

# Laboratorija za ekotoksikologiju LECOTOX



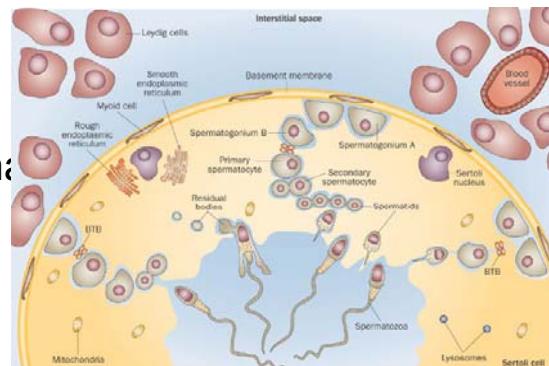
**Reproaktivna i  
molekularna  
toksikologija**

**Ćelijski markeri  
toksičnosti u  
ekofiziološkim/ekotoksik  
ološkim istraživanjima**

# KSENOBITICI-REPRODUKTIVNI ĆELIJE (FP7 EcoSignal)

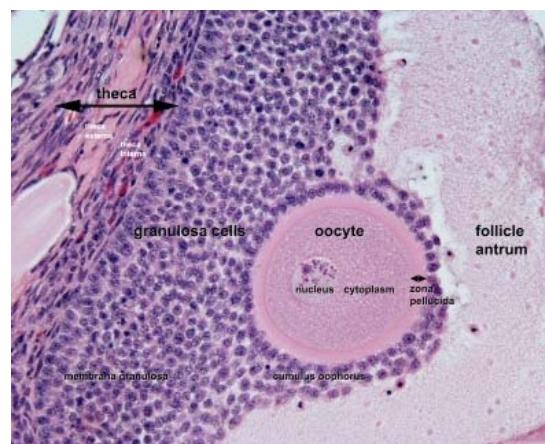
## Granuloza ćelije pacova

- izolovane iz ovarijuma ženke pacova
- ćelije koje okružuju oocitu
- osnovna uloga: produkcija estradiola i progesterona
- omogućavaju normalan razvoj oocite i ovulaciju



## Lajdigove ćelije pacova

- izolovane iz testisa mužjaka pacova
- osnovna uloga: produkcija testosterona



## Humane granuloza ćelije

- dobijene nakon postupka vantelesne oplodnje



# Koje supstance trenutno ispitujemo?

## Bisfenol A (BPA)

- ✓ koristi se u proizvodnji polikarbonatnih plastičnih masa i epoksidnih smola



## Atrazin

- ✓ jedan od najčešće korišćenih pesticida

## Uzorci otpadnih voda

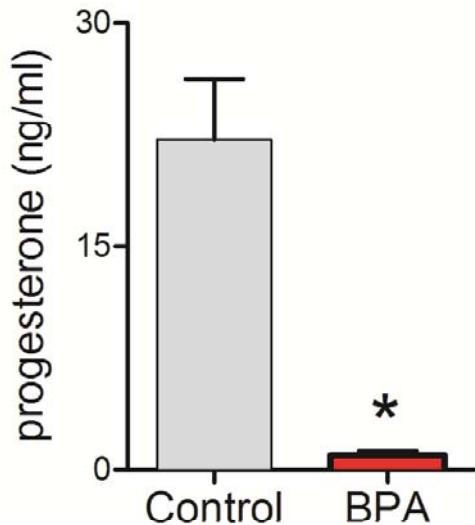
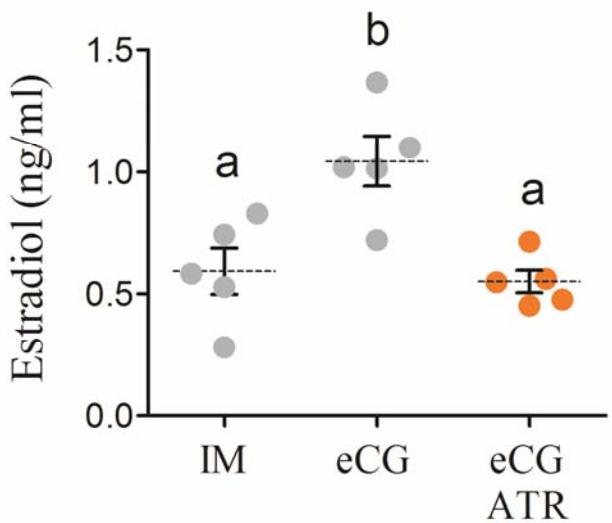
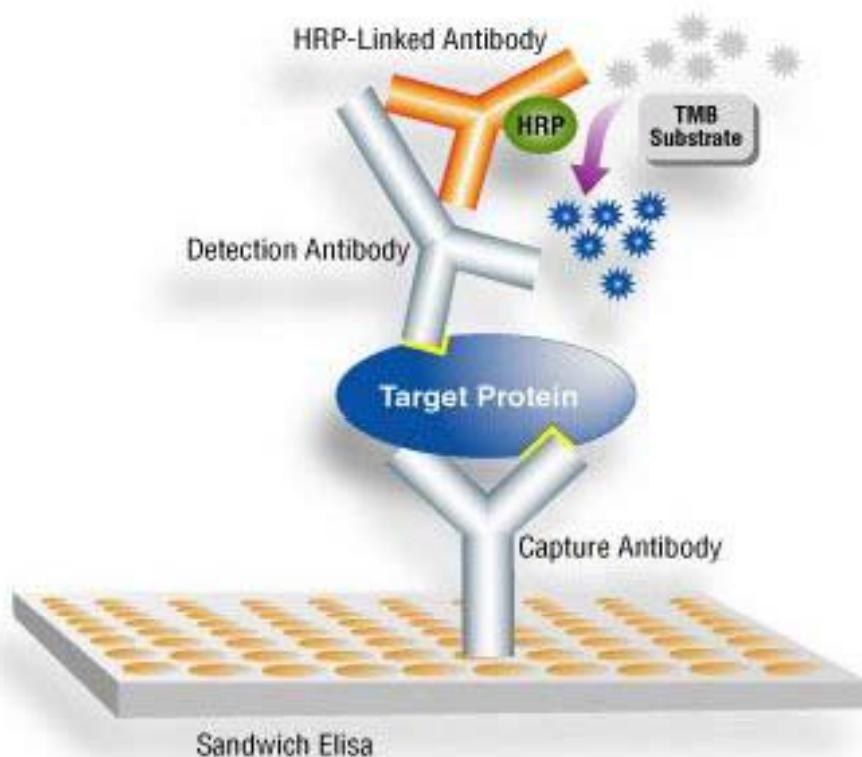
- ✓ uzorkovanje izvršeno sa jednog od dva najveća ispusta kanalizacije u Novom Sadu, GC2



**Ksenobiotici sa hormonskom aktivnošu (endokrini ometači)** - jedinjenja iz spoljašnje sredine koja remete funkciju prirodnih hormona

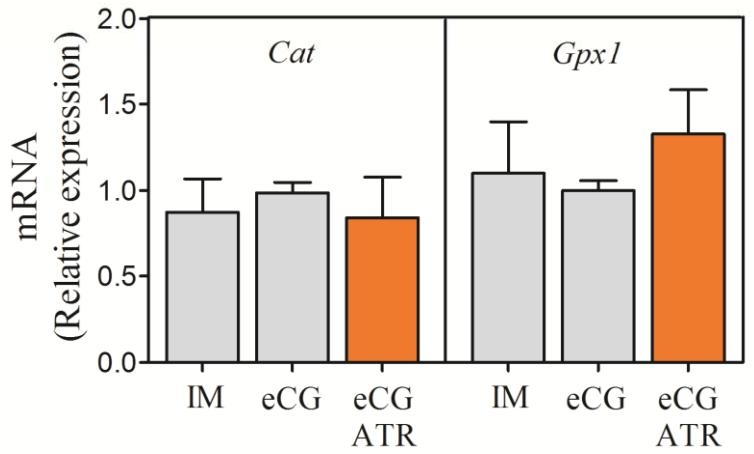
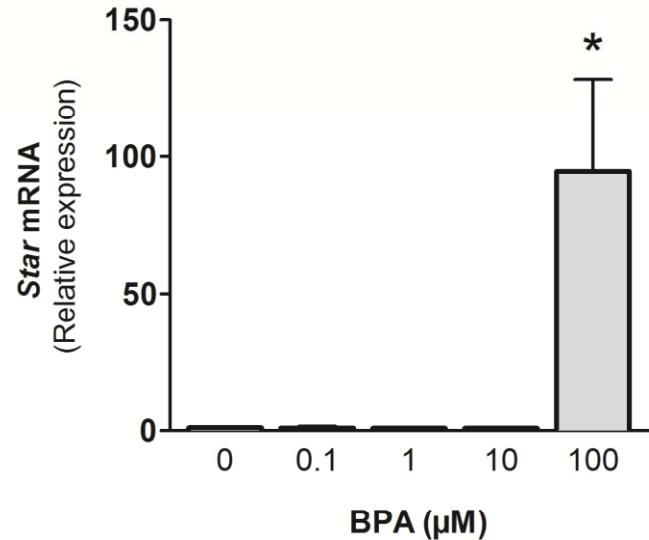
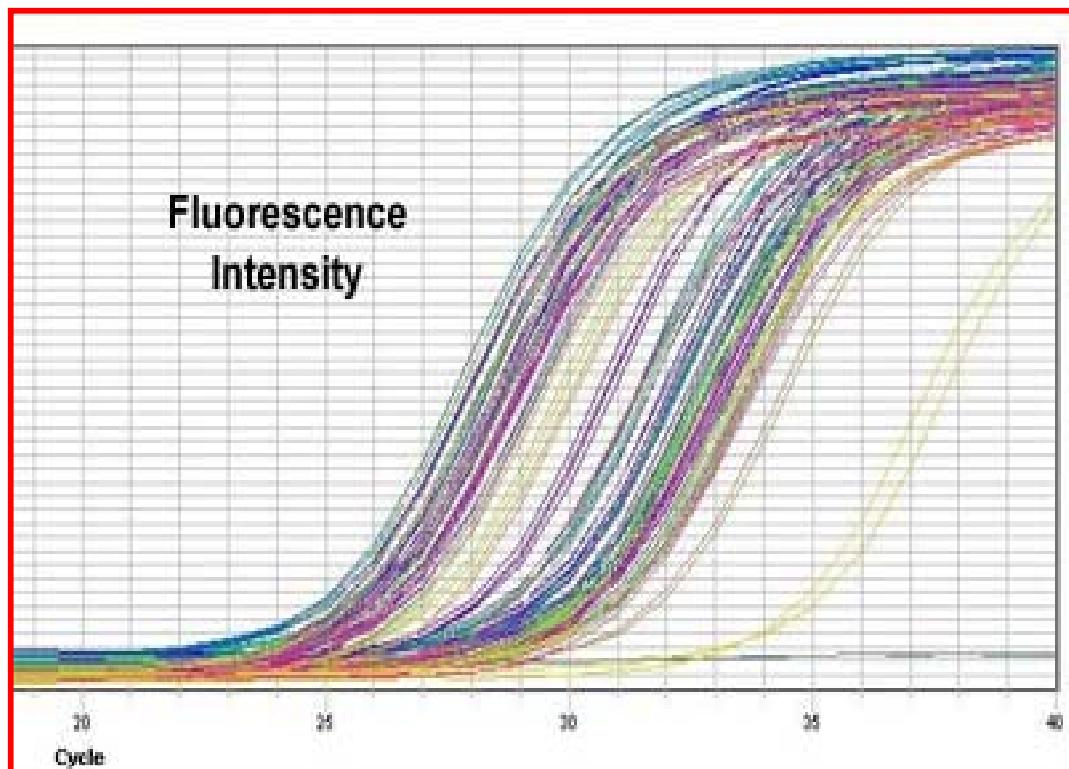
# Imunoeseji – RIA i ELISA

-za određivanje nivoa hormona i cAMP-a produkovanih od strane Lajdigovih/granulozaćelija



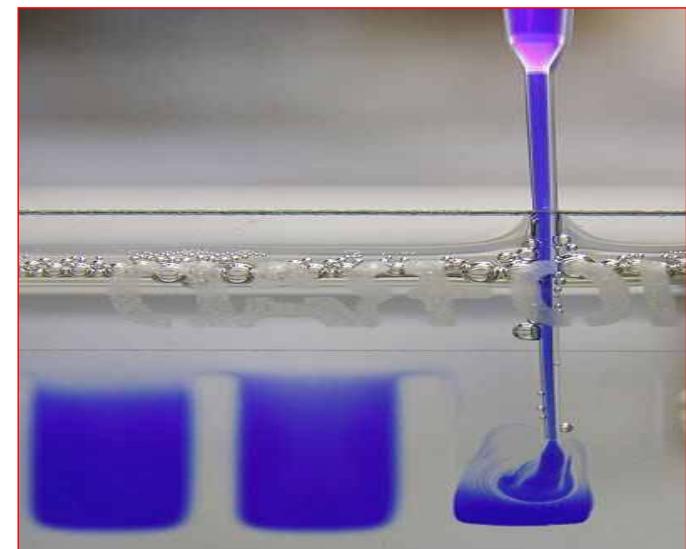
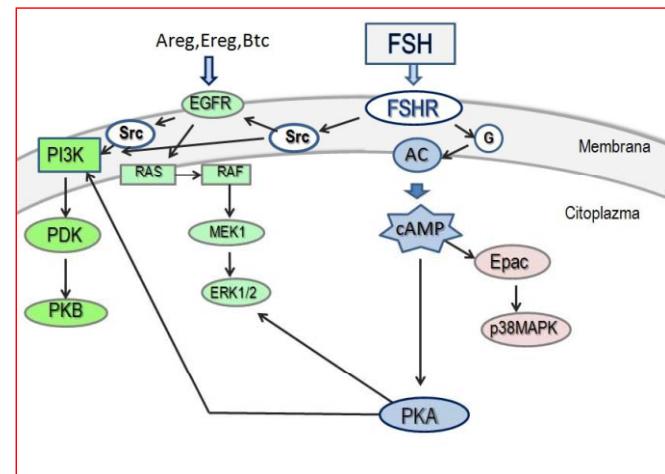
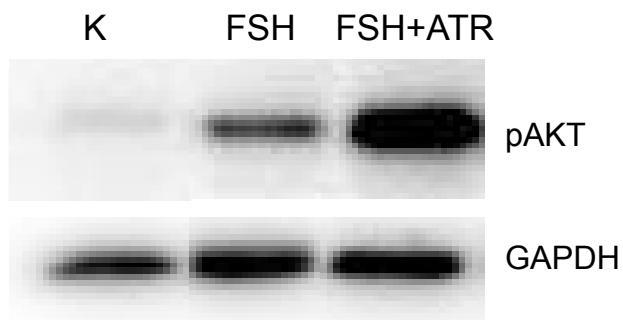
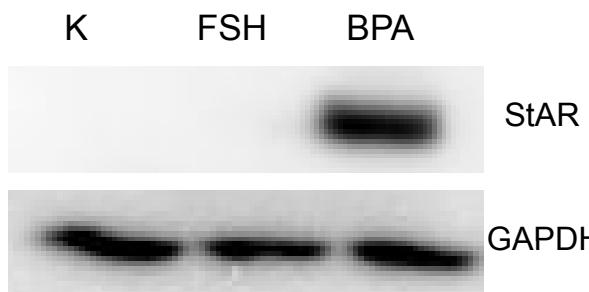
# qRT-PCR – quantitative real-time PCR

-za analizu genske ekspresije – komponente steroidogene mašinerije, regulacija ćelijske proliferacije, apoptoze, antioksidativni enzimi, geni uključeni u proces ovulacije...



# WESTERN BLOTTING

- za analizu ekspresije proteina – komponenata najvažnijih signalnih puteva i transkripcionih faktora i drugih proteina koji regulišu funkciju steroidogenih ćelija testisa i ovarijuma



# Signalni putevi i mehanizme delovanja ksenobioitka

Swiss National Science Foundation [grant number SCOPES-IZ73Z0\_152743/1]

Partner: Department for Environmental Toxicology, Eawag

Ispitivanje aktivnosti ERK1/2 signalnih puteva:

*ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay*



Tributiltin



Bisfenol A



Benzo[a]piren



Atrazin

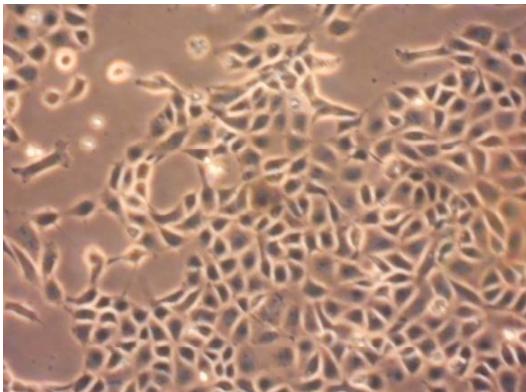
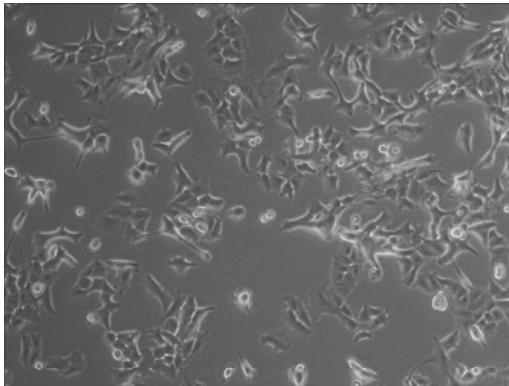


Ibuprofen

# Kontinualne ćeljske linije

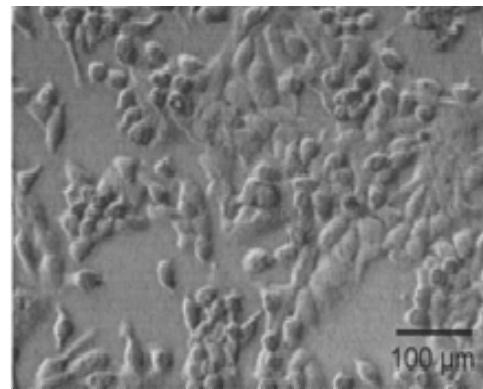
Riblje ćeljske linije      Humane ćeljske linije

Hep G2 – hepatoma ćelije



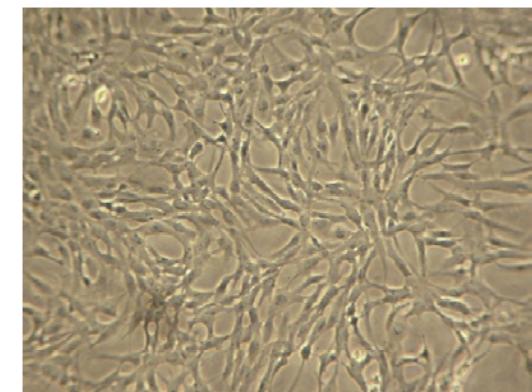
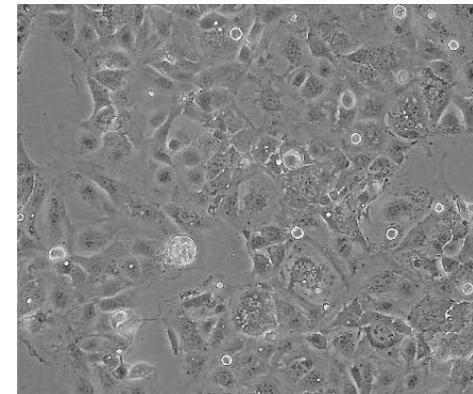
ZFL – ćelije jetre

Caco-2 – ćelije kolona



RTgutGC – ćelije creva

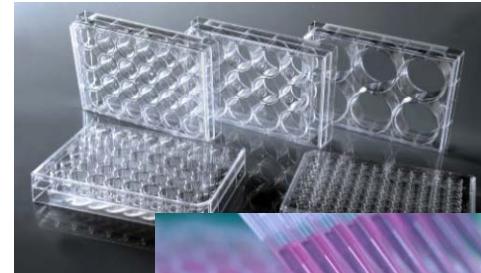
A549 – plućne ćelije



Rtgill-W1 – ćelije škrga

# Kontinualne ćelijske linije

Ćelije sa neograničenim kapacitetom proliferacije, tzv. „besmrtnе ćelije“!



Kontrolisani i sterilni uslovi

„Banke ćelija“ – veliki izbor dobro okarakterisanih ćelijskih linija

# ZEBRICE (*Danio rerio*)

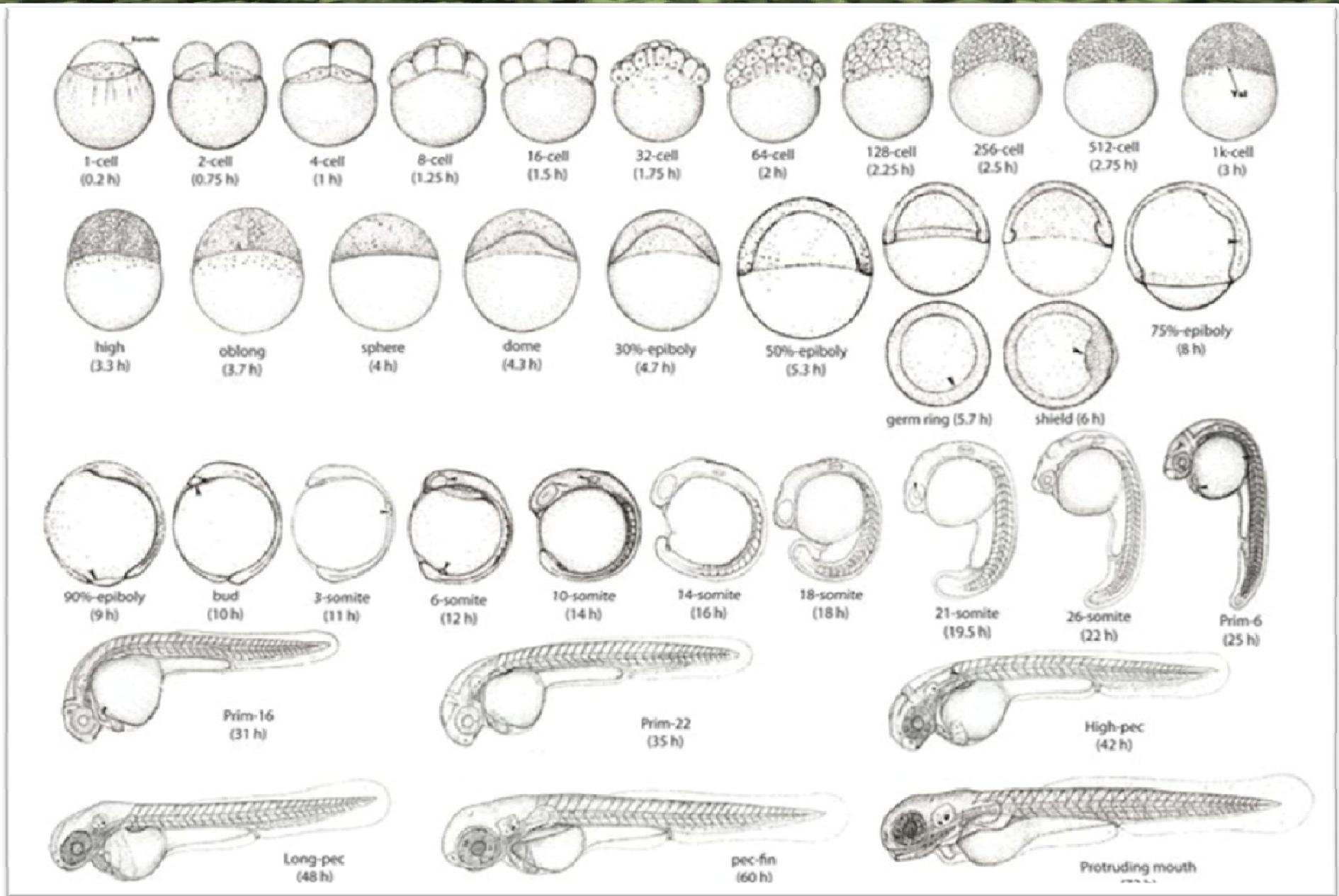
Embrioni zebrica kao model organizam u  
toksikološkim ispitivanjima promene  
ekspresije gena i signalnih puteva

# Gajilište zebričica na DBE PMF UNS



# Morfološke karakteristike

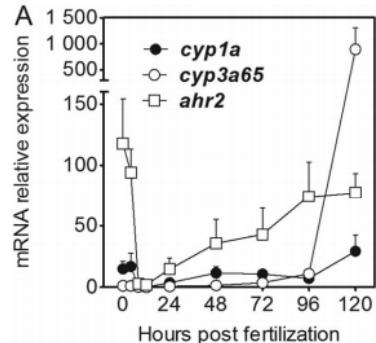
Kimmel, 1995



# Genska ekspresija

## Bazalna ekspresija

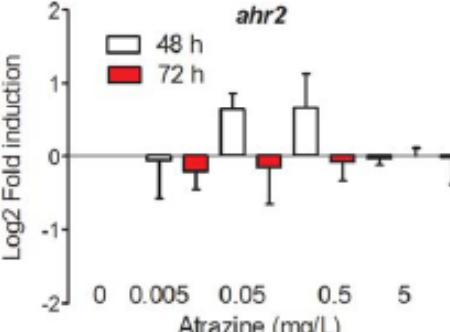
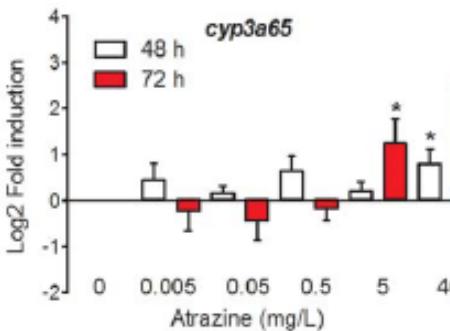
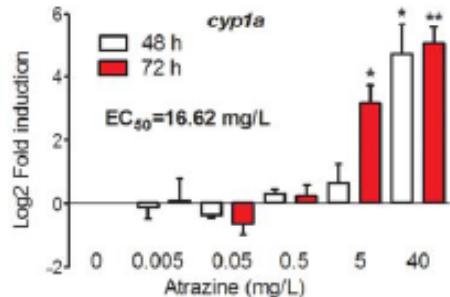
6 GLISIC ET AL.



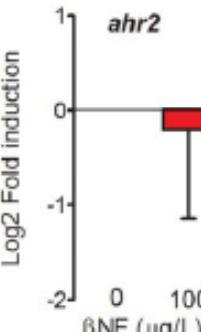
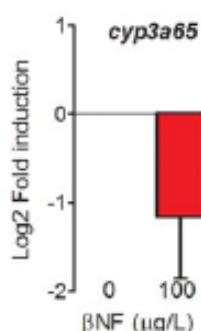
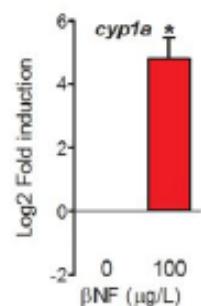
qRT-PCR  
(quantitative  
real-time PCR)

## Uticaj atrazina na ekspresiju gena

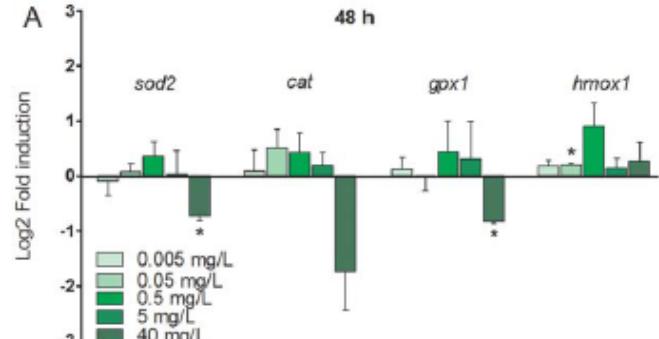
A



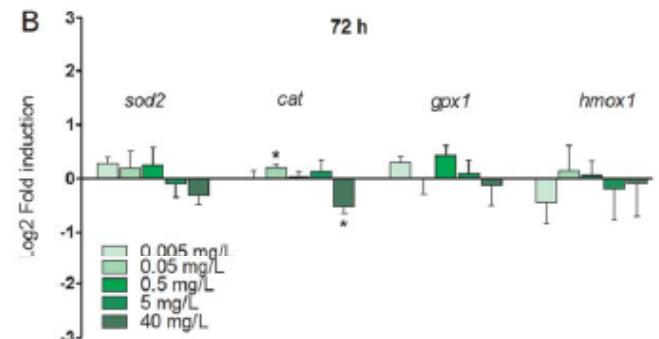
B



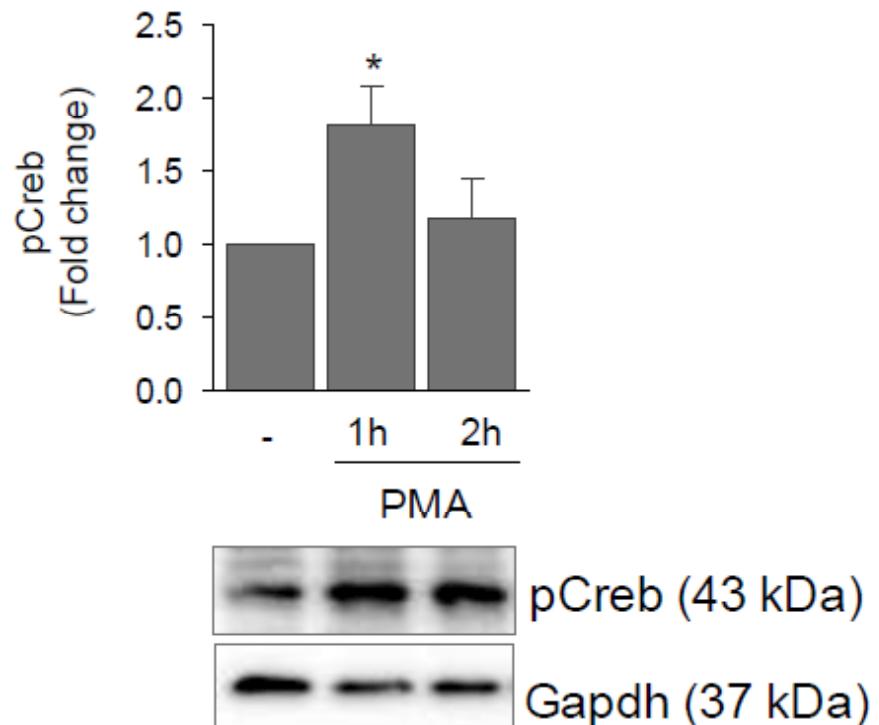
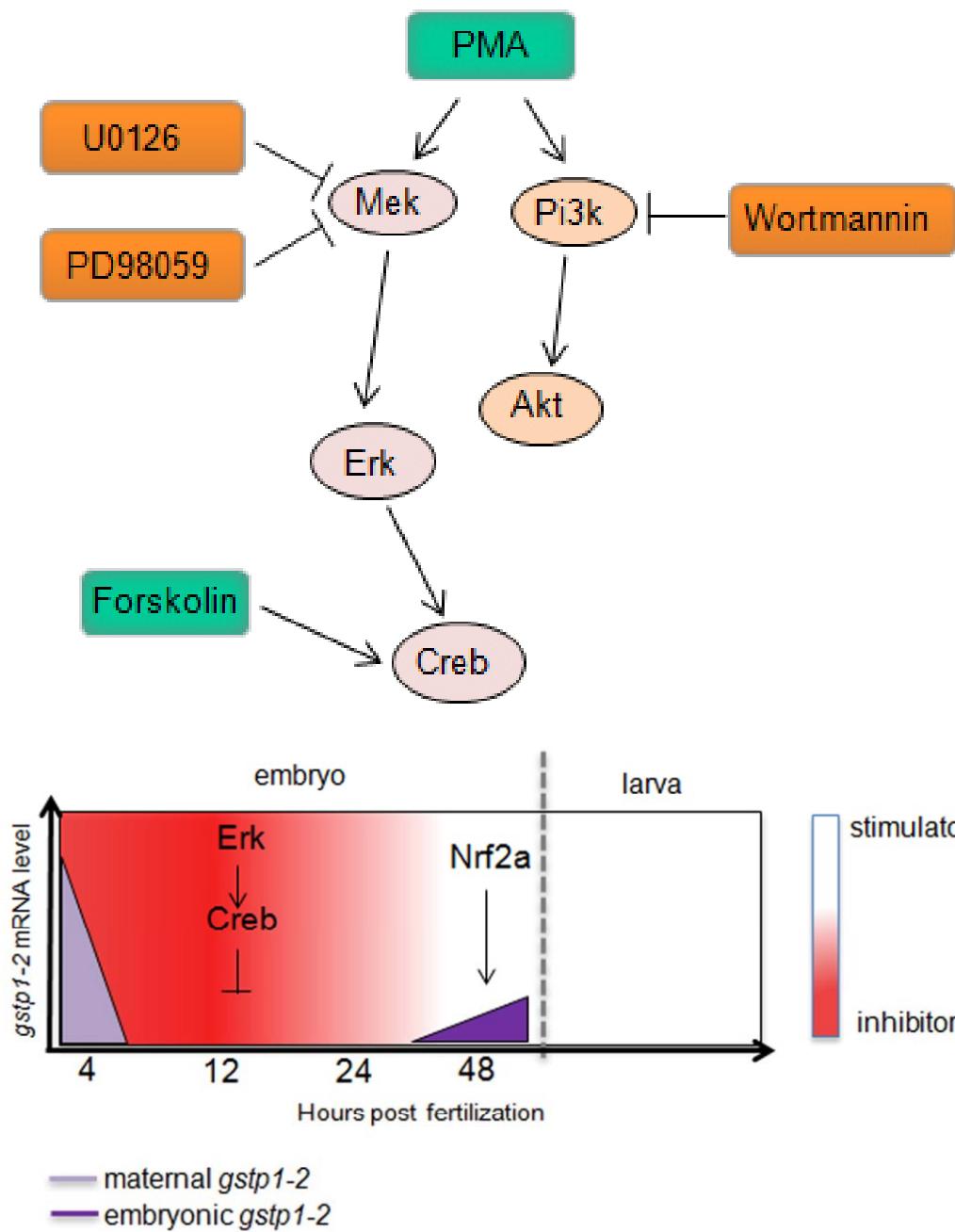
A



B



# Signalni putevi

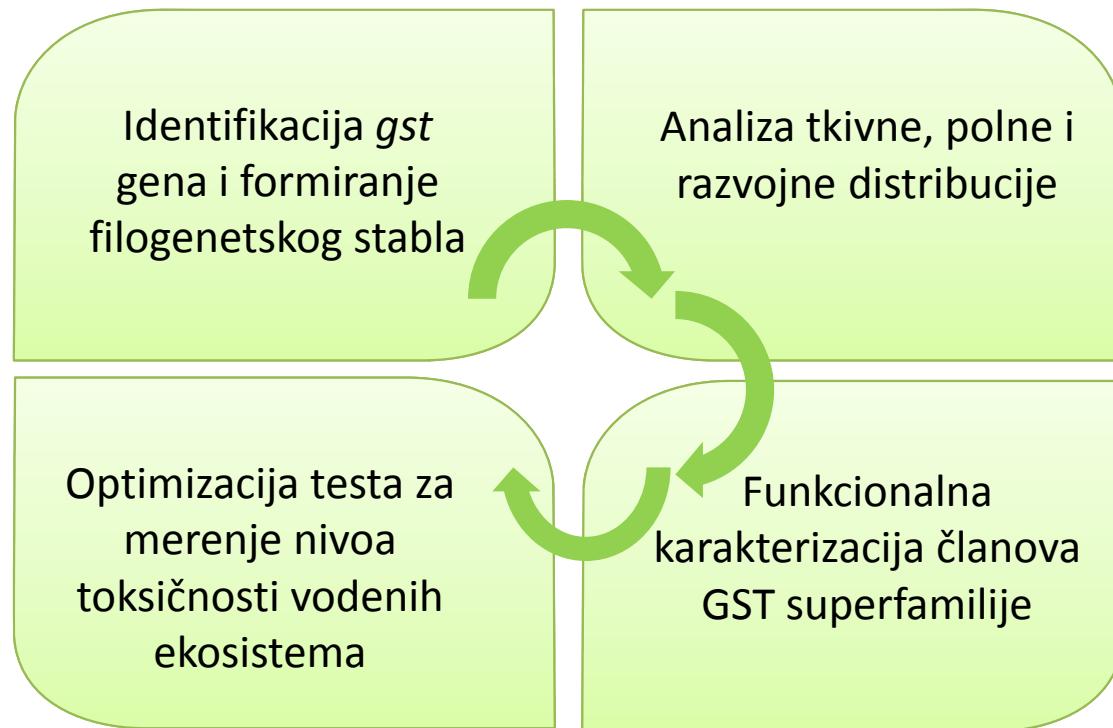


Western blot

# ZEBRICE (*Danio rerio*)

**Glutation-S-transferaze u zebrići**

# Sadržaj



## Saradnja

U okviru projekta: Swiss National Science Foundation [grant number SCOPES-IZ73Z0\_128025]

Laboratorija za ekotoksikologiju, UNSPMF

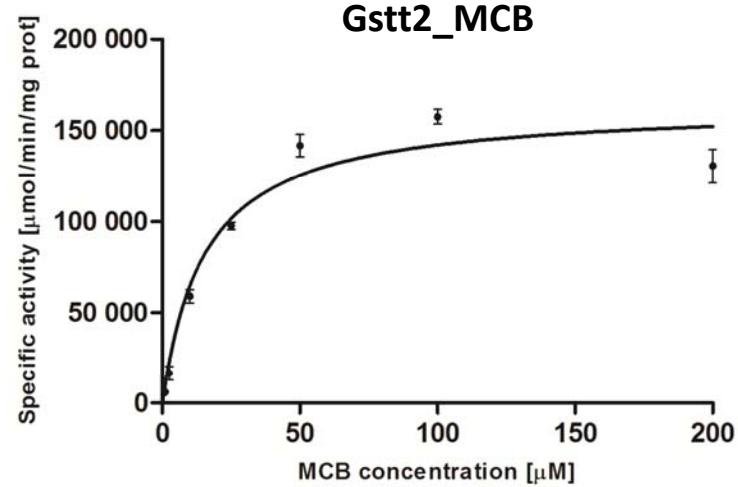
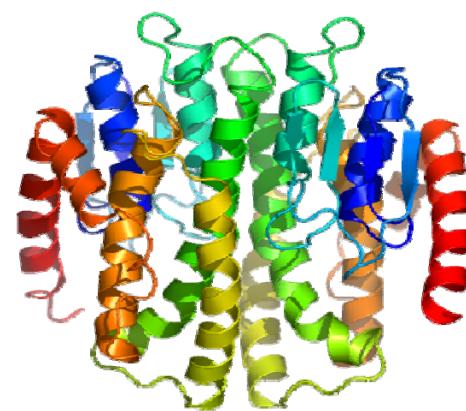
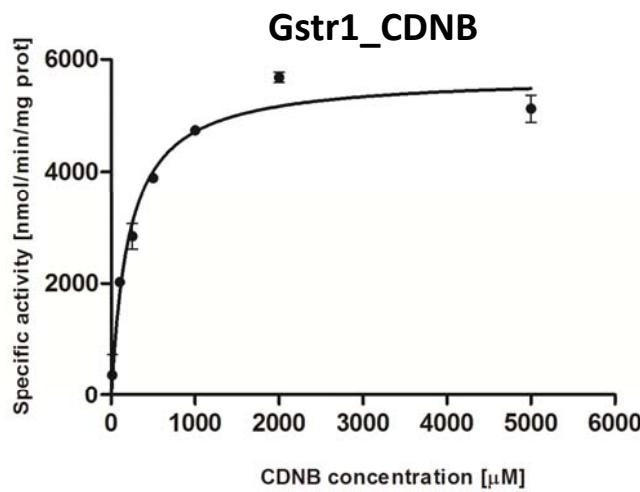
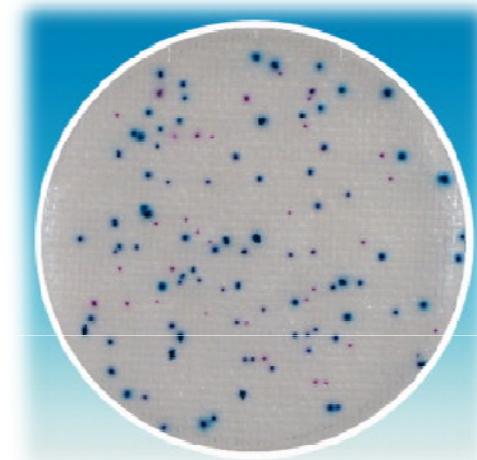


Laboratorija za molekularnu ekotoksikologiju,  
"Institut Ruđer Bošković", Zagreb, Hrvatska



# Funkcionalna karakterizacija odabranih Gst proteina zebrice

- PCR
- Kloniranje u odabrani vektor
- Prolazna transformacija i ekspresija gena u *E. coli*
- Prečišćavanje Gst proteina pomoću *HisTrap HP* kolona
- Funkcionalna karakterizacija pojedinih Gst enzima
- Testiranje enzimske aktivnosti primenom Gst eseja



# Projekti

## MEĐUNARODNI PROJEKTI

**2014-2017 Swiss National Science Foundation (SNSF) - SCOPES project:** “Responsiveness of Mitogen-Activated Protein-Kinase signalling on chemical exposure of human and fish cells”

**2012-2016 FP7 Marie Curie project:** “Environmental signaling and ovarian diseases susceptibility- EcoSignal”

**2013 Swiss National Science Foundation (SNSF) – SCOPES project:** “Valorization Grant (SCOPES Valorization Grant Workshop)”

**2009-2012 Swiss National Science Foundation (SNSF) – SCOPES project:** “Establishing and developing of an ecotoxicology platform in Serbia and Croatia: a focus on zebrafish (*Danio rerio*)”

**2007-2009 FP6 Regpot project:** “Reinforcement of research potential of the Laboratory for Ecotoxicology (REP-LECOTOX)”

## NACIONALNI PROJEKTI

**2016** “Ispitivanje uticaja mikotoksina T-2 na reprodukciju: analiza rizika i značaj za javno zdravlje”. **APV**

**2011-2015** “Ksenobiotici sa hormonskom aktivnošću: reproduktivni, metabolički, razvojni odgovori i mehanizam dejstva kod odabralih model organizama i ćelijskih linija”. **MNTR**

**2015** “*In vitro* evaluacija species-specifične osetljivosti na pesticide u ekološkoj proceni rizika u skladu sa politikom EU o njihovoj održivoj upotrebi”. **APV**

**2012** “Uvođenje testova toksičnosti na standardnim vrstama riba po zahtevima REACH direktive”. **APV**