

PRIMJENA MIKRONUKLEUSNOG TESTA U AKTUALNIM IHTIOLOŠKIM ISTRAŽIVANJIMA

V. Mijat

Sažetak

U ovom je radu iznesen pregled najnovijih ihtioloških istraživanja u kojima se autori služe tzv. mikronukleusnim testom. Test se u znanstvenoj literaturi spominje već čitav niz godina kao jedno od osnovnih sredstava za utvrđivanje oštećenja na DNK organizma-modela. Znanstvenici se njime koriste radi dokazivanja genotoksičnih utjecaja različitih tvari na organizme, u ovom slučaju hidrobionte.

Ključne riječi: mikronukleus, genotoksičnost, ekotoksikologija, mutageneza, citotoksikologija, ihtiologija.

UVOD

U današnje vrijeme brzog rasta ljudske populacije, širenja gradova, te industrijalizacije, onečišćenje je sve veći problem našega društva. Jedno od najugroženijih prirodnih staništa jesu vodeni ekosustavi. Vode tekućice i stajaćice akumuliraju i transportiraju štetne tvari koje u njih dospjevaju: iz industrijskih ispusnih voda (metalska, kemijska, tekstilna, papirna i dr.), iz poljoprivrednih tala zbog prekomjerne upotrebe zaštitnih sredstava (pesticidi i herbicidi), te iz drugih izvora. U SAD-u su prethodno provedena istraživanja pokazala da oko 30% industrijskih ispusnih voda sadrži genotoksične tvari (Kohlpoth i sur., 1999). U 2002. godini američka je agencija *Toxic Release Inventory* zabilježila ispuštanje 105 210 tona otrovnih tvari izravno u rijeke, jezera i more (Chen i White, 2004). Samo je štetni utjecaj tekstilne industrije enorman, ponajprije zbog velike količine ispusnih voda koje stvara, te kompleksnog sastava tih voda. Ispusne vode tekstilne industrije mogu sadržavati: anorganske tvari, polimere, organske nusproizvode, boje za tekstil, tvari za zgušnjavanje. Dvoje turskih znanstvenika dokazalo je godine 2003. postojanje pozitivne korelacije između frekvencije mikronukleusa i količine ispusne vode iz tekstilne industrije kakvoj su bile podvrgnute eksperimentalne

Vesna Mijat, dipl. ing., Biomax d. o. o., Perjavička putina 5, Zagreb, vmijat@waitrose.com

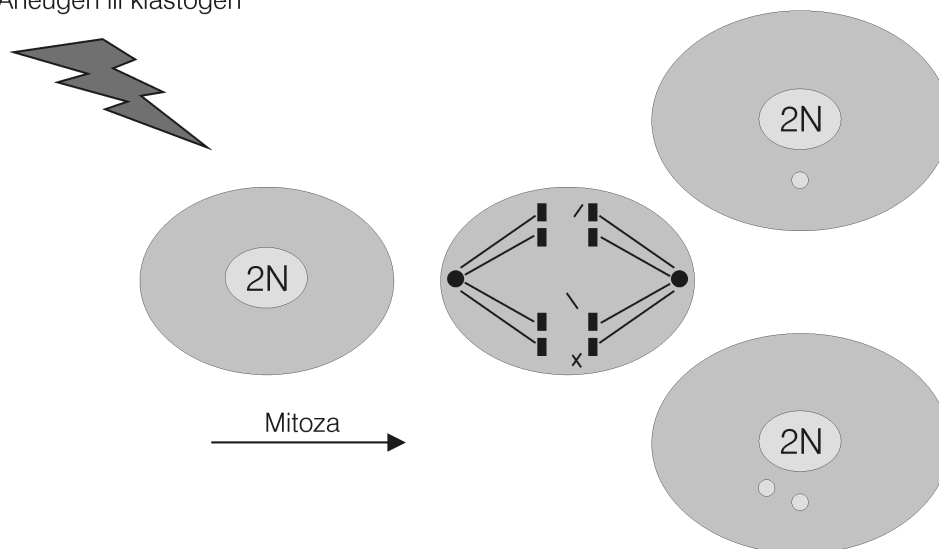
životinje (Çavaş i Ergene-Gözükara, 2003). Kabil Al-Sabti je u svojem radu dokazao povezanost između broja mikronukleusa kod riba i doze tekstilne boje *Chlorotriazine Reactive Azo Red 120* koju su te ribe primile (Al-Sabti, 2000). Također je poznato da su pesticidi vrlo štetne tvari za vodene ekosustave jer uzrokuju stvaranje genotoksičnih promjena na stanicama vodenih organizama (Koppe Grisolia, 2002). Potvrđen je utjecaj pesticida PCP-a (pentaklorofenol) i 2,4 D (2,4 diklorofenoksi octena kiselina) na pojavu mikronukleusa u riba (Abul Farah i sur., 2003; Ateeq i sur., 2002). U današnje se vrijeme obrađuje i problematika potencijalnog genotoksičnog djelovanja raznih insekticida na vodene organizme, pa je tako i potvrđena genotoksičnost piretroida lambda-cihalotrina (Çavaş i Ergene-Gözükara, 2003a). Industrija se koristi vodom ne samo kao izvorom energije nego i kao pogodnim medijem u koji se ispuštaju svi nusproizvodi prerade i proizvodnje. Poznato je da mnogi dugotrajni organski onečišćivači mogu uzrokovati nakupljanje štetnih tvari u tijelu hidrobionata i eventualno stvaranje ozbiljnih kroničnih bolesti. Zbog akumulacije otrovnih tvari njihova koncentracija u tijelu vodenih organizama može biti i višestruko veća nego u samoj vodi u kojoj taj organizam obitava. Zbog toga se često, radi utvrđivanja stupnja onečišćenja u rijekama, promatraju promjene u koncentraciji PCB-a (polikloriranih bifenila), dioksina i teških metala (žive i olova) putem uzorkovanja ribljeg tkiva. Nadalje, već je otprije poznato da industrijska onečišćenja mogu uzrokovati genotoksične učinke koji se očituju u promjenama na strukturi DNA. Spomenute promjene na DNK mogu inducirati mutagenezu (promjenu genetske informacije), teratogenezu (razvojne malformacije), klastogenezu (cijepanje kromosoma) i karcinogenezu (rak ili neoplaziju), (Si u i sur., 2004). Posljedice utjecaja genotoksina na organizme mogu se očitovati i u: smanjenju broja gameta, slabijoj plodnosti, razvojnim anomalijama, pojavi tumora, letalnim mutacijama (Diekmann i sur., 2004). Zbog ovakvih višestrukih štetnih utjecaja koje genotoksične tvari imaju na žive organizme, potrebno je provoditi opsežna i detaljna ispitivanja. Genotoksični utjecaj ispusnih voda mjeri se kombinacijom kemijskih, fizikalnih i bioloških ispitivanja radi dobivanja što relevantnijih rezultata. Pojedini su se autori usmjerili prema proučavanju genotoksičnosti sedimenata u vodama. U aktualnim se istraživanjima primjenjuju neki od ovih testova:

- Utvrđivanje postojanja spojeva između DNK i kemijskih mutagena (*DNA adducts*) koji katkad aktiviraju početak regeneracije lanca nukleinskih kiselina, što u pojedinim slučajevima dovodi do supstitucije ili delecije nukleotida.
- Utvrđivanje pojave cijepanja DNK lanca.
- Detekcija genskih mutacija.
- Razmjena sestrinskih kromatida SCE (*Sister Chromatide Exchanges*) citogenetička je metoda za proučavanje, ponajprije kemijskih mutagena. Stanica koja je izložena genotoksičnomu djelovanju, pokušava ukloniti

nastala oštećenja na lancu DNK, tako da homologni fragmenti sestričkih kromatida katkad zamijene mjesta, a oblik kromatide ostane isti. Broj takvih izmjena veći je u stanicama koje su više izložene djelovanju štetne tvari, te su posredan pokazatelj stupnja genotoksičnosti određene tvari.

- UDS (*unscheduled DNA synthesis*) test, mjera kemijski induciranih DNK zakrpa (obnavljanja), koja je prihvaćena kao indikator genotoksičnosti kemikalija na određene organe (Diekmann i sur., 2004a).
- *Alkaline filter elution* (AFE) metoda koju su godine 1976. razvili Kohn i sur. (Diekmann i sur., 2004a).
- Dokazivanje anomalija na jezgrama u eritrocitima (*Erythrocytic Nuclear Abnormalities* ENA), (Pacheco i Santos, 2002; Çavaş i Ergene-Gözükara, 2003; Bombail i sur., 2001). Često se rezultati mikronukleusnog testa uspoređuju s rezultatima nuklearnih anomalija. One jednim imenom označuju sva mala uleknuća stanične membrane, oblike na jezgri slične resama, ureze, jezgre s mjehurićima, jezgre oblikom slične djetelini i sl.
- U posljednje se vrijeme sve više primjenjuje tzv. komet-test ili gel elektroforeza pojedinačnih stanica (*Single Cell Gel Electrophoresis* SCGE). Taj nam test omogućuje proučavanje oštećenja na DNK lancu (puknuća jednostrukog i dvostrukog lanca) na razinu pojedinačnih stanica (Bombail i sur., 2001). U spomenutom se testu individualne stanice imobiliziraju u agaroznom gelu na predmetnome stakalcu, te se stanična i nuklearna stijenka razbiju umakanjem u *lysis*-otopinu s visokom koncentracijom soli i detergenata. Tada se ovako izložena DNK podvrgava elektroforezi i pod utjecajem električne struje fragmenti se različitih veličina počinju razdvajati u gelu. Nakon bojenja gela fluorescentnim bojama, oštećena DNK promatranjem ispod fluorescentnog mikroskopa poprima oblik sličan kometu. Duljina puta koji je DNK prešla, tj. rep kometa ujedno označuje veličinu i količinu iscjepkanih fragmenata dvostrukog DNK lanca (što je rep kometa duži, više je cijepanja DNK dvostrukog lanca). Najveće prednosti ovog testa jesu velika osjetljivost, jednostavnost, ekonomičnost i brzina izvođenja. Upotreba komet-testa omogućuje nam da neposredno nakon izlaganja utjecaju genotoksične tvari uočimo promjene. Kidanje DNK lanca nastaje mnogo brže nego mikronukleusi za čije stvaranje trebamo pričekati da se dogodi mitozu (Buschini i sur., 2004).
- SOS kromotest koji za model-organizam upotrebljava *E. coli*, a primjenjuje se za ispitivanje genotoksičnosti sedimenta.
- Sljedeći test koji je važno spomenuti jest tzv. Amesov test mutagenosti ili *Salmonella* test. Taj se test temelji na pretpostavci da je svaka tvar koja je karcinogena ujedno i mutagena. Izvodi se na mutiranom soju *Salmonelle typhimurium*, koja nema gen za sintezu histidina. Kada se

Mutagen:
Aneugen ili klastogen



Slika 1. Nastajanje mikronukleusa
Fig. 1. Appearance of the micronucleus

ovakva kultura podvrgne djelovanju neke poznate karcinogene tvari, postoji mogućnost da pod njenim utjecajem bakterija mutira (reverzna mutacija) i počne sintetizirati histidin iz sastojaka podloge u kojoj ne postoji histidin. Taj test nije 100% pouzdan, ali je jednostavan i brz, pa je još relativno popularan. Dioksin, npr., kao poznati karcinogen, ne daje pozitivne rezultate Amesova testa. S druge strane, mnoge tvari upotrebljavane u poljoprivredi daju pozitivne rezultate tog testa: etilen dibromid, ziram i sl. Ovaj često primjenjivani test detektira mutagenost i karcinogenost određenih tvari na prokariotskom organizmu koji, naravno, nije idealan model za istraživanja u ihtiologiji.

- Mutatox test koji za model-organizam upotrebljava tamni mutant bakteriju *Vibrio fisheri*, za razliku od divljeg tipa koji luminiscira.
- I na kraju tzv. mikronukleusni test (MN) standardni je test za detekciju citogenetskih oštećenja (Slika 1).

MIKRONUKLEUSNI TEST

Mikronukleusni test brzi je i osjetljivi način za jednostavno potvrđivanje postojanja strukturnih promjena na DNK ili gubitka dijelova DNK. U novijoj se znanstvenoj literaturi spomenuti test rabi u više svrha. Prevladavaju radovi koji frekvenciju mikronukleusa upotrebljavaju za dokazivanje genotoksičnosti

ispitivanih tvari (Siu i sur., 2004; Torres de Lemos i sur., 2001; Pacheco i Santos, 2002; Çavaş i Ergene–Gözükara, 2004). Ista se metoda primjenjuje za dokazivanje genotoksičnosti voda na pojedinim lokacijama (Porto i sur., 2004; Kolak i sur., 1999; Bombail i sur., 2001). Nedavno je, međutim, došlo do raščlanjivanja problematike vezane uz mikronukleus, pa su se znanstvenici počeli baviti pitanjima oko utjecaja spola na frekvenciju mikronukleusa (Takai i sur., 2004), utjecaja riblje vrste (Koppe Grisolia i Torre Cordeiro, 2000), utjecaja vrste stanica na kojima se provodi test (Palhares i Koppe Grisolia, 2002), utjecaja jačine doze toksina kojem su izloženi organizmi i sl. Mikronukleusi se stvaraju kondenzacijom kromosomskih fragmenata (klastogeni efekt) ili cijelih kromosoma (aneugeni efekt) koji nisu uključeni u stvaranje jezgre stanice–kćeri prigodom anafaze. Ova tjelešca, nakon mitoze, egzistiraju odvojeno u citoplazmi. Znanstvena je postavka da, kada se stanica izloži utjecaju neke genotoksične tvari, dolazi do različitih oštećenja DNK, pa tako i do stvaranja mikronukleusa. Dokazana je pozitivna korelacija između broja eritrocita u stanicama nekog organizma i genotoksičnog utjecaja određene ispitivane tvari. Često se izvodi na recirkulirajućim perifernim eritrocitima ili na stanicama škrga. Upotreba mikronukleusnog testa seže još iz 70-ih godina prošloga stoljeća. Konstantno se upotrebljuje već zadnjih 30-ak godina za proučavanje genotoksičnih efekata onečišćavača na ribama, vodozemcima i školjkašima.

U današnje vrijeme test se izvodi na nizu organizama: ribe, školjkaši i vodozemci. Riba su vodeni organizmi koji štetne tvari iz vode asimiliraju preko škrga, kože ili preko hrane jer se mnoge od njih nalaze pri vrhu hranidbenog lanca. Od riba se u recentnoj literaturi mikronukleusni test izvodi na nizu morskih i slatkovodnih vrsta. Pretpostavka je da svaka vrsta reagira drukčije na djelovanje genotoksičnih utjecaja, pa se u radovima rabe: zlatni karas (*Carassius auratus Gibelio*), (Štrunjak–Perović i sur., 2003), šaran (*Cyprinus carpio*), (Gustavino i sur., 2001; Buschini i sur., 2004), trlja blatarica (*Mullus barbatus*), (Pietrapiana i sur., 2002), oslić (*Merluccius merluccius*) (Pietrapiana i sur., 2002), pastrva (*Salmo trutta*), europska jegulja (*Anguilla anguilla*), (Rodriguez–Cea i sur., 2003), riba–zebra (*Danio rerio*), (Diekmann i sur., 2004a; Diekmann i sur., 2004), klen (*Leuciscus cephalus*), (Kolak i sur., 1999) i dr. No, ipak se znanstvenici u većini slučajeva odlučuju na vrste koje su česte i uobičajene, ili na vrste koje lako preživljavaju u laboratorijskim uvjetima. Zlatni se karas (*Carassius auratus gibelio*), na primjer, upotrebljava jer je relativno česta vrsta i dostupan tijekom cijele godine (Al–Sabti, 2000). U nekim se radovima rezultati testa provjeravaju na školjkašima, npr. dokazujući štetnost B[a]P na vrsti školjke *Perna viridis* (Siu i sur., 2004). Gauthier i suradnici (2004) provode mikronukleusni test na ličinkama vodozemca, južnoafričke žabe *Xenopus laevis* radi utvrđivanja genotoksičnosti riječne vode u blizini rudnika kamena spata ili lisnika. U pojedinim se radovima uspoređuje pogodnost iskorištavanja različitih vrsta kao organizama–modela za mikronukleusni test, pa tako

Koppe Grisolia (2002) u svojem radu opravdava upotrebu ribe u ovu svrhu. Prema njegovim rezultatima ribe su mnogo osjetljiviji bioindikator u proučavanju genotoksičnosti određenih tvari od miševa. Kod miševa je, dalje, utvrđeno da se djelovanje genotoksičnih tvari drukčije očituje među jedinkama različitog spola, a iste vrste (Takai i sur., 2004). Najčešće se u riba uzorkuju hemociti, odnosno periferni eritrociti. Za potrebe mikronukleusnog testa testiraju se stanice iz: repne žile, škrge, bubrega, iz srca (punkcija srca), te koštane srži (u miševa). Radi optimizacije i standardizacije eksperimentalnih metoda, neki su znanstvenici pokušali izvesti prebrojavanje mikronukleusa u drugim stanicama, npr. bubrežnim stanicama (glavno mjesto hematopoeze) uz pretpostavku da će te stanice brže reagirati na izloženost organizma otrovima. Rezultat testa, međutim, nije potvrdio početnu pretpostavku jer je mikronukleusni test pokazao jednaku osjetljivost na bubrežnim stanicama i perifernim eritrocitima. Druga se je varijanta, ujedno, pokazala lakše izvedivom i neinvazivnom (Palhares i Koppe Grisolia, 2002). I Rodriguez-Cea i suradnici 2003. godine koriste se bubrežnim stanicama zbog njihova visokog mitotičkog indeksa. Za proučavanje mikronukleusa se, također, rabe i jetrene stanice zbog pretpostavke da će jetra brže reagirati na izlaganje genotoksinima jer se u njoj ionako događa metabolička aktivacija (Pietrapiana i sur., 2002). Nakon uzorkovanja, stanice se razmazuju po predmetnome stakalcu. Ovako uzeti obrisci fiksiraju se s apsolutnim etanolom ili metanolom i boje različitim bojama (Giemson, hematoksilinom, May-Grunwaldovom bojom, Leishmannovom bojom, *acridine-orange* bojom). Mikronukleusi se prebrojavaju u uljnoj imerziji pod mikroskopom kao okruglaste citoplazmatske inkluzije slične jezgri, jasno odijeljenih rubova, s promjerom od 1/10 do 1/3 jezgre (Chamberland i sur., 2002). Prema općeprihvaćenom opisu mikronukleusa, ta se tjelešca ne smiju doticati s jezgrom, te bi morala imati istu boju i intenzitet kao jezgra. Mikronukleusi ne lome svjetlost. Preporuka je da se najmanje 2 000–4 000 stanica/po ribi provjerava na prisutnost mikronukleusa. Test se u današnje vrijeme izvodi u *in vivo* i *in vitro* uvjetima, uz napomenu da *in vitro* metode postaju sve popularnije. Arcand-Hoy i Metcalfe (2000) u svojem radu izvodi mikronukleusni test *in vivo* na jetrenim stanicama koje se umjetno induciraju na dijeljenje. Upotrijebljen je jetreni nekrogen alil-format (AF) radi induciranja regeneracije hepatocita kalifornijske pastrve. Povećanje broja neoplazmi (tumori) na jetri i koži ovih riba određeno je kao biomarker za detekciju utjecaja genotoksičnih i karcinogenih tvari. Istraživanja *in vitro* izvode se i na kulturama stanica RTG 2 (*Rainbow Trout Gonade*) kalifornijske pastrve u svrhu dokazivanja genotoksičnih utjecaja nekih supstanija (Kohlpoth i sur., 1999). U testu *in vitro* na staničnim kulturama sisavaca važno je analizirati aktivne stanice koje se razmnožavaju (proliferirajuće) jer se mikronukleusi stvaraju nakon mitoze. Kao pozitivna kontrola u radovima najčešće se rabe ove tvari: benzoapiren (Kohlpoth i sur., 1999; Siu i sur., 2004; Pacheco i Santos, 2002; Kolak i sur., 1999), ciklofosamid (Palhares i Koppe Grisolia, 2002; Koppe Grisolia i Torre

Cordeiro, 2000; Koppe Grisolia i Starling, 2001; Rodrigues-Cea i sur., 2003), mitomicin C (Palhares i Koppe Grisolia, 2002; Koppe Grisolia i Torre Cordeiro, 2002), kolhicin (Rodrigues-Cea i sur., 2003).

RASPRAVA I ZAKLJUČCI

1. Mikronukleusni test i dalje nalazi široku primjenu u ihtiološkim istraživanjima kao eksperimentalna metoda za utvrđivanje genotoksičnog utjecaja. Prednosti mikronukleusnog testa nad ostalim testovima jesu ove: praktičan, brz i jednostavan. Rezultati se mogu lako arhivirati i očitati bilo kada i koliko god puta je potrebno. Izvodi se na eritrocitima radi proučavanja onečišćivača koji mogu uzrokovati mutagenezu. Osim mikronukleusnog testa postoji i nekoliko nespecifičnih indikatora visokog otrovanja ribljih organizama: gubitak ljuski, odbijanje hrane, promjene u ponašanju i pokretljivosti, poteškoće u disanju, smanjena plodnost i sl. No, upotrebom tih testova ne može se mnogo doznati o promjenama na genetskom materijalu ispitivanog organizma.
2. Riba se je pokazala kao pogodan organizam–model za primjenu mikronukleusnog testa jer je vrlo osjetljiva na pojavu štetnih tvari u svojem staništu. Mutageno je djelovanje mnogo lakše i brže uočljivo u prokariota, te u biljaka i životinja (riba) s brzom izmjenom generacija.
3. Ribe, vodozemci i školjkaši se već dugi niz godina služe kao genetski model za evaluaciju stupnja onečišćenosti u vodenim biosustavima.
4. Preporučljivo je upotrijebiti još jedan od mnogih postojećih testova za dokazivanje genotoksičnog utjecaja, tako da bi se rezultati mikronukleusnog testa lakše potvrdili ili opovrgnuli.
5. Budući da sve više do izražaja dolaze rezultati da svaka riblja vrsta reagira drukčije na određeno genotoksično djelovanje, važno je testirati što veći broj vrsta i imati na umu ovu činjenicu pri uspoređivanju rezultata dvaju radova izvedenih na dvjema ribljim vrstama. Kada su za ispitivanje genotoksičnog utjecaja X-zraka rabljene jedinke iste vrste, ali različita spola, autor nije utvrdio signifikantnu razliku između dviju ispitivanih skupina (Takai i sur., 2004). Važno je za riblji modelni organizam upotrijebiti vrste koje se hrane na različite načine (omnivor, piscivor, herbivor) i usporediti fekvenciju mikronukleusa među njima.
6. Vrsta tkiva i stanica na kojima se izvodi mikronukleusni test katkad može imati utjecaj na frekvenciju pojave mikronukleusa. Jesu li škržne stanice bolje za taj test jer su neprestano izravno izložene genotoksinu ili je bolje prebrojavati mikronukleuse u hemocitima jer su oni negranulirani i imaju nisku učestalost spontanih mikronukleusa? Kod izbora vrste stanica na kojima će se obavljati test važno je imati u vidu staničnu kinetiku i brzinu izmjene generacija.

7. Radi optimizacije i standardizacije eksperimentalnih uvjeta važno je uložiti još napora u proučavanje mehanizama koji dovode do stvaranja mikronukleusa. Znanstvenici su na dobrom putu postavljanja potpunih i nepogrješivih kriterija za očitavanje mikronukleusa, no još se katkad događaju pogreške (viralna nekroza eritrocita može se zamijeniti mikronukleusom). Valja naglasiti da je preporučljivo zamoliti više različitih osoba da, neovisno jedna o drugoj, očitaju mikronukleuse pod mikroskopom i tek onda odrede njihov prosjek. Relevantnost dobivenih podataka ovisi i o broju stanica po organizmu u kojima su prebrojeni mikronukleusi. Preporuka je da se prebroje mikronukleusi u najmanje 1 000 do 3 000 stanica jedne ispitivane jedinke.
8. Prigodom donošenja znanstvenog zaključka bitno je ne zanemariti ostale moguće utjecaje na frekvenciju mikronukleusa. Na učestalost pojave mikronukleusa, osim vrste ispitivane otrovne tvari, utječu i čimbenici kao: dob, spol, zdravstveno stanje ispitivanog organizma, vrsta polutanta, doza genotoksične tvari, sezona, temperatura vode i prehrana. U pojedinim je radovima već potvrđena znatna razlika u broju induciranih mikronukleusa između različitih vrsta. U jednom je radu dokazano da najmanji utjecaj kadmij, ciklofosfamid i kolhicin imaju na europsku jegulju, a da je ispitivana vrsta pastrve ujedno i najosjetljivija na štetne čimbenike (Rodríguez-Cea i sur., 2003). S druge strane, povećanje temperature vode uzrokuje povećanje broja kromosoma-poliploidiju, a time, posredno, i povećanje broja mikronukleusa (Štrunjak-Perović i sur., 2003).
9. Rezultate testa potrebno je usporediti sa spontano induciranim mikronukleusima nastalima u prirodnim uvjetima i tek s tako dobivenim podacima usporediti rezultate.
10. Mikronukleusni test nije najbrži test za dokazivanje oštećenja na DNK jer je potrebno čekati da se odigra mitozu u stanicama koje su izložene genotoksinu i tek će onda mikronukleusi postati uočljivi.
11. Još su neodgovorena brojna pitanja vezana uz aspekt perioda, a koja se nameću pri upotrebi mikronukleusnog testa. Izaziva li produženi period izlaganja organizma-modela nekom toksinu povećani broj mikronukleusa? Postoji i pretpostavka da se pri dužem izlaganju nekom genotoksinu u organizmu stvori rezistencija/tolerancija i ne dode do fiziološkog odgovora. Nasuprot ovom problemu, postavlja se i pitanje koliko je najkraće razdoblje potrebno za neku genotoksičnu tvar da počne ostavljati vidljive posljedice na živi organizam. Već je oдавно poznato da postoji period latencije između početka izlaganja organizma otrovu i postizanja najvećega broja mikronukleusa (Koppe Grisolia i Torre Cordeiro, 2000). Utvrđeno je da se najveći broj mikronukleusa u *in vivo* testovima u laboratoriju najčešće može zabilježiti od oko 1 do 5 dana nakon početka tretmana.
12. Rezultati mikronukleusnog testa mogu se primijeniti i radi poboljšanja prehrane i zdravlja ljudske populacije. U mnogim su zemljama ribe i

vodeni mekušci glavni izvor proteina za ljude, ali u isto vrijeme akumuliraju štetne tvari u svojem organizmu. Primjerice, Svjetska zdravstvena organizacija (*WHO*) utvrdila je godine 1999. da ribe i mekušci pohranjuju velike količine žive u svojem organizmu. Znanstvenici su pronašli korelaciju između količine pronađene žive u limfocitima osoba koje su konzumirale kontaminiranu ribu.

13. Imajući u vidu ekološku značajku mikronukleusnog testa, važno je držati se nekih osnovnih načela očuvanja okoliša. Pri izvođenju mikronukleusnog testa u kontroliranim laboratorijskim uvjetima, te pri izlaganju riba utjecaju različitih mutagena, pojavljuje se problem odlaganja kontaminirane vode u kojoj su držani ispitivani organizmi. Sljedeći problem stvara neracionalna uporaba laboratorijskih životinja u svrhu različitih istraživanja, pa tako i ihtioloških. Zbog ekoloških i etičkih razloga, testovi *in vitro* trebali bi biti pravilo.

I na kraju, korisno je upotrijebiti mikronukleusni test prigodom proučavanja ekotoksikoloških utjecaja u ihtiološkom istraživanju, ali uz neizbježne mjere opreza.

Summary

MICRONUCLEUS TEST IN MOST RECENT ICHTHIOLOGY RESEARCH

V. Mijat

The purpose of this paper was to give an insight into the most recent ichthyology research in which Micronucleus test is used. This test has been used for some time now as a tool for determining DNA damage in model-organism. Scientists have been using it in order to assess genotoxic effects which certain substances exhibit towards different organisms, in this case hydrobionts.

Key word: micronucleus, genotoxicity, ecotoxicology, mutagenesis, cytotoxicity, ichthyology

LITERATURA

- Abul Farah, M., Ateeq, B., Niamat Ali, M., Ahmad, W. (2003):* Evaluation of genotoxicity of PCP and 2, 4-D by micronucleus test in freshwater fish *Channa Punctatus*. *Ecotoxicology and Environmental Science*, 54, 25–29.
- Al-Sabti, K. (2000):* Chlorotriazine Reactive Azo Red 120 Textile Dye Induces Micronuclei in Fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 47, 149–155.
- Arcand-Hoy, L. D., Metcalfe, M. D. (2000):* Hepatic Micronuclei in Brown Bullheads (*Ameiurus nebulosus*) as a biomarker for Exposure to Genotoxic Chemicals. *J. Great Lakes Res.*, 26, (4), 408–415.
- Ateeq, B., Abil Farah, M., Niamat Ali, M., Ahmad, W. (2002):* Induction of micronuclei and erythrocyte alterations in the catfish *Clarias Batrachus* by 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor. *Mutation Research*, 518, 135–144.
- Bombail, V., Aw, D., Gordon, E., Batty, J. (2001):* Application of comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. *Chemosphere*, 44, 383–392.
- Buschini, A., Martino, A., Gustavino, B., Monfrinotti, M., Poli, P., Rossi, C., Santoro, M., Dörr, A., J. M., Rizzoni, M. (2004):* Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimens exposed in situ to lake waters treated with disinfectants for potabilization. *Mutation Research*, 557, 111–129.
- Çavaş, T., Ergene-Gözükara, S. (2003):* Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-

Vesna Mijat, dipl. ing., Biomax d. o. o., Perjavička putina 5, Zagreb, vmijat@waitrose.com

- genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *Mutation Research*, 538, 81–91.
- Çavaş, T., Ergene-Gözükara, S. (2003a): Evaluation of the genotoxic potential of lambda-cyhalothrin using nuclear and nucleolar biomarkers on fish cells. *Mutation Research*, 534, 93–99.
- Çavaş, T., Ergene-Gözükara, S. (2004): Genotoxicity evaluation of metronidazole using the piscine micronucleus test by acridine orange fluorescent staining. *Environmental Toxicology and Pharmacology* (in press).
- Chamberland, K., Lindroth, B. A., Whitaker, B. (2002): Genotoxicity in Androscoggin river–Smallmouth bass. *Northeastern Naturalist*, 9, (2), 203–212.
- Chen, G., White, A. P., (2004): The mutagenic hayards of aquatic sediments: a review. *Mutation Research*, 567, 151–225.
- Diekmann, M., Hultsch, V., Nagel, R. (2004): On the relevance of genotoxicity for fish populations I: effects of a model genotoxicant on zebrafish (*Danio rerio*) in a complete life–cycle test. *Aquatic Toxicology*, 68, 13–26.
- Diekmann, M., Waldmann, P., Schnurstein, A., Grummt, T., Braunbeck, T., Nagel, R. (2004a): On the relevance of genotoxicity for fish populations II: genotoxic effects in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to 4–nitroquinoline–1–oxide in a complete life–cycle test. *Aquatic Toxicology*, 68, 27–37.
- Gauthier L., Tardy E., Mouchet F., Marty J. (2004): Biomonitoring of the genotoxic potential (micronucleus assay) and detoxifying activity (EROD induction) in the river Dadou (France), using the amphibian *Xenopus laevis*. *Science of the Total Environment*, 323, 47–61.
- Gustavino, B., Scornajenghi, K. A., Minissi, S., Ciccotti, E. (2001): Micronuclei induced in erythrocytes of *Cyprinus carpio* (teleostei, pisces) by X–rays and colchicine. *Mutation Research*, 494, 151–159.
- Kohlpoth, M., Rusche, B., Nüsse, M. (1999): Flow cytometric measurement of micronuclei induced in a permanent fish cell line as a possible screening test for the genotoxicity of industrial waste waters. *Mutagenesis*, 14, (4), 397–402.
- Kolak, A., Treer, T., Aničić, I., Safner, R. (1999): Monitoring the genotoxicity of the river Sava by micronuclei in chub (*Leuciscus cephalus*). *Cytobios*, 99, 135–142.
- Koppe Grisolia, C. (2002): A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. *Mutation Research*, 518, 145–150.
- Koppe Grisolia, C., Torre Cordeiro, C. M. (2000): Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. *Genetics and Molecular Biology*, 23, (1), 235–239.
- Koppe Grisolia, C., Starling, F. L. R. M. (2001): Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. *Mutation Research*, 491, 39–44.
- Pacheco, M., Santos, M. A. (2002): Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 53, 331–347.
- Palhares, D., Koppe Grisolia, C. (2002): Comparison between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment. *Genetics and Molecular Biology*, 22, (3), 281–284.

- Pietrapiana, D., Modena, M., Guidetti, P., Falugi, C., Vacchi, V. (2002):* Evaluating the genotoxic damage and hepatic tissue alterations in demersal fish species: a case study in Ligurian Sea (NW–Mediterranean). *Marine Pollution Bulletin*, 44, 238–243.
- Porto, J. I. R., Araujo, C. S. O., Feldberg, E. (2004):* Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species. *Environmental Research* (in press).
- Rodriguez-Cea, A., Ayllon, F., Garcia-Vazquez, E. (2003):* Micronucleus test in freshwater fish species: an evaluation of its sensitivity for application in field surveys. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56, 442–448.
- Siu, W. H. L., Cao, J., Jack, R. W., Wu, R. S. S., Richardson, B. J., Xu, L., Lam, P. K. S. (2004):* Application of the comet and micronucleus assay to the detection of B[a]P genotoxicity in haematocytes of the green lipped mussel (*Perna viridis*). *Aquatic Toxicology*, 66, 381–392.
- Štrunjak-Perović, I., Čož-Rakovac, R., Topić Popović, N. (2003):* Micronucleus occurrence in diploid and triploid rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss* Walbaum). *Vet. Med.*, 48, (8), 215–219.
- Takai, A., Kagawa, N., Fujikawa, K. (2004):* Susceptibility of male and female medaka (*Oryzias latipes*) fish to spontaneous and X-ray induced micronucleus formation in gill cells. *Mutation Research*, 558, 131–136.
- Torres De Lemos, C., Milan Rödel, P., Regina Terra, N., Erdtmann, B. (2001):* Evaluation of Basal Micronucleus Frequency and Hexavalent Chromium Effects in Fish Erythrocytes. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14, (6), 1320–1324.

Primljeno: 16. 3. 2005.
Prihvaćeno: 4. 4. 2005.