

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Vida Burić

**Utjecaj temperaturnog stresa na fiziološke i
histološke promjene u tkivu koralja
(Hexacorallia, Anthozoa) iz Jadranskog mora**

Diplomski rad

Zagreb, 2023.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Vida Burić

**Impact of temperature stress on physiological
and histological changes in the tissue of the
Adriatic Sea corals (Hexacorallia, Anthozoa)**

Master thesis

Zagreb, 2023.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za biologiju mora na Zoologijskom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Petra Kružića te komentorstvom Pavela Ankona, mag. oecol. et prot. nat. Istraživanje je provedeno u sklopu projekta „Utjecaj klimatskih promjena na bioraznolikost koralja - istraživanje slučaja masovnih ugibanja u Jadranskom moru – ADRICOR“ financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

ZAHVALE I POSVETE

Iza ovog rada stajao je tim divnih ljudi.

Veliko hvala mojem mentoru prof. Petru Kružiću što je znao prepoznati smjer mojih interesa, što mi je pružio priliku izrade diplomskog rada i sudjelovanja na terenima, na optimizmu, otvorenosti i podršci. Uvijek ću Vas pamtiti.

Mojem komentoru Pavelu, koji je svojim smirenim i toplim pristupom u svakom koraku stvaranja ovoga rada bio uz mene. Pavel beskrajno ti hvala. Sretna sam što sam imala priliku raditi s tobom.

Veliko hvala prof. Romani Gračan i prof. Domagoju Đikiću na konstruktivnim savjetima i susretljivosti, uloženom trudu i vremenu, nesebičnoj pomoći oko dilema i podršci. Bilo mi je zadovoljstvo raditi s vama.

Velike zahvale na pomoći poslijedoktorandu Vedranu Balti i asistentu Silvestru Beljanu te profesorici Ireni Landeka Jurčević s Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu. Hvala i tehničarkama Zoologijskog zavoda na brizi i pripremi hrane za koralje u eksperimentalnom dijelu mojeg rada.

Hvala svim mojim cimericama (a bilo ih je podosta) što su hrabro proživljavale sa mnom sve moje uspone i padove i uvijek bile ogromna podrška.

Hvala svim mojim kolegama, zaista sam uživala dijeliti studentske dane s vama.

Posebno hvala mojem prijatelju i kolegi Borni koji je uvijek bio poticajan, spreman pomoći i uz mene prilikom izrade rada.

Hvala mojoj baki Mirjani i nonićima Anamariji i Anđelu, vaše su pozitivne misli i držanje figa uvijek donosili sreću.

Hvala mojem bratu Gregoru koji me je svojom staloženošću i toplom podrškom uvijek uspio učiniti mirnom. Hvala mojem bratu Bartolu što me je svojom dječaćkom razigranošću podsjećao koliko je život lijep.

I na kraju, beskrajno hvala mojim roditeljima Nadi i Fabriciu koji su uvijek stajali uz mene, bodrili me i vjerovali u mene kada i sama nisam. Moja ste sigurna luka, uvijek.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Utjecaj temperaturnog stresa na fiziološke i histološke promjene u tkivu koralja (*Hexacorallia*, *Anthozoa*) iz Jadranskog mora

Vida Burić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Temperaturni stres predstavlja veliku ugrozu za osjetljive skupine organizama poput koralja. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj eksperimentalno izazvanog temperaturnog stresa na fiziološke i histološke pokazatelje kod kamenog koralja *Cladocora caespitosa* i crvene moruzgve *Actinia equina*. Organizmi prikupljeni u Jadranskom moru nakon perioda aklimatizacije smješteni su u dva akvarija, jedan s morskom vodom grijanom na 20 °C, a drugi na 30 °C, uz jednake ostale abiotičke parametre. Tkiva organizama uzorkovana su nakon dva tjedna. Histopatološke lezije kvalitativno su klasificirane svjetlosnom mikroskopijom. Za fiziološke pokazatelje, homogenati tkiva podvrgnuti su imunokemijskim analizama intenziteta lipidne peroksidacije, ukupnog glutaciona i proteina toplinskog šoka (Hsp90, Hsp60, Hsp70). Kod vrste *C. caespitosa* uočene su značajne promjene na 30 °C u svim slojevima tkiva, kao i značajne razlike rezultata imunokemijskih analiza za grupe s povišenom temperaturom. Kod vrste *A. equina* nisu uočene značajnije histološke i fiziološke promjene između različitih temperaturnih tretmana. Istraživanje po prvi puta pokazuje mogućnost detekcije biomarkera oksidacijskog stresa kod vrste *C. caespitosa* i primjene istih kao metode rane detekcije temperaturnog stresa.

Ključne riječi: oksidacijski stres, nekroza, lipidna peroksidacija, glutation, proteini toplinskog šoka

(69 stranica, 34 slike, 6 tablica, 103 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Mentor: Prof. dr. sc. Petar Kružić

Komentor: mag. oecol. et prot. nat. Pavel Ankon

Ocjenitelji:

Prof. dr. sc. Petar Kružić

Izv. prof. dr. sc. Romana Gračan

Prof. dr. sc. Domagoj Đikić

Rad prihvaćen: 7. prosinca 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

Impact of temperature stress on physiological and histological changes in the tissue of the Adriatic Sea corals (Hexacorallia, Anthozoa)

Vida Burić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Temperature stress poses a great threat to sensitive groups of organisms such as corals. This research aimed to examine the influence of experimentally induced temperature stress on physiological and histological indicators in the stony coral *Cladocora caespitosa* and the beadlet anemone *Actinia equina*. The organisms collected from the Adriatic sea were placed after acclimatization in two experimental aquariums, one with seawater heated to 20 °C and the other to 30 °C, with the same other abiotic parameters. Tissues of organisms were sampled after two weeks. Histopathological lesions were qualitatively classified by light microscopy. For physiological indicators, tissue homogenates were subjected to immunochemical analyses of the intensity of lipid peroxidation, total glutathione and heat shock proteins (Hsp90, Hsp60, Hsp70). In the species *C. caespitosa*, significant changes were observed at 30 °C in all tissue layers, as well as significant differences in the results of immunochemical analyses for groups with elevated temperatures. In the species *A. equina*, no significant histological and physiological changes were observed between different temperature treatments. The research shows for the first time the possibility of detecting biomarkers of oxidative stress in the species *C. caespitosa* and applying them as a method of early detection of temperature stress.

Keywords: oxidative stress, necrosis, lipid peroxidation, glutathione, heat shock proteins (69 pages, 34 figures, 6 tables, 103 references, original in: Croatian)

This thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Prof. Petar Kružić, PhD

Co-mentor: Pavel Ankon, mag. oecol. et prot. nat.

Reviewers:

Prof. Petar Kružić, PhD

Assoc. Prof. Romana Gračan, PhD

Prof. Domagoj Đikić, PhD

Thesis accepted: December 7, 2023

Sadržaj

1	UVOD	1
1.1	Klimatske promjene u Jadranu	1
1.2	Žarnjaci u biomonitoringu klimatskih promjena.....	2
1.2.1	Usporedba provedenih istraživanja na žarnjacima	3
1.3	Biologija i ekologija kamenog koralja <i>Cladocora caespitosa</i> i crvene moruzgve <i>Actinia equina</i>	5
1.3.1	Utjecaj klimatskih promjena na kamenu koralj i crvenu moruzgvu.....	6
1.4	Molekularni mehanizmi i biomarkeri praćenja klimatskih promjena u žarnjaka	8
1.4.1	Enzimi oksidacijskog stresa.....	8
1.4.2	Proteini toplinskog šoka („heat shock proteins“)	12
1.5	Histološka i histokemijska istraživanja žarnjaka pod utjecajem klimatskih promjena.....	14
2	CILJ ISTRAŽIVANJA	16
3	METERIJALI I METODE	17
3.1	Uzorkovanje i eksperimentalni tijek uzgoja kamenog koralja <i>Cladocora caespitosa</i> u laboratorijskim uvjetima	17
3.2	Uzorkovanje i eksperimentalni tijek uzgoja crvene moruzgve <i>Actinia equina</i> u laboratorijskim uvjetima	19
3.3	Imunokemijske metode	19
3.3.1	Određivanje ukupnih proteina kamenog koralja i crvene moruzgve indirektnom metodom po Lowry-u.....	19
3.3.2	Određivanje enzima oksidacijskog stresa	20
3.3.3	Određivanje proteina toplinskog šoka (Hsp)	22
3.4	Histološke i histokemijske metode	24
3.4.1	Priprema histoloških preparata	24
3.4.2	Bojenje histoloških preparata	26
3.5	Analiza podataka	28
3.5.1	Analiza poklapanja sekvenci proteina toplinskog šoka	28
4	REZULTATI.....	29
4.1	Analiza biomarkera oksidacijskog stresa	29
4.1.1	Analiza sekvenci proteina toplinskog šoka.....	30
4.1.2	Kamenu koralj <i>Cladocora caespitosa</i>	33
4.1.3	Crvena moruzgva <i>Actinia equina</i>	38
4.2	Rezultati histoloških analiza	42
4.2.1	Kamenu koralj <i>Cladocora caespitosa</i>	42
4.2.2	Crvena moruzgva <i>Actinia equina</i>	49
5	RASPRAVA.....	52
5.1	Biomarkeri oksidacijskog stresa	52

5.2 Histološke promjene.....	55
6 ZAKLJUČAK	58
7 LITERATURA.....	59
8 ŽIVOTOPIS	

KRATICE

BSA goveđi serumski albumin, engl. „*bovine serum albumin*“

DTNB 5,5'- ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina (Ellmanov reagens)

ELISA enzimski povezani imunosorbentni test, engl. „*enzyme-linked immunosorbent assay*“

GSH glutation

GSSG glutation disulfid

HSP hrenova peroksidaza

Hsp protein toplinskog šoka, engl. „*heat shock protein*“

MDA malondialdehid

NADPH nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

PBS fosfatni pufer, engl. „*phosphate –buffered saline*“

PUFA polunezasićena masna kiselina, engl. „*polyunsaturated fatty acid*“

ROS reaktivne vrste kisika, engl. „*reactive oxigen species*“

SOD natrij dodecil-sulfat, engl. „*sodium dodecyl sulfate*“

TBA tiobarbiturna kiselina

TBARS tiobarbiturni test, engl. „*tiobarbituric acid reactive substances*“

TBN tert butil nitrit

TNB 5-tionitrobenzoična kiselina

1 UVOD

1.1 Klimatske promjene u Jadranu

Sredozemno more smatra se jednim od svjetskih žarišta bioraznolikosti (engl. *biodiversity hotspot*) i prostorom s najvećim globalnim endemizmom (MedECC 2020; Chatzimentor i sur. 2023). Ovaj poluzatvoreni bazen predstavlja tzv. „minijaturni ocean“ gdje proučavanje cirkulacije vodenih masa, monitoring fizikalnih i kemijskih parametara te klimatskih i okolišnih promjena, omogućava bolje razumijevanje i ekstrapolaciju istih na globalnu razinu (Bethoux i sur. 1999; Lejeune i sur. 2010). Mediteran je zbog brojnih negativnih utjecaja i svoje poluzatvorenosti također jedno od najosjetljivijih i najranjivijih područja. Klimatske promjene, koje se manifestiraju kroz povećanje temperature mora, zakiseljavanje, masovne pomore i dr., uzrokuju značajne promjene u morskim ekosustavima (Kružić 2014). Analiza 90 ugroženih vrsta Sredozemnog mora iz različitih razreda, pokazala je da je čak četvrtina istih pod direktnim, eklatantnim utjecajem klimatskih promjena (Chatzimentor i sur. 2023) što za njih predstavlja dodatan rizik i ugrozu.

Promjene koje se odvijaju u Sredozemnom moru i koje s vremenom postaju sve izraženije, direktno utječu i na stanje u Jadranskom moru. Uz karakterističnu cirkulaciju vode koja ulazak u Jadransko more započinje iz Jonskog mora uz istočnu obalu prema sjeveru i daljnjim kretanjem uz zapadnu obalu prema jugu, na dinamiku kretanja vodenih masa i strujanja mora značajno utječe i vjetar bura (sjeverno-istočni vjetar). Poluzatvoreni izduženi bazen Jadranskog mora s brojnim otocima donekle usporava nektonskim vrstama migriranje i time otežava izbjegavanje područja s velikim zagrijavanjem vodenog stupca (Cavraro i sur. 2022). Površinske temperature mora na jugu, značajno su veće od onih u srednjem ili sjevernom dijelu Jadrana (Kružić i sur. 2012). Istraživanja Bonacci i suradnika (2022) pak uočavaju izraženiji utjecaj klimatskih promjena (kroz trend povišenja temperature zraka i površinske temperature mora) na području Sjevernog Jadrana. Također, neovisno o blizini dvaju proučavanih lokaliteta (Korčula i Vela Luka) na istome otoku u južnom Jadranu, zabilježen je različit intenzitet utjecaja klimatskih promjena na temperaturu zraka i precipitaciju (Bonacci i sur. 2021). Navedeni primjeri upućuju na kompleksnost proučavanja klimatskih promjena u Jadranu i potrebu za sveobuhvatnim, interdisciplinarnim istraživanjima u svrhu razumijevanja istih.

Istraživanja predviđaju nekoliko ključnih događaja u Jadranu pod utjecajem klimatskih promjena i globalnog zagrijavanja: značajne promjene u hidrogeološkom ciklusu kroz redukciju precipitacije odnosno povećanje evaporacije (Vilibić i sur. 2013; MedECC 2020), izmjene u biološkoj produkciji i dostupnosti nutrijenata (Waller i sur. 2018), zagrijavanje

morske vode, promjene u kretanju vodenih masa i kontinuirano slabljenje termohaline cirkulacije (Mihanović i sur. 2021), a time i povećanje stratifikacijskog indeksa.

Neupitna je činjenica da promjene koje se odvijaju uslijed globalnog zagrijavanja, i za koje se predviđa da će s vremenom postajati sve izraženije, mijenjaju dinamiku morskih ekosustava. Stoga je u ovako malom, poluzatvorenom moru kao što je Jadransko more, vrlo važno vršiti kontinuirani monitoring i uvoditi nove metode ranog otkrivanja biomarkera stresa, kod za to pogodnih organizama, kako bi se okolišne promjene uočavale na vrijeme i stanja ekosustava procjenjivala što točnije (Vilibić i sur. 2013).

1.2 Žarnjaci u biomonitoringu klimatskih promjena

Sesilni žarnjaci jedno su od najosjetljivijih koljena s ograničenim potencijalom širenja i izbjegavanja negativnih promjena okolišnih čimbenika (Choresh i sur. 2004) pa stoga ujedno predstavljaju i idealnu grupu organizama za monitoring temperaturnih oscilacija u morima kao posljedicu klimatskih promjena i adaptivnih odgovora na iste (Gadelha i sur. 2017).

Izloženost sjedilačkih organizama temperaturnim anomalijama ima za posljedicu nekoliko učinaka kao što su: metabolički poremećaji, fiziološki stres (Coma i sur. 2002; Coma i Ribes 2003; Torrents i sur. 2008) te veća osjetljivost organizama na razvoj patogena (Kushmaro i sur. 1998; Banin i sur. 2001, 2003; Bally i Garrabou 2007).

Šteta koju klimatske promjene mogu prouzročiti organizmima rezultat je istovremeno intenziteta okolišnih stresora kao i same osjetljivosti (podložnosti, adaptivnog kapaciteta, ponašanja i dr.) organizama na iste (Chatzimentor i sur. 2023). Posebne prilagodbe organizama na okolišni stres, uslijed dinamičnih izmjena u okolišu, ekološki i evolucijski omogućile su im preživljavanje. Upravo razumijevanje mehanizama kojima se organizmi služe u borbi protiv navedenih negativnih utjecaja, daju dobar uvid u adaptacijski potencijal raznolikosti vrsta (Rivera i sur. 2021).

Brojna ekološka i biološka istraživanja žarnjaka već su omogućila uvid u raznolikost odgovora organizama na stresne okolišne uvjete, mehanizme prilagodbi, raznolikost u toleranciji na fluktuirajuće ekološke parametre (Dias i sur. 2019) kao i trenutno stanje njihove distribucije i ugroženosti. Daljnjim razvojem molekularnih metoda i biomarkera za prepoznavanje stupnja utjecaja okolišnog stresa, omogućila bi se usporedba, te uspostava preciznijih sustava monitoringa i predikcija stanja organizama (Cziesielski i sur. 2019).

1.2.1 Usporedba provedenih istraživanja na žarnjacima

Ispitujući postojanje temperaturne tolerancije kod moruzgvi roda *Nematostella*, Rivera i suradnici (2021) otkrili su pojavu transgeneracijske plastičnosti. Naime, izlaganje roditeljskih jedinki povišenoj temperaturi, izaziva pojavu povećane tolerancije na temperaturne oscilacije kod ličinačkog stadija njihovih potomaka, što potomcima omogućava veću šansu preživljavanja. Richier i suradnici (2005) istraživanjem na simbiotskoj moruzgvi *Anemonia viridis* (Forsskal, 1775) i nesimbiotskoj moruzgvi *Actinia mediterranea* Schmidt, 1971 pokazali su razliku u odgovoru na temperaturni stres ovisno o ne/posjedovanju simbiotskih organizama. Dok su jedinke nesimbiotske vrste pokazale veliku osjetljivost na temperaturne promjene kroz smanjenje antioksidacijskog odgovora (SOD) i povećanje biomarkera lipidne peroksidacije, jedinke simbiotske vrste pokazale su veliku toleranciju. Istraživanje Downs i suradnika (2000) također je pokazalo povećanje lipidne peroksidacije u uvjetima temperaturnog stresa i to 4,4-5,9 puta u odnosu na kontrolne uzorke kod koralja *Orbicella faveolata* (Ellis i Solander, 1786). Ovo i brojna druga istraživanja na koraljima (Anthozoa) pokazala su povećanje lipidne peroksidacije kao posljedice temperaturnog stresa (Dias i sur. 2020).

Kružić i suradnici (2016) utvrdili su da u Jadranu oko 10 % populacija zadružne moruzgve *Parazoanthus axinellae* (Schmidt, 1862) i kamenog koralja *Caryophyllia inornata* (Duncan, 1878) pokazuju znakove pojačane nekroze u koraligenskoj zajednici. Sličan događaj uočen je i na nekoliko lokaliteta duž Ligurske obale od 2001. do 2003. godine (Cerrano i sur. 2006).

Populacije koje žive u plićem dijelu mora su uglavnom otpornije od onih u dubljem dijelu mora. Drugačija teza je postavljena za bijelu gorgoniju *Eunicella singularis* (Esper, 1791). Kod ove vrste populacije iz plićeg dijela mora su puno ugroženije od onih iz dubljeg dijela (Ferrier-Pages i sur. 2009), najvjerojatnije zbog mogućnosti gubitka simbiotskih algi (zooksantela) zbog povećane temperature mora (Kružić i sur. 2016).

Prije 20 godina, smrtnost koralja *Oculina patagonica* de Angelis D'Ossat, 1908 u jugoistočnom dijelu Sredozemnog mora uzrokovana je patogenom bakterijom *Vibrio shiloi* (Kushmaro i sur. 1998), dok su u Karipskom moru gorgonije stradale zbog patogenih gljivica *Aspergillus sydowii* (Geiser i sur. 1998). Temperatura mora vjerojatno ima snažan utjecaj na dinamiku interakcije između koralja i patogena. Mnogi patogeni imaju sposobnost uzrokovati bolesti kod domaćina samo pod uvjetima ekološkog stresa. Smatra se da se pojačanim i naglim porastom brojnosti patogena smanjuje efikasnost imunoreakcije domaćina, čime on u isto vrijeme postaje ranjiviji (Kushmaro i sur. 1998). Navedena istraživanja upućuju na veliku

ranjivost simbiotskih koralja Sredozemnog mora u zadnjih nekoliko valova pozitivnih temperaturnih anomalija (povećanja temperature mora).

Istraživanjem je utvrđeno smanjenje metaboličke aktivnosti kod gorgonija tijekom razdoblja visoke temperature mora (Previati i sur. 2010). Na temperaturama iznad 20 °C, metabolička aktivnost i potrošnja kisika je smanjena kod vrsta *Paramuricea clavata* (Risso, 1827), *Eunicella cavolini* (Koch, 1887) i *Corallium rubrum* (Linnaeus, 1758), a utvrđeni su i prvi znakovi nekroze tkiva. Kod crvene gorgonije *P. clavata* istraživanja Pairaud i suradnika (2014) pokazala su značajne nekroze tkiva nakon kratkih (u prosjeku 9 dana) izlaganja temperaturama mora višim od 25 °C. Sunagawa i suradnici (2008) pokazali su svojim istraživanjem na moruzgvi *Exaiptasia pallida* (Agassiz in Verrill, 1864) povećanu razinu ukupnog glutaciona kao jednog od odgovora na temperaturni stres.

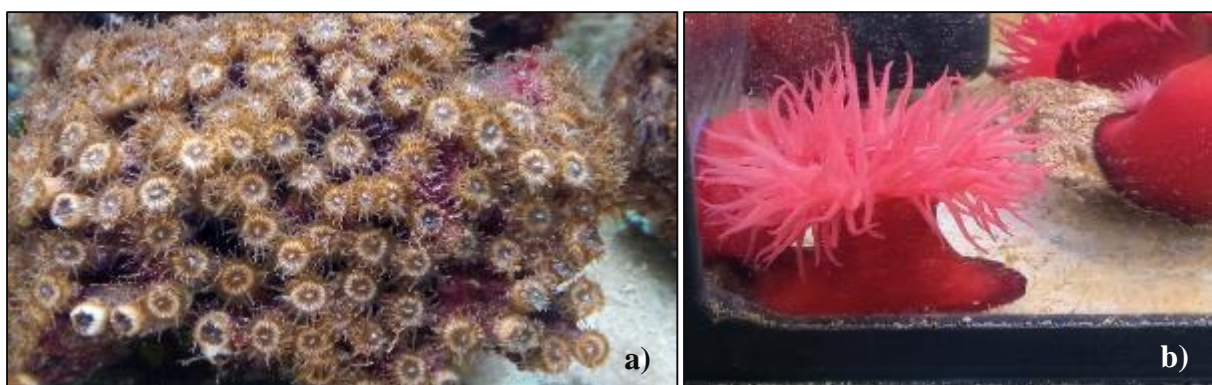
Istraživanja Kružić i suradnika (2016) kroz kontinuirani monitoring od 14 godina na pet lokaliteta duž Jadrana, pokazala su po prvi puta intenzitet utjecaja klimatskih promjena na pojavu masovnog pomora bentičkih vrsta (s naglaskom na koraligenske zajednice), dubinski raspon i moguće uloge temperaturnih promjena na bentičke beskralješnjake. Sjeverni dio Jadrana (područje Cresa) bio je najmanje zahvaćen, dok je na lokalitetima Srednjeg i Južnog Jadrana (Telašćica, Lastovo, NP Mljet) bio vidljiv značajniji utjecaj. Gorgonije poput *P. clavata*, *E. cavolini* i *E. singularis* pokazale su nekroze tkiva sa ogoljenim skeletom. Također, kod vrsta *P. clavata* i *E. cavolini* uočena su oštećenja tkiva vjerojatno prouzročena nakupljanjem sluzavih makroagregata.

Brojni su slučajevi gubitka cenenhima i nekroze tkiva kod crvenog koralja *C. rubrum* (Kružić i sur. 2016), što je rezultiralo djelomičnom uginućem kolonija zabilježenim tijekom 2009., 2012. i 2016. godine na lokacijama u Nacionalnom parku Mljet, ali nije utvrđeno masovno ugibanje kao u zapadnom dijelu Sredozemnog mora (Garrabou i sur. 2001). Jedan od razloga za manji mortalitet u Jadranu može biti dubina staništa crvenog koralja. Populacije crvenog koralja rijetko se mogu pronaći u plitkim obalnim morima (iznad 40 metara dubine) u Jadranu, jer je većina plitkih populacija drastično smanjena zbog krivolova, čak i u zaštićenim područjima. Zajedno s temperaturnim anomalijama na Mediteranu, preživljavanje crvenog koralja u plitkim staništima izgleda vrlo neizvjesno. Kalcifikacija kamenog koralja *Cladocora caespitosa* (Linnaeus, 1767) proučavana X-radiografskom analizom (Kružić i sur. 2012) pokazala je veće stope rasta koralja u periodima povećane temperature mora. Negativna je korelacija utvrđena između povećane temperature mora i gustoće koralja. Proučavanje rasta koralja *C. caespitosa* kroz duži niz godina moglo bi se tako koristiti u svrhu rekonstruiranja

promjena klimatskih parametara kroz prošlost (Morri i sur. 2001), ali i predvidjeti odgovor jedinki na klimatske fluktuacije danas i u budućnosti.

1.3 Biologija i ekologija kamenog koralja *Cladocora caespitosa* i crvene moruzgve *Actinia equina*

Busenasti kameni koralj *Cladocora caespitosa* endemska je vrsta Mediterana (Slika 1a). Nastanjuje staništa različitih karakteristika: pomičnog i čvrstog dna, raspona dubine od 5 - 40 metara, u mirnim područjima kao i područjima s izraženim morskim strujama (Zibrowius 1982; Kružić i Benković 2008). Gradi manje nasumične kolonije ili velike kolonijalne banke (Casado de Amezua i sur. 2015) poput koraljnog grebena u Velikom jezeru (Mljet), koji sa površinom od 650 m² čini najveći greben kamenog koralja *C. caespitosa* u Mediteranu (Kružić i Požar-Domac 2003). Busen kamenog koralja ima tzv. faceloidnu građu tj. sačinjen je od većeg ili manjeg broja međusobno neovisnih polipa (Rodolfo-Metalpa i sur. 2005). Posjeduje obilježja tropskog koralja s karakterističnim fiziološkim i morfološkim osobinama, ostvarivanjem simbiotskih odnosa s jednostaničnim dinoflagelatima iz porodice Symbiodiniaceae, kolonijalnom građom i mogućnošću formiranja strukture grebena (Zibrowius 1982; Kružić i Benković 2008). Ekološka važnost ovog koralja proizlazi iz njegove sposobnosti formiranja trodimenzionalnih karbonatnih struktura koje predstavljaju stanište za epilitske, endolitske i slobodno živuće beskralježnjake i time povećavaju ukupnu bioraznolikost (Pitacco i sur. 2014; Zunino i sur. 2018). Zbog opadanja brojnosti populacija tijekom zadnjih desetljeća, kao i prespore stope obnove zbog koje se ne mogu kompenzirati gubitci (Kersting i sur. 2014), prema IUCN-ovoj crvenoj listi ova vrsta svrstana je u ugrožene (Casado de Amezua i sur. 2015).

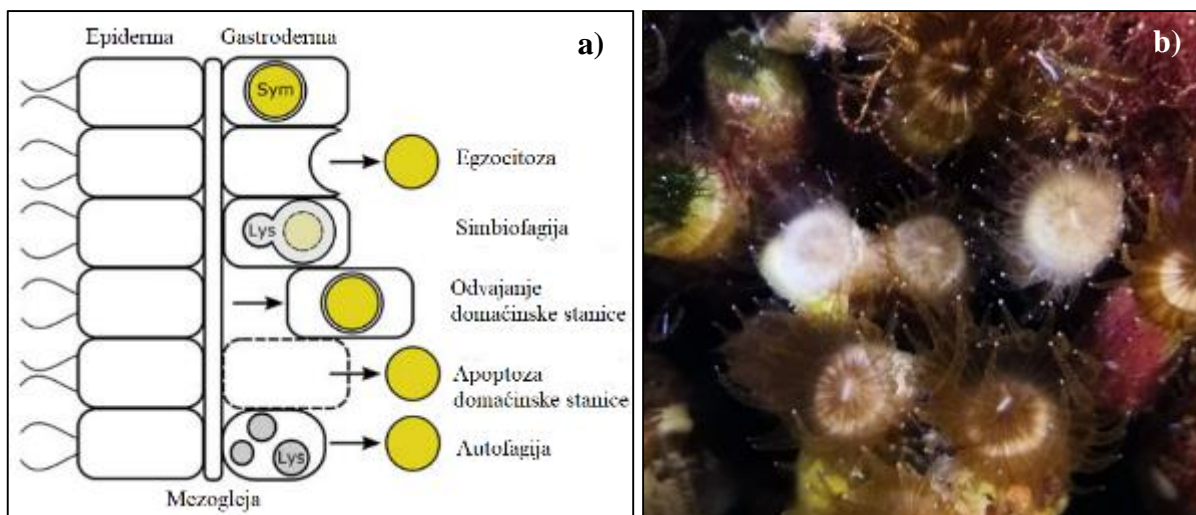


Slika 1. Brojni polipi kamenog koralja *Cladocora caespitosa* (a) i crvena moruzgva *Actinia equina* s otvorenim lovkama (b) u laboratorijskim uvjetima. Jedinke su slikane za vrijeme trajanja eksperimentalnog dijela ovog rada.

Za razliku od zadružnog kamenog koralja, crvena moruzgva *Actinia equina* (Linnaeus, 1758) solitarni je polip (*Slika 1b*). Ne posjeduje endosimbiontske dinoflagelate i aktivno lovi sitne beskralježnjake pomoću lovki koje se radijalno šire iz otvora gastrovaskularne šupljine (Matoničkin i sur. 1998). Nastanjuje kamenite podloge mediolitoralne zone u kojoj su izraženi promjenjivi uvjeti okoliša (Chomsky i sur. 2004). Pretpostavlja se da zbog prilagođenosti života u ekstremno različitim uvjetima (potpuno potopljenih u vodi, u potpunosti na suhom) crvena moruzgva tolerira veću varijaciju temperature, saliniteta, osvjetljenosti i drugih abiotičkih parametara. Neki od obrambenih mehanizama koje koristi su uvlačenje lovki i zaobljivanje u svrhu smanjenja tjelesne površine, migracija odljepljivanjem od podloge i korištenje toksičnih žarnih stanica (Terrell 2003). Veliku toleranciju od isušivanja postiže zadržavanjem vode unutar gastrovaskularne šupljine i postepenom evaporacijom iste u svrhu hlađenja (Griffiths 1977). Oba žarnjaka uobičajeno nastanjuju Jadransko more, a budući da obitavaju u drugačijim okolišnim zonama (infralitoral i mediolitoral) u kojima su različiti intenziteti temperaturnih promjena, zanimljivo je proučavati u kojoj mjeri to utječe na njih.

1.3.1 Utjecaj klimatskih promjena na kameni koralj i crvenu moruzgvu

Spora dinamika ovog dugoživućeg busenastog kamenog koralja pa time i smanjena sposobnost oporavka od utjecaja klimatskih promjena, čini ga osjetljivim na okolišne fluktuacije (Kersting i sur. 2014), što bi u narednim desetljećima moglo izazvati sve izraženije pomore (Kružić i sur. 2016). Budući da je *C. caespitosa* simbiotski koralj, proučavanje utjecaja temperaturnih promjena dodatno je otežano zbog sagledavanja utjecaja temperature na oba organizma koji sudjeluju u simbiozi (kameni koralj i alge roda *Symbiodinium*). Jedna od najočitijih makroskopskih promjena koralja pod utjecajem temperaturnog stresa je tzv. izbjeljivanje koralja (engl. *coral bleaching*) koje nastaje kao posljedica napuštanja simbiotskih organizama na različite načine uslijed stresnih uvjeta (*Slika 2a,b*). Izbjeljivanje se morfološki očituje kroz sve blijeđe tkivo koje napreduje postepeno do potpune prozirnosti. Na taj način, kroz prozirno koraljno tkivo, bijeli skelet postaje sve vidljiviji (Hawthorn i sur. 2023.). Podvojena su mišljenja o tome koji točno događaj izaziva *bleaching*. Oksidativna teorija (Downs i sur. 2002) tvrdi da zbog narušavanja fotosintetskog sustava simbiotskih algi dolazi do stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta i posljedično povećane akumulacije istih, kao i oštećenja u tkivu domaćina što uzrokuje izbjeljivanje koralja kao zadnje opcije obrane od oksidativnog stresa (Gardner i sur. 2016). Adaptivna teorija nalaže pak da se organizam domaćin prilagođava na novonastale stresne okolišne uvjete, kroz zamjenu postojećih simbiota sa novim, fiziološki bolje prilagođenim tipom simbiota (Kinzie i sur. 2001; Weis 2008).



Slika 2. Mehanizmi gubitka simbiozata koji dovodi do izbjeljivanja koralja (a). Sym označava simbiotske organizme, a Lys lizosome (preuzeto i prilagođeno iz Oakley i Davy 2018). Polipi kamenog koralja *C. caespitosa* u različitim stanjima (b). Polipi kamenog koralja *C. caespitosa* s bijelim skeletom i izbijeljenim lovkama prolaze kroz proces „bleachinga“ za razliku od zdravih, smeđih polipa.

Korištenjem kamenog koralja *C. caespitosa* kao indirektnog zapisa (engl. *proxy*) za proučavanje klimatskih fluktuacija u prošlosti, Peirano i suradnici (2004) pokazali su da su fosilni uzorci koralja u prošlosti živjeli u uvjetima izražene sezonalnosti, toplijeg mora i većeg turbiditeta nego danas. Nasuprot ovim činjenicama, novija istraživanja pokazuju negativnu korelaciju između globalnog zagrijavanja (povišenja temperature mora) i stanja kamenog koralja. Istraživanjem rasta kolonija *C. caespitosa* Kružić i suradnici (2012) pokazali su dobru prilagođenost kamenog koralja na sezonalnu promjenu temperature mora, međutim izraženi negativni utjecaj ekstremnih temperaturnih varijacija na rast, cvjetanje algi i pojavu izbjeljivanja koralja. Veliki mortalitet (oko 90 %) kolonija uočen je u blizini otoka Iža, a zadnjih godina uočava se i opadanje brojnosti na Mljetu (oko 10 %) (Kersting i del Mar Otero 2016; Kružić i sur. 2012).

Kod crvene moruzgve zbog izmjenjivanja perioda plime i oseke, perioda u danu ili godišnjeg doba, izražene su ciklične, dnevne promjene u temperaturi okoliša kojemu je izložena (Chomsky i sur. 2004). Istraživanja Chomsky i suradnika (2004) pokazala su značajno smanjenje biomase jedinki crvene moruzgve prilikom povišenih temperatura mora što je povezano s energijom koja se troši na disanje, a ovisi o temperaturi. Također, ekstremna povišenja temperature mora pokazala su i značajno smanjenje stope preživljenja testiranih jedinki (Gadelha i sur. 2017).

Nekoliko je strategija staničnog odgovora kod koralja (Anthozoa) u svrhu prilagodbe na temperaturne varijacije (Brown 1997): reorganizacija enzima oksidacijskog stresa (superoksid dismutaza, katalaza i sl.) kroz promjene u koncentraciji, prisutnim izoformama i kinetici, eksprimiranje proteina staničnog šoka i promjena fluidnosti staničnih membrana.

Istraživanja stupnjeva oštećenja tkiva žarnjaka, osim klasičnim vizualnim metodama zapažanja, upotpunjuju se histološkim i fiziološkim analizama. Uz uočavanje tkivnih promjena (histološkim metodama), mjerenja razine oksidacijskog stresa (fiziološkim metodama) i promjena različitih proteina toplinskog šoka (Hsp, engl. *Heat shock protein*) pokušavaju se standardizirati protokoli i za druge molekularne markere. Primjena imunokemijskih, imunohistokemijskih i biokemijskih metoda omogućavaju sveobuhvatnu analizu tkivnih promjena uzrokovanih klimatskim promjenama kroz povišenje temperature.

1.4 Molekularni mehanizmi i biomarkeri praćenja klimatskih promjena u žarnjaka

Iako je kisik neophodan za život, reaktivne vrste kisika (ROS, engl. *Reactive Oxygen Species*) kao grupa radikalnih (zbog nesparenog elektrona u zadnjoj ljusci) i neradikalnih molekula nastalih iz kisika (npr. superoksidni anion, hidroksilni anion, vodikov peroksid i dr.) predstavljaju toksične oblike. Takvi štetni oblici kisika nastaju tijekom normalnih staničnih procesa u staničnim odjeljcima (Averill-Bates 2023), ali osim zbog endogenih uzroka, reaktivne vrste kisika povećano se akumuliraju u stanicama organizama pod utjecajem okolišnih stresora. Interakcija reaktivnih vrsta kisika sa staničnim makromolekulama lipidima, proteinima i nukleinskim kiselinama izaziva njihovu oksidaciju, lipidnu peroksidaciju, proteinsku denaturaciju, poremećaj u radu organela poput mitohondrija i peroksisoma i u konačnici snažan stanični odgovor koji može završiti apoptozom (Bhagat i sur. 2016).

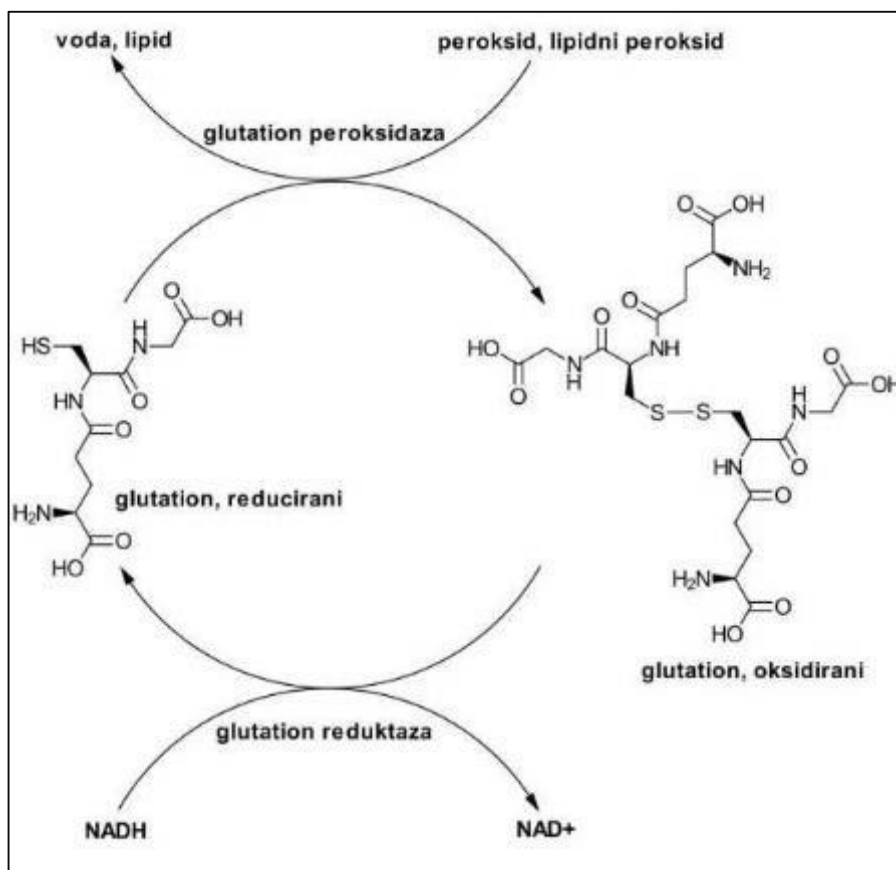
Organizmi su razvili nekoliko obrambenih mehanizama u svrhu borbe protiv štetnih oblika kisika. U održavanju stanične homeostaze i normalnih razina slobodnih radikala važnu ulogu imaju antioksidansi. Upravo promjene u razinama antioksidansa i promjene u funkcioniranju sustava antioksidativne obrane mogu poslužiti kao indikatori niza okolišnih varijacija koje direktno ili indirektno utječu na oksidativni stres u organizmima (Bhagat i sur. 2016).

1.4.1 Enzimi oksidacijskog stresa

Upravo disbalans između staničnih obrambenih mehanizama i povećane količine reaktivnih kisikovih vrsta izaziva oksidativni stres.

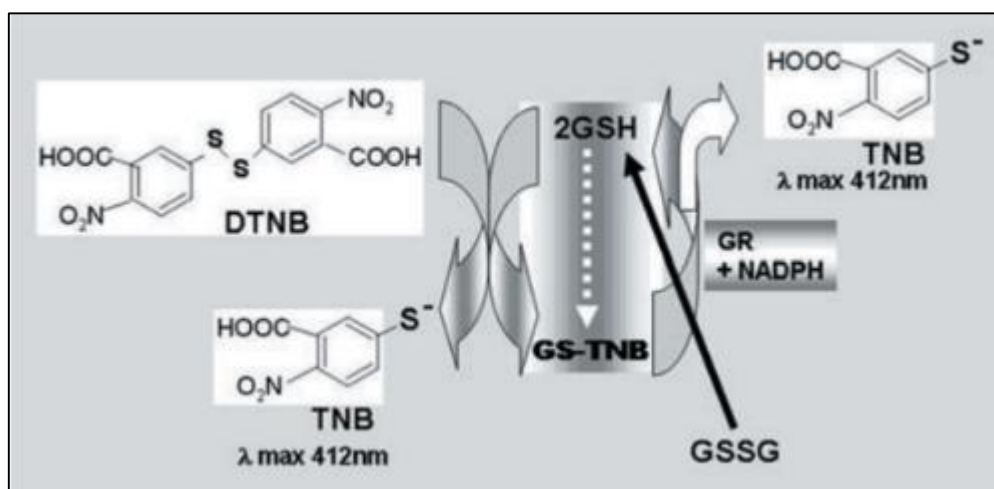
Reducirani glutation (GSH), tripeptid građen od aminokiselina glutamin (Glu), cistein (Cys) i glicin (Gly), važan je antioksidans u animalnim tkivima koji pomaže u održavanju stanične

homeostaze i sprječavanju staničnih oštećenja uslijed okolišnih stresora (Lesser 2006; Rahman i sur. 2007; Nielsen i sur. 2018). Reducirani glutathion predominantan je oblik glutathiona u zdravim stanicama gdje predstavlja oko 90 % ukupnog glutathiona (Krueger i sur. 2014). Naime, reaktivne vrste kisika oksidiraju GSH (GSH kao antioksidans donira elektron) do glutathion disulfida (GSSG) direktno ili indirektno putem enzima glutathion peroksidaze (GPX, engl. *Glutathione Peroxidase*) (Slika 3). Pomoću enzima glutathion reduktaze i nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH) dolazi do redukcije GSSG (Rahman i sur. 2007; Sunagawa i sur. 2008; Nielsen i sur. 2018). Upravo optimalne razine reduciranog (GSH) i oksidiranog (GSSG) oblika glutathiona predstavljaju svojevrsan pufer u stanici, a promjene u tom omjeru pokazatelj su razine oksidativnog stresa (Lesser 2006). Temperaturni stres dokazano izaziva poremećaje u ovom redoks sustavu (Nielsen i sur. 2018) pa se oksidativni stres detektira prilikom povećanih razina oksidiranog oblika glutathiona (GSSG).



Slika 3. Shema oksidacije i redukcije glutathiona (preuzeto i prilagođeno iz Plantagea 2019-2022).

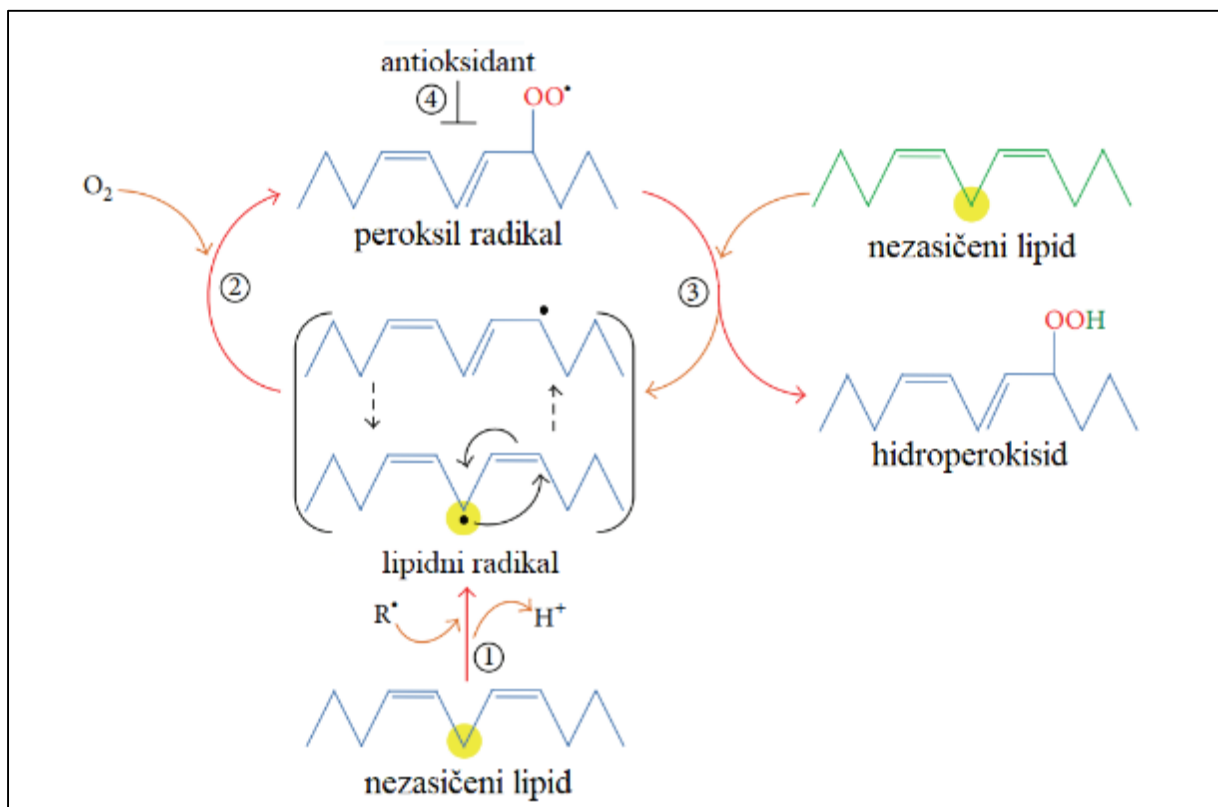
Detekcija i kvantitativno određivanje koncentracije ukupnog glutationa u uzorku najčešće se određuje prema modificiranom Tietzejevom protokolu (1969). Ova enzimatska metoda određivanja GSH-GSSG razine zasniva se na reakciji tiolne (-SH) skupine aminokiseline cistein GSH-a s 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeve kiseline (DTNB, Ellmanov reagens). Kao produkt reakcije nastaje žuto obojenje 5-tionitrobenzoične kiseline (TNB) koje je detektabilno spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 412 nm. Drugi produkt koji nastaje, adukt glutationa i TNB-a (GS-TNB) reducira se u prisutnosti NADPH pomoću glutation reduktaze čime nastaje GSH koji opet ulazi u reakciju (Rahman i sur. 2007). Izmjereni glutation predstavlja ukupnu količinu reduciranog i oksidiranog oblika glutationa u uzorku (Slika 4).



Slika 4. Princip enzimatske metode određivanja ukupnog glutationa (GSH) u uzorku prema modificiranom Tietze (1969) protokolu. Reakcijom GSH s Ellmanovim reagensom (DTNB) dolazi do formiranja TNB kromogena kao i GS-TNB adukta. GS-TNB adukt se uz prisustvo NADPH i glutation reduktaze reducira do GSH i TNB-a. TNB je detektabilan spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 412 nm (preuzeto i prilagođeno iz Rahman i sur. 2007).

Kao posljedica akumulacije reaktivnih kisikovih vrsta i neefektivnog antioksidativnog sustava obrane dolazi i do reakcije lipide peroksidacije (Nielsen i Petrou 2023). Riječ je o lančanoj, radikalima izazvanoj reakciji oksidacije lipida (Cai 2005) koja u stanicama izaziva oštećenja staničnih membrana kroz promjene u fluidnosti i permeabilnosti membrane, smanjenje aktivnosti membranskih enzima, inaktivaciju membranskih pumpi kao i induciranje programirane stanične smrti (Wadhwa i sur. 2012; Ayala i sur. 2014). Upravo su polinezasićene (višestruko nezasićene) masne kiseline (PUFA, engl. *polyunsaturated fatty acids*), koje grade fosfolipidni dvosloj staničnih membrana, izuzetno podložne procesu lipidne peroksidacije (Cai

2005). Proces se odvija kroz tri koraka: inicijaciju, propagaciju i terminaciju (Slika 5). Tijekom inicijacije dolazi do oduzimanja iona vodika iz lipida i formiranja novih slobodnih radikala. U fazi propagacije stvoreni lipidni radikali reagiraju s drugim molekulama i stvaraju nove radikale. Reakcijom lipidnih radikala s molekularnim kisikom nastaju peroksil radikali, a njihova daljnja reakcija s lipidnim supstratom stvara hidroperoksidge (Cai 2005; Ayala i sur. 2014) i nove radikale. Raspadom hidroperoksidge stvara se još novih radikalnih molekula i aldehida. Reaktivni aldehidi koji nastaju kao produkti lipidne peroksidacije smatraju se tzv. sekundarnim glasnicima jer već u malim koncentracijama mogu nastaviti lančanu reakciju, nanijeti štetu stanicama kroz promjenu u ekspresiji gena i prenošenju signala (Wadhwa i sur. 2012). Tek u završnoj fazi, terminaciji, reakcijom dvaju radikala nastaje neradikalni produkt i time se lančana reakcija zaustavlja.



Slika 5. Shematski prikaz faza lipidne peroksidacije. U fazi inicijacije dolazi do napada slobodnog radikala (R^\bullet) na nezasićeni lipid čime nastaje lipidni radikal (1). U fazi propagacije lipidni radikal reagira s molekularnim kisikom čime nastaje peroksil radikal (2). Peroksil radikal u daljnjoj reakciji s lipidnim supstratom (nezasićenim lipidom) stvara hidroperoksid (3). U terminalnoj fazi (4), molekula antioksidant donira vodikov atom peroksilnom radikalu čime nastaje neradikalni produkt (preuzeto i prilagođeno iz Ayala i sur. 2014).

Jedan od najučestalijih načina mjerenja intenziteta lipidne peroksidacije je tiobarbiturnim testom koji omogućava očitavanje jednog od glavnih produkata, a time i indikatora lipidne peroksidacije, reaktivnog aldehida malondialdehida (MDA). Spajanjem MDA s tiobarbiturnom kiselinom (TBA) dolazi do formiranja ružičastog kompleksa MDA-(TBA)₂ koji je detektabilan spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 532 nm. Intenzitet obojenja govori o količini ispuštenog malondialdehida u kiselim uvjetima (Wadhwa i sur. 2012). Mjerenje lipidne peroksidacije omogućava tako procjenu statusa stanične membrane i razine prisutnih reaktivnih vrsta kisika (Downs i sur. 2000).

1.4.2 Proteini toplinskog šoka („heat shock proteins“)

Različiti organizmi razvili su specifične oblike prilagodbi na abiotičke stresore, kao što su promjene u ponašanju, morfološke promjene, izmjene reproduktivnih navika i promjene u staničnom odgovoru. Velika količina stresora (promjene u temperaturi, oksidativni stres, izloženost teškim metalima, osmotske i pH varijacije, UV zračenje i dr.) direktno izaziva različite oblike stanične smrti kod žarnjaka kao i narušavanje proteinske homeostaze u stanicama. Kao odgovor na proteinska oštećenja, akumulaciju abnormalnih proteina, greške u sklapanju ili transportu proteina, inducira se naglo povećanje ekspresije *Hsp* (engl. *Heat shock protein*) gena (Louis i sur. 2017). Takav tzv. „heat shock response“ zaštitni mehanizam omogućava stanicama da prevladaju denaturirajuće i stresne uvjete.

Proteini toplinskog šoka (*Hsp*) konzervirani su molekularni šaperoni, biomarkeri fiziologije i stresa. Pomažu prilikom pravilnog zamatanja proteina, označavanja za transport, sortiranja (Louis i sur. 2017). Proteini su kategorizirani u različite grupe, ovisno o njihovoj veličini (*Hsp60*, *Hsp70*, *Hsp90* i dr.), ali posjeduju i brojne izoforme. Waller i suradnici (2018) pokazali su svojim istraživanjem na žarnjaku *Nematostella vectensis* Stephenson, 1935 kako pojavnost različitih *Hsp70* izoformi varira ovisno o intenzitetu stresa (visini temperature) kojem je organizam izložen. Proteini toplinskog šoka normalno su eksprimirani u stanicama gotovo svih organizama, a pojačana ekspresija uočena je prilikom izlaganja organizama stresorima čime se nastoji regulirati stanični disbalans. Razine nekih od *Hsp* proteina ostaju vrlo visoke u stanici sve dok stres i dalje prevladava. Smatra se da proteini toplinskog šoka imaju važnu ulogu u razvoju tolerancije organizama na stresne okolišne uvjete (Choresch i sur. 2001). O korištenju *Hsp* proteina kao bioindikatora klimatskih promjena ukazuju brojna istraživanja. Choresch i suradnici (2001) po prvi su puta korištenjem imunoloških metoda pokazali promjene u razini ekspresije *Hsp60* kod vlasulje *A. viridis* pod utjecajem naglih i neočekivanih, ali i kontinuiranih sezonskih promjena temperature mora. Povećana ekspresija *Hsp60* pri višim temperaturama

smatra se fenotipskom prilagodbom organizma na stresne uvjete okoliša. Oksidativni stres i umiranje stanica za vrijeme temperaturnog stresa kod vlasulje *A. viridis* pokazali su i Richier i suradnici (2006). Sveobuhvatnije istraživanje Hsp60 odgovora kod beskralježnjaka u stresnim okolišnim uvjetima, provedeno je na čak 5 vrsta iz koljena Porifera i 16 vrsta iz koljena Cnidaria. Choresch i suradnici (2004) pokazali su tako općenitu važnost ovog zaštitnog mehanizma kod beskralježnjaka u potencijalnoj adaptaciji na okolišne promjene i prvu identifikaciju mitohondrijskog proteina toplinskog šoka 60 (mt-Hsp60) kod žarnjaka na molekularnoj razini.

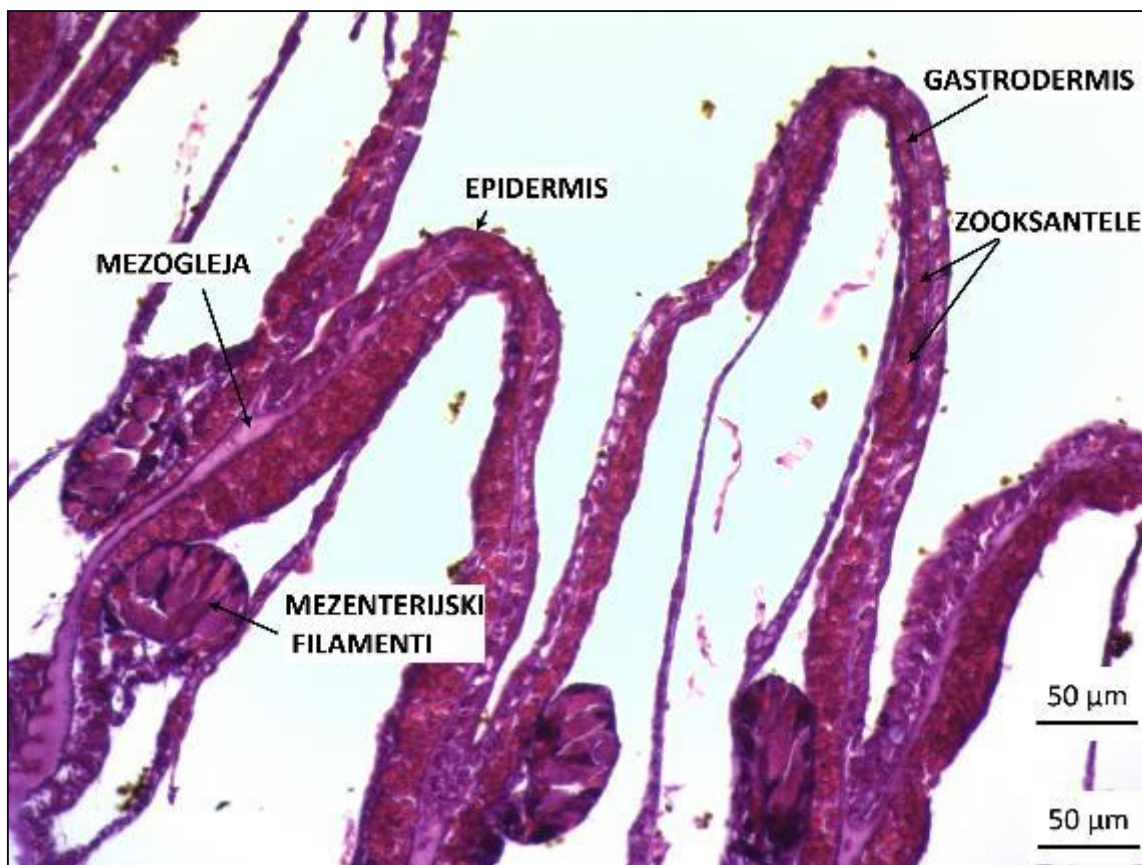
Protein toplinskog šoka 70 (Hsp70) molekularni je šaperon koji je konstitutivno eksprimiran, ali i inducibilno pod utjecajem stresa. Istraživanja biologije razvoja za vrijeme formiranja tjelesnih osi Duffy i suradnika (2012) na žarnjaku *Hydractinia echinata* (Fleming, 1828), dovela su u vezu protein toplinskog šoka 71 (Hsc71 je pripadnik Hsp70 obitelji) sa Wnt signalnim putem. Naime pokazano je da je Hsc71 prisutan u *H. echinata* u svim životnim stadijima, ali je vremenski (ovisno o razvojnom stadiju), prostorno (anatomska lokacija) i ovisno o staničnom tipu, različito eksprimiran. Toplinski tretman povećao je ekspresiju *Hsc71* gena proporcionalno trajanju toplinskog tretmana, a eksprimirao se i u područjima gdje u normalnim uvjetima inače ne postoji. Toplinski tretman dugoročno je smanjio regulaciju komponenti Wnt signalnog puta (povećana regulacija *Hsc71*, pod utjecajem toplinskog tretmana, izazvala je smanjenu regulaciju *Wnt3* ekspresije) i narušio posteriorni razvoj. Istraživanja su pokazala da razine Hsp70 proteina variraju ovisno o stresoru i ovisno o proučavanom organizmu. Protein toplinskog šoka 90 (Hsp90) također se pokazao kao rani biomarker stresnih uvjeta. Molekularni šaperoni male molekularne mase između 12 i 43 kDa (sHSPs eng. „*Small heat shock proteins*“) osim uloge šaperona u sklapanju proteina, sudjeluju i u staničnoj proliferaciji i diferencijaciji, apoptozi, imunološkim reakcijama. Osim konstitutivno, eksprimiraju se i kao odgovor na stresne okolišne uvjete (bilo izlaganju visokim temperaturama ili hladnoći). Nicosia i suradnici (2014) tu su pojavu pokazali kroz značajno povišenu ekspresiju *AvHSP28.6* (*Anemonia viridis* *Hsp-28.6*) kod vlasulje *A. viridis* kao odgovor na ekstremne temperaturne promjene kojima su izlagane (povišenu temperaturu kao i hladni tretman). I kod toplog i kod hladnog tretmana, dolazi do oštećenja i denaturacije proteina, njihove agregacije i u konačnici stanične smrti pa se kod *A. viridis* aktiviraju slični sustavi zaštite i adaptacije na temperaturni stres.

Proteini toplinskog šoka mogu se detektirati imunoenzimskom metodom „sendvič“ ELISA (ELISA, engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Razvojem sustava „ranog upozorenja“

stanja bentičkih organizama kao i karakterizacijom Hsp odgovora kod organizama koraljnog grebena, omogućilo bi se predviđanje kapaciteta preživljavanja temperaturnih fluktuacija kojima su izloženi (Choresh i sur. 2004).

1.5 Histološka i histokemijska istraživanja žarnjaka pod utjecajem klimatskih promjena

Kako bi se odredilo sveobuhvatno stanje organizama pod utjecajem temperaturnog stresa, osim mjerenja molekularnih biomarkera stresa, korisno je ispitati i fizičko stanje tkiva. Histopatološke promjene tkiva poput lezija, promjene u boji (diskoloracije), nekroze, oticanja stanica, stvaranja mukusa i lize stanica jasno upućuju na izmijenjenu tkivnu strukturu, što pomaže u boljem razumijevanju i karakteriziranju utjecaja okolišnih stresora na same organizme. Također, promjene u rasporedu kolagena mogu upućivati na reorganizaciju tkiva uslijed izlaganja organizama temperaturnom stresu (Traylor-Knowles 2019). Žarnjaci nemaju razvijena prava tkiva i organe (Matoničkin i sur. 1998). To su diploblastični organizmi karakteristične tkivne organizacije (*Slika 6*) s dva epitelna monosloja (epiderme i gastroderme) između kojih se nalazi mezogleja kao homogeni vezivni sloj. Unutar gastrovaskularne šupljine vidljive su mezenterne (pregrade) koje pružaju strukturnu potporu, povećavaju površinu gastroderme i nose gonade. Brojna su histološka istraživanja već provedena na žarnjacima. Ainsworth i suradnici (2007) povezali su tako histopatološke promjene koralja Crvenog mora s raznim mikrobima koji kod koralja uzrokuju bolesti. Također, pokazali su koliko je za preciznu dijagnostiku važno objediniti podatke iz različitih područja poput fiziologije, histologije i citologije. Kako bi se u uzorku jasno razlikovali različiti tipovi tkiva i morfološke promjene, koriste se mnogobrojna histološka bojenja koja naglašavaju i vizualiziraju određene vrste tkiva, stanica, organela ili specifične strukture. Najčešće se provodi bojenje hematoksilinom i eozinom (Fischer i sur. 2008; Feldman i Wolfe 2014) za vizualizaciju nukleinske kiseline i proteinskih struktura (BioGnost Hematoxylin H 2019) te Masson trikromnim setom boja za uočavanje mezogleje, vezivnog tkiva, mišića, kolagena i dr. (BioGnost Masson Trichrome Kit 2020). Istraživanje utjecaja temperaturnog stresa Traylor-Knowles (2019), na tkivo koralja *Acropora hyacinthus* (Dana, 1846) Masson trikromnim setom boja, pokazalo je značajne promjene u tkivnoj strukturi i prodiranje kolagena iz mezogleje u gastrodermu kod organizama izloženih temperaturnom stresu.



Slika 6. Karakteristična diploblastična organizacija polipa busenastog kamenog koralja *Cladocora caespitosa* (HE, mjerilo 50 μm).

Istraživanja su pokazala da su koralji (Anthozoa) jedan od razreda s najizraženijim rizikom od negativnih posljedica klimatskih promjena (Chatzimentor i sur. 2023). Crvena moruzgva *Actinia equina* i kameni koralj *Cladocora caespitosa* predstavljaju prikladne modelne organizme za laboratorijska istraživanja klimatskih promjena jer se nalaze pod direktnim utjecajem često naglih i nepredvidivih okolišnih fluktuacija. Za sveobuhvatno razumijevanje utjecaja okolišnih promjena, detaljnu dijagnostiku i pravu procjenu stanja organizama, makroskopska zapažanja morfoloških promjena klasičnim vizualnim metodama korisno je upotpuniti histološkim i histokemijskim analizama kao i rezultatima mjerenja fizioloških parametara organizama.

2 CILJ ISTRAŽIVANJA

Povišene temperature mora kao rezultat globalnih klimatskih promjena s vremenom postaju sve izraženije, a posljedice na koralje (Anthozoa) suočene s navedenim okolišnim fluktuacijama, sve neizvjesnije. U svrhu boljeg razumijevanja zabilježenih problema u Jadranu, glavni ciljevi ovog istraživanja su:

- Utvrditi povezanost povišene temperature mora, u laboratorijskim uvjetima, s fiziološkim i histološkim promjenama u tkivu kamenog koralja *C. caespitosa* i crvene moruzgve *A. equina* primjenom imunokemijskih i histoloških metoda
- Ispitati postoje li mjerljivi znakovi oksidacijskog stresa u tkivima koralja na molekularnoj razini
- Identificirati i kvantificirati stupanj oštećenja i nekroze tkiva na histološkoj razini
- Definirati biološki potencijal promjena oksidacijskog stresa pomoću proteina toplinskog šoka, kao ranih biomarkera temperaturnih promjena, što bi dugoročno omogućilo praćenje temperaturnih promjena na koraljima i u prirodnim staništima

3 MATERIJALI I METODE

Ovo istraživanje provela sam u laboratorijskim uvjetima na dvije vrste iz razreda Anthozoa: kamenom koralju *Cladocora caespitosa* i crvenoj moruzgvi *Actinia equina*.

3.1 Uzorkovanje i eksperimentalni tijek uzgoja kamenog koralja *Cladocora caespitosa* u laboratorijskim uvjetima

U okviru terenskog rada, na koraljnom grebenu u blizini Paškog mosta (GPS koordinate 44.318925, 15.260692), sa dubine od 19 metara i temperature mora od 10 °C, autonomnim SCUBA ronjenjem prikupljeno je 10 busena živih kolonija kamenog koralja *C. caespitosa*. Za aktivnosti uzorkovanja dobivena je potrebna dozvola Ministarstva zaštite okoliša i energetike (KLASA: UP/I-324-01/22-01/110; URBROJ: 525 -12/718-22-2).

Dva busena kamenog koralja sa 30-ak jedinki (polipa) pohranjena su odmah po završetku sakupljanja na -20 °C kako bi predstavljali kontrolu (jedinke koje su živjele pri temperaturi mora od 10 °C). Ostatak od osam živih kolonija kamenog koralja (svaka s 30-60 polipa) transportirano je do laboratorija u plastičnim kutijama s morskom vodom (sakupljenom na mjestu uzorkovanja), reduciranim osvjetljenjem i prijenosnim aeratorima (zračnim pumpama) u periodu od nekoliko sati. U svrhu održavanja i praćenja stanja kamenog koralja *C. caespitosa* uspostavljena su 2 eksperimentalna akvarija (Slika 7). Po četiri busena kamenih koralja nasumično je raspoređeno u svaki od akvarija. Svaki akvarij sadržavao je 30 litara morske vode (sakupljene na mjestu uzorkovanja organizama), protočni unutarnji filter (300 l/h, Aquael), automatski regulirano svjetlo (12h dan/12h noć, 6500K, 650lm, Aquael), 2 kamena prozračivača (pumpa 150 l/min, Crawfish 4500, Flamingo), grijač (50W, Aquael) i 2 kamena (prikupljena na mjestu uzorkovanja). Količinu isparene vode nadopunjavala sam morskom vodom do označene razine volumena uspostavljenog prvoga dana. Organizme sam hranila otopinom *Artemia* račića (25 ml/akvarij) svaka 3 dana. Provjeravala sam parametre vode: nitratne i nitritne ione, tvrdoću vode, koncentraciju klora, pH, tvrdoću karbonata i koncentraciju ugljikovog dioksida pomoću Prodac speedy testa (Tetra). U slučaju odstupanja od početno zabilježenih vrijednosti provodila sam djelomične izmjene vode (10 l) i aplikaciju tekućine za biološku pripremu vode (3 ml/akvarij) Prodac nitridac (Tetra). Proces aklimatizacije oba akvarija, tijekom kojeg se pratio morfološki izgled jedinki, trajao je 7 dana tijekom kojeg se temperatura morske vode spontano podignula s 10 °C na 20 °C. Po isteku perioda aklimatizacije, u jednom od akvarija podizala sam temperaturu morske vode pomoću grijača, 1 °C po danu, do konačne temperature od 30 °C. Drugi akvarij ostao je na stalnoj ambijentalnoj temperaturi od 20 °C. Nakon dva tjedna žrtvovala sam jedinke i uzorkovala tkiva polipa koralja

iz oba akvarija kao i zamrznutih kontrolnih uzoraka pomoću metalne špatule (Slika 8). Jedan uzorak za daljnja imunokemijska istraživanja (jedna Eppendorf epuveta od 2 ml) sadržavao je tkivo 30-45 polipa iz istog kamenog busena. Od svake proučavane temperature (10 °C, 20 °C i 30 °C) pripremila sam po 5 uzoraka, razrijedila ih fosfatnim puferom (PBS, engl. *Phosphate-Buffered Saline*) i pohranila na -20 °C. Dodatno, za daljnja histološka istraživanja, sa busena koralja svake proučavane temperature odlomila sam 10-ak čaški i fiksirala Z-Fix-om (cink formalin, proizvođač: Sigma Aldrich) razrijeđenog s morskom vodom u omjeru 1:4 na 24 sata i pohranila u 70 %-tnom etanolu u hladnjak.



Slika 7. Eksperimentalni akvariji sa kamenim koraljima *C. caespitosa* i crvenim moruzgvama *A. equina* u procesu aklimatizacije. Po završetku aklimatizacije, svi parametri u akvarijima ostali su isti osim temperature. Desni akvarij ostao je na ambijentalnoj temperaturi od 20 °C, a organizmi u lijevom akvariju održavani su na temperaturi od 30 °C.



Slika 8. Čaške kamenog koralja *C. caespitosa* tijekom sakupljanja tkiva metalnom špatulom snimljeno pod binokularnom lupom.

3.2 Uzorkovanje i eksperimentalni tijek uzgoja crvene moruzgve *Actinia equina* u laboratorijskim uvjetima

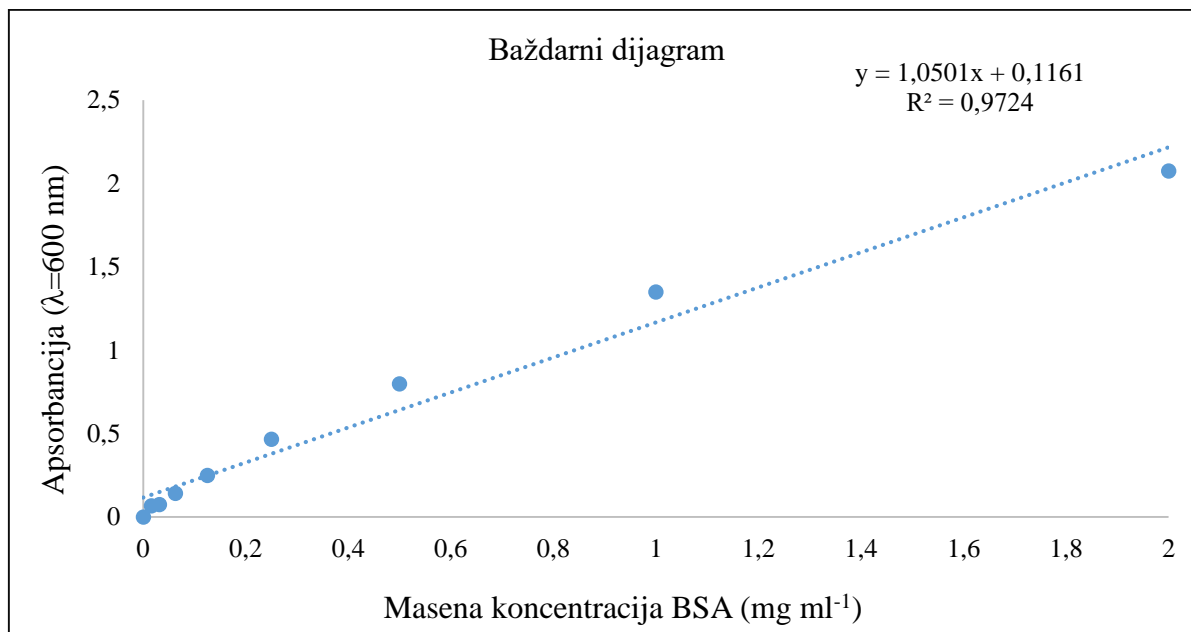
Dvadeset i tri žive jedinke crvene moruzgve *A. equina* uzorkovano je na mediolitoralnom području otoka Krka (GPS koordinate 45.139574, 14.527972) odvajanjem bazalne ploče od stjenovite obale pomoću drvene špatule, pri temperaturi mora od 15 °C. Jedinke su transportirane do laboratorija u plastičnim kutijama s morskom vodom (sakupljenom na mjestu uzorkovanja), reduciranim osvjetljenjem i prijenosnim aeratorima (zračnim pumpama) u periodu od nekoliko sati. Sve sakupljene jedinke prošle su isti proces aklimatizacije i istu postavu okolišnih uvjeta kao i *C. caespitosa* opisano u poglavlju 3.1. Nakon aklimatizacije, 12 jedinki crvene moruzgve ostavila sam u akvariju od 20 °C, a 11 jedinki sam prebacila u akvarij na temperaturu od 30 °C. Nakon dva tjedna pri različitim temperaturnim tretmanima, žrtvovala sam 5 nasumičnih jedinki sa svake od temperatura uzdužnim prerezom skalpela po okomitoj tjelesnoj osi. Polovicu tkiva jedinke pohranila sam na -20 °C za daljnje imunokemijske metode (ukupno 5 uzoraka po temperaturi), dok sam drugu polovicu iste jedinke fiksirala Z-Fix-om (cink formalin, proizvođač: Sigma Aldrich) razrijeđenim morskom vodom u omjeru 1:4 (ukupno 5 uzoraka po temperaturi) i pohranila u 70 %-tnom etanolu u hladnjak za daljnja histološka i histokemijska istraživanja.

3.3 Imunokemijske metode

Suspenzije tkiva koralja i moruzgvi nakon željenog razrjeđivanja fosfatnim (PBS) puferom, homogenizirala sam na ledu u Eppendorf tubicama pomoću ultrazvučnog homogenizatora (Bandelin Sonopuls HD 2070). Dobivene supernatante (ukupno po 5 uzoraka sa svake temperature za svaki od organizama) s oslobođenim proteinima, nakon centrifugiranja homogenata 15 minuta na 15 000 okretaja i temperaturi od 4 °C na centrifugi (Centric 200R), koristila sam u daljnjim imunokemijskim testovima. Imunokemijske metode provodila sam po istom protokolu za oba proučavana organizma.

3.3.1 Određivanje ukupnih proteina kamenog koralja i crvene moruzgve indirektnom metodom po Lowry-u

Indirektnu metodu određivanja koncentracije proteina po Lowry-u provela sam prema protokolu Balta i suradnika (2017). Iz otopine goveđeg serumskog albumina BSA ($\gamma = 2,0$ mg/ml) pripremila sam niz od devet otopina poznatih koncentracija (S_0 - S_8) koje su mi poslužile za konstruiranje baždarnog dijagrama (*Slika 9*).



Slika 9. Baždarni dijagram ovisnosti intenziteta apsorbancije otopina goveđeg serumskog albumina (BSA) o poznatoj masenoj koncentraciji (mg ml⁻¹) BSA u otopini.

Lowry otopina A sadržavala je 2 %-tnu otopinu natrijevog karbonata (Na₂CO₃), Lowry otopina B 1 %-tnu otopinu NaK-tartarata, a Lowry otopina C 0,5 %-tnu otopinu bakrovog (II) sulfata pentahidrata (CuSO₄ x 5H₂O). Otopinu D koju sam dodala na slijepu probu (S₀), pripremljeni standardni niz i supernatante uzoraka kamenog koralja i crvene moruzgve pripremila sam miješanjem otopina A, B i C u omjeru 48:1:1. Nakon desetominutne inkubacije uzoraka s otopinom D, dodala sam otopinu Folin-Ciocalteuovog reagensa razrijeđenog s vodom u omjeru 2:1. Apsorbancije uzoraka očitavala sam na spektrofotometru (Biochrom Libra S22) pri valnoj duljini od 600 nm. Nepoznate masene koncentracije proteina (γ/mg ml⁻¹) iz uzoraka odredila sam iz jednadžbe pravca baždarnog dijagrama konstruiranog iz standardnog niza (Slika 9).

3.3.2 Određivanje enzima oksidacijskog stresa

Određivanje stupnja lipidne peroksidacije pomoću tiobarbiturnog testa (TBARS, engl. *Tiobarbituric Acid Reactive Substances*) provela sam prema protokolu Balta i suradnika (2017). Otopinu A pripremila sam otapanjem 0,81 g natrij dodecil-sulfata (SDS, engl. *Sodium Dodecyl Sulfate*) u 10 ml destilirane vode dH₂O. Otopinu B dobila sam miješanjem 20 ml 99,5 %-tne octene kiseline i 2,32 ml otopine klorovodične kiseline masenog udjela (w) 37 %. Otopinu sam nadopunila do 50 ml dH₂O i pomoću pH-metra podešenog na pH 3,5 nakon čega sam otopinu nadopunila destiliranom vodom do konačnih 100 ml. Otopinu C pripremila sam otapanjem 0,8 g tiobarbiturne kiseline (TBA) u 40 ml destilirane vode dH₂O uz dodatak od 500 μl natrijevog hidroksida (NaOH) množinske koncentracije 5 mol/l. Otopinu sam također nadopunila s

destiliranom vodom do konačnih 100 ml. Otopinu D dobila sam miješanjem otopine A, B i C u omjeru 10:75:75. Apsorbancije kompleksa MDA(TBA)₂ u uzorcima izmjerila sam na spektrofotometru (Biochrom Libra S22) pri valnoj duljini od 532 nm. Množinske koncentracije malondialdehida (MDA) iz uzoraka kamenog koralja i crvenih moruzgvi izračunala sam prema formuli:

$$c(MDA) = \frac{A_{uzorak} \times V_{reakcijske\ smjese} (ml)}{l \times \varepsilon \times V_{uzorka} (ml) \times c_{proteina} (mg \times ml^{-1})}$$

gdje simboli predstavljaju:

$c(MDA)$ – množinska koncentracija MDA u nmol mg⁻¹ proteina

$A(uzorak)$ – izmjerena apsorbancija uzorka pri valnoj duljini od 600 nm

$V(reakcijske\ smjese)$ – 1,7 ml (100 μl uzorka + 1,6 ml otopine D)

l – duljina kivete (1 cm)

ε – molarni ekstinkcijski koeficijent 1,56 x 10⁵ l mol⁻¹ cm⁻¹

$V(uzorka)$ – 100 μl

$c(proteina)$ – izračunana masena koncentracija proteina u uzorku (mg x ml⁻¹)

Određivanje koncentracije ukupnog glutationa (GSH) iz homogenata tkiva kamenog koralja i crvene moruzgve provela sam prema protokolu Balta i suradnika (2017). Mjerenje apsorbancije na čitaču mikrotitarske pločice (Bio-Rad Model 550) pri valnoj duljini od 412 nm omogućilo mi je određivanje ukupne koncentracije GSH pomoću formule:

$$c(GSH) = \frac{\Delta A_{uzorka} \times V_{reakcijske\ smjese} (ml) \times d}{\varepsilon \times V_{uzorka} (ml) \times c_{proteina} (mg \times ml^{-1})}$$

gdje simboli predstavljaju:

$c(GSH)$ – ukupna koncentracija glutationa (GSH) u uzorku (mU/mg proteina)

$\Delta A(uzorak) = A_{bez\ enzima} - A_{s\ enzimom}$

d – faktor razrjeđenja uzorka

$\varepsilon (DTNB)$ – molarni ekstinkcijski koeficijent 8,22 l mmol⁻¹ cm⁻¹

$c(proteina)$ – koncentracija proteina u mg ml⁻¹

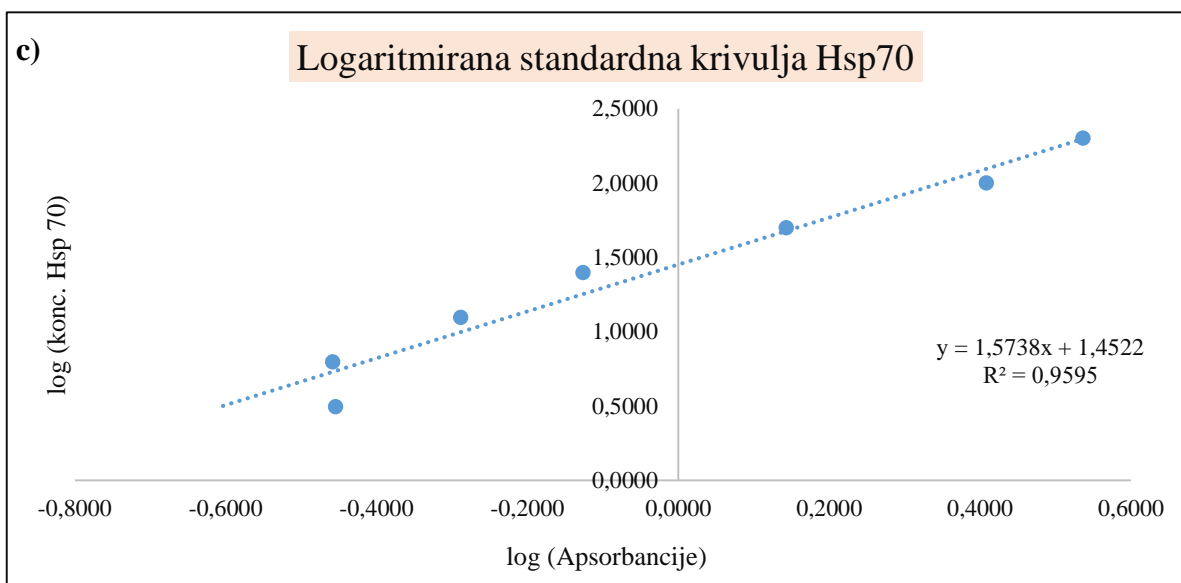
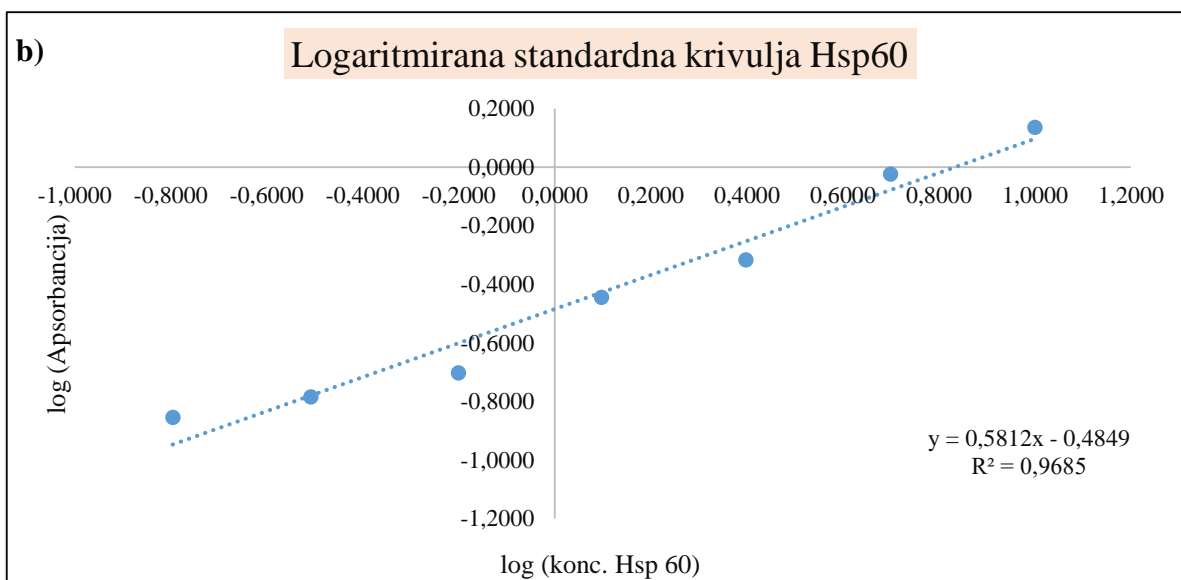
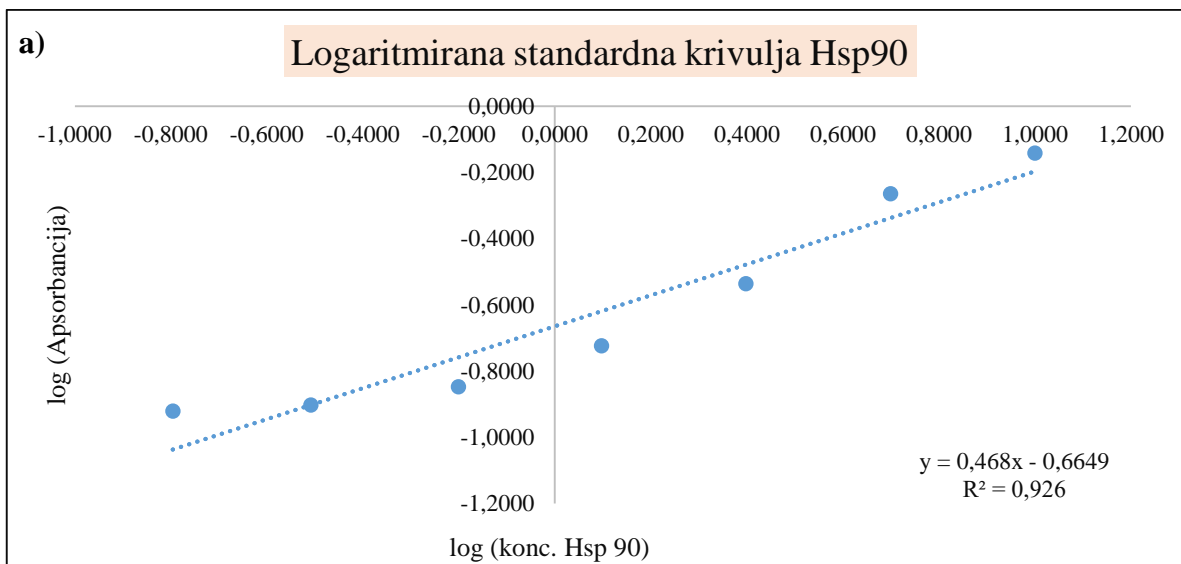
3.3.3 Određivanje proteina toplinskog šoka (Hsp)

Proteine toplinskog šoka 90 (Hsp90), 60 (Hsp60) i 70 (Hsp70) odredila sam metodom imunoenzimskog testa „sendvič“ ELISA prema protokolu proizvođača MyBioSource, mišjim kitovima katalognih brojeva MBS2512363, MBS2509804, MBS8806642.

Proteine toplinskog šoka 90 (Hsp90) i 60 (Hsp60) mjerila sam jednakim protokolima. U jažice mikrotitarske pločice obložene specifičnim antitijelom za mišji Hsp90, odnosno Hsp60 dodala sam 100 µl standarda/uzoraka. Inkubaciju u trajanju od 90 minuta provela sam na 37 °C u KemoLab Memmert inkubatoru. Nakon odlijevanja tekućina iz jažica, dodala sam 100 µl biotiniziranog detekcijskog antitijela. Inkubaciju u istim uvjetima provela sam u trajanju od 60 minuta. Nakon trostrukih ispiranja s 350 µl pufera za ispiranje, dodala sam 100 µl hrenove peroksidaze, HRP konjugata (engl. *Avidin-Horseradish Peroxidase*) i inkubirala u istim uvjetima na 30 minuta. Nakon pet ispiranja puferom za ispiranje, dodala sam 90 µl supstratnog reagensa i inkubirala pločicu u periodu od 15 do 30 minuta do razvoja plavog obojenja. Dodatkom 50 µl stop reagensa prekinula sam reakciju u jažicama.

Proteine toplinskog šoka 70 (Hsp70) određivala sam prema malo drugačijem protokolu. Nakon prve inkubacije u trajanju od 80 minuta na 37 °C provela sam trostruka ispiranja jažica s 200 µl pufera za ispiranje. Inkubacija 100 µl biotiniziranog detekcijskog antitijela u istim uvjetima trajala je 50 minuta. Nakon peterostrukih ispiranja jažica puferom za ispiranje, dodala sam 90 µl TBN supstratne otopine (engl. *Tert-Butyl Nitrite*) i inkubirala na 37 °C kroz 20 minuta do razvoja plavog obojenja. Dodatkom 50 µl stop reagensa, tekućina u jažicama poprimila je žutu boju i reakcija je prekinuta. Apsorbancije svih Hsp proteina mjerila sam na 450 nm na čitaču mikrotitarskih pločica (Tecan Infinite M Plex).

Rezultate mjerenja proteina toplinskog šoka Hsp90, Hsp60 i Hsp70 dobila sam logaritmiranjem eksponencijalnih standardnih krivulja (krivulje sam konstruirala iz otopina standardnog niza) čime sam provela linearizaciju (*Slika 10*). Logaritme koncentracija Hsp90/60/70 izrazila sam iz dobivenih jednadžbi pravaca, a antilogaritmiranjem tih vrijednosti dobila sam prave koncentracije Hsp90/60/70 u uzorcima.



Slika 10. Logaritmirane standardne krivulje za Hsp90 (a), Hsp60 (b) i Hsp70 (c).

3.4 Histološke i histokemijske metode

3.4.1 Priprema histoloških preparata

Fragmente *C. caespitosa* sam nakon fiksacije u Z-Fix-u dekalificirala uranjanjem na 24 sata u otopinu RDO Rapid Decalcifier (Apex Engineering Products Corporation).

Tkiva kamenog koralja i crvene moruzgve sam dehidrirala postepenim prebacivanjem (dekantiranjem) uzoraka kroz rastući niz alkohola (Histanol 70, 80 i 96, Biognost; Ethanol absolute anhydrous, Carlo Erba reagents) sve do kloroforma (Carlo Erba reagents) (*Tablica 1*).

Tablica 1. Protokol za dehidraciju tkiva

Kemikalije za dehidraciju tkiva	Trajanje
70 %-tni alkohol 1	5 tjedana
70 %-tni alkohol 2	1 sat
96 %-tni alkohol	1 sat
100 %-tni alkohol 1	1 sat
100 %-tni alkohol 2	1 sat
Kloroform	24 sata

Nakon 24-satnog čuvanja uzoraka u kloroformu, uslijedio je proces uklapanja tkiva u blokove paraplata (Biowax Plus 56/58, Biognost). Cijeli proces provela sam u termostatu (Shel Lab) na 60 °C. Izmjenu smjesa potrebnih za uklop uzoraka (*Tablica 2*) provodila sam dekantiranjem prijašnje i dolijevanjem sljedeće smjese u staklenim posudicama s uzorcima.

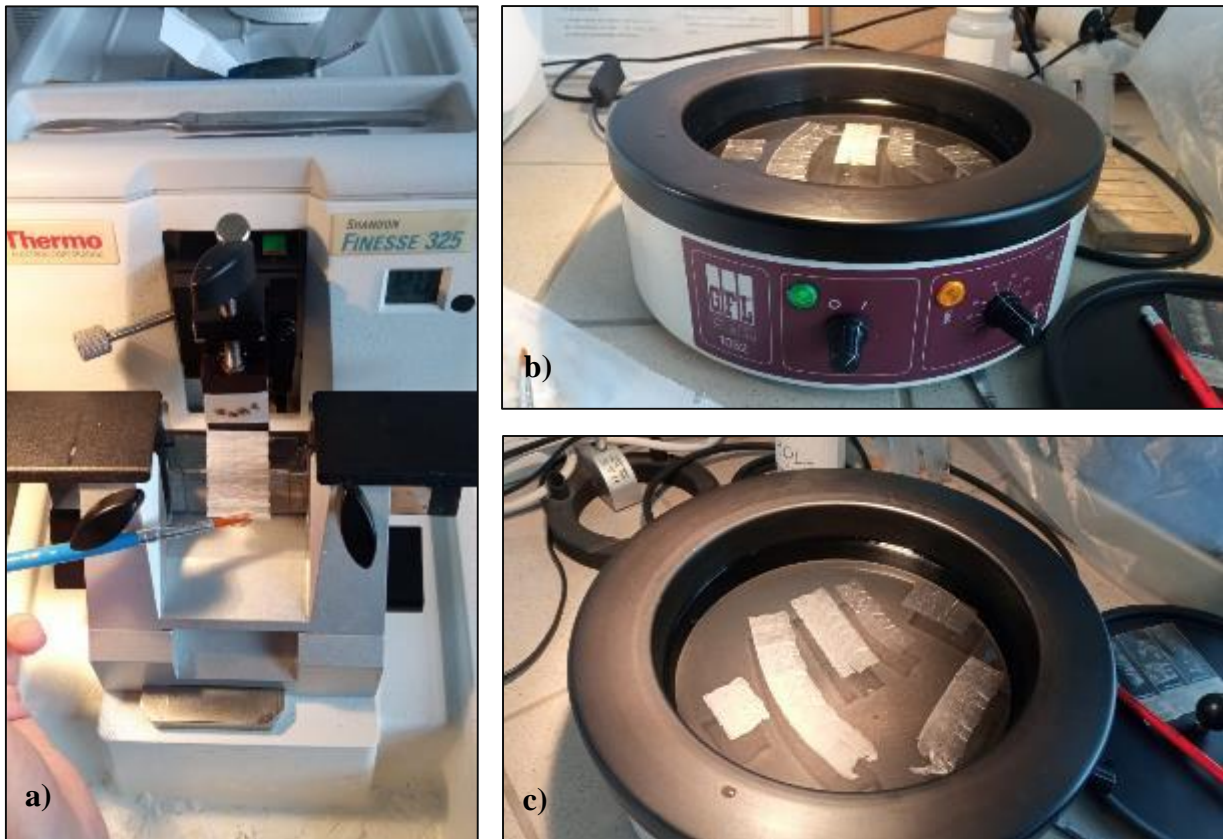
Tablica 2. Protokol za uklapanje uzoraka tkiva u blokove paraplata.

Smjese za uklapanje tkiva	Trajanje (min)
kloroform : paraplast (1:1)	60
Paraplast 1	60
Paraplast 2	60
Čisti paraplast	do stvrdnjavanja

Uzorke sam u paraplatsu orijentirala na način da se kasnijim rezanjem blokova dobije poprečni presjek organizama. Kao kalup za blokove paraplata s uzorcima koristila sam lađice od masnog papira. Pripremila sam po 5 parafinskih blokova za oba organizma i svaku od proučavanih temperatura. Parafinski blokovi kamenog koralja *C. caespitosa* sastojali su se od 2-3 polipa,

koja sam uzorkovala s različitih dijelova busena, dok sam kod uzoraka crvene moruzgve *A. equina*, ovisno o veličini jedinke, uklopila polovicu ili četvrtinu jedinke. Histološke prezeze dobila sam rezanjem uklopljenih uzoraka tkiva na rotacijskom mikrotomu (Shadon Finesse 325, Thermo Fisher Scientific) (*Slika 11*) na debljinu od 10 mikrona. Dobiveni prezezi ravnali su se nekoliko minuta na 40 °C u vodenoj kupelji (GFL 1052) prije stavljanja na predmetna stakalca (VitroGnost, Biognost) na koje sam prethodno nanijela tanak sloj glicerina bjelanjka kao adhezivnog sredstva.

Prezezi tkiva kamenog koralja i crvenih moruzgvi sušili su se kroz dva dana na sobnoj temperaturi u uspravnom položaju na predmetnim stakalcima na drvenom stalku. Od svakog uklopljenog uzorka tkiva (pet po temperaturi i po organizmu) napravila sam 4 predmetna stakalca sa po 3-4 prezeza.



Slika 11. Rezanje uzoraka tkiva kamenog koralja i crvenih moruzgvi uklopljenih u parafinske blokove na tanke histološke prezeze debljine 10 mikrona pomoću mikrotoma (a), ravnanje prezeza u vodenoj kupelji na 40 °C (b), izravnani histološki prezezi netom prije prebacivanja na predmetna stakalca (c).

3.4.2 Bojenje histoloških preparata

Prije samog bojenja uzoraka, provela sam postupak uklanjanja paraplasta kroz deparafiniranje u ksilenu (BioClear, Biognost) i rehidriranje kroz padajuće koncentracije alkohola (Histanol 95 i 100, Biognost) i vode (*Tablica 3*).

Tablica 3. Protokol deparafiranja i rehidriranja uzoraka prije histološkog bojenja.

Deparafiniranje i rehidriranje	Trajanje (u minutama)
Ksilen 1	2
Ksilen 2	2
Ksilen 3	2
100 %-tni alkohol 1	5
100 %-tni alkohol 2	3
95 %-tni alkohol	2
Destilirana voda	2

Bojenje prvog seta uzoraka tkivnih prereza mješavinom bazične boje hematoksilina i kiselog eozina (HE; *Slika 12a*) provela sam prema BioGnostovom protokolu (2019). Uzorke sam uronila u Hematoksilin H boju (Biognost) u trajanju od 3 minute, potom isprala pod tekućom vodom 3 minute, zatim uronila u destiliranu vodu i naknadno u 95 %-tni alkohol u trajanju od 30 sekundi. Bojenje uzoraka kontrastnom otopinom 0,5 %-tnog Eozina Y (Biognost) provela sam u trajanju od 2 minute, nakon kojeg sam ih ispirala pod tekućom vodom 2 minute.

Bojenje drugog seta uzoraka tkivnih prereza Masson trikromnim setom boja također sam provela prema BioGnostovom protokolu (2020) i s njihovim reagensima (*Slika 12b*). Uzorke sam prvo dodatno fiksirala Bujonovom otopinom u Coplin posudi na 56 °C u trajanju od 60 minuta u vodenoj kupelji, a potom sam ih hladila 10 minuta u hladnjaku. Stakalca sam zatim ispirala pod tekućom i destiliranom vodom 10 sekundi, pa potom na njih aplicirala 5 kapi boje hematoksilin Weigert A i 5 kapi otopine Ferri reagensa Weigert B i inkubirala u digestoru 20 minuta. Nakon ispiranja pod tekućom vodom, na preparate sam dodala oko 5 kapi Biebrich Scarlet-Acid Fuchsin reagensa i inkubirala 20 minuta, nakon čega sam ih ispirala pod destiliranom vodom do prestanka ispuštanja boje, a zatim prekrila s oko 5 kapi PTA-PMA reagensa i inkubirala 10 minuta. Aniline Blue reagens dodala sam bez prethodnog ispiranja stakalaca i inkubirala 7 minuta, a zatim isprala pod destiliranom vodom do prestanka ispuštanja obojenja te potom dodala 5 kapi 1 %-tne octene kiseline u trajanju od 1-2 sekunde. Preparate

Tablica 4. Protokol za dehidraciju u rastućim koncentracijama alkohola i bistrenje u ksilenu.

Kemikalija	Trajanje
95 %-tni alkohol	2 izmjene s 10-15 urona
100 %-tni alkohol	2 izmjene s 10-15 urona
Ksilen	2 izmjene u trajanju od 2 minute

3.5 Analiza podataka

Rezultate provedenih imunokemijskih testova statistički sam obradila pomoću programa GraphPad Prism 9. Dobiveni rezultati prikazani su kao srednje vrijednosti 5 replika \pm standardna pogreška. S obzirom da podaci nisu pratili normalnu distribuciju (provjereno Shapiro-Wilk testom), za analizu podataka iz tkiva kamenog koralja primijenila sam Kruskal-Wallis neparametrijski test sa razinom značajnosti $\alpha = 0,05$ i Post-hoc Dunnov test ($p < 0,05$). Dobivene rezultate biomarkera oksidativnog stresa kod crvene moruzgve analizirala sam pomoću Mann-Whitney *U* neparametrijskog testa. Granicu statističke značajnosti postavila sam na $p < 0,05$.

Histološki preparati analizirani su na svjetlosnom mikroskopu Nikon Eclipse E600 s digitalnom kamerom AxioCam ERc5s i obrađeni u softverskom programu ZEN2 lite (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Njemačka). Histopatološke lezije kvalitativno su klasificirane kroz: prisutnost nekrotičnih stanica (citoplazmatske promjene, karioreksiju, kariolizu, piknozu), propadanje i ljuštenje gastroderma, fragmentaciju tkiva (gubitka integriteta i funkcionalnosti epiderme), morfološke promjene stanica simbiotskih dinoflagelata, brojnost mezenterijskih filamenata, prisutnost i brojnost jajnih stanica i ne/prisutnost parazita.

3.5.1 Analiza poklapanja sekvenci proteina toplinskog šoka

Zbog nedostupnosti setova za testiranje proteina toplinskog šoka iz koralja provedena je usporedna analiza sličnosti aminokiselinskih sekvenci koralja i miševa (čiji je set za detekciju Hsp dostupan). Sekvence proteina toplinskog šoka (Hsp60, Hsp70 i Hsp90) identificirane su i preuzete iz baze podataka National Center for Biotechnology Information database (NCBI). Prikupljene sekvence su poravnate u računalnom programu Clustal Omega (Madeira i sur. 2022) koristeći algoritam MUSCLE (Edgar 2004) i vizualizirane pomoću računalnog programa ESPript 3.0 (Robert i Gouet 2014). Matrice identičnosti i sličnosti aminokiselina dobivene su pomoću računalnog alata Matrix Global Alignment tool (MatGAT2.01 with the BLOSUM62 score) (Campanella i sur. 2003).

4 REZULTATI

4.1 Analiza biomarkera oksidacijskog stresa

Rezultati dobivenih masenih koncentracija ukupnih proteina za sve uzorke oba organizma prikazani su u *Tablici 5*. Masene koncentracije ukupnih proteina u uzorcima kamenog koralja i crvenih moruzgvi određene su metodom po Lowry-u iz jednadžbe pravca baždarnog dijagrama poznatih koncentracija otopina goveđeg serumskog albumina BSA (*Slika 9*).

Tablica 5. Izmjerene apsorbancije otopina proteina iz uzoraka kamenog koralja *Cladocora caespitosa* i crvene moruzgve *Actinia equina* i izračunate masene koncentracije ukupnih proteina u uzorcima pomoću nagiba pravca i odsječka na y-osi baždarne krivulje (*Slika 9*). Kratica CLA predstavlja modelni organizam *C. caespitosa*, a kratica M crvenu moruzgvu *A. equina*. Prvi broj u kratlici predstavlja temperaturu kojom je organizam izlagan, a drugi broj redni broj replikata.

Kratice uzoraka	Apsorbancije ($\lambda=600$ nm)	Masene koncentracije (mg/ml)
CLA 10.1	2,53	2,2987
CLA 10.2	2,403	2,1778
CLA 10.3	2,394	2,1692
CLA 10.4	2,23	2,0130
CLA 10.5	1,887	1,6864
CLA 20.1	1,903	1,7016
CLA 20.2	1,802	1,6055
CLA 20.3	2,124	1,9121
CLA 20.4	2,031	1,8235
CLA 20.5	1,942	1,7388
CLA 30.1	2,106	1,8950
CLA 30.2	2,344	2,1216
CLA 30.3	2,25	2,0321
CLA 30.4	2,306	2,0854
CLA 30.5	2,366	2,1426
M 20.1	0,874	0,7217
M 20.2	0,78	0,6322
M 20.3	0,769	0,6218
M 20.4	1,106	0,9427
M 20.5	0,783	0,6351
M 30.1	1,627	1,4388
M 30.2	0,953	0,7970
M 30.3	1,714	1,5217
M 30.4	0,743	0,5970
M 30.5	0,777	0,6294

Izmjerene koncentracije malondialdehida, glutationa i proteina toplinskog šoka u daljnjim rezultatima iskazane su u odnosu na koncentracije ukupnih proteina iz *Tablice 5*.

4.1.1 Analiza sekvenci proteina toplinskog šoka

Provedena usporedna analiza aminokiselinskih sekvenci homologa proteina Hsp90/60/70, između ljudi, miševa i koralja, pokazuje visoku očuvanost (područja označena crvenim okvirima sa *Slike 13*, *Slike 14* i *Slike 15*) od 79,4 – 89 % (*Tablica 6*). Analiza je potvrdila kompatibilnost primijenjenog komercijalno dostupnog Mišjeg Hsp ELISA kompleta s koraljima.

Tablica 6. Analiza sličnosti/identičnosti za sekvence proteina Hsp90 na temelju *Slike 13 (a)*, Hsp60 na temelju *Slike 14 (b)* i Hsp70 na temelju *Slike 15 (c)* između čovjeka *Homo sapiens* (Hsa), miša *Mus musculus* (Mmu), koralja *Paramuricea clavata* (Pcl) i koralja *Acropora cervicornis* (Ace).

a)	Hsa90	Mmu90	Ace90
Hsa90	-	99 %	75.9 %
Mmu90	99.7 %	-	75.8 %
Ace90	89 %	88.6 %	-
b)			
	Hsa60	Mmu60	Ace60
Hsa60	-	97.6 %	65.9 %
Mmu60	98.3 %	-	65.2 %
Ace60	79.5 %	79.4 %	-
c)			
	Hsa70	Mmu70	Pcl70
Hsa70	-	94.9 %	76.2 %
Mmu70	96.4 %	-	77 %
Pcl70	87.2 %	87.5 %	-



Slika 13. Poravnanje sekvenci proteina toplinskog šoka 90 (Hsp90) kod čovjeka *Homo sapiens* (Hsa90), miša *Mus musculus* (Mmu90) i koralja *Paramuricea clavata* (Pcl90). Crveni okviri s bijelim slovima označavaju strogu podudarnost. Sekvence su poravnate koristeći računalni program Clustal Omega (Madeira i sur. 2022) i vizualizirane koristeći računalni program ESPript 3.0 (Robert i Gouet 2014).



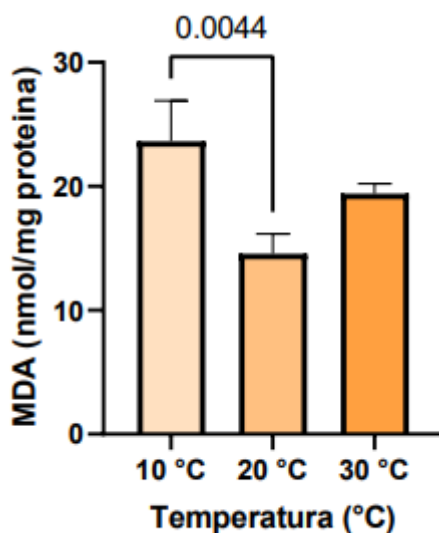
Slika 14. Poravnanje sekvenci proteina toplinskog šoka 60 (Hsp60) kod čovjeka *Homo sapiens* (Hsa60), miša *Mus musculus* (Mmu60) i koralja *Acropora cervicornis* (Ace60). Crveni okviri s bijelim slovima označavaju strogu podudarnost. Sekvence su poravnate koristeći računalni program Clustal Omega (Madeira i sur. 2022) i vizualizirane koristeći računalni program ESPript 3.0 (Robert i Gouet 2014).



Slika 15. Poravnanje sekvenci proteina toplinskog šoka 70 (Hsp70) kod čovjeka *Homo sapiens* (Hsa70), miša *Mus musculus* (Mmu70) i koralja *Paramuricea clavata* (Pcl70). Crveni okviri s bijelim slovima označavaju strogu podudarnost. Sekvence su poravnate koristeći računalni program Clustal Omega (Madeira i sur. 2022) i vizualizirane koristeći računalni program ESPript 3.0 (Robert i Gouet 2014).

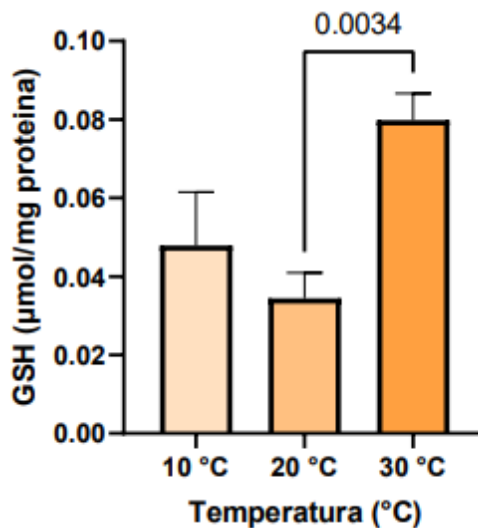
4.1.2 Kameni koralj *Cladocora caespitosa*

Stupanj lipidne peroksidacije kamenog koralja *C. caespitosa* prikazan je na *Slici 16* kroz izmjerene koncentracije malondialdehida (MDA) iz homogenata tkiva. Srednje vrijednosti MDA za uzorke s temperature 10 °C, 20 °C i 30 °C iznose redom 23,63 nmol/mg proteina, 14,56 nmol/mg proteina i 19,42 nmol/mg proteina. Kruskal-Wallis neparametrijski test ($H = 10,50$, p -vrijednost = 0,0004, $\alpha = 0,05$) pokazao je da postoji značajna razlika među grupama. Statistički je značajan odnos rezultata između temperature od 10 °C i 20 °C (Dunnov test, $p = 0,0044$), dok razlika rezultata s 10 °C i 20 °C u odnosu na 30 °C nije pokazala statističku značajnost.



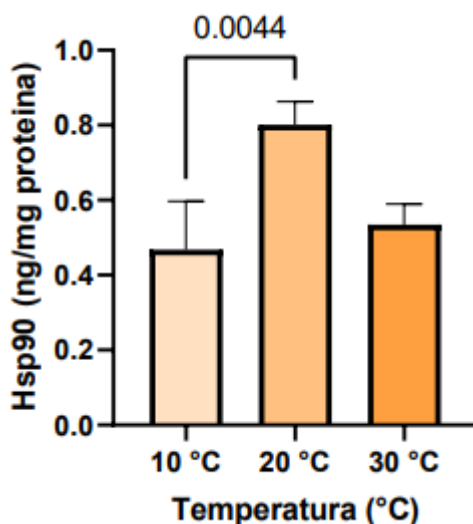
Slika 16. Koncentracije malondialdehida (MDA) kamenog koralja *C. caespitosa* izražene po mg ukupnih proteina za tri ispitivane temperature. Iskazane su srednje vrijednosti 5 replika \pm standardna pogreška i statistička značajnost razlike (Kruskal-Wallis test, $\alpha = 0,05$, Dunnov test $p = 0,0044$).

Slika 17 prikazuje odnos izračunatog ukupnog glutationa (GSH) iz homogenata tkiva kamenog koralja *C. caespitosa* za dva eksperimentalna temperaturna tretmana (20 °C i 30 °C) i kontrolu iz mora (10 °C). Srednje vrijednosti GSH za uzorke s temperature 10 °C, 20 °C i 30 °C iznose redom 0,047 $\mu\text{mol/mg}$ proteina, 0,034 $\mu\text{mol/mg}$ proteina, 0,08 $\mu\text{mol/mg}$ proteina. Testna varijabla H Kruskal-Wallis testa iznosi 10,82 (p -vrijednost = 0,0002, $\alpha = 0,05$). Statistička značajnost pokazana je između rezultata s temperature od 20 °C i 30 °C (Dunnov test, $p = 0,0034$), dok odnos rezultata sa 10 ° i 20 °C naprema 30 °C nije pokazao statističku značajnost.



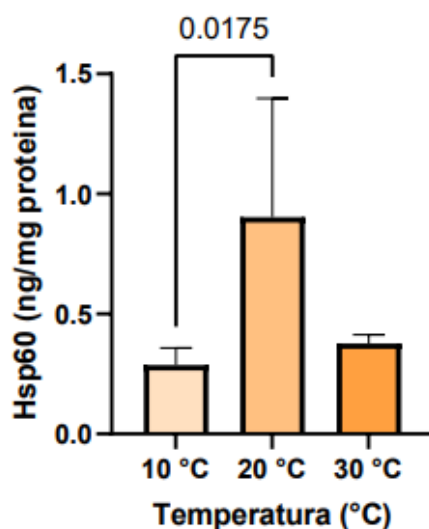
Slika 17. Koncentracije ukupnog glutationa (GSH) izražene po mg ukupnih proteina u uzorcima tkiva kamenog koralja *C. caespitosa* s tri testirane temperature. Iskazane su srednje vrijednosti 5 replika \pm standardna pogreška i statistička značajnost razlike (Kruskal-Wallis, $\alpha = 0,05$ i Dunnov test, $p = 0,0034$).

Srednje vrijednosti Hsp90 za uzorke kamenog koralja s temperature 10 °C, 20 °C i 30 °C prikazane su na *Slici 18* i iznose redom 0,468 ng/mg proteina, 0,801 ng/mg proteina i 0,534 ng/mg proteina. Provedenim Kruskal-Wallis testom dobivena je testna varijabla H koja iznosi 10,50 (p -vrijednost = 0,0004, $\alpha = 0,05$). Prikazana je statistički značajna razlika među uspoređivanim uzorcima s temperature od 10 °C i 20 °C (Dunnov test $p = 0,0044$), dok isti u odnosu na 30 °C nisu pokazali statističku značajnost.



Slika 18. Prikaz koncentracije proteina toplinskog šoka 90 (Hsp90) po mg ukupnih proteina u uzorcima tkiva kamenog koralja *C. caespitosa* za tri testirane temperature. Iskazane su srednje vrijednosti 5 replika \pm standardna pogreška i statistička značajnost razlike (Kruskal-Wallis, $\alpha = 0,05$ i Dunnov test, $p = 0,0044$).

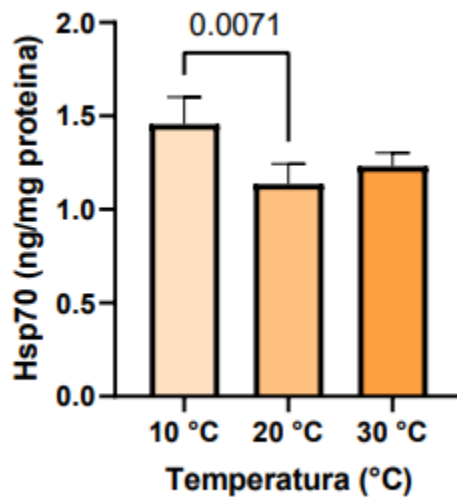
Srednje vrijednosti Hsp60 za uzorke s temperature 10 °C, 20 °C i 30 °C prikazane su na *Slici 19* i iznose redom 0,287 ng/mg proteina, 0,903 ng/mg proteina i 0,376 ng/mg proteina. Kruskal-Wallis testom (p -vrijednost = 0,013, $\alpha = 0,05$) izračunata je testna varijabla $H = 7,620$ i iskazana značajna razlika među grupama. Dunnovim usporednim testom prikazana je statistički značajna razlika između uzoraka s temperature od 10 °C i 20 °C ($p = 0,0175$), dok isti u odnosu na 30 °C nisu pokazali statističku značajnost.



Slika 19. Prikaz koncentracije proteina toplinskog šoka 60 (Hsp60) po mg ukupnih proteina u uzorcima tkiva kamenog koralja *C. caespitosa* za tri testirane temperature. Iskazane su srednje

vrijednosti 5 replika \pm standardna pogreška i statistička značajnost razlike (Kruskal-Wallis, $\alpha = 0,05$ i Dunnov test, $p = 0,0175$).

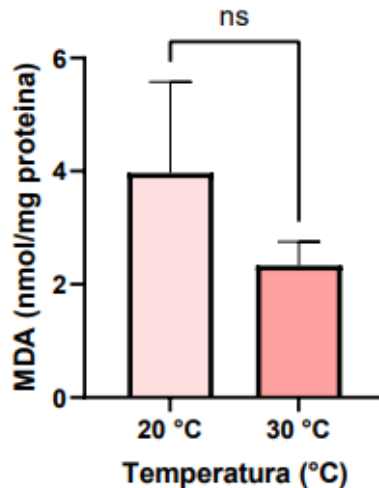
Srednje vrijednosti Hsp70 za uzorke s temperature 10 °C, 20 °C i 30 °C prikazane su na *Slici 20* i iznose redom 1,456 ng/mg proteina, 1,136 ng/mg proteina i 1,231 ng/mg proteina. Provedeni Kruskal-Wallis test ($H = 9,38$ i p -vrijednost = 0,0029) pokazao je da postoji statistički značajna razlika među grupama, a Dunnovim je testom potvrđena signifikantna razlika između uspoređivanih uzoraka s temperature od 10 °C i 20 °C ($p = 0,0071$), dok isti u odnosu na 30 °C nisu pokazali statističku značajnost.



Slika 20. Prikaz koncentracije proteina toplinskog šoka 70 (Hsp70) po mg ukupnih proteina u uzorcima tkiva kamenog koralja *C. caespitosa* za tri testirane temperature. Iskazane su srednje vrijednosti 5 replika \pm standardna pogreška i statistička značajnost razlike (Kruskal-Wallis, $\alpha = 0,05$ i Dunnov test, $p = 0,0071$).

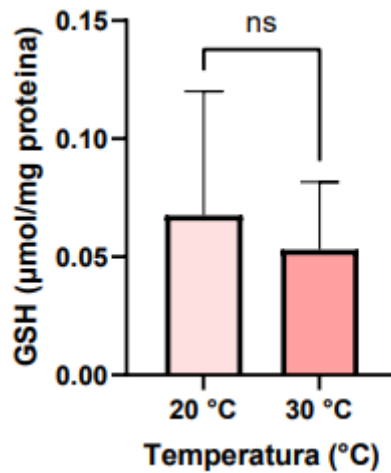
4.1.3 Crvena moruzgva *Actinia equina*

Stupanj lipidne peroksidacije crvene moruzgve *A. equina* prikazan je na *Slici 21* kroz izmjerene koncentracije malondialdehida (MDA) iz homogenata tkiva. Srednje vrijednosti MDA za uzorke s temperatura 20 °C i 30 °C iznose redom 3,97 nmol/mg proteina i 2,33 nmol/mg proteina. Provedeni Mann-Whitney neparametrijski test ($U = 4$ i p -vrijednost = 0,0952) nije pokazao statistički značajnu razliku među uzorcima s dvije testirane temperature.



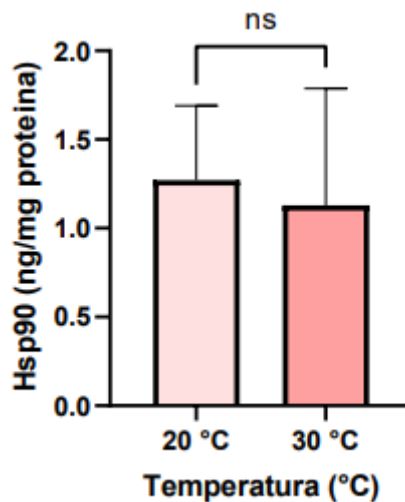
Slika 21. Koncentracije malondialdehida (MDA) crvene moruzgve *A. equina* izražene u nmol po mg ukupnih proteina iskazane za dvije ispitivane temperature. Iskazane su srednje vrijednosti 5 replika \pm standardna pogreška. Oznaka ns izražava razliku koja nije statistički značajna (Mann-Whitney, $p < 0,05$).

Izračunati ukupni glutation (GSH) iz homogenata tkiva crvene moruzgve *A. equina* prikazan je na *Slici 22* za dva provedena temperaturna tretmana. Srednje vrijednosti GSH za uzorke s temperature 20 °C i 30 °C iznose redom 0,067 μ mol/mg proteina i 0,053 μ mol/mg proteina. Provedeni Mann-Whitney neparametrijski test ($U = 11$ i egzaktna p -vrijednost = 0,8016) nije pokazao statistički značajnu razliku među uzorcima s dvije testirane temperature.



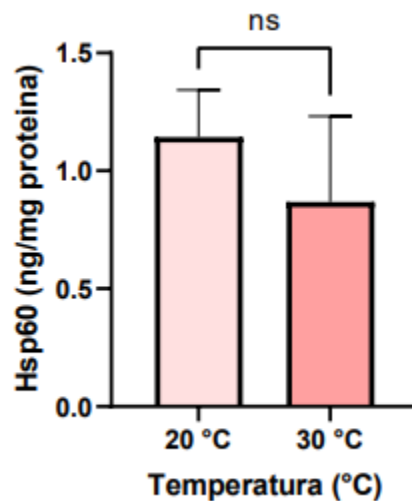
Slika 22. Ukupne koncentracije glutationa (GSH) izražene po mg ukupnih proteina u uzorcima crvene moruzgve *A. equina* sa dvije testirane temperature. Iskazane su srednje vrijednosti 5 replika \pm standardna pogreška. Oznaka ns izražava razliku koja nije signifikantna (Mann-Whitney, $p < 0,05$).

Srednje vrijednosti Hsp90 za uzorke crvene moruzgve s testiranih temperatura mora 20 °C i 30 °C prikazane su na *Slici 23* i iznose redom 1,271 ng/mg proteina i 1,129 ng/mg proteina. Provedeni neparametrijski Mann-Whitney test ($U = 10$ i p -vrijednost = 0,6903) nije pokazao statistički značajnu razliku među uzorcima s dvije testirane temperature.



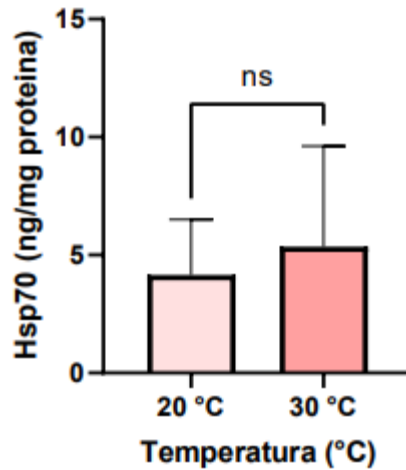
Slika 23. Prikaz koncentracija proteina toplinskog šoka 90 (Hsp90) po mg ukupnih proteina u uzorcima crvene moruzgve *A. equina* sa dvije testirane temperature. Iskazane su srednje vrijednosti 5 replika \pm standardna pogreška. Oznaka ns izražava razliku koja nije statistički značajna (Mann-Whitney, $p < 0,05$).

Slika 24 prikazuje srednje vrijednosti Hsp60 za uzorke crvene moruzgve s testiranih temperatura 20 °C i 30 °C koje redom iznose 1,143 ng/mg proteina i 0,869 ng/mg proteina. Provedeni neparametrijski Mann-Whitney test ($U = 7$ i p -vrijednost = 0,3095) nije pokazao statistički značajnu razliku među uzorcima s dvije testirane temperature.



Slika 24. Prikaz koncentracija proteina toplinskog šoka 60 (Hsp60) po mg ukupnih proteina u uzorcima crvene moruzgve *A. equina* za dvije testirane temperature. Iskazane su srednje vrijednosti 5 replika \pm standardna pogreška. Oznaka ns izražava razliku koja nije statistički značajna (Mann-Whitney, $p < 0,05$).

Srednje vrijednosti Hsp70 za uzorke crvene moruzgve s testiranih temperatura 20 °C i 30 °C prikazane su na *Slici 25* i iznose redom 4,159 ng/mg proteina i 5,352 ng/mg proteina. Provedeni neparametrijski Mann-Whitney test ($U = 11$ i p -vrijednost = 0,8413) nije pokazao statistički značajnu razliku među uzorcima s dvije testirane temperature.

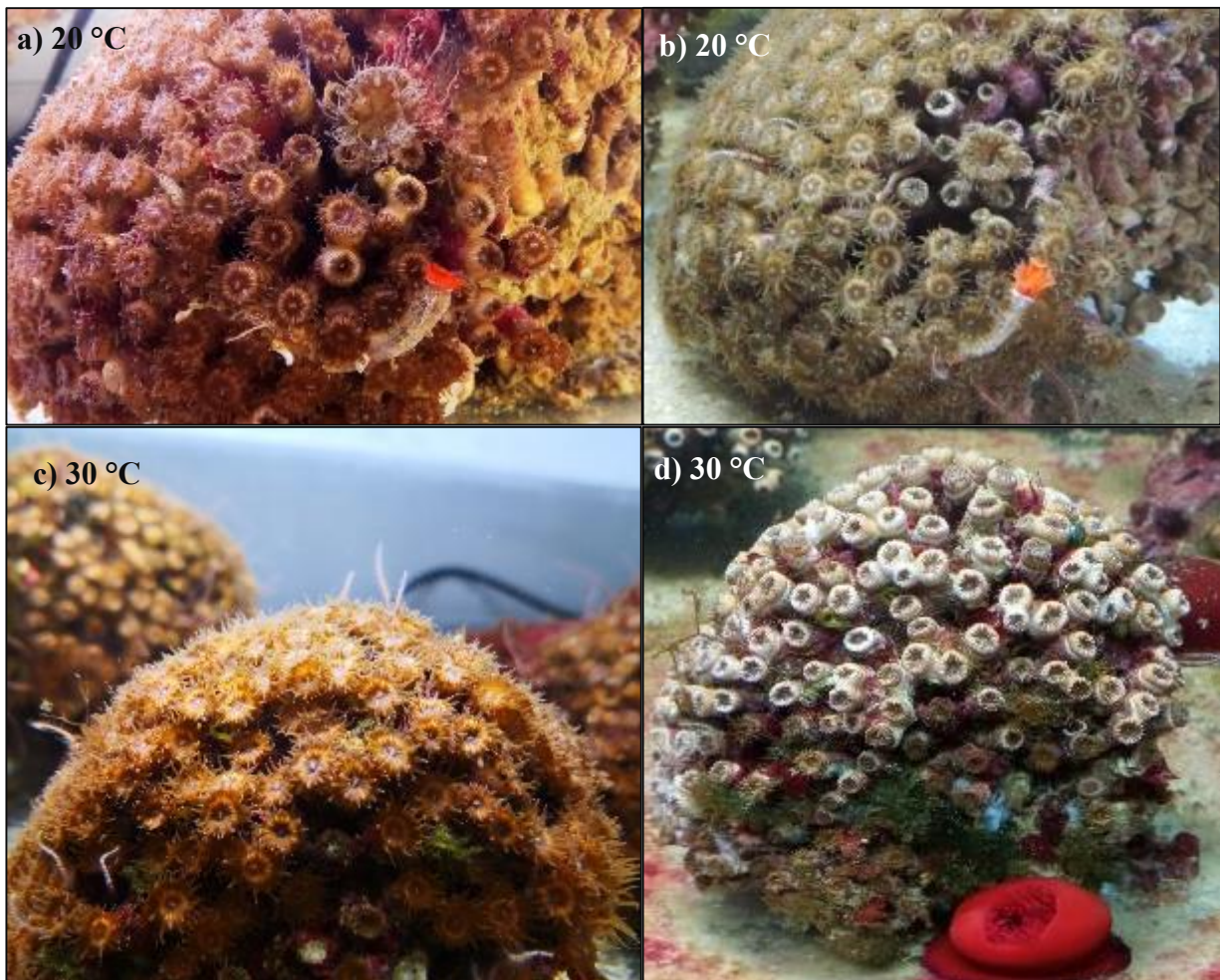


Slika 25. Prikaz koncentracija proteina toplinskog šoka 70 (Hsp70) po mg ukupnih proteina u uzorcima crvene moruzgve *A. equina* za dvije testirane temperature. Iskazane su srednje vrijednosti 5 replika \pm standardna pogreška. Oznaka ns izražava razliku koja nije statistički značajna (Mann-Whitney, $p < 0,05$).

4.2 Rezultati histoloških analiza

4.2.1 Kameni koralj *Cladocora caespitosa*

Na početku eksperimenta, kolonije kamenog koralja svih ispitivanih temperatura (10 °C, 20 °C i 30 °C) bile su zdrave, bez vidljivih lezija i promjena u pigmentaciji, smeđe-zlatnih polipa tj. bez morfoloških znakova temperaturnog stresa (Slika 26a,c). Na kraju eksperimentalnog temperaturnog tretmana, kolonije koralja na 20 °C nisu pokazivale vidljive morfološke promjene (Slika 26b), za razliku od jedinki s 30 °C koje su bile u vidljivo promijenjenom stanju (Slika 26d). Kod više od 75 % dijela kolonija uočeni su morfološki znakovi stresa u okviru zatvaranja promijenjenih (svjetlijih i transparentnijih) lovki, izmjene obojenja, multifokalnih lezija i znakova izbjeljivanja („bleaching“) polipa.

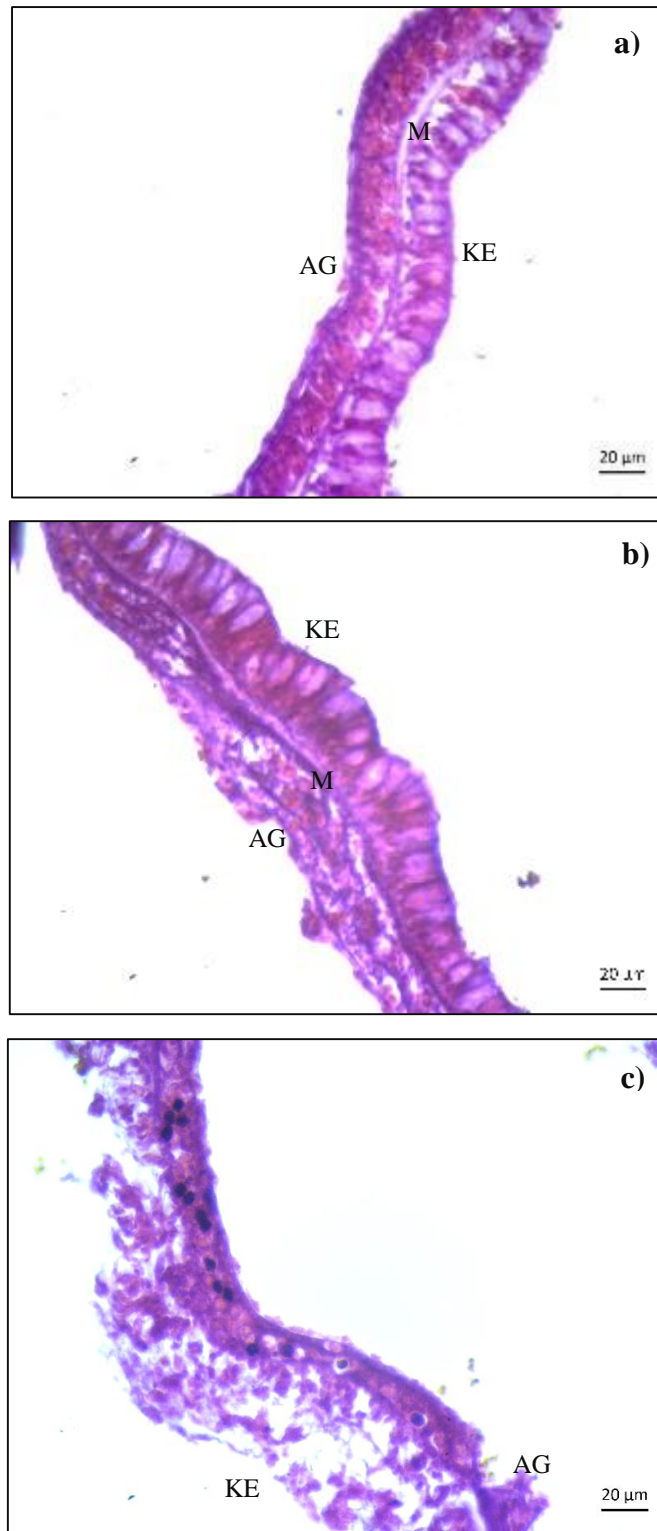


Slika 26. Razlike u morfologiji kamenog koralja *C. caespitosa*. Stanje kolonija na početku eksperimenta (a, c) i na kraju temperaturnog tretmana (b, d). Gornje fotografije (a, b) predstavljaju kolonije tretirane na temperaturi od 20 °C, a donje fotografije (c, d) na temperaturi od 30 °C.

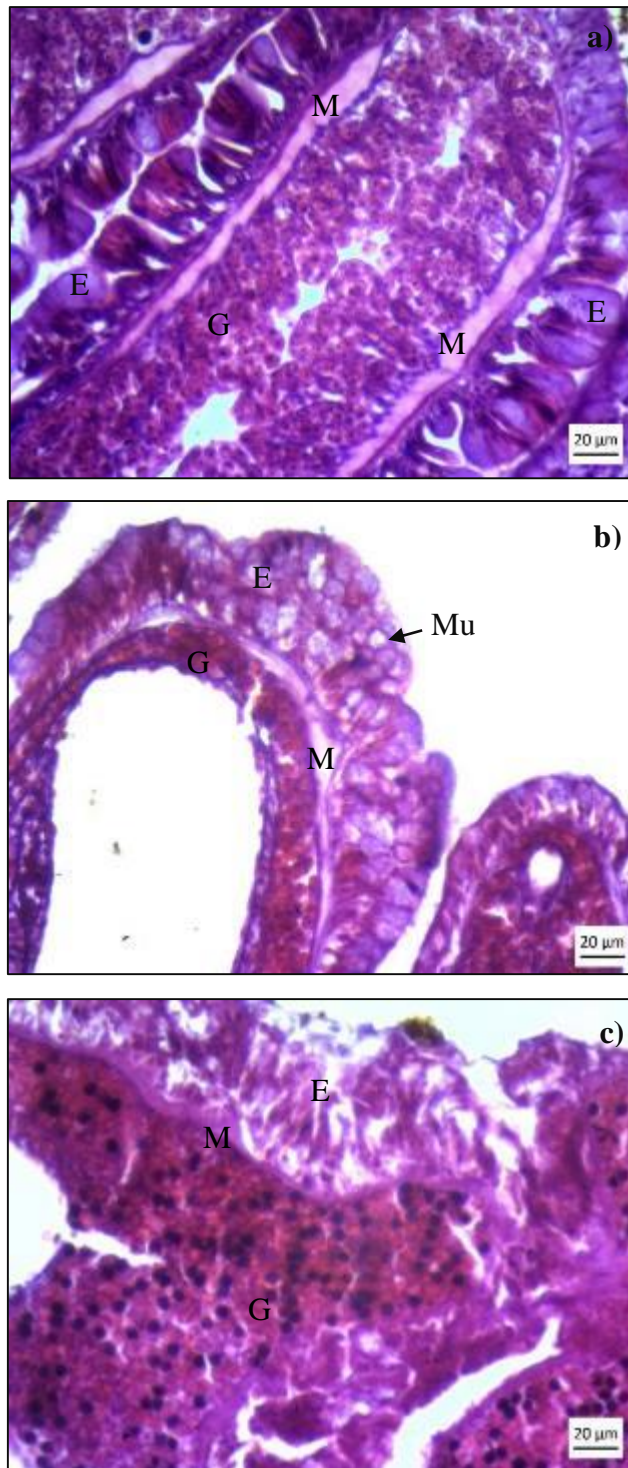
Histološki preparati epidermalnog kalikoblastičnog sloja (dio bazalne stijenke tijela) (*Slika 28a*), površinske stijenke tijela (*Slika 27a*) i gastroderme (*Slika 30a*) kod uzoraka s 10 °C pokazuju normalnu staničnu arhitekturu, bez znakova degradacije. Prosječni promjer stanica jednostaničnih algi roda *Symbiodinium* u gastrodermi uzoraka s 10 °C iznosi $6,24 \pm 0,61 \mu\text{m}$. Longitudinalni prerez kroz polipe aboralne regije (*Slika 29a*) pokazuje uredne gonade i mezenterijske filamente također bez promjena u staničnoj arhitekturi.

Kod uzoraka kamenog koralja s 20 °C bazalna stijenka tijela (*Slika 27b*) je očuvana, ali su u strukturi epidermisa površinske stijenke tijela (*Slika 28b*) uočene blage promjene u kojem je povećan udio mukoznih stanica. Također, uočena je i proliferacija epitelnih stranica (brzo atipično umnažanje koje dovodi do povišenja visine epitela) kod 60% analiziranih uzoraka. Arhitektura i integritet mezogleje, mezenterijskih filamenata i gonada je očuvana i bez znakova degradacije ili nekroze (*Slika 29b*). Gastrodermalni sloj (*Slika 30b*) kod 40% uzoraka pokazuje znakove temperaturnog stresa kroz uočene smežurane i tamnije obojene alge roda *Symbiodinium*.

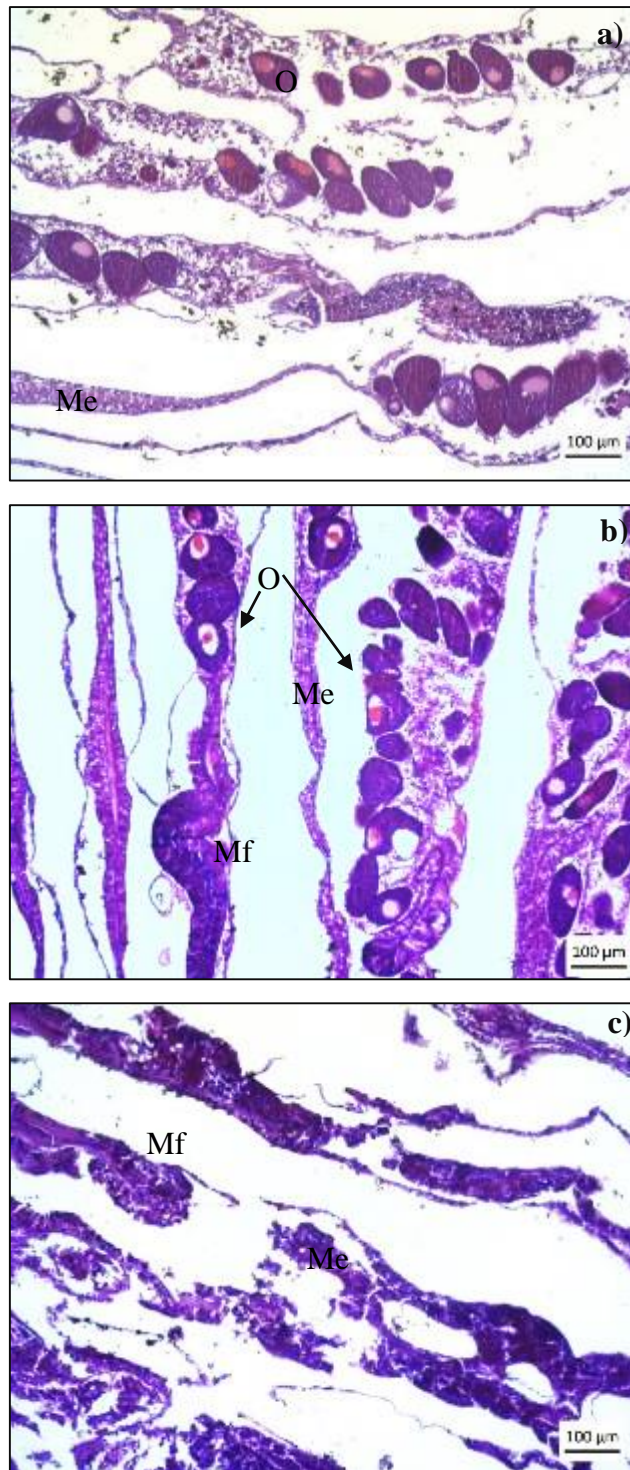
Uzorci kamenog koralja s temperature 30 °C pokazuje razoreni sloj stanica epidermalnog kalikoblastičnog sloja (*Slika 27c*) iz bazalne stijenke tijela kao i narušenu strukturu epiderme površinske stijenke tijela (*Slika 28c*). Longitudinalni prerez kroz polipe u aboralnoj regiji (*Slika 29c*) pokazuju značajne promjene u izgledu i količini mezentera kao i izostanak jajnih stanica. Očiti znakovi temperaturnog stresa vidljivi su i kroz fragmentiranu i nekrotičnu gastrodermu, litičke lezije, nekrotične, smežurane i tamno obojene alge roda *Symbiodinium* (*Slika 30c*). Prosjek promjera jednostaničnih algi iz analiziranih uzoraka s 30 °C iznosi $5,90 \pm 0,96 \mu\text{m}$. Kod 60 % uzoraka s temperature od 30 °C identificirane su makroalge, dok je kod samo jednog od uzoraka uočena spužva. Ostali endosimbionti nisu detektirani.



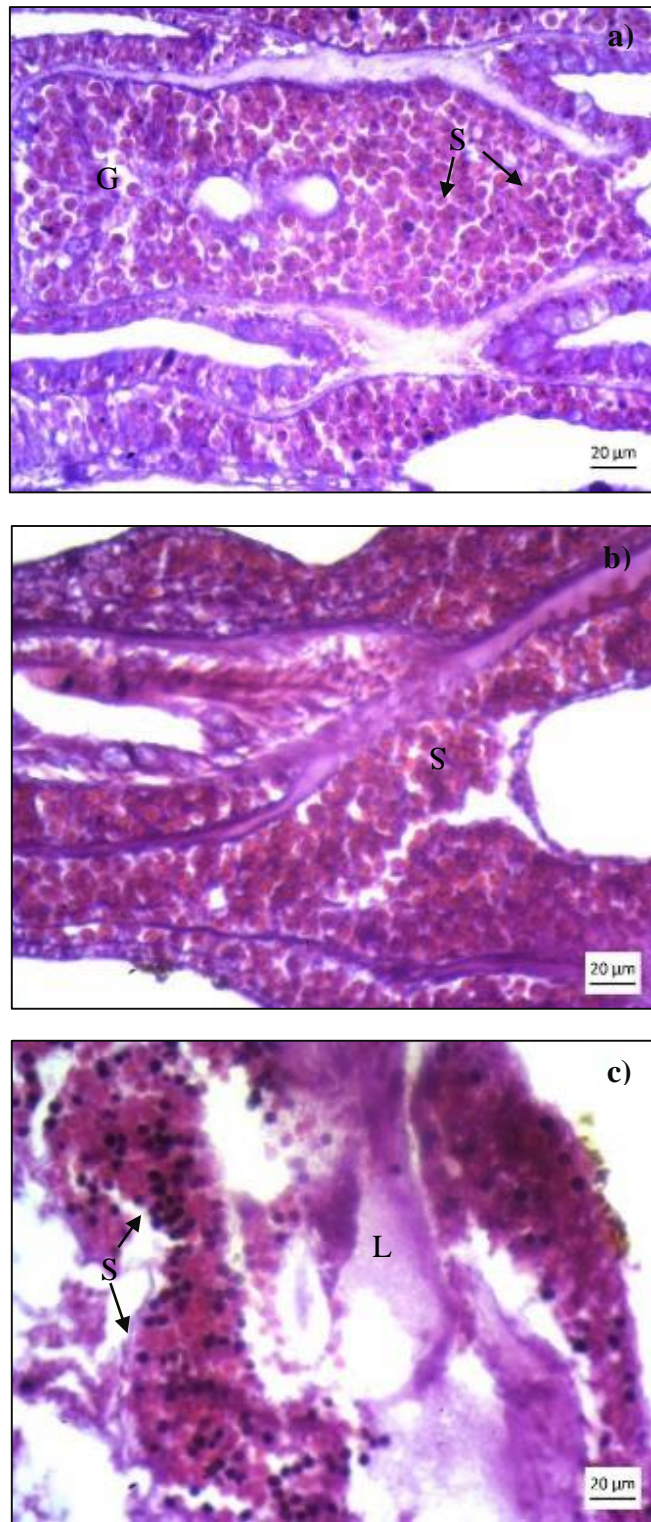
Slika 27. Histološki prerezi bazalne stijenke tijela kamenog koralja *C. caespitosa*. Polipi s temperature 10 °C (a) i 20 °C (b) pokazuju karakterističnu staničnu arhitekturu i cjeloviti kalikoblastični epitel, dok polipi s temperature 30 °C (c) pokazuju znakove degradacije i razoren sloj stanica u istom području. AG-aboralna gastroderma, KE-kalikoblastični epitel, M-mezogleja. Hematoksilin i eozin (mjerilo 20 µm).



Slika 28. Histološki prerezi površinske stijenke tijela kamenog koralja *C. caespitosa*. Polipi s temperature 10 °C (a) ne pokazuju znakove degradacije, polipi s temperature 20 °C (b) zadržali su integritet epiderme, ali pokazuju povećanu količinu mukocita i proliferaciju dok polipi s temperature 30 °C (c) pokazuju značajno ljuštenje i degradaciju epiderme. E-epiderma, G-gastroderma, M-mezogleja, Mu-mukocite. Hematoksilin i eozin (mjerilo 20 µm).

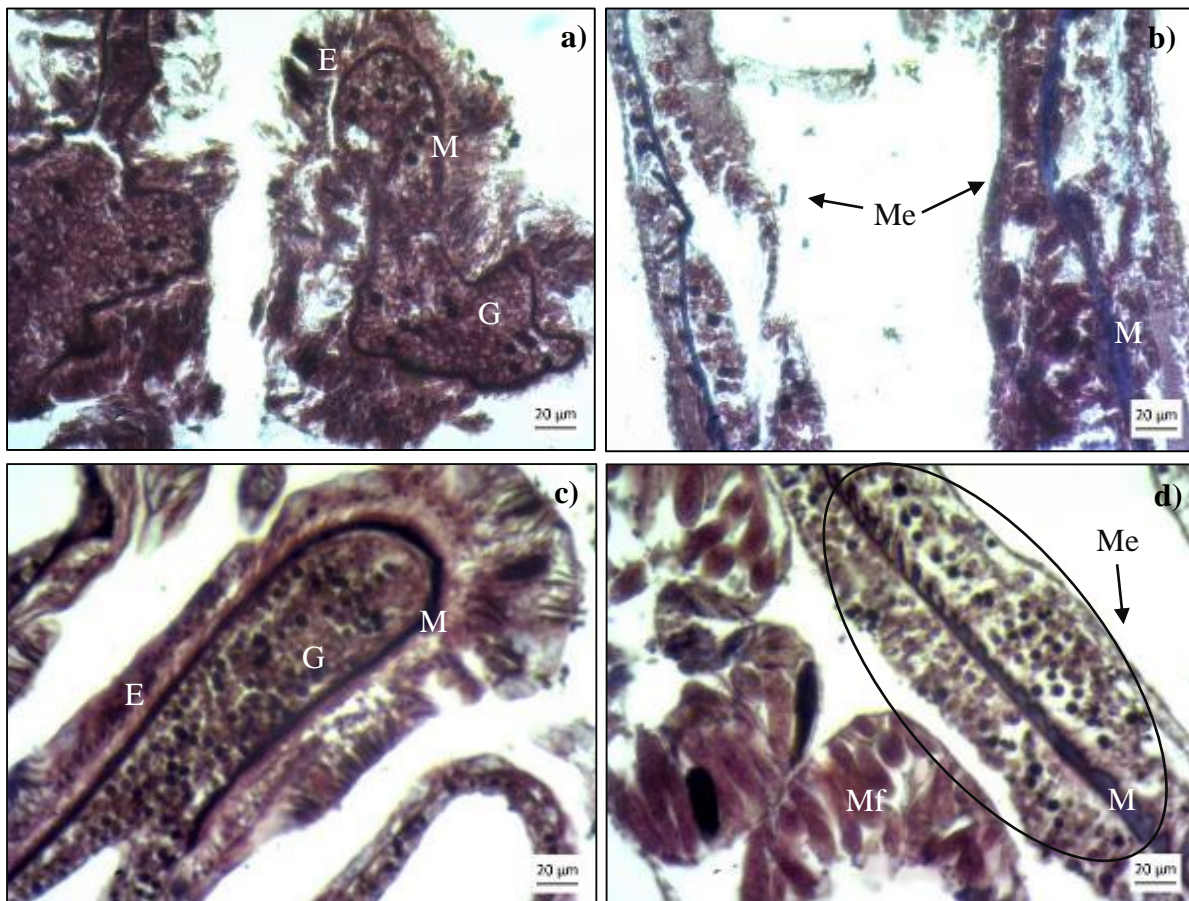


Slika 29. Histološki prerezi longitudinalnih sekcija polipa kamenog koralja *C. caespitosa*. Kod polipa s temperature 10 °C (a) i 20 °C (b) stanična arhitektura je očuvana, vidljive su mezenterije i jajne stanice, mezenterijski filamenti ne pokazuju vidljive lezije. Kod polipa s temperature 30 °C (c) struktura mezentera je značajno narušena, jajne stanice nisu prisutne. Me-mezenterije, Mf-mezenterijski filamenti, O-jajne stanice. Hematoksilin i eozin (mjerilo 100 µm).



Slika 30. Histološki prerezi gastroderme polipa kamenog koralja *C. caespitosa*. Kod polipa s temperature 10 °C (a) i 20 °C (b) stanična arhitektura je normalna, vidljivo je mnoštvo jednostaničnih algi roda *Symbiodinium*. Gastroderma kod polipa s temperature 30 °C (c) je fragmentirana i nekrotična, vidljive su litičke lezije i deformirane, smežurane, tamno obojene jednostanične alge. G-gastroderma, L-lezije, S-jednostanične alge roda *Symbiodinium*. Hematoksilin i eozin (mjerilo 20 µm).

Histokemijska metoda bojenja tkiva pomoću Masson trikromnog seta boja ističe kolagena vlakna tamno-plavom do crnom bojom. Analiza je pokazala da su, u laboratorijskim uzorcima koralja sa 20 °C (Slika 31a,b) i 30 °C (Slika 31c,d), kolagena vlakna ograničena samo na sloj mezogleje. Nije pokazano specifično obojenje u okolnim tkivima. Iako je vidljiv visoki stupanj nekroze, sami sloj mezogleje nije nabubrio nego održava debljinu i strukturu kao i u kontrolnim uzorcima.

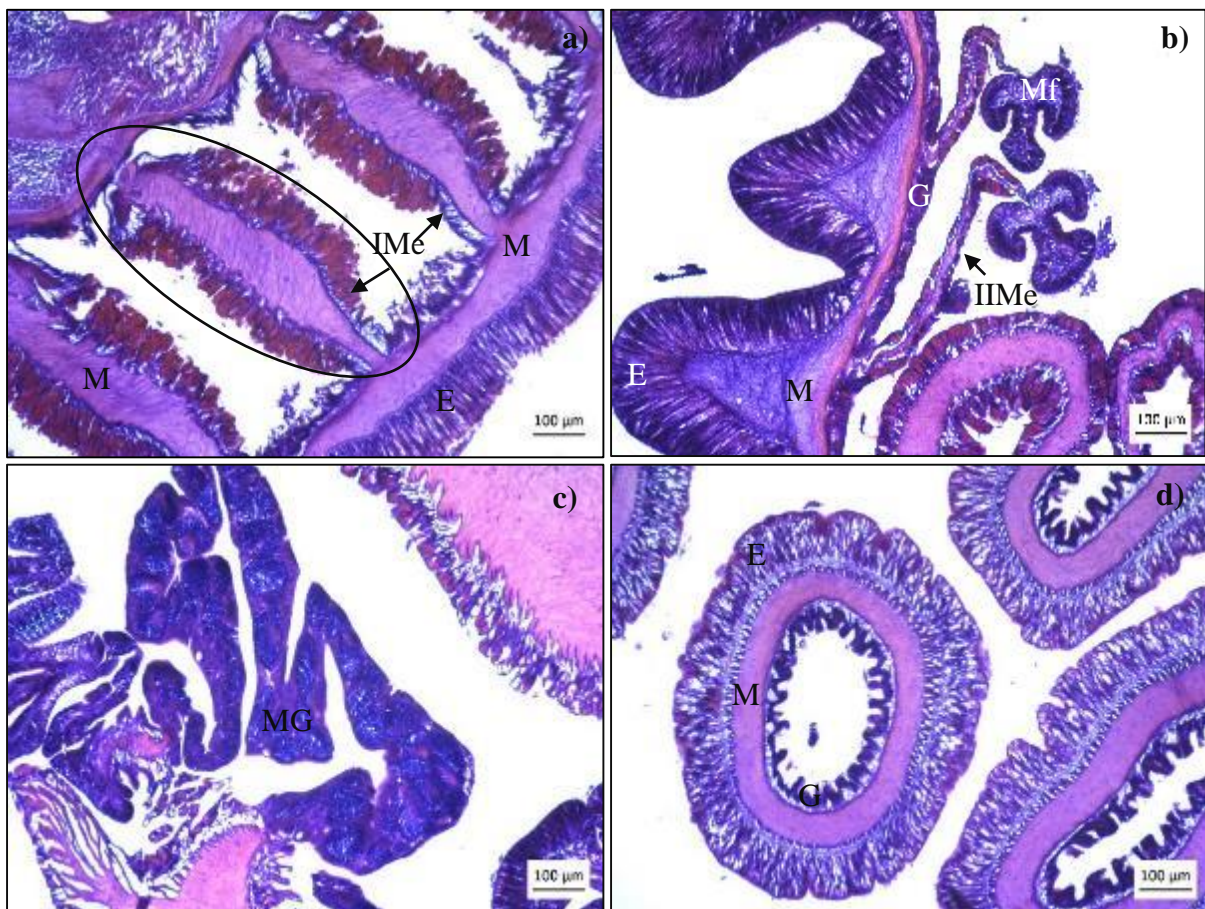


Slika 31. Histološki prerezi površinske stijenke tijela kamenog koralja *C. caespitosa* (a, c) i dijelova mezentera s fragmentima mezenterijskih filamenata (b, d). Gornje fotografije (a, b) predstavljaju kolonije tretirane na temperaturi od 20 °C, a donje fotografije (c, d) na temperaturi od 30 °C. Plavom bojom obilježen je sloj mezogleje (kolagena vlakna i manji broj stanica), a crvenom citoplazma, mišićne niti i keratin. E- epiderma, G- gastroderma, M- mezogleja, Me- mezentera, Mf- mezenterijski filament. Masson trikromni set boja, (mjerilo 20 μm).

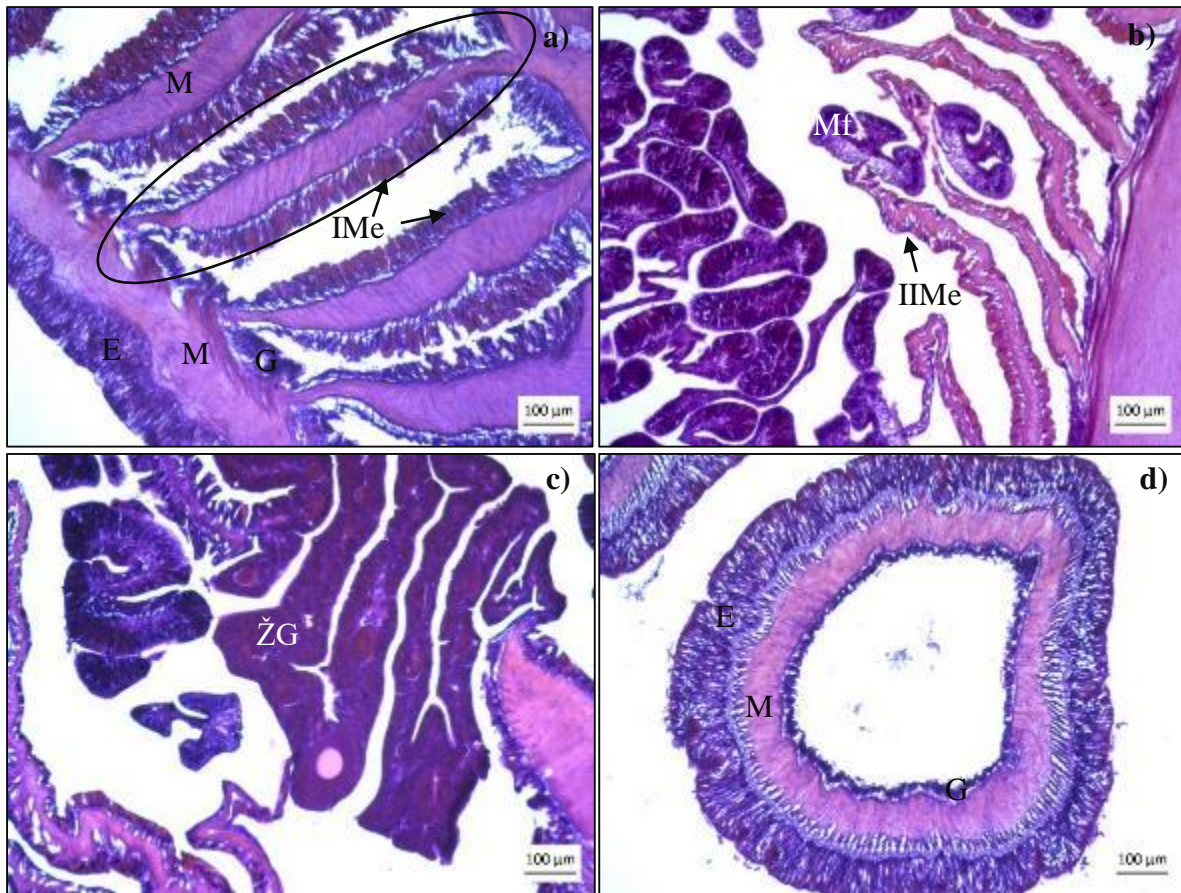
4.2.2 Crvena moruzgva *Actinia equina*

Za vrijeme trajanja eksperimenta, kod crvene moruzgve nisu uočene značajnije morfološke promjene pod utjecajem različitih temperaturnih tretmana.

Stanična arhitektura kod histoloških preparata s temperature 20 °C (Slika 32) i 30 °C (Slika 33) također je normalnog izgleda, bez vidljivih znakova histopatoloških promjena. Na mezenterama je uočljiv sloj vezivnog tkiva omeđen s pločastim epitelom kao i retraktorni mišići. Krajevi mezentera se sužavaju u mezenterijske filamente s žarnim i žljezdanim stanicama. Gonade su vidljive između mezenterijskih filamenata i uzdužnih retraktornih mišića. Među analiziranim jedinkama nisu uočeni hermroditi (uočene su ženske ili muške gamete).

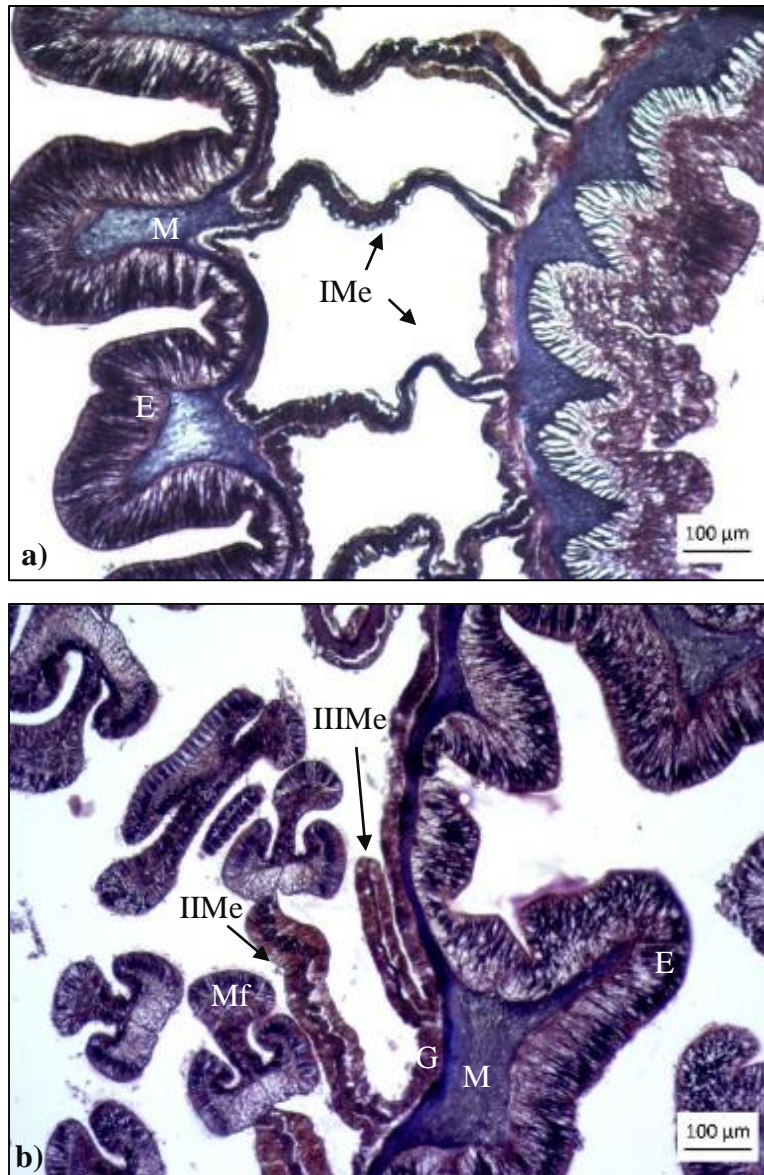


Slika 32. Histološki prerezi crvene moruzgve *A. equina* s temperaturnog tretmana od 20 °C. Poprečni presjek kroz proksimalni dio stijenke tijela s primarnim mezenterama (a), sekundarne mezentera s mezenterijskim filamentima (b), muške gonade (c) i poprečni presjek kroz lovke (d), uredne su stanične arhitekture. E- epiderma, G- gastroderma, IMe- primarna mezentera (zaokruženo), IIME- sekundarna mezentera, M- mezogleja, MG- muške gonade, Mf- mezenterijski filament. Hematoksilin i eozin, mjerilo 100 µm.



Slika 33. Histološki prerezi crvene moruzgve *A. equina* s temperaturnog tretmana od 30 °C. Poprečni presjek kroz proksimalni dio stijenke tijela sa mezenterama (a), mezentere s mezenterijskim filamentima (b), ženske gonade (c) i poprečni presjek kroz lovku (d), uredne su stanične arhitekture. E- epiderma, G- gastroderma, M- mezogleja, IMe- primarna mezentera, IIMe- sekundarna mezentera, Mf- mezenterijski filament, ŽG- ženske gonade. Hematoksilin i eozin, mjerilo 100 µm.

Kolagena vlakna prikazana tamno-plavom do crnom bojom, vizualizirana pomoću Masson trikromnog bojenja, uredna su i ograničena samo na sloj mezogleje (Slika 34).



Slika 34. Histološki prerezi kroz lovke crvene moruzgve *A. equina* kod uzoraka s temperature 20 °C (a) i 30 °C (b) pokazuju urednu staničnu arhitekturu. E- epiderma, G- gastroderma, IMe- primarna mezentera, IIme- sekundarna mezentera, IIIme- tercijarna mezentera, M- mezogleja, Mf- mezenterijski filament. Masson trikromni set boja (mjerilo 100 µm).

5 RASPRAVA

Mediteran se smatra jednom od svjetskih točaka najveće bioraznolikosti, stoga je zabrinjavajuća činjenica da sve izraženije klimatske promjene zajedno s cijelim nizom abiotičkih stresora izazivaju sve veću štetu i predstavljaju rizik i ugrozu za ranjive skupine organizama (Lejeune i sur. 2010; Chazotte i sur. 2023). Jedna od takvih je i najveća skupina žarnjaka, koralji, Anthozoa. Razvoj ranih metoda detekcije rezultata klimatskih promjena i sustava upozorenja kod ranjivih skupina organizama od velike je važnosti, kako bi se omogućilo predviđanje kapaciteta preživljavanja kratkotrajnih/dugotrajnih temperaturnih anomalija (Choresch i sur. 2001; Choresch i sur. 2004).

Provedeno istraživanje imalo je za cilj u laboratorijskim uvjetima ispitati povezanost promjena temperature mora (različitih temperaturnih tretmana) s razvojem oksidacijskog stresa u tkivima dva organizma iz skupine Anthozoa različitih ekološki niša i temperaturnih valencija. Ovo je prvo takvo istraživanje mjerenja biomarkera oksidacijskog stresa kao i ispitivanja morfoloških i histoloških promjena uslijed temperaturnog stresa provedeno na kamenom koralju *Cladocora caespitosa* i crvenoj moruzgvi *Actinia equina* iz Jadranskog mora.

5.1 Biomarkeri oksidacijskog stresa

Provedeno istraživanje pokazalo je povezanost promjene temperature mora u laboratorijskim uvjetima s fiziološkim promjenama tkiva kamenog koralja *C. caespitosa*. Rezultati lipidne peroksidacije pokazuju najveću koncentraciju malondialdehida (MDA) u odnosu na ukupne proteine kod uzoraka kamenog koralja s temperature 10 °C, srednju kod uzoraka tretiranih na temperaturi od 30 °C dok je za uzorke s temperature 20 °C detektirana najmanja razina MDA. Zbog povećane razine MDA pri 10 °C moglo bi se diskutirati o staničnom stresu koji je organizam mogao razviti tijekom transporta (Costa i sur. 2021) od mjesta uzorkovanja do laboratorija. Uočeno statistički značajno smanjenje intenziteta lipidne peroksidacije sa porastom temperature (smanjenje koncentracije MDA sa 10 ° na 20 °C) slično kao i u istraživanju Dias i suradnika (2020) kod koralja *Acropora tenuis* (Dana, 1846) i *Psammocora contigua* (Esper, 1794) moglo bi implicirati na proces remodeliranja i reorganiziranja lipida unutar stanične membrane kao mehanizma zaštite od oštećenja. Iako bez statističke značajnosti, povećanje u koncentraciji MDA na 30 °C može implicirati na to da temperaturni stres popraćen akumulacijom reaktivnih kisikovih vrsta nadilazi kapacitet antioksidativnog odgovora, što u određenoj mjeri narušava strukturu i integritet staničnih membrana (Dias i sur. 2020). Downs i suradnici (2000) na koralju *O. faveolata* pokazali su povećanje intenziteta lipidne peroksidacije pri povišenoj (32 °C) u odnosu na kontrolnu (26°C)

temperaturu. Za tri testirane temperature, u uzorcima tkiva kamenog koralja, uočena je razlika u koncentracijama ukupnog glutaciona (GSH). Najvišu koncentraciju ukupnog glutaciona pokazuju uzorci tkiva s 30 °C i oni se značajno razlikuju od uzoraka tkiva s 20 °C. Iako bez statističke značajnosti, koncentracija ukupnog glutaciona za uzorke s 10 °C također je viša i od koncentracije za uzorke sa 20 °C. Dobiveni rezultati razlikuju se od rezultata istraživanja provedenih na koralju *O. faveolata* (Downs i sur. 2000; Desalvo i sur. 2008) koji pod utjecajem tretmana temperaturnog šoka pokazuju signifikantno smanjenje u koncentraciji GSH. Budući da setovi dizajnirani za testiranje proteina toplinskog šoka iz koralja još uvijek nisu dostupni, testiranje na koraljima provedeno je primjenom mišjih kitova, što je opravdano provedenom usporednom analizom aminokiselinskih sekvenci koja je pokazala visoki postotak sličnosti. Testiranja proteina toplinskog šoka 90 (Hsp90) i 60 (Hsp60) provedena su prema istom metodološkom protokolu i pokazuju slične rezultate. Naime, najviše količine proteina toplinskog šoka Hsp90 i Hsp60 detektirane su za uzorke tretirane na temperaturi 20 °C. Uočeno može biti posljedica razvoja veće količine proteina toplinskog šoka tijekom perioda aklimatizacije s temperature 10 °C na temperaturu 20 °C koja nije tekla kontrolirano, već spontano ovisno o okolnoj, ambijentalnoj temperaturi. Uočena je značajna statistička razlika između uzoraka sa 10 °C i 20 °C za Hsp90 i Hsp60. Iako razlike u koncentracijama uzoraka s temperatura 10 ° i 20 ° u odnosu na uzorke s 30 °C postoje, nisu pokazale statističku značajnost. Uzrok smanjenja koncentracije Hsp90 i Hsp60 na 30 °C u odnosu na 20 °C mogla bi biti povećana smrtnost polipa pod utjecajem temperaturnog stresa od 30 °C uočena i na histološkoj razini za istu temperaturu. Seveso i suradnici (2013) uočeni trend smanjenja razine Hsp60 kod kamenog koralja *Seriatopora caliendrum* Ehrenberg, 1834 u uvjetima povećanog saliniteta (stresor) također povezuju s mogućnošću progresivne stanične smrti polipa koralja. Smanjenje razine Hsp60 kod *S. caliendrum* na temperaturi od 33 °C u periodu od 12-24 sata, Seveso i suradnici (2016) objašnjavaju kao moguću „prezasićenost“ obrambenog sustava da se odupre snažnom temperaturnom stresoru. Iz svega navedenog, snižene razine Hsp90 i Hsp60 pri povišenoj temperaturi mora od 30 °C kod *C. caespitosa*, mogu upućivati na zabrinjavajući fiziološki status koralja što prate i morfološki dokazi izbjeljivanja koralja kao i uočene značajne histološke promjene (Slike 27c, 28c, 29c, 30c). Zanimljivi su rezultati mjerenog Hsp70 koji pokazuju najveću koncentraciju za uzorke s temperature 10 °C i statistički značajnu razliku u odnosu na koncentraciju Hsp70 kod uzoraka tretiranih na temperaturi 20 °C. Uočeno bi kao i kod rezultata MDA mogla biti posljedica razvoja najvećeg temperaturnog stresa upravo u periodu transporta jedinki od mjesta uzorkovanja do laboratorija. Također je moguće i to da jedinke trpe veći oksidacijski stres pri sniženim temperaturama mora. U prilog tome ide

istraživanje Nicosia i suradnika (2014) koje kod *A. viridis* tijekom toplog (28 °C), ali i hladnog temperaturnog stresa (4 °C) ukazuje na pojavu povećane ekspresije mRNA za mali protein toplinskog šoka Hsp28.6. Istraživanje Franzellitti i suradnika (2018) kod kamenog koralja *C. caespitosa* pokazalo je veće razine *Hsp70 in situ*, ali zato razine *Hsp70* tijekom temperaturnog stresa nisu pokazale statistički značajne promjene. Dobiveni rezultati utjecaja temperaturnog stresa na ekspresiju proteina toplinskog šoka ipak se razlikuju od većine rezultata sličnih istraživanja. Downs i suradnici (2000) i Montalbetti i suradnici (2021) kao odgovor na povećane temperature mora pokazali su značajno veće razine Hsp60 i Hsp70 kod zvjezdastog koralja *O. faveolata* i kamenog koralja *Stylophora pistillata* (Esper, 1792). Leggat i suradnici (2011) kvantitativnim PCR-om (engl. *polymerase chain reaction*) pokazali su značajno povećanje u ekspresiji gena *Hsp70* i *Hsp90* kod koralja *Acropora aspera* (Dana, 1846) pri 4 °C većoj temperaturi od kontrolne. Istraživanje na ličinačkom stadiju kamenog koralja *Acropora millepora* (Ehrenberg, 1834) također je pokazalo rapidno (nakon 3 i nakon 10 sati) povećanje u ekspresiji gena *Hsp70* i *Hsp90* prilikom povišene (28 °C i 31 °C) u odnosu na kontrolnu (24 °C) temperaturu mora (Rodriguez-Lanetty i sur. 2009). Činjenica da bi razlika u ekspresiji Hsp mogla ovisiti o drugim okolišnim parametrima u akvarijima nije vjerojatna, jer mjerenja parametara vode nisu pokazala značajnija odstupanja tijekom eksperimenta (što zbog povremene djelomične izmjene vode, što zbog primjene sredstva za kondicioniranje vode tekućinom obogaćenom bakterijskim kulturama). Rezultati bez statističke značajnosti mogu sugerirati na pojavu zaglušenja staničnog odgovora uslijed dugotrajne izloženosti temperaturnom stresu, u odnosu na već provedena slična istraživanja mjerenja oksidacijskih parametara uslijed kraćeg vremenskog izlaganja stresoru.

Rezultati istog testiranja provedenog na crvenoj moruzgvi *A. equina* pokazuju veću, ali ne i statistički značajnu koncentraciju MDA za tkiva tretirana na temperaturi od 20 °C u odnosu na tkiva s 30 °C. Dobiveni rezultati razlikuju se od istraživanja Richier i suradnika (2005) na nesimbiontskoj moruzgvi *A. mediterranea* koje je pokazalo značajno povećanje koncentracije MDA nakon 5 dana od povišenja temperature mora sa 17 °C na 24 °C. Treba uzeti u obzir mogućnost da je crvena moruzgva, zbog svoje ekološke niše koja je promjenjivih abiotičkih čimbenika, otpornija na temperaturne promjene. Do uočenog smanjenja u koncentraciji MDA pri povišenoj temperaturi mora od 30 °C u odnosu na 20 °C moglo bi doći i zbog smanjene proizvodnje antioksidativnog enzima zbog energetske istrošenosti (Dias i sur. 2019). Kod crvene moruzgve uzorci s temperature 20 °C pokazuju veću koncentraciju ukupnog glutationa (GSH) od uzoraka tretiranih na temperaturi od 30 °C, ali ta razlika nije statistički značajna. Isti

odnos vidljiv je i kod testova provedenih za proteine toplinskog šoka 90 (Hsp90) i 60 (Hsp60). Dobiveni rezultati razlikuju se od istraživanja Sunagawa i suradnika (2008) koji su na moruzgvi *E. pallida* pokazali povećanje u ekspresiji glutaciona prilikom temperaturnog stresa (32 °C), kao i istraživanja Choresh i suradnika (2001) koji su po prvi puta proveli imunološku detekciju Hsp60 na smeđoj vlasulji *A. viridis* i pokazali značajno više razine Hsp60 kod jedinki održavanih na 31 °C za razliku od jedinki s 23 °C. U prilog signifikantnom negativnom utjecaju povišene temperature mora na crvenu moruzgvu idu i bihevioralna istraživanja Gadelha i suradnika (2017). Rezultati mjerenih proteina toplinskog šoka 70 (Hsp70) jedini od mjerenih parametara pokazuju veću koncentraciju za uzorke s temperature 30 °C, iako bez statističke značajnosti. Povišene razine Hsp kod crvene moruzgve sugeriraju na njezinu fenotipsku prilagodbu (aklimatizaciju), kao i kod vrste *A. viridis* (Choresh i sur. 2001), na promjenjivu temperaturu mora kojom je direktno izložena i u svojem prirodnom okolišu. Maskrey (2022) kod jedinki *A. equina* nije uočio značajnije promjene u ekspresiji proteina toplinskog šoka uslijed temperaturnog stresa.

5.2 Histološke promjene

Značajnije morfološke promjene uočene kod *C. caespitosa* idu u prilog ranije provedenim istraživanjima koja pokazuju negativan utjecaj temperaturnog stresa na tkivo koralja (Rodolfo-Metalpa i sur. 2005; Kružić 2007; Kersting i sur. 2013; Jimenez i sur. 2014). Uočena neujednačenost u morfološkim promjenama kod polipa iz istog busena kamenog koralja pod utjecajem jednakog temperaturnog stresora može proizlaziti iz činjenice da su polipi kamenog koralja faceloidne morfologije tj. neovisni su jedan o drugome (Kersting i sur. 2013), čime je regeneracija oštećenog tkiva kao i širenje oštećenja na druge polipe ograničena. Histološki preparati svih tkivnih slojeva kod uzoraka s temperature 10 °C pokazuju normalnu staničnu strukturu. Već pri temperaturi od 20 °C povećan udio mukoznih stanica i proliferacija epitelnih stranica (brzo atipično umnažanje koje dovodi do povišenja visine epitela) impliciraju na pogoršanje stanja uslijed povišenja temperature tj. patološku promjenu. Uočena povećana količina mukocita mogla bi imati zaštitnu ulogu od temperaturnih oštećenja (Brown i Bythell 2005; Galloway i sur. 2007). Histopatološkom analizom uzoraka tkiva kamenog koralja s temperature 30 °C utvrđene su pak značajne lezije i nekroza tkiva u svakom od staničnih slojeva (razoren epidermalni sloj, ogoljena mezogleja i fragmentiran i nekrotičan gastrodermalni sloj). Smanjenje promjera i smežuranost citoplazme endosimbiontskih algi s povišenjem temperature uočeno na histološkim preparatima uzoraka koralja s 30 °C, slaže se s istraživanjima Casareto i suradnika (2016). Iz uočenih histoloških promjena moguće je zaključiti da izlaganje povišenoj

temperaturi negativno utječe na stanje tkiva kamenog koralja pokazano i u drugim sličnim istraživanjima (Casareto i sur. 2016; Traylor-Knowles i sur. 2019). Bojanje Masson trikromnim setom boja pak nije pokazalo značajnije promjene u rasporedu kolagenskih vlakana među histološkim uzorcima organizama s različitih temperatura. Dobiveni rezultati razlikuju se od istraživanja Traylor-Knowles i suradnika (2019) koji su na koralju *A. hyacinthus* pod utjecajem temperaturnog stresa pokazali pojavu kolagenih vlakana u epidermi i gastrodermi za razliku od zdravog tkiva kod kojeg je kolagen bio ograničen samo na mezogleju.

Zanimljivo je usporediti utjecaj temperaturnog stresa na fiziološki i histološki status proučavanih vrsta koje pripadaju istom koljenu Anthozoa. Uočene razlike u rezultatima mogu biti posljedica drugačijih ekoloških niša koje proučavane vrste nastanjuju tj. razlike u izloženosti varijabilnim čimbenicima okoliša kao i razlika potencijalne otpornosti na iste. Promjene u efektu temperaturnih fluktuacija na biomarkere oksidacijskog stresa kod crvene moruzgve *A. equina* bez statističke značajnosti, bile su očekivane. U prilog tome idu i morfološka i histološka opažanja koja nisu pokazala značajnije tkivne promjene pod utjecajem povišene temperature. Gadelha i suradnici (2017) s druge strane pokazuju osjetljivost jedinki *A. equina* na temperaturne promjene kroz značajnu redukciju u preživljenju (50 %) na temperaturi od 30 °C u periodu od 96 sati. Istraživanja provedena na simbiotskim moruzgvama *Aiptasia* sp. i *Entacmaea quadricolor* (Leuckart in Ruppell i Leuckart, 1828) također pokazuju negativan utjecaj povišene temperature na tkivo kroz pojavu programirane stanične smrti i nekroze (Dunn i sur. 2004) kao i signifikantnog smanjenja endosimbiontskih algi i promjene u obojenosti jedinki tj. izbjeljivanja (Pryor i sur. 2021).

Provedeno istraživanje bilo je ograničeno isključivo na uzorkovanje tkiva koralja u trenutku uočavanja morfoloških promjena. Bilo bi zanimljivo uzorkovanje tkiva napraviti više puta tijekom eksperiment: na početku (pri uspostavi akvarija), nakon perioda aklimatizacije te nakon uočenih morfoloških promjena, čime bi se sa većim setom podataka omogućila preciznija statistička obrada i bolje razlučivanje uzroka detektiranih promjena. Također, jasnije bi se moglo razlučiti događaju li se i u kojoj mjeri uočene razlike u ekspresiji biomarkera oksidacijskog stresa kao posljedica naglih temperaturnih promjena ili kontinuiranih dugotrajnih izlaganja istoj temperaturi. Imajući na umu da se polipi koralja unutar istog busena mogu razlikovati po svojoj veličini tj. količini tkiva, replike stvorene sakupljanjem tkiva (engl. *pooling*) iz istog broja polipa u ovom istraživanju, u narednim istraživanjima bilo bi preciznije sakupiti vaganjem tkiva tj. sakupljanjem iste mase tkiva. Također, budući da su tkiva polipa uzorkovana s istog „majčinskog“ busena i time male genetičke varijabilnosti (Dias i sur. 2019),

buduća istraživanja mogla bi dati drugačije rezultate. Bilo bi stoga korisno napraviti i usporedna istraživanja iste vrste kamenog koralja, ali s različitih lokaliteta duž Jadrana. Isto bi, zbog potencijalno različitog odgovora na temperaturni stres među različitim genetičkim morfortipovima (Maskrey i sur. 2020), bilo korisno provesti i za jedinke *A. equina* duž Jadrana i sa različitih raspona visina obala koje nastanjuju.

Ovaj diplomski rad doprinosi boljem razumijevanju utjecaja temperaturnih fluktuacija na izazvan oksidacijski stres i histološke promjene kod sesilnih Anthozoa. Dokazana mogućnost detekcije biomarkera oksidacijskog stresa (Hsp, MDA, GSH) kao i važnost sveobuhvatne analize (fiziologija i histologija) stvaraju dobru podlogu za daljnja prijeko potrebna istraživanja temperaturnog stresa kod koralja (Anthozoa).

6 ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja na kamenom koralju *C. caespitosa* i crvenoj moruzgvi *A. equina* moguće je zaključiti sljedeće:

- Utvrđena je povezanost povišene temperature mora u laboratorijskim uvjetima s promjenama u razini biomarkera oksidacijskog stresa u tkivima kamenog koralja *C. caespitosa*. Statistički su značajne razlike u ekspresiji MDA, Hsp90, Hsp60 i Hsp70 između uzoraka s temperature 10 °C i 20 °C kao i u ekspresiji GSH između uzoraka s temperature 20 °C i 30 °C.
- Na molekularnoj razini nisu uočeni statistički značajni znakovi oksidacijskog stresa u tkivima crvene moruzgve *A. equina* pod utjecajem temperaturnog stresa.
- Proteini toplinskog šoka mogli bi se koristiti kao rani biomarkeri temperaturnog stresa kod kamenog koralja *C. caespitosa*.
- Uzorci kamenog koralja pri 10 °C pokazuju urednu staničnu arhitekturu, na uzorcima s 20 °C primijećene su blage histološke promjene u gastrodermalnom sloju i epidermi površinske stijenke tijela, dok uzorci pri 30 °C pokazuju značajne histološke promjene u svim tkivnim slojevima: uznapredovale lezije i nekroze tkiva, fragmentiranu gastrodermu, izbljedjelu mezogleju i narušenu arhitekturu epidermalnog sloja.
- Prosječan promjer stanica jednostaničnih endosimbiontskih algi roda *Symbiodinium* u uzorcima kamenog koralja s 20 °C veći je u odnosu na prosječni promjer stanica uzoraka s 30 °C.
- Kod uzoraka crvene moruzgve *A. equina* s proučavanih temperatura od 20 °C i 30 °C nisu detektirane značajnije histološke promjene, te je stanična arhitektura uredna.
- Razumijevanje osjetljivosti organizama na različite temperaturne fluktuacije, zajedno s već postojećim mjernim podacima, može pomoći u predviđanju utjecaja i posljedica temperaturnog stresa na ugrožene skupine organizama.

7 LITERATURA

Ainsworth T. D., Kramasky-Winter E., Loya Y., Hoegh-Guldberg O., Fine M. (2007): Coral disease diagnostics: What's between a plague and a band? *Applied and Environmental Microbiology*. 73(3): 981–992.

Averill-Bates D. A. (2023): The antioxidant glutathione. *Vitamins and Hormones*. 121: 109-141.

Ayala A., Munoz M. F., Arguelles S. (2014): Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2014: 360438.

Bally M., Garrabou J. (2007): Thermodependent bacterial pathogens and mass mortalities in temperate benthic communities: a new case of emerging disease linked to climate change. *Global Change Biology*. 13: 2078–2088.

Balta V., Kukulj M., Odeh D., Đikić D., Oršolić N. (2017): *Praktikum iz Fiziologije oksidacijskog stresa (interna skripta)*. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zagreb.

Banin E., Israely T., Fine M., Loya Y., Rosenberg E. (2001): Role of endosymbiotic zooxanthellae and coral mucus in the adhesion of the coral-bleaching pathogen *Vibrio shiloi* to its host. *FEMS Microbiology Letters*. 199: 33–37.

Banin E., Vassilakos D., Orr E., Martinez R. J., Rosenberg E. (2003): Superoxide dismutase is a virulence factor produced by the coral bleaching pathogen *Vibrio shiloi*. *Current Microbiology*. 46(6): 418–422.

Bethoux J. P., Gentili B., Morin P., Nicolas E., Pierre C., Ruiz-Pino D. (1999): The Mediterranean Sea: A miniature ocean for climatic and environmental studies and a key for the climatic functioning of the North Atlantic. *Progress in Oceanography*. 44(1–3): 131–146.

Bhagat J., Ingole B. S., Singh N. (2016): Glutathione S-transferase, catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and lipid peroxidation as biomarkers of oxidative stress in snails: A review. *Invertebrate Survival Journal*. 13: 336–349.

BioGnost Hematoxylin H, Modified hematoxylin acc. to Harris for nuclear staining. Reagent for strong, regressive staining in histopathology (2019). <https://www.biognost.com/wp-content/uploads/2019/12/Hematoxylin-H-IFU-V15-EN15.pdf> (pristupljeno 12. 07. 2023.)

BioGnost Masson Trichrome Kit, Seven-reagent muscle and collagen fiber staining kit (2020). <https://www.biognost.com/wp-content/uploads/2020/02/Masson-Trichrome-kit-IFU-V14-EN6.pdf> (pristupljeno 12. 07. 2023.)

Bonacci O. i Vrsalović A. (2022): Differences in Air and Sea Surface Temperatures in the Northern and Southern Part of the Adriatic Sea. *Atmosphere*. 13(7): 1158.

Bonacci O., Ljubenković I., Roje-Bonacci T. (2021): Different climate changes at two locations on a Small Karst Island Korčula (Adriatic sea, Croatia). *Naše More*. 68(1): 1–13.

Brown B. E. (1997): Adaptations of Reef Corals to Physical Environmental Stress. *Advances in Marine Biology*. 31: 221–299.

Brown B. E., Bythell J. C. (2005): Perspectives on mucus secretion in reef corals. *Marine Ecology Progress Series*. 296: 291–309.

Cai Z. (2005): Lipid peroxidation. U: Wexler P. (ur.) *Encyclopedia of Toxicology (Second Edition)*. Elsevier, 730–734.

Campanella J. J., Bitincka L., Smalley J. (2003): MatGAT: An application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences. *BMC Bioinformatics*. 4: 29.

Casado de Amezua P., Kersting D., Linares C. L., Bo M., Caroselli E., Garrabou J., Cerrano C., Ozalp B., Terron-Sigler A., Betti F. (2015): *Cladocora caespitosa* (Linnaeus, 1767). The IUCN Red List of Threatened Species 2015.

Casareto B. E., Suzuki T., Suzuki Y. (2016): Chemical and Biological Characteristics of Coral Reef Ecosystem at Microscale/Nanoscale: Effect of Multiple and Synergistic Stresses. U: Kayanne H. (ur.) *Coral Reef Science, Strategy for Ecosystem Symbiosis and Coexistence with Humans under Multiple Stresses*. Coral Reefs of the World 5, Springer Japan, 25–45.

Cavraro F., Anelli Monti M., Matic-Skoko S., Caccin A., Pranovi F. (2022): Vulnerability of the Small-Scale Fishery to Climate Changes in the Northern-Central Adriatic Sea (Mediterranean Sea). *Fishes*. 8(1): 9.

Cerrano C., Totti C., Sponga F., Bavestrello G. (2006): Summer disease in *Parazoanthus axinellae* (Schmidt, 1862) (Cnidaria, Zoanthidea). *Italian Journal of Zoology*. 73(4): 355–361.

Chatzimentor A., Doxa A., Katsanevakis S., Mazaris A. D. (2023): Are Mediterranean marine threatened species at high risk by climate change? *Global Change Biology*. 29(7): 1809–1821.

Chomsky O., Kamenir Y., Hyams M., Dubinsky Z., Chadwick-Furman N. E. (2004): Effects of temperature on growth rate and body size in the Mediterranean Sea anemone *Actinia equina*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 313(1): 63–73.

Choresh O., Ron E., Loya Y. (2001): The 60-kDa heat shock protein (HSP60) of the sea anemone *Anemonia viridis*: A potential early warning system for environmental changes. *Marine Biotechnology*. 3(5): 501–508.

Choresh O., Loya Y., Müller W. E. G., Wiedenmann J., Azem A. (2004): The mitochondrial 60-kDa heat shock protein in marine invertebrates: biochemical purification and molecular characterization. *Cell Stress and Chaperones*. 9(1): 38–48.

Coma R., Ribes M. (2003): Seasonal energetic constraints in Mediterranean benthic suspension feeders: effects at different levels of ecological organization. *Oikos*. 101: 205–215.

Coma R., Ribes M., Gili J. M., Zabala M. (2002): Seasonality of in situ respiration rate in three temperate benthic suspension feeders. *Limnology and Oceanography*. 47: 324–331.

Costa A. P. L., Silva D. A. M., Rodrigues A. C. M., Marques C. R., Soares A. M. V. M., Rocha R. J. M. (2021): Species-specific oxidative stress responses and cellular energy allocation after coral shipping. *Aquaculture Reports*. 19: 100623.

Cziesielski M. J., Schmidt-Roach S., Aranda M. (2019): The past, present, and future of coral heat stress studies. *Ecology and Evolution*. 9: 10055–10066.

Desalvo M. K., Voolstra C. R., Sunagawa S., Schwarz J. A., Stillman J. H., Coffroth M. A., Szmant A. M., Medina M. (2008): Differential gene expression during thermal stress and

bleaching in the Caribbean coral *Montastraea faveolata*. *Molecular ecology*. 17(17): 3952–3971.

Dias M., Ferreira A., Gouveia R., Madeira C., Jogue N., Cabral H., Diniz M., Vinagre C. (2019): Long-term exposure to increasing temperatures on scleractinian coral fragments reveals oxidative stress. *Marine Environmental Research*. 150: 104758.

Dias M., Madeira C., Jogue N., Ferreira A., Gouveia R., Cabral H., Diniz M., Vinagre C. (2020): Integrative indices for health assessment in reef corals under thermal stress. *Ecological Indicators*. 113: 106230.

Downs C. A., Mueller E., Phillips S., Fauth J. E., Woodley C. M. (2000): A molecular biomarker system for assessing the health of coral (*Montastraea faveolata*) during heat stress. *Marine Biotechnology*. 2(6): 533–544.

Downs C. A., Fauth J. E., Halas J. C., Dustan P., Bemiss J., Woodley C. M. (2002): Oxidative stress and seasonal coral bleaching. *Free Radical Biology and Medicine*. 33(4): 533–543.

Duffy D. J., Millane R. C., Frank U. (2012): A heat shock protein and Wnt signaling crosstalk during axial patterning and stem cell proliferation. *Developmental Biology*. 362(2): 271–281.

Dunn S. R., Thomason J. C., Le Tissier M. D. A., Bythell J. C. (2004): Heat stress induces different forms of cell death in sea anemones and their endosymbiotic algae depending on temperature and duration. *Cell Death and Differentiation*. 11: 1213–1222.

Edgar R. C. (2004): MUSCLE: an approach for multiple sequence alignment with reduced time and space requirements. *BMC Bioinformatics*. 5: 113.

Feldman A. T., Wolfe D. (2014): Tissue processing and hematoxylin and eosin staining. U: Day C. E. (ur.) *Methods in Molecular Biology*. 1180: 31–43.

Ferrier-Pages C., Tambutte E., Zamoum T., Segonds N., Merle P. L., Bensoussan N., Allemand D., Garrabou J., Tambutte S. (2009): Physiological response of the symbiotic gorgonian *Eunicella singularis* to a longterm temperature increase. *Journal of Experimental Biology*. 212(18): 3007–3015.

Fischer A. H., Jacobson K. A., Rose J., Zeller R. (2008): Hematoxylin and Eosin Staining of Tissue and Cell Sections. 3(5): 4986–4988.

Franzellitti S., Airi V., Calbucci D., Caroselli E., Prada F., Voolstra C. R., Mass T., Falini G., Fabbri E., Goffredo S. (2018): Transcriptional response of the heat shock gene hsp70 aligns with differences in stress susceptibility of shallow-water corals from the Mediterranean Sea. *Marine Environmental Research*. 140: 444–454.

Gadelha J. R., Jesus F., Gomes P. B., Osten J. R. Von Morgado F., Soares A. M. V. da M. (2017): Temperature Tolerance Test Exposition with Temperate Sea Anemone *Actinia equina*, a Climatic and Environmental Changes Simulation. *Open Access Library Journal*. 4(3): 1–24.

Galloway S. B., Work T. M., Bochsler V. S., Harley R. A., Kramarsky-Winters E., McLaughlin S. M., Meteyer C. U., Morado J. F., Nicholson J. H., Parnell P. G., Peters E. C., Reynolds T. L., Rotstein D. S., Sileo L, Woodley C. M. (2007): Coral Disease and Health Workshop: Coral Histopathology II. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS 56 i CRCP 4. National Oceanic and Atmospheric Administration, Silver Spring, MD. 84p.

Gardner S. G., Nielsen D. A., Laczka O., Shimmon R., Beltran V. H., Ralph P. J., Petrou K. (2016): Dimethylsulfonylpropionate, superoxide dismutase and glutathione as stress response indicators in three corals under short-term hyposalinity stress. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 283(1824).

Garrabou J., Perez T., Sartoretto S., Harmelin J. G. (2001): Mass mortality event in red coral *Corallium rubrum* populations in the Provence region (France, NW Mediterranean). *Marine Ecology Progress Series*. 217: 263–272.

Geiser D., Taylor J., Ritchie K., Smith G. W. (1998): Cause of sea fan death in the West Indies. *Nature*. 394: 137–138.

Griffiths R. J. (1977): Temperature acclimation in *Actinia equina* L. (Anthozoa). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 28(3): 285–292.

Hawthorn A., Berzins I. K., Dennis M. M., Kiupel M., Newton A. L., Peters E. C., Reyes V. A., Work T. M. (2023): An introduction to lesions and histology of scleractinian corals. *Veterinary pathology*. 60(5): 529–546.

- Jimenez C., Hadjioannou L., Petrou A., Nikolaidis A., Evriviadou M., Lange M. A. (2014): Mortality of the scleractinian coral *Cladocora caespitosa* during a warming event in the Levantine Sea (Cyprus). *Regional Environmental Change*. 16(7): 1963–1973.
- Kersting D., del Mar Otero M. (2016): A3.238: Communities of *Cladocora caespitosa* beds and reefbanks of moderately exposed or semi-exposed infralittoral rock. 1–10.
- Kersting D. K., Bensoussan N., Linares C. (2013): Long-Term Responses of the Endemic Reef-Builder *Cladocora caespitosa* to Mediterranean Warming. *PLOS ONE*. 8(8): e70820.
- Kersting D. K., Teixido N., Linares C. (2014): Recruitment and mortality of the temperate coral *Cladocora caespitosa*: Implications for the recovery of endangered populations. *Coral Reefs*. 33(2): 403–407.
- Kinzie R. A., Takayama M., Santos S. R., Coffroth M. A. (2001): The Adaptive Bleaching Hypothesis: Experimental Tests of Critical Assumptions. *The Biological Bulletin*. 200(1): 51–58.
- Krueger T., Becker S., Pontasch S., Dove S., Hoegh-Guldberg O., Leggat W., Fisher P. L., Davy S. K. (2014): Antioxidant plasticity and thermal sensitivity in four types of *Symbiodinium* sp. *Journal of Phycology*. 50(6): 1035–1047.
- Kružić P. (2007): Polyp expulsion of the coral *Cladocora caespitosa* (Anthozoa, Scleractinia) in extreme sea temperature conditions. *Natura Croatica*. 16(3): 211–214.
- Kružić P. (2014): Bioconstructions in the Mediterranean: Present and Future. U: Goffredo S., Dubinsky Z. (ur.) *The Mediterranean sea: Its history and present challenges*. Dordrecht, Springer. 435–447.
- Kružić P., Požar-Domac A. (2003): Banks of the coral *Cladocora caespitosa* (Anthozoa, Scleractinia) in the Adriatic Sea. *Coral Reefs*. 22(4): 536.
- Kružić P., Benković L. (2008): Bioconstructional features of the coral *Cladocora caespitosa* (Anthozoa, Scleractinia) in the Adriatic Sea (Croatia). *Marine Ecology*. 29(1): 125–139.

Kružić P., Sršen P., Benković L. (2012): The impact of seawater temperature on coral growth parameters of the colonial coral *Cladocora caespitosa* (Anthozoa, Scleractinia) in the eastern Adriatic Sea. *Facies*. 58(4): 477–491.

Kružić P., Rodić P., Popijač A., Sertić M. (2016): Impacts of temperature anomalies on mortality of benthic organisms in the Adriatic Sea. *Marine Ecology*. 37(6): 1190–1209.

Kushmaro A., Rosenberg E., Fine M., Ben Haim Y., Loya Y. (1998): Effect of temperature on bleaching of coral *Oculina patagonica* by *Vibrio* AK-1. *Marine Ecology Progress Series*. 171: 131–137.

Leggat W., Seneca F., Wasmund K., Ukani L., Yellowlees D., Ainsworth T. D. (2011): Differential Responses of the Coral Host and Their Algal Symbiont to Thermal Stress. *PLOS ONE*. 6(10): e26687.

Lejeusne C., Chevaldonne P., Pergent-Martini C., Boudouresque C. F., Perez T. (2010): Climate change effects on a miniature ocean: the highly diverse, highly impacted Mediterranean Sea. *Trends in Ecology and Evolution*. 25(4): 250–260.

Lesser M. P. (2006): Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Annual Review of Physiology*. 68: 253–278.

Louis Y. D., Bhagooli R., Kenkel C. D., Baker A. C., Dyll S. D. (2017): Gene expression biomarkers of heat stress in scleractinian corals: Promises and limitations. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*. 191: 63–77.

Madeira F., Pearce M., Tivey A. R. N., Basutkar P., Lee J., Edbali O., Madhusoodanan N., Kolesnikov A., Lopez R. (2022): Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022. *Nucleic Acids Research*. 50(W1): W276-W279. <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustaloo/> (pristupljeno 07. 11. 2023.)

Maskrey D. K. (2022): The behavioural, metabolic and proteomic effects of temperature stress on bold and shy beadlet anemones (*Actinia equina*). Doktorski rad, Sveučilište u Liverpoolu.

Maskrey D. K., Sneddon L. U., Arnold K. E., Wolfenden D. C. C., Thomson J. S. (2020): The impact of personality, morphotype and shore height on temperature-mediated behavioural

responses in the beadlet anemone *Actinia equina*. *Journal of Animal Ecology*. 89(10): 2311–2324.

Matoničkin I., Habdija I., Primc-Habdija B. (1998): *Beskralješnjaci: biologija nižih avvertebrata*, III. prerađeno i dopunjeno izdanje. Školska knjiga, Zagreb.

MedECC (2020): *Summary for Policymakers. Climate and Environmental Change in the Mediterranean Basin - Current Situation and Risks for the Future. First Mediterranean Assessment Report*. Cramer W., Guiot J., Marini K. (ur.) Union for the Mediterranean, Plan Bleu, UNEP/MAP, Marseille, France. 11–40.

Mihanović H., Vilibić I., Šepić J., Matić F., Ljubešić Z., Mauri E., Gerin R., Notarstefano G., Poulain P. M. (2021): Observation, Preconditioning and Recurrence of Exceptionally High Salinities in the Adriatic Sea. *Frontiers in Marine Science*. 8: 1–22.

Montalbetti E., Biscere T., Ferrier-Pages C., Houlbreque F., Orlandi I., Forcella M., Galli P., Vai M., Seveso D. (2021): Manganese Benefits Heat-Stressed Corals at the Cellular Level. *Frontiers in Marine Science*. 8: 681119.

Morri C., Bianchi C. N., Peirano A. (2001): Is the Mediterranean coral *Cladocora caespitosa* an indicator of climatic change? *Archo Oceanography and Limnology*. 22: 139–144.

Nicosia A., Maggio T., Mazzola S., Gianguzza F., Cuttitta A., Costa S. (2014): Characterization of Small HSPs from *Anemonia viridis* Reveals Insights into Molecular Evolution of Alpha Crystallin Genes among Cnidarians. *PLOS ONE*. 9(9): e105908.

Nielsen D. A., Petrou K. (2023): Lipid stores reveal the state of the coral-algae symbiosis at the single-cell level. *Isme Communications*. 3: 29.

Nielsen D. A., Petrou K., Gates R. D. (2018): Coral bleaching from a single cell perspective. *International Society for Microbial Ecology Journal*. 12(6): 1558–1567.

Oakley C. A., Davy S. K. (2018): *Cell biology of coral bleaching*. U: van Oppen M. J. H., Lough J. M. (ur.) *Coral Bleaching: Patterns, Processes, Causes and Consequences*. Springer International Publishing. 189–211

Pairaud I. L., Bensoussan N., Garreau P., Faure V., Garrabou J. (2014): Impacts of climate change on coastal benthic ecosystems: assessing the current risk of mortality outbreaks associated with thermal stress in NW Mediterranean coastal areas. *Ocean Dynamics*. 64(1): 1–13.

Peirano A., Morri C., Bianchi C. N., Aguirre J., Antonioli F., Calzetta G., Carobene L., Mastronuzzi G., Orru P. (2004): The Mediterranean coral *Cladocora caespitosa*: A proxy for past climate fluctuations? *Global and Planetary Change*. 40(1–2): 195–200.

Pitacco V., Orlando-Bonaca M., Mavric B., Lipej L. (2014): Macrofauna associated with a bank of *Cladocora caespitosa* (Anthozoa, scleractinia) in the gulf of trieste (Northern Adriatic). *Annales, Series Historia Naturalis*. 24(1): 1–14.

Plantagea (2019–2022): <https://www.plantagea.hr/zbirka-tekstova/antioksidansi-pocetak/attachment/glutation-redukcija-oksidacija/> (pristupljeno 26. 11. 2023.)

Previati M., Scinto A., Cerrano C., Osinga R. (2010): Oxygen consumption in Mediterranean octocorals under different temperatures. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 390(1): 39–48.

Pryor S. H., Andrews L., Kelaher B. P., Tagliafico A., Scott A. (2021): Ocean temperature, but not acidification, causes sea anemone bleaching under a near-future climate scenario. *Coral Reefs*. 40(2): 355–364.

Rahman I., Kode A., Biswas S. K. (2007): Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature Protocols*. 1(6): 3159–3165.

Richier S., Furla P., Plantivaux A., Merle P., Allemand D. (2005): Symbiosis-induced adaptation to oxidative stress. *The Journal of Experimental Biology*. 208(2): 277–285.

Richier S., Sabourault C., Courtiade J., Zucchini N., Allemand D., Furla P. (2006): Oxidative stress and apoptotic events during thermal stress in the symbiotic sea anemone, *Anemonia viridis*. *Federation of European Biochemical Societies Journal*. 273(18): 4186–4198.

- Rivera H. E., Chen C. Y., Gibson M. C., Tarrant A. M. (2021): Plasticity in parental effects confers rapid larval thermal tolerance in the estuarine anemone *Nematostella vectensis*. *Journal of Experimental Biology*. 224(5): 236745.
- Robert X. i Gouet P. (2014): Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Research*. 42 (Web Server issue): W320–W324.
- Rodolfo-Metalpa R., Bianchi C. N., Peirano A., Morri C. (2005): Tissue necrosis and mortality of the temperate coral *Cladocora Caespitosa*. *Italian Journal of Zoology*. 72(4): 271–276.
- Rodriguez-Lanetty M., Harii S., Hoegh-Guldberg O. (2009): Early molecular responses of coral larvae to hyperthermal stress. *Molecular Ecology*. 18(24): 5101–5114.
- Seveso D., Montano S., Strona G., Orlandi I., Galli P., Vai M. (2013): Exploring the effect of salinity changes on the levels of Hsp60 in the tropical coral *Seriatopora caliendrum*. *Marine Environmental Research*. 90: 96–103.
- Seveso D., Montano S., Strona G., Orlandi I., Galli P., Vai, M. (2016): Hsp60 expression profiles in the reef-building coral *Seriatopora caliendrum* subjected to heat and cold shock regimes. *Marine Environmental Research*. 119: 1–11.
- Sunagawa S., Choi J., Forman H. J., Medina M. (2008): Hyperthermic stress-induced increase in the expression of glutamate-cysteine ligase and glutathione levels in the symbiotic sea anemone *Aiptasia pallida*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 151(1): 133–138.
- Terrell D. (2003): "*Actinia equina*" (On-line), Animal Diversity Web. https://animaldiversity.org/accounts/Actinia_equina/ (pristupljeno 22. 08. 2023.)
- Tietze F. (1969): Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical Biochemistry*. 27(3): 502–522.
- Torrents O., Tambutte E., Caminiti N., Garrabou J. (2008): Upper thermal thresholds of shallow vs. deep populations of the precious Mediterranean red coral *Corallium rubrum* (L.): assessing the potential effects of warming in the NW Mediterranean. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 357(1): 7–19.

Traylor-Knowles N. (2019): Heat stress compromises epithelial integrity in the coral, *Acropora hyacinthus*. PeerJ Life and Environment. 7: e6510.

Vilibić, I., Šepić, J., Proust, N. (2013): Weakening thermohaline circulation in the Adriatic Sea. Climate Research. 55(3): 217–225.

Wadhwa N., Mathew B. B., Jatawa S. K., Tiwari A. (2012): Lipid peroxidation: Mechanism, models and significance. International Journal of Current Science. 3: 29–38.

Waller, S. J., Knighton, L. E., Crabtree, L. M., Perkins, A. L., Reitzel, A. M., Truman, A. W. (2018): Characterizing functional differences in sea anemone Hsp70 isoforms using budding yeast. Cell Stress and Chaperones. 23(5): 933–941.

Weis V. M. (2008): Cellular mechanisms of Cnidarian bleaching: Stress causes the collapse of symbiosis. Journal of Experimental Biology. 211(19): 3059–3066.

Zibrowius H. (1982): Taxonomy in ahermatypic scleractinian corals. Paleontographica Americana. 54: 80–85.

Zunino S., Pitacco V., Mavrič B., Orlando-Bonaca M., Kružić P., Lipej L. (2018): The ecology of the Mediterranean stony coral *Cladocora caespitosa* (Linnaeus, 1767) in the Gulf of Trieste (northern Adriatic Sea): a 30-year long story. Marine Biology Research. 14(3): 307–320.

8 ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Puli 26. 08. 1999. godine. Pohađala sam Osnovnu školu Monte Zaro u Puli, a srednjoškolsko obrazovanje nastavila sam u Gimnaziji Pula koju sam završila 2018. godine. Iste godine upisala sam preddiplomski studij Molekularne biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta pri Sveučilištu u Zagrebu. Titulu sveučilišne prvostupnice molekularne biologije ostvarila sam 2021. godine kada sam nastavno upisala i diplomski studij Molekularne biologije na istom fakultetu. Tijekom fakultetskog obrazovanja sudjelovala sam s prezentacijom na Simpoziju studenata biologije Europe (Symbiose 2021), projektu Sveučilišta Jurja Dobrile u Puli „Partnerstvo između znanstvenika i ribara“ i projektu „Mobilni ZEZ centar“ udruge Baltazar za edukaciju mladih i popularizaciju STEM-a. Prisustvovala sam na znanstveno-popularnoj manifestaciji „Dan i noć na PMF-u“, danu karijera (WISe) kao i Simpoziju studenata bioloških usmjerenja (SISB). Laboratorijsku stručnu praksu „Biološka oceanografija“ i stručnu praksu „Biologija i ekologija mora“ obavljala sam na Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka u Laboratoriju za istraživanje mora pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Petra Kružića. Svoje sam znanje o biologiji mora, uz fakultetsko, upotpunjavala kroz višestruka volontiranja u Aquariumu Pula (Udruga Morski obrazovni centar) te usavršavanjem vještina SCUBA ronjenja (SSI Advanced Open Water Diver).