

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Stoimir M. Kolarević

**PRIMENA KOMET TESTA NA
SLATKOVODNIM ŠKOLJKAMA *Unio
pictorum* (LINNAEUS, 1758), *Unio
tumidus* (PHILIPSSON, 1788) I
Sinanodonta woodiana (LEA, 1834) U
EKOGENOTOKSIKOLOŠKOJ PROCENI
AKVATIČNIH EKOSISTEMA**

Doktorska disertacija

BEOGRAD, 2014.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Stoimir M. Kolarević

**APPLICATION OF THE COMET ASSAY
ON FRESHWATER MUSSELS *Unio
pictorum* (LINNAEUS, 1758), *Unio
tumidus* (PHILIPSSON, 1788) AND
Sinanodonta woodiana (LEA, 1834) IN
ECOGENOTOXICOLOGICAL
ASSESSMENT OF AQUATIC
ECOSYSTEMS**

Doctoral dissertation

BELGRADE, 2014

MENTORI I ČLANOVI KOMISIJE

Mentori:

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

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

Komisija:

Dr Jelena Knežević-Vukčević, redovni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Momir Paunović, viši naučni saradnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane _____ 2014. godine

Istraživanje za ovu doktorsku disertaciju rađeno je na Katedri za mikrobiologiju, Instituta za botaniku, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu i u laboratoriji istraživačkog broda „Argus“ u okviru sledećih projekata:

Biološki aktivni prirodni proizvodi kao potencijalni izvori novih lekova i dijetetskih suplemenata, projekat Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, br. 172058

Međunarodna ekspedicija Joint Danube Survey 3, projekat Međunarodne komisije za zaštitu reke Dunav

Cyotothreat - Fate and effects of cytostatic pharmaceuticals in the environment and identification of biomarkers for an improved risk assessment on environmental exposure, projekat Evropske Unije OP7

Establishing the basic microbial faecal pollution pattern along a large river: testing the longitudinal continuum vs. lateral discontinuum hypothesis at the River Danube, projekat Austrijskog fonda za nauku (Austrian Science Fund -FWF).

Globaqua - Managing the effects of multiple stressors on aquatic ecosystems under water scarcity, projekat Evropske Unije OP7

Veliku zahvalnost dugujem dragoj mentorki, profesorki dr Branki Vuković-Gačić, šefu Katedre za mikrobiologiju, na veoma stručnom vođenju kako tokom eksperimentalnog dela tako i tokom izrade disertacije. Hvala Vam za sav trud i svo vreme uloženo na planiranje i realizaciju ove disertacije kao i za svu podršku koju ste mi pružili tokom istraživanja.

Zahvalnost dugujem dragom mentoru dr Zoranu Gačiću na svim sugestijama, predlozima i korekcijama koje su znatno unapredile eksperimentalni rad tokom ovog istraživanja, hvala Vam što ste imali strpljenja da mi objasnite osnove statističkih analiza.

Želim da se zahvalim dragoj profesorki dr Jeleni Knežević-Vukčević, dekanici Biološkog fakulteta, na svim sugestijama i korekcijama koje su znatno pomogle da unapredim kvalitet pisanja naučnih radova kao i same disertacije, hvala Vam na velikom strpljenju.

Dr Momiru Paunoviću dugujem veliku zahvalnost za svu pomoć pruženu prilikom terenskog rada. Momo hvala ti što si mi pružio priliku da postanem deo JDS porodice, hvala ti za svu podršku i svo zalaganje tokom ekspedicije, JDS tim nije mogao imati bolje vođe od tebe i Bele!

Moram da se zahvalim svim učesnicima JDS ekspedicije. Zahvaljujem se austrijskom timu mikrobiologa dr Alexander Kirschner-u, dr Georg Reischer-u i Stefan Jackwert-u za uspešnu saradnju i prijateljski odnos tokom ekspedicije. Bela, Momo, Joci, Georg, Stef, Claudia, Florentina, Rado i Uli, hvala za drugarstvo u svim napornim i

veselim trenucima koje smo podelili. Takođe, zahvaljujem se posadi broda „Argus“ za pomoć i prostorije koje su mi ustupili.

Želeo bih da se zahvalim Međunarodnoj komisiji za zaštitu reke Dunav, Agenciji za lekove, Gradskom zavodu za javno zdravlje – Beograd i Republičkom Hidrometeorološkom zavodu Srbije za ustupljene podatke.

Zahvaljujem kolegama Vanji Markoviću, Stefanu Skoriću, Mariji Ilić, Jeleni Tomović i Božici Vasiljević za veliku pomoć na terenu.

Dragim kolegamicama Karolini Sunjog i Jovani Kostić dugujem veliku zahvalnost za nesebičnu pomoć u eksperimentalnom radu. Kolegama Ivici Dimkiću i Bojani Jovanović zahvaljujem za kolegijalnost i prijatno radno okruženje u laboratoriji.

Svim članovima Katedre za mikrobiologiju dugujem zahvalnost za kolegijalni i prijateljski odnos tokom svakodnevnog rada.

Veliku zahvalnost dugujem mojim porodicama Kolarević, Kračun i Janković, hvala vam na podršci koju dobijam od vas uvek i za sve.

Najveću zahvalnost, mojoj dragoj ženici Margareti dugujem za sve, svu pomoć i ideje prilikom rada, svu podršku i energiju koju mi stalno daje, za svo strpljenje, za svu ljubav....

Ovaj rad posvećujem mojoj majci Ljubici.

**Primena komet testa na slatkovodnim školjkama *Unio pictorum* (Linnaeus, 1758),
Unio tumidus (Philipsson, 1788) i *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) u
ekogenotoksikološkoj proceni akvatičnih ekosistema**

Izvod

Široka rasprostranjenost slatkovodnih školjki, ishrana filtriranjem, sesilni način života i sposobnost da akumuliraju zagađivače čine ih pogodnim organizmima za procenu nivoa zagađenja spoljašnje sredine i uticaja različitih zagađivača. Komet, test ili elektroforeza pojedinačnih ćelija (eng. single cell gel electrophoresis - SCGE) je osetljiva i brza tehnika za detekciju DNK oštećenja u pojedinačnim ćelijama i predstavlja jednu od osnovnih metoda u praćenju genotoksičnog efekta zagađivača na akvatične organizame.

Da bismo odredili osetljivost školjki kao bioindikatora u ekogenotoksikološkim studijama, primenom alkalnog komet testa pratili smo nivo oštećenja molekula DNK u hemocitama slatkovodnih školjki *Unio pictorum* i *U. tumidus* (autohtone vrste) i *Sinanodonta woodiana* (alohtona vrsta) izlaganih sredinskom stresu *in situ* i *ex situ*.

U okviru *in situ* proučavanja, aktivnim i pasivnim biomonitoringom, pratio se uticaj sredine na nivo oštećenja DNK molekula. Procena kvaliteta vode na različitim lokalitetima vršena je na osnovu mikrobioloških i fizičko-hemijskih parametara. Pasivni biomonitoring je rađen u okviru istraživanja na reci Velika Morava, na jedinkama vrste *S. woodiana* i u okviru istraživanja na reci Dunav, na jedinkama roda *Unio*. Aktivni biomonitoring je rađen sa jedinkama istog roda na lokalitetima Save i Dunava na teritoriji grada Beograda.

U okviru *ex situ* proučavanja, pratio se uticaj citostatika: 5-fluorouracila, cisplatine, etopozida, vinkristin sulfata i imatinib mezilata na nivo oštećenja DNK molekula u hemocitama vrsta roda *Unio in vivo*, izlaganjem jedinki 72 h, i *in vitro*, izlaganjem sveže izolovanih hemocita (30 min) ili hemocita u primarnoj kulturi (22 h). Kao model mutagen, korišćen je kadmijum hlorid koji je u svim tretmanima doveo do indukcije oštećenja DNK molekula.

Rezultati *in situ* studija su pokazali da se primenom komet testa na jedinkama vrsta *U. pictorum*, *U. tumidus* i *S. woodiana* može detektovati i kvantifikovati prisustvo

genotoksičnog zagađenja. Nivo oštećenja DNK u hemocitama pokazao je značajnu korelaciju sa koncentracijama različitih grupa genotoksičnih polutanata u vodi, kao i sa mikrobiološkim indikatorima fekalnog zagađenja.

Prilikom *in vivo* tretmana nije detektovan uticaj imatinib mezilata, dok su najniže efektivne koncentracije (LOEC) 5-fluorouracila, cisplatine, etopozida i vinkristin sulfata bile daleko više od njihovih očekivanih koncentracija u površinskim vodama. Efektivne koncentracije za 5-fluorouracil i cisplatinu su bile u rangu koncentracija u kojima se ovi lekovi mogu naći u otpadnim vodama bolnica. Rezultati dobijeni prilikom *in vitro* tretmana sveže izolovanih hemocita pokazali su da je period od 30 min izlaganja suviše kratak za detekciju genotoksičnog efekta citostatika. Tretman u primarnoj kulturi hemocita se može preporučiti za detekciju genotoksičnog potencijala *in vitro* ali uz dodatne modifikacije, kao što su stimulacija hemocita na proliferaciju, a uzimajući u obzir mehanizam dejstva testiranih supstanci.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Genotoksikologija, Mikrobiologija

UDK broj: [574.64:594.141][57.088:577.113](043.3)

Ključne reči: ekogenotoksikologija, vodeni ekosistemi, mikrobiološko i hemijsko zagađenje, citostatici, *Unio pictorum*, *U. tumidus*, *Sinanodonta woodiana*, oštećenja DNK, procena rizika

Application of the comet assay on freshwater mussels *Unio pictorum* (Linnaeus, 1758), *Unio tumidus* (Philipsson, 1788) and *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) in ecogenotoxicological assessment of aquatic ecosystems

Abstract

Due to generally wide distribution of considerable number of species, filter feeding, a sessile life form and an ability to accumulate pollutants, freshwater mussels were found to be favourable organisms for estimating the environmental pollution level and the impact of various pollutants. The comet assay or the single cell gel electrophoresis (SCGE) represents a sensitive and rapid technique for detection of DNA damage and thus this method is commonly employed for detection of genotoxic pollution in aquatic ecosystems.

To evaluate the sensitivity of freshwater mussels as bioindicators in ecogenotoxicological studies, we studied the level of DNA damage with alkaline comet assay in haemocytes of freshwater mussels *Unio pictorum* and *U. tumidus* (autochthonous species) and *Sinanodonta woodiana* (allochthonous species) exposed to environmental stress *in situ* and *ex situ*.

For *in situ* studies, active and passive biomonitoring were employed for the evaluation of the impact of environmental stress on the level of DNA damage. Water quality assessment on studied sites was based on physical, chemical and microbiological parameters. Passive biomonitoring was performed on specimens of *S. woodiana* collected from the Velika Morava River, and on two species belonging to genus *Unio* collected from the Danube River. Active biomonitoring was performed on specimens of the same species exposed in the Sava and Danube rivers in the urban area of the Belgrade city.

Ex situ studies of the impact of cytostatics: 5-fluorouracil, cisplatin, etoposide, vincristine sulphate and imatinib mesylate were performed *in vivo*, by treatment of the whole animals for 72, and *in vitro*, by treatment of freshly isolated haemocytes for 30 min or by treatment of haemocytes in primary cultures for 22 h. Treatment with cadmium chloride (model mutagen) resulted in significant induction of DNA damage in all treatment conditions.

The results of *in situ* studies indicated that the presence of genotoxic pollution could be detected and quantified by comet assay on specimens of *U. pictorum*, *U. tumidus* i *S. woodiana*. The level of DNA damage in haemocytes showed significant correlation with concentration of genotoxic pollutants measured in water and with microbiological indicators of faecal pollution.

The effect of imatinib mesylate was not detected following *in vivo* treatment, while the lowest observable effective concentrations (LOECs) of 5-fluorouracil, cisplatin, etoposide and vinkristine sulphate were few orders of magnitude higher than their concentrations in the surface waters. The effective concentrations for 5-fluorouracil and cisplatin were in the range of concentrations which could be found in hospital wastewaters. The results obtained *in vitro* indicated that exposure of freshly isolated haemocytes for 30 min was too short for detection of genotoxic effect. The treatment of haemocytes in primary culture can be proposed for detection of genotoxic potential *in vitro* with some modifications, such as stimulation of haemocytes on proliferation.

Research field: Biology

Specific research field: Genotoxicology, Microbiology

UDC No.: [574.64:594.141][57.088:577.113](043.3)

Key words: ecogenotoxicology, aquatic ecosystems, microbial and chemical pollution, cytostatics, *Unio pictorum*, *U. tumidus*, *Sinanodonta woodiana*, DNA damage, risk assessment

Spisak skraćenica korišćenih u tekstu

5-FU – 5-fluorouracil

AO – akridin oranž

ATC - Anatomska terapeutska klasifikacija

CFU – eng. Colony Forming Unit – broj jedinica koje formiraju kolonije

CisPt – cisplatina

DMSO – dimetil sulfoksid

DTA - dekstrozni teluritni agar

EB – etidijum bromid

EDTA – eng. Ethylenediaminetetraacetic acid

ETO – etopozid

FC – eng. Faecal Coliforms – fekalni koliformi

FE – eng. Faecula Enterococci – fekalne enterokoke

FI – factor indukcije

HBSS – eng. Hanks Balanced Saline Solution

IM- imatinib mezilat

JDS – eng. The Joint Danube Survey – udruženo nadgledanje Dunava

LMP – eng. Low Melting Point

MF – membranska filtracija

MPKH- medijum za primarnu kulturu hemocita

MPN – eng. The Most Probable Number – metod najverovatnijeg broja

MUG - metilumberiferil- β -glukuronid

NMP – eng. Normal Melting Point

ONPG - orto-nitrofenil- β -D-galaktoriranozid

OTM - eng. Olive tail moment

PEC – eng. Predicted Environmental Concentration – predviđena koncentracija u životnoj sredini

PNEC - eng. Predicted No Effect Concentration – predviđena koncentracija koja nema efekta

POP – eng. Persistent Organic Pollutants – perzistentni organski zagađivači

r-PEC – rafinisana vrednost PEC

rpm – eng. Rounds Per Minute

rkm – rečni kilometer

PBS – eng. Phosphate Buffered Saline Solution

SCDI – eng. Significant Concentration Depended Induction Factor

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

TC – eng. Total Coliforms – ukupni koliformi

TI – eng. Tail Intensity – itenzitet repa

TL – eng. Tail Length – dužina repa

VIN – Vinkristin sulfat

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. <i>In vivo</i> i <i>in vitro</i> istraživanja u genotoksikologiji	2
1.2. Biomonitoring, bioindikatori i biomarkeri.....	2
1.2.1. <i>In situ</i>	4
1.3. <i>Ex situ</i> studije.....	5
1.4. Oštećenje DNK molekula kao biomarker.....	5
1.4.1. Bazalni nivo oštećenja DNK molekula.....	7
1.5. Komet test (SCGE) za detekciju DNK oštećenja	8
1.6. Akvatični ekosistemi – mikrobiološko i hemijsko zagađenje.....	10
1.7. Hemijsko zagađenje i procena rizika po životnu sredinu	10
1.7.1. Citostatici.....	12
1.7.2. Procena rizika po životnu sredinu.....	15
1.8. Mikroorganizmi kao bioindikatori kvaliteta vode	18
1.9. Školjke kao bioindikatori.....	19
1.9.1. <i>Unio</i> sp.....	21
1.9.2. <i>Sinanodonta woodiana</i>	22
1.9.3. Primena komet testa na slatkovodnim školjkama u <i>in situ</i> i <i>ex situ</i> studijama ..	22
2. CILJEVI	24
3. MATERIJAL I METODE	25
3.1. Materijal.....	25
3.1.1. Rastvori.....	25
3.1.2. Citostatici.....	27
3.1.3. Podloge i medijumi.....	29
3.2. Eksperimenti rađeni <i>in situ</i>	31
3.2.1. Velika Morava – pasivni biomonitoring.....	31
3.2.2. Dunav - pasivni monitoring	31
3.2.3. Grad Beograd - aktivni biomonitoring.....	34
3.2.3.1. Uzorkovanje jedinki <i>U. pictorum</i> i <i>U. tumidus</i>	34
3.2.3.2. Izlaganje školjki – školjke u kavezima	34
3.3. Metode	35
3.3.1. Aklimacija.....	35
3.3.2. Uzorkovanje hemolimfe.....	35
3.3.3. Diferencijalno bojenje ćelija akridin oranž/etidijum bromid (AO/EB)	36
3.3.4. Komet test	37
3.3.5. Eksperimenti <i>ex situ</i>	38
3.3.5.1. Uzorkovanje jedinki.....	38
3.3.5.2. <i>In vivo</i> tretman	38
3.3.5.3. <i>In vitro</i> tretman	40
3.3.5.3.1 Tretman sveže izolovanih hemocita u fiziološkom rastvoru	40
3.3.5.3.2. Priprema primarne kulture hemocita	41
3.3.5.3.2.1. Tretman u medijumu za primarnu kulturu hemocita	41
3.3.5.3.3. Post-tretman vodonik peroksidom.....	42
3.3.5.4. Izvedeni parametri korišćeni za poređenje rezultata <i>ex situ</i> studija.....	42

3.3.5.4.1. Faktor indukcije	42
3.3.5.4.2. Indukcija oštećenja.....	42
3.3.5.4.3. Faktor indukcije koncentracija sa značajnim efektom.....	42
3.3.6. Mikrobiološki parametri	43
3.3.6.1. Koliformi – metod membranska filtracija (MF)	43
3.3.6.2. Koliformi – metod najverovatniji broj (MPN).....	43
3.3.6.3. Fekalne enterokoke – metod membranska filtracija	44
3.3.6.4. Fekalne enterokoke – metod najverovatniji broj	45
3.3.7. Statističke analize.....	46
4. REZULTATI.....	47
4.1. Velika Morava – pasivni biomonitoring.....	47
4.1.1. Fizičko-hemijski i mikrobiološki kvalitet vode	48
4.1.2. Uzorkovanje jedinki <i>S. woodiana</i> na reci Velika Morava	50
4.1.3. Određivanje bazalnog nivoa oštećenja DNK molekula	50
4.1.4. Određivanje nivoa oštećenja DNK kod jedinki <i>in situ</i>	51
4.1.5. Korelacija između nivoa oštećenja DNK, fizičko – hemijskih i mikrobioloških parametara.....	52
4.2. Dunav – pasivni monitoring.....	53
4.2.1. Mikrobiološki kvalitet vode.....	54
4.2.2. Uzorkovanje jedinki <i>Unio</i> sp. i <i>S. woodiana</i> na reci Dunav	56
4.2.2.2. Variranje u nivou oštećenja na različitim lokalitetima	56
4.2.2.3 Korelacija između nivoa oštećenja DNK, fizičko – hemijskih i mikrobioloških parametara.....	59
4.2.2.3. Poređenje odgovora kod <i>Unio</i> sp. i <i>S. woodina</i>	60
4.3. Grad Beograd - aktivni biomonitoring.....	62
4.3.1. Fizičko-hemijski i mikrobiološki kvalitet vode	62
4.3.2. Određivanje bazalnog nivoa oštećenja DNK molekula	64
4.3.3. Toksičnost i nivo oštećenja DNK prilikom izlaganja	64
4.3.4. Korelacija između nivoa oštećenja DNK, fizičko – hemijskih i mikrobioloških parametara.....	65
4.4. Biomonitoring <i>ex situ</i>	67
4.4.1. CdCl ₂	67
4.4.1.1. Tretman <i>in vivo</i>	68
4.4.1.2. Tretman <i>in vitro</i>	68
4.4.2. 5-fluorouracil (5-FU)	69
4.4.2.1. Efekat tretmana 5-FU <i>in vivo</i>	70
4.4.2.2. Efekat tretmana 5-FU <i>in vitro</i>	71
4.4.3. Cisplatina (CisPt).....	71
4.4.3.1. Efekat tretmana CisPt <i>in vivo</i>	72
4.4.3.2. Efekat tretmana CisPt <i>in vitro</i>	73
4.4.4. Etopozid (ETO).....	74
4.4.4.1. Efekat tretmana ETO <i>in vivo</i>	75
4.4.4.2. Efekat tretmana ETO <i>in vitro</i>	76
4.4.5. Vinkristin sulfat (VIN).....	76

4.4.6. Imatinib mezilat (IM).....	78
4.4.6.1. Efekat tretmana IM <i>in vivo</i>	79
4.4.7. Rangiranje citostatika na osnovu efekata <i>in vivo</i>	80
4.4.8. Procena rizika od citostatika po okolinu.....	80
5. DISKUSIJA	82
5.1. Bazalne/referentne vrednosti i parametri kvantifikacije DNK oštećenja	82
5.2. <i>In situ</i> studije.....	83
5.2.1. Pasivni biomonitoring.....	84
5.2.3. Aktivni biomonitoring	87
5.3. Korelacija DNK oštećenja sa mikrobiološkim i fizičko-hemijskim parametrima....	89
5.3.1. Korelacija sa mikrobiološkim parametrima.....	90
5.3.2. Korelacija sa teškim metalima.....	91
5.3.3. Policiklični aromatični ugljovodonici (PAH)	93
5.3.4. Perzistentni organski zagađivači.....	94
5.3.5. „Novootkriveni” polutanti	94
5.4. <i>Ex situ</i> studije - uticaj citostatika na DNK oštećenja u slatkovodnim školjkama....	95
5.4.1. Efekat tretmana <i>in vivo</i>	95
5.4.2. Efekat tretmana <i>in vitro</i>	97
5.4.3. Poređenje rezultata dobijenih <i>in vivo</i> i <i>in vitro</i>	100
5.4.4. Procena rizika po životnu sredinu.....	102
6. ZAKLJUČCI	105
7. LITERATURA	108
PRILOG	132
Prilog 1 – Pasivni biomonitoring – reka Velika Morava	132
Prilog 2 – Pasivni biomonitoring – reka Dunav.....	135
Prilog 3 – Aktivni biomonitoring – grad Beograd	143
Prilog 4 – Aktivni biomonitoring – grad Beograd.....	148

UVOD

1. Uvod

Svi živi organizmi su kontinuirano izloženi endogenim i egzogenim agensima, koji mogu interagovati sa vitalnim ćelijskim komponentama i dovesti do različitih posledica po organizam. Za razliku od toksičnih agenasa, čiji se efekti brzo ispoljavaju na fiziološkom nivou, genotoksični agensi, koji interaguju sa molekulom DNK, ili sa mehanizmima koji regulišu stabilnost i vernost genoma, imaju mnogo sporiji, ali i opasniji efekat, jer dovode do naslednih promena u genetičkom materijalu – mutacija. U zavisnosti od toga da li se pojavljuju u somatskim ili germinativnim ćelijama, mutacije mogu imati različite posledice po organizam, od nastanka degenerativnih bolesti uključujući kancer, pa do genetičkih abnormalnosti potomstva (Simić et al., 2001).

Genetička toksikologija, ili genotoksikologija, je multidisciplinarna nauka koja primenjuje znanja iz oblasti molekularne genetike, DNK reparacije i mutageneze, populacione genetike, matematičkog modeliranja i statistike, kako bi detektovala efekte i posledice izlaganja genotoksičnim agensima. To je široka oblast koja obuhvata izučavanje različitih oštećenja na DNK, dejstvom samih hemijskih agenasa ili njihovih metabolita, kao i novonastale genetičke promene.

Ekogenotoksikologija je jedna od ekotoksikoloških subdisciplina koja se može opisati kao pristup koji primenjuje principe i tehnike genetičke toksikologije da bi se utvrdio potencijalni efekat zagađivača spoljašnje sredine, u formi genotoksičnih agenasa, na stanje ekosistema (Shugart i Theodorakis, 1994). Genetička ekotoksikologija se može definisati i kao “studija hemijski ili fizički indukovanih promena na genetičkom materijalu prirodnih biota”. Promene mogu biti direktne alternacije u genima ili ekspresiji gena, ili posledica selektivnih efekata na frekvencu gena. Istraživanja u okviru ekogenotoksikologije su usmerena na biološki monitoring mutagena spoljašnje sredine (environmental mutagens) u određenim ekosistemima i na direktne konsekvence oštećenja DNK.

Da bi se pratio efekat genotoksičnih agenasa spoljašnje sredine na različite organizme u ekosistemu, preuzeti su mnogi testovi koji su preporučeni za detekciju mutagena i kancerogena (OECD, 1986), kao što su testovi za detekciju genskih mutacija,

testovi za detekciju hromozomskih mutacija, kao i testovi za detekciju efekata na molekul DNK.

1.1. *In vivo* i *in vitro* istraživanja u genotoksikologiji

U genotoksikološkim studijama, istraživanja se mogu vršiti *in vivo* na čitavom organizmu, ili *in vitro* na određenom tipu ćelija. U poslednjoj deceniji, prvenstveno zbog etičkih razloga, mnogo truda je uloženo u razvoj *in vitro* sistema koji trenutno imaju široku primenu, ne samo u genotoksikologiji, već i u fiziologiji, endokrinologiji i dr. Ovakav tip istraživanja se obično vrši na primarnim kulturama tkiva ili ćelijskim linijama. Primarne kulture tkiva se prave od eksplanata tkiva; kulture čine najčešće diferencirane ćelije koje odlikuje odsustvo proliferacije, te je ovakav tip kultura obično kratkotrajan. Ćelijske kulture koje mogu biti kultivisane duži vremenski period nazivaju se ćelijskim linijama (Stacy, 2001). Ćelije u ovom tipu kultura odlikuje stalna proliferacija, obično vode poreklo od tumorskih tkiva, ili ređe, ćelija koje su modifikovane da bi se omogućila stalna proliferacija. U genotoksikologiji, kulture sisarskih ćelija imaju veliku ulogu kao modeli za proučavanje mutageneze i kancerogeneze, antimutageneze i hemoprevencije.

1.2. Biomonitoring, bioindikator i biomarkeri

Biomonitoring predstavlja korišćenje organizama za procenu stanja ekosistema. Prilikom biomonitoringa, prikupljaju se i podaci kvantitativne i kvalitativne prirode o prisustvu i distribuciji zagađivača, kao izvorima zagađenja i transportu zagađivača (Munn, 1973). U ekotoksikološkim i ekogenotoksikološkim studijama, biomonitoring se može vršiti primenom dva različita pristupa: *in situ* i *ex situ*. U *in situ* studijama, monitoring se vrši direktno u životnoj sredini na određenom lokalitetu od interesa. U *ex situ* studijama, proučavanje uticaja određenih supstanci vrši se u laboratorijskim uslovima.

Bioindikaciju je moguće izvoditi na svim nivoima organizacije živih sistema, počevši od molekularnog, preko biohemijsko-fiziološkog, celularnog, individualnog, populacionog, specijskog, biocenološkog (ekosistemskog), biomskog, pa sve do biosfernog.

Bioindikatori su organizmi ili zajednice organizama na osnovu kojih se može proceniti stanje ekosistema (Van Gestel i Van Brummelen, 1996).

Idealni bioindikatorski organizmi bi trebalo da zadovolje sledeće kriterijume (Zhou i sar., 2008):

- da imaju mogućnost akumuliranja visokih koncentracija zagađivača, bez visoke stope mortaliteta,
- da imaju sesilni način života, ili da su slabo pokretni, kako bi se dobijeni odgovor mogao vezati za određeni lokalitet,
- da su široko rasprostranjeni, kako bi bili primenjivi na većem prostoru,
- da imaju životni vek dovoljno dug kako bi se dejstvo zagađivača moglo ispoljiti,
- da imaju visoku abundancu i/ili da su jedinke dovoljno velike da bi se mogla obezbediti količina materijala (tkiva) u količinama potrebnim za analize,
- da je uzorkovanje jednostavno i
- da se mogu lako gajiti u laboratoriji.

Biomarkeri predstavljaju biohemijske, fiziološke i histološke indikatore prisustva ksenobiotika i omogućavaju njihovu detekciju pre nego što se njihov efekat odrazi na nivou čitave jedinke i populacije (Forbes i sar., 2006). Po nekim autorima, ponašanje se može takođe posmatrati kao biomarker, dok drugi autori ponašanje zajedno sa preživljavanjem, rastom i reprodukcijom svrstavaju u odgovor na nivou čitave jedinke (Forbes i sar., 2006).

Prema klasifikaciji koju je predložio Peakall (1994), biomarkeri se mogu podeliti na zlatne, srebrne i bronzane. Zlatni biomarkeri ne zahtevaju dodatnu hemijsku analizu kao potvrdu njihove pouzdanosti. Ovaj tip biomarkera je prilično robustan i samo određena grupa jedinjenja može uticati na njih. Primer zlatnog biomarkera je pojava hermafroditizma kod gastropoda pod uticajem tributilina (Nias i sar., 1993; Evans i sar. 2000). Srebrni biomarkeri zahtevaju propratnu fizičko-hemijsku analizu. U ove biomarkere spadaju i DNK oštećenja. U bronzane spadaju biomarkeri koji se tek pojavljuju u studijama i za čiju pouzdanost je potrebno dodatno testiranje (npr. proteini stresa) (Forbes i sar., 2006).

1.2.1. *In situ* biomonitoring

Generalno, organizmi koji se proučavaju u *in situ* studijama, najčešće nisu izloženi jednom zagađivaču, već je to smeša različitih supstanci. Teško je utvrditi da li će u toj smeši supstance imati aditivan, sinergistički ili čak antagonistički efekat jedna na drugu. Jedino što preostaje jeste povezivanje biomarkera i izmerenih hemijskih parametara u vodi ili sedimentu na lokalitetima, pomoću korelacija ili multiple regresije. Čak i u slučaju kad postoji statistička značajnost, teško je sa sigurnošću tvrditi da je supstanca sa čijom je koncentracijom uočena najviša korelacija glavni uzrok za povišene vrednosti praćenog biomarkera (Forbes i sar., 2006). Dodatno, situaciju komplikuju novootkriveni („emerging“) polutanti, koje je teško kvantifikovati zbog niskih koncentracija, ali koji mogu imati veliki uticaj na praćeni biomarker.

U *in situ* studijama, upotrebljavaju se pristupi pasivnog ili aktivnog biomonitoringa, kako bi se procenilo stanje ekosistema. Pasivni monitoring podrazumeva proučavanje efekata sredinskog stresa kod organizama koji naseljavaju određeni lokalitet. Aktivni biomonitoring podrazumeva proučavanje efekata sredinskog stresa kod organizama koji su na određeni vremenski period izloženi na nekom lokalitetu. Organizmi koje izlažemo, najčešće se prikupljaju na lokalitetima za koje je utvrđeno da stresni faktori čije se dejstvo proučava nisu prisutni, ili je njihovo dejstvo procenjeno kao zanemarljivo („čisti“ lokaliteti), ili se oni gaje u laboratoriji, u odsustvu stresa (De Kock i Kramer, 1994; Smolders i sar., 2003). Aktivni biomonitoring je sve zastupljeniji u praćenju uticaja raznih polutanata, jer poseduje brojne prednosti u odnosu na pasivni biomonitoring. Na primer, aktivnim monitoringom se mogu izbeći problemi u smislu variranja odgovora zbog pola, veličine i reproduktivnog statusa jedinki, kao i razlike u odgovoru usled dejstva drugih abiotičkih faktora (Bauer i sar., 1991; Cossu i sar., 2000; Arbuckle i Downing, 2002; Andral i sar., 2004; Viarengo i sar., 2007; Štambuk i sar., 2009). Aktivni biomonitoring je u poslednjoj deceniji uspešno primenjen na velikom broju filogenski različitih organizama (Nigro i sar., 2006; Jha, 2008).

1.3. *Ex situ* studije

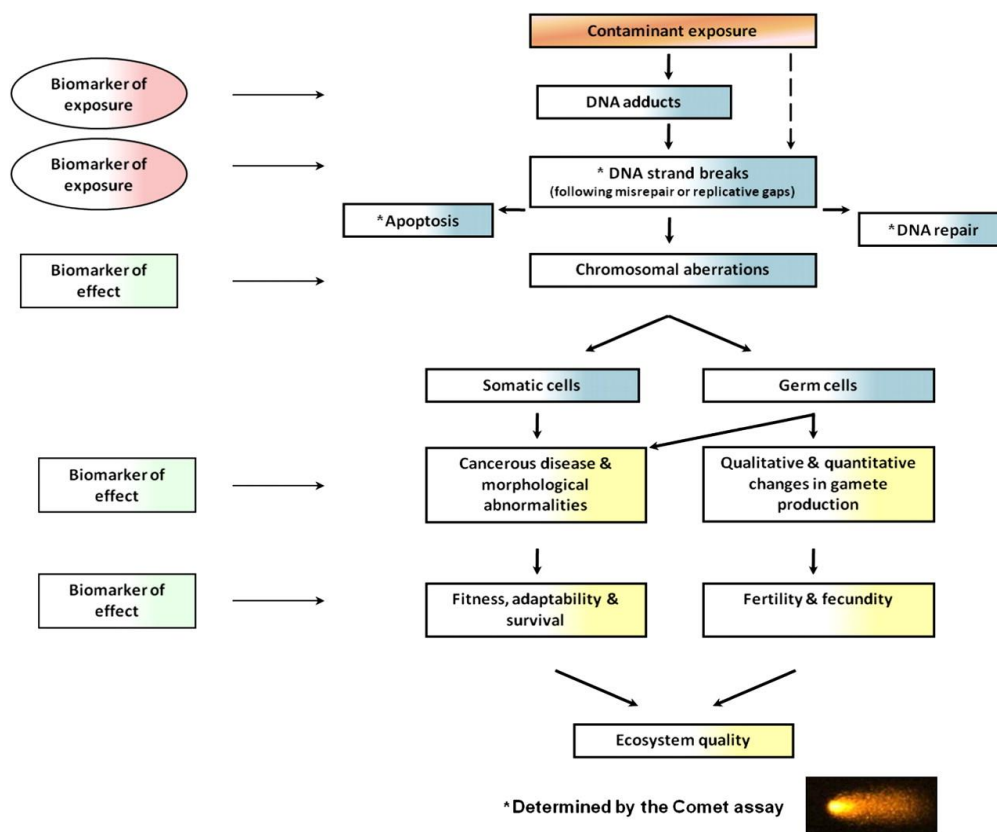
Kao što je pomenuto ranije, u *ex situ* studijama, proučavanje uticaja određenih supstanci vrši se u laboratorijskim uslovima. Prilikom korišćenja akvatičnih bioindikatora, obično se primenjuju statički, semi–statički ili protočni sistemi. U statičkim sistemima, test supstanca se dodaje samo na početku tretmana. Tokom tretmana, voda u akvarijumima se ne menja. Ovakvi sistemi se obično koriste pri testiranju supstanci čija stabilnost se neće narušiti u datim eksperimentalnim uslovima. Semi-statički sistemi se koriste za manje stabilne supstance. U semi-statičkim sistemima, voda sa test supstancom se periodično zamenjuje kako bi se minimiziralo variranje koncentracije test supstance tokom tretmana. U protočnim test sistemima, voda sa test supstancom se konstantno zamenjuje tokom čitavog tretmana (Environmental Protection Agency, US, 1996).

1.4. Oštećenje DNK molekula kao biomarker

Zagađivači prisutni u životnoj sredini mogu delovati na molekul DNK i dovesti do nastanka različitih oštećenja, kao što su jednolančani i dvolančani prekidi, modifikacije baza, DNK-DNK ili DNK-protein unakrsne veze. Ukoliko se oštećenja na molekulu DNK ne poprave, mogu biti zaustavljeni procesi replikacije i transkripcije, može doći do nastanka mutacija, koje dalje mogu voditi nizu bioloških promena, ne samo na nivou ćelije, već i organa i čitavog organizma i populacije.

Da bi se pratio efekat genotoksičnih agenasa iz životne sredine na različite organizme, koriste se mnogi biomarkeri poput oštećenja DNK molekula, genskih mutacija, hromozomskih aberacija i testovi zasnovani na učestalosti mikronukleusa.

Biomarkere možemo podeliti na biomarkere izlaganja i biomarkere efekta. S obzirom da se mogu ispraviti, oštećenja DNK molekula koja se mogu detektovati npr. komet testom smatraju se biomarkerima izlaganja, dok strukturne promene hromozoma, koje se mogu detektovati mikronukleus testom, ili testom razmene sestrinskih hromatida (eng. Sister Chromatide Exchange - SCE), smatramo biomarkerima efekta (**Slika 1.1.**).

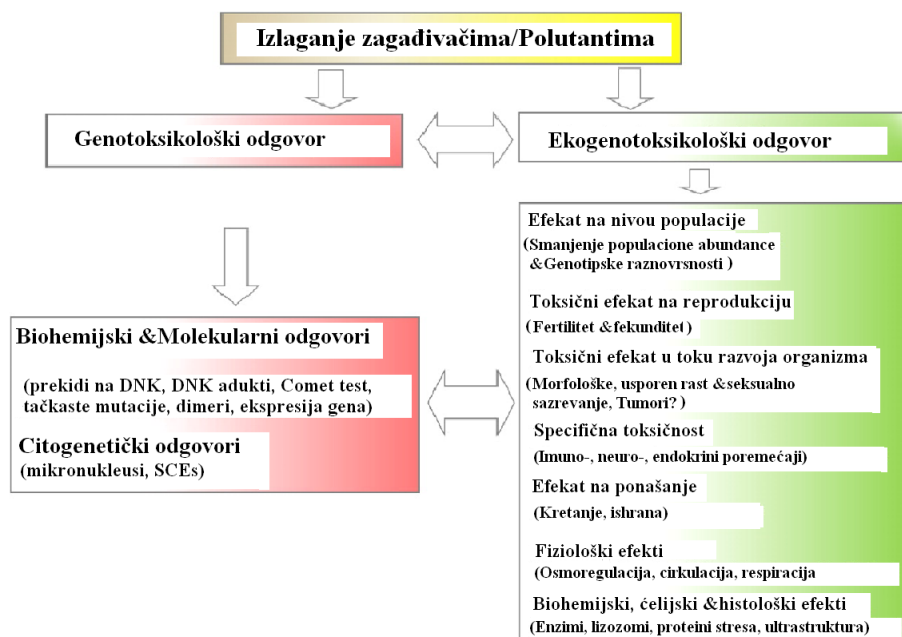


Slika 1.1. Značaj i posledice oštećenja DNK molekula (Jha, 2008)

U zavisnosti od toga da li se pojavljuju u somatskim ili germinativnim ćelijama, DNK oštećenja mogu imati velike posledice na nivou ćelije, organa, jedinke, pa i čitavih populacija. Ukoliko se pojave u somatskim ćelijama i ostanu neispravljena mehanizmima popravke, oštećenja mogu uzrokovati morfološke abnormalnosti i pojavu kancera, te uticati na fiziološko stanje, adaptiranost i preživljavanje jedinke. Ukoliko se pojave u germinativnim ćelijama, može doći do kvantitativnih i kvalitativnih promena u produkciji gameta, što će imati uticaj na fertilitet i fekunditet (**Slika 1.2.**). U studijama u genotoksikologiji, velika pažnja je posvećena oštećenjima DNK koja se javljaju u germinativnim ćelijama, zbog posledica koje ova oštećenja mogu imati na sledeću generaciju. Ovoj činjenici treba dati još veći značaj u ekogenotoksikološkim studijama, uzimajući u obzir da kod većine invertebrata ne postoji barijera između krvi i gonada, kao i da smena generacija ima veću frekvenciju u poređenju sa sisarima. U ekogenotoksikološkoj literaturi već postoje podaci o korelaciji između nivoa DNK oštećenja i embriotoksičnosti (Jha i sar., 2000a; Jha i sar., 2000b; Hagger i sar., 2005),

stepena produkcije embriona (Lee i Steinert, 2003), rasta i reprodukcije (Steinert i sar., 1998a; Steinert i sar., 1998b).

Dosadašnja istraživanja pokazuju da su rezultati komet testa značajno korelisani sa mikronukleus testom, kao i sa drugim biomarkerima (**Slika 1.2.**).



Slika 1.2. Veza između oštećenja DNK molekula drugih biomarkera (Jha, 2008)

1.4.1. Bazalni nivo oštećenja DNK molekula

Da bismo mogli pratiti određeni biomarker, neophodno je utvrditi bazalne, odnosno referentne vrednosti biomarkera za odabranu vrstu. Obično jedinke odabrane vrste iz populacija koje nisu pod stresom, najčešće sa „čistih“ lokaliteta, ili jedinke gajene u laboratoriji, služe za određivanje bazalnih vrednosti. Često, međutim, nije moguće odabrati lokalitet na samoj reci koji bi se mogao smatrati referentnim. S druge strane, odgajanje test organizama u laboratorijskim uslovima često je složeno i skupo. Takav je slučaj i sa slatkovodnim školjkama, s obzirom na njihov životni ciklus i uslove sredine koji su potrebni za razviće jedinke. Kao rešenje problema referentnih vrednosti, može se koristiti aklimacija individua. Aklimacija podrazumeva gajenje jedinki prikupljenih u prirodi u kontrolisanim uslovima, u određenom vremenskom periodu. U kontrolisanim uslovima stresorni faktori su eliminisani, ili svedeni na minimum, čime se, nakon definisanog

vremena, jedinka dovodi u stanje minimalnog stresa. U ovakvim uslovima nivo odgovora praćenog biomarkera je standardizovan, te je moguće porediti odgovor nakon izlaganja stresnom faktoru, sa onim koji smatramo referentnim.

1.5. Komet test (SCGE) za detekciju DNK oštećenja

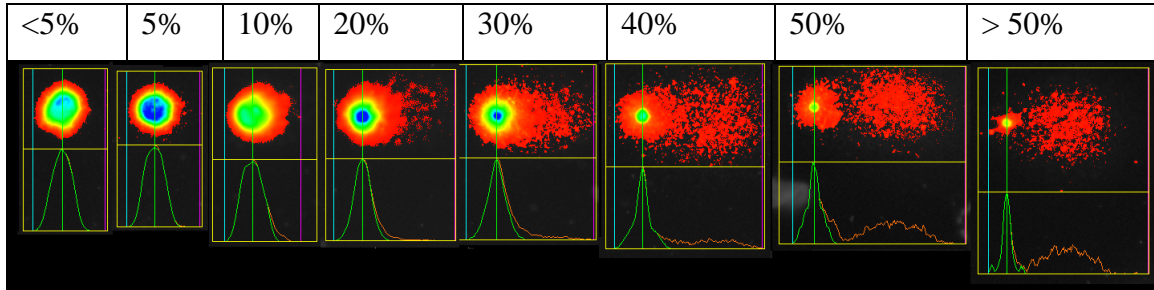
Komet test ili test elektroforeze pojedinačnih ćelija (eng. Single Cell Gel Electrophoresis - SCGE), je osetljiva i brza tehnika za detekciju DNK oštećenja u pojedinačnim ćelijama. Zasniva se na sposobnosti negativno naelektrisanih DNK fragmenata da se kreću kroz gel (agarozu), tokom elektroforeze, ka pozitivnoj elektrodi, pri čemu oštećena jedra izgledaju kao komete. U ovom testu, oblik, veličina i količina DNK u okviru komete imaju važnu ulogu u određivanju nivoa oštećenja DNK.

Komet test je prihvaćen kao jedna od osnovnih metoda u praćenju genotoksičnog efekta zagađujućih supstanci na akvatične organizme (Dixon i sar., 2002). Korišćen je u brojnim ekogenotoksikološkim ispitivanjima na školjkama (De Lafontaine i sar., 2000; Pavlica i sar., 2001; Klobučar i sar., 2003; Binelli i sar., 2007; Štambuk i sar., 2009; Guidi i sar., 2010, Kolarević i sar., 2013, Vuković-Gačić i sar., 2014) i pokazuje korelaciju sa ostalim genotoksikološkim testovima, kao što su hromozomske aberacije, razmena sestrinskih hromatida i mikronukleus test (Dhawan i Bajpayee, 2009).

Modifikovana, alkalna verzija komet testa, koju je opisao Singh i sar. (1988), omogućava detekciju i jednolančanih i dvolančanih prekida, kao i alkalno labilnih mesta. Slike kometa mogu se analizirati manuelno, ili uz pomoć kompjuterskog softvera. Kada se vrednuju manuelno, jedra su podeljena u klase na osnovu različitog nivoa oštećenja, od neoštećenih jedara (klasa 0), do jedara kojima je gotovo čitava DNK u repu komete (klasa 4), ili na osnovu odnosa dužina između glave i repa komete (Collins i sar., 1997).

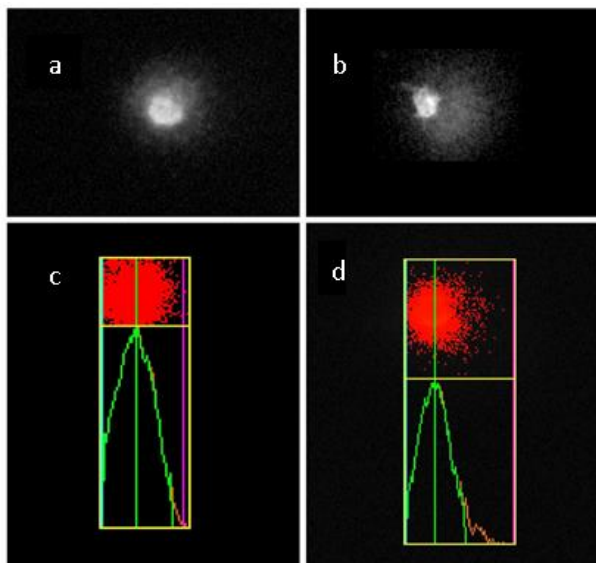
U skorašnjim istraživanjima, komete se analiziraju korišćenjem računarskog programa – Comet IV Computer Software (Perceptive Instruments, UK), koji automatski prepoznaje nivo oštećenja (**Slika 1.3.**). Programski paket razmatra tri parametra putem kojih se može identifikovati nivo oštećenja DNK: intenzitet repa (eng. - Tail Intensity - TI), moment repa (eng. Olive Tail Moment - OTM) i dužina repa (eng. - Tail Length - TL). TI predstavlja procenat fluorescencije u repu komete u odnosu na fluorescenciju čitave

komete. OTM je parametar izveden kombinovanjem parametra TI i udaljenosti centara mase glave i repa (Olive i Judit, 2006; Cok i sar. 2011; Rosenberger i sar., 2011). TL predstavlja dužinu repa komete.



Slika 1.3. Izgled hemocita sa različitim nivoom DNK oštećenja; iznad slika kometa predstavljena je vrednost TI kao parametra oštećenja DNK

Etidijum bromid (EB) se najčešće koristi za bojenje DNK u komet testu. EB je interkalirajući agens koji se vezuje za DNK materijal i na taj način čini DNK fragmente lako uočljivim. Pored EB, za bojenje se može koristiti i akridin oranž (AO), sajber gold, sajber grin i sl. Prvi korak u testu je pronalaženje kometa na fluorescentnom mikroskopu i „zamrzavanje“ slika pomoću kamere. Zatim se definišu glava i rep komete. Dužina repa meri se u pikselima, koji se potom preobraćaju u mikrone (**Slika 1.4.**).



Slika 1.4. (a) Jedro hemocita iz kontrolne grupe školjki sa minimalnim DNK oštećenjem, što se ogleda u nepostojanju migracije DNK fragmenata. (b) Jedro hemocita iz školjki koje su sakupljene na zagađenim lokacijama pokazuje visok nivo DNK oštećenja, sa značajno smanjenim jezgrom jedra i velikim oblakom DNK fragmenata koji migriraju od jezgra formirajući karakterističan rep komete. (c,d) Komete se analiziraju Komet IV kompjuterskim softverom (Perceptive Instruments, UK).

1.6. Akvatični ekosistemi – mikrobiološko i hemijsko zagađenje

Vode su značajan resurs i koriste se u različite svrhe kao što su proizvodnja vode za piće, proizvodnja električne energije, rekreacija, navodnjavanje i sl. Da bi bila bezbedna za korišćenje, voda mora da poseduje odgovarajući hemijski kvalitet i ne sme sadržati patogene bakterije, među kojima su najzastupljeniji enterični patogeni. Površinske vode, međutim, kroz vekove služe kao recipijenti otpadnih voda. Otpadne vode predstavljaju opasnost usled visoke koncentracije nutrijenata, visoke koncentracije organskih i neorganskih jedinjenja kao i visoke brojnosti patogena, koji ovom prilikom dospevaju u akvatične ekosisteme. U zavisnosti od socio-ekonomskih prilika i nacionalnih regulativa, otpadne vode se u različitim zemljama u manjem ili većem stepenu prerađuju pre ispuštanja u vodotokove. Proces i za preradu otpadnih voda, koji se danas najčešće primenjuju, dizajnirani su tako da eliminišu samo određene grupe organskih i neorganskih polutanata. Ovim procesima, pasivno, smanjuje se i broj patogenih mikroorganizama.

1.7. Hemijsko zagađenje i procena rizika po životnu sredinu

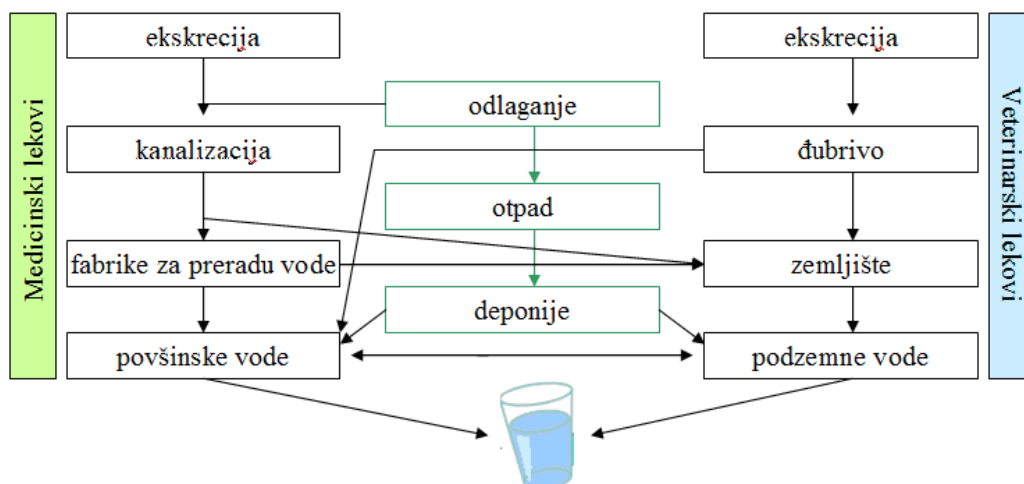
Procenjuje se da u životnu sredinu dospeva oko 150.000 različitih supstanci antropogenog porekla (Slobodnik, 2013). Na listu postojećih polutanata u akvatičnim ekosistemima, svake godine se dodaje 400 - 500 novih jedinjenja. Na listama se mogu razdvojiti dve grupe zagađivača: neorganske i organske supstance. Dominantni članovi grupe neorganskih supstanci su metali, amonijak, fosfati, nitrati i nitriti. U grupi organskih zagađivača, dominiraju deterdženti, insekticidi, herbicidi, policiklična aromatična jedinjenja, polihlorovani bifenili, trihloretileni i perhlorati (Wright i Welbourn, 2002). Jasno je, međutim, da u monitoring nije moguće uključiti sve ove supstance, već se formiraju liste sa supstancama koje predstavljaju najveću pretnju po biotu - prioritizacija. Ove supstance su u Okvirnoj direktivi o vodama (Water Framework Directive - Directive 2000/60/EC) naznačene kao hazardne supstance. U okviru hazardnih supstanci izdvaja se podgrupa nazvana prioritetne supstance, koje karakteriše visoka toksičnost, perzistentnost i visoka stopa bioakumulacije. Dozvoljene koncentracije ovih supstanci u ekosistemima su određene zakonskim regulativama, a kao osnova se koristi Direktiva o standardima u

vodenim ekosistemima (EQS Directive, 2008/105/EC). Genotoksičnost odlikuje većinu prioritetnih supstanci. Među njima se ističu teški metali i to kadmijum, živa, olovo i niki (Johns i Luoma, 1990; Tran i sar., 2007; Vincent-Hubert i sar., 2008), policiklična aromatična jedinjenja (Akchsa i sar., 2003; Pandrangi i sar., 1995).

Perzistentni organski polutanti (POP) su grupa jedinjenja koju karakteriše otpornost na fotolitičku, hemijsku i biološku transformaciju. POP se ne rastvaraju u vodi, ali se rastvaraju u mastima, te podležu bioakumulaciji. Zbog visoke stope bioakumulacije, njihova koncentracija u tkivima životinja je obično mnogo viša od koncentracije u vodi i sedimentu. Dozvoljene koncentracije ovih supstanci u životnoj sredini su regulisane Stokholmskom konvencijom (United Nations Environment Programme, 2004). Većinu članova ove grupe pored visoke bioakumulacije i toksičnosti karakteriše i genotoksičnost (Sandal i sar., 2008; Marabini i sar., 2011).

Razvojem analitičkih metoda u hemiji, dolazi do smanjenja limita detekcije i kvantifikacije supstanci u rastvorima (čak ng/L), a samim tim i otkrivanja novih grupa zagađivača u akvatičnim ekosistemima, tzv. „novonastali“, ili „novootkriveni“ zagađivači („emerging pollutants“). Veliki problem predstavlja što „opasne“ koncentracije ovih zagađivača nisu ispitane, dozvoljene koncentracije ovih supstanci u ekosistemu nisu zakonski regulisane, pa ove supstance nisu uključene u monitoring. Lista supstanci koje ulaze u grupu „novootkrivenih“ zagađivača je veoma duga, ali se kao dominantni mogu izdvojiti lekovi, produkti za ličnu higijenu, biocidi, derivati benzina, toksini algi, antioksidanti, sredstva za dezinfekciju, droge, dodaci hrani, nanočestice i supstance za prezervaciju drveta. Velika pažnja se obraća na lekove kao „novootkrivene“ zagađivače. Fabrike za preradu otpadne vode kao i postrojenja za proizvodnju vode za piće ne eliminišu većinu lekova prilikom procesa prečišćavanja. Na **slici 1.5.** je šematski predstavljen put kojim lekovi dospevaju u površinske i podzemne vode a samim tim i u vodu za piće.

U okviru farmaceutskih supstanci koje mogu biti potencijalni zagađivači, najveću pretnju predstavljaju antibiotici, analgetici, antiinflamatorni lekovi, steroidi i hormoni, lekovi za tretman psihičkih oboljenja i citostatici.



Slika 1.5. Šematski prikaz izvora medicinskih i veterinarskih lekova u površinskim i podzemnim vodama (WHO, 2012)

1.7.1. Citostatici

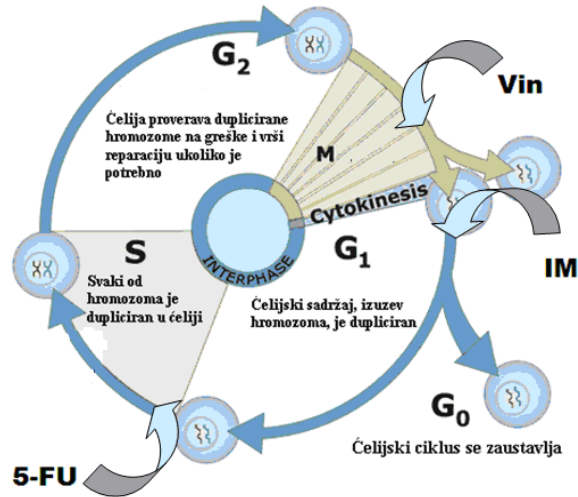
Citostatici predstavljaju veliku grupu, uglavnom organskih jedinjenja, sa širokim spektrom fizičko-hemijskih osobina. Njihova različitost i prisustvo u životnoj sredini u tragovima, čine njihovu detekciju velikim izazovom (Ternes i sar., 2005).

Dodatan izazov za praćenje sudbine citostatika u životnoj sredini predstavlja i niz metabolita koji nastaju tokom primene lekova.

Anatomska terapijska klasifikacija (ATC), smešta citostatike u klasu L-antineoplastika i imunomodulirajućih agenasa, prema njihovoj hemijskoj strukturi i terapijskim svojstvima, i deli ih dodatno na pet klasa:

- 1) L01A- Alkilirajući agensi,
- 2) L01B- Antimetaboliti,
- 3) L01C- Biljni alkaloidi i drugi prirodni proizvodi,
- 4) L01D- Citotoksični antibiotici i slične supstance,
- 5) L01X- Ostali neoplastični agensi.

U okviru istraživanja ove disertacije, odabrani su citostatici iz prve tri grupe i to: 5-fluorouracil (L01B), cisplatina (L01A), vinkristin sulfat (L01C), etopozid (L01C) i imatinib mezilat (L01X). U zavisnosti od mehanizma dejstva, odabrani citostatici ostvaruju svoju ulogu u različitim fazama ćelijskog ciklusa, što je šematski predstavljeno na **Slici 1.6**. Pregled podataka iz literature o odabranim citostaticima je prikazan u **tabeli 1.1**.



Slika 1.6. Šematski prikaz faza u ćelijskom ciklusu u kom odabrani citostatatici ostvaruju svoju ulogu: cisplatina i etopozid mogu da ostvare svoju ulogu u svakoj fazi ciklusa

Tabela 1.1. Pregled podataka o poreklu, primeni i mehanizmu dejstva odabranih citostatika.

Citostatik	Godina otkrića	Godina od koje se koristi u terapiji	Poreklo	Primena	Mehanizam dejstva
5-Fluorouracil (5-FU)	1957. Heidelberg	1957.	Sintetisan, fluorisan analog pirimidina	Karcinom debelog creva, jednjaka, želuca i pankreasa	Antimetabolit - bazni analog
Cisplatina (CisPt)	1893. Werner	1971.	Sintetisan	Kancer ovarijuma, pluća, neuroblastoma, karcinoma probavnog trakta i metastaza na mišićima u vratnom regionu i glavi.	Alkilirajući agens - stvara unakrsne veze
Etopozid (ETO)	1950. Sandoz	1983.	Modifikovan podofilotoksin izolovan iz biljke <i>Podophyllum peltatum</i>	Karcinoma testisa, pluća, ovarijuma, dojke, želuca, Kapoši sarcoma, Hodkinove bolesti i Ne-Hodkinovog limfoma	Inhibitor topoizomerase II
Vinkristin sulfat (VIN)	1950.	1963.	Alkaloid poreklom iz biljke <i>Catharanthus roseus</i>	Tretman limfoidne leukemije, akutne mieloidne leukemije, Hodkinove bolesti, Ne-Hodkinovog limfoma, neuroblastoma, rabdomiosarkoma, Wilmsovog tumora, tumora na mozgu i karcinoma pluća.	Intereaguje sa deobnim vretenom
Imatinib mezilat (IM)	1990. Novartis (Glevec)	2001.	Derivat 2-fenilaminopirimidina	Hroničnu mijeloidnu leukemiju, mastocitozu, hipereozinofilni sindrom, hroničnu eozinofilnu leukemiju, dermatofibrosarkom	Inhibitor tirozin kinaze

1.7.2. Procena rizika po životnu sredinu

Među „novootkrivenim“ polutantima, citostatici tek od skora privlače veliku pažnju pošto se u odnosu na druge zagađivače u životnoj sredini javljaju u daleko nižim koncentracijama. Uprkos niskih koncentracija, mogu predstavljati rizik po životnu sredinu uzimajući u obzir mehanizme dejstva ovih lekova, kao i njihove fizičko-hemijske karakteristike koje određuju njihovu dalju sudbinu u životnoj sredini (**Tabela 1.2.**).

Tabela 1.2. Faktori koji utiču na sudbinu citostatika u životnoj sredini

Citostatik	Biorazgradivost		Adsorpcija na čestice mulja		Fotoliza	
	5-FU	da/ne	Straub, 2010; Kiffmeyer i sar. (1998)	ne	Mahnik i sar. (2007)	ne
CisPt	-	-	da	Lenz i sar. (2005)	da	Fry i sar. (2002)
VIN	ne	Al-Ahmad i Kümmerer (2001).	da	Kosjek i Heat (2011)	-	-
ETO	ne	Al-Ahmad i Kümmerer (2001).	-	-	da	Kosjek i Heat (2011)
IM	-	-	-	-	-	-

Podaci o koncentracijama citostatika u životnoj sredini su veoma oskudni, naročito informacije vezane za koncentracije citostatika u površinskim vodama. U literaturi se mogu naći podaci o koncentracijama citostatika u otpadnim vodama, izuzev za IM (**Tabela 1.3.**), dok za površinske vode trenutno postoje podaci samo za 5-FU u Sloveniji (<0,5 ng/L, Kosjek i sar., 2013).

Tabela 1.3. Pregled literaturnih podataka o koncentracijama citostatika u otpadnim vodama

Citostatik	Koncentracija	Tip vode	Referenca
5-FU	20-122 µg/L	kanalizacija bolnice	Mahanik i sar. (2004)
CisPt	5-145 µg/L	kanalizacija bolnice	Lenz i sar. (2005)
VIN	< 20 ng/L	kanalizacija bolnice	Yin i sar. (2010)
ETO	6-380 ng/L	kanalizacija bolnice	Yin i sar. (2010)

Na osnovu podataka o potrošnji citostatika na određenoj teritoriji, moguće je okvirno predvideti koncentraciju citostatika u životnoj sredini (eng. Predicted Environmental Concentration - PEC).

Konzervativna i rafinisana PEC vrednost (r-PEC) se računaju na osnovu formule (Besse i sar., 2008):

$$PEC = \frac{\text{Godišnja potrošnja citostatika} \times F_{\text{eks}} \times F_{\text{pov}}}{\text{OV stanovnika} \times \text{razblaženje} \times \text{br. stanovnika na teritoriji} \times 365}$$

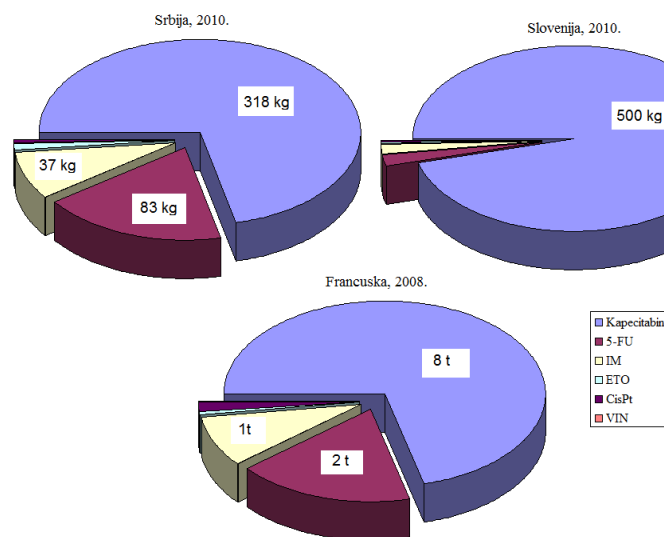
F_{eks} - Frakcija izlučene aktivne forme (1 pri računanju konzervativne vrednosti PEC)

F_{pov} - Frakcija aktivne forme nakon prerade otpadne vode (1 pri računanju konzervativne vrednosti PEC)

OV stanovnika – zapremina otpadne vode po stanovniku po danu (200 L)

Razblaženje – standardna vrednost 10

Na osnovu podataka o prodaji lekova u 2010. godini, koje je ustupila Agencija za lekove Republike Srbije, vidimo da su u Srbiji 5-FU i njegov prekursor kapecitabin najzastupljeniji u terapiji među odabranim citostaticima (Slika 1.7.). Može se uočiti sličan trend u potrošnji lekova i u Francuskoj tokom 2008., na osnovu podataka iz rada Besse i sar., (2012). U Sloveniji je kapecitabin daleko zastupljeniji u odnosu na ostale lekove (Filipič i sar., 2013). U **tabeli 1.4.**, predstavljene su vrednosti PEC (konzervativne i rafinisane) dobijene na osnovu podataka o potrošnji.

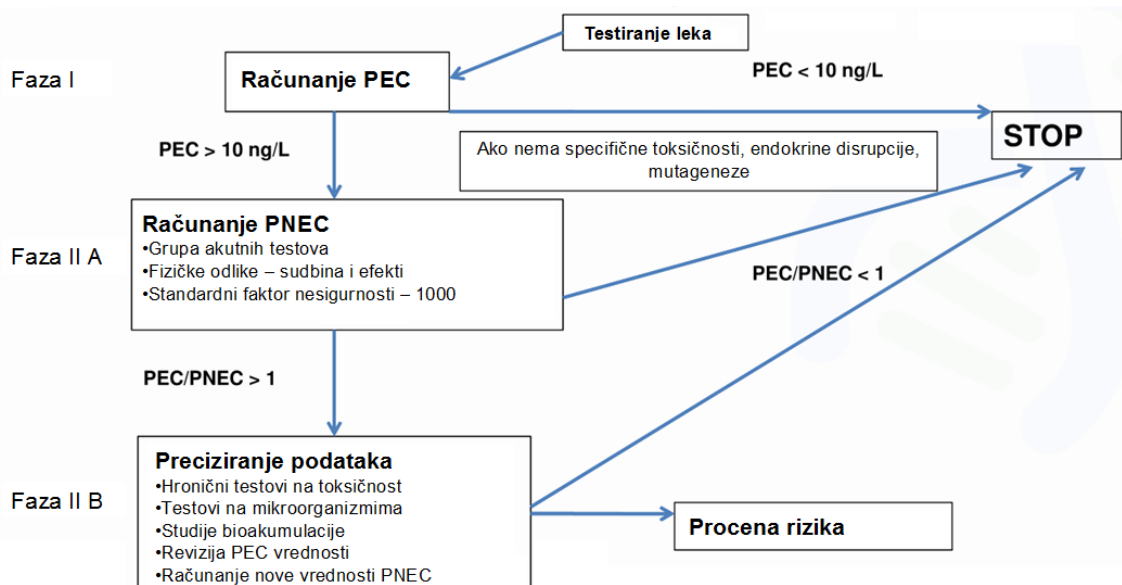


Slika 1.7. Potrošnja citostatika kapecitabina, 5-FU, IM, ETO, CisPt i VIN u Srbiji 2010., Sloveniji 2010. i Francuskoj 2008. godine

Tabela 1.4. Vrednosti PEC i r-PEC na osnovu potrošnje citostatika u Sloveniji, Francuskoj i Srbiji

citostatik	Konzervativna vrednost PEC ng/L			F _{eks}	Rafinisana vrednost PEC ng/L		
	SLO	FRA	SRB		SLO	FRA	SRB
Kapцитabin	232,120	117,240	60,693	0,030	6,964	3,517	1,821
5-FU	9,310	39,570	15,795	0,200	1,862	7,914	3,159
IM	5,030	19,950	7,063	0,250	1,258	4,988	1,766
ETO	0,700	0,940	1,100	nn	0,700	0,940	1,100
CisPt	0,740	0,520	0,358	1,000	0,740	0,520	0,358
VIN	/	0,003	0,002	nn	/	0,003	0,002

Na **slici 1.8.** šematski je predstavljen proces procene rizika po životnu sredinu. Prilikom procene da li određeni farmaceutske proizvod predstavlja rizik po životnu sredinu, uzima se u obzir izračunata vrednost konzervativne PEC. Ukoliko je ova koncentracija manja od 10 ng/L, smatra se da taj proizvod ne predstavlja rizik po životnu sredinu (izuzev ako postoje podaci o specifičnoj toksičnosti, endokrinoj disrupciji i mutagenizi), međutim ukoliko je koncentracija viša od 10 ng/L, sprovodi se niz akutnih biotestova.



Slika 1.8. Šematski prikaz sistema za procenu rizika po okolinu Evropske agencije za medikamente (European medicines agency - EMA, 2006)

Na osnovu rezultata ovih testova određuje se koncentracija test supstance za koju se procenjuje da nema efekata na biotu (PNEC - eng. Predicted no effect concentration). Na osnovu odnosa PEC/PNEC se odlučuje da li je potrebno nastaviti ili stopirati testiranje. Ako je odnos PEC/PNEC manji od 1 test supstanca ne predstavlja rizik po okolinu, ukoliko je veći od 1 sprovode se hronični testovi na toksičnost. U ovoj fazi testiranja, umesto konzervativne, uzima se u obzir rafinisana vrednost PEC, a potom se sa novom vrednošću vrši procena rizika po okolinu (EMA, 2006).

Izuzev koncentracija 5-FU i kapecitabina, vrednosti konzervativne PEC odabranih citostatika ne prelaze granicu od 10 ng/L. Sudeći po pravilniku EMA (2006) CisPt, VIN i ETO ne predstavljaju rizik po okolinu. U slučaju 5-FU i kapecitabina, literaturni podaci (Straub, 2010) dobijeni u testovima akutne toksičnosti (test na algama - inhibicija rasta), test na *Daphnia* sp. (test redukcije) i test na ribama (toksičnost na ranim stupnjevima razvika), pokazuju da je odnos PEC/PNEC < 1, te da ni ova jedinjenja ne predstavljaju rizik po životnu sredinu. Postavlja se pitanje da li su rezultati dobijeni u testovima akutne toksičnosti dovoljni za procenu rizika po životnu sredinu i da li se putem ovih testova može predvideti efekat hroničnog izlaganja organizma.

1.8. Mikroorganizmi kao bioindikator kvaliteta vode

Detekcija i izolacija enteričnih patogena je najčešće prilično skupa i komplikovana, te se kao indirektan pokazatelj njihovog prisustva prate koliformne bakterije i enterokoke (Rompre i sar., 2002). Koliformi su gramnegativne, štapičaste, nesporogene, fakultativno aerobne bakterije koje na 37°C fermentišu laktozu (poseduju enzim β -D galaktozidazu) uz produkciju gasa. Grupa ukupnih koliforma (eng. Total Coliforms - TC) naseljava digestivni trakt invertebrata i vertebrata, ali unutar ove grupe postoje i vrste koje mogu naseljavati vodu i zemljište (Caplenas i Kanarek, 1984; Gauthier i Archibald, 2001; Kavka i Poetsch, 2002). Unutar grupe koliformnih bakterija, izdvaja se podgrupa fekalnih koliforma (eng. Faecal Coliforms - FC), koju čine termotolerantni koliformi, koji mogu da se izoluju na temperaturi od 44°C i pored enzima β -D galaktozidaze poseduju enzim β -D glukoronidazu, a dominantan predstavnik grupe je *Escherichia coli*. Pokazano je da pripadnicima ove grupe bakterija, po dospeću u površinske vode, opada metabolička aktivnost, te gube

sposobnost deobe i opstaju relativno kratak vremenski period. Upravo zbog ovih karakteristika, većina autora smatra da je ova grupa bakterija efikasan pokazatelj prisustva nedavnog fekalnog zagađenja (Korhonen i Martikainen, 1991, Skraber i sar., 2004).

Fekalne enterokoke (FE) su grampozitivne fakultativno aerobne koke organizovane u vidu diplokoka. Fekalnog su porekla, ne formiraju spore i otporne su na visoke koncentracije žučnih soli, natrijum azida i telurita. Ovu grupu čine vrste *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* i *E. hirae* (Pinto i sar., 2002). *E. faecalis* je dominantna vrsta u grupi FE u fecesu humanog porekla, a javlja se još i u fecesu živinskog porekla gde ima nižu procentualnu zastupljenost (Geldreich i Kenner, 1969; Wheeler i sar., 2002), na osnovu čega se može zaključiti da je prisustvo enterokoka pokazatelj fekalnog zagađenja humanog porekla. U zakonskoj regulativi Republike Srbije, određivanje brojnosti koliforma i FE je uključeno u procenu ekološkog statusa površinskih reka („Službeni glasnik RS“ br. 74/2011), dok je na nivou EU praćenje brojnosti *E. coli* i FE u površinskim vodama obavezno na osnovu Direktive o vodi za kupanje (EU Bathing Water Directive, 2006/7/EEC).

Postoje dva glavna pristupa u izolaciji indikatora fekalnog zagađenja: metod membranske filtracije (MF) i metod najverovatnijeg broja (eng. The Most Probably Number - MPN). Svaki od metoda ima svoje prednosti. Metodom MF dobija se tačan broj živih mikroorganizama u uzorku koji su sposobni da formiraju kolonije na membranama kroz koje se uzorak filtrira, te se broj mikroorganizama izražava u jedinicama CFU (eng. Colony Forming Units). Metodom MPN dobija se najverovatniji broj mikroorganizama u uzorku. Metoda se zasniva na zasejavanju uzorka u tečni medijum u velikom broju replikata (čak do 100) i procene najverovatnijeg broja na osnovu statističkih tablica. Kako se prilikom izvođenja metode MPN, kultivacija vrši u tečnom medijumu što više pogoduje većini mikroorganizama u poređenju sa izolacijom na čvrstom medijumu, ovom metodom se obično dobijaju više vrednosti u odnosu na metod MF.

1.9. Školjke kao bioindikatori

Školjke zadovoljavaju većinu kriterijuma za bioindikatorske organizme. Imaju široku rasprostranjenost, filtracioni način ishrane, sesilni način života i sposobnost

akumulacije različitih zagađujućih materija, što ih čini pogodnim organizmima za procenu nivoa zagađenja akvatičnih ekosistema, što potvrđuju mnogi autori (Black i Belin, 1996; Ravera, 2001; Roméo i sar., 2003; Andral i sar., 2004; Bocquené i sar., 2004; Pampanin i sar., 2005; Amiard i sar., 2006; Lehtonen i sar., 2006).

Kao odgovor na stres iz okruženja, školjke pokazuju širok spektar fizioloških, histoloških i molekularnih odgovora, uključujući abnormalnu morfologiju, izmene antioksidativnog statusa, indukciju prekida DNK lanaca, itd. (Pavlica i sar., 2001; Binelli i sar., 2007; Bolognesi i sar., 2004; Rocher i sar., 2006; Coffinet i sar., 2008; Klobučar i sar., 2008).

Zbog veoma visoke osetljivosti, školjke se koriste i kao prvi alarm koji aktivira stresor u okruženju pri čemu se zatvaranje ljuštore (**Slika 1.9.**) i prestanak filtracije posmatra kao signal upozorenja (Kramer i sar., 1989).



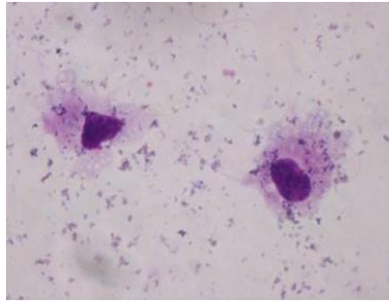
Slika 1.9. Jedinka *S. woodiana* sa otvorenom ljušturou i izbačenim sifonom

U najvećem broju slučajeva, ispitivanja genotoksičnosti se vrše na ćelijama škrge i hemocitama.

Škrge su visoko efikasne u monitoringu genotoksičnosti zbog njihove relativno velike površine i konstantne izloženosti okruženju.

Ćelije hemolimfe-hemocite (**Slika 1.10.**) imaju ulogu u procesima kao što su transport i digestija nutrijenata, eliminacija toksičnih supstanci i malih čestica, usled čega su konstantno izložene polutantima iz vode (Makela i Oikari, 1990; Soares-da-Silva i sar.,

2002; Dhawan i Bajpayee, 2009). Hemolimfa se može lako izvaditi iz mišića aduktora, a što je još važnije, uzimanje hemolimfe ne zahteva žrtvovanje životinje, što je slučaj kada se koristi tkivo škrge.

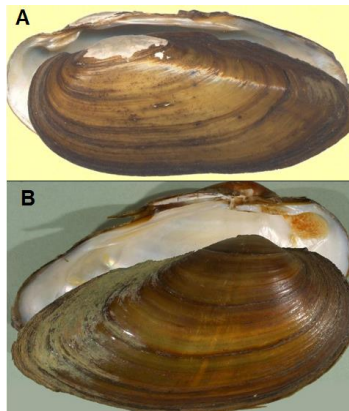


Slika 1.10. Hemocite vrste *Unio pictorum* obojene Gimza bojom

Literatura koja se bavi problematikom hemolimfe slatkovodnih školjki je veoma oskudna. Još uvek je nepoznato poreklo hemocita, tj. hematopoetično tkivo kod školjki. Nije poznato ni u kojoj meri su hemocite diferencirane i da li se u hemolimfi hemocite dele (Carballal i sar., 1997; Binelli i sar., 2009a).

1.9.1. *Unio* sp.

Vrste roda *Unio*, *Unio pictorum* (Linnaeus, 1758) i *Unio tumidus* (Philipsson, 1788) (**Slika 1.11.**) su autohtone vrste u vodenim ekosistemima Srbije. Ove vrste su široko rasprostranjene u centralnoj, severnoj i istočnoj Evropi i pokazuju malu prostornu genetičku varijabilnost (Bauer i Wachtler, 2001).



Slika 1.11. *Unio pictorum* (A) i *Unio tumidus* (B)

1.9.2. *Sinanodonta woodiana*

Kineska jezerska školjka (istočno azijska slatkovodna školjka, ili labud-školjka), *Andonta (Sinanodonta) woodiana* (Lea, 1834) (Bivalvia:Unionida:Unionidae) (Slika 1.12.) je invazivna vrsta koja je postala široko rasprostranjena u celom svetu. Ranija ispitivanja pokazala su sposobnost *S. woodiana* da akumulira mikroelemente (Liu, 2010) i pesticide (Uno i sar., 2001), kao i njen potencijal u detekciji genotoksičnosti (Woznicki i sar., 2004; Kolarević i sar., 2011). Introdukcija i širenje ove školjke iz istočne Azije (Watters, 1997) povezana je sa introdukcijom nekoliko vrsta riba: amur *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes, 1844), srebrni karaš *Carassius auratus gibelio* (Bloch, 1783), beli tolstolobik *Hypophthalmichthys molitrix* (Valenciennes, 1844) i sivi tolstolobik *Aristichthys nobilis* (Richardson, 1844) u vode Srbije i okolnih regiona.



Slika 1.12. *Sinanodonta woodiana*

1.9.3. Primena komet testa na slatkovodnim školjkama u *in situ* i *ex situ* studijama

Predmet istraživanja ovog rada je praćenje oštećenja molekula DNK pomoću alkalnog komet testa u hemocitama slatkovodnih školjki *U. pictorum*, *U. tumidus* i *S. woodiana* u *in situ* i *ex situ* uslovima. Prilikom *in situ* studija, procena kvaliteta vode na proučavanim lokalitetima vršena je na osnovu mikrobioloških i fizičko-hemijskih parametara.

U okviru *in situ* proučavanja, pasivnim i aktivnim biomonitoringom, pratio se uticaj sredine na nivo oštećenja DNK molekula. Pasivni biomonitoring je obuhvatio dve studije:

- U studiji rađenoj na reci Velika Morava, detektovan je uticaj sredinskog stresa u hemocitama jedinki *S. woodiana* sakupljenim na dva lokaliteta.
- U studiji rađenoj na reci Dunav, detektovan je uticaj sredinskog stresa u hemocitama jedinki *U. pictorum*, *U. tumidus* i *S. woodiana* sakupljenim na 34 lokaliteta.

Aktivni biomonitoring je primenjen u studiji rađenoj na teritoriji grada Beograda pri čemu se na jedinkama *U. pictorum* i *U. tumidus*, pratio uticaj otpadnih voda.

U okviru *ex situ* proučavanja, pratio se uticaj odabranih citostatika (5-fluorouracil, cisplatina, vinkristin sulfat, etopozid i imatinib mezilat). Istraživanje je rađeno primenom dva različita pristupa: *in vivo* i *in vitro*.

- Prilikom *in vivo* tretmana jedinke *U. pictorum* i *U. tumidus* su izlagane različitim koncentracijama odabranih citostatika u semistatičkom sistemu.
- Prilikom *in vitro* tretmana, uticaj citostatika je praćen izlaganjem sveže izolovanih hemocita u fiziološkom rastvoru ili izlaganjem hemocita u primarnoj kulturi.

CILJEVI

2. Ciljevi

Široka rasprostranjenost slatkovodnih školjki, ishrana filtriranjem, sesilni način života i sposobnost da akumuliraju zagađivače, čini ih pogodnim organizmima za procenu nivoa zagađenja spoljašnje sredine i uticaja različitih zagađivača, tj. bioindikatorima zagađenja, usled čega se mogu koristiti u ekogenotoksikološkim studijama. Da bismo potvrdili pouzdanost školjki kao bioindikatora neophodno je dovesti u vezu nivo odgovora kod jedinki i koncentraciju polutanata izmerenih *in situ*. Pored toga, u literaturi ne postoje podaci o potencijalnom genotoksičnom uticaju citostatika na organizme u akvatičnim ekosistemima, pa ni procene osetljivosti akvatičnih organizama na njihovo dejstvo. Konkretni ciljevi rada su:

- Da se primenom aktivnog i pasivnog monitoringa ispita uticaj sredine na nivo oštećenja DNK molekula kod tri vrste slatkovodnih školjki *Unio pictorum*, *U. tumidus* i *Sinanodonta woodiana*.
- Da se ispita korelacija između nivoa oštećenja DNK molekula i fizičko-hemijskih i mikrobioloških parametara izmerenih *in situ*.
- Da se u ispita uticaj citostatika 5-fluorouracila, cisplatine, etopozida, vinkristin sulfata i imatinib mezilata na nivo oštećenja DNK molekula u hemocitama slatkovodnih školjki *in vivo*.
- Da se ispita u kojim koncentracijama odabrani citostatici predstavljaju rizik po životnu sredinu.
- Da se ispita da li se na osnovu rezultata *in vitro* tretmana može predvideti efekat citostatika u *in vivo* tretmanu.
- Da se na osnovu dobijenih rezultata proceni primenljivost i osetljivosti komet testa na školjkama u ekogenotoksikologiji.

MATERIJAL I METODE

3. Materijal i metode

3.1. Materijal

3.1.1. 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 ₂ O.....	1.000 mL

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

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

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 ₂ O.....	965 mL

Ne podešavati pH.

10 M NaOH

Potrebno za 500 mL rastvora:

NaOH “ Superlab” (Belgrade, Serbia).....	200 g
dH ₂ O.....	do 500 mL

0,2 M EDTA

Potrebno za 500 mL rastvora:

EDTA „Sigma“ (St.Louis, MO, USA).....	37,2 g
dH ₂ O.....	500 mL

Rasvor III - za neutralizaciju (pH 7,5)

Potrebno za 1 L rastvora:

Tris „Sigma“ (St.Louis, MO, USA).....48,44 g
dH₂O.....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
dH₂O.....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 dH₂O.....900 mL

HBSS+EDTA (fiziološki rastvor koji sprečava koagulaciju)

Potrebno za 100 mL rastvora:

HBSS “Sigma” (St. Louis, MO, USA).....100 mL
EDTA „Sigma“ (St.Louis, MO, USA).....186 mg

Podesiti pH na 7,5

Etidijum bromid SI

10 mg/mL, „Sigma“ (St.Louis, MO, USA)

Arkidin 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 ₂ O.....	980 µL

Arkidin oranž za komet

2 µg/mL, „Sigma“ (St.Louis, MO, USA)

CdCl₂ primarni stok 10 mg/mL

CdCl ₂ „Sigma“ (St.Louis, MO, USA).....	10 mg
dH ₂ O.....	1 mL

3.1.2. Citostatici

Citostatici 5-fluorouracil (CAS br. 51-21-8) , cisplatina (CAS br. 15663-27-1), vinckristin sulfat (CAS br. 2068-78-2) i etopozid (33419-42-0), kupljeni su od firme Sigma-Aldrich. Primarni stok citostatika 5-fluorouracila, cisplatine, vinkristina i imatinib mezilata pravljen je u koncentraciji 1 mg/ml u destilovanoj vodi. Citostatici su rastvarani neposredno na dan eksperimenta. Primarni stok etopozida, pripremljen je u dimetil sulfoksidu (DMSO) u finalnoj koncentraciji 50mM.

5-Fluorouracil primarni stok 1 mg/mL

Potrebno za 10 mL rastvora:

5-fluorouracil „Sigma“ (St.Louis, MO, USA).....	10 mg
dH ₂ O.....	10 mL

Cisplatina primarni stok 1 mg/mL

Potrebno za 10 mL rastvora:

Cisplatin „Sigma“ (St.Louis, MO, USA).....	10 mg
dH ₂ O.....	10 mL

Etopozid primarni stok 50 mM

Potrebno za 1 mL rastvora:

Etopozid „Sigma“ (St.Louis, MO, USA).....	29,4 mg
DMSO.....	10 mL

Vinkristin sulfat primarni stok 1mg/mL

1mg/mL u dH₂O „Sigma“ (St.Louis, MO, USA)

Imatinib mezilat primarni stok

Imatinib mezilat, kupljen je od firme NOVATRIS PHARMA STEIN AG, Stein, Švajcarska u vidu Gleevec film tableta sa sastavom:

Imatinib mezilat.....	400 mg
Celuloza mikrokristalna.....	139,4 mg
Hipromeloza.....	10 mg
Krospovovidon.....	112 mg
Magnezijum-stearat.....	5,6 mg
Silicijum-dioksid.....	5 mg
Boja Premix red/yellow.....	21,5 mg

Prilikom *in vivo* eksperimenata sa imtinib mezilatom, pravljen je rastvor tablete u finalnoj koncentraciji 1mg/ml. Tableta je rastvarana 3h na sobnoj temperaturi na magnetnoj

mešalici. Kako tableta pored imatinib mezilata sadrži i komponente nerastvorljive u vodi, dobijena je emulzija sa vidnim zamućenjem.

3.1.3. Podloge i medijumi

Eozin metilne blue agar „HIMEDIA“ Mumbai, India

Potrebno za 1 L:

Pepton.....	10 g
K ₂ HPO ₄	2 g
Laktoza.....	5 g
Sukroza.....	5 g
Eozin-Y.....	0,4 g
Metilensko plavo.....	0,065 g
Agar.....	13,5 g
dH ₂ O.....	1 L

Autoklavirati (20 min, 121°C, 1 bar)

MacConkey agar „Torlak“ Srbija

Potrebno za 1 L:

Pepton-4.....	20 g
Žučne soli.....	1,5 g
NaCl.....	5 g
Agar.....	13,5 g
Neutral crveno.....	0,03 g
Kristal violet.....	0,001 g
dH ₂ O.....	1 L

Autoklavirati (20 min, 121°C, 1 bar)

Dekstrozni teluritni agar, „Torlak“ Srbija

Potrebno za 1 L:

Pepton-1

Mesni ekstrakt.....10 g

Ekstrakt kvasca.....3 g

Dekstroza.....5 g

NaCl.....5 g

Agar.....20 g

dH₂O.....1 L

Nakon autoklaviranja (20 min, 121 °C, 1 bar) ohladiti podlogu do 60°C i dodati 5 mL kalijum telurita (8 mg/mL)

Medijum za primarnu kulturu hemocita (MPKH)

Potrebno za 300 mL:

Leibovitz's L-15 „PAA“ Austrija.....45 mL

Penicilin/Streptomycin 100x „PAA“ Austrija.....0,8 mL

200 mM L-Glutamin „PAA“ Austrija.....3 mL

Kanamycin „Sigma“ (25 mg/mL) (St.Louis, MO, USA).....0,3 mL

dH₂O sterilna.....252 mL

Pomešati komponente, podesiti pH na 7,5 a potom sterilisati rastvor filtriranjem. Dodati teleći serum u finalnoj koncentraciji 10%.

Teleći serum „PAA“ Austrija.....33 mL

Vodonik peroksid

3% rastvor vodonik peroksida Farmanea Galenska Laboratorija, Beograd

Za post-tretman pripreman 20 µM rastvor vodonik peroksida razblaživanjem komercijalnog stoka u 1xPBS

3.2. Eksperimenti rađeni *in situ*

3.2.1. Velika Morava – pasivni biomonitoring

Istraživanje je vršeno u periodu od maja 2010. do februara 2011. na lokalitetima Varvarin i Bagrdan. Prilikom izlaska na teren, jedinke vrste *Sinanodonta woodiana*, uzorkovane su pomoću bentološke mreže. Jedinke su do laboratorije transportovane u rashladnim kutijama. Analiza je rađena odmah po dospeću biološkog materijala u laboratoriju (do 8 h od trenutka uzorkovanja).

Prilikom svakog uzorkovanja školjki, pomoću multiparametarske sonde, mereni su fizičko – hemijski parametri vode (O_2 , $t^{\circ}C$, pH, NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-}), takođe uziman je uzorak vode za mikrobiološke analize. Od mikrobioloških parametara analizirani su ukupni koliformi, fekalni koliformi kao i fekalne enterokoke. Republički Hidrometeorološki zavod Srbije, obezbedio je dodatne podatke o koncentracijama teških metala u vodi. Podaci o fizičko – hemijskim parametrima predstavljeni su u **Tabeli 1 (Prilog 1)**.

Kako je reka Velika Morava čitavim tokom pod uticajem zagađenja, na samoj reci nije bilo moguće odabrati lokalitet koji bi se mogao smatrati referentnim. Školjke držane na aklimaciji 10 dana su služile kao referentne jedinke prilikom pasivnog monitoringa.

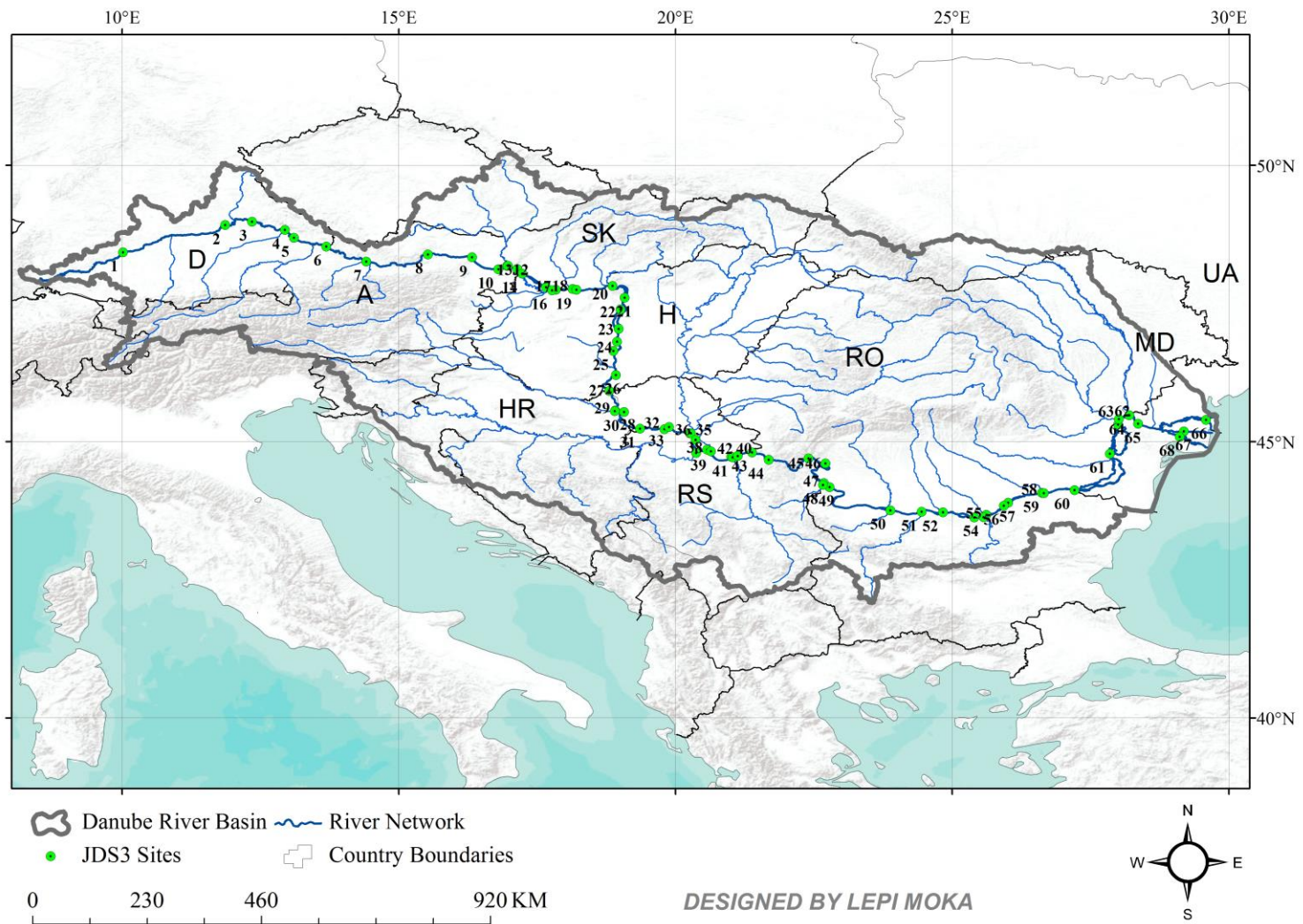
3.2.2. Dunav - pasivni monitoring

Istraživanje na reci Dunav, rađeno je na 34 (**Tabela 3.1.**) od ukupno 68 lokaliteta obrađivanih u okviru ekspedicije JDS3 tokom avgusta i septembra 2013. godine (**Slika 3.1.**). Jedinke vrsta *Unio pictorum*, *U. tumidus* i *S. woodiana*, sakupljane su na lokalitetima pomoću bentološke mreže, bentološke dredže i ronjenjem. Jedinke su čuvane na $4^{\circ}C$ od momenta uzorkovanja do vađenja hemolimfe za komet (ne više od 8 h). Zbog specifičnih uslova u kojima je rađen eksperiment vijabilnost hemocita nije testirana. Nakon vađenja hemolimfe, jedinke su disekovane kako bi se uzeo uzorak tkiva za analize teških metala. Rezultati su prikazani u **Tabeli 2 (Prilog 2)**. Od mikrobioloških parametara, praćeni su ukupni koliformi, *E. coli* i fekalne enterokoke.

Materijal i metode

Tabela 3.1. Lokaliteti na reci Dunav sa kojih su uzorkovane jedinke *Unio* sp. i *S. woodiana* tokom ekspedicije JDS. Ob-obala, U - *Unio* sp., S - *S. woodiana*

Kod	Ob.	Država	Lokalitet	rkm	U	S
Sektor II Zapadno Alpsko pobrđe (rkm 2.581 – 2.225)						
JDS4	L	DE	Deggendorf - 40.000 stanovnika	2.285	3	-
JDS5	L	DE	Mühlau - manje od 1.000 stanovnika	2.258	4	-
Sektor IV Niže Alpsko pobrđe (rkm 2.001 – 1.789,5)						
JDS14	D	SK, HU	Gabčíkovo -akumulacija nizvodno of Bratislave	1.852	2	4
JDS15	D	SK, HU	Medvedov - manje od 1.000 stanovnika	1.806	4	4
Sektor V Mađarska krivina Dunava (rkm 1.789,5 – 1.497)						
JDS18	-	SK	Vah (rkm 0,8) - leva pritoka	1.766	4	-
JDS19	L	SK, HU	Iza/Szony - manje od 2.000 stanovnika	1.761	4	2
JDS20	L	HU	Szob - manje od 3.000 stanovnika	1.707	4	-
JDS22	L	HU	Nizvodno od Budimpešte	1.632	4	5
JDS25	D	HU	Paks - nizvodno od nuklearne elektrane	1.533	3	8
Sektor VI Panonska ravan (rkm 1.497 – 1.075)						
JDS27	D	HU	Hercegszanto - manje od 3.000 stanovnika	1.434	5	2
JDS29	D	HR	Drava (rkm 1,4) - desna pritoka	1.379	-	4
JDS30	D	HR, RS	Nizvodono od ušća Drave - oko 10.000 stanovnika	1.367	4	3
JDS31	D	HR, RS	Ilok/Bačka Palanka – 35.000 stanovnika	1.300	4	4
JDS34	D	RS	Stari Slankamen - ispod 1.000 stanovnika	1.216	4	-
JDS38	L	RS	Pančevo/ Nizvodno od ušća Sava	1.159	4	-
JDS39	D	RS	Nizvodno od Pančeva - industrija	1.151	4	4
JDS40	L	RS	Nizvodno od Smedereva - metalurška industrija	1.107	4	-
JDS42	L	RS	Nizvodno od ušća Velike Morave	1.097	4	7
Sektor VII Đerdap (rkm 1.075 - 942)						
JDS43	D	RS, RO	Banatska Palanka/Bazias – 1.000 stanovnika	1.071	4	4
JDS44	DL	RS, RO	Golubac/Koronin - ispod 2.000 stanovnika	1.040	4	-
JDS45	L	RS, RO	Tekija/Oršova – 1.000 stanovnika	954	4	-
Sektor VIII Zapadna Ponska oblast (rkm 942 – 375,5)						
JDS49	L	RO, BG	Pristol/Nizvodno od Timoka - manje od 2.000 stanovnika	834	4	-
JDS50	L	BG, RO	Kozloduj - nizvodno od nuklearne elektrane	685	-	5
JDS51	L	BG	Iskar (rkm 0,3) - desna pritoka, 2.000 stanovnika	637	6	5
JDS52	L	RO, BG	Olt - leva pritoka	602	4	4
JDS53	L	RO, BG	Zimnicea/Svishtov - luke sa 40.000 stanovnika	550	-	6
JDS59	D	RO, BG	Oltenica - nizvodno od Ardeša – 30.000 stanovnika	429	4	-
JDS60	D	RO, BG	Chiciu/Silistra - oko 35.000 stanovnika	378	4	-
Sektor IX Istočna Valahijska oblast (rkm 375,5 - 100)						
JDS62	D	RO	Braila – 18.0000 stanovnika	167	4	-
JDS64	-	RO, MD	Prut (rkm 1,0) - leva pritoka	135	4	-
JDS65	D	RO, UA	Reni - oko 40.000 stanovnika	130	4	-
Sektor X Delta (rkm 100 - 7)						
JDS66	L	RO, UA	Vilkova - Kilia rukavac - oko 10.000 stanovnika	18	4	-
JDS67	L	RO	Sulina rukavac – 3.000 stanovnika	26	4	-
JDS68	L	RO	Sv. Đorđe rukavac – 3.000 stanovnika	107	4	-



Slika 3.1. Lokalizirani tokom ekspedicije JDS3

3.2.3. Grad Beograd - aktivni biomonitoring

3.2.3.1. Uzorkovanje jedinki *U. pictorum* i *U. tumidus*

Jedinke *U. pictorum* i *U. tumidus* uzorkovane su na lokalitetu Orešac, na reci Dunav u aprilu 2011. Na ovom lokalitetu, školjke su bile prisutne u broju neophodnom za eksperimente izlaganja. Uzorkovano je oko 250 jedinki svake vrste, sa dubine 1 do 2 m pomoću bentoloških mreža, bentološke dredže, ribarskim mrežama i ronjenjem. Jedinke su u rashladnim kutijama transportovane do laboratorijskih bazena (Slika 3.2.). Hemolimfa je uzorkovana iz 5 jedinki svake vrste i na ovim uzorcima je odmah rađen komet test. Ostale jedinke su ostavljene na aklimaciji sledećih 10 dana (Kolarević i sar., 2013).



Slika 3.2. Bazen za aklimaciju jedinki

3.2.3.2. Izlaganje školjki – školjke u kavezima

Nakon aklimacije, po 40 jedinki svake vrste je stavljano u plastične džakove (dijametar okca 2 mm) i izlagano na lokalitetima Duboko, Savski rukavac, Savska marina i Višnjica na dubini od 2 m. Izlaganje je trajalo 30 dana pri čemu je po 5 jedinki svake vrste uzorkovano nakon 7, 14 i 30 dana izlaganja. Uzorkovanim jedinkama je vađena hemolimfa za komet test. Za kontrolu, hemolimfa je vađena iz 5 jedinki svake vrste odmah nakon aklimacije.

Prilikom svakog uzorkovanja školjki, multiparametarskom sondom su mereni fizičko – hemijski parametri vode (O_2 , $t^{\circ}C$, pH, NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-}); takođe uziman je uzorak vode za mikrobiološke analize koje su obuhvatile fekalne koliforme i fekalne enterokoke. Republički Hidrometeorološki zavod Srbije i Gradski zavod za javno zdravlje, obezbedili su dodatne podatke o koncentracijama teških metala u vodi na lokalitetima ili u neposrednoj blizini lokaliteta. Podaci o fizičko – hemijskim parametrima, predstavljeni su u **Tabelama 1 i 2 (Prilog 3)**.

3.3. Metode

3.3.1. Aklimacija

Uzorkovane školjke se drže na aklimaciji bar 10 dana u akvarijumima od 60 L, pod kontrolisanim uslovima (konc. $O_2 > 8$ mg/L, zasićenje $O_2 > 90\%$, $t = 22^{\circ}C$, pH 7.2 - 8.1). Supstrat na dnu akvarijuma sačinjen je od finog peska ispranog čistom vodom kako bi se eliminisale nečistoće, supstrat je potom tretiran toplotom (na $250^{\circ}C$, 4 h) kako bi se uklonili potencijalni patogeni i virusne čestice. Školjke su hranjene jednom sedmično tabletama Spirulina (Sera, Nemačka) ili usitnjenim listovima čaja od koprive.

3.3.2. Uzorkovanje hemolimfe

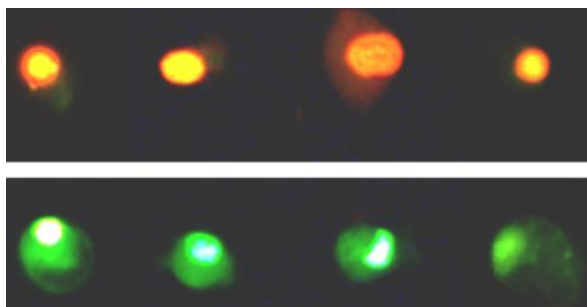
Vrh skalpela se smesti između kapaka ljuštore školjke i potom se školjka pažljivo otvori približno 5 mm. Pomoću šprica od 3 mL i igle 23G, vadi se približno 1 mL hemolimfe iz mišića aduktora (**Slika 3.3**). Izuzetak je napravljen u studiji pasivnog monitoringa na Velikoj Moravi, kada je za 1 mL uzorka hemolimfa prikupljena iz više jedinki („pulovanje”). Hemolimfa se meša u odnosu 2:1 sa fiziološkim rastvorom HBSS (sa dodatkom 5 mM EDTA). Dobijena suspenzija se centrifugira na 2.000 rpm, 10 min na $4^{\circ}C$. Nakon centrifugiranja, supernatant se odbacuje, a talog resuspenduje u približno 80 μ L rezidualnog supernatanta. Od dobijene suspenzije 20 μ L se koristi za procenu vijabilnosti hemocita, a 60 μ L za komet test.



Slika 3.3. Vadenje hemolimfe iz aduktora jedinke *U. tumidus*

3.3.3. Diferencijalno bojenje ćelija akridin oranž/etidijum bromid (AO/EB)

U 20 μL suspenzije ćelija, dodaje se 2 μL pripremljene AO/EB boje. Nakon mešanja nastavkom automatske pipete, suspenzija se nanosi na mikroskopsku pločicu i prekrije sa pokrovnim staklom. Ćelije se posmatraju na fluorescentnom mikroskopu (Leica, DMLS, Austria), pod uvećanjem 400 \times , sa filterom za ekscitaciju (pobuđivanje) od 510-560 nm i emisiju od 590 nm. Bojenje se zasniva na proveru integriteta membrane: ukoliko je membrana intaktna (neoštećena) samo će boja AO difundovati u ćeliju i bojiti jedro zelenom fluorescencijom. Ukoliko je integritet membrane narušen i EB će difundovati u ćeliju i prekriti signal te će jedra emitovati narandžastu ili crvenu fluorescenciju (Slika 3.4.). Ćelije sa crvenim ili narandžastim jedrom se smatraju mrtvima, dok se ćelije sa zelenim jedrom smatraju živima (Squier i Cohen, 2001).



Slika 3.4. Hemocite *U. tumidus* prilikom AO/EB diferencijalnog bojenja

3.3.4. Komet test

Primenjena je alkalna verzija komet testa po protokolu Singh i sar. (1988). Čitava procedura se obavlja pod žutim svetlom. Prethodno očišćene (odmašćene) mikroskopske pločice se potapaju u 1% rastvor agaroze normalne tačke topljenja (eng. - Normal Melting Point - NMP) i suše na sobnoj temperaturi 24 h. Na pločicu se potom, na dva mesta, nanosi po 80 μ L 1% NMP agaroze i prekriva pokrovnim staklom, kako bi se agarozu ravnomerno rasporedila po pločici. Pločice se stavljaju na 5 min na 4°C, kako bi se agarozu stegla. Od pripremljene suspenzije ćelija, 30 μ L se meša sa 70 μ L agaroze niske tačke topljenja (eng. – Low Melting Point - LMP). Potom se skidaju pokrova stakla i na pločice se nanosi 70 μ L 1% LMP agaroze sa ćelijama. Da bi se agarozu ravnomerno rasporedila, prekriva se pokrovnim staklom. Pločice se opet stavljaju na 5 min na 4°C. Nakon skidanja pokrovnih stakala, pločice se na 1 h potapaju u hladan rastvor za lizu (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1,5% Triton X-100, pH = 10). Pločice se zatim poređaju u kadicu za elektroforezu i potope u hladan rastvor za denaturaciju i elektroforezu (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH = 13). Pločice se prvo inkubiraju 20 min bez struje kako bi došlo do denaturacije. Nakon denaturacije, narednih 20 min vrši se elektroforeza (0,5 - 0,75 V/cm, 300 mA) u istom rastvoru koji je korišćen za denaturaciju. Nakon elektroforeze, pločice se potapaju na 15 min u hladan rastvor za neutralizaciju (0,4 M Tris, pH = 7.5). Fiksacija se vrši u hladnom metanolu 15 min. Nakon fiksacije, pločice se suše 24 h u mraku na 4°C. Fiksirane pločice se čuvaju u klasteru do analize. Neposredno pre analize, pločice se potapaju u hladnu destilovanu vodu 15 min kako bi se agarozu rehidrirala. Za bojenje pločica koristi se AO ili EB (2 μ g/mL). Na svaki gel se nanese po 20 μ L rastvora boje i pokrije pokrovnim staklom. Pločice se posmatraju na fluorescentnom mikroskopu (Leica, DMLS, Austria) pod uslovima opisanim u poglavlju 3.3.7. Za analizu pločica, koristi se softver Comet IV Computer Software (Perceptive Instruments, UK). Na svakoj pločici analizira se uzorak od 50 kometa. Nivo oštećenja praćen je putem parametara TI i OTM (izuzav studije JDS3 gde su analize zbog obima uzoraka rađene samo na parametru TI). Tokom izvođenja različitih grupa eksperimenata (različitih studija) varirali su ekperimentalni uslovi usled nabavke nove opreme i prilagođavanja protokola (**Tabela 3.2.**).

Tabela 3.2. Podaci o opremi i modifikacijama protokola tokom izvođenja komet testa

Studija	Kadica	Napajanje	Voltaža	Amperaža	Boja
Pasivni monitoring Velika Morava	BIOFINEX 16 cm	PS503, APELEX	0,75 V/cm	300 mA	EB
Pasivni monitoring Dunav	ENDURO 32cm	ENDURO, LABNET	0,75 V/cm	300 mA	AO
Aktivni monitoring Beograd	NP 32cm	PS503, APELEX	0,5 V/cm	300 mA	EB
Eksperimenti <i>ex situ</i> <i>in vivo</i>	ENDURO 32cm	ENDURO, LABNET	0,5 V/cm	300 mA	AO
Eksperimenti <i>ex situ</i> <i>in vitro</i>	ENDURO 32cm	ENDURO, LABNET	0,75 V/cm	300 mA	AO

3.3.5. Eksperimenti *ex situ*

3.3.5.1. Uzorkovanje jedinki

Jedinke su uzorkovane na lokalitetu Duboko na reci Savi i lokalitetu Orešac, na Dunavu.

Lokalitet Duboko se nalazi uzvodno od Beograda na reci Savi i manje je zagađen u odnosu na drugu lokaciju, jer prima samo otpadne vode iz domaćinstava manjih okolnih naselja. Ova lokacija se karakteriše visokim razblaživanjem zagađivača, jer je prosečan protok vode oko 3.000 m³/s kao i dobrom aeracijom (Vuković-Gačić i sar., 2014).

Lokalitet Orešac je pod većim pritiskom zagađenja, sa povišenim koncentracijama cinka i bakra (Vuković-Gačić i sar., 2014). Fizičko – hemijski podaci lokaliteta prikazani su u **Tabelama 1 i 2 (Prilog 3)**. Postupak uzorkovanja jedinki, opisan je u prethodnim poglavljima. Školjke su potom stavljane na aklimaciju po proceduri opisanoj u poglavlju 3.3.1.

3.3.5.2. *In vivo* tretman

Školjke su tretirane 72 h u statičkom sistemu. Prilikom odabira sistema, u obzir je uzeta stabilnost supstanci koje se testiraju (**Tabela 3.3**).

Tabela 3.3. Stabilnost odabranih citostatika u rastvoru na 25°C i 4°C.

Citostatik	Stabilnost 100 % u rastvoru na 25°C		% u rastvoru nakon 3 dana na 4°C	
	5-FU	najmanje 1 dan	Negreira i sar. (2013)	100
CisPt	nije poznato	-	-	-
VIN	najmanje 1 dan	Negreira i sar. (2013)	>90	Negreira i sar. (2013)
ETO	najmanje 1 dan	Negreira i sar. (2013)	>95	Negreira i sar. (2013)
IM	najmanje 1 dan	Negreira i sar. (2013)	>85	Negreira i sar. (2013)

Tretman je rađen u plastičnim akvarijumima od 10 L. Dno akvarijuma je prekriveno kvarcnim peskom za akvarijume, zapremina peska u svakom akvarijumu je 1,5 L. Pesak se stavlja na dno akvarijuma kako bi se što vernije imitirali prirodni uslovi u kojima školjke žive i kako bi mogli da pratimo aktivnost jedinki. U svaki akvarijum je postavljen grejač, termometar i sistem za regulaciju aeracije (**Slika 3.5.**). Tretman je rađen u kontrolisanim uslovima (zapremina vode 8 L, konc. O₂ > 8 mg/L, zasićenje O₂ > 90%, t = 22 ± 2°C, pH 7.2 - 8.1).



Slika 3.5. Akvarijumi u kojima je vršen *in vivo* tretman

Iz grupe aklimatizovanih jedinki, dan pred početak tretmana, po 5 jedinki približne veličine stavljanu je u svaki akvarijum. Kao kontrola sistema izlaganja, urađen je tretman model mutagenom (CdCl₂) u koncentracijama 4, 40 i 100 μM. Kao negativna kontrola, korišćene su jedinke postavljene u akvarijum u kome se nalazila čista voda. Ukoliko je citostatik restvaran u DMSO rađena je dodatna kontrola rastvarača. Tokom

tretmana, pratili smo ponašanje jedinki - da li se ukopavaju, da li su otvorene ili zatvorene, da li se kreću. Važno je da su jedinke tokom trajanja tretmana otvorene kako bi se omogućio kontakt sa citostatikom. Nakon tretmana, jedinke smo transportovali do laboratorije u rashladnoj torbi (4°C). Potom, jedinkama je vađena hemolimfa i pripremljena je suspenzija hemocita po proceduri opisanoj u poglavlju 3.3.2. a potom je rađen i komet test po proceduri opisanoj u poglavlju 3.3.4.

3.3.5.3. *In vitro* tretman

Testiranje genotoksičnog efekta u *in vitro* uslovima vršeno je na dva načina. U prvom slučaju, sveže izolovane hemocite su tretirane 30 min u fiziološkom rastvoru. U drugom slučaju, od izolovanih hemocita je formirana primarna kultura, a tretman je trajao 22 h.

3.3.5.3.1 Tretman sveže izolovanih hemocita u fiziološkom rastvoru

Tretman sveže izolovanih hemocita rađen je po protokolu koji je opisao Binelli i sar. (2009a) sa modifikacijama. Ljuštura školjki je pažljivo otvarana skalpelom do uočavanja mišića aduktora. Iz mišića je vađena hemolima i mešana u odnosu 2:1 sa HBSS sa dodatkom 5 mM EDTA kao antikoagulantom. Hemolimfa je sakupljana iz nekoliko jedinki, kako bi se izbegla varijabilnost u jedinkama. Uzorak hemolimfe je centrifugiran 10 min na 2.000 rpm i resuspendovan u HBSS + 5mM EDTA. Pul je razdeljen u ependorff epruvete (0,9 mL) u koje je potom dodato 100 µL test supstance rastvorene u HBSS-u, ili drugom odgovarajućem rastvaraču, da bi se postigla željena finalna koncentracija test supstance. Za negativnu kontrolu, umesto test supstance, dodavano je 100 µL HBSS-a; za pozitivnu kontrolu korišćen je CdCl₂ u koncentraciji 4, 40 i 100 µM. Za citostatike rastvarane u DMSO-u rađena je i kontrola rastvarača. Tretman je vršen 30 min u mraku na 22 ± 2°C, za svaku koncentraciju, tretman je vršen u triplikatu. Nakon tretmana, uzorci su centrifugirani 10 min na 2.000 rpm. Nakon centrifugiranja, odbačen je supernatant, dok je talog resuspendovan u 80 µL supernatanta.

Od ćelijske suspenzije 60 μL se koristilo za komet test, dok je 20 μL uzimano za procenu vijabilnosti hemocita diferencijalnim bojenjem.

3.3.5.3.2. Priprema primarne kulture hemocita

Primarna kultura hemocita pripremljena je po protokolu primenjenom na slatkovodnim školjkama vrste *Dreissena polymorpha* (Quinn i sar., 2009). Školjke uronjene u 70% alkohol su pažljivo otvarane skalpelom, toliko da se može uočiti mišić aduktor. Mišić se potom ispira 70% alkoholom pomoću špric boce, a zatim se iz njega vadi hemolimfa, upotrebom šprica od 3 mL i igle sa oznakom 26G. Dalja manipulacija hemolimfom vršena je u sterilnim uslovima. Hemolimfa je sakupljana iz više jedinki („pulovana”) i mešana sa jednakom zapreminom medijuma za primarnu kulturu hemocita (MPKH), koji je pripremljen po proceduri opisanoj za slatkovodne školjke (Parolini i sar., 2011a), sa dodatkom 5 mM EDTA (pH 7,5) kao antikoagulant. Pomoću hemocitometra je određen broj hemocita, a potom je uzorak centrifugiran na 2.000 rpm 10 min. Nakon centrifugiranja, hemocite su resuspendovane u MPKH (finalna koncentracija 1×10^6 ćelija/mL).

3.3.5.3.2.1. Tretman u medijumu za primarnu kulturu hemocita

Tretman je vršen na ploči sa 12 bunara. Za svaku koncentraciju, testiranje je vršeno u tri ponavljanja. U svaki bunar sipano je po 0,9 mL primarne kulture koja je sadržala 1×10^6 ćelija/mL. Potom, u svaki bunar je dodavano 100 μL supstance rastvorene u MPKH da bi se ostvarila željena finalna koncentracija u bunaru. Za pozitivnu kontrolu korišćen je CdCl_2 u finalnoj koncentraciji 100 μM . Za negativnu kontrolu u bunare se dodavalo 100 μL čistog MPKH. Za citostatike rastvarane u DMSO-u rađena je i kontrola rastvarača. Po zasejavanju, ploče su zatvarane parafilnom i inkubirane u mraku na $22 \pm 2^\circ\text{C}$ tokom 22 h. Nakon inkubacije, u svaki bunar dodavano je po 1 mL MPKH sa dodatkom 5 mM EDTA da bi se hemocite odlepilo sa dna bunara i da bi se razbile grupacije hemocita. Nakon inkubacije od 10 min, suspenzija ćelija je prebačena u ependorff epruvete od 2 mL i centrifugirana. Supernatant je odbačen ali tako da u svakoj

epruveti ostane talog i 80 μL supernatanta. Talog je razbijen u rezidualnom supernatantu, 60 μL je odvojeno za komet test, a 20 μL za praćenje preživljavanja diferencijalnim bojenjem.

3.3.5.3.3. Post-tretman vodonik peroksidom

Post-tretman vodonik peroksidom je vršen na osnovu protokola prikazanog u radu Štambuk i sar. (2008) na hemocitama vrste *U. pictorum*. Pločice pripremljene za komet test po protokolu opisanom u poglavlju 3.3.4. su pre lize potapane u 20 μM rastvor vodonik peroksida. Tretman je trajao 10 min u mraku na sobnoj temperaturi. Nakon isteka 10 min, pločice su isprane 1xPBS i potom stavljane na lizu. Ostatak protokola je isti kao u poglavlju 3.3.4.

3.3.5.4. Izvedeni parametri korišćeni za poređenje rezultata *ex situ* studija

3.3.5.4.1. Faktor indukcije

Faktor indukcije (FI) predstavlja odnos srednje vrednosti TI dobijene u određenom tretmanu i srednje vrednosti TI u odgovarajućoj kontroli (Seitz i sar., 2008).

3.3.5.4.2. Indukcija oštećenja

Indukcija oštećenja računata je na osnovu formule:

$$I = IF - 1$$

3.3.5.4.3. Faktor indukcije koncentracija sa značajnim efektom

SCDI (eng. Significant Concentration Depended Induction Factor) (Seitz i sar., 2008), računat je na osnovu formule:

$$SCDI = \sum_{i=1}^n \frac{IF_i}{c_i}$$

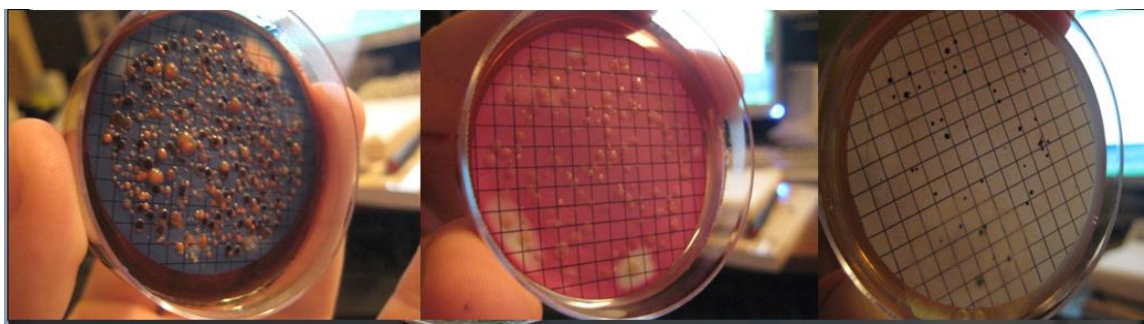
IF_i - faktor indukcije za koncentraciju i

C_i – koncentracija i svedena u mg/L

3.3.6. Mikrobiološki parametri

3.3.6.1. Koliformi – metod membranska filtracija (MF)

Prilikom studije pasivnog monitoringa na reci Velika Morava, kao i prilikom studije aktivnog monitoringa, koliformi su izolovani metodom MF (Službeni glasnik SFRJ, broj 33/87). Uzorak od 100 mL vode, odnosno odgovarajućeg razblaženja vode u fiziološkom rastvoru, filtriran je kroz celulozno-nitrilne filtre dijametra pora 0,45 μm . Prilikom izolacije ukupnih koliforma, filteri su postavljani na podlogu EMB agar (eng. Eosine Metilene Blue, LabM) i inkubirani 24 h na 37°C. Kolonije tamno plave boje su smatrane pozitivnim rezultatom (**Slika 3.6.**). Za izolaciju fekalnih koliforma, filteri su postavljani na podlogu MacConkey agar (Torlak) i inkubirani 24 h na 44°C. Kolonije tamno ružičaste boje su smatrane pozitivnim rezultatom (**Slika 3.6.**).



Slika 3.6. Kolonije ukupnih koliforma na EMB podlozi (levo), fekalnih koliforma na MacConkey podlozi (sredina) i fekalnih enterokoka na DTA podlozi (desno).

3.3.6.2. Koliformi – metod najverovatniji broj (MPN)

Prilikom studije pasivnog monitoringa na reci Dunav (JDS3), koliformi su analizirani putem MPN metode pomoću Colilert 18 sistema (ISO 9308-2:2012). Aktivnost enzima β -galaktozidaze (tipičan za koliforme) detektuje se pomoću supstrata

ONPG (orto-nitrofenil- β -D-galaktoriranozid). Oslobođeni ONP ima karakterističnu žutu boju. Aktivnost enzima glukoronidaze (tipičan za *E. coli*) se detektuje pomoću supstrata MUG (metilumberiferil- β -glukuronid). Oslobođeni metilumberiferon fluorescira plavom bojom. U uzorak od 100 mL vode koja se testira, ili odgovarajućeg razblaženja ove vode u destilovanoj vodi, sipan je Colilert 18 supstrat. Nakon što se supstrat rastvorio, uzorci su sipani u Quanti-Tray/2000 ploče sa 97 komora. Ploče su zavarene na Quanti-Tray zavarivaču i stavljene na inkubaciju na 37°C 24 \pm 6h. Nakon inkubacije, za određivanje najverovatnijeg broja ukupnih koliforma, brojani su žuti bunari. Za određivanje najverovatnijeg broja *E. coli*, ploče su nakon inkubacije stavljane pod UV lampu (365 nm) pri čemu su brojani bunari sa plavom fluorescencijom (**Slika 3.7.**). Najverovatniji broj u uzorku je određen pomoću statističkih tablica po instrukcijama proizvođača.



Slika 3.7. Određivanje najverovatnijeg broja koliforma pomoću Colilert 18 sistema

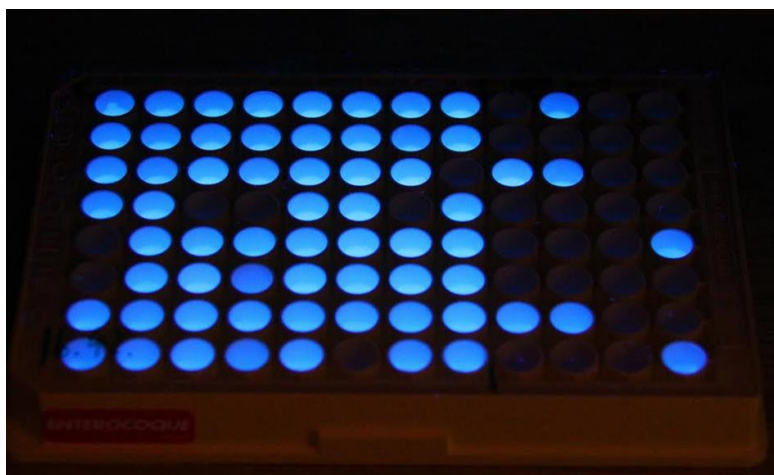
3.3.6.3. Fekalne enterokoke – metod membranska filtracija

Prilikom studije pasivnog monitoringa na reci Velika Morava, kao i prilikom studije aktivnog monitoringa, fekalne enterokoke su izolovane metodom MF. Uzorak od 100 mL vode, odnosno odgovarajućeg razblaženja vode u fiziološkom rastvoru, filtriran je kroz celulozno-nitrilne filtre dijametra pora 0,2 μ m. Filtri su postavljeni na podlogu DTA (dekstrozni teluritni agar, Torlak) i inkubirani 24 h na 37°C. Na crnim kolonijama,

izraslim nakon inkubacije, kao potvrdni test rađen je katalaza test, prelivanjem kolonija 3% rastvorom vodonik peroksida. Crne, katalaza negativne kolonije su smatrane pozitivnim rezultatom (**Slika 3.6.**).

3.3.6.4. Fekalne enterokoke – metod najverovatniji broj

Prilikom studije pasivnog monitoringa na reci Dunav (JDS3) fekalne enterokoke su analizirane putem metode MPN. Za izolaciju su korišćene Biorad MPN ploče za enterokoke (ISO 7899-1:1998). Radili smo 2 razblaženja uzorka vode u DSM medijumu (1/2 i 1/20), izuzev jako zagađenih lokaliteta gde smo radili 4 razblaženja (1/2, 1/20, 1/200 i 1/2.000). Pri radu sa dva razblaženja, manje razblaženje (1/2) je sipano u 64 bunara, dok je veće razblaženje (1/20) sipano u 32 bunara pomoću multikanalne pipete (200 µL po bunaru). Pri radu sa 4 razblaženja, svako razblaženje je pipetirano u 32 bunara (200 µL po bunaru). Preko razlivenih ploča lepi se providna folija i ploče se inkubiraju 48 h na 44°C. Nakon inkubacije, ploče se stavljaju pod UV lampu (365 nm), pri čemu se broje bunari sa plavom fluorescencijom (**Slika 3.8.**). Najverovatniji broj u uzorku je određen pomoću statističkih tablica po instrukcijama proizvođača.



Slika 3.8. Određivanje najverovatnijeg broja fekalnih enterokoka pomoću Biorad MPN ploča.

Na osnovu broja koliforma i enterokoka određivan je mikrobiološki kvalitet vode na osnovu **tabele 3.4.** u skladu sa Pravilnikom o parametrima hemijskog i ekološkog statusa („Službeni glasnik RS” br. 74/2011).

Tabela 3.4. Granice klasa kvaliteta vode na osnovu broja koliforma i fekalnih enterokoka

	Klasa	I	II	III	IV	V
Ukupni koliformi	100 mL	≤ 500	≤10.000	≤100.000	≤1.000.000	> 1.000.000
Fekalni koliformi	100 mL	≤ 100	≤1.000	≤10.000	≤100.000	>100.000
Fekalne enterokoke	100 mL	≤ 40	≤400	≤4.000	≤40.000	>40.000

3.3.7. Statističke analize

Statističke analize su vršene u programu Statistica 6.0 Software (StatSoft, Inc.). Pomoću Kolmogorov-Smirnov testa, proveravano je da li rezultati komet testa imaju normalnu raspodelu.

U svim studijama, izuzev u slučaju pasivnog monitoringa na reci Dunav, razlika između grupa, testirana je primenom neparametrijskog Mann Whitney U-testa sa nivoom značajnosti $p < 0,05$. Prilikom studije **pasivnog monitoringa - Velika Morava**, grupe obuhvatile od 50 do 150 ćelija. U studiji **aktivnog monitoringa - Grad Beograd**, grupe su sačinjene od 250 ćelija (50 ćelija po jedinki). Tokom *ex situ* istraživanja, u *in vivo* testovima, grupe su obuhvatile 250 ćelija (50 ćelija po jedinki). U slučaju *ex situ* istraživanja, u *in vitro* testovima, grupe su sačinjene od 150 ćelija (triplikat po 50 ćelija).

U slučaju studije **pasivnog monitoringa – Dunav**, grupe su sačinjene od 200 ćelija (50 ćelija po jedinki). Da bismo predstavili i variranje među jedinkama na lokalitetima, za svaku jedinku je računata srednja vrednost 50 izmerenih ćelija. Razlika između grupa, testirana je primenovog Studentovog t-testa.

U *in situ* istraživanjima, korelacije između nivoa oštećenja DNK i parametara merenih u vodi (mikrobioloških i fizičko-hemijskih) testirane su primenom Spearman-ovog testa sa nivoom značajnosti $p < 0,05$.

U *ex situ* istraživanjima, korelacije između vijabilnosti hemocita i nivoa oštećenja takođe su testirane primenom Spearman-ovog testa sa nivoom značajnosti $p < 0,05$.

REZULTATI

4. Rezultati

Predmet istraživanja ovog rada je praćenje oštećenja molekula DNK pomoću alkalnog komet testa u hemocitama slatkovodnih školjki *Unio pictorum*, *U. tumidus* i *Sinanodonta woodiana* u *in situ* i *ex situ* uslovima.

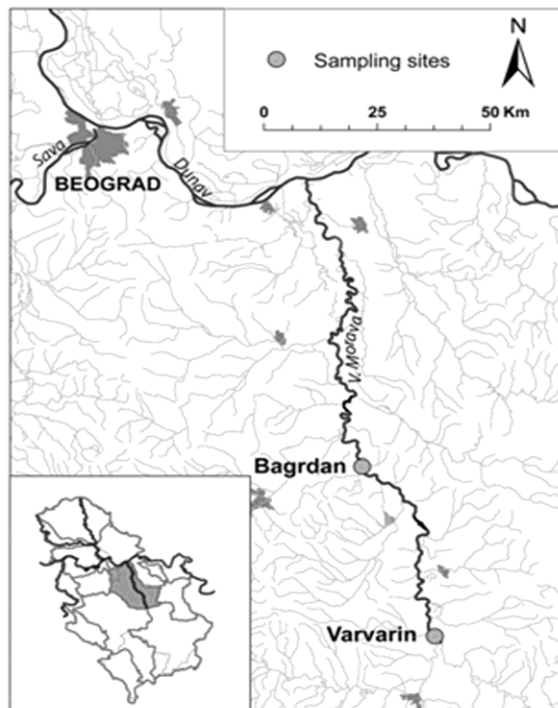
Kao što je već rečeno, školjke predstavljaju pogodne organizme za procenu nivoa zagađenja spoljašnje sredine i uticaja različitih zagađivača u vodenim ekosistemima, zbog čega imaju primenu, kako u detekciji zagađivača u njihovoj prirodnoj sredini (*in situ*), tako i u proučavanju dejstva zagađivača u laboratorijskim uslovima (*ex situ*).

U *in situ* biomonitoringu, upotrebljavaju se pristupi pasivnog i/ili aktivnog biomonitoringa, kako bi se procenilo stanje ekosistema. Pasivni monitoring podrazumeva proučavanje efekata sredinskog stresa kod organizama koji naseljavaju određeni lokalitet. Aktivni biomonitoring podrazumeva proučavanje efekata sredinskog stresa kod organizama koji su, na određeni vremenski period izloženi na određenom lokalitetu.

U okviru *in situ* proučavanja u ovom radu praćen je uticaj sredine na nivo oštećenja DNK molekula pasivnim i aktivnim biomonitoringom. Pasivnim biomonitoringom obuhvaćeni su lokaliteti na rekama Velika Morava i Dunav, a aktivnim biomonitoringom lokaliteti na rekama Sava i Dunav na teritoriji grada Beograda.

4.1. Velika Morava – pasivni biomonitoring

U istraživanju na reci Velika Morava, praćen je uticaj sredine na nivo oštećenja DNK molekula u hemocitama jedinki *S. woodiana* primenom pasivnog biomonitoringa. Istraživanje je rađeno u periodu od maja 2010. do februara 2011. na lokalitetima Varvarin i Bagrdan (**Slika 4.1.**). Detaljan opis istraživanog područja dat je u **Prilogu 1.**



Slika 4.1. Lokaliteti Varvarin i Bagrdan na reci Velika Morava

Tokom istraživanja, procena kvaliteta vode na proučavanim lokalitetima vršena je na osnovu mikrobioloških i fizičko-hemijskih parametara.

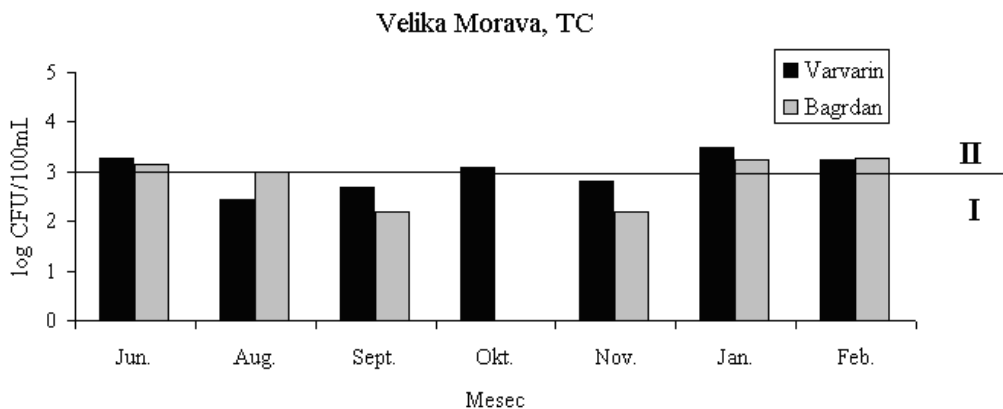
4.1.1. Fizičko - hemijski i mikrobiološki kvalitet vode

Rezultati fizičko - hemijskih analiza su predstavljeni u **tabeli 1 (Prilog 1)**.

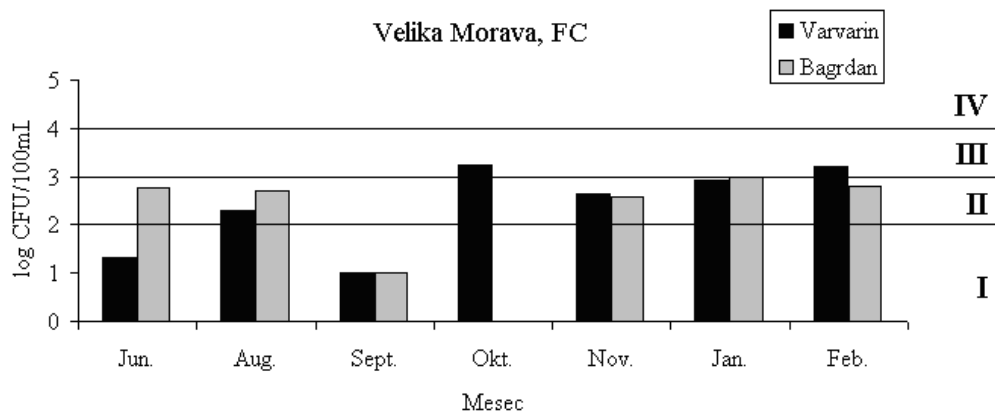
Na lokalitetu Varvarin, koji je pod uticajem otpadnih voda grada Kruševca, nitrati su detektovani u najvišoj koncentraciji u junu. U avgustu su zabeležene najviše koncentracije rastvorenog cinka (6 puta viša od dozvoljene vrednosti), olova (skoro 2 puta veća od dozvoljene vrednosti) i nikla (6 puta viša od dozvoljene vrednosti). Kadmijum je imao najviše vrednosti u oktobru (skoro 3 puta više od dozvoljene vrednosti), dok je bakar imao najviše vrednosti u januaru (12 puta više od dozvoljene vrednosti).

Ukupni koliformi i enterokoke su imali najveću vrednost u januaru, dok su fekalni koliformi imali najveću vrednost u oktobru. Voda nije imala zadovoljavajući mikrobiološki kvalitet u oktobru, januaru i februaru (III klasa). Najniže fekalno

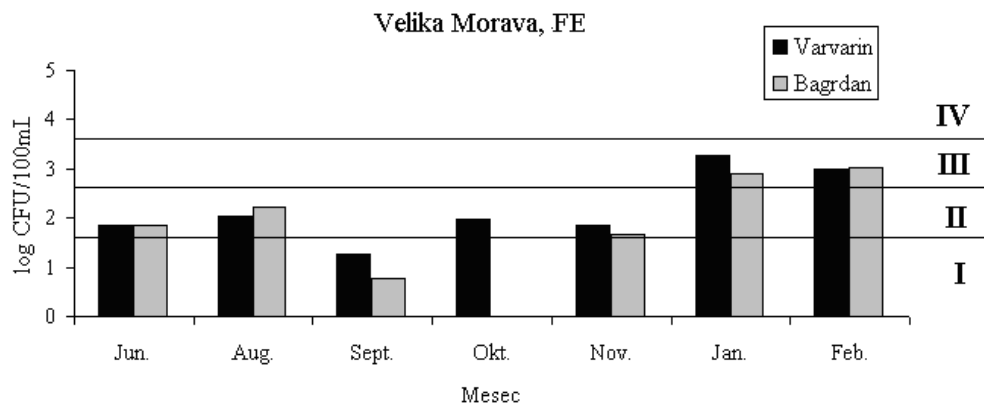
zagađenje, voda je imala u septembru, kada je po svim parametrima zabeležena prva klasa vode (Slike 4.2. - 4.4.).



Slika 4.2. Brojnost ukupnih koliforma (TC) na lokalitetima Varvarin i Bagrdan izražena kao log CFU/100 mL sa naznačenim granicama između klasa



Slika 4.3. Brojnost fekalnih koliforma (FC) na lokalitetima Varvarin i Bagrdan izražena kao log CFU/100 mL sa naznačenim granicama između klasa



Slika 4.4. Brojnost fekalnih enterokoka (FE) na lokalitetima Varvarin i Bagrdan izražena kao log CFU/100 mL sa naznačenim granicama između klasa

Na lokalitetu **Bagrdan**, koji je pod uticajem otpadnih voda Paraćina i Jagodine, tekstilne industrije i postrojenja za proizvodnju šećera, najviša koncentracija amonijaka i fosfata je zabeležena u junu, dok su nitrati imali najvišu vrednost u januaru. Cink je imao najvišu vrednost u junu (9 puta viša vrednost od dozvoljene vrednosti) dok su bakar (12 puta viša vrednost od dozvoljene vrednosti) i nikel (6 puta viša vrednost od dozvoljene vrednosti) imali najvišu vrednost u septembru. U novembru je živa imala 5 puta višu vrednost od dozvoljene.

Ukupni koliformi i enterokoke su imali najveću vrednost u februaru, dok su fekalni koliformi imali najveću vrednost u januaru. Indikatori fekalnog zagađenja su pokazali nezadovoljavajući mikrobiološki kvalitet vode u januaru i februaru (III klasa) (**Slike 4.2.-4.4.**).

Na oba lokaliteta primećena je značajna korelacija između vrednosti sva tri parametra mikrobiološkog kvaliteta vode. Takođe, primećena je i visoka korelacija između FC i koncentracije amonijaka (**Tabela 4.1.**).

4.1.2. Uzorkovanje jedinki *S. woodiana* na reci Velika Morava

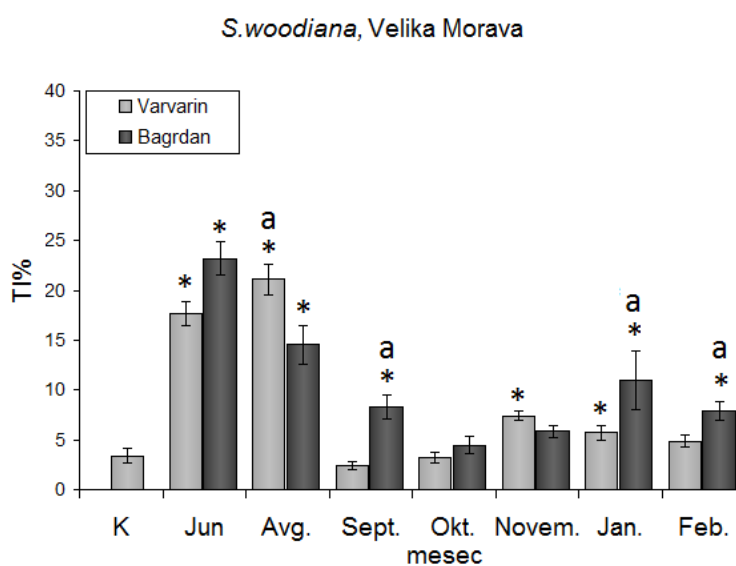
Broj uzorkovanih jedinki je varirao tokom različitih meseci uzorkovanja (**Tabela 2, Prilog 1**). Najveći broj jedinki prikupljen je u avgustu na lokalitetu Varvarin (preko 30) koje su korišćene i za određivanje bazalnog nivoa DNK oštećenja. Školjke nisu nađene na lokalitetu Bagrdan u maju i julu, kao ni na jednom od lokaliteta u decembru.

4.1.3. Određivanje bazalnog nivoa oštećenja DNK molekula

Školjke sakupljene u avgustu na lokalitetu Varvarin su podvrgnute aklimaciji, odnosno školjke su držane u kontrolisanim laboratorijskim uslovima kako bi odredili bazalni nivo oštećenja DNK molekula. Nakon 10 dana došlo je do značajne redukcije nivoa oštećenja DNK molekula (TI je opao sa $21,1 \pm 1,6$ na $3,4 \pm 0,7$). Dobijena vrednost je korišćena kao referentna za procenu nivoa oštećenja jedinki prikupljenih na lokalitetima.

4.1.4. Određivanje nivoa oštećenja DNK kod jedinki *in situ*

Vijabilnost hemocita prilikom vađenja hemolimfe iz jedinki nije značajno varirala tokom meseci uzorkovanja i u svakom od uzoraka je bila viša od 80 %. Razlike u nivou oštećenja DNK molekula u zavisnosti od meseca uzorkovanja primećene su na oba lokaliteta. U poređenju sa negativnom kontrolom, najviši nivo oštećenja DNK molekula primećen je u avgustu na lokalitetu Varvarin ($21,1 \pm 1,6$) i u junu na lokalitetu Bagrdan ($23,2 \pm 1,7$) (Slika 4.5.). Vrednosti TI predstavljene su u vidu histograma, dok su vrednosti OTM predstavljene tabelarno u **Tabeli 3 (Prilog 1)**.



Slika 4.5. Nivo oštećenja DNK molekula u jedinkama *S. woodiana* (sred. \pm SE) prikupljenih na lokalitetima Varvarin i Bagrdan na reci Velika Morava; * $p < 0,05$ značajnost u poređenju sa negativnom kontrolom; ^a $p < 0,05$ značajnost u poređenju sa jedinkama sa drugog lokaliteta

Tokom septembra, januara i februara, jedinke prikupljene sa lokaliteta Bagrdan su imale viši nivo oštećenja DNK molekula u poređenju sa jedinkama sa lokaliteta Varvarin. U avgustu, situacija je bila obrnuta.

4.1.5. Korelacija između nivoa oštećenja DNK, fizičko – hemijskih i mikrobioloških parametara

Poredeći nivo oštećenja DNK molekula u jedinkama sa fizičko - hemijskim parametrima izmerenim na lokalitetima, značajna korelacija je uočena između TI i OTM i temperature vode, rastvorenog kiseonika i koncentracije rastvorenog cinka. Između parametara oštećenja DNK i mikrobioloških parametara nije primećena značajna korelacija (**Tabela 4.1.**).

Tabela 4.1. Spearman-ova korelacija između oštećenja DNK, mikrobioloških i fizičko-hemijskih parametara izmerenih u vodi na lokalitetima; označene korelacije su značajne za $p < 0,05$

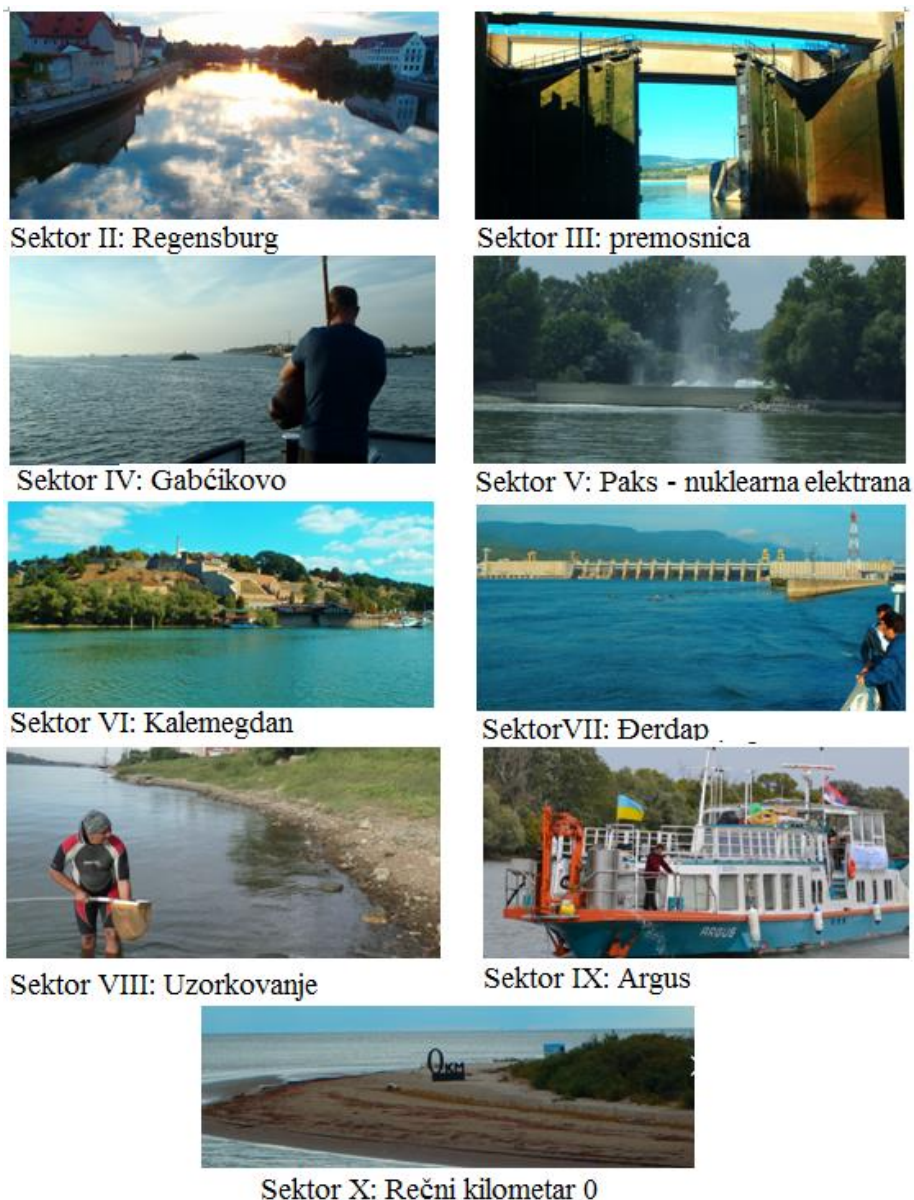
parameter		OTM	TI	TC	FC	EF
OTM		1,00	0,88	-0,06	-0,20	-0,05
TI		0,88	1,00	0,13	-0,05	0,13
t (C°)		0,64	0,62	0,05	-0,21	-0,03
Kiseonik	mg/L	0,70	0,54	-0,13	-0,13	0,00
	%	0,93	0,79	-0,16	-0,41	-0,16
pH		0,09	-0,07	-0,53	0,19	-0,11
NH ₄ ⁺	mg/L	-0,17	-0,26	0,06	0,51	-0,01
NO ₃ ⁻	mg/L	0,34	0,50	0,22	-0,02	-0,09
PO ₄ ³⁻	mg/L	0,00	0,07	0,44	-0,10	-0,30
Fe	mg/L	0,03	0,06	-0,18	-0,17	-0,27
Zn	µg/L	0,66	0,74	0,01	-0,18	-0,05
Cu	µg/L	-0,51	-0,31	0,28	0,05	0,15
Cr	µg/L	0,13	0,24	-0,20	-0,50	-0,37
Pb	µg/L	0,10	0,28	0,19	-0,04	0,39
Cd	µg/L	-0,16	0,07	0,28	0,33	0,21
Hg	µg/L	0,08	-0,16	-0,67	-0,39	-0,58
Ni	µg/L	0,16	0,36	-0,22	-0,21	-0,18
TC	CFU/100mL	-0,06	0,13	1,00	0,58	0,69
FC	CFU/100mL	-0,20	-0,05	0,58	1,00	0,75
FE	CFU/100mL	-0,05	0,13	0,69	0,75	1,00

4.2. Dunav – pasivni monitoring

U istraživanju na reci Dunav, praćen je uticaj sredinskog stresa na nivo oštećenja DNK molekula u hemocitama jedinki *Unio* sp. i *S. woodiana* primenom pasivnog biomonitoringa. Istraživanje je rađeno u okviru međunarodne ekspedicije JDS3 (eng. Joint Danube Survey 3) pri čemu je obuhvaćeno 68 lokaliteta iz 9 sektora reke:

- Sektor II Zapadno Alpsko pobrđe (rkm 2.581 – 2.225), država Nemačka;
- Sektor III Istočno Alpsko pobrđe (rkm 2.225 – 2.001), države Nemačka, Austrija;
- Sektor IV Niže Alpsko pobrđe (rkm 2.001 – 1.789,5), države Slovačka, Mađarska;
- Sektor V Mađarska krivina Dunava (rkm 1.789,5 – 1.497), države Slovačka, Mađarska;
- Sektor VI Panonska ravan (rkm 1.497 – 1.075), države Mađarska, Hrvatska, Srbija;
- Sektor VII Đerdap (rkm 1.075 - 942), države Srbija, Rumunija;
- Sektor VIII Zapadna Pontoška oblast (rkm 942 – 375,5), države Rumunija, Bugarska;
- Sektor IX Istočna Valahijska oblast (rkm 375,5 - 100), države Rumunija, Moldavija, Ukrajina i
- Sektor X Delta (rkm 100 - 7), države Rumunija, Ukrajina

Na svakom od lokaliteta praćen je i mikrobiološki kvalitet vode dok je Međunarodna komisija za zaštitu Dunava (ICPDR) obezbedila podatke o fizičko-hemijskim parametrima izmerenim u vodi, suspendovanim česticama i sedimentu. Međutim, zvanični izveštaj ICPDR do ovog trenutka nije objavljen, pa iz tog razloga sami podaci fizičko - hemijskih analiza neće biti diskutovani, osim u svetlu korelacija sa DNK oštećenjem merenim u jedinkama školjki. Na **slici 4.6.**, prikazane su odabrane fotografije proučavanih sektora reke Dunav. Detaljan opis sektora reke Dunav dat je u **prilogu 3.**



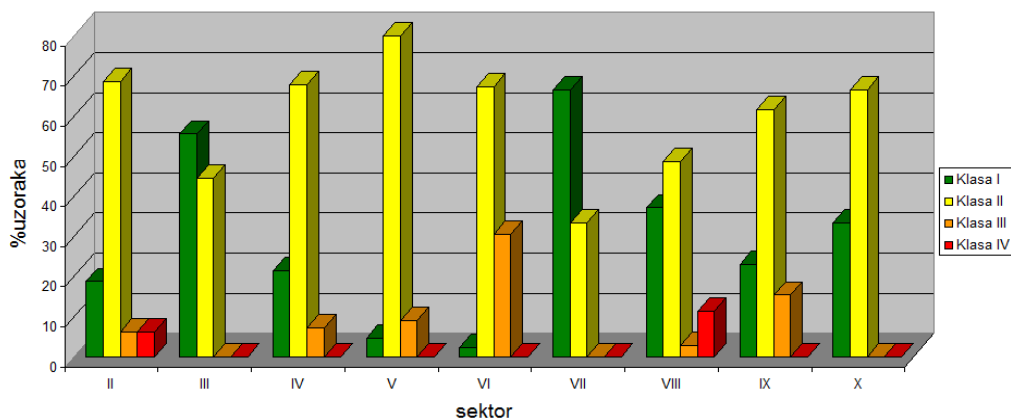
Slika 4.6. Odabrane fotografije sa proučavanih sektora Dunava

4.2.1. Mikrobiološki kvalitet vode

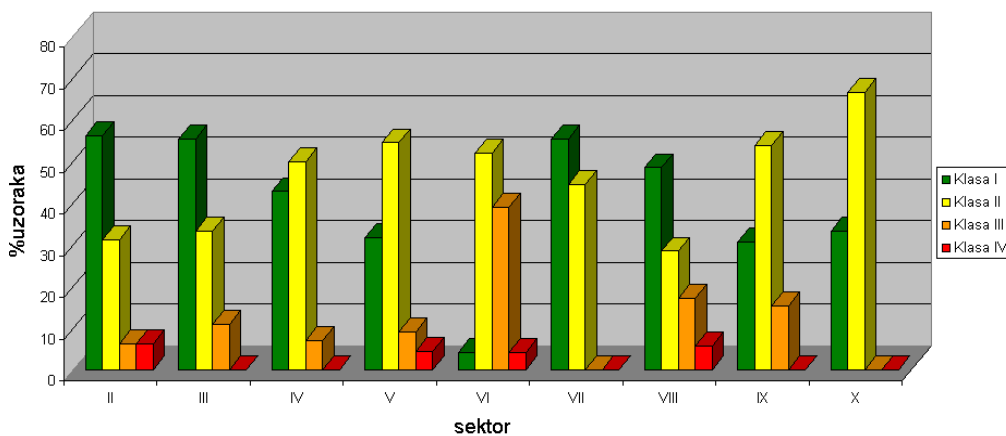
Mikrobiološke analize vode rađene su na 68 lokaliteta, pri čemu su na svakom lokalitetu uzimana po tri uzorka: leva obala, desna obala i sredina. Gledajući po sektorima, primećuje se značajna razlika u kvalitetu vode. Po svim parametrima sektor VI se izdvaja kao najzagađeniji (uticaj Novog Sada i Beograda kao i pritoka Drava i Velika Morava), dok se sektor VII (Đerdap) izdvaja kao najčistiji (Slike 4.7. - 4.9.). Na osnovu

Rezultati

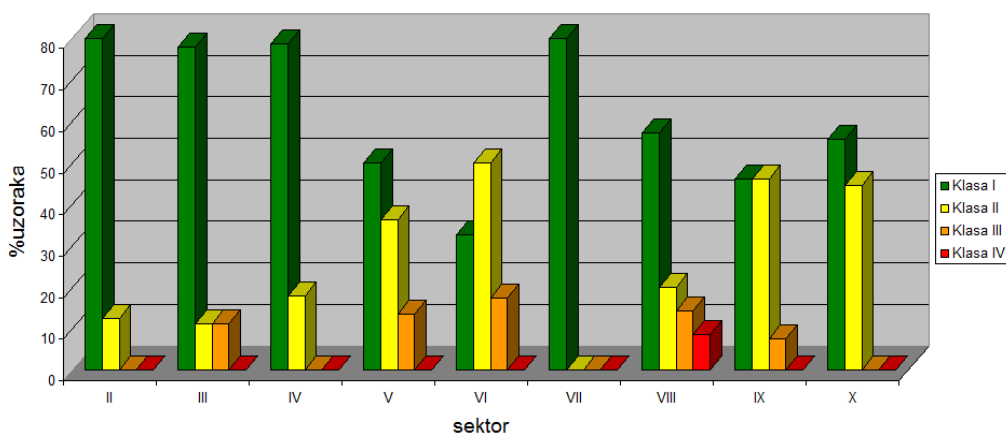
brojnosti *E. coli*, u sektoru VI čak 40 % uzoraka je bilo kritično zagađeno (klasa III) dok je svega 4 % uzoraka u ovom sektoru spadalo u klasu I. U sektoru VIII 49 % uzoraka spada u prvu klasu dok 20 % uzoraka ima kritično (klasa III) ili veće zagađenje. U sektoru VII čak 55 % uzorka je bilo u klasi I a 45 % u klasi II (Slika 4.8.).



Slika 4.7. Frekventna analiza uzoraka na osnovu nivoa fekalnog zagađenja (klasifikacija na osnovu TC)



Slika 4.8. Frekventna analiza uzoraka na osnovu nivoa fekalnog zagađenja (klasifikacija na osnovu *E. coli*)



Slika 4.9. Frekventna analiza uzoraka na osnovu nivoa fekalnog zagađenja (klasifikacija na osnovu EF)

4.2.2. Uzorkovanje jedinki *Unio* sp. i *S. woodiana* na reci Dunav

Jedinke su nađene na ukupno 34 od 68 ispitivanih lokaliteta. Jedinke *Unio* sp. su nađene na 31 lokalitetu (ukupno 129 jedinki) dok su jedinke *S. woodiana* nađene na 16 lokaliteta (ukupno 63 jedinke). Jedinke obe vrste su nađene na 13 lokaliteta.

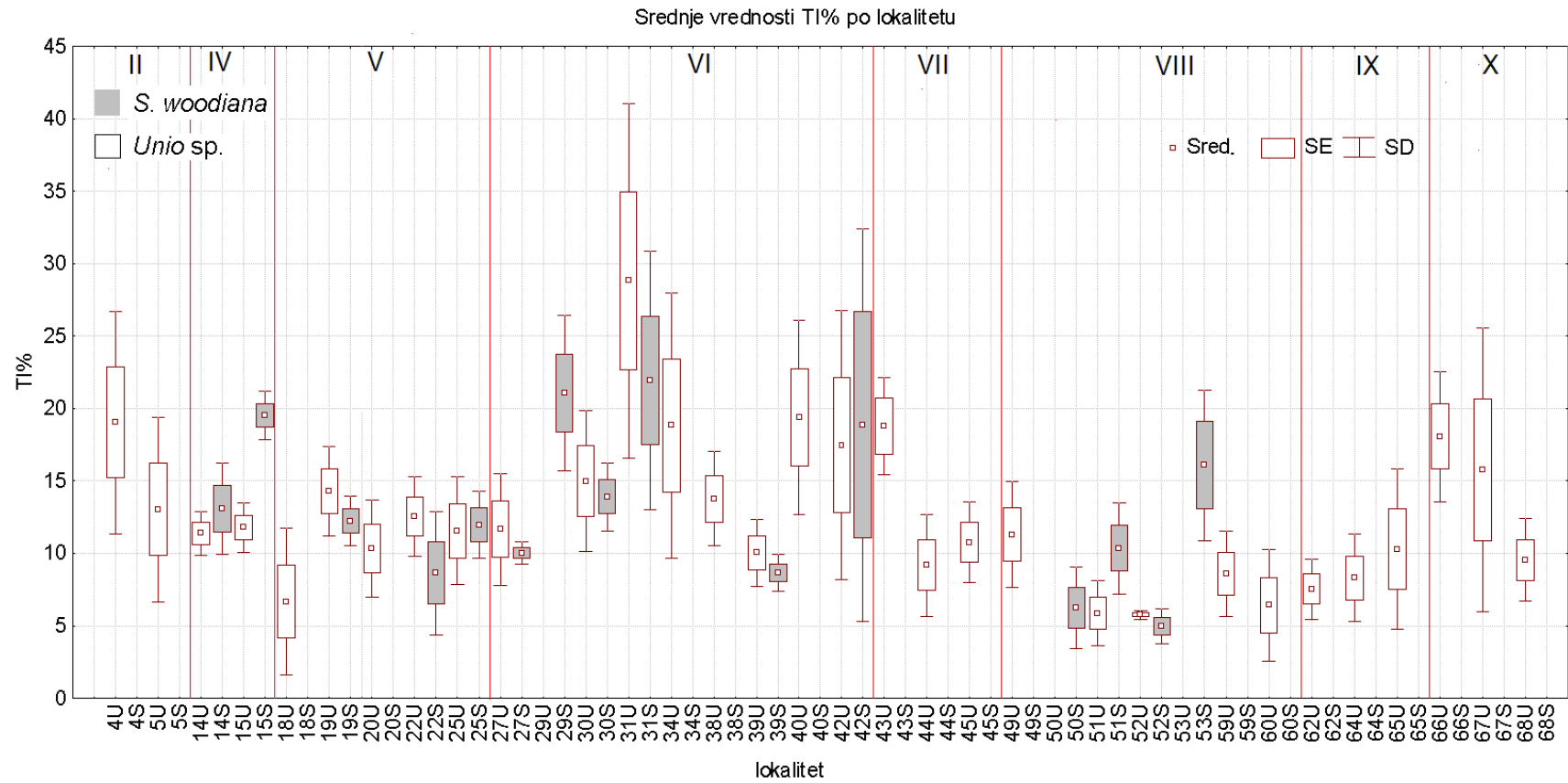
Na slici 4.10., izdvojene su pojedinačne vrednosti mikrobioloških indikatora na lokalitetima na kojim su uzorkovane i školjke. Po visokom nivou fekalnog zagađenja izdvajaju se lokaliteti JDS29, JDS38, JDS39, JDS40, JDS53 i JDS59 (sektori VI i VIII). Takođe, na velikom broju lokaliteta evidentna je razlika u kvalitetu vode na levoj i desnoj obali reke.



Slika 4.10. Brojnost ukupnih koliforma (TC), *E. coli* i fekalnih enterokoka (FE) na lokalitetima na reci Dunav izražena kao log MPN/100mL sa naznačenim granicama između klasa

4.2.2.2. Variranje u nivou oštećenja na različitim lokalitetima

Na slici 4.11., prikazan je nivo oštećenja DNK u jedinkama odvojeno za svaki lokalitet.



Slika 4.11. Nivo oštećenja DNK u jedinkama izražen kao srednja vrednost TI svih jedinki iste vrste na određenom lokalitetu; crvenim linijama predstavljene su granice između sektora reke Dunav

U **sektoru II**, na lokalitetu JDS4 (Deggendorf) primećen je povišen nivo oštećenja dok je u jedinkama sa lokaliteta JDS5 (Muhlau) nivo oštećenja odgovarao nivou u jedinkama iz sledećeg sektora.

U **sektoru IV**, najviše oštećenje je detektovano kod jedinki *S. woodiana* na lokalitetu JDS15. U ostalim uzorcima nivo oštećenja po vrednostima nije značajnije varirao u odnosu na lokalitet JDS5 iz prethodnog i na lokalitete iz sledećeg sektora. Na lokalitetu JDS14 nije primećen uticaj Bratislave.

U **sektoru V**, znatno niže oštećenje je detektovano na lokalitetu JDS18 (pritoka Vah) u poređenju sa ostalim lokalitetima u ovom sektoru. Na ostalim lokalitetima primećeno je neznatno variranje u oštećenju DNK. Uticaj Budimpešte nije detektovan (JDS22).

U **sektoru VI**, nivo oštećenja počinje naglo da raste u jedinkama iz Drave kao i nizvodno od ušća ove pritoke (JDS29). Najviši nivo oštećenja detektovan je na lokalitetu JDS31 (Ilok, Bačka Palanka) nakon čega nivo oštećenja počinje da opada. Uticaj Beograda i Pančeva nije detektovan, čak je na ova dva lokaliteta (JDS 38 i 39) u potezu od ušća Drave do ušća Velike Morave detektovan najniži nivo oštećenja. Na oba lokaliteta jedinke su prikupljene sa obale koja se nalazi nasuprot izvora zagađenja. Na ovim tačkama veliki uticaj ima Sava. U sektoru su detektovane povišene vrednosti na lokalitetu nadomak Smedereva (JDS40) kao i na lokalitetu nizvodno od ušća Velike Morave (JDS42).

U **sektoru VII** je evidentno postepeno snižavanje nivoa oštećenja DNK. Najniže vrednosti zabeležene su na lokalitetu JDS44 (Golubac).

U **sektoru VIII** najniže oštećenje DNK je detektovano u jedinkama sa lokaliteta JDS52 (Nizvodno od reke Olt). Nagli skok DNA oštećenja detektovan je u jedinkama *S. woodiana* sa lokaliteta nizvodno od luka Zimnicea/Svištov (JDS53).

U **sektoru IX** nije primećena razlika u nivou oštećenja u jedinkama iz Dunava i jedinkama iz pritoke Prut (JDS64), blag porast oštećenja detektovan je nizvodno od grada Reni (JDS65).

U **sektoru X** primećeno je povišenje nivoa oštećenja DNK u odnosu na prethodni. U rukavcu Sf. George (JDS68) zabeležen je znatno niži nivo oštećenja nego u Kilia i Sulina rukavcu (JDS66 i 67).

4.2.2.3. Korelacija između nivoa oštećenja DNK, fizičko – hemijskih i mikrobioloških parametara

Rezultati dobijeni komet testom su upoređeni sa vrednostima fizičko - hemijskih parametara merenih u vodi, suspendovanim česticama, sedimentu i tkivu školjki (rezultati su sumirani u **Tabeli 1** u **Prilogu 3**). Nivo oštećenja DNK u hemocitama kod jedinki *Unio* sp. je više korelisao sa izmerenim fizičko - hemijskim parametrima u odnosu na jedinke *S. woodiana*.

Od osnovnih parametara merenih u vodi (fizički parametri i nutrijenti) značajna korelacija je detektovana samo sa koncentracijom azota (samo za jedinke *Unio* sp.)

Koncentracije teških metala merene su u vodi, suspendovanim česticama i tkivu školjki. Značajna korelacija je detektovana samo između nivoa oštećenja DNK kod jedinki *Unio* sp. i koncentracije žive u tkivima jedinki ($r = 0,48$), dok je visoka korelacija detektovana sa koncentracijom cinka u vodi ($r = 0,34$) i rastvorenim česticama ($r = 0,29$). Takođe, ispitali smo odnos između koncentracije teških metala u vodi i suspendovanim česticama i koncentracije teških metala u tkivu školjki. Rezultati su prikazani u **tabeli 4.2**. Značajna pozitivna korelacija dobijena je samo sa koncentracijama kadmijuma i žive u suspendovanim česticama (*Unio* sp.), značajna negativna korelacija dobijena je sa koncentracijom arsena u vodi (*S. woodiana*).

Tabela 4.2. Spearman-ova korelacija između koncentracije teških metala/metaloida merenih u tkivu jedinki *Unio* sp. i *S. woodiana* i koncentracije teških metala/metaloida merenih u vodi i suspendovanim česticama (SČ). Označene korelacije su značajne za $p < 0,05$

Vrsta	Medijum	As	Cd	Cr	Cu	Pb	Hg	Ni	Zn
<i>Unio</i> sp.	Voda	0,16	0,13	-0,29	-0,04	0,32	0,21	-0,22	0,31
	SČ	-0,04	0,63	-0,46	0,12	-0,13	0,7	-0,21	-0,01
<i>S. woodiana</i>	Voda	-0,63	-0,05	-0,44	0,17	0,37	0,11	0,13	0,36
	SČ	-0,31	0,28	0,006	0,45	-0,1	0,29	0,18	-0,53

Koncentracije policikličnih aromatičnih ugljovodonika (PAH) su merene u vodi, suspendovanim česticama i sedimentu. Od PAH-ova merenih u vodi, izdvojeni su samo flouranten, naftalen i benzo[*g,h,i*]perilen, jer su samo koncentracije ovih supstanci bile iznad granice detekcije na većini lokaliteta. Sa druge strane, u suspendovanim česticama i

sedimentu, koncentracije svih PAH-ova su bile iznad granice detekcije. Primećena je značajna korelacija u nivou oštećenja DNK u jedinkama *Unio* sp. sa koncentracijom svih PAH-ova merenim u suspendovanim česticama kao i sa koncentracijom benzo[*b*]fluorantena iz sedimenta.

Od „novootkrivenih“ zagađivača u vodi, zabeležena je značajna korelacija DNK oštećenja kod jedinki *Unio* sp. sa koncentracijom hloradizon-desfenila i oksazepama kao i sa koncentracijom dioksina (PeCDD i TCDD) u sedimentu. Takođe, visoka korelacija je detektovana sa koncentracijama nekih od furana i polihlorovanih bifenila u sedimentu.

Rezultati korelacija između nivoa oštećenja DNK i indikatora fekalnog zagađenja pokazali su da postoji pozitivna korelacija između nivoa oštećenja DNK i brojnosti *E. coli* na lokalitetima ali korelacija ni u jednom od slučajeva nije bila značajna (**Tabela 4.3.**).

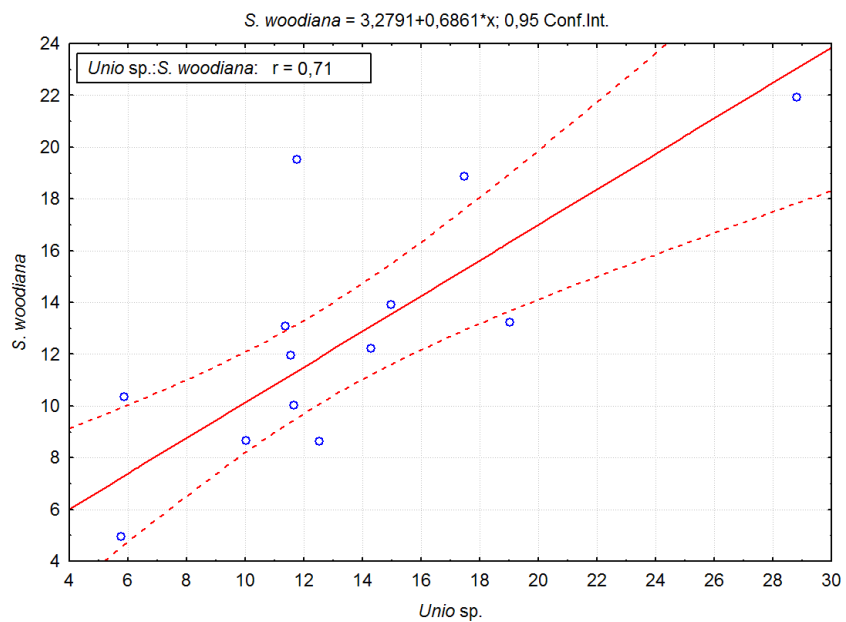
Tabela 4.3. Spearman-ova korelacija između parametara oštećenja DNK kod jedinku *Unio* sp. i *S. woodiana* i mikrobioloških parametara izmerenih u vodi na lokalitetima; označene vrednosti su značajne za $p < 0,05$

	<i>Unio</i> sp.	<i>S. woodiana</i>	TC	<i>E. coli</i>	FE
<i>Unio</i> sp.	1,0	0,71	-0,15	0,27	-0,07
<i>S. woodiana</i>	0,71	1,0	0,14	0,41	0,01
TC	-0,15	0,14	1,0	0,82	0,67
<i>E. coli</i>	0,27	0,41	0,82	1,0	0,67
EF	-0,07	0,01	0,67	0,67	1,0

4.2.2.3. Poređenje odgovora kod *Unio* sp. i *S. woodiana*

Upoređivanjem odgovora kod jedinki dve vrste na lokalitetima na kojima su obe vrste bile prisutne primećena je visoka korelacija ($r = 0,71$) u nivou oštećenja DNK (**Slika 4.12.**). Značajna razlika u odgovoru među vrstama detektovana je samo na lokalitetima JDS15 i JDS52.

Rezultati



Slika 4.12. Korelacija između nivoa oštećenja kod jedinki *Unio* sp. i *S. woodiana* iz Dunava

4.3. Grad Beograd - aktivni biomonitoring

Na četiri lokaliteta na Savi i Dunavu na teritoriji grada Beograda primenjen je aktivni biomonitoring, izlaganjem jedinki *U. pictorum* i *U. tumidus* prikupljenih na lokalitetu Orešac (Dunav). Uticaj sredinskog stresa na nivo oštećenja DNK molekula praćen je u hemocitima jedinki tokom 30 dana izlaganja.

Odabrani su lokaliteti Duboko (1), Savski rukavac (2) i Savska marina (3) na reci Savi i lokalitet Višnjica (4) na reci Dunav (**Slika 4.13.**). Detaljan opis istraživanog područja dat je u **prilogu 3**. Tokom istraživanja, procena kvaliteta vode na proučavanim lokalitetima vršena je na osnovu mikrobioloških i fizičko - hemijskih parametara.



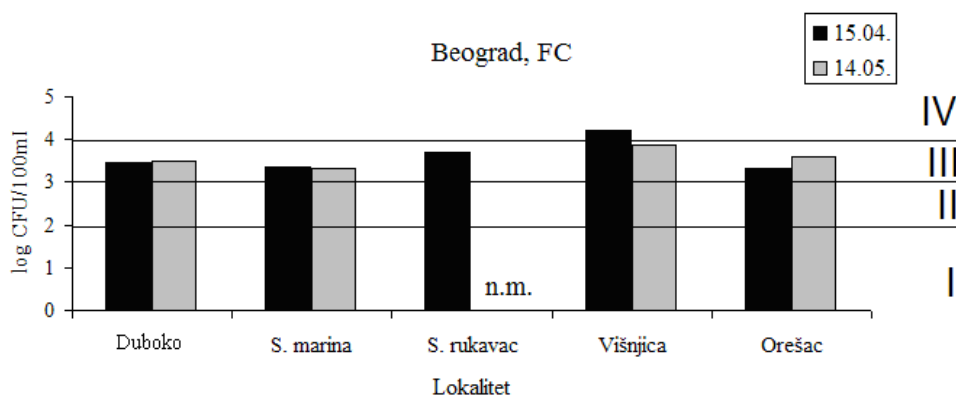
Slika 4.13. Lokaliteti na Savi i Dunavu na kojima je primenjen aktivni biomonitoring: Duboko (1), Savski rukavac (2), Savska marina (3), Višnjica (4)

4.3.1. Fizičko - hemijski i mikrobiološki kvalitet vode

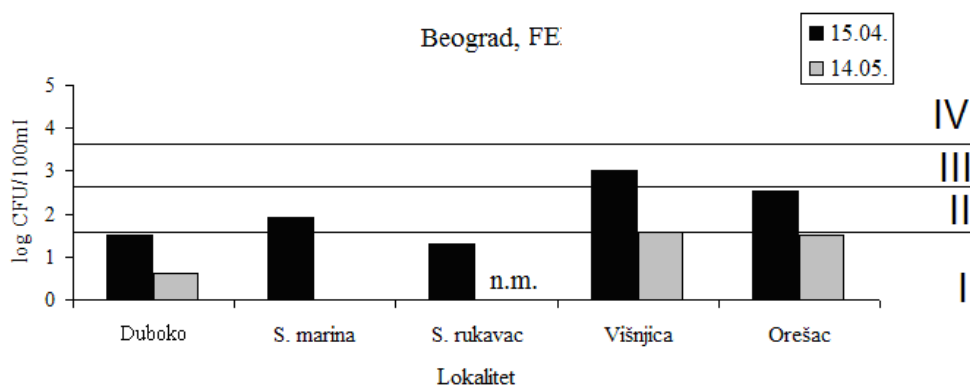
Podaci o fizičko - hemijskim parametrima dati su u u **tabelama 1 i 2 (Prilog 3)**. Rezultati analiza su ukazali na nezadovoljavajući kvalitet vode na svim lokalitetima. Visoka brojnost fekalnih koliforma (**Slika 4.14. i 4.15.**), kao i visoke koncentracije amonijaka i fosfata, ukazale su na prisustvo nedavnog fekalnog zagađenja. Na lokalitetu

Rezultati

Višnjica zabeležene su i ekstremno niske koncentracije rastvorenog kiseonika (1,6 %). Koncentracije rastvorenog cinka, bakra i arsena bile su nekoliko puta više od dozvoljenih vrednosti na lokalitetima u rečnim rukavcima (Višnjica i Savski rukavac). Republički Hidrometeorološki zavod Srbije i Gradski zavod za javno zdravlje obezbedili su i dodatne podatke o koncentracijama herbicida, pesticida i PAH-ova ali ovi parametri nisu značajno varirali i obično su bili u granicama dozvoljenih koncentracija ili čak ispod limita detekcije. Na lokalitetu Duboko, svi parametri osim broja fekalnih koliforma, amonijaka i fosfata su se nalazili u granicama dozvoljenih vrednosti. Na lokalitetu Orešac, na kom su sakupljane školjke, detektovan je povišen broj fekalnih koliforma kao i povišena koncentracija cinka i bakra.



Slika 4.14. Brojnost fekalnih koliforma (FC) na lokalitetima tokom aktivnog biomonitoringa izražena kao log CFU/100 mL sa naznačenim granicama između klasa; n.m. – nije mereno



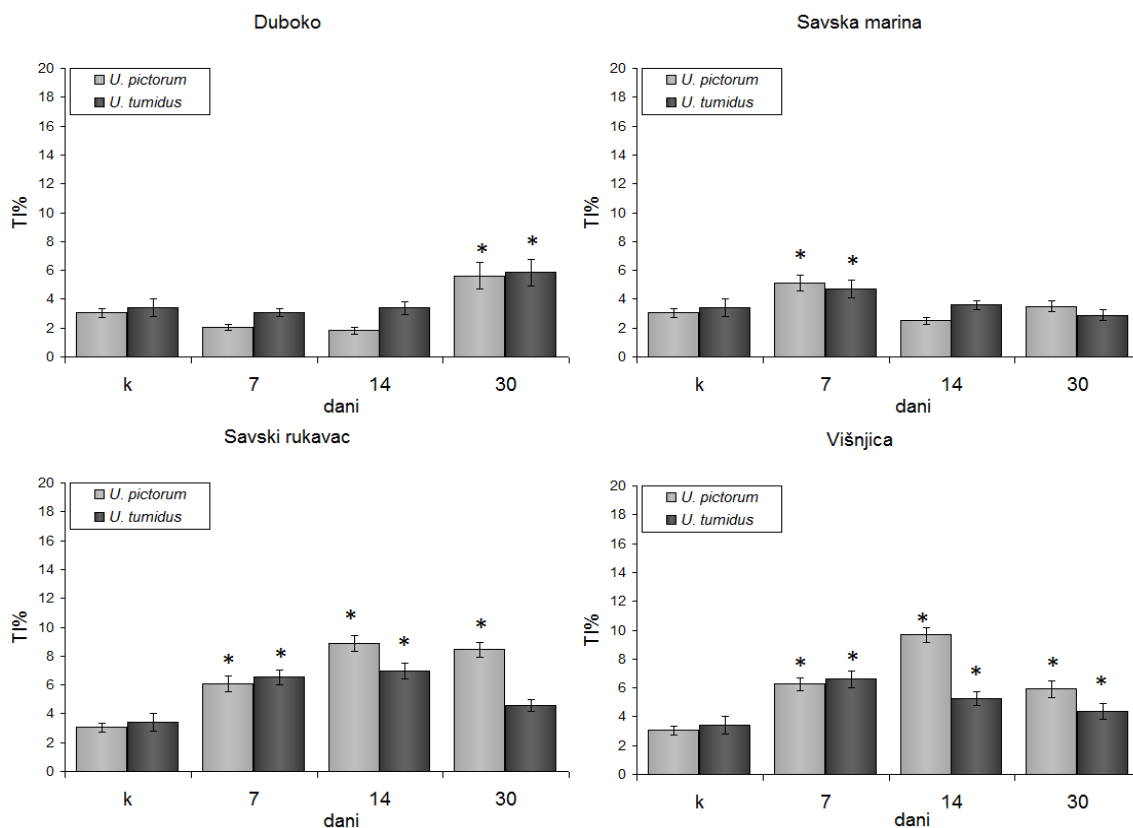
Slika 4.15. Brojnost fekalnih enterokoka (FE) na lokalitetima tokom aktivnog biomonitoringa izražena kao log CFU/100 mL sa naznačenim granicama između klasa; n.m. – nije mereno

4.3.2. Određivanje bazalnog nivoa oštećenja DNK molekula

U jedinkama uzorkovanim u Orešču vrednost TI je iznosila $8,1 \pm 1$ kod *U. pictorum* i $9,5 \pm 1,3$ kod *U. tumidus*. Nakon 10 dana aklimacije, primećeno je značajno sniženje nivoa oštećenja u jedinkama obe vrste. Vrednost TI je iznosila $3,1 \pm 0,3$ za *U. pictorum* i $3,4 \pm 0,6$ za *U. tumidus*.

4.3.3. Toksičnost i nivo oštećenja DNK prilikom izlaganja

Tokom 30 dana izlaganja na lokalitetu Višnjica, uginulo je 12 jedinki *U. tumidus* (33 %) i 4 jedinke *U. pictorum* (10 %). Na lokalitetu Savski rukavac, uginule su samo dve jedinke *U. tumidus* (5 %) (Tabela 4, Prilog 3). Nivo oštećenja DNK molekula u jedinkama tokom izlaganja, izražen preko vrednosti TI, sumiran je na slici 4.16.



Slika 4.16. Nivo oštećenja DNK molekula u hemocitama *U. pictorum* i *U. tumidus* tokom 30 dana izlaganja; *p < 0,05

Na lokalitetu Duboko, koji se po fizičko - hemijskim analizama vode pokazao kao najmanje zagađen, vrednost TI u hemocitama obe vrste značajno je porasla tek nakon 30 dana izlaganja. Bitno je napomenuti da na ovom lokalitetu nije primećen porast oštećenja nakon sedmog dana izlaganja koji bi se mogao pripisati stresu nastalom usled prebacivanja jedinki na novi lokalitet.

Na lokalitetu Savska marina, povišenje nivoa oštećenja DNK molekula je primećeno samo nakon 7 dana izlaganja. Na lokalitetima Savski rukavac i Višnjica, povišenje nivoa oštećenja je primećeno tokom čitavog perioda izlaganja. Na ovim lokalitetima, porast oštećenja DNK, primećen već nakon 7 dana izlaganja, dostiže maksimum nakon 14 dana, a zatim do pada nivoa oštećenja.

4.3.4. Korelacija između nivoa oštećenja DNK, fizičko – hemijskih i mikrobioloških parametara

Korelacije između nivoa oštećenja DNK, fizičko – hemijskih i mikrobioloških parametara prikazane su u **tabeli 4.4**. Za analizu su korišćene kako vrednosti TI, tako i vrednosti OTM prikazane u **tabelama 3 i 5 (Prilog 3)**. Ustanovljena je značajna korelacija između vrednosti TI ($r = 0,74$), odnosno OTM ($r = 0,73$), između vrsta *U. pictorum* i *U. tumidus*. Takođe, korelacija je detektovana između vrednosti TI i OTM i fizičko - hemijskih parametara. Najznačajnije korelacije detektovane su između vrednosti TI u hemocitama *U. pictorum* i koncentracije gvožđa ($r = 0,76$), cinka ($r = 0,80$), bakra ($r = 0,81$) i arsena ($r = 0,83$). Takođe je primećena i značajna korelacija između TI obe vrste i brojnosti FC.

Što se tiče mikrobioloških indikatora fekalnog zagađenja i fizičko - hemijskih parametara, primećena je značajna korelacije između vrednosti FC i koncentracije gvožđa ($r = 0,86$), bakra ($r = 0,90$) i arsena ($r = 0,78$). Takođe, primećena je negativna korelacija između FC i koncentracije hroma ($r = -0,79$). Visoka, ali statistički neznačajna, korelacija je primećena i između brojnosti FC i FE i kao i između broja FC i koncentracije amonijaka.

Rezultati

Tabela 4.4. Spearman-ova korelacija između oštećenja DNK, mikrobioloških i fizičko - hemijskih parametara izmerenih u vodi na lokalitetima; označene vrednosti su značajne za $p < 0,05$

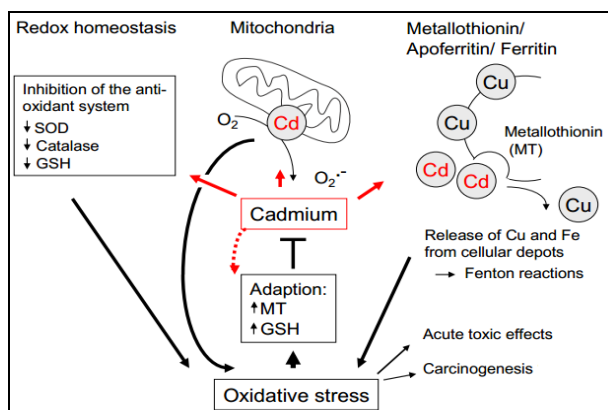
Parametar	TI		OTM		Fekalni indikatori	
	<i>U. pictorum</i>	<i>U. tumidus</i>	<i>U. pictorum</i>	<i>U. tumidus</i>	FC	FE
t (C°)	-0,31	-0,50	0,13	-0,56	-0,32	-0,45
konduktivitet	0,39	0,11	0,54	0,30	0,32	-0,11
Kiseonik (mg/l)	-0,43	-0,32	-0,21	-0,29	-0,36	0,14
Kiseonik (%)	-0,47	-0,34	-0,25	-0,36	-0,34	0,11
pH	-0,22	-0,49	0,22	-0,50	-0,23	-0,36
NH ₄ ⁺ (mg/l)	0,57	0,32	0,64	0,60	0,54	0,11
NO ₃ ⁻ (mg/l)	-0,25	-0,39	-0,11	0,04	-0,64	-0,68
PO ₄ ³⁻ (mg/l)	0,18	0,24	-0,02	0,33	0,22	0,67
Fe	0,76	0,63	0,80	0,45	0,86	0,24
Zn	0,80	0,50	0,76	0,58	-0,42	-0,57
Cu	0,81	0,55	0,79	0,56	0,90	0,54
Cr	-0,47	-0,25	-0,42	-0,36	-0,79	-0,63
As	0,83	0,64	0,85	0,53	0,78	0,30
Ni	0,44	0,14	0,30	0,40	0,27	0,31
FC	0,86	0,86	0,79	0,39	1,00	0,54
FE	0,43	0,43	0,29	0,36	0,54	1,00
<i>U. pictorum</i> TI	1,00	0,74	0,94	0,73	0,86	0,43
<i>U. tumidus</i> TI	0,74	1,00	0,59	0,47	0,86	0,43
<i>U. pictorum</i> OTM	0,94	0,59	1,00	0,73	0,79	0,29
<i>U. tumidus</i> OTM	0,73	0,47	0,73	1,00	0,39	0,36

4.4. Biomonitoring *ex situ*

Ex situ biomonitoring podrazumevaju proučavanje uticaja supstanci na jedinke u laboratorijskim uslovima. U ovom radu praćen je efekat citostatika 5-fluorouracila, cisplatine, etopozida, vinkristin sulfata i imatinib mezilata na nivo oštećenja u hemocitama školjki *U. pictorum* i *U. tumidus* u *in vivo* i *in vitro* uslovima. Prilikom *in vivo* tretmana jedinke su izlagane različitim koncentracijama odabranih citostatika u semistatičkom sistemu. Prilikom *in vitro* tretmana, uticaj citostatika je praćen izlaganjem sveže izolovanih hemocita i hemocita u primarnoj kulturi. Kao pozitivnu kontrolu koristili smo model mutagen kadmijum hlorid. Za sve eksperimente, vrednosti TI predstavljene su u vidu histograma, dok su vrednosti OTM predstavljene tabelarno u **prilogu 4**.

4.4.1. CdCl₂

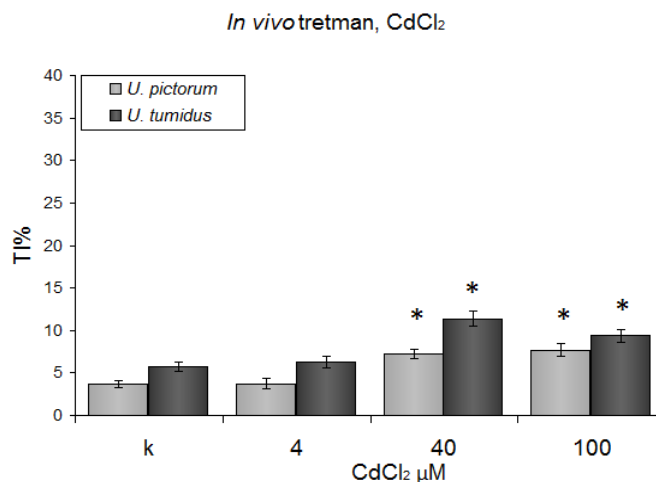
Kao što je šematski prikazano na **slici 4.17.**, kadmijum inhibira antioksidativnu odbranu, dovodi do stvaranja reaktivnih vrsta kiseonika, bilo direktno ili putem Fentonove reakcije, i utiče na mehanizme reparacije DNK i regulaciju ćelijskog ciklusa, te samim tim smanjuje stabilnost genoma (Bandyopadhyay i Mukherjee, 2011; Filipič, 2012).



Slika 4.17.. Mehanizam dejstva kadmijuma

4.4.1.1. Tretman *in vivo*

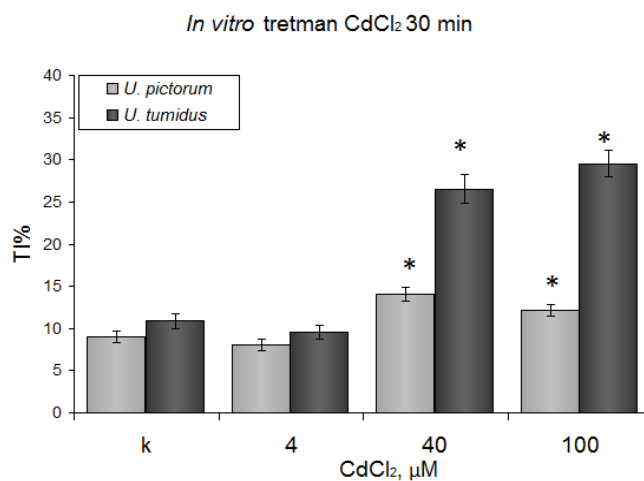
Kod obe vrste, CdCl₂ u koncentracijama 40 i 100 μM doveo je do povećanja DNK oštećenja u poređenju sa kontrolom (Slika 4.18.), pri čemu nije primećen uticaj testiranih koncentracija na vijabilnost hemocita (Tabela 1, Prilog 4).



Slika 4.18. Nivo oštećenja DNK u hemocitama *U. tumidus* i *U. pictorum* prilikom tretmana CdCl₂ (4, 40 and 100 μM) tokom 72h *in vivo*. *p < 0.05

4.4.1.2. Tretman *in vitro*

Prilikom tretmana sveže izolovanih hemocita (30 min) CdCl₂ je kod obe vrste doveo do povećanja DNK oštećenja u koncentracijama 40 i 100 μM u poređenju sa kontrolom (Slika 4.19.).



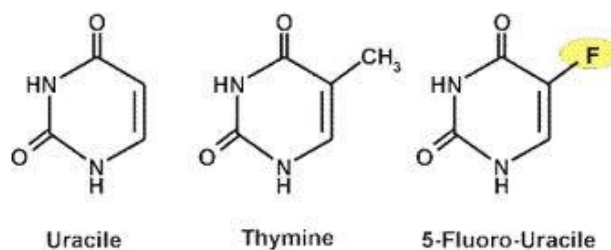
Slika 4.19. Nivo oštećenja DNK u hemocitama *U. tumidus* i *U. pictorum* prilikom tretmana CdCl₂ (4, 40 and 100 μM) tokom 30 min *in vitro*. *p < 0,05

Za tretman u primarnoj kulturi hemocita (**22 h**), odabrana je samo koncentracija od 100 μM . Tretman je rađen kao pozitivna kontola paralelno sa testiranim citostatikom. Rezultati tretmana prikazani su na graficima odgovarajućih tretmana citostaticima.

Ni tokom *in vitro* tretmana nije primećen uticaj testiranih koncentracija na vijabilnost hemocita (**Tabela 1, Prilog 4**).

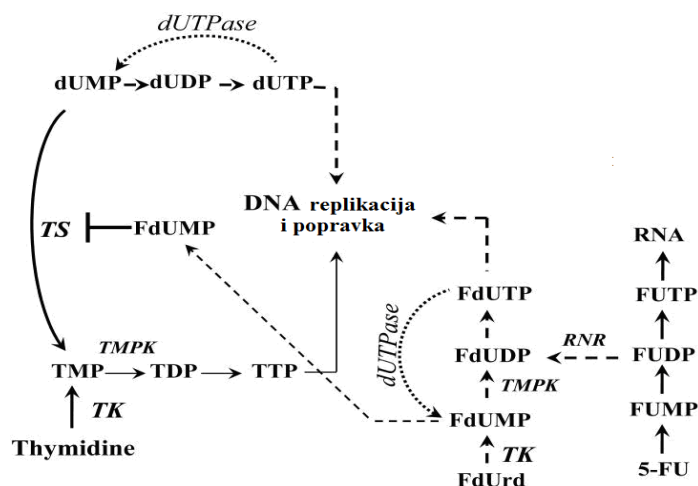
4.4.2. 5-fluorouracil (5-FU)

5-FU je analog pirimidina (**Slika 4.20.**) i ugrađuje se u DNK u S fazi ćelijskog ciklusa umesto timina.



Slika 4.20. Hemijske strukture uracila, timina i 5-FU (www.oncoprof.net)

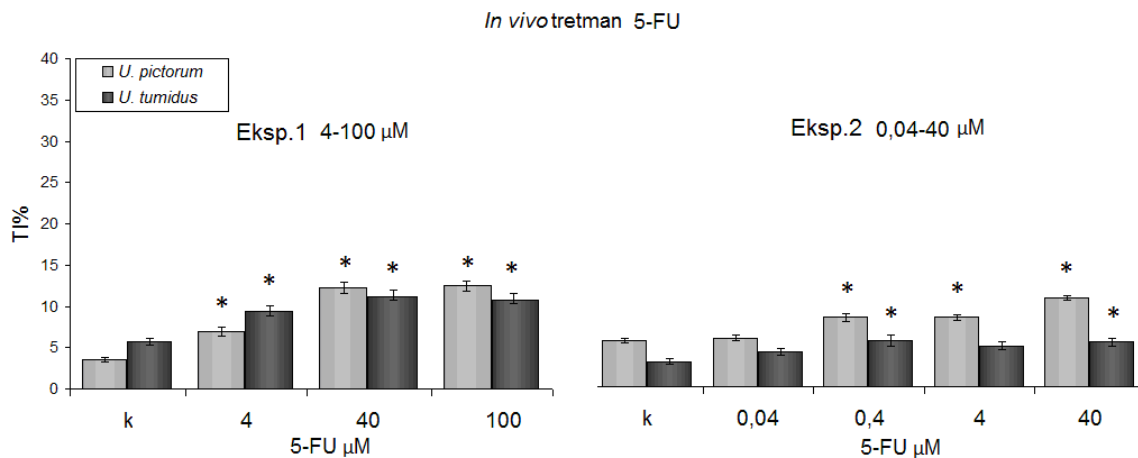
U organizmu 5-FU podleže transformaciji u ribozil i dezoksiribozil nukleotidne metabolite. Jedan od ovih metabolita (fluor-dezoksi uridin monofosfat- FdUMP) vezuje se kovalentno za enzim timidilat sintetazu (TS), koja dodaje metil grupu na dUMP (dezoksi uridin monofosfat) i prevodi ga u TMP (timidin monofosfat). Kada se blokira timidilat sintetaza nema sinteze timina, pa se umesto njega u DNK molekul ugrađuje dUTP (dezoksi uridin trifosfat), koji prirodno nije deo DNK molekula. Pogrešno ugrađen nukleotid biva isecan prilikom popravke pogrešno sparenih baza ili prilikom ekscizije baza ili nukleotida (BER i NER). Ukoliko se pri reparaciji napravi dosta takvih prekida, doći će do apoptoze tj. programirane ćelijske smrti (Longley i sar., 2003). Mehanizam dejstva 5-FU sumiran je na **slici 4.21**.



Slika 4.21. Mehanizam dejstva 5-FU (Longley i sar., 2003)

4.4.2.1. Efekat tretmana 5-FU *in vivo*

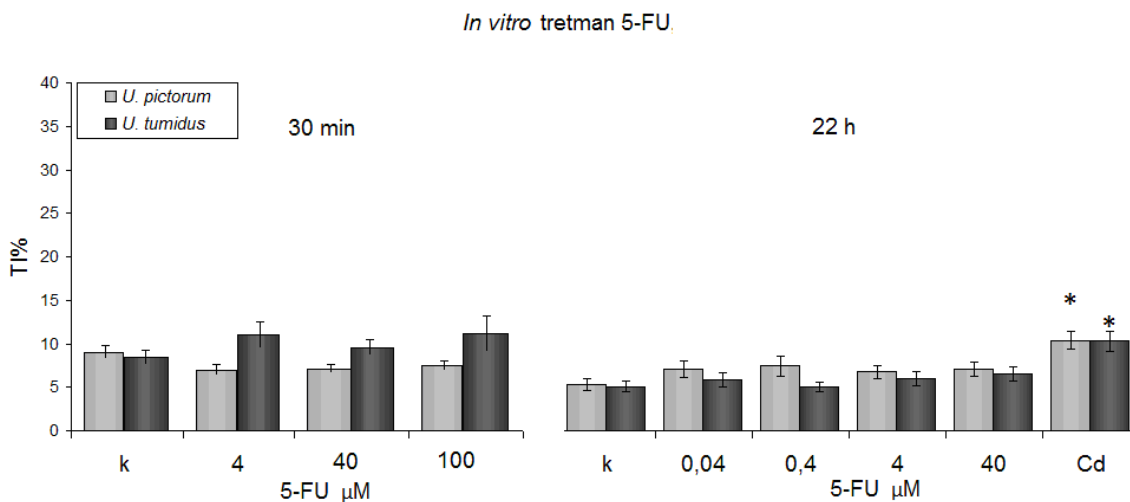
Prilikom tretmana školjki sa 5-FU u opsegu koncentracija 4-100 μM (Slika 4.22.) kod obe vrste je detektovano statistički značajno povećanje DNK oštećenja za sve tri testirane koncentracije, dok je pri ponovljenom testiranju u opsegu koncentracija 0,04 - 40 μM povećanje DNK oštećenja detektovano za koncentracije 0,4, 4 i 40 μM kod vrste *U. pictorum* i 0,4 i 40 μM kod vrste *U. tumidus* (Slika 4.22.). Tokom ovih eksperimenata nije primećen uticaj 5-FU na vijabilnost hemocita (Tabela 4, Prilog 4).



Slika 4.22. Nivo oštećenja DNK u hemocitama *U. tumidus* i *U. pictorum* prilikom tretmana 5-FU tokom 72h *in vivo*. * $p < 0,05$

4.4.2.2. Efekat tretmana 5-FU *in vitro*

Rezultati *in vitro* tretmana hemocita *U. pictorum* i *U. tumidus* prikazani su na **slici 4.23.**



Slika 4.23. Nivo oštećenja DNK u hemocitama *U. tumidus* i *U. pictorum* prilikom *in vitro* tretmana sa 5-FU tokom 30 min i 22 h; *p < 0,05

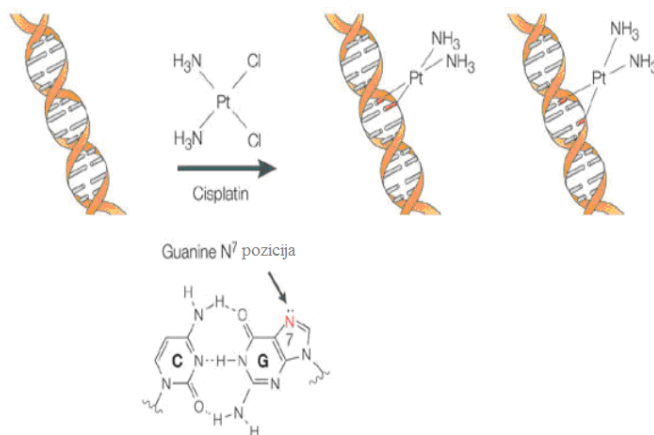
Prilikom tretiranja sveže izolovanih hemocita (30 min) u opsegu koncentracija 4 - 100 µM, nije detektovano statistički značajno povećanje DNK oštećenja za testirane koncentracije, pri čemu je samo vijabilnost hemocita *U. pictorum* je bila niža od 80% u poređenju sa kontrolom (**Tabela 4, Prilog 4**).

Ni prilikom tretmana hemocita u primarnoj kulturi (22 h) u opsegu koncentracija 0,04 - 40 µM nije detektovano statistički značajno povećanje DNK oštećenja za testirane koncentracije. Samo je tretman sa 100 µM CdCl₂ doveo da povećanja DNK oštećenja u odnosu na kontrolu.

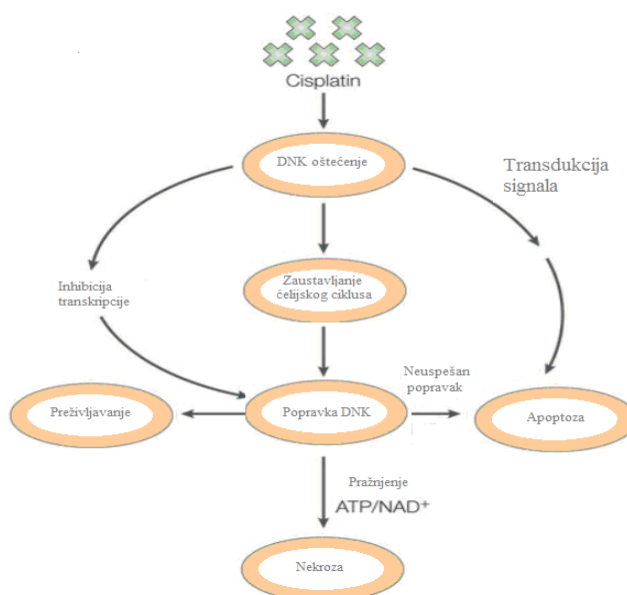
4.4.3. Cisplatina (CisPt)

U ćeliji se atom platine iz CisPt kovalentno vezuje za purine na poziciji N⁷ i formira monoadukte, 1,2- ili 1,3- unakrsne veze među lancima DNK molekula, ili u okviru istog lanca, ili unakrsne veze između DNK molekula i proteina (**Slika 4.24**).

Formirane veze blokiraju replikaciju i transkripciju, dovodeći do zaustavljanja ćelijskog ciklusa i ćelijske smrti (**Slika 4.25.**).



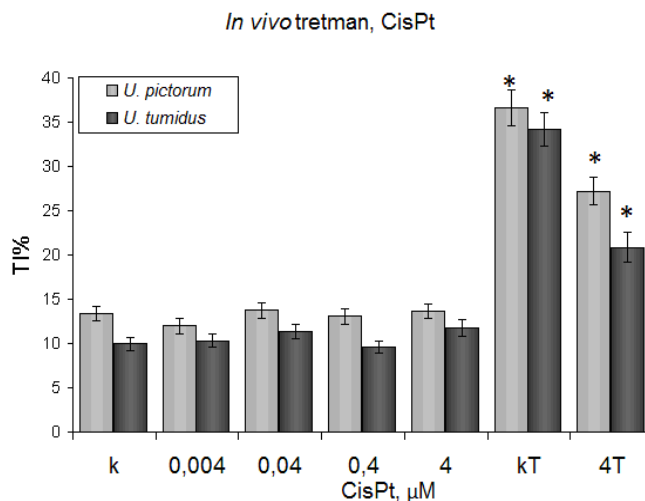
Slika 4.24. Mehanizam dejstva CisPt (<http://www.neurocard.net/flat.php?stack=180>)



Slika 4.25. Posledice interakcije DNK molekula i CisPt (Wang i Lippard., 2005)

4.4.3.1. Efekat tretmana CisPt *in vivo*

Tokom *in vivo* tretmana ni za jednu od testiranih koncentracija CisPt nije detektovano značajno povećanje oštećenja DNK (**Slika 4.26.**), a nije primećen ni uticaj testiranih koncentracija na vijabilnost hemocita (**Tabela 8, Prilog 4**).



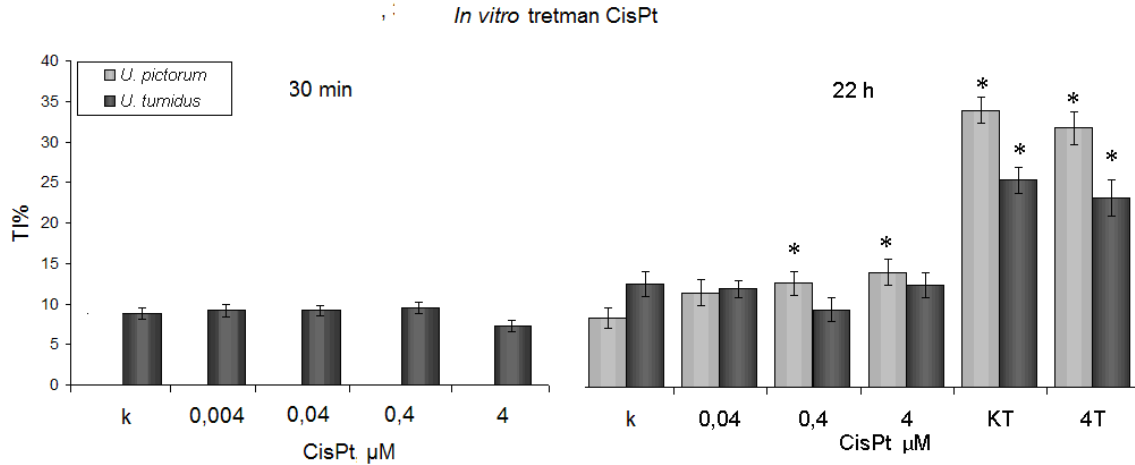
Slika 4.26. Nivo oštećenja DNK u hemocitama *U. tumidus* i *U. pictorum* prilikom tretmana sa CisPt tokom 72h *in vivo*, kao i nakon post-tretmana hemocita *in vitro* sa 20 μ M vodonik peroksida (kT i 4T); * $p < 0.05$

Da bismo utvrdili da li je nakon tretmana CisPt došlo do nastanka unakrsnih veza na molekulu DNK, rađen je post-tretman vodonik peroksidom. Hemocite jedinki iz grupa tretirane sa 4 μ M CisPt (4T) i jedinki iz odgovarajuće negativne kontrole (kT), tretirane su *in vitro* sa 20 μ M H₂O₂. Detektovana je značajna razlika u nivou DNK oštećenja u hemocitama iz grupe 4T i grupe kT (**Slika 4.26.**).

4.4.3.2. Efekat tretmana CisPt *in vitro*

Prilikom tretmana sveže izolovanih hemocita, testirane koncentracije CisPt nisu uticale na nivo oštećenja DNK u hemocitama *U. tumidus*. Međutim, prilikom tretmana hemocita *U. pictorum* u primarnoj kulturi, primećeno je značajno povećanje DNK oštećenja na koncentracijama 0,4 i 4 μ M CisPt. Nasuprot tome, u primarnoj kulturi hemocita *U. tumidus*, testirane koncentracije CisPt nisu uticale na povećanje oštećenja DNK. Post-tretman vodonik peroksidom (20 μ M), doveo je do značajnog povišenja oštećenja DNK u hemocitama obe vrste, ali nije bilo razlike između kontrolne grupe i grupe tretirane sa 4 μ M CisPt (**Slika 4.27.**).

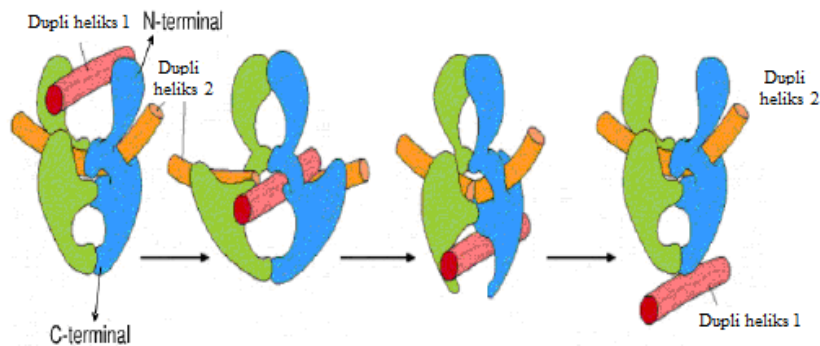
Tokom *in vitro* tretmana nije primećen uticaj testiranih koncentracija na vijabilnost hemocita (**Tabela 8, Prilog 4**).



Slika 4.27. Nivo oštećenja DNK u hemocitama *U. pictorum* i *U. tumidus* prilikom *in vitro* tretmana sa CisPt tokom 30 min, tretmanom 22h kao i nakon post-tretmana hemocita sa 20 μ M vodonik peroksidom (KT i 4T); *p < 0,05

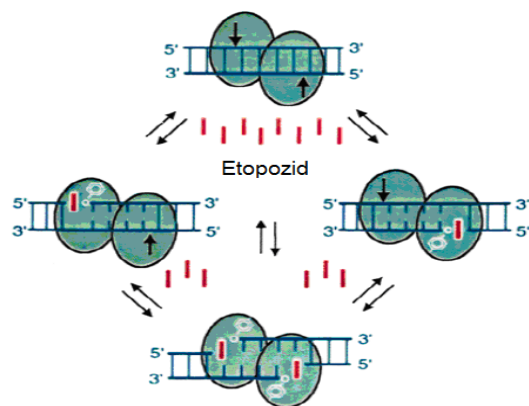
4.4.4. Etopozid (ETO)

ETO spada u grupu inhibitora topoizomeraze II. Uloga topoizomeraze II je da spreči prekomerno uvrtanje DNK molekula (eng. supercoiling) koje nastaje usled replikacije ili transkripcije (Mondal i Parvin, 2001). Topoizomeraza II pravi dvolančane prekide na molekulu DNK, katalizuje prolazak drugog dvolančanog segmenta kroz nastali prekid i vrši ponovnu ligaciju (**Slika 4.28.**).



Slika 4.28. Mehanizam dejstva topoizomeraze II

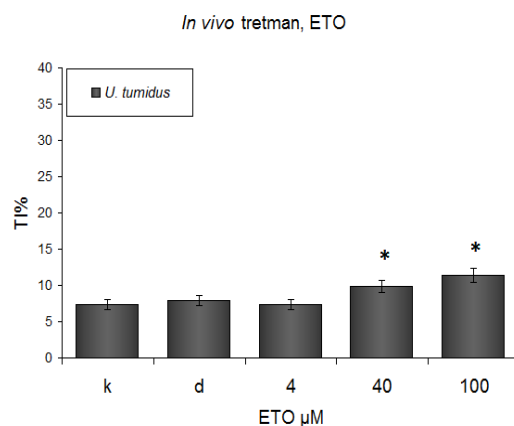
ETO se vezuje za topoizomerazu II i sprečava ligaciju nastalih prekida. Kako topoizomeraza II ima dve podjedinice, u zavisnosti da li je ETO vezan samo za jednu ili za obe subjedinice, nastaće jednolančani ili dvolančani prekidi DNK (Slika 4.29.).



Slika 4.29. Mehanizam inhibicije topoizomeraze II

4.4.4.1. Efekat tretmana ETO *in vivo*

In vivo tretman ETO, rađen je samo na jedinkama *U. tumidus* (Slika 4.30.). Tokom izlaganja, koncentracije 40 i 100 μM su dovele do značajnog povišenja DNK oštećenja u poređenju sa kontrolom. Značajna negativna korelacija ($r = -0.9$) između nivoa DNK oštećenja i vijabilnosti hemocita detektovana je samo kod jedinki *U. tumidus*, iako ni u jednoj grupi vijabilnost nije bila niža od 80% u poređenju sa kontrolom (Tabela 12, Prilog 4).

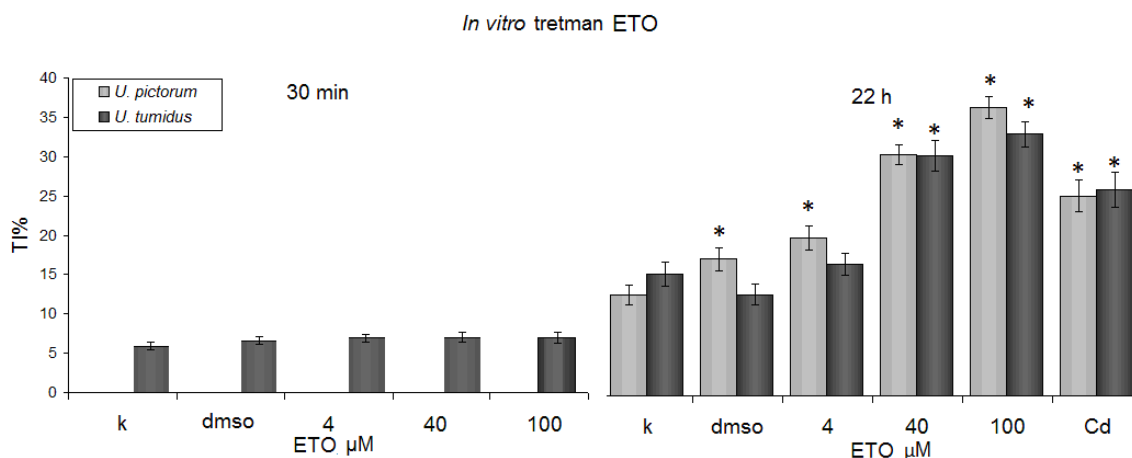


Slika 4.30. Nivo oštećenja DNK u hemocitama *U. tumidus* i *U. pictorum* prilikom tretmana sa ETO tokom 72h *in vivo*; * $p < 0.05$

4.4.4.2. Efekat tretmana ETO *in vitro*

Rezultati *in vitro* tretmana su sumirani na **slici 4.31**. Prilikom tretmana sveže izolovanih hemocita, testirane koncentracije nisu uticale na nivo oštećenja DNK.

Prilikom tretmana hemocita *U. pictorum* u primarnoj kulturi, povećanje oštećenja DNK je detektovano za sve testirane koncentracije ETO, kao i za pozitivnu kontrolu (100 μM CdCl_2) i kontrolu rastvarača (DMSO). U primarnoj kulturi hemocita vrste *U. tumidus*, značajno povećanje oštećenja DNK u poređenju sa kontrolom zabeleženo je samo sa 40 i 100 μM etopozidom, kao i u pozitivnoj kontroli, pri čemu je vijabilnost hemocita bila niža od 80% u poređenju sa kontrolom samo u slučaju pozitivne kontrole (**Tabela 12, Prilog 4**).



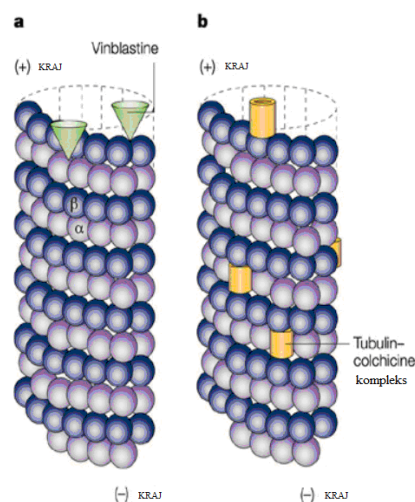
Slika 4.31. Nivo oštećenja DNK u hemocitama *U. pictorum* i *U. tumidus* prilikom *in vitro* tretmana ETO tokom 30 min i 22 h; * $p < 0,05$

4.4.5. Vinkristin sulfat (VIN)

VIN interaguje sa deobnim vretenom. Isto kao i vinblastin, VIN se sa visokim afinitetom vezuje za mesta na + kraju mikrotubula, za razliku od kolhicina koji formira kompleks sa dimerima tubulina, ometajući tako funkcije deobnog vretena (**Slika 4.32**).

Kao i većina antimitotičkih lekova, VIN redukuje dinamične pokrete deobnog vretena smanjivanjem tenzije na kinetohorama, centromerama i spojenim hromozomima usled čega dolazi do blokiranja mitoze u trenutku prelaska iz metafazu u anafazu

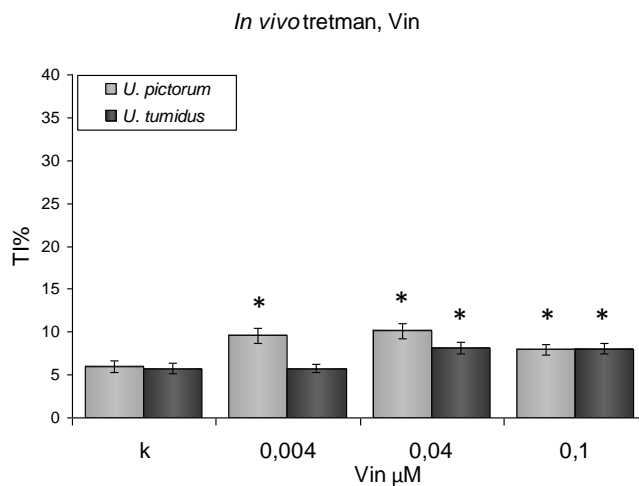
(Gordaliza i sar., 2004; Jordan i Wilson, 2004). Međutim VIN pored aneugenog može imati i klastogeno dejstvo (Kopjar i Garaj-Vrhovac, 1999; Kopjar i Garaj-Vrhovac, 2002).



Slika 4.32. Vezivanje vinblastina i kolchicina za mikrotubule

4.4.5.1. Efekat tretmana VIN *in vivo*

Značajno povećanje DNK oštećenja detektovano je kod jedinki *U. pictorum* izloženih svakoj od koncentracija VIN, pri čemu nije primećena zavisnost nivoa odgovora od testirane koncentracije (Slika 4.33.).



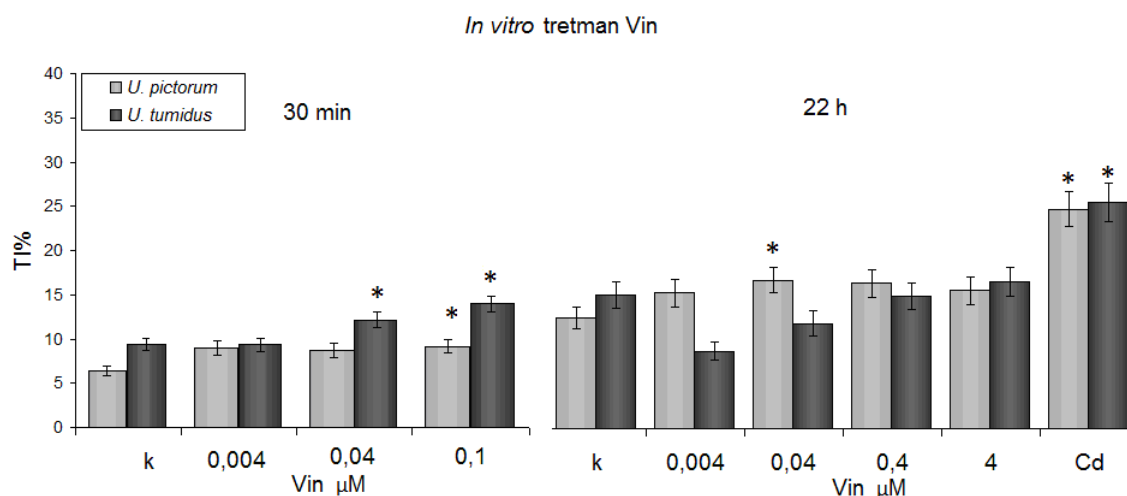
Slika 4.33. Nivo oštećenja DNK u hemocitama *U. tumidus* i *U. pictorum* prilikom tretmana Vin tokom 72h *in vivo*. *p < 0,05

Kod jedinki *U. tumidus* povećanje oštećenja DNK detektovano je na koncentracijama 0,04 i 0,1 μM . Testirane koncentracije nisu uticale na vijabilnost hemocita kod obe vrste (Tabela 16, Prilog 4).

4.4.5.2. Efekat tretmana VIN *in vitro*

Rezultati *in vitro* tretmana su sumirani na slici 4.34. Prilikom tretmana sveže izolovanih hemocita, značajno povećanje DNK oštećenja detektovano je kod *U. pictorum* na koncentraciji 0,1 μM , kao i kod *U. tumidus* na koncentracijama 0,04 i 0,1 μM .

Prilikom tretmana hemocita *U. pictorum* u primarnoj kulturi, značajno povećanje DNK oštećenja detektovano je samo pri tretmanu koncentracijom 0,04 μM , kao i u pozitivnoj kontroli. U primarnoj kulturi hemocita *U. tumidus* testirane koncentracije VIN nisu uticale na povećanje oštećenja DNK. Vijabilnost niža od 80% u poređenju sa kontrolom zabeležena je samo u primarnoj kulturi hemocita *U. tumidus* (Tabela 16, Prilog 4).

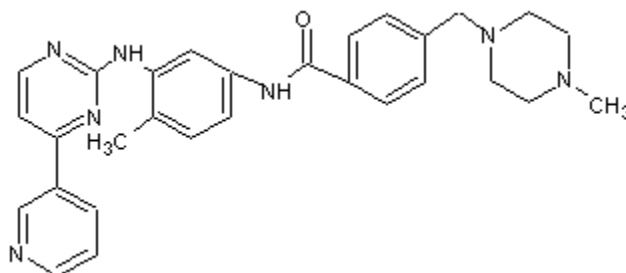


Slika 4.34. Nivo oštećenja DNK u hemocitama *U. tumidus* i *U. pictorum* prilikom *in vitro* tretmana sa Vin tokom 30 min i 22h. * $p < 0,05$

4.4.6. Imatinib mezilat (IM)

IM (Slika 4.35.) vrši inhibiciju onkogena BCR/ABL tirozin kinaze. Jedini dostupni literaturni podaci o genotoksičnosti IM, ukazuju da uzrokuje DNK oštećenja u

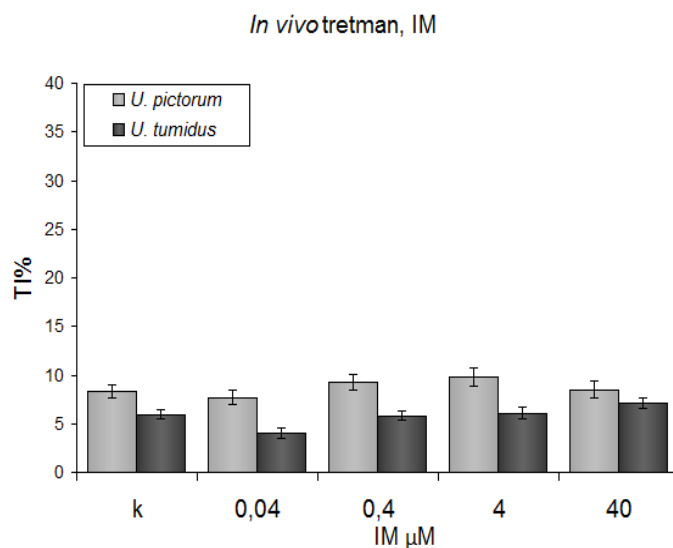
ćelijama koje sintetišu BRC/ABL protein, ali nema efekta na nivo oštećenja u normalnim ćelijama. Pretpostavlja se da je uzrok nastalih oštećenja stvaranje alkalno labilnih mesta i proizvodnja slobodnih radikala (Czechowska i sar., 2005).



Slika 4.35. Hemijska struktura IM

4.4.6.1. Efekat tretmana IM *in vivo*

Testirane koncentracije IM nisu uticale na nivo oštećenja DNK u hemocitama jedinki *U. pictorum* i *U. tumidus* tretiranim *in vivo* (Slika 4.36.), a vijabilnost hemocita je uvek bila veća od 80% u poređenju sa kontrolnim jedinkama (Tabela 20, Prilog 4).



Slika 4.36. Nivo oštećenja DNK u hemocitama *U. tumidus* i *U. pictorum* prilikom tretmana IM tokom 72h *in vivo*. * $p < 0.05$

4.4.7. Rangiranje citostatika na osnovu efekata *in vivo*

Da bismo uporedili uticaj testiranih supstanci, rangiranje je vršeno na dva načina: putem najniže koncentracije koja je imala efekat u smislu oštećenja DNK (eng. the Lowest Observable Effective Concentration – LOEC) i SCDI (eng. significant concentration depended induction factor).

Primenom oba tipa rangiranja dobijeni su slični ishodi: za *U. pictorum*: VIN > 5-FU > CdCl₂ > CisPt > IM; za *U. tumidus*: VIN > 5-FU > CdCl₂ > ETO > CisPt > IM (**Tabela 4.5.**).

Tabela 4.5. Rangiranje supstanci na osnovu LOEC i SCDI

	<i>U. pictorum</i>		<i>U. tumidus</i>	
	LOEC (Rang)	SCDI (Rang)	LOEC (Rang)	SCDI (Rang)
CdCl ₂	7,3 mg/L (3)	0,39 (3)	7,3 mg/L (3)	0,36 (3)
5-FU	52 µg/L (2)	32,31 (2)	52 µg/L (2)	35,30 (2)
CisPt	nd (4)	0 (4)	nd (5)	0 (5)
ETO	/ /	/ /	24 mg/L (4)	0,08 (4)
VIN	3,7 µg/L (1)	493,49 (1)	36,9 µg/L (1)	53,78 (1)
IM	nd (4)	0 (4)	nd (5)	0 (5)

nd – nije detektovana; / - nije testirano

4.4.8. Procena rizika od citostatika po okolinu

Procena je vršena po instrukcijama pravilnika EMA (European Medicines Agency, 2006), na osnovu odnosa PEC (eng. Predicted Environmental Concentration)/PNEC (eng. Predicted No Effect Concentration). Umesto PNEC korišćena je najviša koncentracija koja nije imala efekta u *in vivo* testovima (eng. No Observable Effect Concentration - NOEC). Odnos PEC/NOEC za sve testirane citostatike ima daleko nižu vrednost od 1 (**Tabela 4.6.**), što na osnovu pravilnika znači da citostatici korišćeni u istraživanju ne predstavljaju rizik po okolinu.

Rezultati

Tabela 4.6. Odnos PEC/NOEC za citostatike testirane u eksperimentima *in vivo*

	<i>U. pictorum</i>			<i>U. tumidus</i>		
	NOEC (ng/L)	PEC (ng/L)	PEC/NOEC	NOEC (ng/L)	PEC (ng/L)	PEC/NOEC
5-FU	5200	15,795	<0,01	5200	15,795	<0,01
CisPt	1200	0,358	<0,01	1200	0,358	<0,01
ETO	/	1,1	/	$2,4 \times 10^6$	1,1	<0,01
VIN	nd	0,002	/	3690	0,002	<0,01
IM	$23,6 \times 10^6$	7,063	<0,01	$23,6 \times 10^6$	7,063	<0,01

nd – nije detektovana; / - nije testirano

DISKUSIJA

5. Diskusija

U ovom radu se mogu uočiti dve celine. Prvi deo rada se bavi ispitivanjem pouzdanosti slatkovodnih školjki kao bioindikatora i praćenjem oštećenja DNK molekula kao biomarkera u *in situ* eksperimentalnim uslovima. Drugi deo studije se bavi primenom slatkovodnih školjki kao indikatorskih organizama u *ex situ* eksperimentalnim uslovima pri čemu se pratio uticaj citostatika na nivo oštećenja DNK molekula.

5.1. Bazalne/referentne vrednosti i parametri kvantifikacije DNK oštećenja

Prilikom *in situ* i *ex situ* istraživanja neophodno je bilo utvrditi bazalne, odnosno referentne vrednosti DNK oštećenja kao praćenog biomarkera. Na rekama na kojima je rađeno *in situ* istraživanje, usled prisustva zagađenja, nije bilo moguće odabrati tačku koja bi mogla poslužiti kao referenti lokalitet. Takođe nije bilo moguće odabrati nezagađen lokalitet sa koga bi se prikupljale jedinke za *ex situ* istraživanja. Prilikom aklimacije jedinki, pokazali smo da nakon 10 dana gajenja jedinki u kontrolisanim laboratorijskim uslovima, u kojim su svi stresorni faktori svedeni na minimum, dolazi do znatnog sniženja nivoa oštećenja DNK molekula u hemocitama jedinki sve tri proučavane vrste. Redukcija nivoa oštećenja DNK molekula kod slatkovodnih školjki nakon uklanjanja stresornih faktora opisana je u više studija. Štambuk i sar. (2008) su pokazali da kod jedinki tretiranih vodonik peroksidom dolazi do znatnog sniženja DNK oštećenja prilikom aklimacije jedinki, pri čemu je najniži nivo oštećenja detektovan nakon 7 dana aklimacije. Redukcija oštećenja DNK se pripisuje mehanizmima reparacije DNK. Slično objašnjenje se navodi i u radu Labieniec i sar. (2007), gde je redukcija DNK oštećenja nastalog tretmanom fenolnom kiselinom detektovana u ćelijama digestivne žlezde *U. tumidus*. U studiji Rigonato i sar. (2005) rađenoj na *Corbicula fluminea* detektovana je redukcija oštećenja DNK kod jedinki sa zagađenih lokaliteta, kao i kod jedinki tretiranih metilmetan sulfonatom, pri čemu je najniže oštećenje detektovano nakon 9 dana aklimacije.

Nivo oštećenja DNK molekula kod aklimatizovanih jedinki se može smatrati bazalnim i odgovara podacima iz literature o nivou oštećenja kod jedinki sa nezagađenih

lokaliteta (Štambuk i sar., 2009). Iz tog razloga, aklimatizovane jedinke su obezbedile referente vrednosti za nivo oštećenja DNK molekula prilikom *in situ* i *ex situ* studija.

U studijama smo, kao meru oštećenja DNK, koristili OTM i TI. Primećena je signifikantna korelacija između ova dva parametra, kako u *in situ*, tako i u *ex situ* istraživanjima. Prilikom aktivnog biomonitoringa, pokazalo se da u situacijama kada je nivo oštećenja DNK blizak vrednosti u kontroli, TI ima veći potencijal za detekciju genotoksičnosti u poređenju sa OTM. Tokom studije aktivnog biomonitoringa, u većini slučajeva su vrednosti TI pokazale višu korelaciju sa koncentracijama polutanata u vodi u poređenju sa OTM. Sudeći po ovome, možemo reći da TI ima blagu prednost pri odabiru parametra za procenu nivoa oštećenja DNK molekula, što je u skladu sa studijom Collins i sar. (2008). Međutim, rezultati naših studija sprovedenim na drugim akvatičnim organizmima (Sunjog i sar., 2013; Heberger i sar., 2014) pokazali su da pozdanost ova dva parametra zavisi od mnogo faktora, kao što su vrsta na kojoj se studija radi, tkivo koje se koristi za komet test a najverovatnije i uslovi u kojima se studija sprovodi. Iz tog razloga, rezultate naših istraživanja smo prikazali putem oba parametra, ali je diskusija rezultata bazirana prvenstveno na parametru TI.

5.2. *In situ* studije

U *in situ* studijama, primenili smo pristup pasivnog ili aktivnog biomonitoringa, u zavisnosti od koncepcije svake od studija. Prilikom istraživanja rađenog na reci Velika Morava, jedinke odabrane vrste (*S. woodiana*) su bile prisutne na ispitivanim lokalitetima tokom većeg dela godine. Kako je istraživanje rađeno mesečno, tokom godinu dana i kako su lokaliteti bili prilično udaljeni od laboratorije, odlučili smo se za pasivni biomonitoring. Prilikom istraživanja rađenog na reci Dunav, tokom JDS3 ekspedicije, primenjen je takođe pasivni monitoring. Uzimajući u obzir broj analiziranih lokaliteta, međusobnu udaljenost lokaliteta, kao i dimenzije istraživanog područja, aktivni biomonitoring nije bio izvodljiv. Prilikom praćenja uticaja otpadnih voda na teritoriji grada Beograda, odlučili smo se za aktivni monitoring, uzimajući u obzir da je istraživanje rađeno na visoko zagađenim lokalitetima, na kojim se nisu mogle naći jedinke odabranih vrsta (*U. pictorum* i *U. tumidus*).

5.2.1. Pasivni biomonitoring

Studija pasivnog monitoringa rađena na Velikoj Moravi je specifična po odabranoj vrsti - *S. woodiana*, na kojoj je po prvi put primenjen komet test, kao i po tome što je variranje nivoa oštećenja DNK molekula u jedinkama praćeno tokom različitih godišnjih sezona.

U ovoj studiji, praćen je nivo oštećenja DNK molekula u hemocitama školjke *S. woodiana* na lokalitetima Varvarin i Bagrdan. Na ovim lokalitetima su naročito bile uočljive povišene koncentracije teških metala i to cinka, olova, nikla, kadmijuma i žive.

Tokom istraživanja, primećena je razlika u nivou oštećenja DNK u jedinkama sa lokaliteta Varvarin i Bagrdan. U avgustu su jedinke sa lokaliteta Varvarin imale znatno viši nivo oštećenja DNK, u poređenju sa lokalitetom Bagrdan, ukazujući na viši nivo zagađenja na lokalitetu Varvarin, što je potvrđeno i hemijskom analizom vode. Slična situacija je primećena i na lokalitetu Bagrdan u septembru, kada je koncentracija teških metala na ovom lokalitetu bila znatno viša nego na lokalitetu Varvarin.

Primećena je razlika u nivou oštećenja DNK tokom različitih sezona, pri čemu je detektovana značajna korelacija sa temperaturom vode. Najviši nivo oštećenja DNK, detektovan je u jedinkama prikupljenim u junu i avgustu, nakon čega je primećen pad tokom ostalih meseci uzorkovanja. Iako su koncentracije teških metala na lokalitetu Varvarin imale slične vrednosti u novembru, junu i avgustu, znatno viši nivo oštećenja je detektovan u jedinkama uzorkovanim tokom letnjih meseci. U studiji Frenzilli i sar. (2001), rađenoj na morskim školjkama, pokazano je da je nivo oštećenja DNK pozitivno korelisan sa temperaturom. Temperatura u velikoj meri utiče na stepen filtracije kod akvatičnih organizmima (Burns, 1969; Jorgensen i sar., 1990). U studiji Xu i sar. (2007), dokazano je da je kod školjke *S. woodiana* stepen filtracije mnogo viši na 20 i 25°C nego na 15°C. Možemo pretpostaviti da niži stepen filtracije, tokom hladnijih meseci, može umanjiti izloženost jedinki genotoksičnim zagađivačima, te je niži nivo oštećenja DNK u tim mesecima očekivan. U studiji Cherkasov i sar. (2007a, 2007b) navodi se da temperatura u akvatičnim sredinama ima uticaj na modulaciju toksičnosti teških metala kod poikiloterma, tako što menja intenzitet unosa i akumulacije teških metala. Glavni put unosa metala u ćelije predstavlja ATP - zavisni aktivni transport putem jonskih pumpi,

kao i difuzija jonskim kanalima. U radu Sokolova i Lannig (2008), navodi se da su ovi procesi kod ekoterma pod velikim uticajem temperature u njihovom okruženju - povišenjem temperature raste i unos metala kao i njihova akumulacija u organizmu. Značajna korelacija je primećena i između nivoa oštećenja DNK i koncentracije rastvorenog kiseonika u vodi. Pad koncentracije rastvorenog kiseonika u površinskim vodama, najčešće je uzrokovan smanjenjem protoka vode, ili je posledica intenzivnog razlaganja organskih materija (trulenja) (Mackin i Swider, 1989). Ovakvi uslovi, takođe, mogu da utiču na smanjenje stepena filtracije kod školjki.

Studija pasivnog monitoringa rađena na reci Dunav je specifična po tome što je istraživanje rađeno na velikom broju lokaliteta, u relativno kratkom vremenskom periodu i na velikom geografskom području. Zbog većeg broja uzoraka i dostupnosti vrsta bilo je moguće uporediti odgovor kod autohtonih i alohtonih vrsta. Prilikom JDS-a rađena je obimna hemijska analiza uzoraka vode, suspendovanih čestica i sedimenta, te je ovo bila prilika i da se detektovani nivo oštećenja DNK uporedi sa nizom dodatnih parametara.

Do sada, na reci Dunav je rađen relativno mali broj studija koje se bave toksikologijom i genotoksikologijom. Genotoksikološke studije su rađene u sektorima I, II i VI.

Gornji tok (sektori II i III – Nemačka i Austrija). U studijama rađenim *in situ* i *ex situ*, Boettcher i sar. (2010) i Higley i sar. (2012) su primenom baterije testova, koja je, između ostalog, obuhvatala i komet test na ribama *Denio rerio*, pokazali mutageni i klastogeni efekat sedimenta iz gornjeg toka Dunava. Povišen nivo oštećenja koji smo detektovali na lokalitetima JDS4 i JDS5 (sektor II) je u skladu sa rezultatima njihovog istraživanja. U sektoru III, jedinke nisu nađene a razlog je kompozicija supstrata rečnog dna. Dostupnost jedinki je glavna mana pasivnog monitoringa. Iz istog razloga, ostali smo uskraćeni za podatke o nivou oštećenja kod jedinki sa lokaliteta koji su pod visokim uticajem zagađenja (npr. nizvodno od Beča i Novog Sada).

Srednji tok (sektori IV, V, VI i VII – Slovačka, Mađarska, Hrvatska, Srbija i Rumunija). Uticaj većih naselja u slovačkom i mađarskom delu Dunava nije bio evidentan. Uticaj Bratislave nije detektovan nizvodno na lokalitetu JDS18 (sektor IV), međutim Dunav je ovde izmenjen u akumulaciju usled brane hidrocentrale Gabčíkovo.

Zanimljivo je da ni uticaj Budimpešte nije detektovan na lokalitetu JDS22 (sektor V), neposredno nizvodno od grada, na mestu ispuštanja otpadnih voda. Najviši nivo genotoksičnosti zabeležen je u sektoru VI. Ovaj sektor se izdvaja kao najzagađeniji i na osnovu indikatora fekalnog zagađenja. U sektoru VI, Dunav je pod uticajem velike količine neprerađenih otpadnih voda, za razliku od predhodnih sektora reke u kojim se otpadna voda prečišćava pre ispuštanja u samu reku. Uticaj otpadnih voda je evidentan ako uporedimo nivo oštećenja DNK u jedinkama iz sektora V i sektora VI. Na osnovu dobijenih rezultata, može se reći da prerada otpadnih voda efikasno snižava njihov genotoksični potencijal. Prisustvo genotoksičnog zagađenja u sektoru VI detektovano je i u našim prethodnim studijama primenom komet testa na ribama vrste *Barbus barbus* (Sunjog i sar., 2012) kao i na školjkama (Kolarević i sar., 2011). Genotoksični potencijal otpadnih voda grada Beograda, najvećeg grada u ovom sektoru, potvrđen je i studijom aktivnog monitoringa pri čemu je jedan od proučavanih lokaliteta bio i na samom Dunavu (lokalitet Višnjica).

Međutim, veliki uticaj na kvalitet vode reke Dunav u ovom sektoru imaju pritoke (Kirschner i sar., 2009). Kvalitet vode pritoka Dunava znatno varira, te pritoke samim tim imaju različit uticaj na kvalitet vode reke Dunav. Indikatori fekalnog zagađenja su ukazali da je pritoka Drava kritično zagađena, što se odražava i na lokalitete na Dunavu, nizvodno od ove pritoke. Detektovano je i znatno povišenje nivoa oštećenja DNK u jedinkama prikupljenim u samoj Dravi, kao i na lokalitetima nizvodno od ušća ove reke. Dobijeni rezultati su u skladu sa postojećim studijama koje se bave kvalitetom vode ove pritoke. Genotoksičnost je detektovana u reci Dravi i u prethodnim istraživanjima, na lokalitetu koji se nalazi nedaleko od ušća u Dunav, primenom komet testa na ribama *Cyprinus carpio* (Klobučar i sar., 2010) i školjkama *D. polymorpha* (Štambuk i sar., 2009). Zanimljivo je da su autori za studiju na Dravi kao referentu tačku koristili Kopački rit, oblast koja se nalazi između Drave i Dunava, nedaleko od lokaliteta JDS27. U našoj studiji je zabeležena i razlika u nivou oštećenja DNK kod jedinki sa lokaliteta JDS27 i jedinki iz same reke Drave (JDS29).

U prethodnoj studiji pasivnog monitoringa pokazali smo da je reka Velika Morava pod uticajem genotoksičnog zagađenja. Tokom JDS istraživanja, jedinke nisu pronađene u samoj Velikoj Moravi, ali je detektovan visok nivo oštećenja u jedinkama

prikupljenim nizvodno od ušća Velike Morave (JDS42). Međutim, zagađenje koje se beleži nizvodno od Velike Morave treba pripisati i aktivnoj metalurškoj privredi nadomak ovog istraživanog lokaliteta (uticaj Smedereva).

Veoma evidentan je bio i uticaj Save, ali za razliku od prethodno pomenutih pritoka, Sava je povoljno uticala na kvalitet vode Dunava, tako da u sektoru VI lokaliteti JDS38 (nizvodno od Beograda) i JDS39 (nizvodno od Pančeva) imaju niže vrednosti u poređenju sa ostalim lokalitetima u ovom sektoru. Prilikom JDS-a nisu prikupljne jedinke iz Save ali je različit genotoksični potencijal ove reke u odnosu na Dunav detektovan prilikom studije aktivnog monitoringa pri čemu su jedinke izložene na lokalitetima na Savi imale znatno niži nivo oštećenja u poređenju sa jedinkama sa Dunava.

U akumulaciji Đerdap (sektor VII), zbog velikog razblaženja i odsustva većih izvora zagađenja, dolazi do pada nivoa oštećenja, u poređenju sa prethodnim sektorom.

Donji tok (Sektori VIII, IX i X – Rumunija, Bugarska, Moldavija i Ukrajina). Kroz sektore VIII i IX, nivo oštećenja ostaje relativno nizak i primećena su samo neznatna variranja. Evidentan je porast oštećenja nizvodno od luka Zimnicea/Svištov (JDS53). U literaturi postoje podaci o štetnom uticaju luka, bilo rečnih ili pomorskih, prvenstveno zbog povećane koncentracije policikličnih aromatičnih ugljovodonika u vodi, do koje dovode akcidenti vezani za naftu (Pérez-Cadahía i sar., 2004; Vanzella i sar., 2007, Tuvikene i sar., 1999). Porast oštećenja je detektivan i u jedinkama uzorkovanim u delti Dunava, što je očekivano uzimajući u obzir da se u sedimentu u rukavcima delte taloži veliki broj polutanata koje reka nosi.

Tokom istraživanja, uporedili smo odgovor autohtonih vrsta roda *Unio* sa odgovorom alohtone vrste *S. woodiana*. Na 13 od 34 ispitivana lokaliteta na kojima su bile nađene jedinke (*Unio* sp. i *S. woodiana*) detektovana je signifikantna korelacija u odgovoru, što ide u prilog da je *S. woodiana* jednako pouzdan bioindikator kao jedinke *Unio* sp.

5.2.3. Aktivni biomonitoring

Uticaj otpadnih voda na teritoriji grada Beograda praćen je primenom aktivnog biomonitoringa. Prilikom studije pratili smo odgovor na sredinski stres na lokalitetima

koji su pod visokim uticajem zagađenja. Studija je specifična i po tome što smo ovom prilikom uporedili odgovor kod vrsta *U. pictorum* i *U. tumidus*. Prilikom izlaganja jedinki, primećeno je variranje u nivou oštećenja DNK u zavisnosti od stepena zagađenja lokaliteta.

U jedinkama izloženim na lokalitetima u rečnim rukavcima (Savski rukavac i Višnjica), primećeno je znatno više oštećenje DNK u poređenju sa jedinkama izloženim na lokalitetima na samom toku reke. Lokaliteti Savski rukavac i Višnjica su pod uticajem velike količine otpadnih voda poreklom iz bolnica, industrije i domaćinstava; protok je znatno redukovan te je zagađenje na ovim lokalitetima dostiglo kritičan nivo. U studiji Wang i sar. (2008), pokazano je da amonijak u koncentraciji bliskoj onoj detektovanoj na lokalitetu Višnjica, u kombinaciji sa pH većim od 8,5 ima letalan efekat na slatkovodne školjke. Štaviše, na ovim lokalitetima zabeležili smo i toksične i genotoksične efekte. Na ovim lokalitetima detektovan je povišen nivo oštećenja DNK već nakon 7 dana izlaganja. Oštećenje je dostiglo maksimum nakon 14 dana izlaganja.

Za razliku od lokaliteta u rečnim rukavcima, na lokalitetu Duboko, povišen nivo oštećenja je detektovan tek nakon 30 dana izlaganja. Kod vrste *U. pictorum* je čak primećeno i sniženje nivoa oštećenja nakon 7 i 14 dana izlaganja. Lokalitet Duboko je lociran na reci Savi, uzvodno od Beograda. Lokalitet je pod uticajem otpadnih voda manjih naselja na obali Save. Iako organski ekstrakti otpadnih voda poreklom iz domaćinstava mogu imati genotoksičan potencijal, njihov efekat je znatno manji od industrijskih otpadnih voda (White i Rasmussen, 1998). Ovaj lokalitet karakteriše i visok protok vode (oko 3.000 m³/s), kao i dobra aeracija, koji su verovatno doprineli niskom stepenu genotoksičnog zagađenja na ovom lokalitetu. Porast oštećenja DNK detektovan nakon 30 dana se može pripisati zagađenju prispelom putem reke Kolubare, čije ušće se nalazi 2 km uzvodno od lokaliteta Duboko. Prisustvo genotoksičnog potencijala u slivu reke Kolubare je detektovano u ribama vrste *Squalius cephalus* u našim prethodnim istraživanjima (Sunjog i sar., 2014).

Lokalitet Savska marina je pod uticajem otpadnih voda Novog Beograda. Karakteriše ga prisustvo organskog zagađenja, kao i povišene koncentracije cinka u vodi. Na ovom lokalitetu nije detektovan toksičan efekat, dok je povišen nivo oštećenja DNK detektovan samo nakon 7 dana izlaganja. Na osnovu rezultata dobijenih na lokalitetu

Duboko, možemo zaključiti da porast oštećenja nakon 7 dana nije posledica stresa nastalog usled izlaganja već reakcija na prisustvo genotoksičnog zagađenja na lokalitetu.

Kod obe vrste je nakon detektovanog maksimuma oštećenja DNK sledio pad oštećenja. Sličan trend je primećen i kod školjke *Mytilus galloprovincialis* tokom aktivnog monitoringa u luci Đenove (Regoli i sar., 2004). U ovoj studiji je primećeno variranje svih praćenih biomarkera (DNK oštećenje, koncentracija teških metala, enzimi oksidativnog stresa, stabilnost membrane lizozoma) tokom izlaganja jedinki. Može se pretpostaviti da je do pada DNK oštećenja došlo zbog fiziološkog prilagođavanja (povišena antioksidativna odbrana, povišen kapacitet DNK popravke) jedinki na zagađenje na lokalitetima. U studiji Regoli i sar. (2004), navodi se da prisustvo teških metala dovodi do povećanja antioksidativne odbrane. Od nivoa zagađenja zavisi da li će nastala antioksidativna obrana biti nadvladana tokom dužeg perioda izlaganja i da li će nastalo oksidativno oštećenje DNK biti efikasno popravljeno. Postoji takođe i mogućnost da je tokom izlaganja došlo do selekcije otpornijih jedinki eliminacijom osetljivijih (visok moratlitet jedinki *U. tumidus* na zagađenim lokalitetima).

Tokom izlaganja detektovana je visoka korelacija u nivou oštećenja DNK u hemocitama kod dve proučavane vrste. Takođe, u našoj studiji (Vuković-Gačić i sar., 2014) detektovana je korelacija u nivou oštećenja DNK u ćelijama škrge ove dve vrste. Na osnovu ovoga možemo reći da su obe vrste dobri bioindikator u ekogenotoksikologiji i da daju veoma sličan odgovor na prisustvo genotoksičnog zagađenja.

5.3. Korelacija DNK oštećenja sa mikrobiološkim i fizičko - hemijskim parametrima

Ono što je bilo zajedničko za studije pasivnog i aktivnog biomonitoringe jeste evidentan antropogeni uticaj na lokalitetima koji je potvrđen hemijskim i mikrobiološkim analizama vode. Svaka od rađenih studija predstavlja individualni scenario, sa određenim specifičnostima, što nam je omogućilo da odnose između DNK oštećenja u školjkama i praćenih parametara sagledamo iz više uglova kroz svaku od studija. Prilikom svake od studija, nivo oštećenja DNK je analiziran i diskutovan u zavisnosti od dostupnih parametara okruženja (mikrobioloških i fizičko - hemijskih).

5.3.1. Korelacija sa mikrobiološkim parametrima

Obično se prisustvo genotoksičnog zagađenja u ekosistemu vezuje za emisiju otpadnih voda. Upravo je iz tog razloga posvećena posebna pažnja mikrobiološkim indikatorima fekalnog zagađenja. Postoji određena podudarnost između praćenih parametara fekalnog zagađenja i DNK oštećenja, kao parametra genotoksičnog zagađenja. Indikatori fekalnog zagađenja (fekalni koliformi i fekalne enterokoke) mogu samo kratak vremenski period da prežive u površinskim vodama (Kavka i Poetsch, 2002). Kako su to mezofilni ili termotolerantni organizmi, nakon dospeća u površinske vode doživljavaju stres koji utiče na njihovu vijabilnost, a takođe inhibira i njihovu daljnju proliferaciju. Upravo zbog ovih karakteristika, fekalni koliformi i fekalne enterokoke se smatraju pouzdanim pokazateljem nedavnog fekalnog zagađenja. Sa druge strane, komet test se koristi za detekciju oštećenja DNK molekula kao biomarkera izlaganja. Ako se uzme u obzir sposobnost redukcije nastalog oštećenja za samo 10 dana u povoljnim uslovima, nastalo oštećenje se može smatrati indikatorom nedavnog prisustva genotoksičnog zagađenja.

U studiji pasivnog monitoringa na reci Velika Morava detektovali smo visoko variranje u koncentraciji indikatora fekalnog zagađenja. Kvalitet vode je varirao od klase I do klase III, upućujući na variranje u emisiji otpadnih voda na proučavanim lokalitetima. Kako nije primećena korelacija između vrednosti mikrobioloških parametara i koncentracije drugih polutanata (npr. teških metala), može se zaključiti da priliv zagađenja na lokalitetima, najverovatnije, potiče iz različitih izvora. Nije detektovana ni korelacija između indikatora fekalnog zagađenja i nivoa oštećenja DNK u hemocitama jediniki *S. woodiana*. Dodatno, u našoj studiji rađenoj tokom četiri sezone na 5 lokaliteta na reci Velika Morava (Kolarević i sar., 2012), pokazali smo da je vrednost parametara fekalnog zagađenja u negativnoj korelaciji sa temperaturom vode, što doprinosi težem povezivanju parametara fekalnog i genotoksičnog zagađenja vode.

U studiji pasivnog biomonitoringa rađenoj na reci Dunav, takođe nije detektovana signifikantna korelacija između nivoa oštećenja DNK i indikatora fekalnog zagađenja. Odabrani lokaliteti su bili pod različitim uticajem, počev od otpadnih voda manjih naselja, do velikih gradova i otpadnih voda različitih grana privrede. Na nekim od

lokaliteta na kojima je zabeležen skok u fekalnom zagađenju (npr. nizvodno od Budimpešte, Novog Sada i Beograda) nije detektovan skok u nivou oštećenja DNK. Prilikom interpretacije rezultata neophodno je uzeti u obzir dodatne uticaje pod kojim se ispitivani lokalitet nalazi. Na primer, iako je lokalitet JDS31 nadomak Iloka (manjeg naselja) detektovan je visok nivo oštećenja DNK, koji se ne može pripisati otpadnim vodama ovog naselja, ali se može objasniti uticajem Drave, kao i industrijskog postrojenja za proizvodnju akumulatora, kojim se može objasniti i visoka koncentracija nikla zabeležena na ovom lokalitetu. Slično, na lokalitetima JDS38 i JDS39 (nizvodno od Beograda) detektovan je pad oštećenja u poređenju sa lokalitetima koji se nalaze uzvodno u sektoru VI. Na ovim lokalitetima primećuje se uticaj Save koja povoljno utiče na kvalitet vode Dunava (doprinosi razblaženju zagađenja).

Prilikom studije aktivnog biomonitoringa detektovana je značajna korelacija između nivoa oštećenja DNK molekula u hemocitama i brojnosti fekalnih koliforma. Takođe, detektovana je i značajna korelacija između koncentracije fekalnih koliforma i koncentracije teških metala (Fe, Cu i As). Kada govorimo o otpadnim vodama velikih gradova, najčešće se radi o mešavini poreklom iz različitih izvora zagađenja (kišnica, kanalizacija, otpadne vode industrije, otpadne vode bolnica). Prilikom njihovog izliva u površinske vode, sa fekalnim zagađenjem se može očekivati i prisustvo genotoksičnog zagađenja.

Na osnovu naših rezultata možemo zaključiti da prisustvo fekalnog zagađenja na lokalitetima ne implicira direktno i prisustvo genotoksičnog zagađenja. Situacija je specifična za svaki lokalitet, u zavisnosti da li se on nalazi samo pod uticajem otpadnih voda domaćinstava, dodatnog izvora hemijskog zagađenja, ili pod uticajem mešovitenih otpadnih voda.

5.3.2. Korelacija sa teškim metalima

Među polutantima, na lokalitetima su naročito bile uočljive povišene koncentracije teških metala. U studiji pasivnog monitoringa na reci Velika Morava, detektovana je visoka korelacija DNK oštećenja sa koncentracijom cinka; u studiji aktivnog monitoringa detektovana je korelacija DNK oštećenja sa koncentracijom cinka,

bakra, gvožđa i arsena. U literaturi postoje brojni podaci o genotoksičnosti ovih metala/metaloida. Bagdonas i Vosyline (2006) su ukazali na sinergističan genotoksični efekat cinka i bakra u studiji rađenoj na slatkovodnoj vrsti ribe *Oncorhynchus mykiss*. U studiji rađenoj *in situ* na *Mytilus* sp., Dixon i Pascoe (1994) su ukazali na korelaciju između frekvencije razmene sestrinskih hromatida u oocitama i koncentracije cinka i bakra. Toksični efekti arsena na slatkovodnu školjku *C. fluminea* su pokazani u studiji Johns i Luoma (1990), dok su genotoksični efekti arsena studijama Graham-Evans i sar. (2004) i Liao i sar. (2008). Genotoksičan uticaj gvožđa pokazan je u studiji Pra i sar. (2008) rađenoj na tkivima miša. Međutim, na lokalitetima su detektovane i povišene koncentracije drugih metala (nikl, olovo, živa i kadmijum). Costa i sar. (2002) su pokazali da tretman niklom izaziva oksidativni stres u sisarskim ćelijma. U studiji Black i sar. (1996), detektovan je genotoksični uticaj olova na slatkovodnu školjku *Anodonta grandis*. Genotoksičan uticaj žive na morsku školjku *Mytilus edulis* je pokazan u studiji Tran i sar. (2007) dok je genotoksičan efekat kadmijuma na slatkovodnu školjku *D. polymorpha* pokazan u studiji Vincent-Hubert i sar. (2011).

U studiji pasivnog monitoringa rađenoj na Dunavu nije uočena značajna korelacija između nivoa DNK oštećenja i koncentracije teških metala u vodi i suspendovanim česticama. Ovom prilikom, koncentracija teških metala je merena i u tkivu školjki ali je značajna korelacija detektovana samo između DNK oštećenja i koncentracije žive. Zanimljivo je da nije detektovana korelacija između koncentracije teških metala u vodi i koncentracije teških metala u tkivima. Korelacija u koncentracijama metala u suspendovanim česticama i tkivu školjki primećena je samo za kadmijum i živu. Na osnovu prisustva teških metala u vodi na lokalitetima ne mogu da se donose predikcije o genotoksičnim efektima u organizmima koji naseljavaju taj lokalitet - stepen biološke dostupnosti metala će odlučivati o posledicama. Sa druge strane, na osnovu odsustva korelacije između koncentracije metala akumuliranih u tkivima i nivoa DNK oštećenja možemo zaključiti da je jedan deo akumuliranih metala najverovatnije inaktivisan putem metaltionina čime se sprečava oksidativni stres (Wright i Welbourn, 2002).

Na osnovu izloženog, uprkos detektovanim korelacijama, možemo zaključiti da genotoksični potencijal ne treba pripisati samo teškim metalima kao dominantnim

polutantima. Treba imati u vidu da su na lokalitetima školjke bile izložene mešavinama otpadnih voda naselja i industrije koje mogu imati genotoksični potencijal (Ciccotelli, 1998; Claxton i sar., 1998; White i Rasmussen, 1998; Grover i Kaur, 1999). Iako su koncentracije drugih polutanata, kao što su pesticidi, herbicidi, policiklični aromatični ugljovodonici i sl., bili u granicama dozvoljenih vrednosti, smeše ovih jedinjenja mogu imati genotoksičan efekat, čak i kad su zagađivači prisutni u veoma niskim koncentracijama (Richardson i sar., 1985; Halling i sar., 1998; Connors i Black, 2003; Ferrari i sar., 2003; Parolini i sar., 2011). To je upravo prikazano u studiji pasivnog monitoringa na reci Dunav. Obiman set podataka, merenih u vodi, suspendovanim česticama i sedimentu, ukazao je na značajnost grupa jedinjenja koja su prisutna u veoma niskim koncentracijama.

5.3.3. Policiklični aromatični ugljovodonici (PAH)

Prilikom studije pasivnog monitoringa na Dunavu, detektovana je signifikantna korelacija između nivoa oštećenja DNK i koncentracije PAH-ova (fluoranten, benzo[*a*]piren, benzo[*b*]fluoranten, benzo[*k*]fluoranten, benzo[*g,h,i*]perilen) u suspendovanim česticama. Značajna korelacija je detektovana i sa koncentracijom benzo[*b*]fluorantena u sedimentu, međutim nije primećena korelacija sa koncentracijama PAH-ova izmerenim u vodi. Većina PAH-ova je visoko lipofilna te se vežu za površinu čestica i akumuliraju u sedimentu te je dobijeni trend korelacija očekivan. Iako su vezani za čestice PAH-ovi su i dalje biodostupni određenom broju organizama, a samim tim putem lanca ishrane postaju problem u čitavom ekosistemu (Borchert i sar., 1997). Genotoksičnost PAH-ova prisutnih u akvatičnim ekosistemima je široko poznata (Cachot i sar., 2006; Inzunza i sar., 2006; Barbee i sar., 2008). Među PAH-ovima velika pažnja se poklanja benzo[*a*]pirenu, kao dominantnom članu ove grupe u ekosistemu čija genotoksičnost je detektovana u hemocitama školjke *Perna viridis* (Ching i sar., 2001; Siu i sar., 2004), *A. anatina* (Woznicki i sar., 2004), kao i digestivnoj žlezdi i škragama *D. polymorpha* (Binelli i sar., 2008; Chatel i sar., 2012).

5.3.4. Perzistentni organski zagađivači

Kao što je i očekivano, koncentracije perzistentnih organskih zagađivača u vodi i suspendovanim česticama Dunava su na većini lokaliteta bile ispod granice detekcije. Međutim merenja rađena u uzorcima sedimenta ukazala su na prisutnost ovih jedinjenja na većini lokaliteta. Signifikantna korelacija nivoa oštećenja zabeležena je sa koncentracijom dioksina (PeCDD i TCDD) - jedinjenja koja u životnoj sredini najčešće dospevaju spaljivanjem plastičnog otpada. Među dioksinima, TCDD je poznat kao najtoksičnije jedinjenje u ovoj grupi, sa visokim potencijalom kancerogeneze, usled oksidativnog stresa koji izaziva (Huff i sar., 1994; Yoshida i Ogawa, 2000). Takođe, visoka korelacija je zabeležena i sa koncentracijama furana čija genotoksičnost je pokazana u studiji Belvins (1991).

Pored pomenutih dioksina, u literaturi postoje podaci o genotoksičnosti i drugih članova perzistentnih organskih polutanata. Široko rasprostranjeni su polihlorovani bifenili (PCB), jedinjenja koja ulaze u sastav tečnosti iz rashladnih uređaja. Genotoksičnost PCB 52 i 77 je pokazana u studiji Sandal i sar. (2008) rađenoj na humanim limfocitima, dok je genotoksičnost PCB 153, 138, 101 i 118 pokazana u studiji Marabini i sar. (2011) rađenoj na ćelijskoj liniji RTG-2 (linja poreklom od riba). Mehanizam nastanka oštećenja DNK molekula pripisan je oksidativnom stresu.

5.3.5. „Novootkriveni” polutanti

Među jedinjenjima čija je koncentracija merena u vodi, izdvojili su se oksazepan i hloridazon-desfenil, sa kojima je detektovana značajna korelacija genotoksičnog odgovora merenog komet testom. Oksazepan se koristi kao sedativ za smanjivanje aksioznosti. U literaturi se mogu naći podaci o njegovoj genotoksičnosti. U studiji Ibrulj i Jovičić (2001) pokazano je da oksazepan povišava frekvenciju formiranja mikronukleusa u humanim limfocitima. Oksazepan ne reaguje direktno sa molekulom DNK, već uzrokuje oksidativni stres a kao posledica nastaju prekidi na DNK molekulu, koji se mogu detektovati komet testom (Deutsch i sar., 2001). Hloridazon desfenil je

herbicide koji je u širokoj upotrebi. Kao i za oksazepam i za hlolandizon postoje podaci o genotoksičnosti u literaturi (Piešova i sar., 1997; Šivikova i sar., 1999).

5.4. *Ex situ* studije - uticaj citostatika na DNK oštećenja u slatkovodnim školjkama

U *ex situ* istraživanjima, ispitivali smo uticaj citostatika na nivo oštećenja DNK molekula u hemocitama jedinki *U. pictorum* i *U. tumidus*. Rezultati *in situ* istraživanja su pokazali da je vrsta *S. woodiana* jednako pouzdan bioindikator, ali smo se ipak odlučili samo za autohtone vrste roda *Unio* kako bismo izbegli moguće komplikacije prilikom vraćanja jedinki *S. woodiana* u životnu sredinu.

Uticaj citostatika je praćen *in vivo* - tretmanom čitavih jedinki i *in vitro* – tretmanom izolovanih hemocita.

5.4.1. Efekat tretmana *in vivo*

U literaturi trenutno nema podataka o genotoksičnom uticaju citostatika na akvatične organizme. Tretman *in vivo* je rađen da bismo utvrdili najnižu koncentraciju u kojoj citostatici utiču na nivo oštećenja DNK (LOEC) kod školjki, odnosno najnižu koncentraciju u kojoj testirani citostatici predstavljaju rizik po okolinu. Za sve supstance, izabrane su netoksične koncentracije. Za ispitivanje uticaja citostatika odabrali smo statički sistem i tretman od 72 h, uzimajući u obzir stabilnost testiranih supstanci. U *in vivo* tretmanu, testiran je uticaj 5-fluoruracila, cispaltine, etopozida, vinkristin sulfata i imatinib mezilata. Kao kontrolu sistema za *in vivo* izlaganje, izabrali smo model mutagen kadmijum hlorid.

Kadmijum hlorid (CdCl_2) je doveo do značajnog povišenja oštećenja DNK molekula kod obe vrste u koncentracijama 40 i 100 μM . Kadmijum stvara reaktivne vrste kiseonika, utiče na mehanizme reparacije DNK i na mahanizme regulacije ćelijskog ciklusa, te samim tim smanjuje stabilnost genoma (Filipič, 2012). Odabir koncentracija CdCl_2 za *in vivo* tretman izvršen je na osnovu studije Juhel i sar. (2007) rađene na slatkovodnim školjkama *D. polymorpha* u kojoj je tretman u statičkim uslovima trajao 7 dana. Za razliku od navedene studije, koncentracija od 4 μM nije detektovano značajno

povećanje nivoa oštećenja DNK molekula prilikom tretmana CdCl_2 , što se može pripisati periodu izlaganja, razlici u unosu polutanta kod različitih vrsta, ili razlici u protokolu komet testa. Prilikom tretmana CdCl_2 u našem istraživanju, nije primećena dozna zavisnost. Studije rađene na vrstama *Potomida litoralis* i *Lampsilis siliquoides* iz familije Unionidae, pokazale su da izlaganje visokim koncentracijama kadmijuma može imati inhibični efekat na stepen filtracije i unos kadmijuma (Mouabad et al., 2001; Cope et al., 2009).

Prilikom tretmana **5-fluorouracilom (5-FU)** detektovan je veoma sličan odgovor kod jedinki *U. pictorum* i *U. tumidus*. Vrednost LOEC kod obe vrste iznosila je $52 \mu\text{g/L}$. 5-FU je analog pirimidina koji se ugrađuje u DNK u S fazi ćelijskog ciklusa umesto timina. Prilikom popravke inkorporiranih baznih analoga odnosno pogrešno sparenih baznih parova dolazi do stvaranja jednolančanih prekida koje smo kao što je i očekivano detektovali alkalnim komet testom što je u skladu i sa studijama Sorsa i Anderson (1996) i Matuo i sar. (2009).

U odabranom opsegu koncentracija, **cisplatina (CisPt)** nije dovela do značajnog povišenja DNK oštećenja. CisPt dovodi do nastanka unakrsnih veza među lancima DNK molekula, ili u okviru istog lanca, ili unakrsnih veza između DNK molekula i proteina. Aktivacijom popravke DNK oštećenja isecanjem nukleotida u pokušaju uklanjanja nastalih unakrsnih veza, raste frekvencija prekida na DNK molekulu (De Silva i sar., 2000; Wilson i Seidman, 2010; Deans i West, 2011). Međutim, ukoliko je formiran visok broj unakrsnih veza, koje mehanizmi popravke oštećenja ne uspevaju da otklone, očekuje se da nivo oštećenja detektovan komet testom bude obrnuto proporcionalan frekvenciji unakrsnih veza (Merk i Speit, 1999). Da bismo proverili da li je došlo do formiranja unakrsnih veza, uveli smo post-tretman izolovanih hemocita vodonik peroksidom. Post-tretman je odabran na osnovu protokola korišćenog u radu Štambuk i sar. (2008) na hemocitama *U. pictorum*. Nakon post-tretmana, zabeležen je znatno niži nivo DNK oštećenja u hemocitama izolovanim iz jedinki koje su prethodno tretirane *in vivo* sa $4 \mu\text{M}$ CisPt u poređenju sa hemocitama izolovanim iz kontrolne grupe jedinki. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa studijom Heringova i sar. (2006), rađenom na keratinocitama i ćelijama tumora ovarijuma, gde je takođe znatno niži nivo DNK oštećenja nakon tretmana vodonik peroksidom dobijen u ćelijama prethodno tretiranim CisPt.

Uticaj **etopozida (ETO)** je praćen samo na jedinkama *U. tumidus*, pri čemu je vrednost LOEC iznosila 24 mg/L. ETO inhibira topoizomerazu II pri čemu može da uzrokuje jednolančane i dvolančane prekide DNK molekula, pa je logično da smo komet testom detektovali oštećenje DNK molekula što je i u skladu sa studijama Lebailly i sar. (1997) i Godard i sar. (1999).

Prilikom tretmana **vinkristin sulfatom (VIN)** detektovana je razlika u odgovoru kod testiranih vrsta. Indukcija oštećenja je bila mnogo veća u jedinkama *U. pictorum* (LOEC 3,7 µg/L) u poređenju sa *U. tumidus* (LOEC 36,9 µg/L), ali kod *U. pictorum* nije detektovano dozno zavisno povišenje oštećenja DNK. VIN intreguje sa deobnim vretenom tokom M-faze ćelijskog ciklusa i uzrokuje numeričke hromozomske aberacije. Među dostupnom literaturom, samo je u studiji Kopjar i Garaj-Vrhovac (1999) pokazano da VIN može imati i klastogeno dejstvo koje je detektovano komet testom ali sam mehanizam dejstva nije opisan.

Uticaj **imatinib mezilata (IM)** je testiran samo *in vivo*, pri čemu nije detektovana indukcija DNK oštećenja. Jedini dostupni literaturni podaci o genotoksičnosti imatinib mezilata, ukazuju da uzrokuje DNK oštećenja u ćelijama koje sintetišu BCR/ABL protein, ali nema efekta na nivo oštećenja u normalnim ćelijama. Uzimajući u obzir rezultate dobijene u *in vivo* tretmanu kao i mehanizam dejstva ovog citostatika, tretman *in vitro* nije rađen.

5.4.2. Efekat tretmana *in vitro*

Za tretman *in vitro* odabrali smo dva pristupa: kratkotrajni tretman sveže izolovanih hemocita (30 min) i tretman hemocita u primarnoj kulturi (22 h). U *in vitro* tretmanima testirani su citostatici korišćeni i u tretmanu *in vivo*, izuzev imatinib mezilata. Tretman model mutagenom kadmijum hloridom je korišćen kao pozitivna kontrola. Nakon svakog tretmana, praćena je vijabilnost hemocita, kako bismo bili sigurni da oštećenje DNK detektovano komet testom nije uzrokovano apoptozom nastalom usled citotoksičnosti.

Tretman sveže izolovanih hemocita je vršen u fiziološkom rastvoru, odmah po uzorkovanju hemolimfe. Kako u fiziološkom rastvoru vijabilnost hemocita opada u

relativno kratkom vremenskom periodu (Binelli i sar., 2009a), tretman je trajao 30 min. Vijabilnost hemocita je samo pri tretmanu hemocita *U. pictorum* 5-FU bila oko 70%, dok je u svim drugim slučajevima bila veća od 80%. Poređenjem nivoa oštećenja DNK molekula i procenta vijabilnih hemocita, nije primećena statistički značajna korelacija, te se može smatrati da citotoksičnost nije uticala na nivo oštećenja DNK molekula. Genotoksični potencijal je detektovan prilikom tretmana CdCl₂ (40 i 100 μM) i VIN (0,1 μM). Studija Valverde i sar. (2001) pokazala je da CdCl₂, čak i u koncentracijama nižim od 1 μM, može izazvati prekide na DNK molekulu za veoma kratko vreme (1 sat), pri čemu je tretman rađen na prethodno liziranim ćelijama (acelularni komet test), pa je mehanizam nastanka oštećenja pripisan oksidativnom stresu i enzimima koji interaguju sa DNK molekulom. Rezultati dobijeni prilikom tretmana VIN biće diskutovani kasnije. Odsustvo genotoksičnog efekta kod drugih testiranih citostatika se može pripisati kratkom periodu izlaganja ili mehanizmu dejstva citostatika, koji zahteva aktivne deobe ćelija.

Tretman hemocita u primarnoj kulturi je rađen kako bi se ispitao uticaj citostatika prilikom dužeg perioda izlaganja *in vitro* (22 h). Iako se kulture sisarskih ćelija već duže vreme koriste za istraživanja u toksikologiji i genotoksikologiji, samo mali broj studija se bavi razvojem kultura ćelija poreklom iz invertebrata (Rinkevich, 1995; Rinkevich, 2005; Parolini i sar., 2011). Načelno, u većini studija koje se bave ovom problematikom, najveći problem predstavlja odsustvo proliferacije ćelija. Medijum za kulturu ćelija poreklom od tkiva školjki koji je primenio Qiunn i sar. (2009), pokazao se veoma uspešnim jer je proliferacija detektovana u primarnoj kulturi ćelija poreklom od plašta i škruga *D. polymorpha* ali ipak proliferacija hemocita nije detektovana. Odsustvo proliferacije u primarnim kulturama hemocita se navodi kao problem i u drugim izvorima, kao što je studija Label i sar (1996), rađena na hemocitama morskih školjki. U literaturi čak ne postoje podaci o poreklu hemocita, hematopoetičnom tkivu i stepenu diferenciranosti hemocita (Carballal i sar., 1997; Binelli i sar., 2009a).

Kao pozitivnu kontrolu koristili smo CdCl₂ u koncentraciji 100 μM, pri čemu je detektovano značajno povećanje DNK oštećenja u primarnim kulturama hemocita obe istraživane vrste roda *Unio*. U studiji Jose i sar. (2011), rađenoj na primarnoj kulturi

hemocita *Penaeus monodon*, takođe je pokazano da CdCl_2 u koncentraciji 140 μM utiče na porast oštećenja DNK molekula, čak nakon samo 4h tretmana.

Prilikom tretmana **5-FU** nije primećeno značajno povećanje oštećenja DNK molekula. Ako pretpostavimo da se hemocite slatkovodnih školjki takođe ne dele u primarnim kulturama, može se zaključiti da je odsustvo uticaja **5-FU** očekivano, uzimajući u obzir da se radi o leku čije dejstvo se ostvaruje u S fazi ćelijskog ciklusa.

Da bismo utvrdili da li je i prilikom tretmana hemocita u primarnoj kulturi **CisPt** došlo do formiranja unakrsnih veza, koristili smo post-tretman vodonik peroksidom. Za razliku od rezultata dobijenih *in vivo*, prilikom post-tretmana ćelija u primarnoj kulturi hemocita nije zabeležena signifikantna razlika između kontrolne grupe hemocita i grupe prethodno tretirane CisPt u koncentraciji 4 μM . Razlog za ovakav rezultat može biti u niskoj metaboličkoj aktivnosti hemocita u primarnoj kulturi. Ovakvo stanje je moglo uzrokovati manji unos CisPt u ćeliju, a samim tim i nastanak samo manjeg broja unakrsnih veza. Naime, prilikom testa citotoksičnosti rađenog u primarnoj kulturi hemocita primenom UptiBlue eseja (Gačić i sar., 2014), detektovali smo da je procenat redukcije boje nakon 22 sata inkubacije obično dostizao 60%. Isti procenat redukcije se, kod kultura sisarskih ćelija, sa istom koncentracijom ćelija, dostiže već nakon 3 h. Ovo je u skladu sa studijom Parolini i sar. (2011) koja se bavi praćenjem citotoksičnog efekta farmaceutika (atenolol, karbamazepin, diklofen i gemfibrozil) na primarnim kulturama različitih tkiva *D. polymorpha* (škrge, digestivna žlezda i hemolimfa). Autori navode da, upravo zbog niske metaboličke aktivnosti, nisu u mogućnosti detektovati citotoksični efekat testiranih supstanci u primarnoj kulturi hemocita.

Tretman **ETO** doveo je do povišenja DNK oštećenja pri svakoj od testiranih koncentracija u hemocitama *U. tumidus* i pri koncentracijama 40 i 100 μM kod *U. pictorum*. Ako uporedimo dobijene rezultate sa rezultatima drugih *in vitro* studija, možemo zaključiti da su koncentracije koje su izazvale oštećenje DNK u hemocitama u našoj studiji daleko više. Na primer, u studiji Boos i Sopper (2000) navodi se da koncentracija od 25,5 nM etopozida izaziva značajno povećanje DNK oštećenja u ćelijskoj liniji L517X (limfom kod miševa) nakon 4 h tretmana. Nižu osetljivost hemocita možemo objasniti niskom metaboličkom aktivnošću ovih ćelija.

Tretman VIN doveo je do blagog povišenja nivoa oštećenja DNK, pri čemu je statistička značajnost zabeležena samo pri tretmanu hemocita *U. pictorum* koncentracijom 0,04 μM . Uzimajući u obzir mehanizam dejstva ovog citostatika i odsustvo proliferacije hemocita u primarnoj kulturi, odsustvo genotoksičnog potencijala je očekivano. Zanimljivo je da je tretman VIN u sveže izolovanim hemocitama doveo do značajnog povišenja DNK oštećenja nakon perioda od samo 30 min. U studiji Kopjar i Garaj-Vrhovac (1999) pokazano je da VIN može uticati na povišenje nivoa oštećenja DNK i na leukocitima koji se nalaze u G_0 fazi, kao i u leukocitima stimulisanim na proliferaciju. Možemo pretpostaviti da su hemocite neposredno po izolaciji metabolički aktivnije i da im aktivnost opada u primarnoj kulturi, kao što je slučaj prilikom izolacije limfocita (Frauwirth i Thompson, 2004).

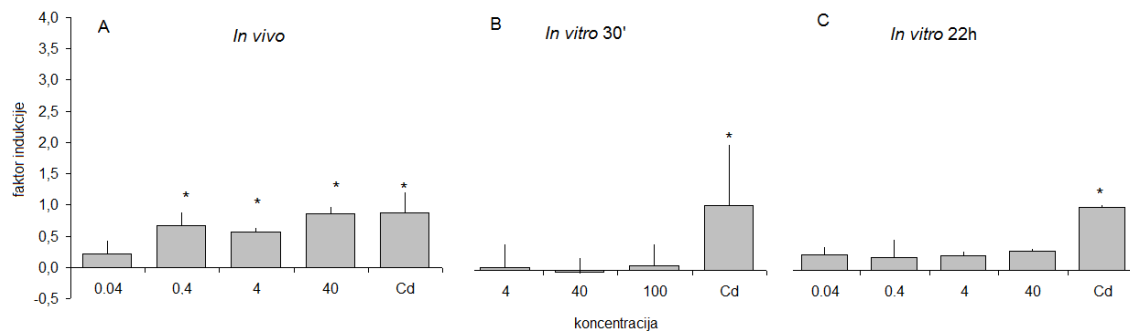
5.4.3. Poređenje rezultata dobijenih *in vivo* i *in vitro*

Jedan od ciljeva ove disertacije bio je da se za odabrane citostatike ispita da li se tretmanom *in vitro* može predvideti ishod *in vivo* tretmana. Rezultati dobijeni u *in vivo* i *in vitro* tretmanima za obe vrste su prikazani su putem faktora indukcije na **slikama 5.1.-5.4.** (srednja vrednost dva eksperimenta $\pm\text{SD}$).

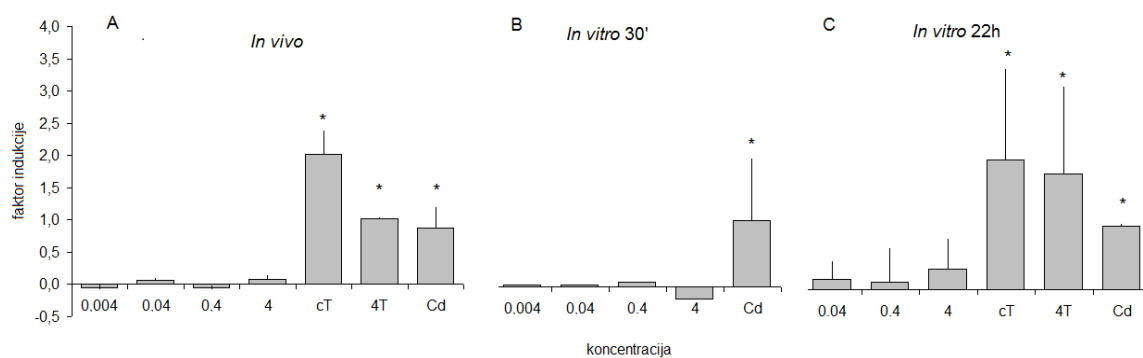
Podudarnost između rezultata *in vivo* i rezultata u primarnoj kulturi je uočljiva za tretman ETO. Međutim, detektovana je i velika razlika u rezultatima tretmana 5-FU i VIN koja se može prvenstveno pripisati mehanizmu dejstva ovih citostatika.

Tretman sveže izolovanih hemocita (30 min) se ne može koristiti kao predikcija rezultata u testovima *in vivo* iz više razloga. Pokazali smo da izolovane hemocite imaju nisku metaboličku aktivnost, što implicira da tretman od 30 min nije dovoljan u smislu izloženosti hemocita test supstanci. Kao argument možemo navesti i studiju Binelli i sar. (2009b) radenu na školjki *D. polymorpha*, koja pokazuje da su efektivne koncentracije (u smislu genotoksičnosti) test supstance (trihlorsan) u tretmanima *in vivo* čak 100 puta manje od efektivnih koncentracija koje su prethodno dobili u *in vitro* tretmanu (1 h) sveže izolovanih hemocita u fiziološkom rastvoru (Binelli i sar., 2009a).

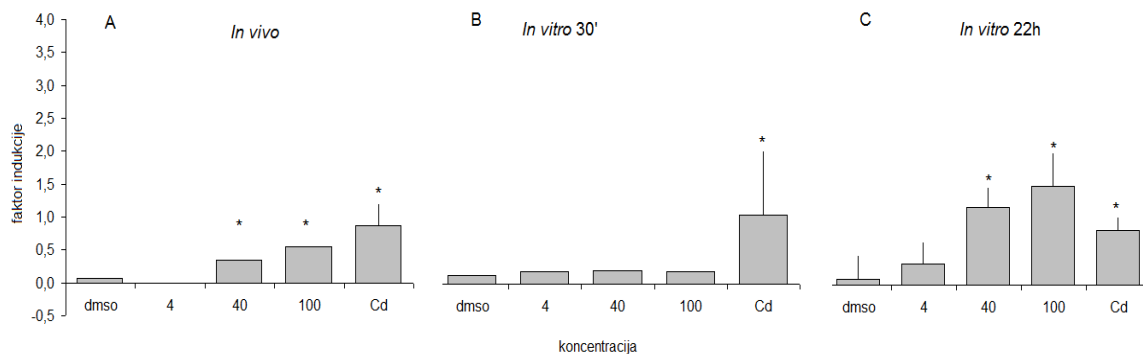
Diskusija



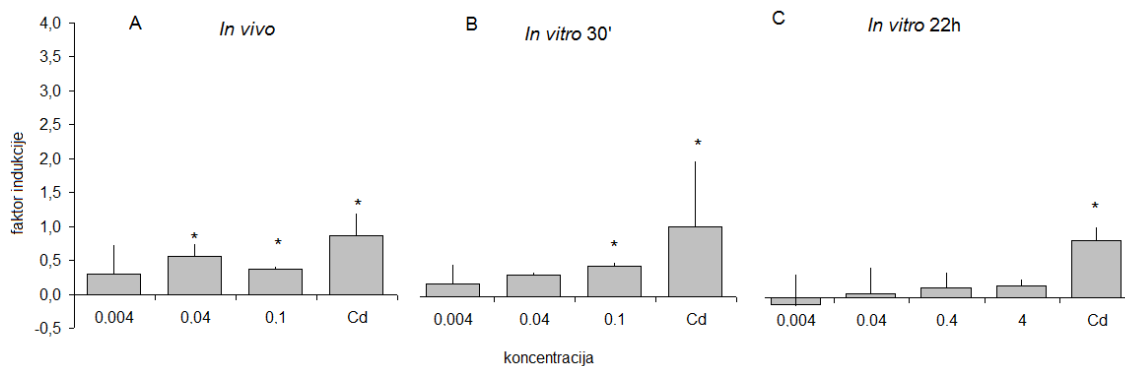
Slika 5.1. Indukcija oštećenja DNK prilikom tretmana 5-FU



Slika 5.2. Indukcija oštećenja DNK prilikom tretmana CisPt



Slika 5.3. Indukcija oštećenja DNK prilikom tretmana ETO



Slika 5.4. Indukcija oštećenja DNK prilikom tretmana VIN

Sa druge strane, primena primarnih kultura hemocita može biti dragocena u ispitivanju genotoksičnosti ali isključivo uzimajući u obzir mehanizam dejstva supstanci koje se testiraju. Stimulacija hemocita u primarnim kulturama na proliferaciju bi znatno unapredila ovaj tip *in vitro* istraživanja.

5.4.4. Procena rizika po životnu sredinu

O uticaju citostatika kao zagađivača koji predstavljaju potencijalnu opasnost po akvatične ekosistema postoje samo oskudni podaci. U literaturi se mogu naći podaci o ekotoksičnosti za neke od citostatika. Za 5-FU postoji prilično opširna baza podataka. U pregledu literature vezane za ekotoksičnost 5-FU koju je dao Straub (2010), podaci pokazuju da je ovaj citostatik štetan za akvatične organizme tek u relativno visokim koncentracijama (toksičnost za ribe, 96 h, > 1 g/L; embriotoksičnost za vodozemce, 96 h, 530 - 1620 mg/L; toksičnost za račiće *D. magna*, 48h, 25 - 850 mg/L). Za ostale citostatike podaci o ekotoksičnosti su znatno oskudniji. Studija Zoukova i sar. (2007) navodi podatke o toksičnosti za račiće *D. magna* (48 h tretman) za CisPt (0,64 mg/L) i ETO (30 mg/L). U literaturi nema podataka o ekotoksičnosti za VIN i IM. Za testirane citostatike ne postoje podaci o toksičnosti na slatkovodnim školjkama.

Procena rizika po životnu sredinu se sastoji od dve faze (EMA, 2006). U fazi I procene se ispituje da li je predviđena koncentracija određene supstance u životnoj sredini (PEC) veća od 10 ng/L. Ukoliko je koncentracija niža od ove vrednosti, ispitivana supstance ne predstavlja rizik po životnu sredinu i dalje procena rizika se zaustavlja. Ukoliko je koncentracija veća od 10 ng/L, prelazi se na fazu II procene rizika. U ovoj fazi procene, prati se odnos predviđene koncentracije supstance u životnoj sredini i predviđene maksimalne koncentracije u kojoj supstanca ne predstavlja opasnost po biotu (PNEC). Ukoliko je odnos PEC/PNEC < 1, supstanca ne predstavlja rizik po životnu sredinu.

Ako se uzmu u obzir PEC vrednosti citostatika u površinskim vodama preračunate za Srbiju i preporučenu proceduru EMA (2006) za procenu rizika po životnu sredinu, samo 5-FU od testiranih citostatika prolazi fazu I procene, zbog PEC više od 10 ng/L. U fazi IIA procene, podaci o ekotoksičnosti ukazuju da 5-FU, CisPt i ETO ne

predstavljaju rizik po životnu sredinu, dok za VIN i IM nema dovoljno podataka da bi se uradila procena. Međutim, kad govorimo o predviđenoj koncentraciji koja nema efekta u fazi IIA procene, procedura EMA uzima samo u obzir podatke toksikoloških studija. Kao što je ranije navedeno, oštećenje DNK može da rezultuje brojnim štetnim posledicama na nivou ćelije, jedinke i populacije i samim tim bi trebalo da bude relevantan biomarker za procenu rizika po životnu sredinu.

Ako se prilikom procene rizika u fazi IIA umesto PNEC koristi koncentracija koja nije imala vidljiv uticaj na indukciju DNK oštećenja (NOEC) u našoj studiji, rezultati ukazuju da odabrani citostatici ne predstavljaju opasnost, obzirom da u tom slučaju odnos PEC/NOEC ima daleko nižu vrednost od 1. Međutim, veliku manu u preporučenoj proceduri EMA (2006) predstavlja stopiranje dalje procene rizika u fazi IIA, pri čemu se efekat hroničnog izlaganja ni ne ispituje ukoliko NOEC u akutnim testovima ima višu vrednost od PEC. Ako se uzme u obzir mehanizam dejstva citostatika, rezultatima akutnog tretmana se teško može predvideti efekat hroničnog izlaganja. Može se očekivati da bi produženo izlaganje rezultovalo genotoksičnim efektom i pri koncentracijama citostatika nižim od testiranih. Takođe u obzir treba uzeti da se citostatici u prirodi nalaze u smešama zajedno sa supstancama koje bi mogle povećati njihovo dejstvo. Na osnovu ovoga dovodi se u pitanje koncept preporučene procedure za procenu rizika po životnu sredinu. Da bi se sa sigurnošću reklo da ove supstance ne predstavljaju rizik neophodno je sprovesti i testove hroničnog izlaganja.

Neophodno je naglasiti da su najniže efektivne koncentracije 5-FU, CisPt i ETO dobijene u našoj studiji bile daleko niže od koncentracija koje imaju ekotoksične efekte. Ipak, ove koncentracije su više od predviđenih koncentracija citostatika u površinskim vodama. Veliki značaj imaju rezultati dobijeni za 5-FU i CisPt, s obzirom da su efektivne koncentracije dobijene za ove citostatike bliske koncentracijama u kojima oni mogu naći u otpadnim vodama bolnica (Mahanik i sar. 2004; Lenz i sar. 2005).

ZAKLJUČCI

6. Zaključci

U skladu sa zadatim ciljevima ove doktorske disertacije i rezultatima dobijenim u *in situ* i *ex situ* istraživanjima može se zaključiti sledeće:

- Prilikom *in situ* istraživanja, slatkovodne školjke *Unio pictorum*, *U. tumidus* i *Sinanodonta woodiana* su pokazale odgovor na prisustvo genotoksičnog zagađenja u životnoj sredini, koje se može detektovati i kvantifikovati primenom komet testa. Zabeležena je značajna korelacija između nivoa DNK oštećenja kod ispitivanih vrsta izazvanih sredinskim stresom.
- Slatkovodne školjke *U. pictorum*, *U. tumidus* i *S. woodiana* su pokazale sposobnost redukcije DNK oštećenja u hemocitama tokom aklimacije u kontrolisanim uslovima. Nivo DNK oštećenja koji odgovara bazalnom nivou jedinki sa lokaliteta koji su pod minimalnim uticajem stresnih faktora dostiže se kod svih ispitivanih vrsta nakon 10 dana. Aklimatizovane jedinke se mogu koristiti za *ex situ* studije, a takođe i za dobijanje referentnih vrednosti za nivo oštećenja DNK molekula za *in situ* studije.
- Parametri DNK oštećenja u komet testu: TI i OTM su pouzdani pokazatelji, ali u situacijama kada je nivo oštećenja DNK blizak vrednosti u kontroli, TI ima veći potencijal za detekciju genotoksičnosti u poređenju sa OTM.
- Aktivni i pasivni biomonitoring na slatkovodnim školjkama *U. pictorum*, *U. tumidus* i *S. woodiana* se mogu preporučiti kao pouzdani pristupi za detekciju genotoksičnosti u akvatičnim ekosistemima *in situ*.
- U svim *in situ* studijama detektovana je korelacija između nivoa oštećenja DNK u hemocitama i koncentracija genotoksičnih polutanata u vodi na ispitivanim lokalitetima. Korelacija sa mikrobiološkim indikatorima fekalnog zagađenja, zabeležena je prilikom studije aktivnog biomonitoringa.
- Prilikom *ex situ* istraživanja vrste *U. pictorum* i *U. tumidus* pokazuju odgovor na tretman citostaticima koji se, u zavisnosti od mehanizma delovanja, može detektovati i kvantifikovati primenom komet testa.

- Kadmijum hlorid (model mutagen) je indukovao DNK oštećenja u hemocitama *U. pictorum* i *U. tumidus* u *in vivo* i *in vitro* uslovima.
- 5-fluorouracil je indukovao DNK oštećenja u hemocitama *U. pictorum* i *U. tumidus* samo prilikom *in vivo* tretmana. Odsustvo efekta u *in vitro* uslovima može se pripisati odsustvu proliferacije izolovanih hemocita, ili kratkom vremenu izlaganja.
- Cisplatina nije indukovala prekide DNK u hemocitama *U. pictorum* i *U. tumidus* prilikom tretmana *in vivo* i *in vitro*, ali je post-tretman vodonik peroksidom potvrdio prisustvo unakrsnih veza na molekulu DNK.
- Vinkristin sulfat je indukovao DNK oštećenja u hemocitama *U. pictorum* i *U. tumidus* prilikom tretmana *in vivo*, kao i prilikom tretmana sveže izolovanih hemocita *in vitro*. Odsustvo efekta u *in vitro* tretmanu u primarnoj kulturi hemocita, može se pripisati manjoj metaboličkoj aktivnosti hemocita u primarnoj kulturi u odnosu na sveže izolovane hemocite.
- Etopozid je indukovao DNK oštećenja u hemocitama *U. tumidus* prilikom tretmana *in vivo*, kao i u *in vitro* tretmanu hemocita u primarnim kulturama. Odsustvo efekta u sveže izolovanim hemocitama može se pripisati suviše kratkom vremenu izlaganja.
- *In vivo* tretman imatinib mezilat nije indukovao DNK oštećenja u hemocitama *U. pictorum* i *U. tumidus*.
- Na osnovu rezultata *in vivo* izvršena je procena rizika po akvatične organizme i testirani citostatici su rangirani po opadajućem genotoksičnom potencijalu na sledeći način: za *U. pictorum*: VIN > 5-FU > CdCl₂ > CisPt > IM; za *U. tumidus*: VIN > 5-FU > CdCl₂ > ETO > CisPt > IM.
- Prema našim rezultatima, *in vitro* tretman sveže izolovanih hemocita u našim uslovima ne predstavlja pouzdan sistem za detekciju genotoksičnog potencijala.
- *In vitro* tretman hemocita u primarnoj kulturi može se preporučiti za detekciju genotoksičnog potencijala *in vitro* ali uz dodatne modifikacije, kao što su stimulacija hemocita na proliferaciju.
- Najniže koncentracije 5-fluorouracila i cisplatine koje indukuju oštećenja DNK su više od koncentracija u kojima se citostatici javljaju u površinskim vodama i u

rangu su koncentracija u kojima se ovi lekovi mogu naći u otpadnim vodama bolnica.

- 5-fluorouracil, cisplatina i etopozid indukuju oštećenja DNK u hemocitama slatkovodnih školjki na koncentracijama nižim od onih koje imaju ekotoksikološke efekte, što ukazuje na važnost uvođenja ekogenotoksikološkog pristupa u proceni rizika po akvatične organizme.
- Na osnovu rezultata dobijenih u *in situ* i *ex situ* istraživanjima može se zaključiti da primena komet testa predstavlja značajan eksperimentalni sistem u ekogenotoksikološkoj proceni stanja akvatičnih ekosistema.

LITERATURA

7. Literatura

- Akcha, F., Vincent Hubert, F., Pfhof-Leszkowicz, A. (2003). Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (*Limanda limanda*) for assessment of *in situ* exposure to genotoxic compounds. *Mutat. Res./Gen. Toxicol. Environ. Mutagen.* 534, 21-32.
- Al-Ahmad, A., Kümmerer, K. (2001). Biodegradation of the antineoplastics vindesine, vincristine, and vinblastine and their toxicity against bacteria in the aquatic environment. *Cancer Detect. Prev.* 25, 102-107.
- Amiard, J.C, Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S. (2006). Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 76, 160-202.
- Andral, B., Stanisiere, J.Y., Sauzade, D., Damier, E., Thebault, H., Galgani, F., Boissery, P. (2004). Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging. *Marine Poll. Bull.* 49, 704–712.
- Arbuckle, K.E., Downing, J.A. (2002). Freshwater mussel abundance and species richness: GIS relationships with watershed land use and geology. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 59, 310–316.
- Bagdonas, E., Vosyliene, M.Z.,(2006). A study of toxicity and genotoxicity of copper, zinc and their mixture to rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*). *Biologija* 1, 8-13.
- Bandyopadhyay, A., Mukherjee, A. (2011). Sensitivity of *Allium* and *Nicotiana* in cellular and acellular comet assays to assess differential genotoxicity of direct and indirect acting mutagens. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 860-865.
- Barbee, G.C., Barich, J., Duncan, B., Bickham, J.W., Matson, C.W., Hintze, C.J., Autenrieth, R., Zhou, G. McDonald, T., Cizmas, L., Norton, D., Donnelly, K.C. (2008). *In situ* biomonitoring of PAH-contaminated sediments using juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 71, 454-464.

- Bauer, G., Hochwald, S., Silkenat, W. (1991). Spatial distribution of freshwater mussels: the role of host fish and metabolic rate. *Freshwater Biol.* 26, 377–386.
- Bauer, G., Wachtler, K. (2001). Ecology and Evolution of the Freshwater Mussels Unionoida, in: Bauer, G and K. Wachtler. (Eds.), *Ecological Studies* 145.
- Besse, J.P., Latour, J.F., Garric, J. (2012). Anticancer drugs in surface waters: what can we say about the occurrence and environmental significance of cytotoxic, cytostatic and endocrine therapy drugs? *Environ. Int.* 39, 73-86.
- Binelli, A., Riva, C., Provini, A. (2007). Biomarkers in zebra mussel for monitoring and quality assessment of Lake Maggiore (Italy). *Biomarkers* 13, 349–368.
- Binelli, A., Riva, C., Cogni, D., & Provini, A. (2008). Assessment of the genotoxic potential of benzo (a) pyrene and *pp'*-dichlorodiphenyldichloroethylene in Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Mutat. Res./Gen. Toxicol. Environ. Mutagen.* 649, 135-145.
- Binelli, A., Cogni, D., Parolini, M., Riva, C., Provini, A. (2009a). Cytotoxic and genotoxic effects of *in vitro* exposure to Triclosan and Trimethoprim on zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) hemocytes. *Comp. Biochem. Phys. C* 150, 50-56.
- Binelli, A., Cogni, D., Parolini, M., Riva, C., & Provini, A. (2009b). *In vivo* experiments for the evaluation of genotoxic and cytotoxic effects of Triclosan in Zebra mussel hemocytes. *Aquat.Toxicol.* 91, 238-244.
- Black, C.M., Ferrell, R.J., Horning, C.R., Martin, K.L. (1996). DNA strand breakage in freshwater mussels (*Anodonta grandis*) exposed to lead in the laboratory and field. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 802-808.
- Black, M.C., Belin, J.I. (1998). Evaluating sublethal indicators of stress in Asiatic clams (*Corbicula fluminea*) caged in an urban stream, in: Little, E. E., Delonay, A. J., Greenberg, B. M. (Eds), *Environmental toxicology and risk assessment ASTM STP 1333 American Society for Testing and Materials West* 7, 76–88.

- Blevins, R.D. (1991). 2, 3, 7, 8 Tetrachlorodibenzodioxin in fish from the pigeon river of Eastern Tennessee, USA: Its toxicity and mutagenicity as revealed by the Ames Salmonella assay. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20, 366-370.
- Bocquené, G., Chantereau, S., Clérendeau, C., Beausir, E., Ménard, D., Raffin, B., Minier, C., Burgeot, T., Leszkowicz, A.P., Narbonne, J.F. (2004). Biological effects of the “Erika” oil spill on the common mussel (*Mytilus edulis*). *Aquat. Living Resour.* 17, 309-316.
- Boettcher, M., Grund, S., Keiter, S., Kosmehl, T., Reifferscheid, G., Seitz, N., Rocha, P., Hollert H., Braunbeck, T. (2010). Comparison of *in vitro* and *in situ* genotoxicity in the Danube River by means of the comet assay and the micronucleus test. *Mutat. Res./Gen. Toxicol. Environ. Mutagen.* 700, 11-17.
- Bolognesi, C., Buschini, A., Branchi, E., Carboni, P., Furlini, P., Martino, A., Monteverde, M., Poli, P., Rossi, C. (2004). Comet and micronucleus assays in zebra mussel cells for genotoxicity assessment of surface drinking water treated with three different disinfectants. *Sci. Total. Environ.* 333, 127-136.
- Boos, G., Stopper, H. (2000). Genotoxicity of several clinically used topoisomerase II inhibitors. *Toxicol. Lett.* 116, 7-16.
- Borchert, J., Karbe, L., Westendorf, J. (1997). Uptake and metabolism of benzo (a) pyrene absorbed to sediment by the freshwater invertebrate species *Chironomus riparius* and *Sphaerium corneum*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 58, 158-165.
- Burns, W.C. (1969). Relation between filtering rate, temperature and body size in four species of *Daphnia*. *Limnol. Oceanogr.* 14, 693-701.
- 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). *Aquat. Toxicol.* 79, 257-267.

- Caplenas, N.R., Kanarek, M.S. (1984). Thermotolerant non-fecal source *Klebsiella pneumoniae*: validity of the fecal coliform test in recreational waters. *Am. J. Public Health* 74, 1273–1275.
- Carballal, M.J., Lopez, M.C., Azevedo, C., Villalba, A. (1997). Hemolymph cell types of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Dis. Aquat. Organ.* 29, 127-135.
- Châtel, A., Faucet-Marquis, V., Perret, M., Gourlay-Francé, C., Uher, E., Pfohl-Leszkowicz, A., & Vincent-Hubert, F. (2012). Genotoxicity assessment and detoxification induction in *Dreissena polymorpha* exposed to benzo [a] pyrene. *Mutagenesis* 27, 703-711.
- Cherkasov, A.A., Overton., J.R.A., Sokolov, E.P., Sokolova, I.M., 2007a. Temperature dependent effects of cadmium and purine nucleotides on mitochondrial aconitase from a marine ectotherm, *Crassostrea virginica*: a role of temperature in oxidative stress and allosteric enzyme regulation. *J. Exp. Biol.* 210, 46–55.
- Cherkasov, A.S., Grewal, S., Sokolova, I.M., 2007b. Combined effects of temperature and cadmium exposure on haemocyte apoptosis and cadmium accumulation in the eastern oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *J. Therm. Biol.* 32, 162–170.
- Ching, E.W., Siu, W.H., Lam, P.K., Xu, L., Zhang, Y., Richardson, B.J., Wu, R.S. (2001). DNA Adduct Formation and DNA Strand Breaks in Green-lipped Mussels (*Perna viridis*) Exposed to Benzo [a] pyrene: Dose-and Time-Dependent Relationships. *Marine Poll. Bull.* 42, 603-610.
- Ciccotelli, M., Crippa, S., Colombo, A. (1998). Bioindicators for toxicity assesment of effluents from a wastewater treatment plant. *Chemosphere* 37, 2823-2832.
- Claxton, L.D., Houk, V.S., Hughes, T.J., 1998. Genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutat. Res.* 410, 237–243.
- Coffinet, S., Cossu-Leguille, C., Bassères, A., Gonnet, J.F., Vasseur, P. (2008). Response of the bivalve *Unio tumidus* and freshwater communities in artificial streams for

- hazard assessment of methyl methacrylate. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1371-1382.
- Cok, I., Ulutas, O.K., Okusluk, O., Durmaz, E., Demir, N. (2011). Evaluation of DNA damage in common Carp (*Cyprinus carpio* L.) by comet assay for determination of possible pollution in Lake Mogan (Ankara). *ScientificWorldJournal* 11, 1455–1461.
- Collins, A.R., Dobson, V.L., Dusinska, M., Kennedy, G., Stetina, R. (1997). The Comet assay: what can it really tell us? *Mutat. Res.* 375, 183-193.
- Connors, E.D., Black, C.M. (2004). Evaluation of lethality and genotoxicity in the freshwater mussel *Utterbackia imbecillis* (Bivalvia: Unionidae) exposed singly and in combination to chemicals used in Lawn Care. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46, 362-371.
- Cope, W.G., Bringolf, R.B., Buchwalter, D.B., Newton, T.J., Ingersoll, C.G., Wang, N., Hammer, E. (2009). Differential exposure, duration, and sensitivity of unionoidean bivalve life stages to environmental contaminants. *J. N. Amer. Benthol. Soc.* 27, 451-462.
- Cossu, C., Doyotte, A., Babut, M., Exinger, A., Vasseur, P. (2000). Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediments. *Ecotoxicol. Environ. Safety.* 45, 106-121.
- Costa, M., Salnikow, K., Sutherland, J.E., Broday, L., Peng, W., Zhang, Q., Kluz, T. (2002). The role of oxidative stress in nickel and chromate genotoxicity. *Mol. Cell. Biochem.* 234-235, 265-275.
- Czechowska, A., Poplawski, T., Drzewoski, J., Blasiak, J. (2005). Imatinib (STI571) induces DNA damage in BCR/ABL-expressing leukemic cells but not in normal lymphocytes. *Chemico-biological interactions*, 152, 139-150.

- De Kock, W.C., Kramer, K.J.M. (1994). Active Biomonitoring (ABM) by translocation of *Bivalves mollusks*. In: Kramer, K.J.M. (ed) Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries. CRC Press, Boca Raton, FL, US, 51-84.
- De Lafontaine, Y., Gagne, F., Blaise, C., Costan, G., Gagnon, P., Chan, H.M. (2000). Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquat. Toxicol.* 50, 51–71.
- De Silva, I.U., McHugh, P.J., Clingen, P.H., Hartley, J.A. (2000). Defining the roles of nucleotide excision repair and recombination in the repair of DNA interstrand cross-links in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 20, 7980-7990.
- Deans, A.J., West, S.C. (2011). DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 11, 467-480.
- Deutsch, W.A., Kukreja, A., Shane, B., Hegde, V. (2001). Phenobarbital, oxazepam and Wyeth 14,643 cause DNA damage as measured by the Comet assay. *Mutagenesis* 16, 439-442.
- Dhawan, A., Bajpayee, M., Parmar, D. (2009). Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell. Biol. Toxicol.* 25, 5-32.
- Dixon, D.R., Pruski, A.M., Dixon, L.R.J., Jha, A.N. (2002). Marine invertebrate ecogenotoxicity: a methodological overview. *Mutagenesis* 17, 495-507.
- Dixon, D.R., Pascoe, P.L. (1994). Mussel eggs as indicators of mutagen exposure in coastal and estuarine environments. In: Sutcliffe D.W. (ed), *Water quality & stress indicators in marine and freshwater systems: linking levels of organization*, Ambleside,UK, 124-128.
- European Medicines Agency - EMA (2006). Note for guidance on environmental risk assessment of medicinal products for human use. Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/447/00.London, UK: Environmental Agency for the Evaluation of Medical Products.

- Environmental Protection Agency, US (1996). Ecological Effects Test Guidelines OPPTS 850.1000 Special Considerations for Conducting Aquatic Laboratory Studies, 712-C-96-113.
- European Commission (2006). Directive 2006/7/EEC, Directive concerning management of bathing water quality and repealing Directive 76/160/EEC. Official Journal of European Communities L. 2006; 64, 37-51.
- European Commission (2008). Directive 2008/105/EC, Directive concerning environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council management of bathing water quality and repealing Directive 76/160/EEC. Official Journal of European Communities L. 2008; 348, 84-97.
- Evans, S.M., Kerrigan, E., Palmer, N. (2000). Causes of Imposex in the Dogwhelk *Nucella lapillus* (L.) and its Use as a Biological Indicator of Tributyltin Contamination. Marine Poll. Bull. 40, 212-219.
- Ferrari, B., Paxeus, N., Lo Giudice, R., Pollio, A., Garric, J. (2003). Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated waste waters: study of carbamazepine, clofibric acid and diclofenac. Ecotoxicol. Environ. Saf. 55, 359-370.
- Filipič, M., (2012). Mechanisms of cadmium induced genomic instability. Mutat. Res. /Fund. Mol. M. 733, 69-77.
- Filipič, M., Isidori, M., Knasmuller, S., Horvat, A., Garaj-Vrhovac, V., Baebler, Š., Gačić, Z. (2013). Environmental occurrence and potential adverse effects of the residues of cytostatic drugs to aquatic organisms, UNESCO Conference on Emerging Pollutants in Water, Belgrade, Serbia, Book of abstracts 68-70.
- Forbes, V.E., Palmqvist, A., Bach, L. (2006). The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. Environ. Toxicol. Chem. 25, 272-280.

- Frauwirth, K.A., Thompson, C.B. (2004). Regulation of T lymphocyte metabolism. *J Immunol.* 172, 4661-4665.
- Frenzilli, G., Nigro, M., Scarcelli, V., Gorbi, S., Regoli, F. (2001). DNA integrity and total oxyradical scavenging capacity in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*: a field study in a highly eutrophicated coastal lagoon. *Aquat. Toxicol.* 53, 19–32.
- Fry, H.C., Deal, C., Barr, E., Cummings, S.D. (2002). Photoactivation of dichloro (ethylenediamine) platinum (II). *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 150, 37-40.
- 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*. *Environ. Poll.* 191, 145-150.
- Gauthier, F., Archibald, F. (2001). The ecology of fecal indicator bacteria commonly found in pulp and paper mill water systems. *Water Res.* 35, 2207–2218.
- Geldreich, E.E., Kenner, B.A. (1969). Concepts of faecal streptococci in stream pollution. *J. Water. Pollut. Control Fed.* 41, R336-R352.
- Godard, T., Fessard, V., Huet, S., Mourot, A., Deslandes, E., Pottier, D., Hyrien, O., Sichel, F., Gauduchon, P., Poul, J.M. (1999). Comparative *in vitro* and *in vivo* assessment of genotoxic effects of etoposide and chlorothalonil by the comet assay. *Mutat. Res./Gen. Toxicol. Environ. Mutagen.* 444, 103-116.
- Gordaliza, M., Garcia, P.A., Miguel del Corral, J.M., Castro, M.A., Gomez-Zurita, M.A. (2004). Podophyllotoxin: distribution, sources, applications and new cytotoxic derivatives. *Toxicom.* 44, 441-459.
- Graham-Evans, B., Cohly, H., Tchounwou, B. (2004). Arsenic-Induced Genotoxic Effects in Human Keratinocytes, Melanocytes and Dendritic Cells. *Int. J. Environ. Res. Pub. Health* 1, 83-89.

- Grover, S., Kaur, S. (1999). Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assays. *Mutat. Res.* 426, 183–188.
- Guidi, P., Frenzilli, G., Benedetti, M., Bernardeschi, M., Falleni, A., Fattorini, D., Regoli, F., Scarcelli, V., Nigro, M. (2010). Antioxidant, genotoxic and lysosomal biomarkers in the freshwater bivalve (*Unio pictorum*) transplanted in a metal polluted river basin. *Aquat. Toxicol.* 100, 75-83.
- Hagger, J.A., Atienzar, F.A., Jha, A.N. (2005). Genotoxic, cytotoxic, developmental and survival effects of tritiated water in the early life stages of the marine mollusc *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.* 74, 205-217.
- Halling, S., Nors, N., Lanzky, P.F, Ingerslev, F., Holten, L., Jorgensen, S.E. (1998). Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment—a review. *Chemosphere* 36, 357–393.
- 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. *Mutat. Res./Gen. Toxicol. Environ. Mutagen.* 771, 15-22.
- Heringova, P., Woods, J., Mackay, F. S., Kasparkova, J., Sadler, P. J., & Brabec, V. (2006). Transplatin is cytotoxic when photoactivated: Enhanced formation of DNA cross-links. *J. Medicin. Chem.* 49, 7792-7798.
- Higley, E., Grund, S., Jones, P.D., Schulze, T., Seiler, T.B., Varel, U.L.V., Brack, W., Wolz, J., Zielke, H., Giesy, J., Hollert, H., Hecker, M. (2012). Endocrine disrupting, mutagenic, and teratogenic effects of upper Danube River sediments using effect - directed analysis. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 1053-1062.
- Huff, J., Lucier, G., Tritscher, A. (1994). Carcinogenicity of TCDD: experimental, mechanistic, and epidemiologic evidence. [Review] [195 refs]. *Annu. Rev.Pharmacol. Toxicol.* 34, 343–372.

- Ibrulj, S., Duricić, E. (2001). Genotoxicity of oxazepam--the micronucleus cytochalasin-B test. *Medicinski arhiv* 56, 61-64.
- ICPDR (2002). Water Quality in the Danube River Basin. TNMN Yearbook 2002. http://www.icpdr.org/icpdr-pages/tnmn_yearbooks.htm.
- 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. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 65, 242-251.
- Jha, A.N. (2008). Ecotoxicological application and significance of the comet assay. *Mutagenesis* 23, 207-221.
- Jha, A.N., Cheung, V.V., Foulkes, M.E., Hill, S.J., Depledge, M.H. (2000a). Detection of genotoxins in the marine environment: adoption and evaluation of an integrated approach using the embryo-larval stages of the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Mutat. Res./Gen. Toxicol. Environ. Mutagen.*, 464, 213-228.
- Jha, A.N., Hagger, J.A., Hill, S.J. (2000b). Tributyltin induces cytogenetic damage in the early life stages of the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 343-350.
- Johns, C., Luoma, C.N. (1990). Arsenic in benthic bivalves of San Francisco Bay and the Sacramento/San Joaquin River delta. *Sci. Total Environ.* 97/98, 673-684.
- Jordan, M.A., Wilson, L. (2004). Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer* 4, 253-265.
- Jorgensen, C.B., Larsen, P.S., Riisgard, H.U. (1990). Effects on temperature on the mussel pump. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 64, 89-97.
- Jose, S., Jayesh, P., Mohandas, A., Philip, R., Bright Singh, I.S. (2011). Application of primary haemocyte culture of *Penaeus monodon* in the assessment of cytotoxicity and genotoxicity of heavy metals and pesticides. *Mar. Environ. Res.* 71, 169-177

- Juhel, G., O'Halloran, J., Culloty, S.C., O'Riordan, R.M., Davenport, J., O'Brien, N.M., James, K.F., Allis, O. (2007). *In vivo* exposure to microcystins induces DNA damage in the haemocytes of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, as measured with the comet assay. *Environ. Mol. Mutagen.* 48, 22-29.
- Kavka, G., Poetsch, E. (2002). Microbiology. In: Joint Danube Survey – Technical report of the International Commission for the Protection of the Danube River. 138-150.
- Kirschner, A.K., Kavka, G.G., Velimirov, B., Mach, R.L., Sommer, R., Farnleitner, A.H. (2009). Microbiological water quality along the Danube River: Integrating data from two whole-river surveys and a transnational monitoring network. *Water Res.* 43, 3673-3684.
- Klobučar, G., Pavlica, M., Erben, R., Papeš, D. (2003). Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. *Aquat. Toxicol.* 64, 15–23.
- Klobučar, G., Štambuk, A., Hylland, K., Pavlica, M. (2008). Detection of DNA damage in haemocytes of *Mytilus galloprovincialis* in the coastal ecosystems of Kaštela and Trogir Bays, Croatia. *Sci. Total Environ.* 405, 330-337.
- Klobučar, G.I., Štambuk, A., Pavlica, M., Perić, M.S., Hackenberger, B.K., Hylland, K. (2010). Genotoxicity monitoring of freshwater environments using caged carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicol.* 19, 77-84.
- 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, 243-251.
- Kolarević, S., Knežević-Vukčević, J., Paunović, M., Tomović, J., Gačić, Z., Vuković-Gačić, B. (2011). Anthropogenic impact on water quality of the River Danube in Serbia: microbiological analysis and genotoxicity monitoring. *Arch. Biol. Sci.* 63, 1209-1217.

- Kolarević, S., Knežević-Vukčević, J., Paunović, M., Vasiljević, B., Kračun, M., Gačić Z., Vuković-Gačić, B., (2012). Seasonal variations of microbiological parameters of water quality of the Velika Morava River. Arch. Biol. Sci. 64, 1017-1027.
- Kopjar, N., Garaj-Vrhovac, V. (1999). Application of cytogenetic endpoints and Comet assay on human lymphocytes treated with vincristine *in vitro*. Neoplasma 47, 162-167.
- Kopjar, N., Garaj-Vrhovac, V. Milas, I. (2002). Assessment of chemotherapy induced DNA damage in peripheral blood leukocytes of cancer patients using the alkaline comet assay. Teratogen. Carcinogen. Mutagen. 22, 13-30.
- Korhonen, L.K., Martikainen, P.J. (1991). Survival of *Escherichia coli* and *Campylobacter jejuni* in untreated and filtered lake water. J. Applied Bacteriology 71, 379–382.
- Kosjek, T., Heath, E. (2011). Occurrence, fate and determination of cytostatic pharmaceuticals in the environment. Trend. Anal. Chem. 30, 1065-1087.
- Kosjek, T., Perko, S., Žigon, D., Heath, E. (2013). Fluorouracil in the environment: Analysis, occurrence, degradation and transformation. J. Chromatogr. A. 1290, 62-67.
- Kramer, K.J., Jenner, H.A., De Zwart, D. (1989). The valve movement response of mussels: a tool in biological monitoring. Hydrobiologia 188, 433-443.
- Kiffmeyer, T., Götze, H.J., Jursch, M., Lüders, U. (1998). Trace enrichment, chromatographic separation and biodegradation of cytostatic compounds in surface water. Fresenius' journal of analytical chemistry 361, 185-191.
- Labieniec, M., Gabryelak, T., Falcioni, G. (2003). Antioxidant and pro-oxidant effects of tannins in digestive cells of the freshwater mussel *Unio tumidus*. Mutat. Res./Gen. Toxicol. 539, 19-28.

- Lebailly, P., Vigreux, C., Godard, T., Sichel, F., Bar, E., LeTalaer, J.Y., Henry-Amar, M., Gauduchon, P. (1997). Assessment of DNA damage induced *in vitro* by etoposide and two fungicides (carbendazim and chlorothalonil) in human lymphocytes with the comet assay. *Mutat. Res./Fund. Mol. M.* 375, 205-217.
- Lebel, J.M., Giard, W., Favrel, P., Boucaud - Camou, E. (1996). Effects of different vertebrate growth factors on primary cultures of hemocytes from the gastropod mollusc, *Haliotis tuberculata*. *Biol. Cell* 86, 67-72.
- 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. *Mutat. Res./Rev. Mutat.* 544, 43-64.
- Lehtonen, K.K., Schiedek, D., Köhler, A., Lang, T., Vuorinen, P.J., Förlin, L., Baršienė, J., Pempkowiak, J., Gercken, J. (2006). The BEEP project in the Baltic Sea: Overview of results and outline for a regional biological effects monitoring strategy. *Marine Poll. Bull.* 53, 523-537.
- Lenz, K., Hann, S., Koellensperger, G., Stefanka, Z., Stingeder, G., Weissenbacher, N., Mahnik, S.N., Fuerhacker, M. (2005). Presence of cancerostatic platinum compounds in hospital wastewater and possible elimination by adsorption to activated sludge. *Sci.Total Environ.* 345, 141-152.
- Liao, C.M., Jau, S.F., Chen, W.Y., Lin, C.M., Jou, L.J., Liu, C.W., Liao, V.H.C., Chang, F.J. (2008). Acute Toxicity and Bioaccumulation of Arsenic in Freshwater Clam *Corbicula fluminea*. *Environ. Toxicol.* 23, 702-711.
- Liu, H., Yang, J., Gan, J. (2010). Trace element accumulation in bivalve mussels *Anodonta woodiana* from Taihu Lake, China. *Arch. Environ. Contam.Toxicol.* 59, 593-601.
- Longley, D.B., Harkin, D.P., Johnston, P.G. (2003). 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat. Rev. Cancer* 3, 330-338.

- Mackin, J.E., Swider, K.T. (1989). Organic matter decomposition pathways and oxygen consumption in coastal marine sediments. *J. Marine Res.* 47, 681-716.
- Mahnik, S.N., Lenz, K., Weissenbacher, N., Mader, R. M., Fuerhacker, M. (2007). Fate of 5-fluorouracil, doxorubicin, epirubicin, and daunorubicin in hospital wastewater and their elimination by activated sludge and treatment in a membrane-bio-reactor system. *Chemosphere* 66, 30-37.
- Mahnik, S.N., Rizovski, B., Fuerhacker, M., Mader, R.M. (2004). Determination of 5-fluorouracil in hospital effluents. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 380, 31-35.
- Makala, P., Oikari, A.O.J. (1990). Uptake and body distribution of chlorinated phenolic in the freshwater mussel, *Anodonta atina* L. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 20, 354-362.
- Marabini, L., Calò, R., Fucile, S. (2011). Genotoxic effects of polychlorinated biphenyls (PCB 153, 138, 101, 118) in a fish cell line (RTG-2). *Toxicol in Vitro*, 25(5), 1045-1052.
- Matuo, R., Sousa, F.G., Escargueil, A.E., Grivicich, I., Garcia - Santos, D., Chies, J.A.B., Saffi, J., Larsen A.K., Henriques, J.A.P. (2009). 5 - Fluorouracil and its active metabolite FdUMP cause DNA damage in human SW620 colon adenocarcinoma cell line. *J. App. Toxicol.* 29, 308-316.
- Merk, O., Speit, G. (1999). Detection of crosslinks with the comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity. *Environ. Mol. Mutagen.* 33, 167-172.
- Mondal, N., Parvin, J.D. (2001). DNA topoisomerase II α is required for RNA polymerase II transcription on chromatin templates. *Nature* 413, 435-438.
- Mouabad, A., Fdil, M.A., Maarouf, A., Pihan, J.C., 2001. Pumping behaviour and filtration rate of the freshwater mussel *Potomida littoralis* as a tool for rapid detection of water contamination. *Aquat. Ecol.* 35, 51-60.

- Munn, R.E. (1973). Global Environmental Monitoring System (GEMS). Action Plan for Phase I. Consultant appointed by SCOPE to the UN Inter-Agency Working Group on Monitoring, Commission on Environmental Monitoring and Assessment, SCOPE Report 3, Toronto, Canada, 67 pp.
- Negreira, N., Mastroianni, N., de Alda, M.L., Barceló, D. (2013). Multianalyte determination of 24 cytostatics and metabolites by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry and study of their stability and optimum storage conditions in aqueous solution. *Talanta* 116, 290-299.
- Nias, D.J., McKillup, S.C., Edyvane, K.S. (1993). Imposex in *Lepsiella vinosa* from Southern Australia. *Marine Poll. Bull.* 26, 380-384.
- Nigro, M., Falleni, A., Del Barga, I., Scarcelli, V., Lucchesi, P., Regoli, F., Frenzilli, G. (2006). Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: transplanted versus native mussels. *Aquat. Toxicol.* 77, 339–347.
- OECD (1986). Introduction to the OECD guidelines on genetic toxicity and guidance on the selection and application of assays. Organization for Co-Operational Development.
- Olive, P.L., Judit, P.B. (2006). The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. British Columbia Cancer Research Center, doi:10.1038/nprot.2006.5675.
- Pampanin, D.M., Camus, L., Gomiero, A., Marangon, I., Volpato, E., Nasci, C. (2005) Susceptibility to oxidative stress of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in the Venice Lagoon (Italy). *Marine Poll. Bull.* 50, 1548–1557.
- Pandurangi, R., Petras, M., Ralph, S., Vrzoc, M. (1995). Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. *Environ. Mol. Mutagen.* 26, 345-356.
- Parolini, M., Quinn, B., Binelli, A., Provini, A. (2011). Cytotoxicity assessment of four pharmaceutical compounds on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*)

- haemocytes, gill and digestive gland primary cell cultures. *Chemosphere* 84, 91-100.
- Parolini, M., Binelli, A., Provini, A. (2011). Assessment of the potential cytotoxicity of the nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) diclofenac on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Water Air Soil Pollut.* 217, 589–601.
- Pavlica, M., Klobučar, G., Mojaš, N., Erben, R., Papeš, D. (2001). Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay. *Mutat. Res.* 490, 209–214.
- Peakall, D.B. (1994). The role of biomarkers in environmental assessment. *Ecotoxicology* 3, 157-160.
- Pérez-Cadahía, B., Laffon, B., Pásaro, E., & Méndez, J. (2004). Evaluation of PAH bioaccumulation and DNA damage in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to spilled Prestige crude oil. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* 138, 453-460.
- Piešová, E., Šiviková, K. (1997). Induction of Micronuclei and Sister Chromatid Exchanges in Sheep Lymphocyte Cultures by Herbicide Chloridazon. *Acta Veterinaria Brno* 66, 229-234.
- Pinto, B., Pierotti, R., Canale, G., Reali, D. (2002). Characterization of faecal streptococci as indicators of faecal pollution and distribution in the environment. *Lett. App. Microbiol.* 29, 258-263.
- Prá, D., Franke, S.I.R., Giulian, R., Yoneama, M.L., Dias, J.F., Erdtmann, B., Henriques, J.A.P. (2008). Genotoxicity and mutagenicity of iron and copper in mice. *Biometals*, 21, 289-297.
- Quinn, B., Costello, M.J., Dorange, G., Wilson, J.G., Mothersill, C. (2009). Development of an *in vitro* culture method for cells and tissues from the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Cytotechnology* 59, 121-134.

- Ravera, O. (2001). Monitoring of the aquatic environment by species accumulators of pollutants: a review. In: Ravera, O. (ed) Scientific and legal aspects of biological monitoring in freshwater. *J Limnol.* 60, 63-72.
- 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. *Aquat. Toxicol.* 68, 167-178.
- Richardson, M.L., Bowron, J.M. (1985). The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. *J.Pharmacy Pharmacol.* 37, 1–12.
- Rigonato, J., Mantovani, M.S., Jordão, B.Q. (2005). Comet assay comparison of different *Corbicula fluminea* (Mollusca) tissues for the detection of genotoxicity. *Gen.Mol. Biol.* 28, 464-468.
- Rinkevich, B. (1999). Cell cultures from marine invertebrates: obstacles, new approaches and recent improvements. *Prog. Ind. Microbiol.* 35, 133-153.
- Rinkevich, B. (2005). Marine invertebrate cell cultures: new millennium trends. *Marine Biotechnol.* 7, 429-439.
- Rocher, B., Le Goff, J., Peluhet, L., Briand, M., Manduzio, H., Gallois, J. (2006). Genotoxicant accumulation and cellular defence activation in bivalves chronically exposed to waterborne contaminants from the Seine River. *Aquat. Toxicol.* 79, 65–77.
- Roméo, M., Hoarau, P., Garello, G., Gnassia-Barelli, M., Girard, J.P. (2003). Mussel transplantation and biomarkers as useful tools for assessing water quality in the NW Mediterranean. *Environ. Pollut.* 122, 369–378.
- Rompre, A.P., Servais, J., Baudart, M., Roubin, R., Laurent, P. (2002). Detection and enumeration of coliforms in drinking water: Current methods and emerging approaches. *J. Microbiol. Methods* 49, 31-54.

- Rosenberger, A., Rössler, U., Hornhardt, S., Sauter, W., Bickeböller, H., Wichmann, H.E., Gomolka, M. (2011). Validation of a fully automated COMET assay: 1.75 million single cells measured over a 5 year period. *DNA Repair* 10, 322–337.
- Sandal, S., Yilmaz, B., & Carpenter, D. O. (2008). Genotoxic effects of PCB 52 and PCB 77 on cultured human peripheral lymphocytes. *Mutat.Res./Gen. Toxicol.* 654, 88-92.
- Seitz, N., Böttcher, M., Keiter, S., Kosmehl, T., Manz, W., Hollert, H., Braunbeck, T. (2008). A novel statistical approach for the evaluation of comet assay data. *Mutat. Res./Gen. Toxicol.* 652, 38-45.
- Shugart, L., Theodarkis, C. (1994). Environmental genotoxicity: probing the underlying mechanisms. *Environ. Health.Prospect.* 102, 13-17.
- Simić, D., Knežević-Vukčević, J., Vuković-Gačić, Mitić, D., Berić, T., Nikolić, B., Stanojević, J., Stanković, S. (2001). In Antić, D. And Vujić, J. (eds.): *Environmental Recovery of Serbia*, 378-382.
- 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. *Exp. Cell. Res.* 175, 184-191.
- Siu, W.H.L., Cao, J., Jack, R.W., Richardson, B.J., Xu, L., Lam, P.K.S. (2004). Application of the comet and micronucleus assays to the detection of B [a] P genotoxicity in haemocytes of the green-lipped mussel (*Perna viridis*). *Aquat. Toxicol.* 66, 381-392.
- Skraber, S., Gassilloud, B., Schwartzbrod, L., Gantzer, C. (2004). Survival of infectious *Poliovirus* in river water compared to the persistence of somatic coliphages, thermotolerant coliforms and *Poliovirus* genome. *Water Res.* 38, 2927-2933.
- Slobodnik, J. (2013). Emerging Environmental Pollutants in the Context of Risk Assessment of European River Basin. UNESCO Conference on Emerging Pollutants in Water, Belgrade, Serbia. *Proceedings* 35-38.

- Službeni glasnik RS (2011). Pravilnik o parametrima hemijskog i ekološkog statusa br. 74/2011.
- Službeni glasnik SFRJ (1987) Pravilnik o mikrobiološkoj ispravnosti vode za piće br. 33/87.
- Smolders, R., Bervoets, L., Wepener, V., Blust, R. (2003). A conceptual framework for using mussels as biomonitors in whole effluent toxicity. *Human Ecol. Risk Assess.* 9, 741–760.
- Soares-da-Silva, I.M., Ribeiro, J., Valongo, C., Pinto, R., Vilanova, M., Bleher, R., Machado, J. (2002). Cytometric, morphologic and enzymatic characterization of haemocytes in *Anodonta cygnea*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 132, 541-553.
- Sokolova, I., Lannig, G. (2008). Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change. *Clim. Res.* 37, 181-201.
- Sorsa, M., Anderson, D. (1996). Monitoring of occupational exposure to cytostatic anticancer agents. *Mutat.Res./Fund. Mol.*355, 253-261.
- Squier, M.K., Cohen, J.J. (2001). Standard quantitative assays for apoptosis. *Mol. Biotechnol.* 19, 305-312.
- Stacey, G. (2001). Primary Cell Cultures and Immortal Cell Lines. DOI: 10.1038/npg.els.0003960.
- StatSoft, Inc. (2001). STATISTICA for Windows [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., <http://www.statsoft.com>.
- Steinert, S.A., Montee, R.S., Sastre, M.P. (1998a). Influence of sunlight on DNA damage in mussels exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Marine Environ.Res.* 46, 355-358.

- Steinert, S.A., Streib-Montee, R., Leather, J.M., Chadwick, D.B. (1998b). DNA damage in mussels at sites in San Diego Bay. *Mutat. Res./Fund. Mol.* 399, 65-85.
- Straub, J.O. (2010). Combined environmental risk assessment for 5 - fluorouracil and capecitabine in Europe. *Integr. Environ. Ass. Manage.* 6, 540-566.
- 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. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 37, 967-974.
- Sunjog, K., Kolarević, S., Héberger, K., Gačić, Z., Knežević-Vukčević, J., Vuković-Gačić, B., Lenhardt, M. (2013). Comparison of comet assay parameters for estimation of genotoxicity by sum of ranking differences *Anal. Bioanal. Chem.* DOI 10.1007/s00216-013-6909-y.
- Sunjog, K., Gačić Z., Kolarević, S., Višnjić-Jeftić, Z., Jarić, I., Knežević-Vukčević, J., Vuković-Gačić, B., Lenhardt, M. (2012). Heavy metal accumulation and the renotoxicity in barbel (*Barbus barbus*) as indicators of the Danube river pollution. *The Scientific World Journal* doi:10.1100/2012/351074.
- Šivikova, K., Dianovský, J., Piešova, E. (1999). Chromosome damage in cultured bovine peripheral lymphocytes induced by herbicide chloridazon. *Acta Veterinaria Brno* 68, 105-110.
- Štambuk, A., Pavlica, M., Malović, L., Klobušar, G. (2008). Persistence of DNA damage in the freshwater mussel *Unio pictorum* upon exposure to ethyl methanesulphonate and hydrogen peroxide. *Environ. Mol. Mutagen.* 49, 217-225.
- Štambuk, A., Pavlica, M., Vignjević, G., Bolarić, B., Klobučar, G. (2009). Assessment of genotoxicity in polluted freshwaters using caged painter's mussel, *Unio pictorum*. *Ecotoxicology* 18, 430-439.

- Ternes, T.A., Bonerz, M., Herrmann, N., Löffler, D., Keller, E., Lacida, B.B., Alder, A.C. (2005). Determination of pharmaceuticals, iodinated contrast media and musk fragrances in sludge by LC tandem MS and GC/MS. *J. Chromatogr. A* 1067, 213-223.
- Tran, D., Moody, J.A., Fisher, A.S., Foulkes, M.E., Jha, A.N. (2007). Protective effects of selenium on mercury-induced DNA damage in mussel haemocytes. *Aquat. Toxicol.* 84, 11-18.
- Tuvikene, A., Huuskonen, S., Koponen, K., Ritola, O., Mauer, U., Lindström-Seppä, P. (1999). Oil shale processing as a source of aquatic pollution: monitoring of the biologic effects in caged and feral freshwater fish. *Environ. Health Persp.* 107, 745-752.
- United Nations Environment Programme (2004). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants.
- Uno, S., Shiraishi, H., Hatakeyama, S., Otsuki, A., Koyama, J. (2001). Accumulative Characteristics of Pesticide Residues in Organs of Bivalves (*Anodonta woodiana* and *Corbicula leana*) Under Natural Conditions. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 40, 35-47.
- Valverde, M., Trejo, C., Rojas, E. (2001). Is the capacity of lead acetate and cadmium chloride to induce genotoxic damage due to direct DNA-metal interaction? *Mutagenesis*, 16, 265-270.
- Van Gestel, C.A.M., Van Brummelen, T.C. (1996). Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology* 5, 217-225.
- 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. *Mutat. Res./Gen. Toxicol.* 631, 36-43.

- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., Koehler, A. (2007). The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp. Biochem. Physiol. C* 146, 281–300.
- Vincent-Hubert, F., Arini, A., Gourlay-France, C. (2008). Early genotoxic effects in gill cells and haemocytes of *Dreissena polymorpha* exposed to cadmium, B(a)P and combination of B(a)P and Cd. *Mut. Res. Genetic Toxicol. Environ. Mutagen.* 723, 26-35.
- Vuković-Gačić, B., Kolarević, S., Sunjog, K., Tomović, J., Knežević-Vukčević, J., Paunović, M., Gačić, Z. (2014), Comparative study of the genotoxic response of freshwater mussels *Unio tumidus* and *Unio pictorum* to environmental stress, *Hydrobiologia* 735, 221-231
- Wang, D., Lippard, S.J. (2005). Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, 307-320.
- Wang, N., Erickson, R.J., Ingersoll, C.G., Ivey, C.D., Brunson, E.L., Augspurger, T., Barnhart, M.C. (2008). Influence of pH on the acute toxicity of ammonia to juvenile freshwater mussels (fatmucket, *Lampsilis siliquoidea*). *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1141-1146.
- Watters, G.T. (1997). A synthesis and review of the expanding range of the Asian freshwater mussel *Anodonta woodiana* (Bivalvia: Unionidae). *Veliger* 40, 152-156.
- Wheeler, A.L., Hartel, P.G., Godfrey, D.G., Hill, J.L., Segars, W.I. (2002). Potential of as a Human Fecal Indicator for Microbial Source Tracking. *J. Environ. Qual.* 31, 1286-1293.
- White, P., Rasmussen, J.B. (1998). The genotoxic hazard of domestic wastes in surface waters. *Mutat. Res.* 410, 223-236.

- Wilson, D.M., Seidman, M.M. (2010). A novel link to base excision repair? Trends Biochem. Sci. 35, 247-252.
- World Health Organisation (2012). Pharmaceuticals in drinking water http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44630/1/9789241502085_eng.pdf
- Woznicki, P., Lewandowska, R., Brzuzan, P., Ziomek, E., Bardega, R. (2004). The level of DNA damage and the frequency of micronuclei in haemolymph of freshwater mussels (*Anadonta woodiana*) exposed to benzo[a]pyrene. Acta Toxicol. 12, 41-45.
- Wright, D., Wlourn, P. (2002). Environmental toxicology. The press syndicate of the University of Cambridge, Cambridge UK.
- Xu, G.C., Gu, R.B., Wen, H.B., Hua, D., Wang, Y.F. (2007). Influence of Water Temperature and pH on Filtration Rate of *Anodonta woodiana pacifica*. Acta. Hydrobiol. Sin. 31, 600-603.
- Yin, J., Shao, B., Zhang, J., Li, K. (2010). A preliminary study on the occurrence of cytostatic drugs in hospital effluents in Beijing, China. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 84, 39-45.
- Yoshida, R., Ogawa, Y. (2000). Oxidative stress induced by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: an application of oxidative stress markers to cancer risk assessment of dioxins. *Ind. Health* 38, 5-14
- Zhou, Q., Zhang, J., Fu, J., Shi, J., Jiang, G. (2008). Biomonitoring: an appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. Anal. Chim. Acta 606, 135-150.
- Zouneková, R., Odráška, P., Doležalová, L., Hilscherová, K., Maršálek, B., & Bláha, L. (2007). Ecotoxicity and genotoxicity assessment of cytostatic pharmaceuticals. Environ. Toxicol. Chem. 26, 2208-2214.

PRILOG

Prilog 1 – Pasivni biomonitoring – reka Velika Morava

Velika Morava je najveća reka Srbije i veoma bitna desna pritoka Dunava uzvodno od Đerdapa. Sliv reke obuhvata površinu od 37.444 km². Reka nastaje spajanjem Južne i Zapadna Morave kod mesta Stalać. Reka protiče kroz region sa intenzivnom poljoprivredom (preko 25.000 ha) koja znatno utiče na kvalitet vode same reke, zbog visoke koncentracije azota i fosfora u đubrivima koja se koriste. Takođe, veliki problem predstavljaju i neprerađene otpadne vode iz naselja uz reku Veliku Moravu, koje se izlivaju direktno u reku. Istraživanje je rađeno na lokalitetima Varvarin i Bagrdan (Slika 1).



Slika 1. Lokaliteti Varvarin (levo) i Bagrdan (desno)

Lokalitet Varvarin se nalazi neposredno nizvodno od mesta spajanja Južne i Zapadne Morave. Lokalitet je pod uticajem otpadnih voda grada Kruševca (65000 stanovnika).

Lokalitet Bagrdan se nalazi nizvodno od Jagodine (35.000 stanovnika). Otpadne vode Jagodine dospevaju u Veliku Moravu kroz pritoke Belicu i Lugomir. Lokalitet Bagrdan je takođe pod uticajem kanalizacije i otpadnih voda tekstilne industrije kao i postrojenja za proizvodnju šećera grada Paraćina (25.000 stanovnika).

Prilog 1

Tabela 1. Fizičko-hemijski parametri izmereni u vodi na lokalitetima Varvarin i Bagrdan.

parameter		^a Dozvoljena vrednost	Varvarin						Bagrdan							
			Jun.	Aug.	Sept.	Okt.	Nov.	Jan.	Feb.	Jun.	Aug.	Sept.	Okt.	Nov.	Jan.	Feb.
t (C°)		np	24,1	24,8	18,8	13,2	10	11,9	1,8	25,9	27	20,5	/	10,2	11	2
Kiseonik	mg/L	6	9,7	10,1	6,94	7,48	10,8	9,11	10,6	10	7,9	8,55	/	9,8	7,79	10,4
	%	np	97	118	74,5	71,6	95	78,6	76,2	104	96	95,6	/	87	69,9	74,8
pH		6,8-8,5	7,79	8,20	8,00	8,50	9,00	7,90	8,80	8,28	8,50	8,20	/	8,90	8,00	8,30
NH ₄ ⁺	mg/L	0,3	0,03	0,05	0,08	0,22	0,08	0,18	0,12	0,50	0,03	0,08	/	0,38	0,17	0,12
NO ₃ ⁻	mg/L	3	12,1	2,7	1,2	1,3	3,4	3,0	3,7	6,6	1,8	11,1	/	5,9	12,3	3,0
PO ₄ ³⁻	mg/L	0,1	50,0	0,8	44,1	42,9	0,3	3,2	2,5	48,7	1,0	13,9	/	0,4	2,9	1,0
Fe	mg/L	0,3	0,13	0,16	0,1	0,17	0,49	0,09	0,13	0,15	0,07	0,21	/	0,06	0,07	/
Zn	µg/L	5	19,9	31,7	11,5	12	24,8	17,5	/	46	18,1	44,7	/	10,8	12,8	/
Cu	µg/L	2	10,9	11	13,8	13,5	9,5	24,7	/	9,7	7,6	24,2	/	7,3	16,6	/
Cr	µg/L	2	1,5	1,1	1,1	0,6	0,8	0,5	/	0,7	0,7	1	/	1,2	1,4	/
Pb	µg/L	1	0,6	1,8	0,5	0,5	0,5	0,9	/	0,5	0,5	0,7	/	0,5	0,9	/
Cd	µg/L	0,1	0,07	0,25	0,08	0,28	0,05	0,06	/	0,09	0,025	0,05	/	0,04	0,1	/
Hg	µg/L	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	/	0,1	0,1	0,2	/	0,5	0,1	/
Ni	µg/L	1	4,8	6	3,2	4,2	4,8	3,2	/	4,1	3,1	6,5	/	3,6	5,4	/

^aPredložene maksimalne dozvoljene vrednosti preuzete od Međunarodne komisije za zaštitu reke Dunav (ICPDR, 2002); označene vrednosti su veće od naznačenih dozvoljenih vrednosti; np – nije rimenjivo;/- nije mereno

Prilog 1

Tabela 2. Broj jedinki uzorkovanih sa lokaliteta Varvarin i Bagrdan i broj ćelija analiziranih komet testom.

Lokalitet	Mesec	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	I	II
Varvarin	Br. jedinki	6	4	3	4	3	4	5	0	3	4
	Br. ćelija	150	100	50	100	100	100	100	0	100	100
Bagrdan	Br. jedinki	0	5	0	4	3	4	6	0	4	5
	Br. ćelija	0	100	0	50	50	100	150	0	50	100

Tabela 3. Vrednosti OTM zabeležene u jedinkama *S. woodiana* sa lokaliteta Varvarin i Bagrdan na Velikoj Moravi

Lokalitet	Oštećenje DNK (OTM)	Kontrola	Jun.	Avg.	Sept.	Okt.	Novem.	Jan.	Feb.
Varvarin	sr.vred.	0,48	4,38	5,24*	0,24	0,25	1,28	0,95	0,52
	SE	0,10	0,44	0,38	0,05	0,05	0,08	0,17	0,08
Bagrdan	sr.vred.	0,48	5,67	2,73	1,69*	0,40	1,80*	0,66	1,32*
	SE	0,10	0,56	0,37	0,34	0,09	0,26	0,21	0,17

Osenčene vrednosti su značajno veće u odnosu na kontrolu za $p < 0,05$; * značajno veća vrednost u odnosu na drugi lokalitet u istom mesecu uzorkovanja za $p < 0,05$

Prilog 2 – Pasivni biomonitoring – reka Dunav

Dunav

Istraživanje na reci Dunav, rađeno je na lokalitetima obrađivanim u okviru ekspedicije JDS3 (eng. Joint Danube Survey 3). Svakih 6 godina, Međunarodna komisija za zaštitu reke Dunav (eng. International Commission for the Protection of the Danube River - ICPDR) organizuje međunarodnu ekspediciju JDS. Prethodna ekspedicija (JDS2) organizovana je 2007. godine. JDS3 je najveća ekspedicija ovog tipa u 2013. godini. U ekspediciji je učestvovalo 20 naučnika iz 7 podunavskih država. Prilikom ekspedicije sakupljani su uzorci makrozoobentosa, fitobentosa, fitoplanktona, ihtiofaune, makrofita kao i uzorci za hemijske i mikrobiološke analize. Cilj ekspedicije je da se putem analiza na različitim nivoima biote, zajedno sa hemijskim i hidromorfološkim analizama, proceni trenutno stanje reke Dunav.

Na osnovu geomorfoloških karakteristika, reka Dunav se može podeliti na 10 sektora (Roberts i sar., 2003):

I) Gornji tok Dunava (rkm 2.786 – 2.581)

Tokom ekspedicije, uzorci su prikupljeni samo sa plovnog dela Dunava (sa dodatnim uzorkom iz Böfinger Halde) tako da ovaj sektor Dunava nije uključen u studiju.

II) Zapadno Alpsko pobrđe (rkm 2.581 – 2.225)

U ovom sektoru, Dunav ima odlike alpske reke, protiče između oblasti Swabian Alb na severu i Bavarske na jugu. Na hidrološke odlike znatno utiču pritoke Iller, Lech i Isar. Sektor obuhvata tok Dunava sve do ušća reke Inn. U ovom sektoru školjke *Unio* sp. su pronađene na 2 od 5 odabranih lokaliteta. Lokaliteti JDS1 i JDS2, uzorkovani su uz pomoć Nemačkog nacionalnog tima dok je sama ekspedicija zvanično krenula iz Regenzburga.

III) Istočno Alpsko pobrđe (rkm 2.225 – 2.001)

Najveći uticaj u ovom sektoru ima pritoka Inn. Sa protokom od 737 m³/s Inn znatno utiče na temperaturu, providnost i koncentraciju suspendovane materije u Dunavu. Kroz čitav sektor, reka je ispregrađivana brojnim branama. Školjke nisu pronađene ni na jednom od 3 odabrana lokaliteta.

IV) Niže Alpsko pobrđe (rkm 2.001 – 1.789,5)

Najveći antropogeni uticaj u ovom sektoru imaju gradovi Beč (1,7 miliona stanovnika) i Bratislava (45.0000 stanovnika) kao i hidrocentrala Gabčikovo. Usled pregrađivanja reke hidrocentralom Gabčikovo, formirana je akumulacija pa Dunav u ovom delu sektora IV ima karakteristike jezera. Jedinke *Unio* sp. i *S. woodina* su nađene na 2 od 9 odabranih lokaliteta.

V) Mađarska krivina Dunava (rkm 1.789,5 – 1.497)

U ovom sektoru Dunav polako dobija karakteristike ravničarske reke. Najbitnija pritoka u hidrološkom smislu je Vah. Najveći antropogeni uticaj ima grad Budimpešta (1,7 miliona stanovnika). U ovom sektoru se nalazi i nuklearna elektrana Pakš. Jedinke *Unio* sp. su pronađene na 5 a jedinke *S. woodiana* na 2 od 8 ispitivanih lokaliteta.

VI) Panonska ravan (rkm 1497 - 1075)

Dunav u ovom sektoru ima karakteristike ravničarske reke. Najveći antropogeni uticaj imaju gradovi Novi Sad (150.000 stanovnika) kao i najveće naselje na samoj reci grad Beograd (2 miliona stanovnika). U ovom sektoru Dunav prima velike količine neprerađenih otpadnih voda; tokom prethodne ekspedicije sektor je okarakterisan prisustvom fekalnog zagađenja koje se odražava i na hemiju i na biotu. Najveće pritoke su Drava, Tisa, Sava i Velika Morava koje znatno utiču na kvalitet vode. Jedinke *Unio* sp. su pronađene na 8 a jedinke *S. woodiana* na 6 od 17 ispitivanih lokaliteta.

VII) Đerdap (rkm 1.075 - 942)

Zbog brane hidrocentrale Đerdap, reka u prvom delu sektora ima usporen tok koji se potom znatno ubrzava prilikom prolaska kroz Đerdapsku klisuru. Na proširenjima u klisuri stvaraju se akumulacije. Jedinke *Unio* sp. nađene su na sva tri ispitivana lokaliteta.

VIII) Zapadna Pomska oblast (rkm 943 – 375,5)

Sektor se proteže od brane hidrocentrale Đerdap I pa do ade Balta Ialomitei nedaleko od nuklearne elektrane Černa voda. Najveće pritoke su Timok, Iskar, Olt, Jantra i Ardeš a zbog visokog stepena zagađenja (otpadne vode iz grada Ruse – 260.000 stanovnika) neophodno je pomenuti i manju pritoku Rusenski Lom. U ovom sektoru se nalazi i nuklearna elektrana Kozloduj. Nakon Đerdapa na samoj reci više nema brana, tako da Dunav u ovom sektoru ima slobodan tok. Jedinke *Unio* sp. su pronađene na 5 a jedinke *S. woodiana* na 4 od 15 ispitivanih lokaliteta.

IX) Istočna Valahijska oblast (rkm 375,5 - 100)

U ovom sektoru Dunav i dalje ima slobodan tok. Velike pritoke su Siret i Prut. Od velikih naselja u ovom sektoru se nalazi Braila (180.000 stanovnika). Jedinke *Unio* sp. su pronađene na 3 od 5 ispitivanih lokaliteta.

X) Delta (rkm 100 - 7)

Delta reke Dunav se sastoji od tri glavna rukavca: Kilia rukavac, Sulina rukavac i rukavac Sveti Đorđe. Glavni rukavci su međusobno povezani sistemom kanala i močvarnim zemljištem. Na kraju (ili početku) rukavca Kilija nalazi se oznaka za nulti kilometar reke. Jedinke *Unio* sp. su pronađene na sva 3 ispitivana lokaliteta.

Prilog 2

Tabela 1. Spearman-ova koorelacija između parametra TI i parametara merenih u vodi, suspendovanim česticama i sedimentu. Označene vrednosti su značajne za $p < 0,05$

Medijum	Grupa		<i>Unio sp.</i>	N	<i>S. woodiana</i>	N
Voda	Nutrijenti	Ukupni N	0,46	31	0,33	15
		Ukupni P	0,25	31	0,48	15
	Fizički parametri	Suspendovane čestice	-0,06	31	0,51	15
		Temperatura	0,26	31	-0,02	15
		Konduktivitet	-0,16	31	-0,32	15
		Kiseonik (rastvoreni)	-0,19	31	0,38	15
		DOC	-0,39	31	-0,29	15
		pH	-0,20	31	0,37	15
		Teški metali	Cu - rastvoren	-0,34	31	-0,52
	Zn - rstvoren		0,34	31	-0,21	15
	Ni - rastvoren		0,11	31	0,17	15
	Pb - rastvoren		-0,28	31	-0,41	15
	As - rastvoren		-0,13	31	-0,18	15
	Cr- rastvoren		0,04	31	-0,15	15
	Hg - rastvoren		-0,04	31	-0,34	15
	Cd -rastvoren		-0,22	31	-0,18	15
	Policiklični aromatični ugljovodonici	Fluoranten	-0,03	31	-0,21	15
		Naftalen	0,02	31	-0,06	15
		Benzo(g,h,i)perilene	0,20	31	0,20	15
	Novootkriveni zagađivači	Hloridazon-desfenil	0,42	31	-0,03	15
		AMPA (Aminomethylphosphonic acid)	-0,07	31	-0,33	15
		Oksazepam	0,38	31	0,58	15
		Dibutiltin-katjon	0,11	31	-0,18	15
Suspendovane čestice	Teški metali	Cu - ukupni	-0,33	31	-0,24	15
		Zn -ukupni	0,30	31	0,06	15
		Ni -ukupni	-0,31	31	-0,10	15
		Pb -ukupni	-0,11	31	-0,41	15
		As - ukupni	-0,22	31	-0,16	15
		Cr -ukupni	-0,28	31	-0,26	15

Prilog 2

		Hg- ukupni	0,14	31	-0,29	15	
		Cd - ukupni	-0,04	31	-0,19	15	
		Bi -ukupni	-0,23	31	0,26	15	
		Co - ukupni	-0,34	31	-0,20	15	
		Mn - ukupni	0,27	31	-0,31	15	
		Mo - ukupni	0,02	31	0,14	15	
	Policiklični aromatični ugljovodonici	Fluorantene	0,43	31	0,02	15	
		Benzo(a)pirene	0,46	31	0,12	15	
		Benzo(b)fluorantene	0,47	31	0,20	15	
		Benzo(k)fluorantene	0,45	31	0,20	15	
		Benzo(g,h,i)perilene	0,42	31	0,16	15	
	Novootkriveni zagađivači	Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)	0,23	31	0,32	15	
	Sediment	Policiklični aromatični ugljovodonici	Fluorantene	0,29	31	0,12	15
			Benzo(a)pirene	0,28	31	0,02	15
Benzo(b)fluorantene			0,45	31	0,27	15	
Benzo(k)fluorantene			0,09	31	-0,23	15	
Benzo(g,h,i)perilene			0,21	31	-0,27	15	
Novootkriveni zagađivači		Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)	0,30	31	0,08	15	
		Dibutiltin-katjon	-0,03	31	0,16	15	
		Trifeniltin-katjon	0,09	31	0,16	15	
Dioksini		2378-TCDD (Tetrachlorodibenzo-p-dioxin)	0,56	13	0,00	5	
		12378-PeCDD (1,2,3,7,8-Pentachlorodibenzo-p-dioxin)	0,62	13	-0,10	5	
		123478-HxCDD (1,2,3,4,7,8-Hexachlorodibenzo-p-dioxin)	0,05	13	-0,05	5	
		123678-HxCDD (1,2,3,6,7,8-Hexachlorodibenzo-p-dioxin)	0,43	13	-0,05	5	
		123789-HxCDD (1,2,3,7,8,9-Hexachlorodibenzo-p-dioxin)	0,24	13	-0,87	5	
		1234678-HpCDD (1,2,3,4,6,7,8-Heptachlorodibenzo-p-dioxin)	0,43	13	-0,72	5	
		OCDD (Octachlorodibenzo-p-dioxins)	0,48	13	-0,20	5	
Furani		2378-TCDF (2,3,7,8-Tetrachlorodibenzofuran)	0,51	13	-0,72	5	
		12378-PeCDF (1,2,3,7,8-Pentachlorodibenzofuran)	0,53	13	-0,60	5	
		23478-PeCDF (2,3,4,7,8-Pentachlorodibenzofuran)	0,42	13	-0,72	5	
		123478-HxCDF (1,2,3,4,7,8-Hexachlorodibenzofuran)	0,43	13	-0,60	5	

Prilog 2

		123678-HxCDF (1,2,3,6,7,8-Hexachlorodibenzofuran)	0,48	13	-0,60	5
		234678-HxCDF (2,3,4,6,7,8-Hexachlorodibenzofuran)	0,51	13	-0,80	5
		123789-HxCDF (1,2,3,7,8,9-Hexachlorodibenzofuran)	0,08	13	-0,35	5
		1234678-HpCDF (1,2,3,4,6,7,8-Heptachlorodibenzofuran)	0,47	13	-0,60	5
		1234789-HpCDF (1,2,3,4,7,8,9-Heptachlorodibenzofuran)	0,51	13	-0,80	5
		OCDF (Octachlorodibenzofurans)	0,51	13	-0,60	5
	Polihlorovani bifenili	PCB 77 (3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl)	0,10	13	-0,80	5
		PCB 81 (1,1'-Biphenyl, 3,4,4',5-tetrachloro-)	0,22	13	0,22	5
		PCB 126 (3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl)	0,09	13	-0,35	5
		PCB 169 (3,3',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl)	0,08	13	-0,11	5
		PCB 105 (2,3,3',4,4'-Pentachlorobiphenyl)	0,28	13	-0,60	5
		PCB 114 (1,1'-Biphenyl, 2,3,4,4',5-pentachloro-)	0,18	13	-0,56	5
		PCB 118 (2,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl)	0,36	13	-0,10	5
		PCB 123 (1,1'-Biphenyl, 2',3,4,4',5-pentachloro-)	0,27	13	-0,15	5
		PCB 156 (2,3,3',4,4',5-Hexachlorobiphenyl)	0,34	13	-0,60	5
		PCB 157 (1,1'-Biphenyl, 2,3,3',4,4',5'-hexachloro-)	0,37	13	-0,60	5
		PCB 167 (1,1'-Biphenyl, 2,3',4,4',5,5'-hexachloro-)	0,27	13	-0,80	5
		PCB 189 (1,1'-Biphenyl, 2,3,3',4,4',5,5'-heptachloro-)	0,31	13	-0,50	5
Tkivo		Teški metali	As	0,19	31	0,10
	Cd		0,16	31	-0,11	15
	Cr		0,23	31	-0,36	15
	Cu		-0,18	31	-0,50	15
	Pb		0,01	31	-0,39	15
	Hg		0,48	31	0,07	15
	Ni		-0,06	31	-0,38	15
	Zn		0,18	31	-0,31	15
	Sb		-0,34	31	-0,40	15
	Co		0,11	31	-0,56	15
	Mo		0,10	31	-0,41	15

Prilog 2

Tabela 2. Koncentracije teških metala izmerenih u tkivu jedinki *Unio* sp. i *S. woodiana* prikupljenih sa lokaliteta na reci Dunav. Koncentracije su izražene u mg/kg vlažne mase tkiva.

Lokalitet	Vrsta	As	Cd	Cr	Cu	Pb	Hg	Ni	Zn	Sb	Co	Mo
JDS3	<i>Unio</i> sp.	0,10	0,31	3,61	3,80	8,06	0,68	0,81	208,40	0,74	0,47	0,62
JDS4	<i>Unio</i> sp.	<0,01	0,23	9,50	3,98	3,17	2,19	1,43	43,60	1,01	0,15	0,34
JDS5	<i>Unio</i> sp.	<0,01	0,19	6,07	1,94	8,92	<0,01	0,90	142,60	1,25	0,31	0,25
JDS14	<i>Unio</i> sp.	<0,01	0,13	6,10	1,35	2,74	<0,01	0,78	18,60	0,82	0,10	0,10
JDS14	<i>S. woodiana</i>	0,52	0,77	2,45	2,39	1,38	<0,01	0,99	13,90	2,31	0,18	0,14
JDS15	<i>Unio</i> sp.	1,10	0,26	6,88	1,61	3,12	<0,01	1,74	44,70	0,89	0,24	0,47
JDS15	<i>S. woodiana</i>	0,29	0,06	1,63	0,88	6,73	0,05	0,44	31,70	0,97	0,05	<0,01
JDS18	<i>Unio</i> sp.	<0,01	0,23	4,59	1,41	6,71	0,12	0,81	37,30	0,60	0,15	0,15
JDS19	<i>S. woodiana</i>	0,54	0,13	6,88	1,42	3,83	0,14	1,49	26,90	0,58	0,03	0,07
JDS19	<i>Unio</i> sp.	0,31	0,15	8,12	1,90	1,42	0,18	1,47	39,10	0,42	0,17	0,39
JDS20	<i>Unio</i> sp.	1,01	0,09	0,37	3,15	1,64	<0,01	2,53	17,80	0,49	0,05	0,02
JDS22	<i>Unio</i> sp.	1,31	0,24	5,37	1,64	3,95	7,49	0,54	42,76	0,44	0,12	0,22
JDS22	<i>S. woodiana</i>	0,62	0,23	7,15	2,06	1,58	0,13	0,59	38,35	0,43	0,14	0,17
JDS23	<i>Unio</i> sp.	<0,01	0,24	1,72	1,06	21,53	1,00	0,62	7,67	0,23	0,05	0,06
JDS25	<i>Unio</i> sp.	2,04	0,21	6,53	2,07	7,46	0,52	0,71	48,07	0,74	0,06	0,14
JDS27	<i>Unio</i> sp.	1,12	0,55	3,90	2,58	3,67	0,27	0,39	146,94	0,71	0,22	0,21
JDS27	<i>S. woodiana</i>	<0,01	0,19	8,87	1,51	7,30	1,08	1,67	30,74	0,16	0,07	0,12
JDS29	<i>S. woodiana</i>	<0,01	0,06	1,68	0,48	<0,01	0,36	0,84	12,60	<0,01	0,01	<0,01
JDS30	<i>S. woodiana</i>	0,31	0,09	0,91	0,83	0,50	0,14	0,41	18,72	0,29	0,17	0,12
JDS30	<i>Unio</i> sp.	1,49	0,38	1,80	1,87	1,68	0,19	0,45	107,97	0,83	0,12	0,14
JDS31	<i>Unio</i> sp.	6,31	0,58	1,00	0,89	4,97	0,21	0,30	19,10	0,65	0,08	0,03
JDS31	<i>S. woodiana</i>	0,22	0,58	0,85	1,97	0,95	0,24	0,43	15,74	0,16	0,02	<0,01
JDS34	<i>Unio</i> sp.	6,67	2,54	3,16	2,60	3,16	0,08	0,50	59,39	0,54	0,26	0,11
JDS38	<i>Unio</i> sp.	1,05	1,13	0,77	1,48	3,52	0,13	0,88	23,02	2,45	0,34	<0,01
JDS39	<i>S. woodiana</i>	0,42	0,54	0,36	1,43	5,39	0,58	0,36	15,32	0,46	0,04	<0,01
JDS39	<i>Unio</i> sp.	0,71	0,68	0,56	1,38	2,74	<0,01	0,48	20,88	0,21	0,06	<0,01
JDS40	<i>Unio</i> sp.	1,59	1,55	1,28	1,77	8,82	0,66	0,47	109,15	0,44	0,23	<0,01
JDS42	<i>Unio</i> sp.	3,10	1,77	3,52	6,33	5,55	0,26	1,37	163,41	0,25	0,54	<0,01

Prilog 2

JDS42	<i>S.woodiana</i>	0,65	0,71	0,20	0,70	<0,01	0,69	0,34	11,08	0,74	0,03	<0,01
JDS43	<i>Unio</i> sp.	0,54	0,41	1,39	2,16	<0,01	0,11	0,30	18,72	1,09	0,08	0,08
JDS43	<i>S.woodiana</i>	<0,01	0,14	2,15	2,81	0,72	0,19	1,14	24,34	2,27	0,07	0,09
JDS45	<i>Unio</i> sp.	1,26	0,31	2,56	3,73	0,67	0,05	1,53	29,02	1,36	0,13	0,12
JDS49	<i>Unio</i> sp.	0,70	0,44	6,34	7,80	0,07	<0,01	1,05	17,58	1,74	0,15	0,15
JDS50	<i>S.woodiana</i>	<0,01	0,23	2,68	2,31	0,96	0,07	1,39	13,61	3,44	0,19	0,05
JDS51	<i>S.woodiana</i>	<0,01	0,38	1,56	6,93	7,13	<0,01	0,88	27,14	1,98	0,07	0,08
JDS51	<i>Unio</i> sp.	2,84	0,21	1,11	6,07	4,74	<0,01	0,54	22,76	3,10	0,09	0,05
JDS52	<i>S.woodiana</i>	<0,01	0,14	1,03	1,68	6,93	0,07	0,66	24,97	1,21	0,04	0,06
JDS52	<i>Unio</i> sp.	1,96	0,39	1,15	3,86	5,77	0,05	0,45	33,89	1,29	0,14	0,07
JDS53	<i>S.woodiana</i>	<0,01	0,15	0,45	1,45	8,92	<0,01	0,13	6,39	0,98	0,02	0,08
JDS59	<i>Unio</i> sp.	<0,01	0,91	1,25	1,70	4,76	<0,01	0,82	19,80	1,02	0,09	0,10
JDS60	<i>Unio</i> sp.	1,31	1,37	2,94	4,81	3,54	0,06	1,08	63,20	1,23	0,28	0,12
JDS62	<i>Unio</i> sp.	<0,01	1,06	1,08	2,04	<0,01	<0,01	0,67	22,78	1,06	0,11	0,09
JDS64	<i>Unio</i> sp.	<0,01	0,34	0,38	1,31	<0,01	0,13	0,27	13,69	0,63	0,07	0,04
JDS65	<i>Unio</i> sp.	<0,01	1,91	2,23	3,40	2,79	<0,01	1,02	59,55	0,98	0,48	0,12
JDS66	<i>Unio</i> sp.	<0,01	0,95	0,48	1,30	3,30	<0,01	0,61	10,97	0,78	0,09	0,05
JDS67	<i>Unio</i> sp.	<0,01	0,72	0,21	1,42	2,72	<0,01	0,16	8,54	0,88	0,02	0,02
JDS68	<i>Unio</i> sp.	3,70	0,29	0,83	1,32	2,46	0,25	0,30	7,81	1,02	0,08	0,03

Prilog 3 – Aktivni biomonitoring – grad Beograd

Lokalitet Duboko se nalazi uzvodno od Beograda na reci Savi (28 rkm). Ovaj lokalitet je pod uticajem otpadnih voda manjeg broja domaćinstava koja se nalaze neposredno uz samu reku. Uzvodno od ovog lokaliteta nalazi se ušće reke Kolubare (3 km) (**Slika 1**).



Slika 1. Lokalitet Duboko

Lokalitet Savski rukavac nalazi se neposredno ispod ušća reke Topčiderke u Savu. Lokalitet je pod uticajem otpadnih voda južnog dela grada Beograda. Kako je pozicioniran u rukavcu, kvalitet vode više odgovara reci Topčiderki i samoj otpadnoj vodi nego reci Savi usled ograničenog protoka (**Slika 2**).



Slika 2. Lokalitet Savski rukavac

Lokalitet Savska marina je pod uticajem otpadnih voda domaćinstava iz Novog Beograda (**Slika 3**).



Slika 3. Savska marina

Na Dunavu je odabran **lokalitet Višnjica**, pozicioniran u rukavcu Dunava kod Ade Huje. Lokalitet je pod uticajem otpadnih voda glavnog gradskog kolektora i karakteriše ga najlošiji kvalitet vode među odabranim lokalitetima. Lokalitet je od reke Dunav ograđen Adom Hujom te je uticaj otpadnih voda u samom rukavcu veoma naglašen (**Slika 4**).



Slika 4. Lokalitet Višnjica

Tabela 1. Fizičko - hemijski parametri izmereni u vodi na lokalitetima Duboko, Savska marina, Savski rukavac, Višnjica i Orešac tokom aktivnog monitoringa.

Parametar	^a Dozvoljena vrednost	Duboko		Savska marina		Savski rukavac		Višnjica		Orešac	
		15.04.	14.05.	15.04.	14.05.	15.04.	14.05.	15.04.	14.05.	24.0.	14.04.
t (C°)	/	13,4	15,8	13,6	19,1	13,4	17,2	12,9	19,6	11,6	12,5
konduktivitet	/	257	283	275	441	280	nd	430	475	420	430
Kiseonik (mg/L)	6	8,29	6,27	8,34	3,93	8,10	7,98	0,18	6,80	9,90	9,40
Kiseonik (%)	/	80,1	65,2	80,1	41,6	77,8	83,3	1,6	75,2	107,	88,0
pH	6,5-8,5	8,0	7,9	8,0	8,3	8,2	8,9	7,5	8,5	8,0	8,4
NH ₄ ⁺ (mg/L)	0,30	0,41	1,21	0,84	3,05	1,17	1,12	5,00	7,61	0,18	0,16
NO ₃ ⁻ (mg/L)	3	0,75	1,36	1,40	1,60	1,42	1,14	0,64	1,32	1,50	1,60
PO ₄ ³⁻ (mg/L)	0,1	nd	0,220	nd	1,370	nd	0,310	nd	3,080	0,06	0,045

^aPredložene maksimalne dozvoljene vrednosti preuzete od Međunarodne komisije za zaštitu reke Dunav (ICPDR, 2002) i EU directive o kvalitetu vode za kupanje 2006/7/EEC. Označene vrednosti su veće od naznačenih dozvoljenih vrednosti, nd - nije mereno

Tabela 2. Koncentracija rastvorenih teških metala i arsena izmerena u vodi na lokalitetima Orešac, Dubok, Savska marina, Savski rukavac i Višnjica.

Lokalitet	Parameter	Fe	Zn	Cu	Cr	Pb	Cd	Hg	Ni	As	
		mg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	
	Dozvoljena vrednost	0,300	5	2	2	1	0,1	0,1	1	1	
	Tokom izlaganja	0,114	8	3	<1	<1	<0,1	<0,1	<1	1	
Orešac	Tokom godine	min	0,080	4	1	<1	<1	<0,1	<0,1	<1	1
		Sred.	0,163	9,4	4,3	1,9	<1	<0,1	<0,1	<1	1,8
		max	0,398	21	10	2	<1	<0,1	<0,1	<1	4
	Tokom izlaganja	0,122	3	1	2	<1	<0,1	<0,1	<1	1	
Duboko	Tokom godine	min	0,048	1,2	1	2	<1	<0,1	<0,1	<1	1
		Sred.	0,143	2,1	2,4	2	<1	<0,1	<0,1	<1	1,4
		max	0,377	3	4	2	<1	<0,1	<0,1	<1	2
	Tokom izlaganja	0,117	7	1	2	<1	<0,1	<0,1	<1	1	
Savska marina	Tokom godine	min	0,045	0,8	1	2	<1	<0,1	<0,1	<1	1
		Sred.	0,145	11,8	3,4	2	<1	<0,1	<0,1	<1	1,7
		max	0,432	51	8	2	<1	<0,1	<0,1	<1	2
	Tokom izlaganja	0,219	16	12	2	<1	<0,1	<0,1	<1	10	
Savski rukavac	Tokom godine	min	0,081	3,8	5	2	<1	<0,1	<0,1	<1	5
		Sred.	0,169	11,2	8,5	2	<1	<0,1	<0,1	<1	7,5
		max	0,281	19	12	2	<1	<0,1	<0,1	<1	10
	Tokom izlaganja	0,140	19,2	16,6	0,6	<0,1	<0,1	0,1	2,1	1,8	
Višnjica	Tokom godine	min	0,080	11,2	7	0,5	<0,1	<0,1	0,1	1,6	1,6
		sred,	0,174	27,1	14	1,05	1,1	<0,1	0,11	4,36	2,1
		max	0,580	47,5	23,1	3,6	6,6	0,16	0,2	12,5	3,4

Predložene maksimalne dozvoljene vrednosti preuzete od Međunarodne komisije za zaštitu reke Dunav (ICPDR, 2002)

Tabela 3. Vrednosti OTM zabeležene u jedinkama *U. pictorum* i *U. tumidus* sa lokaliteta Orešac na reci Dunav pre i nakon aklimacije

Vrsta	Oštećenje DNK (OTM)	Orešac	aklimacija
<i>U. pictorum</i>	sr. vred.	1,55	0,6
	SE	0,25	0,1
<i>U. tumidus</i>	sr. vred.	1,82	0,48
	SE	0,3	0,18

Označene vrednosti su značajno niže za $p < 0,05$

Tabla 4. Uticaj zagađenja na lokalitetima Savski rukavac i Višnjica na mortalitet jedinki *U. pictorum* i *U. tumidus*

Dani izlaganja	Vrsta	Savski rukavac	Višnjica
7	<i>U. pictorum</i>	0 %	0 %
	<i>U. tumidus</i>	0 %	0 %
14	<i>U. pictorum</i>	0 %	5 %
	<i>U. tumidus</i>	5 %	5 %
30	<i>U. pictorum</i>	0 %	10 %
	<i>U. tumidus</i>	5 %	33 %

Tabela 5. Vrednosti OTM zabeležene u jedinkama *U. pictorum* i *U. tumidus* tokom 30 dana izlaganja

Vrsta	Oštećenje DNK (OTM)	7 dana				14 dana				30 dana			
		Duboko	S. marina	S. rukavac	Višnjica	Duboko	S. marina	S. rukavac	Višnjica	Duboko	S. marina	S. rukavac	Višnjica
<i>U. pictorum</i>	sr. vred.	0,27	0,53	0,73	0,65	0,20	0,25	0,83	0,99	0,58	0,42	1,31	0,82
	SE	0,03	0,08	0,07	0,05	0,03	0,04	0,05	0,07	0,14	0,05	0,09	0,10
<i>U. tumidus</i>	sr. vred.	0,37	0,63	0,80	0,99	0,47	0,46	0,84	0,36	0,43	0,42	0,37	0,79
	SE	0,04	0,11	0,06	0,10	0,05	0,04	0,07	0,04	0,13	0,05	0,04	0,09

Označene vrednosti su značajne za $p < 0,05$

Prilog 4 – *Ex situ* biomonitoring**Tabela 1.** Procenat vijabilnih hemocita u jedinkama tretiranim CdCl₂ u odnosu na kontrolne jedinke (srednja vrednost ±SD)

Tretman	Koncentracija (μM)	<i>U. tumidus</i>	<i>U. pictorum</i>
<i>In vivo</i>	4	99,4±6,7	>80
	40	95,7±5,5	>80
	100	98,5±5,1	>80
<i>In vitro</i> Sveže izolovane hemocite	4	97,2±3,7	100,1±13,5
	40	94,4±8,7	104,5±6,2
	100	97,2±1,8	85,9±10,5

Tabela 2. *In vivo* tretman CdCl₂ (4, 40 i 100 μM)

Vrsta	Oštećenje DNK (OTM)	Kontrola	4	40	100
<i>U. pictorum</i>	sr.vred.	0,49	0,27	1,02	0,91
	SE	0,07	0,07	0,08	0,11
<i>U. tumidus</i>	sr.vred.	1,52	1,65	3,27	2,64
	SE	0,18	0,20	0,33	0,26

Označene vrednosti su signifikantne za $p < 0,05$

Tabela 3. *In vitro* tretman sveže izolovanih hemocita CdCl₂ (4, 40 i 100 μM)

Vrsta	Oštećenje DNK (OTM)	Kontrola	4	40	100
<i>U. pictorum</i>	sr.vred.	2,57	1,84	3,68	3,15
	SE	0,24	0,16	0,26	0,21
<i>U. tumidus</i>	sr.vred.	3,41	2,64	10,64	11,42
	SE	0,30	0,26	0,88	0,85

Označene vrednosti su signifikantne za $p < 0,05$

Tabela 4. Procenat vijabilnih hemocita u jedinkama tretiranim 5-FU u odnosu na kontrolne jedinke (srednja vrednost \pm SD)

Tretman	Koncentracija (μ M)	<i>U. tumidus</i>	<i>U. pictorum</i>
<i>In vivo</i> Eksperiment I	4	96,6 \pm 4,7	>80
	40	96,1 \pm 3,8	>80
	100	96,1 \pm 4,8	>80
<i>In vivo</i> Eksperiment II	0,04	104,6 \pm 13,2	95,3 \pm 22,5
	0,4	105,7 \pm 20,3	82,2 \pm 18,3
	4	103,5 \pm 5,0	81,9 \pm 24,0
	40	103,7 \pm 18,3	79,5 \pm 9,0
<i>In vitro</i> Sveže izolovane hemocite	4	97,9 \pm 10,0	73,6 \pm 6,7
	40	100 \pm 3,1	69,6 \pm 2,9
	100	99,5 \pm 10,4	67,2 \pm 2,2
<i>In vitro</i> Primarna kultura	0,04	92,3 \pm 14,1	103,0 \pm 3,52
	0,4	90,3 \pm 18,0	104,2 \pm 3,7
	4	97,9 \pm 18,0	102,7 \pm 1,2
	40	100,5 \pm 4,7	106,9 \pm 5,3
	CdCl ₂ 100	117,9 \pm 16,9	100,4 \pm 7,6

Tabela 5a. *In vivo* tretman 5-FU (0,04, 0,4, 4 i 40 μ M)

Vrsta	Oštećenje DNK (OTM)	Kontrola	0,04	0,40	4	40
<i>U. pictorum</i>	sr.vred.	1,65	1,69	2,80	2,66	3,94
	SE	0,18	0,18	0,25	0,27	0,35
<i>U. tumidus</i>	sr.vred.	0,63	0,95	1,58	1,20	1,27
	SE	0,07	0,14	0,22	0,18	0,16

Označene vrednosti su značajne za $p < 0,05$

Tabela 5b. *In vivo* tretman 5-FU (4, 40 i 100 μ M)

Vrsta	Oštećenje DNK (OTM)	Kontrola	4	40	100
<i>U. pictorum</i>	sr.vred.	0,69	1,09	1,63	2,11
	SE	0,06	0,09	0,10	0,11
<i>U. tumidus</i>	sr.vred.	1,10	2,13	2,84	2,50
	SE	0,08	0,18	0,27	0,24

Označene vrednosti su značajne za $p < 0,05$

Tabela 6. *In vitro* tretman sveže izolovanih hemocita 5-FU (4, 40 i 100 μ M),

Vrsta	Oštećenje DNK (OTM)	Kontrola	4	40	100
<i>U. pictorum</i>	sr.vred.	2,89	1,92	1,58	1,92
	SE	0,29	0,20	0,15	0,18
<i>U. tumidus</i>	sr.vred.	2,87	3,28	3,12	3,52
	SE	0,36	0,48	0,35	0,40

Označene vrednosti su značajne za $p < 0,05$

Tabela 7. *In vitro* tretman u primarnoj kulturi hemocita 5-FU (0,04, 0,4, 4 i 40 μ M)

Vrsta	Oštećenje DNK (OTM)	Kontrola	0,04	0,4	4	40	CdCl ₂ 100 μ M
<i>U. pictorum</i>	sr.vred.	1,69	2,33	3,13	2,21	2,29	4,83
	SE	0,29	0,38	0,44	0,32	0,31	0,47
<i>U. tumidus</i>	sr.vred.	1,19	1,69	1,48	1,75	1,55	3,59
	SE	0,16	0,28	0,22	0,31	0,24	0,48

Označene vrednosti su značajne za $p < 0,05$

Tabela 8. Procenat vijabilnih hemocita u jedinkama tretiranim CisPt u odnosu na kontrolne jedinke (srednja vrednost \pm SD); / - nije testirano

Tretman	Koncentracija (μ M)	<i>U. tumidus</i>	<i>U. pictorum</i>
<i>In vivo</i>	0,004	>80	101,7 \pm 10,9
	0,04	>80	103,9 \pm 7,0
	0,4	>80	98,5 \pm 10,8
	4	>80	94,6 \pm 7,0
<i>In vitro</i> Sveže izolovane hemocite	0,004	102,4 \pm 9,9	/
	0,04	101,5 \pm 12,8	/
	0,4	98,8 \pm 14,5	/
	4	100,8 \pm 19,3	/
<i>In vitro</i> Primarna kultura	0,04	79,5 \pm 11,6	103,2 \pm 6,7
	0,4	105,5 \pm 5,8	115,9 \pm 11,2
	4	101,4 \pm 11,6	109,5 \pm 15,7

Tabela 9. *In vivo* tretman CisPt (0,004, 0,04, 0,4 i 4 μ M)

Vrsta	Oštećenje DNK (OTM)	Kontrola	0,004	0,04	0,40	4
<i>U. pictorum</i>	sr.vred.	3,51	4,01	4,88	5,38	5,33
	SE	0,24	0,25	0,31	0,41	0,35
<i>U. tumidus</i>	sr.vred.	1,24	1,43	1,03	1,88	1,19
	SE	0,14	0,18	0,12	0,24	0,18

Označene vrednosti su značajne za $p < 0,05$

Tabela 10. *In vitro* tretman sveže izolovanih hemocita CisPt (0,004, 0,04, 0,4 i 4 μM)

Parametar	Oštećenje DNK (OTM)	0,004	0,04	0,40	4
sr.vred.	2,68	2,70	2,45	2,73	2,04
SE	0,23	0,27	0,19	0,23	0,22

Označene vrednosti značajne za $p < 0,05$

Tabela 11. *In vitro* tretman u primarnoj kulturi hemocita CisPt (0,04, 0,4 i 4 μM)

Vrsta	Oštećenje DNK (OTM)	Kontrola	0,04	0,4	4	H ₂ O ₂ 20 μM
<i>U. pictorum</i>	sr.vred.	3,06	4,43	4,32	5,04	16,09
	SE	0,64	0,67	0,58	0,65	1,20
<i>U. tumidus</i>	sr.vred.	4,63	4,14	3,07	4,09	15,65
	SE	0,64	0,51	0,44	0,55	1,22

Označene vrednosti su značajne za $p < 0,05$

Tabela 12. Procenat vijabilnih hemocita u jedinkama tretiranim ETO u odnosu na kontrolne jedinke (srednja vrednost \pm SD); / - nije testirano

Tretman	Koncentracija (μM)	<i>U. tumidus</i>	<i>U. pictorum</i>
<i>In vivo</i>	4	100 \pm 4,5	/
	40	94,5 \pm 5,7	/
	100	91,2 \pm 7,6	/
<i>In vitro</i> Sveže izolovane hemocite	4	94,4 \pm 16,2	/
	40	100 \pm 7,4	/
	100	100 \pm 15,6	/
<i>In vitro</i> Primarna kultura	4	98,0 \pm 20,1	103,0 \pm 3,52
	40	101,1 \pm 9,2	100,0 \pm 9,9
	100	91,9 \pm 4,6	94,7 \pm 11,7
	CdCl ₂ 100	76,6 \pm 8,5	97,0 \pm 4,7

Tabela 13. *In vivo* tretman ETO (4, 40 i 100 μM)

Vrsta	Oštećenje DNK (OTM)	Kontrola	dms0 0,2 %	4	40	100
<i>U. tumidus</i>	sr.vred.	2,04	2,42	1,90	2,91	4,06
	SE	0,19	0,29	0,24	0,27	0,44

Označene vrednosti su značajne za $p < 0,05$

Tabela 14. *In vitro* tretman sveže izolovanih hemocita ETO (4, 40 i 100 μ M)

Vrsta	Oštećenje DNK (OTM)	Kontrola	dms0 0,2 %	4	40	100
<i>U. tumidus</i>	sr.vred.	1,00	1,27	1,28	1,37	1,24
	SE	0,08	0,09	0,10	0,13	0,13

Označene vrednosti su značajne za $p < 0,05$

Tabela 15. *In vitro* tretman u primarnoj kulturi hemocita ETO (4, 40 i 100 μ M),

Vrsta	Oštećenje DNK (OTM)	Kontrola	dms0	4	40	100	CdCl ₂ 100 μ M
<i>U. pictorum</i>	sr.vred.	4,76	6,54	7,84	12,61	14,36	10,73
	SE	0,72	0,83	0,81	0,76	0,78	1,38
<i>U. tumidus</i>	sr.vred.	6,26	4,80	6,83	14,12	14,28	12,65
	SE	0,79	0,72	0,90	1,36	1,02	1,44

Označene vrednosti su značajne za $p < 0,05$

Tabela 16. Procenat vijabilnih hemocita u jedinkama tretiranim VIN u odnosu na kontrolne jedinke (srednja vrednost \pm SD)

Tretman	Koncentracija (μ M)	<i>U. tumidus</i>	<i>U. pictorum</i>
<i>In vivo</i>	0,004	94,6 \pm 6,1	103,9 \pm 17,6
	0,04	96,0 \pm 1,8	106,6 \pm 10,3
	0,1	96,5 \pm 7,9	103,6 \pm 16,4
<i>In vitro</i> Sveže izolovane hemocite	0,004	100 \pm 8,2	100,1 \pm 13,5
	0,04	91,2 \pm 7,1	104,5 \pm 6,2
	0,1	92,2 \pm 6,4	85,9 \pm 10,5
<i>In vitro</i> Primarna kultura	0,004	80,7 \pm 4,7	95,1 \pm 13,5
	0,04	66,9 \pm 4,9	95,5 \pm 13,5
	0,4	75,5 \pm 12,4	98,9 \pm 4,1
	4	77,6 \pm 15,5	93,9 \pm 11,4
	CdCl ₂ 100	76,6 \pm 8,5	97,0 \pm 4,7

Tabela 17. *In vivo* tretman Vin (0,004,0,04 i 0,1 μ M)

Vrsta	Oštećenje DNK (OTM)	Kontrola	0,004	0,040	0,100
<i>U. pictorum</i>	sr.vred.	1,83	2,48	2,37	2,52
	SE	0,21	0,30	0,20	0,25
<i>U. tumidus</i>	sr.vred.	1,52	1,44	2,31	1,80
	SE	0,18	0,18	0,23	0,15

Označene vrednosti su značajne za $p < 0,05$

Tabela 18. *In vitro* tretman sveže izolovanih hemocita Vin (0,004,0,04 i 0,1 μ M)

Vrsta	Oštećenje DNK (OTM)	Kontrola	0,004	0,040	0,100
<i>U. pictorum</i>	sr.vred.	2,07	2,49	2,62	2,70
	SE	0,21	0,27	0,34	0,32
<i>U. tumidus</i>	sr.vred.	2,56	2,26	3,66	4,14
	SE	0,22	0,25	0,33	0,31

Označene vrednosti su značajne za $p < 0,05$

Tabela 19. *In vitro* tretman u primarnoj kulturi hemocita Vin (0,004,0,04, 0,4 i 4 μ M)

Vrsta	Oštećenje DNK (OTM)	Kontrola	0,004	0,04	0,4	4	CdCl ₂ 100 μ M
<i>U. pictorum</i>	sr.vred.	4,76	5,97	6,54	5,78	6,06	10,73
	SE	0,72	0,95	0,92	0,84	0,95	1,38
<i>U. tumidus</i>	sr.vred.	6,26	3,13	4,56	6,37	6,98	12,65
	SE	0,79	0,48	0,73	0,95	0,99	1,44

Označene vrednosti su značajne za $p < 0,05$

Tabela 20. Procenat vijabilnih hemocita u jedinkama tretiranim IM u odnosu na kontrolne jedinke (srednja vrednost \pm SD); / - nije rađeno

Tretman	Koncentracija (μ M)	<i>U. tumidus</i>	<i>U. pictorum</i>
<i>In vivo</i>	0,04	101,7 \pm 22,9	111,4 \pm 8,9
	0,4	94,0 \pm 15,3	102,6 \pm 28,9
	4	100,7 \pm 11,9	85,0 \pm 26,2
	40	92,0 \pm 20,2	93,8 \pm 28,6

Tabela 21. *In vivo* tretman IM (0,04, 0,4, 4 i 40 μ M)

Vrsta	Oštećenje DNK (OTM)	Kontrola	0,04	0,40	4	40
<i>U. pictorum</i>	sr.vred.	2,18	2,33	2,78	3,19	2,63
	SE	0,19	0,20	0,22	0,28	0,23
<i>U. tumidus</i>	sr.vred.	1,65	1,02	1,53	1,76	1,99
	SE	0,12	0,09	0,15	0,17	0,17

Označene vrednosti su značajne za $p < 0,05$

BIOGRAFIJA

Stoimir Kolarević je rođen 30.07.1984. godine u Sisku, Republika Hrvatska. Osnovnu školu i gimnaziju završio je u Banjoj Luci, Republika Bosna i Hercegovina. Na Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisao se školske 2002/03, a diplomirao 2009. godine. Diplomski rad pod naslovom "Antimutageni potencijal α , β tujona na 4NQO i UV indukovanu mutagenzu", uradio je na Katedri za mikrobiologiju Biološkog fakulteta pod rukovodstvom prof. dr Branke Vuković-Gačić. Nakon studija, priključio se naučno-istraživačkom radu u okviru projekata koji se realizuju na Katedri za mikrobiologiju Biološkog fakulteta kao i u izvođenje praktične nastave.

Školske 2009/10 godine upisao je doktorske studije na Biološkom fakultetu, modul Mikrobiologija, koji organizuje Katedra za mikrobiologiju. Od januara 2011. radi na istoj katedri kao istraživač-saradnik na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije br. 172058 „Biološki aktivni prirodni proizvodi kao potencijalni izvori novih lekova i dijetetskih suplemenata“. Od januara 2011. učestvuje na realizaciji projekta „Cytothreat - Fate and effects of cytostatic pharmaceuticals in the environment and identification of biomarkers for an improved risk assessment on environmental exposure“ (OP7, EU). Tokom 2013. godine učestvovao je u pripremi i izvođenju međunarodne ekspedicije „The Joint Danube Survey 3“, pri čemu je bio zadužen za mikrobiološke i genotoksikološke analize uzoraka reke Dunav. Tokom 2014. učestvuje i u izvođenju projekata „Establishing the basic microbial faecal pollution pattern along a large river: testing the longitudinal continuum vs. lateral discontinuum hypothesis at the River Danube“ (Austrijski fond za nauku) i „Globaqua - Managing the effects of multiple stressors on aquatic ecosystems under water scarcity“ (OP7, EU).

Od 2009. godine Stoimir Kolarević je član Udruženja mikrobiologa Srbije i Federation of European Microbiological Societies (FEMS), od 2010. i Društva genetičara Srbije, Srpskog biološkog društva i European Environmental Mutagen Society (EEMS), a od 2011. i Srpskog društva za zaštitu voda. Godine 2011. dobio je stipendiju EEMS-a za učešće na konferenciji „41st EEMS Annual Meeting, Spain“ (EEMS Congress Grants for Young Scientists) koji je održan u Barseloni, Španija, a 2014. godine i stipendiju Louisiana State University (SAD) za učešće na konferenciji „The Central and Eastern Europe Conference on Health and the Environment (CEECHÉ)“ koja je održana u Klužu, Rumunija. Do sada je objavio 12 naučnih radova i imao 45 saopštenja na naučnim skupovima u zemlji i inostranstvu.

Изјава о ауторству

Потписани Стоимир Коларевић
број уписа Б3002/2009

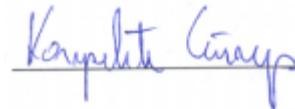
Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом
Примена комет теста на слатководним шкољкама *Unio pictorum* (Linnaeus, 1758),
Unio tumidus (Philipsson, 1788) и *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) у
екогенотоксиколошкој процени акватичних екосистема

- 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, _____



Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Стоимир Коларевић
Број уписа Б3002/2009
Студијски програм биологија
Наслов рада Примена комет теста на слатководним шкољкама *Unio pictorum* (Linnaeus, 1758), *Unio tumidus* (Philipsson, 1788) и *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) у екогенотоксиколошкој процени акватичних екосистема
Ментор Проф. др Бранка Вуковић-Гачић
Потписани Стоимир Коларевић

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, _____



Изјава о коришћењу

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

Примена комет теста на слатководним шкољкама *Unio pictorum* (Linnaeus, 1758), *Unio tumidus* (Philipsson, 1788) и *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) у екогенотоксиколошкој процени акватичних екосистема

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).

У Београду, _____

Потпис докторанда



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.