

ANALIZA PREKIDA I GAPOVA NA HROMOZOMIMA RIBA VRSTA *STIZOSTEDION VOLGENSE* G. I *ALBURNUS ALBURNUS* L. KAO INDIKATOR PRISUSTVA GENOTOKSIČNIH AGENASA U VODENOJ ŽIVOTNOJ SREDINI

SVETLANA FIŠTER

*Fakultet za ekologiju i zaštitu životne sredine Univerziteta Union, Cara Dušana 62-64,
11000 Beograd, e-mail: Svetlanafister@yahoo.com*

CHROMOSOME BREAKS AND GAPS ANALYSIS IN FISH SPECIES *STIYOSTEDION VOLGENSE* G. AND *ALBURNUS ALBURNUS* L. AS AN INDICATOR OF PRESENCE OF GENOTOXIC AGENTS IN THE WATER ECOSYSTEMS

Abstract

The analyses of the frequencies of chromosome breaks and gaps on the *Stizostedion volgensis* G. and *Alburnus alburnus* L. individuals from different localities, in two consecutive years, were showed the highest values, that were above the level of "spontaneous" (under the level of 3 %) changes. The frequencies of changes in fish species *Stizostedion volgensis* were higher than the level of the presumed critical zone (3.0 – 3.5 %) at the localities of Danube by Višnjica and Grocka, i.e. these localities had a risk of being permanent or periodical contaminated with genotoxic agents. Similar results were obtained for fish species *Alburnus alburnus* from the water of some of examined localities. The high levels of chromosomal changes in this fish were detected in river Kolubara by Obrenovac and of the river Sava, especially near its mouth, at the localities of Danube by Višnjica and Grocka, and in the river Tamiš by Pancevo. These localities obviously also had a risk of being permanent or periodical contaminated with genotoxic agents.

Key words: *fish chromosomes, breaks and gaps, genotoxicity, Stiyostedion volgensis* G., *Alburnus alburnus* L.

UVOD

Poznato je da različite hemijski agensi kao i izvori zračenja mogu dovesti do oštećenja naslednih struktura. Ovi agensi su prisutni u životnom okruženju najčešće kao posledica antropogenog zagađenja i mogu poticati iz različitih izvora i delovati na nasledni materijal na različite načine, pa stoga nose opšti naziv – genotoksični agensi, čime su obuhvaćene i kancerogene materije koje mogu dovesti do malignih oboljenja. Povišena učestalost hromozomskih oštećenja, numeričkih i strukturnih aberacija hromozoma, koristan je pokazatelj njihovog delovanja (L i l p i K o r o g o d i n a, 1981; B r o g g e r, 1982; F i š t e r i s a r. 1987; Z i m o n j i ć i s a r. 1990; F i š t e r, 1992; S o l d a t o v i ć i s a r. 1994; F i š t e r i s a r. 2004). Promene strukturnog tipa koje se najčešće uočavaju na hromozomima su prekidi i gapovi i određivanje njihove učestalosti koristi se u različitim laboratorijskom testovima za kvalifikovanje materija koje su rizične za ljudsku upotrebu (P r e s t o n, 1981), kao i za organizme u prirodi. Pored organizama koji se uobičajeno koriste za laboratorijska ispitivanja kao što su sojevi laboratorijskih miševa i pacova (S o l d a t o v i ć i s a r. 1994; F i š t e r, 1992, 2000a, F i š t e r i s a r. 2004; 2006), u ovim eksperimentima su ponekad korišćene i ribe (A l i n k i s a r. 1980). Istraživanja u prirodi – slobodnim uslovima, takođe su najčešće vršena na miševima i drugim sitnim sisarima, ali i drugim organizmima kao što su vodozemci i ribe (F i š t e r, 1992, 1987, 1997, 1998, 1999, 2000a, 2000b, 2002, 2003, 2005; F i š t e r i s a r. 1994, 1996, 1999), najčešće u oblastima sa izraženim antropogenim zagađenjem, kao što su industrijske zone, zone odlaganja otpada i otpadnih voda, ratom zahvaćene zone – sa prisustvom osiromašenog uranijuma (B o ž i ć i s a r. 2004) i slično. Ispitivanja su takođe vršena i u oblastima relativno čistih prirodnih sredina, udaljenih od ljudskih naselja i industrijskih postrojenja. Tako su citogenetički analizirane ribe: pastrmke iz reke Studenice (F i š t e r, 1998), ali i druge vrste, kao što su potočne mreke iz reke Vape sa Pešterske Visoravni (F i š t e r i s a r. 1999) i pastrmke sa izvora reke Vardara, kod Gostivara, na ribnjacima Vrutok i Banjica u Makedoniji (S t e v a n o v s k i, 1998). Istraživanja na ribama iz čistih voda su pokazala da učestalost gapova i prekida nikada nije bila iznad 2,5 %. Ona su korisno poslužila za poređenja i za postavljanje kriterijuma (kritična zona – između 3-3,5%) za procenu genetičkog rizika, kao i za razmatranje dobijenih rezultata.

Cilj ovog rada je bio da se prikažu rezultati ispitivanja riba iz reke Save, Kolubare, Dunava i Tamiša, koje su hvatane na lokalitetima poznatim po prisustvu povećanog opšteg zagađenja, radi procene mogućeg rizika od prisustva genotoksičnih agenasa.

MATERIJAL I METODE

Primeri riba prikupljeni su tokom dve uzastopne godine (1986, 1987) sa različitih lokaliteta i to: smuđ kamenjar – *Stizostedion volgense* sa lokaliteta Dunava kod Beške, Slankamena, Zemuna, Višnjice i Grocke; uklija – *Alburnus alburnus* lovljena je u Kolubari kod Obrenovca, Savi kod termoelektrane “Nikola Tesla” B i na ušću Save kod Beograda, kao i u Dunavu kod Višnjice i Grocke i u Tamišu kod Pančeva.

Metafazne figure hromozoma pogodne za citogenetičku analizu dobijene su preparacijom iz tkiva bubrega, prema metodi F o n t a n a i s a r. (1970). Analizirano je najmanje 30 metafaznih figura kod svake jedinke (najčešće 30 – 40), kod najmanje šest jedinki istovremeno uhvaćenih na jednom lokalitetu (najčešće 6 – 12) primeraka riba. Utvrđivan je broj prekida i gapova na hromozomima ovih riba, a dobijeni rezultati su analizirani primenom statističkih metoda.

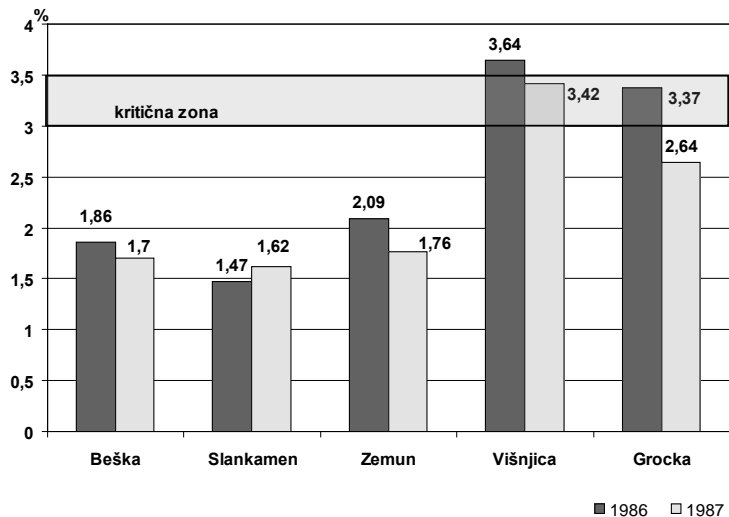
REZULTATI I DISKUSIJA

Rezultati citogenetičke analize metafaznih hromozoma smuđa, prikazani su na Tabeli 1 i Grafikonu 1.

Tabela 1. Učestalost prekida i gapova kod smuđa – *Stizostedion volgense*, G.

Reka Dunav Lokalitet	Godina	Broj jedinki	Ukupno mitoza	Ukupno prekida i gapova	Prekida i gapova %
Beška	1986	6	161	3	1,86
	1987	7	235	4	1,70
Slankamen	1986	8	272	4	1,47
	1987	9	307	5	1,62
Zemun	1986	7	239	5	2,09
	1987	6	226	4	1,76
Višnjica	1986	10	357	13	3,64
	1987	12	409	14	3,42
Grocka	1986	8	267	9	3,37
	1987	9	340	9	2,64

Neke od dobijenih vrednosti za učestalost prekida i gapova ulaze u oblast kritične zone (3-5% promena), dok neke prevazilaze njen nivo. Najviša zabeležena vrednost iznosila je 3,64 % i zabeležena je kod ovih riba na lokalitetu Višnjice 1986 godine. I sledeće godine, vrednost ovih promena na istom lokalitetu je vrlo visoka i iznosi 3,42 % , odnosno nalazi se u okvirima kritične zone. Lokalitet Dunava kod Višnjice je ujedno jedini gde je u obe godine, zabeležen izuzetno visok nivo promena kod ove vrste i pokazuje visoko statistički značajne razlike u odnosu na sve ostale ispitane lokalitete. Ove razlike su manje samo u odnosu na lokalitet Grocke gde je 1986 godine takođe zabeležena visoka vrednost (3,37 % promena), koja ulazi u okvire kritične zone . Iako su ispod nivoa kritične zone, vrednosti za prekide i gapove zabeležene na ostalim lokalitetima više su u 1986 –oj, nego u sledećoj godini (Tabela 2 i Grafikon 1).



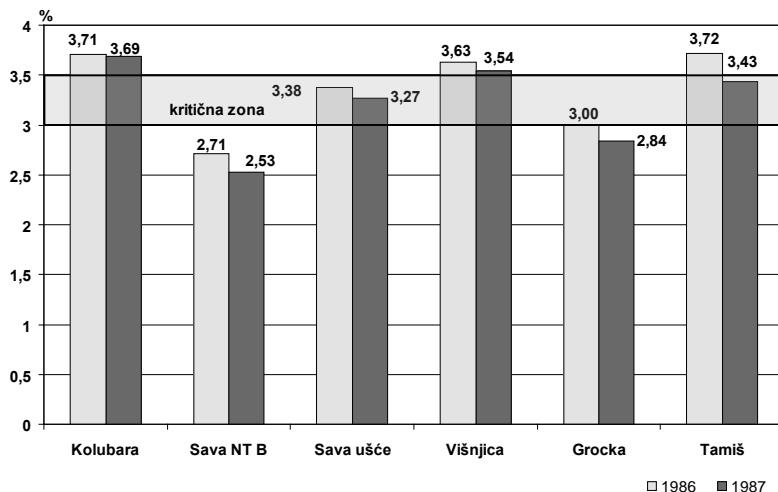
Grafikon 1. Učestalost prekida i gapova kod riba vrste *Stizostedion volgense* G. sa različitih lokaliteta Dunava u odnosu na pretpostavljenu kritičnu zonu (3-3,5 % promena).

Rezultati dobijeni citogenetičkom analizom primeraka uhvaćenih uklija – *Alburnus alburnus*, prikazani su na Tabeli 2 i Grafikonu 2.

Tabela 2. Učestalost prekida i gapova kod uklije – *Alburnus alburnus* L.

Lokalitet	Godina	Broj jedinki	Ukupno mitoza	Ukupno prekida i gapova	Prekida i gapova %
Kolubara - Obrenovac	1986	9	323	12	3,71
	1987	11	433	16	3,69
Sava "NT" B	1986	6	221	6	2,71
	1987	7	276	7	2,53
Sava – ušće	1986	9	325	11	3,38
	1987	8	275	9	3,27
Višnjica	1986	14	468	17	3,63
	1987	10	367	13	3,54
Grocka	1986	8	300	9	3,00
	1987	10	352	10	2,84
Tamiš	1986	12	430	16	3,72
	1987	10	320	11	3,43

Vrlo visok nivo promena na hromozomima ovih riba vidi se (Tabela 2, Grafikon 2), na skoro svim ispitivanim lokalitetima i to u obe godine kada su istraživanja vršena. Najviša vrednosti zabeležen je u Tamišu kada je iznosila čak 3,72 %; takođe u Kolubari: 1986, kada je bila 3,71 % i sledeće godine, kada je bila nešto niža 3,69 %. Sve vrednosti prelaze nivo kritične zone (3-3,5%) i ukazuju da je u vodi ovih reka, u periodu kada su istraživanja vršena, bilo genotoksičnih agenasa. Takođe, pri poređenju ovih lokaliteta sa lokalitetima Save kod termoelektrane "Nikola Tesla" B i lokalitetima Dunava kod Slankamena i pa i Grocke (gde je učestalost promena bila niža) javljaju se značajne statističke razlike. Statističke razlike se ne javljaju poređenjem lokaliteta Kolubare sa lokalitetom Tamiša kod Pančeva, gde su takođe utvrđene vrlo visoke vrednosti za učestalost prekida i gapova, od kojih jedna prelazi nivo kritične zone (3,72 %), dok je druga unutar nje (3,43 %). Kod Višnjice, takođe, obe vrednosti, prelaze nivo kritične zone (3,63 %, 3,54 %), te nema visoko značajnih statističkih razlika u odnosu na Kolubaru i Tamiš.



Grafikon 2. Učestalost prekida i gapova kod riba vrste *Alburnus alburnus* L. sa različitih lokaliteta reka: Kolubare, Save, Dunava i Tamiša u odnosu na pretpostavljenu kritičnu zonu (3-3,5 % promena).

Ispitivanja obe vrste riba su pokazala visoke vrednosti na lokalitetu Dunava kod Višnjice, što ukazuje na povremeno, ili stalno prisustvo genotoksičnih agenasa. Na lokalitetu Dunava kod Grocke, zabeležena je visoka vrednost u 1986 godini, kod obe vrste riba: 3 % kod uklije i 3,37 % kod smuđa, dok su u sledećoj godini, obe vrednosti bile ispod nivoa kritične zone. Generalno, više vrednosti promena ustanovljene su u prvoj godini kada su istraživanja vršena, pri čemu treba imati u vidu, da su ribe lovljene u maju mesecu 1986, kada se desio akcident u Černobilu. S obzirom na dobijene rezultate, ipak smatramo da je mogući uticaj ovog događaja od manjeg značaja od prisustva opšteg zagađenja hemijskim materijama, jer su rezultati ispitivanja, koji su kod nekih vrsta riba vršena i tri uzastopne godine (F i š t e r, 1992, 1998, 1999, 2000a, 2000b, 2002, 2003, 2005; F i š t e r i sar. 1994, 1996, 1997 1998, 1999) pokazali male razlike u odnosu na pojedine lokalitete.

Rezultati koji pokazuju povišenu učestalost prekida i gapova dobijeni su kod riba sa lokaliteta Kolubare, reke Save kod njenog ušća, Dunava kod Višnjice i Tamiša, u obe godine kada su istraživanja vršena, što ukazuje na moguć genetički rizik od povremenog ili stalnog prisustva genotoksičnih agenasa na ovim ispitivanim lokalitetima.

LITERATURA

Alink, G. M., Frederix-Wolters, E. M. H., Van der Gaag, M. A., Van der Kerkoff, J. F., Poels, C. L. M. (1980). Induction of sister-chromatid exchanges in fish exposed to Rhine water. *Mutation Research*, 78, 369-374.

Božić, T., Stevanović, J., Popović, D., Vlaski, M., Fišter Svetlana, Kovačević-Filipović, M. (2004). Possible health effects of depleted uranium (DU): examination of peripheral blood of ruminants in exposed areas. 22nd Meeting of the European Society of Veterinary pathology; 6th Meeting of the European Society of Veterinary Clinical Pathology/European College of veterinary Clinical Pathology and Continuing Education Day. Olsztyn – Poland, 15-18 September, 2004., p. 56.

Brogger, A. (1982). The chromatid gap – a useful parameter in genotoxicology? *Cytogenetics and Cell Genetics*, 33, 14-19.

Fišter, S. (1992). “Genetičko-populaciona analiza nekih vrsta riba familije *Cypriniidae*”. Doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Fišter, S. (1997). Učestalost strukturnih promena hromozoma riba iz reke Studenice. U: *Sanacija i zaštita reke Studenice*. Ministarstvo za ekologiju Srbije.

Fišter, S. (1998). Efekti zagađivanja nastalog kao posledica eksploatacije na prostoru rudnika bakra Majdanpek – na hromozomima nekih organizama terestričnog i akvatičnog ekosistema. U: *Ekspertna studija uticaja i posledica eksploatacije na činioce životne sredine na prostoru Rudnika bakra Majdanpek*. Ministarstvo za ekologiju Srbije.

Fišter, S. (1999). Učestalost promena tipa prekida i gapa na hromozomima riba vrste *Carassius auratus gibelio* Bloch, kao pokazatelj prisustva eventualnog zagađenja genotoksičnim agensima. *Veterinarski Glasnik*, 53, 159-171.

Fišter, S. (2000a). Efekti mebendazola na hromozomima sisara u in vivo i in vitro test-sistemu. Zbornik radova Drugog savetovanja iz kliničke patologije i terapije životinja, Budva, 12.-16.06.2000, ss. 298-305.

Fišter S. (2000b). Analiza kariotipa i učestalost strukturnih promena tipa prekida i gapa kod riba vrste *Scardinius erythrophthalmus* L. *Veterinarski Glasnik*, 54, 107-116.

Fišter S. (2002). Efekti zagađenja genotoksičnim agensima na hromozomima tri vrste riba – šarana (*Cyprinus carpio* L.), srebrnog karaša (*Carassius auratus gibelio* B.) i crvenperke (*Scardinius erythrophthalmus* L.) sa nekih lokaliteta Vojvodine. Zbornik radova XIII Savetovanja o dezinfekciji, dezinsekciji i deratizaciji i zaštiti životne sredine – sa međunarodnim učešćem, Kikinda, 29.05.-01.06.2002. ss. 251-260.

Fišter, S. (2003). Učestalost prekida i gapova na hromozomima šarana – *Cyprinus carpio*, L. *Veterinarski Glasnik*, 57, (7-8), 393-403.

Fišter, S. (2005). Povišena učestalost gapova i prekida hromozoma riba kao pokazatelj prisustva genotoksičnih agenasa u vodenoj životnoj sredini. *Ribarstvo* (II međunarodna konferencija, 10-11.02.2005, Beograd, Poljoprivredni fakultet i Akvaforsk Institute of Aquaculture Research AS, Norway) ss. 135-144.

Fišter, S., Soldatović, B., Živković, S. (1987). The effects of tetramisole chloride on murine bone marrow cells and human lymphocyte chromosomes. *Acta Veterinaria*, 37, 41-46.

Fišter, S., Marković, M., Soldatović, B. (1994). Frequency of gap and break type changes on the chromosomes of the fish *Perca fluviatilis* caught at some localities of Danube. *Acta Veterinaria*, 44, 37-44.

Fišter, S., Soldatović, B., Cakić, P. (1996). Karyotype analysis of the fish species *Stizostedion volgensis* (Percidae, Pisces) caught at different localities on the Danube. *Acta Veterinaria*, 46, 359-366.

Fišter, S., Cakić, P., Đorđević, M. (1997). Frequency of gap and break type changes on the chromosomes of the fish species *Esox lucius* (Esocidae) caught at some localities on the Danube and Sava.– International Arbeitsgemeinschaft Donauforschung der Societas Internationalis Limnologiae. 01.-05.09.1997., Wien. Österreich, pp. 367-371.

Fišter, S., Cakić, P., Kataranovski, D. (1999). Karyotype analysis of *Barbus barbus* L. and *Barbus peloponnensis* V. (Cyprinidae) and frequencies of breaks and gap type structural chromosome changes in fish from the river Vapa. *Acta Veterinaria*, 49, 385-392.

Fišter, S., Jović, S., Stevanović, J., Kovačević-Filipović, M. (2004). Citogenetička analiza ćelija kostne srži pacova tretiranih toluenom. *Veterinarski Glasnik*, 58, 311-318

Fišter, S., Milovanović, M., Jezdimirović, M. (2006). Effects of Flunixin Meglumine on bone marrow cell chromosomes of BALB/C mice. Book of abstracts (15), *Clinica Veterinaria*, [elektronski zapis, ISBN 9958-599-20-1 COBISS.BH-ID 15029766], Bosna i Hercegovina, 26-30. Juni 2006. Neum

Fontana, F. B., Chiarelli, Rosi, A. (1970). Il cariotipo di alcune species di Cyprinidae, Centrarchidae, Ccaracidae. Studiale mediante colture in vivo. *Caryologia*, 23, 549-564.

Lilp, J. G., Korogodina, Yu. V. (1981). Spontaneous and induced chromosome aberrations in bone marrow cells of mice of different strain and age. *Cytologia (USSR)* XXIII, No. 10, 1174-1179.

Preston, J. R., Williom, A., Bender, A. M., Breven, I. G., Carrano, A. V., Heddle, J. A., McFee, A. F., Wolff, S., Wassom, J. S. (1981). Mammalian in vivo and in vitro cytogenetic assays. A report of U S E EPAs Gene-Tox Program. *Mutation Research*, 87, 143-188.

Soldatović, B., Fišter, S., Milčić, D., Stanimirović, Z. (1994). Cytogenetical analysis of the effects of Urotovet® on the chromosomes of mammals in vivo. *Acta Veterinaria*, 44, 345-350.

Stevanovski, V. (2000). Citogenetičke, morfometrijske i proizvodne karakteristike proizvodne forme dužičaste pastrmke *Oncorhynchus mykiss* Walbaum dobijene u makedoniji. Doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Zimonjić, D., Savković, N., Anđelković, M. (1990). Genotoksični agensi. Naučna Knjiga, Beograd.