) ecotoxicology in marine ecosystems. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 69(1-2), 109-123.
- Inzunza, B., Orrego, R., Peñalosa, M., Gavilán, J. F., Barra, R. (2006). Analysis of CYP4501A1, PAHs metabolites in bile, and genotoxic damage in *Oncorhynchus mykiss* exposed to Biobío River sediments, Central Chile. *Ecotoxicology and environmental safety*, 65(2), 242-251.
- ISO/CD, 13829, 2000. Water quality – determination of the genotoxicity of water and waste water using umu-test
- Iwata, H., Tanabe, S., Mizuno, T., Tatsukawa, R. (1995). High accumulation of toxic butyltins in marine mammals from Japanese coastal waters. *Environmental science & technology*, 29(12), 2959-2962.
- Jakimska, A., Konieczka, P., Skóra, K., Namieśnik, J. (2011). Bioaccumulation of Metals in Tissues of Marine Animals, Part I: the Role and Impact of Heavy Metals on Organisms. *Polish Journal of Environmental Studies*, 20(5).
- Jha, A. N. (2008). Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis*, 23(3), 207-221.
- Johansson, A. C., Appelqvist, H., Nilsson, C., Kågedal, K., Roberg, K., Öllinger, K. (2010). Regulation of apoptosis-associated lysosomal membrane permeabilization. *Apoptosis*, 15(5), 527-540.



- Jovanović, J., Kolarević, S., Milošković, A., Radojković, N., Simić, V., Dojčinović, B., Kračun-Kolarević, M., Paunović, M., Kostić J., Sunjog, K., Timilijić, J., Djordjević, J., Gačić, Z., Žegura, B., Vuković-Gačić, B. (2017). Evaluation of genotoxic potential in the Velika Morava River Basin in vitro and in situ. *Science of The Total Environment*.
- Juhasz, A. L., Naidu, R. (2000). Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo [a] pyrene. *International biodeterioration & biodegradation*, 45(1-2), 57-88.
- Kergosien, D. H., Rice, C. D. (1998). Macrophage secretory function is enhanced by low doses of tributyltin-oxide (TBTO), but not tributyltin-chloride (TBTCl). *Archives of environmental contamination and toxicology*, 34(3), 223-228.
- Kholodkevich, S. V., Kuznetsova, T. V., Sharov, A. N., Kurakin, A. S., Lips, U., Kolesova, N., Lehtonen, K. K. (2017). Applicability of a bioelectronic cardiac monitoring system for the detection of biological effects of pollution in bioindicator species in the Gulf of Finland. *Journal of Marine Systems*, 171, 151-158.
- Kholodkevich, S. V., Ivanov, A. V., Kornienko, E. L., Kurakin, A. S. (2013). *U.S. Patent No. 8,442,809*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Kholodkevich, S. V., Kuznetsova, T. V., Lehtonen, K. K., Kurakin, A. S. (2011). Experiences on ecological status assessment of the Gulf of Bothnia different sites based on cardiac activity biomarkers of caged mussels (*Mytilus edulis*). In *ICES Annual Science Conference* (pp. 19-23).
- Kholodkevich, S. V., Kuznetsova, T. V., Trusevich, V. V., Kurakin, A. S., Ivanov, A. V. (2009). Peculiarities of valve movement and of cardiac activity of the bivalve mollusc *Mytilus galloprovincialis* at various stress actions. *Journal of evolutionary biochemistry and physiology*, 45(4), 524-526.

- Kholodkevich, S. V., Ivanov, A. V., Kurakin, A. S., Kornienko, E. L., Fedotov, V. P. (2008). Real time biomonitoring of surface water toxicity level at water supply stations. *Environmental Bioindicators*, 3(1), 23-34.
- Kimmel, E. C., Fish, R. H., Casida, J. E. (1977). Bioorganotin chemistry. Metabolism of organotin compounds in microsomal monooxygenase systems and in mammals. *Journal of agricultural and food chemistry*, 25(1), 1-9.
- Kolarević, S. M. (2014). *Primena komet testa na slatkovodnim školjkama Unio pictorum (Linnaeus, 1758), Unio tumidus (Philipsson, 1788) i Sinanodonta woodiana (Lea, 1834) u ekogenotoksikološkoj proceni akvatičnih ekosistema* (Doctoral dissertation, Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet).
- Kolarević, S., Knežević-Vukčević, J., Paunović, M., Kračun, M., Vasiljević, B., Tomović, J., Vuković-Gačić, B., Gačić, Z. (2013). Monitoring of DNA damage in haemocytes of freshwater mussel *Sinanodonta woodiana* sampled from the Velika Morava River in Serbia with the comet assay. *Chemosphere*, 93(2), 243-251.
- Koukouzika, N., Dimitriadis, V. K. (2008). Aspects of the usefulness of five marine pollution biomarkers, with emphasis on MN and lipid content. *Marine Pollution Bulletin*, 56(5), 941-949.
- Krivokapić, S., Pestorić, B., Drakulović, D. (2011). Temporal variability of nutrients and chlorophyll a in the Boka Kotorska Bay, Eastern Adriatic Sea. *Ecohydrology & Hydrobiology*, 11(1-2), 97-103.
- Krivokapić, S., Stanković, Ž., Vuksanović, N. (2009). Seasonal variations of phytoplankton biomass and environmental conditions in the inner Boka Kotorska Bay (eastern Adriatic Sea). *Acta Botanica Croatica*, 68(1.), 45-55.
- Kuwasawa, K., Hill, R. (1997). Evidence for cholinergic inhibitory and serotonergic excitatory neuromuscular transmission in the heart of the bivalve *Mercenaria mercenaria*. *Journal of Experimental Biology*, 200(15), 2123-2135.

- La Farre, M., Pérez, S., Kantiani, L., Barceló, D. (2008). Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 27(11), 991-1007.
- Lannig, G., Cherkasov, A. S., Pörtner, H. O., Bock, C., Sokolova, I. M. (2008). Cadmium-dependent oxygen limitation affects temperature tolerance in eastern oysters (*Crassostrea virginica* Gmelin). *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 294(4), R1338-R1346.
- Lee, R. F., Steinert, S. (2003). Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 544(1), 43-64.
- Leroy, T. (1996). Evaluation of three methods for the detection of DNA single-strand breaks in human lymphocytes: alkaline elution, nick translation, and single-cell gel electrophoresis. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 47(5), 409-422.
- Li, Z. H., Li, P., Shi, Z. C. (2015). Chronic exposure to tributyltin induces brain functional damage in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). *PloS one*, 10(4), e0123091.
- Lionetto, M. G., Caricato, R., Giordano, M. E., Pascariello, M. F., Marinosci, L., Schettino, T. (2003). Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. *Marine Pollution Bulletin*, 46(3), 324-330.
- Lovell, D. P., Omori, T. (2008). Statistical issues in the use of the comet assay. *Mutagenesis*, 23(3), 171-182.
- Luch, A. (2005). Polycyclic aromatic hydrocarbon-induced carcinogenesis—an introduction. In *The carcinogenic effects of polycyclic aromatic hydrocarbons* (pp. 1-18).
- Magni, P., De Falco, G., Falugi, C., Franzoni, M., Monteverde, M., Perrone, E., Sgro, M., Bolognesi, C. (2006). Genotoxicity biomarkers and acetylcholinesterase activity in

natural populations of *Mytilus galloprovincialis* along a pollution gradient in the Gulf of Oristano (Sardinia, western Mediterranean). *Environmental pollution*, 142(1), 65-72.

Martinović, R., Kolarević, S., Kračun-Kolarević, M., Kostić, J., Jokanović, S., Gačić, Z., Joksimović, D., Đurović, M., Kljajić, Z., Vuković-Gačić, B. (2016). Comparative assessment of cardiac activity and DNA damage in haemocytes of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* in exposure to tributyltin chloride. *Environmental toxicology and pharmacology*, 47, 165-174.

Martinović, R., Gačić, Z., Kljajić, Z. (2015a). The Influence of Oil, Dispersed Oil and the Oil Dispersant SD-25, on the Heart Rate of the Mediterranean Mussel (*Mytilus galloprovincialis* L.). In *Sustainable Development of Sea-Corridors and Coastal Waters* (pp. 21-27). Springer International Publishing.

Martinović, R., Kolarević, S., Kračun-Kolarević, M., Kostić, J., Marković, S., Gačić, Z., Kljajić, Z., Vuković-Gačić, B. (2015b). Genotoxic potential and heart rate disorders in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to Superdispersant-25 and dispersed diesel oil. *Marine environmental research*, 108, 83-90.

Martinović, R., Gačić Z., Kljajić Z. (2013). Heart rate changes of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis* L.) induced by cadmium. *Studia Marina* 26(1):111–118.

Matthiessen, P., Gibbs, P. E. (1998). Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. *Environmental toxicology and chemistry*, 17(1), 37-43.

Mersch, J., Beauvais, M. N., Nagel, P. (1996). Induction of micronuclei in haemocytes and gill cells of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, exposed to clastogens. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 371(1-2), 47-55.

Micael, J., Reis-Henriques, M. A., Carvalho, A. P., Santos, M. M. (2007). Genotoxic effects of binary mixtures of xenoandrogens (tributyltin, triphenyltin) and a

- xenoestrogen (ethinylestradiol) in a partial life-cycle test with Zebrafish (*Danio rerio*). *Environment international*, 33(8), 1035-1039.
- Morales, M., Martínez-Paz, P., Ozáez, I., Martínez-Guitarte, J. L., Morcillo, G. (2013). DNA damage and transcriptional changes induced by tributyltin (TBT) after short in vivo exposures of *Chironomus riparius* (Diptera) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 158(2), 57-63.
- Moschino, V., Delaney, E., Meneghetti, F., Da Ros, L. (2011). Biomonitoring approach with mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) and clam *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850) in the Lagoon of Venice. *Environmental monitoring and assessment*, 177(1-4), 649-663.
- Nakatsu, Y., Kotake, Y., Ohta, S. (2007). Concentration dependence of the mechanisms of tributyltin-induced apoptosis. *Toxicological sciences*, 97(2), 438-447.
- Nicholson, S. (2003). Tachycardia in the mussel, *Perna viridis*(Mytilidae) on exposure to tributyltin antifouling paint. *Australasian Journal of Ecotoxicology*, 9(2), 137-140.
- Oda, Y. (2016). Development and progress for three decades in umu test systems. *Genes and Environment*, 38(1), 24.
- Oda, Y., Nakamura, S. I., Oki, I., Kato, T., Shinagawa, H. (1985). Evaluation of the new system (umu-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 147(5), 219-229.
- Oil slick dispersants ltd (2014) Application rates and techniques. <http://www.oilslickdispersants.co.uk/oil-slick-dispersant-application-techniques.php>
- Okoro, H. K., Snyman, R. G., Fatoki, O. S., Adekola, F. A., Ximba, B. J., Slabber, M. Y. (2015). Lysosomal Membrane Stability of the Mussel, *Mytilus galloprovincialis* (L.), as a Biomarker of Tributyltin Exposure. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 94(5), 609-613.

- Parsons T. R., Maita Y., Lalli C. M. (1985) A manual of chemical and biological methods for seawater analysis. Pergamon Press, New York. pp 173.
- Pavlica, M., Klobučar, G. I., Vetma, N., Erben, R., Papeš, D. (2000). Detection of micronuclei in haemocytes of zebra mussel and great ramshorn snail exposed to pentachlorophenol. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 465(1), 145-150.
- Picado, A., Bebianno, M. J., Costa, M. H., Ferreira, A., Vale, C. (2007). Biomarkers: a strategic tool in the assessment of environmental quality of coastal waters. *Hydrobiologia*, 587(1), 79.
- Polli, J. R., Zhang, Y., Pan, X. (2014). Dispersed crude oil amplifies germ cell apoptosis in *Caenorhabditis elegans*, followed a CEP-1-dependent pathway. *Archives of toxicology*, 88(3), 543-551.
- Potters, G. (2013). Marine Pollution. *Dr. Geert Potters & bookboon. com*.
- Prusina, I., Sarà, G., De Pirro, M., Dong, Y. W., Han, G. D., Glamuzina, B., Williams, G. A. (2014). Variations in physiological responses to thermal stress in congeneric limpets in the Mediterranean Sea. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 456, 34-40.
- Pruski, A. M., Dixon, D. R. (2002). Effects of cadmium on nuclear integrity and DNA repair efficiency in the gill cells of *Mytilus edulis* L. *Aquatic Toxicology*, 57(3), 127-137.
- Rainbow, P. S. (1985). The biology of heavy metals in the sea. *International Journal of Environmental Studies*, 25(3), 195-211.
- Ramachandran, S. D., Hodson, P. V., Khan, C. W., Lee, K. (2004). Oil dispersant increases PAH uptake by fish exposed to crude oil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59(3), 300-308.

- Regoli, L., Chan, H. M., de Lafontaine, Y., Mikaelian, I. (2001). Organotins in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and sediments of the Quebec City Harbour area of the St. Lawrence River. *Aquatic toxicology*, 53(2), 115-126.
- Regoli, F., Frenzilli, G., Bocchetti, R., Annarumma, F., Scarcelli, V., Fattorini, D., Nigro, M. (2004). Time-course variations of oxyradical metabolism, DNA integrity and lysosomal stability in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment. *Aquatic toxicology*, 68(2), 167-178.
- Roos, W. P., Kaina, B. (2006). DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends in molecular medicine*, 12(9), 440-450.
- Santos, C. A., Novaes, L. S., Gomes, L. C. (2010). Genotoxic effects of the diesel water-soluble fraction on the seahorse *Hippocampus reidi* (Teleostei: Syngnathidae) during acute exposure. *Zoologia (Curitiba)*, 27(6), 956-960.
- Sarà, G., De Pirro, M. (2011). Heart beat rate adaptations to varying salinity of two intertidal Mediterranean bivalves: the invasive *Brachidontes pharaonis* and the native *Mytilaster minimus*. *Italian journal of zoology*, 78(2), 193-197.
- Scarlett, A., Galloway, T. S., Canty, M., Smith, E. L., Nilsson, J., Rowland, S. J. (2005). Comparative toxicity of two oil dispersants, superdispersant-25 and corexit 9527, to a range of coastal species. *Environmental toxicology and chemistry*, 24(5), 1219-1227.
- Schmidt-Etkin, D. (2011). Spill occurrences: a world overview. In *Oil spill science and technology* (pp. 7-48).
- Schuwert, P. M., Lewis, J. W., Jones, P. W. (2007). Interactive cellular and physiological responses of the freshwater crab *Potamonautes warreni* to cadmium and microbial gill infestations. *Ecotoxicology and environmental safety*, 67(2), 302-310.

- Seo, E., Ohishi, K., Maruyama, T., Imaizumi-Ohashi, Y., Murakami, M., Seo, Y. (2014). Testing the constant-volume hypothesis by magnetic resonance imaging of *Mytilus galloprovincialis* heart. *Journal of Experimental Biology*, 217(6), 964-973.
- Shugart, L. R. (1995). Environmental genotoxicology. *Aquatic toxicology. Effects, environmental fate, and risk assessment*. North Palm Beach: Taylor & Francis, 405-419.
- Singh, N. P., Stephens, R. E., Singh, H., Lai, H. (1999). Visual quantification of DNA double-strand breaks in bacteria. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 429(2), 159-168.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*, 175(1), 184-191.
- Siu, W. H. L., Cao, J., Jack, R. W., Wu, R. S. S., Richardson, B. J., Xu, L., Lam, P. K. S. (2004a). Application of the comet and micronucleus assays to the detection of B [a] P genotoxicity in haemocytes of the green-lipped mussel (*Perna viridis*). *Aquatic Toxicology*, 66(4), 381-392.
- Siu, W. H., Mak, E., Cao, J., Luca-Abbott, D., Sharon, B., Richardson, B. J., Lam, P. K. (2004b). Micronucleus induction in gill cells of green-lipped mussels (*Perna viridis*) exposed to mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons and chlorinated pesticides. *Environmental toxicology and chemistry*, 23(5), 1317-1325.
- Smith, V. H., Schindler, D. W. (2009). Eutrophication science: where do we go from here?. *Trends in ecology & evolution*, 24(4), 201-207.
- Sosnowska, D., Richardson, C., Sonntag, W. E., Csiszar, A., Ungvari, Z., Ridgway, I. (2013). A heart that beats for 500 years: age-related changes in cardiac proteasome activity, oxidative protein damage and expression of heat shock proteins, inflammatory factors, and mitochondrial complexes in *Arctica islandica*, the



longest-living noncolonial animal. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, glt201.

Spada, L., Annicchiarico, C., Cardellicchio, N., Giandomenico, S., Di Leo, A. (2013). Heavy metals monitoring in mussels *Mytilus galloprovincialis* from the Apulian coasts (Southern Italy). *Mediterranean Marine Science*, 14(1), 99-108.

Strober, W. (2001). Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current protocols in immunology*, A3-B.

Styrishave, B., Andersen, O., Depledge, M. H. (2003). In situ monitoring of heart rates in shore crabs *Carcinus maenas* in two tidal estuaries: effects of physico-chemical parameters on tidal and diel rhythms. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 36(3), 161-175.

Squier, M. K., Cohen, J. J. (2001). Standard quantitative assays for apoptosis. *Molecular biotechnology*, 19(3), 305-312.

Sunjog, K., Kolarević, S., Kračun-Kolarević, M., Gačić, Z., Skorić, S., Đikanović, V., Lenhardt, M., Vuković-Gačić, B. (2014). Variability in DNA damage of chub (*Squalius cephalus* L.) blood, gill and liver cells during the annual cycle. *Environmental toxicology and pharmacology*, 37(3), 967-974.

Štraser, A., Filipič, M., Žegura, B. (2011). Genotoxic effects of the cyanobacterial hepatotoxin cylindrospermopsin in the HepG2 cell line. *Archives of toxicology*, 85(12), 1617-1626.

Tamura, T., Maeda, Y., Sekine, M., Yoshida, M. (2014). Wearable photoplethysmographic sensors—past and present. *Electronics*, 3(2), 282-302.

Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, R.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(3), 206-221.

- Tiano, L., Fedeli, D., Moretti, M., Falcioni, G. (2001). DNA damage induced by organotin on trout-nucleated erythrocytes. *Applied organometallic chemistry*, 15(7), 575-580.
- Turja, R., Höher, N., Snoeijs, P., Baršienė, J., Butrimavičienė, L., Kuznetsova, T., Kholodkevich, S.V., Devier, M.H., Budzinski, H., Lehtonen, K. K. (2014). A multibiomarker approach to the assessment of pollution impacts in two Baltic Sea coastal areas in Sweden using caged mussels (*Mytilus trossulus*). *Science of The Total Environment*, 473, 398-409.
- Urushibara, N., Mitsuhashi, S., Sasaki, T., Kasai, H., Yoshimizu, M., Fujita, H., Oda, A. (2009). JNK and p38 MAPK are independently involved in tributyltin-mediated cell death in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) RTG-2 cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 149(4), 468-475.
- Vanzella, T. P., Martinez, C. B. R., Cólus, I. M. S. (2007). Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 631(1), 36-43.
- Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M. J., Valavanidis, A. (2007). Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. *Marine Pollution Bulletin*, 54(9), 1361-1371.
- Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B., Beyersmann, D. (2003). Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology*, 192(2-3), 95-117.
- Wells, P. G. (1984). The toxicity of oil spill dispersants to marine organisms: a current perspective. In *Oil Spill Chemical Dispersants: Research, Experience, and Recommendations*. ASTM International.
- Wilson, J. T., Pascoe, P. L., Parry, J. M., Dixon, D. R. (1998). Evaluation of the comet assay as a method for the detection of DNA damage in the cells of a marine

invertebrate, *Mytilus edulis* L.(Mollusca: Pelecypoda). *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 399(1), 87-95.

Wise, J., Wise, J. P. (2011). A review of the toxicity of chemical dispersants. *Reviews on environmental health*, 26(4), 281-300.

Wise, C. F., Wise, J. T., Wise, S. S., Thompson, W. D., Wise, J. P. (2014). Chemical dispersants used in the Gulf of Mexico oil crisis are cytotoxic and genotoxic to sperm whale skin cells. *Aquatic toxicology*, 152, 335-340.

Wu, L., Chen, Z., Zhu, J., Hu, L., Huang, X., Shi, H. (2014). Developmental toxicity of organotin compounds in animals. *Frontiers in Marine Science*, 1, 39.

Yu, H. (2002). Environmental carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons: photochemistry and phototoxicity. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 20(2), 149-183.

Zhang, J., Zuo, Z., Chen, R., Chen, Y., Wang, C. (2008). Tributyltin exposure causes brain damage in *Sebastiscus marmoratus*. *Chemosphere*, 73(3), 337-343.

Žegura, B., Heath, E., Černoša, A., Filipič, M. (2009). Combination of in vitro bioassays for the determination of cytotoxic and genotoxic potential of wastewater, surface water and drinking water samples. *Chemosphere*, 75(11), 1453-1460.

## BIOGRAFIJA

Rajko Martinović je rođen 18.07.1983. godine na Cetinju, Crna Gora. Osnovnu školu i gimnaziju završio je u Budvi. Na Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisao se školske 2002/03, a diplomirao 2012. Diplomski rad pod nazivom „Tektni neuroni riba (*Carassius gibelio*, *Perca fluviatilis* i *Squalius cephalus*)“, uradio je na Institutu za multidisciplinarnu studiju u Beogradu, pod rukovodstvom dr Zorana Gačića. Školske 2012/13 godine upisao je doktorske studije na istom fakultetu, modul Neurobiologija, podmodul Neurofiziologija od ćelije do ponašanja, koji organizuje katedra za Opštu fiziologiju i biofiziku.

Od juna 2012. radi kao pripravnik u Institutu za biologiju mora u Kotoru, Univerziteta Crne Gore. Nakon pripravničkog staža, uporedo sa volonterskim radom u istoj instituciji, radio je kao nastavnik bioloških predmeta u osnovnoj školi. Od septembra 2015. zaposlen je kao saradnik u istraživanju na Institutu za biologiju mora. U periodu od 2012–2016 učestvovao je realizaciji naučno-istraživačkih projekata Ministarstva nauke Crne Gore, „KOTOR – Kompleksno istraživanje ekosistema obalnog mora Crne Gore“ i bilateralnog projekta između Crne Gore i Austrije „Ispitivanje dejstva različitih neuroaktivnih supstanci na srčanu aktivnost dagnje (*Mytilus galloprovincialis* L.). Od 2016. učestvuje u realizaciji međunarodnog projekta „The study, protection and possible breeding of pen shell *Pinna nobilis* in the Bokakotorska Bay“, podržanog od Fondacije Princ Albert II iz Monaka.

Godine 2013. Rajko Martinović je dobio stipendiju Njemačke službe za akademsku razmjenu (DAAD) za učešće na kursu neurobiologije: „*In Vivo* and *In Vitro* Physiology of Neurons“ održanom 2013. u Lajpcigu, Njemačka, a 2016. stipendiju Međunarodne agencije za atomsku energiju (IAEA) za učešće na kursu „MED POL Training course on the analysis of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in environmental samples“ održanom u Monaku. Do sada je objavio 6 naučnih radova, 3 poglavlja u monografijama od međunarodnog značaja i 10 saopštenja na naučnim skupovima u zemlji i inostranstvu.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани Рајко Мартиновић

број индекса Б3051/2012

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Промјенљивост срчаног ритма и оштећење ДНК у хемотитама код медитеранске дагње *Mytilus galloprovincialis* L. као биомаркери загађења мора

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Рајко Мартиновић

Број индекса Б3051/2012

Студијски програм биологија

Наслов рада Промјенљивост срчаног ритма и оштећење ДНК у хемотама код медитеранске дагње *Mytilus galloprovincialis* L. као биомаркери загађења мора

Ментор Др Зоран Гачић

Потписани Рајко Мартиновић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

### Прилог 3.

#### Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Промјенљивост срчаног ритма и оштећење ДНК у хемоцитима код медитеранске дагње *Mytilus galloprovincialis* L. као биомаркери загађења мора

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.