

# Procjena izloženosti dagnje (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819) onečišćenju mora upotrebom biomarkera oksidativnog stresa

---

Sabolić, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:124159>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Iva Sabolić

**Procjena izloženosti dagnje (*Mytilus galloprovincialis*  
Lamarck, 1819) onečišćenju mora upotrebom  
biomarkera oksidativnog stresa**

Diplomski rad

Zagreb, 2016.

*Ovaj rad, izrađen na Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom dr.sc. Anamarie Štambuk, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra ekologije i zaštite prirode.*

*Zahvaljujem mentorici dr.sc. Anamarii Štambuk na izdvojenom vremenu, ukazanoj potpori i pomoći te nepresušnom entuzijazmu i inspiraciji prilikom izrade ovog diplomskog rada.*

*Veliko hvala neposrednoj mentorici mag. Dorotei Polović na pripremi i recenziji ovog rada, ugodnom društvu tijekom mukotrpnih sati provedenih u laboratoriju, instrukcijama iz statističke obrade podataka te neprekidnom optimizmu i podršci.*

*Također, zahvaljujem svim djelatnicima i volonterima Laboratorija za ekotoksikologiju koji su sudjelovali u terenskom radu te djelatnicima Instituta Ruđer Bošković koji su odradili analize teških metala kao dijela ovog diplomskog rada.*

*Od srca hvala mojoj obitelji na strpljenju i bezuvjetnoj podršci.*

*I na poslijetku, veliko hvala svim prijateljima koji su dijelili moje muke i radosti tijekom cijelog studiranja i bez kojih bi ovaj rad vjerojatno bio puno prije gotov.*

# **TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## **Procjena izloženosti dagnje (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819) onečišćenju mora upotrebom biomarkera oksidativnog stresa**

Iva Sabolić

Roosveltov trg 6, 10 000 Zagreb

Oksidativni stres, poremećaj u ravnoteži između produkcije slobodnih kisikovih radikala i antioksidativne obrane organizma, može dovesti do štete na staničnim strukturama i poremetiti vitalne funkcije organizma. Zaštitu od toksičnosti slobodnih radikala stanicama omogućuje kompleksni sustav antioksidativne obrane te se oksidativna oštećenja i aktivnosti antioksidativnih enzima smatraju dobrim biomarkerima za analizu utjecaja okolišnog stresa na organizam. Glavni ciljevi ovog rada bili su utvrditi utjecaj kvalitete okoliša, sezonalnosti i adaptacijskih mehanizama na biomarkere oksidativnog stresa u dagnje (*Mytilus galloprovincialis*). Analizirano je 6 biomarkera: katalaza, glutation reduktaza, glutation S-transferaze, acetilkolinesteraza, karbonili i malondialdehidi. Biomarkeri su spektrofotometrijski određeni u 15 nativnih populacija dagnji s istočne obale Jadranskog mora, u jedinkama izlaganim povećanim koncentracijama bakra u laboratoriju te u dagnjama transplantiranim na postaje različite kvalitete okoliša. Rezultati bioloških analiza su integrirani s kemijskim analizama tkiva dagnji. Dobiveni rezultati su pokazali iznimnu varijabilnost svih biomarkera. Utvrđena je sezonalna varijabilnost te različit odgovor antioksidativnih enzima s obzirom na kvalitetu okoliša. Biomarkeri mjereni u kavezno izlaganim jedinkama najbolji su pokazatelj kvalitete okoliša. Jedinke u mezokozmos eksperimentu nisu pokazale populacijski učinak fenotipskog odgovora na stres te nisu utvrđene nedvosmislene korelacije između koncentracija određenih teških metala u tkivu nativnih jedinki i indukcije specifičnih biomarkera.

(69 stranica, 49 slika, 8 tablica, 130 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)  
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: *Mytilus galloprovincialis*, oksidativni stres, biomarkeri, mezokozmos, transplanti, teški metali

Voditelj: Dr.sc. Anamaria Štambuk, doc.  
Neposredni voditelj: mag. Dorožea Polović  
Ocjenitelji: 1. Dr.sc. Anamaria Štambuk, doc.  
2. Dr.sc. Sandra Radić Brkanac, doc.  
3. Dr.sc. Ana Galov, doc.

Rad je prihvaćen: 02.06.2016.

# **BASIC DOCUMENTATION CARD**

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Graduation Thesis

## **Assessment of pollution exposure in *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 using oxidative stress biomarkers**

Iva Sabolić

Roosveltov trg 6, 10 000 Zagreb

Oxidative stress, a disturbance in the balance between the production of reactive oxygen species and antioxidant defenses, can result in damage to cell structures and disturbance of vital functions. Protection against toxicity of free radicals is provided by a complex antioxidative defense system and, consequently, oxidative damage and activity of antioxidant enzymes are considered useful biomarkers for analysis of environmental stress responses in organisms. The main purpose of this work was to identify the effect of environmental quality, seasonality and adaptation mechanisms on oxidative stress biomarkers in mussels (*Mytilus galloprovincialis*). 6 biomarkers were analysed: catalase, glutathione reductase, glutathione S-transferases, acetylcholinesterase, carbonyl content and malondialdehyde. The biomarkers were determined by spectrophotometry in 15 native mussels populations from east Adriatic coast, in individuals exposed to copper in mesocosm and mussels transplanted to sites of different environmental quality. Biological analyses were integrated with data from chemical analyses of mussels tissue. Results showed high variability of biomarker responses. Seasonal variability and diverse response of antioxidative enzymes to different environment quality was detected. Biomarkers measured in caged mussels provided the best indication of the environmental quality. Mussels in mesocosm experiment didn't show population effect of phenotypic stress response, nor were unambiguous correlations found between specific heavy metals and biomarker induction in native populations.

(69 pages, 49 figures, 8 tables, 130 references, original in: Croatian)  
Thesis deposited in the Central Biological Library.

**Key words:** *Mytilus galloprovincialis*, oxidative stress, biomarkers, mesocosm, transplants, heavy metals

Supervisor: doc.dr.sc. Anamaria Štambuk

Assistant Supervisor: mag. Dorotea Polović

Reviewers: 1. Dr. Anamaria Štambuk, Asst. Prof.

2. Dr. Sandra Radić Brkanac, Asst. Prof.

3. Dr. Ana Galov, Asst. Prof.

Thesis accepted: 02.06.2016.

## Sadržaj:

1. Uvod .....	1
1.1. Mediteranska dagnja <i>Mytilus galloprovincialis</i> Lamarck, 1819.....	1
1.1.1. Dagnje kao modelni organizmi .....	2
1.2. Oksidativni stres.....	3
1.3. Biomarkeri oksidativnog stresa .....	5
1.3.1. Katalaza .....	7
1.3.2. Glutation reduktaza .....	8
1.3.3. Glutation S-transferaze.....	9
1.3.4. Acetilkinesteraza.....	9
1.3.5. Karbonili .....	10
1.3.6. Malondialdehidi.....	10
1.6. Ciljevi istraživanja.....	12
2. Materijali i metode .....	13
2.1. Područje istraživanja .....	13
2.2. Prikupljanje i obrada jedinki .....	14
2.2.1. Mezokozmos eksperiment .....	15
2.2.2. Transplant eksperiment .....	15
2.3. Kemijska analiza tkiva .....	16
2.4. Analiza biomarkera oksidativnog stresa .....	17
2.4.1. Određivanje aktivnosti katalaze .....	17
2.4.2. Određivanje aktivnosti glutacion reduktaze .....	18
2.4.3. Određivanje aktivnosti glutacion S-transferaza .....	18
2.4.4. Određivanje aktivnosti acetilkolinesteraze .....	19
2.4.5. Određivanje koncentracije karbonila.....	19
2.4.6. Određivanje koncentracije malondialdehida .....	20
2.4.7. Određivanje ukupnih proteina.....	21
2.5. Statistička obrada podataka .....	21
3. Rezultati.....	22
3.1. Biomarkeri oksidativnog stresa i neurotoksičnosti u dagnjama uzorkovanim u jesen 2013. godine.....	22

3.2. Biomarkeri oksidativnog stresa i neurotoksičnosti u dagnjama uzorkovanim u proljeće 2014. godine.....	26
3.3. Biomarkeri oksidativnog stresa i neurotoksičnosti u dagnjama izlaganim u mezokozmos eksperimentu .....	30
3.4. Biomarkeri oksidativnog stresa i neurotoksičnosti u kavezno izlaganim dagnjama unutar transplant eksperimenta.....	34
3.5. Analiza glavnih komponenti (PCA) biomarkera oksidativnog stresa i neurotoksičnosti .....	39
3.6. Korelacije između koncentracije metala u tkivu dagnji i biomarkera oksidativnog stresa i neurotoksičnosti.....	46
4. Rasprava .....	51
4.1. Utjecaj kvalitete okoliša i sezonalnosti na biomarkere oksidativnog stresa i neurotoksičnosti .....	51
4.2. Utjecaj bakra na biomarkere oksidativnog stresa i neurotoksičnosti .....	54
4.3. Utjecaj kaveznog izlaganja unutar transplant eksperimenta na biomarkere oksidativnog stresa i neurotoksičnosti.....	55
4.4. Integracija bioloških i kemijskih analiza.....	56
5. Zaključak .....	58
6. Literatura .....	59
7. Prilozi.....	69
8. Životopis .....	



## Popis oznaka i kratica:

AChE	Acetilkinesteraza
ANOVA	Analiza varijance
CAT	Katalaza
CDNB	1-kloro-2,4-dinitrobenzen
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazin
DTNB	5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina
EDTA	Etilendiamintetraoctena kiselina
GPx	Glutation peroksidaza
GR	Glutation reduktaza
GSH	Reducirani glutation
GSSG	Oksidirani glutation
GST	Glutation S-transferaze
KP pufer	Kalij – fosfatni pufer
MDA	Malondialdehidi
NADPH	Reducirani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
PAH	Policiklični aromatski ugljikovodici
PCB	Poliklorirani bifenili
PCA	Analiza glavnih komponenti
PLS	Regresijska analiza metodom parcijalnih najmanjih kvadrata
ROS	Reaktivni kisikovi radikali
TBA	Tiobarbiturna kiselina
TCA	Trikloroactena kiselina

# 1. Uvod

## 1.1. Mediteranska dagnja *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819

Mediteranska dagnja, *Mytilus galloprovincialis*, jedna je od tri vrste školjkaša iz porodice Mytilidae koje nalazimo u Europi. Autohtona je vrsta u Jadranskom, Crnom i Sredozemnom moru, a antropogenim aktivnostima proširena je i na obalu Atlantskog oceana od Portugala do Irske te po ostatku svijeta. Zajedno sa svojim sestrinskim vrstama *Mytilus edulis* i *Mytilus trossulus* danas je široko rasprostranjena u umjerenim područjima sjeverne i južne hemisfere i smatra se invazivnom vrstom (<http://www.issg.org/>). Tradicionalno se uzgaja u akvakulturi diljem Mediterana, a u novije vrijeme i u drugim dijelovima svijeta.

Dagnje nalazimo u zonama izloženih kamenitih obala mediolitorala s relativno visokom energijom valova, iako se rijede mogu naći i u gustim nakupinama na pjeskovitim i muljevitim dnima i do 40m dubine (Ceccherelli i Rossi 1984). Za podlogu se čvrsto pričvršćuju bisusnim nitima koje izlučuje stopalo i često su dominantna vrsta u zajednicama koje nastanjuju.

Ljuštura dagnji su trokutastog oblika, tamnoplave, smeđe ili crne boje. Na jednoj strani rub ljuštura završava šiljastim i lagano zavijenim vrhom dok je druga strana zaobljena iako oblik može varirati ovisno o regiji (Slika 1). Na veličinu jedinki uvelike utječu karakteristike samog biotopa. Prosječna visina ljuštura je 5-8 cm, no mogu narasti i do 15 cm (<http://www.fao.org/>).



**Slika 1** Mediteranska dagnja *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 (preuzeto s: <http://www.swims.hku.hk/>)

### **1.1.1. Dagnje kao modelni organizmi**

Beskralješnjaci, a posebno školjkaši poput dagnji, se smatraju jako dobrim organizmima za istraživanje bioloških efekata onečišćivača (Viarengo i sur. 2007) i često se koriste za monitoring obalnih okoliša u cijelom svijetu (Goldberg 1975).

Dagnje su po svojim karakteristikama jako dobri modelni organizmi za korištenje u ekotoksikološkim istraživanjima: imaju široku geografsku rasprostranjenost, sesilni su organizmi prilagođeni širokim ekološkim uvjetima i lako se skupljaju na čistim i onečišćenim postajama. Budući da se hrane filtrirajući plankton i detritus, kroz njihove škrge i plaštanu šupljinu dnevno prolazi velika količina vode te mogu akumulirati i tolerirati visoke koncentracije mnogih organskih i anorganskih onečišćivača u svojim tkivima (Livingstone 1991).

Upravo se zbog velike sposobnosti bioakumulacije i biokoncentracije smatra da dagnje jako dobro reflektiraju promjene u stanju onečišćenosti okoliša što ih čini poželjnom bioindikatorskom vrstom (Phillips i Rainbow 1989). Nekoliko studija ukazuje na to da akumulacija metala u školjkašima ovisi o koncentraciji zagađivača i vremenu izlaganja (Roesijadi i Unger 1993, Wang i Evans 1993, Das i Jana 1999).

Probavna žlijezda mekušaca kombinira svojstva jetre i gušterače i često se koristi u toksikologiji dagnji jer je glavni organ metabolizma organskih spojeva i glavno mjesto biotransformacije ksenobiotika unesenih u organizam hranom (Livingstone 1998).

Iako su istraživanja na višim morskim organizmima neophodna za nedvosmislen zaključak o stanju ekosustava, dagnje se mogu koristiti za istraživanje ranog upozoravajućeg odgovora na dugotrajno ekološko onečišćenje (Vlahogianni i sur. 2007).

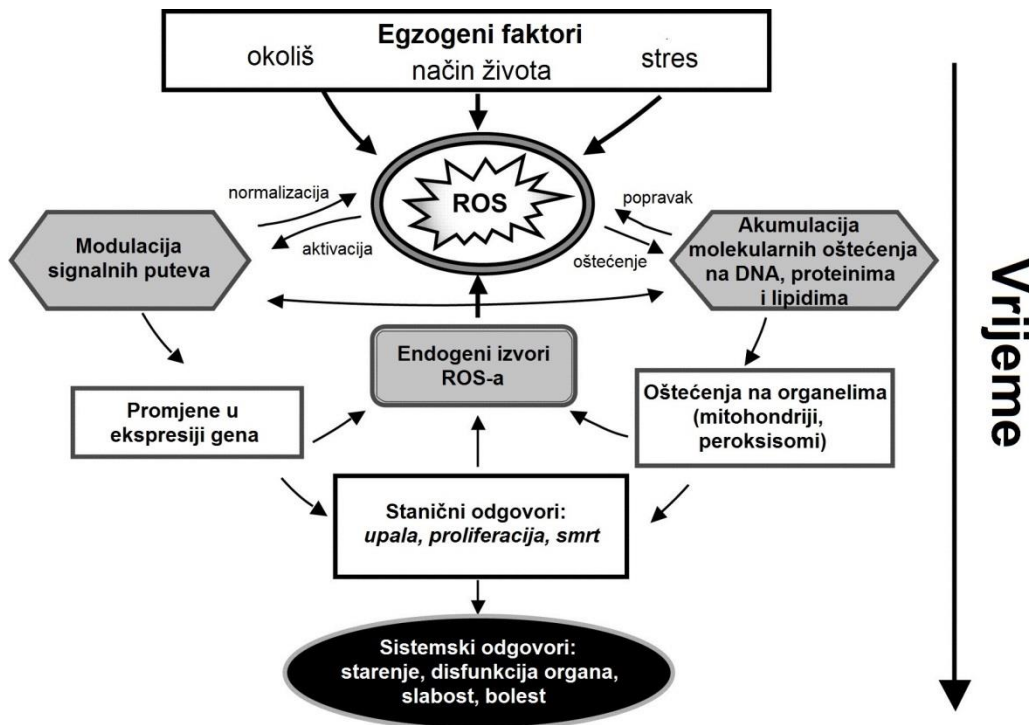
## 1.2. Oksidativni stres

Oksidativni stres se definira kao poremećaj u ravnoteži između produkcije reaktivnih kisikovih spojeva (slobodnih radikala) i antioksidativne obrane organizma (Betteridge 2000).

Slobodni kisikovi radikali (ROS) (eng. *reactive oxygen species*) su nestabilni atomi ili molekule koje u vanjskoj elektronskoj ljusci sadrže jedan nespareni elektron. Kako bi postali stabilniji, mogu uzeti elektrone s drugih molekula prilikom čega dolazi do stvaranja novih radikalnih vrsta i lanca oksidacije (Halliwell i Gutteridge 1984). ROS prirodno nastaju tijekom staničnog aerobnog metabolizma kao rezultat djelomične redukcije kisika u vodu, no također mogu nastati i tijekom metabolizma određenih ksenobiotika (Livingstone i sur. 1990). Glavni slobodni radikali kisika koji nastaju metabolizmom kontaminanata su superoksidni anion ( $O_2^{\cdot-}$ ), vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), hidroksilni radikali ( $\cdot OH$ ), peroksilni radikali ( $ROO\cdot$ ), alkoksilni radikali ( $RO\cdot$ ) i peroksinitrit ( $\cdot OONO$ ) (Camus i sur. 2004). Dokazano je da je hidroksilni radikal najreaktivniji i najmanje selektivan ROS (Davies 2005).

Niske razine slobodnih radikala su neophodne za održavanje homeostaze stanice (Ames i sur. 1993), mehanizma signalizacije i regulaciju različitih staničnih funkcija kao što su sekrecija, rast i ekspresija gena (Halliwell i Gutteridge 1997). Međutim, prevelika produkcija reaktivnih kisikovih spojeva, izazvana okolišnim stresom ili metabolizmom velike količine ksenobiotika, može izazvati promjenu u ravnoteži između oksidansa i antioksidansa prema oksidansima pri čemu dolazi do oksidativnog stresa. Dulje izlaganje dovodi do oksidativne štete na DNK, lipidima i proteinima (Kaloyianni i sur.

2009). ROS u tom slučaju mogu izazvati oštećenje tkiva, promjeniti fiziološko-kemijska svojstva staničnih membrana i poremetiti vitalne funkcije organizma (Manduzio i sur. 2005) (Slika 2).



**Slika 2** Shematski prikaz mehanizma kojim ROS i oksidativni stres pridonose oštećenju stanica i bolesti organizma (preuzeto i prilagođeno iz: Kregel i Zhang 2007)

Razina biološke štete do koje dolazi prevelikom produkcijom slobodnih kisikovih radikala ovisi o učinkovitosti antioksidativne obrane organizma (Livingstone i sur. 1992). Aerobni organizmi su se u procesu evolucije prilagodili povećanim koncentracijama kisika koji im je bitan za održavanje metabolizma, no štetan za biomolekule zbog svog oksidativnog potencijala. Zaštitu od toksičnosti slobodnih radikala stanicama omogućuje kompleksni sustav obrane koji se sastoji od neenzimatskih komponenata i antioksidativnih enzima (Regoli 1998). Konkretno, u dagnjama antioksidativni sustav obrane sadrži enzime kao što su katalaza, glutatation S-transferaze, superoksid dismutaza, glutatation reduktaza te neenzimatske molekule poput glutatationa (Livingstone

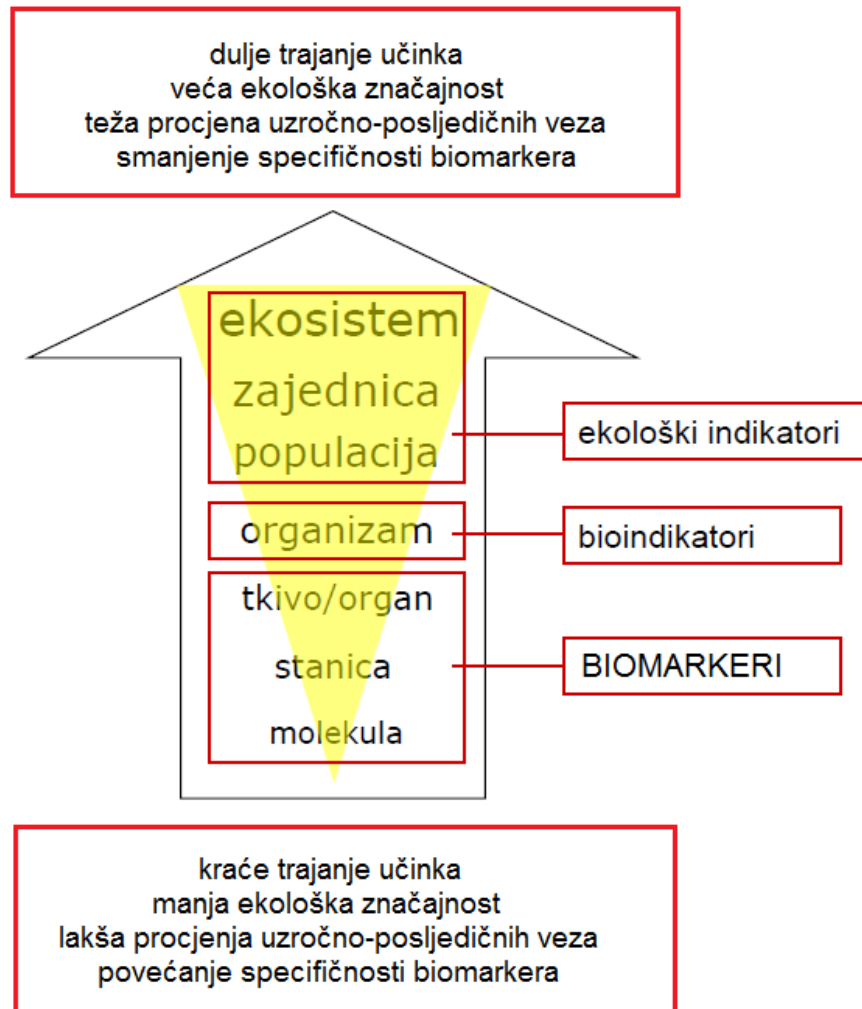
2001). Mnoge studije su pokazale pozitivnu korelaciju između stupnja antioksidativne obrane i prisutnosti ksenobiotika u organizmu (Orbea i sur. 2002).

Mjerenje oksidativnih oštećenja, poput stupnja lipidne peroksidacije i karbonilacije proteina, te antioksidativnog odgovora organizma se često koristi kao biomarker u ekotoksikološkim istraživanjima i smatra se dobrom metodom za analiziranje različitih efekata koje onečišćenje okoliša ima na organizam (Vidal-Liñán i sur. 2010).

### **1.3. Biomarkeri oksidativnog stresa**

U posljednjim je desetljećima prepoznato da se procjena okolišnog onečišćenja ne može temeljiti samo na kemijskim analizama jer one ne pružaju pravu indikaciju toksičnih efekata onečišćivača na morski ekosustav (Livingstone 2001). Koncentracija kontaminanata u tkivima organizama ne daje informaciju o biološkom značaju i štetnim učincima zagađenja okoliša na biološke sustave, a budući da je krajnji cilj monitoringa okoliša zaštita ekoloških sustava, neophodno je istražiti cjelokupne biološke efekte izlaganja potencijalno štetnim sastojcima u okolišu. Stoga se internacionalne organizacije sa iskustvom u procjeni onečišćenja mora zalažu za korištenje bioloških odgovora kao dodatak kemijskim analizama u programima monitoringa (OSPAR 2000, ICES 2008). Da bi se to ostvarilo, razvile su se mnoge biološke metode za monitoring, od mjerenja odgovora na substancičnoj razini do odgovora cijelog organizma. Takva mjerenja ukazuju na vezu između kontaminanata i ekoloških odgovora i mogu se koristiti za detekciju štetnih sastojaka u morskom okolišu (Goldberg 1986).

Biomarkeri su promjene na staničnoj, biokemijskoj, molekularnoj ili fiziološkoj razini koje se mogu mjeriti u stanicama, tjelesnim tekućinama, tkivima ili organima unutar organizma i koje mogu biti indikacija izloženosti ksenobioticima i njihovom djelovanju na organizam (McCarthy i Shugart 1990). Glavna funkcija biomarkera je dati rane signale za uzbunu na značajne biološke promjene, budući da se smatra da odgovori na razinama nižim od organizma dolaze prije onih koji se događaju na višim razinama biološke organizacije kao što su populacija, zajednica ili ekosustav (Lam 2009) (Slika 3).



**Slika 3** Shema djelovanja biomarkera na različitim biološkim razinama (preuzeto i prilagođeno iz: Van Gestel i Van Brummelen 1996)

Istraživanje različitih biomarkera u laboratorijima i na terenu smatra se dobrom metodom za procjenu obrambenih, genotoksičnih, klastogenih i histopatoloških promjena prije nego dođe do kroničnih posljedica kao što su bolest, smrt ili promjene populacije, te na taj način daju detaljnu sliku o zdravlju organizma i statusu okoliša (Danellakis i sur. 2011). Visoka korelacija između stanja biomarkera i koncentracije onečišćivača je dokazana brojnim studijama (Michel i sur. 1993).

Kako bi se pravilno interpretirale fiziološke promjene utvrđene biomarkerima neophodno je razlučiti između efekata prouzročenih onečišćenjem i prirodnih fluktuacija

metabolizma (Handy i sur. 2003). Biomarkeri oksidativnog stresa su povezani s promjenama fizičko-kemijskih okolišnih faktora kao što su temperatura, salinitet, dostupnost hrane i količina kisika, no i intrinzičnim biološkim aktivnostima poput razvoja gonada ili reproduktivnog ciklusa (Widdows 1978) te starenja (Canesi i Viarengo 1997). Kako te promjene mogu utjecati na normalne metaboličke aktivnosti, uključujući antioksidativne odgovore i produkciju slobodnih radikala (Sheehan i Power 1999), abiotički i biotički faktori moraju biti ukomponirani u interpretaciju biomarkera oksidativnog stresa (Fernández i sur. 2010).

Stoga, umjesto izbora jednog biomarkera oksidativnog stresa, korištenje široke lepeze biomarkera daje potpuniju sliku efekata koje ksenobiotici imaju na oksidativni stres u organizmima. Ti biomarkeri bi trebali uključivati i oksidativnu štetu kao i promjene u antioksidativnom sustavu obrane (Almroth i sur. 2008).

### **1.3.1. Katalaza**

Katalaza (CAT) je dobro poznat antioksidativni enzim, odgovoran za redukciju vodikovog peroksida ( $H_2O_2$ ) u vodu i kisik.  $H_2O_2$  može nastati tijekom bazalnog aerobnog metabolizma, te u povećanim koncentracijama nakon izlaganja onečišćenju (Winston i Livingstone 1990). Vodikov peroksid je glavna preteča hidroksilnog radikala ( $\cdot OH$ ) koji je veoma reaktivan i toksičan oblik slobodnog kisikovog spoja. Uklanjanje  $H_2O_2$  je važna strategija morskih organizama protiv oksidativnog stresa (Regoli i sur. 2002a). Box i sur. (2007) su pokazali da je katalaza aktivna pri relativno visokim koncentracijama  $H_2O_2$ , dok kod niske produkcije ima manju ulogu u katabolizmu vodikovog peroksida. Pri niskim koncentracijama  $H_2O_2$ , za njegovu redukciju i održavanje normalne stanične funkcije zadužen je enzim glutation peroksidaza (GP) (Vidal-Liñán i sur. 2010).

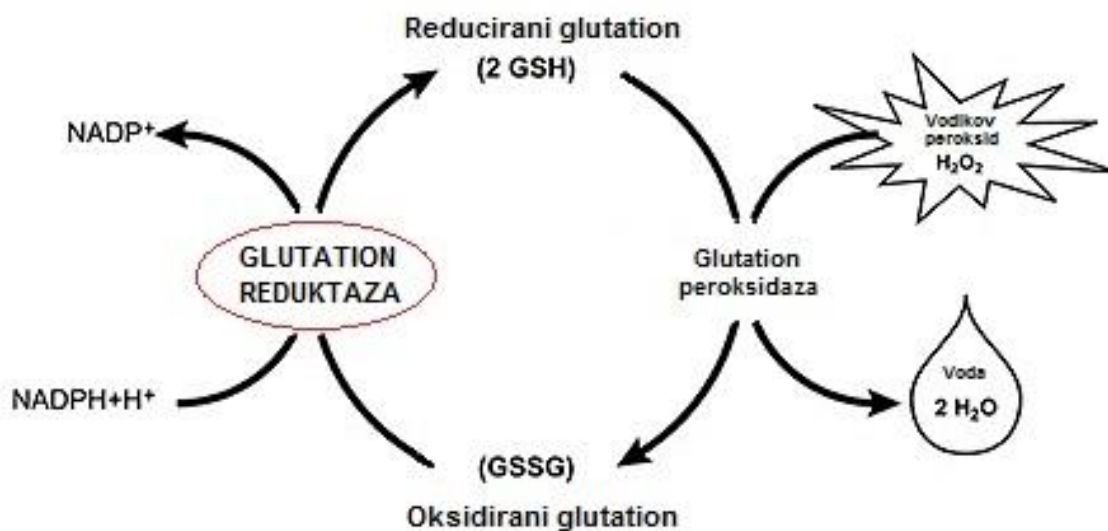
CAT ne pokazuje specifični odgovor na određenu grupu kontaminanata pa se smatra primarnom obranom protiv oksidativne štete i već je proučavan u školjkašima (Pellerin-Massicotte 1997). U istraživanjima u kojima je CAT korišten kao biomarker oksidativnog stresa nađene su visoke korelacije između koncentracije teških metala u tkivu dagnji i aktivnosti samog enzima (Regoli 1998).



### 1.3.2. Glutation reduktaza

Glutation reduktaza (GR) ne igra izravnu ulogu u eliminaciji kisikovih radikala, no može se smatrati esencijalnim antioksidativnim enzimom jer reducira oksidirani glutacion (GSSG) i održava GSSG/GSH ravnotežu neophodnu za homeostazu stanice i aktivnost drugih enzima (Winston i Di Giulio 1991). Redoks status stanice je generalno određen omjerom reduciranog (GSH) i oksidiranog glutaciona, a GR i NADPH održavaju ovaj omjer u korist GSH (Schafer i Buettner 2001) (Slika 4). Ako se omjer previše pomakne u korist GSSG može doći do apoptoze stanica (Matés i Sánchez-Jiménez 2000).

Pozitivne korelacije između aktivnosti GR i koncentracije žive, kadmija, olova i cinka u prijašnjim istraživanjima pokazuju povećanje kapaciteta za recikliranje GSH i zaštitu protiv toksičnosti metala u dagnjama iz područja koja pokazuju onečišćenje metalima (Verlecar i sur. 2008). Dodatno, korelacije nađene između GR i aktivnosti drugih glutacion-povezanih enzima ukazuju na koordiniranu enzimatsku regulaciju ovih enzima da bi se obnovila zaliha GSH i održala efektivna antioksidativna obrana organizma (Fernández i sur. 2010).



**Slika 4** Shema oksidoreduktivnog ciklusa glutaciona (preuzeto i prilagođeno s: <http://genomics.unl.edu/>)

### **1.3.3. Glutation S-transferaze**

Ksenobiotici u organizmu mogu biti biotransformirani prema mehanizmu koji se može podijeliti u tri faze. Faza I je alteracija (oksidacija, redukcija ili hidroliza) originalne strane molekule, koja onda može biti konjugirana u fazi II i katabolizirana u fazi III (Van der Oost i sur. 2003). Glutation S-transferase (GST) su skupina biotransformacijskih enzima faze II koji kataliziraju konjugaciju ksenobiotika sa –SH grupom glutaciona, neutralizirajući njihova elektrofilna mjesta i čineći produkte topljivijima u vodi. Glutation konjugati se dalje metaboliziraju rastavljanjem na glutamat i glicin, nakon čega se slobodna amino grupa cisteina acetilira da bi se stvorio konačni produkt, merkapturična kiselina (Boylard i Chasseaud 1969). Merkapturična kiselina se potom izlučuje iz organizma (Habig i sur. 1974). Dodatno, GST mogu katalizirati aktivnost glutation peroksidaze (Prohaska 1980) što pridonosi povećanju stupnja antioksidativne obrane organizma.

GST se široko koriste kao biomarkeri izloženosti policikličnim aromatskim ugljikovodicima (PAH) i polikloriranim bifenilima (PCB) te teškim metalima u dagnjama i ostalim beskralješnjacima (Vidal-Liñán i sur. 2010). Štoviše, istraživanja na *M. edulis* pokazuju da prema prirodi onečišćivača u organizmu mogu biti inducirane različite izoforme glutacion S-transferaza, budući da one pokazuju specifična svojstva vezivanja za različite tipove kemikalija (Fitzpatrick i sur. 1997).

### **1.3.4. Acetilkinesteraza**

Acetilkinesteraza (AChE) je esencijalan enzim za ispravno prenošenje živčanih impulsa budući da katalizira razgradnju acetilkolina, najvažnijeg neurotransmitera u živčanom sustavu mnogih životinja. AChE se uobičajeno nalazi kao transmembranski protein u različitim staničnim membranama beskralješnjaka, kao što su membrane škrga i probavne žlijezde te u hemolimfi (Dailians i sur. 2003).

Budući da je AChE osjetljiv na neurotoksične supstance, mjerenje njegove aktivnosti široko se koristi kao osjetljiv biomarker neurotoksičnosti u mekušcima (Galloway i sur. 2002, Valbonesi i sur. 2003, Rickwood i Galloway 2004). Inhibicija AChE je direktno povezana s toksičnim djelovanjem organofosfata i karbamatnih

pesticida (Galgani and Bocquené 1989) te nekim metalima i ugljikovodicima (Jebali i sur. 2006, Banni i sur. 2010).

### **1.3.5. Karbonili**

Akutni efekt oksidativne štete na proteinima je formacija karbonilnih grupa. Izlaganje ROS-u može izazvati ireverzibilne modifikacije proteinskih aminokiselinskih bočnih lanaca (većinom lizina, arginina, prolina i histidina) u aldehidne i ketonske grupe (karbonilacija) što može dovesti do agregacije, inaktivacije ili degradacije proteina (Levine i sur. 1990).

Povećanje u razini karbonilnih grupa na proteinima dobro korelira s oksidativnim stresom (Shacter i sur. 1994) i karbonilacija proteina je zadnjih godina često korištena kao biomarker oksidativnog stresa u nekoliko bioindikatorskih vrsta (Almroth i sur. 2005, McDonagh i sur. 2005, Parvez i Raisuddin 2005). Korištenje proteinskih karbonilnih grupa kao biomarkera pokazuje prednosti u usporedbi s mjerenjima drugih produkata oksidacije jer se relativno rano formiraju, a karbonilirani proteini su stabilni (Davies i Goldberg 1987) i stoga ne pokazuju prolazni odgovor tipičan za antioksidativne enzime (Prevodnik i sur. 2007).

Zna se da su karbonilni spojevi toksični zbog svojih kancerogenih svojstava i njihova prisutnost u organizmu je stoga izvor zabrinutosti zbog potencijalno negativnog učinka na zdravlje (Bakeas i sur. 2003).

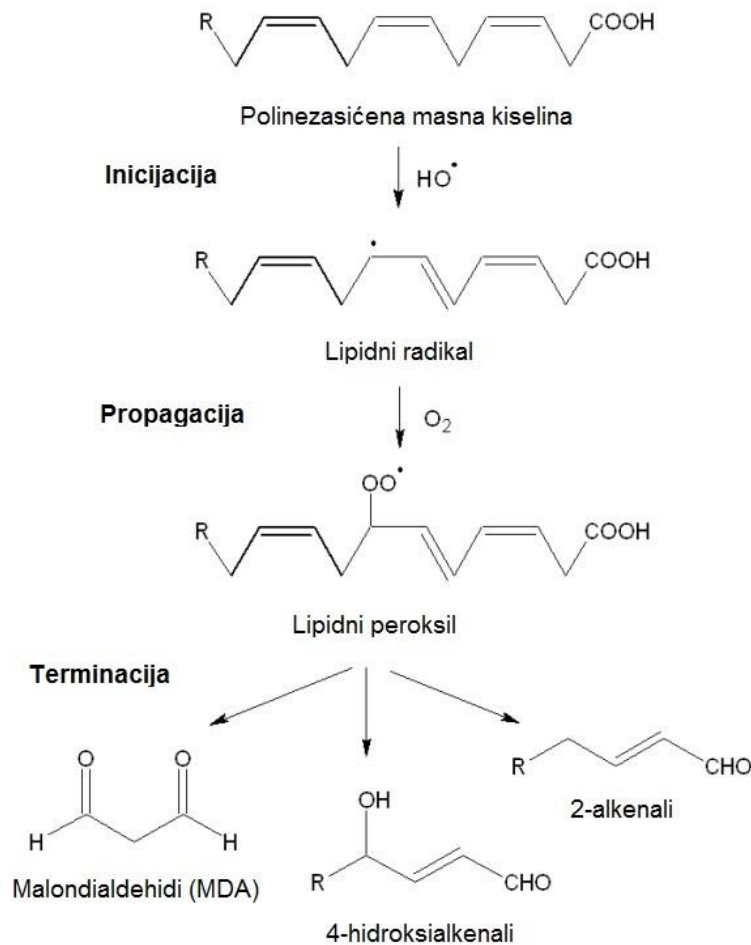
### **1.3.6. Malondialdehidi**

Lipidna peroksidacija je proces kojim slobodni radikali uzimaju elektrone s polinezasićenih masnih kiselina u staničnim membranama pri čemu nastaju lipidni peroksili. Ukoliko oksidacija lipida nije kontrolirana antioksidativnim sustavima dolazi do lančane reakcije koja u konačnici dovodi do oštećenja strukture stanice. Završni produkti lipidne peroksidacije su reaktivni aldehidi (Yin i sur. 2001), od kojih su najzastupljeniji malondialdehidi (MDA) (Pampanin i sur. 2005) (Slika 5). Lipidna peroksidacija ima bitan utjecaj na biološke sustave jer peroksidirane membrane postaju krute, mijenjaju

propusnost i integritet. Stupanj lipidne peroksidacije se može odrediti prema razini primarnih produkata, lipidnih peroksida i krajnjih produkata poput MDA (Stadtman i Levine 2000).

Povećanje količine MDA u organizmu može biti povezano s degradacijom okoliša i smanjenjem kvalitete vode (Charissou i sur. 2004). Istraživanja rađena na morskim vrstama su pokazala da je lipidna peroksidacija relevantan indeks biokemijske štete inducirane toksinima (Pedrajas i sur. 1995).

MDA su mutageni i kancerogeni (Marnett 1999) te imaju ekstremno štetan učinak na stanice i tkiva jer uzrokuju oštećenja DNK i staničnih proteina (Leuratti i sur. 1998). Smatraju se korisnim biomarkerom za mjerenje razine oksidativnog stresa (Del Rio i sur. 2005).



**Slika 5** Mehanizam lipidne peroksidacije (preuzeto i prilagođeno s: <http://www.intechopen.com/>)

## 1.6. Ciljevi istraživanja

Glavni cilj ovog rada je utvrditi varijabilnost biomarkera oksidativnog stresa između populacija dagnji sakupljenih s više postaja različite kvalitete okoliša te njihovu sezonsku varijabilnost. Uspoređujući aktivnost biomarkera u dvije različite populacije u kontroliranom mezokozmos eksperimentu, gdje će dagnje biti izložene povećanoj koncentraciji bakra, definirati će se populacijski efekt fenotipskog odgovora na stres. Usporedbom s rezultatima transplant eksperimenta u prirodnim uvjetima procijenit će se aklimatizacijski kapacitet dagnji, primjerice fenotipska fiziološka plastičnost s obzirom na promjenjive okolišne uvjete. Transplantiranjem dagnji smanjit će se fiziološka varijabilnost među populacijama što će omogućiti bolje istraživanje promjena potaknutih degradacijom okoliša.

Dobiveni rezultati bit će uspoređeni s podacima dobivenim kemijskim analizama tkiva dagnji s istih postaja. Kombinacijom nativnih populacija, transplanata i mezokozmosa analizirat će se prilagodba na onečišćenje u vidu indukcije antioksidativnih mehanizma. Usporedbom biomarkera izloženosti (enzimi) i učinka, utvrdit će se učinkovitost staničnog odgovora na stres u očuvanju staničnog integriteta.

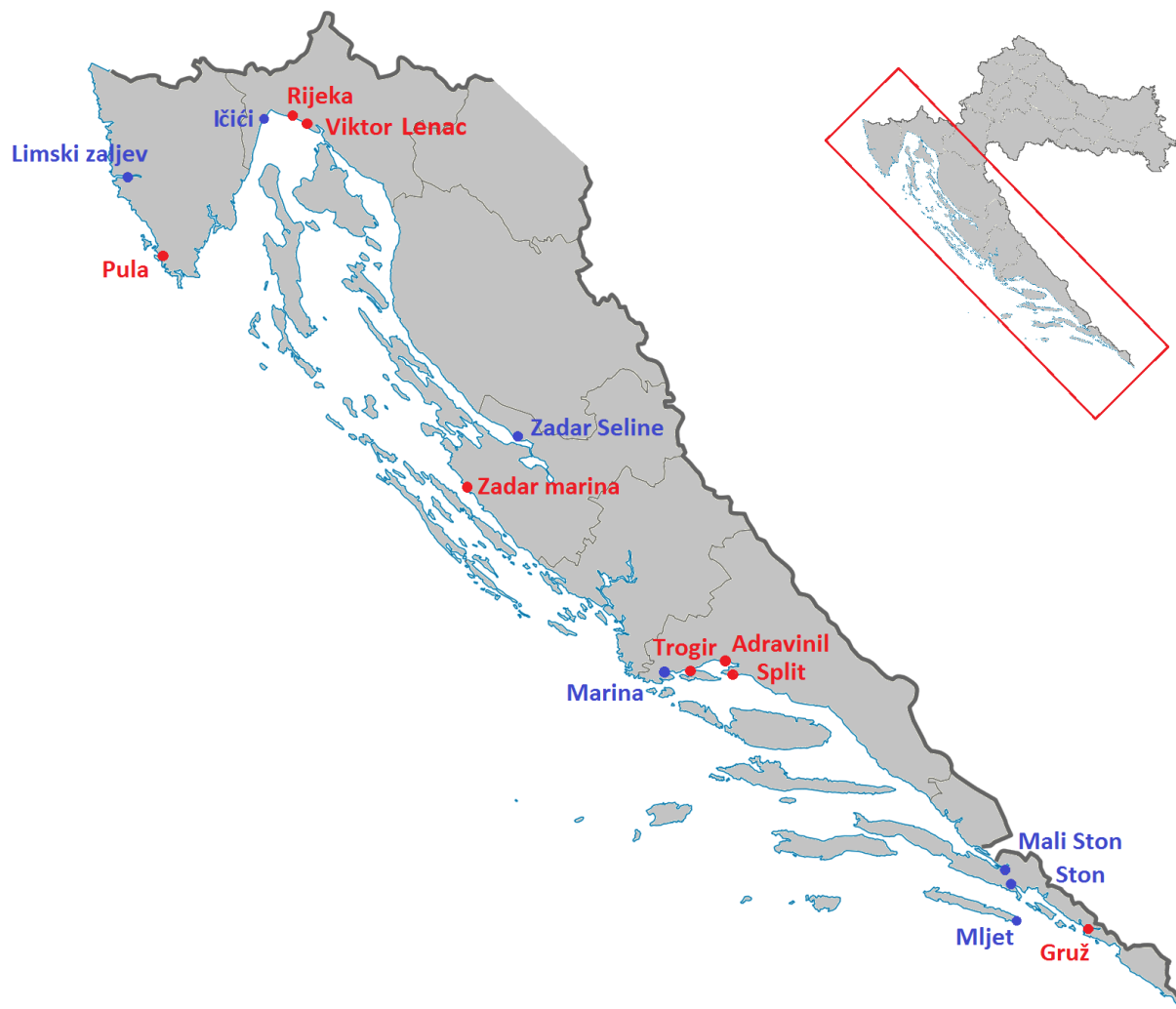
## 2. Materijali i metode

### 2.1. Područje istraživanja

Istraživanje je provedeno na populacijama dagnji s 15 lokaliteta duž istočne obale Jadranskog mora, podjeljenih u tri regije – sjeverni, srednji i južni Jadran (Slika 6). Lokaliteti su odabrani kako bi se pokrio širok raspon geografskih i ekoloških uvjeta. U svrhu određivanja utjecaja onečišćenja na biomarkere oksidativnog stresa, odabrane postaje podijeljene su na čiste i onečišćene prema povijesti onečišćenja lokaliteta, podacima dobivenim kemijskim analizama te prethodnim istraživanjima na tim područjima (Klobučar i sur. 2008, Petrović i sur. 2004, Štambuk i sur. 2013).

Čistim postajama ili postajama s niskom razinom antropogenog zagađenja smatraju se Limski zaljev (prirodni rezervat i uzgajalište dagnji u Istri), Ičići (malo turističko mjesto u Kvarnerskom zaljevu), Zadar Seline (uzgajalište dagnji na obali Velebitskog kanala blizu Paklenice), Marina (uzgajalište dagnji kraj Trogira), Mali Ston (naselje u blizini Stona), Ston (uzgajalište dagnji u Dubrovačko-neretvanskoj županiji) te Mljet (uvala Sapunara u nacionalnom parku Mljet).

Onečišćenim postajama s viskom razinom antropogenog onečišćenja smatraju se Pula i Rijeka (veliki gradovi i prometne luke), Viktor Lenac (brodogradilište kraj Rijeke), Zadar i Trogir (marine), Adriavinil (bivša tvornica za proizvodnju kemikalija i kemijskih proizvoda kod Splita), Split (veliki grad i prometna luka) te Gruž (luka u Dubrovniku).



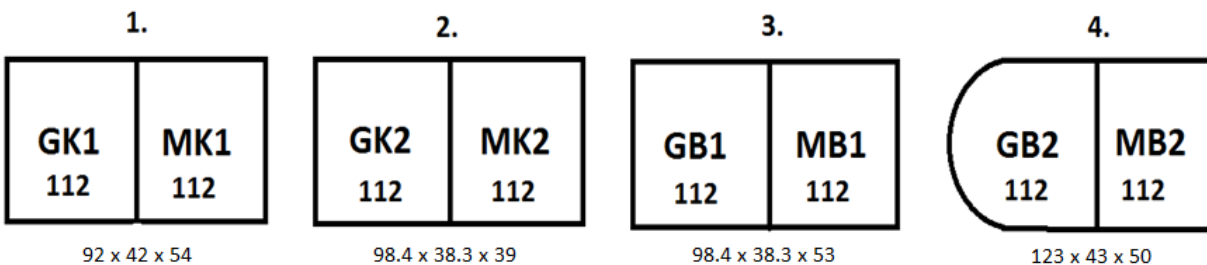
Slika 6 Kartografski prikaz istraživanih postaja

## 2.2. Prikupljanje i obrada jedinki

Jedinke iz nativnih populacija dagnji prikupljane su metalnim grabilom u jesen 2013. i proljeće 2014. godine sa dubine 0,5-1 m. Nakon prikupljanja, dagnje su stavljene na led te prenesene u najbliži laboratorij u određenoj regiji (privremeni laboratoriji na Mljetu i Pelješcu, Istraživačka postaja Martinska te Centar za istraživanje mora Rovinj). U laboratorijima su izdvojeni uzorci tkiva (10 jedinki po postaji) za kemijske analize i probavna žlijezda za analize biomarkera. Uzorci su čuvani u tekućem dušiku do daljnje obrade u Laboratoriju za ekotoksikologiju na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu.

### 2.2.1. Mezokozmos eksperiment

U travnju i svibnju 2014. godine jedinke iz odabrane čiste postaje Marina i onečišćene postaje Gruž izlagane su povećanim koncentracijama bakra u mezokozmos eksperimentu. Jedinke sakupljene iz pergolara u Marini (~ 450) i pomoću metalnog grabila na postaji Gruž (~ 450) transportirane su na ledu do akvarija u Puli gdje su prebačene u bazene s morskom vodom. Period aklimatizacije je trajao 4 tjedna u kontroliranim uvjetima, pri temperaturi od 17 °C u aeriranim bazenima gdje je režim svjetla i tame bio 12h/12h i ½ vode u bazenu svaki dan zamjenjeno svježom morskom vodom. Nakon aklimatizacije 224 jedinke svake populacije su izložene povećanim koncentracijama bakra dok su 224 jedinke svake populacije izlagane čistoj morskoj vodi (kontrola) (Slika 7). Izlaganje je trajalo 8 dana, tijekom kojih je svaki dan u bazene dodavano 7,8 ml bakra ( $c = 100 \mu\text{g L}^{-1}$ ) i 1,5 ml hrane (suspenzija algi). Nakon 8 dana, iz dagnji je izdvojena probavna žlijezda i pohranjena u tekućem dušiku u Laboratoriju za ekotoksikologiju na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu do naknadnih analiza biomarkera oksidativnog stresa.



**Slika 7** Shema mezokozmos eksperimenta u kojem su dagnje izlagane povećanim koncentracijama bakra (GK – Gruž kontrola, GB – Gruž bakar, MK – Marina kontrola, MK – Marina bakar)

### 2.2.2. Transplant eksperiment

Dagnje iz odabrane referentne postaje Marina s minimalnom razinom antropogenog onečišćenja su u travnju 2014. godine transplantirane na 6 postaja različite kvalitete okoliša. Čiste postaje uključivale su Limski zaljev, Zadar Seline i Ston, dok su onečišćene postaje bile Pula, Zadar marina i Gruž. 300 jedinki po postaji raspoređeno je u tri kaveza veličine 50x50 cm, izgrađenih od drvenog okvira i polietilenske mreže te učvršćenih ribarskim flaksom (Slika 8). Kavezi su postavljeni na



dubinu od 1-1,5 m te osigurani sidrom i konopom. Kavezno izlaganje dagnji trajalo je 30 dana, nakon čega su iz dagnji izvađene probavne žlijezde za biološke analize biomarkera.



**Slika 8** Kavez s dagnjama korišten u transplant eksperimentu

### 2.3. Kemijska analiza tkiva

Kemijska analiza tkiva dagnji rađena je na uzorcima nativnih populacija dagnji prikupljenih u proljeće 2014. godine.

Za određivanje koncentracije pojedinih metala i metaloida, homogenizirani uzorci tkiva dagnji stavljeni su u kivetu sa 10 mL „aqua regia“ (omjer 1:3 nitratna kiselina:klorovodična kiselina) te u mikrovalnu pećnicu (Multiwave 3000, Anton Paar, Graz, Austria). Nakon digestije, uzorci su razrijeđeni Milli-Q vodom do optimalne koncentracije za mjerenje ICPMS (masena spektrometrija s induktivno spregnutom plazmom). Prije samog mjerenja u dobivene otopine dodan je indij ( $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) kao interni standard. Multielementalna analiza pripremljenih uzoraka rađena je pomoću masene spektrometrije visoke rezolucije s induktivno spregnutom plazmom (HR ICPMS) koristeći instrument Element2 (Thermo, Bremen, Njemačka). Mjerenja određenih izotopa rađena su na tri različite rezolucije: niska rezolucija ( ${}^7\text{Li}$ ,  ${}^{107}\text{Ag}$ ,  ${}^{111}\text{Cd}$ ,  ${}^{120}\text{Sn}$ ,  ${}^{208}\text{Pb}$ ,  ${}^{209}\text{Bi}$ ), srednja rezolucija ( ${}^{51}\text{V}$ ,  ${}^{52}\text{Cr}$ ,  ${}^{59}\text{Co}$ ,  ${}^{60}\text{Ni}$ ,  ${}^{63}\text{Cu}$ ,  ${}^{66}\text{Zn}$ ,  ${}^{121}\text{Sb}$ ) te visoka rezolucija ( ${}^{27}\text{Al}$ ,  ${}^{39}\text{K}$ ,  ${}^{56}\text{Fe}$ ).

Kemijske analize metala i metaloida u tkivu dagnji rađene su u suradnji s dr.sc. Nevenkom Mikac (Laboratorij za anorgansku geokemiju okoliša, Institut Ruđer Bošković, Zagreb).

## 2.4. Analiza biomarkera oksidativnog stresa

Za analizu biomarkera oksidativnog stresa prikupljene su probavne žlijezde 10 jedinka po postaji. Tkivo je izvagano u laboratoriju i homogenizirano (uređaj Qiagen Retsch MM300 TissueLyser) sa čeličnim kuglicama (7 mm) 1 minutu na frekvenciji 30 kHz. Uzorku je potom dodano 1,2 ml kalij – fosfatnog pufera (50 mM, pH=7 + 10 mM etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA)) te je homogenizacija ponovljena u istim uvjetima. Homogenat je centrifugiran (uređaj Sigma 3-18K) 12 minuta pri 10000 x g i 4 °C. Supernatant je odvojen i pohranjen na -80 °C.

### 2.4.1. Određivanje aktivnosti katalaze

Protokol za određivanje aktivnosti enzima katalaze preuzet je i prilagođen iz Aebi (1984). Reakcijska smjesa sastojala se od 50 ml KP pufera (50 mM, pH 7 + 10 mM EDTA) i 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mM). U kvarcnu kivetu je dodano 950 µl reakcijske smjese te 50 µl 5 puta razrijeđenog ekstrakta (u KP puferu, 50 mM, pH 7 + 10 mM EDTA). Pad apsorbancije mjeren je spektrofotometrijski (uređaj Specord 40) svakih 10 sekundi tokom 100 sekundi na 240 nm ( $\epsilon = 40 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Za slijepu probu korišten je KP pufer (50 mM, pH 7 + 10 mM EDTA).

Aktivnost enzima određena je prema formuli:

$$(\Delta A * V_{\text{kivete}} * \text{razrjeđenje uzorka}) / (V_{\text{uzorka}} * \epsilon * c_{\text{proteina}} * d_{\text{kivete}} * t)$$

gdje je  $\Delta A$  = promjena apsorbancije u vremenu,  $V_{\text{kivete}}$  = volumen kivete,  $V_{\text{uzorka}}$  = volumen uzorka u kiveti,  $\epsilon$  = apsorpcijski koeficijent,  $c_{\text{proteina}}$  = koncentracija ukupnih proteina,  $d_{\text{kivete}}$  = promjer kivete,  $t$  = vrijeme mjerenja.

Aktivnost katalaze izražena je u jedinicama po mg proteina, pri čemu jedna jedinica predstavlja hidrolizu 1 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> po minuti pri 25 °C.

### **2.4.2. Određivanje aktivnosti glutation reduktaze**

Protokol za određivanje aktivnosti enzima glutation reduktaze preuzet je i prilagođen iz Ramos-Martinez i sur. (1983). Reakcijska smjesa sastojala se od 500  $\mu\text{L}$  2 mM GSSG i 50  $\mu\text{L}$  2 mM NADPH (otopljeni u KP puferu, 100 mM, pH 7,4 + 10 mM EDTA), 350  $\mu\text{L}$  KP pufera (100 mM, pH 7,4 + 10 mM EDTA) i 100  $\mu\text{L}$  5 puta razrijeđenog uzorka (u KP puferu, 50 mM, pH 7 + 10 mM EDTA). Apsorbancija je mjerena spektrofotometrijski svakih 5 sekundi tokom 1,5 minute pri valnoj duljini 340 nm ( $\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Za slijepu probu korišten je KP pufer (100 mM, pH 7,4 + 10 mM EDTA).

Aktivnost enzima određena je prema formuli:

$$(\Delta A * V_{\text{kivete}} * \text{razrjeđenje uzorka}) / (V_{\text{uzorka}} * \epsilon * c_{\text{proteina}} * d_{\text{kivete}} * t)$$

gdje je  $\Delta A$  = promjena apsorbancije u vremenu,  $V_{\text{kivete}}$  = volumen kivete,  $V_{\text{uzorka}}$  = volumen uzorka u kiveti,  $\epsilon$  = apsorpcijski koeficijent,  $c_{\text{proteina}}$  = koncentracija ukupnih proteina,  $d_{\text{kivete}}$  = promjer kivete,  $t$  = vrijeme mjerenja.

Aktivnost glutation reduktaze izražena je u jedinicama po mg proteina, gdje jedna jedinica predstavlja oksidaciju 1 nmol NADPH po minuti pri 25 °C.

### **2.4.3. Određivanje aktivnosti glutation S-transferaza**

Protokol za određivanje aktivnosti glutation S-transferaza preuzet je i prilagođen iz Habig i sur. (1974). Reakcijska smjesa sastojala se od 840  $\mu\text{L}$  KP pufera (100 mM, pH 6,5 + 10 mM EDTA), 10  $\mu\text{L}$  100 mM 1-kloro-2,4-dinitrobenzena (CDNB) (otopljenog u vrućem 95%tnom etanolu), 100  $\mu\text{L}$  10 mM GSH (otopljen u KP puferu, 100 mM, pH 6,5 + 10 mM EDTA) i 50  $\mu\text{L}$  uzorka (pet puta razrijeđen u KP puferu, 50 mM, pH 7 + 10 mM EDTA). Apsorbancija je mjerena spektrofotometrijski svake 3 sekunde tokom 1 minute na 340 nm ( $\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Slijepa proba je bila reakcijska smjesa bez uzorka.

Aktivnost enzima određena je prema formuli:

$$(\Delta A * V_{\text{kivete}} * \text{razrjeđenje uzorka}) / (V_{\text{uzorka}} * \epsilon * c_{\text{proteina}} * d_{\text{kivete}} * t)$$

gdje je  $\Delta A$  = promjena apsorbancije u vremenu,  $V_{\text{kivete}}$  = volumen kivete,  $V_{\text{uzorka}}$  = volumen uzorka u kiveti,  $\epsilon$  = apsorpcijski koeficijent,  $c_{\text{proteina}}$  = koncentracija ukupnih proteina,  $d_{\text{kivete}}$  = promjer kivete,  $t$  = vrijeme mjerenja.

GST aktivnost je izražena kao  $\mu\text{mol}$  konjugiranog glutationa po minuti i mg proteina pri  $25\text{ }^\circ\text{C}$ .

#### **2.4.4. Određivanje aktivnosti acetilkolinesteraze**

Protokol za mjerenje aktivnosti enzima acetilkolinesteraze preuzet je i prilagođen iz Ellman i sur. (1961). Reakcijska smjesa sastojala se od  $850\ \mu\text{l}$  KP pufera ( $100\ \text{mM}$ , pH 7,4 +  $10\ \text{mM}$  EDTA),  $50\ \mu\text{l}$   $8\ \text{mM}$  5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeve kiseline (DTNB) i  $50\ \mu\text{l}$   $8\ \text{mM}$  acetilkolina (otopljeni u KP puferu,  $100\ \text{mM}$ , pH 7,4 +  $10\ \text{mM}$  EDTA) i  $50\ \mu\text{l}$  ekstrakta (pet puta razrijeđen u KP puferu,  $50\ \text{mM}$ , pH 7 +  $10\ \text{mM}$  EDTA). Apsorbancija je mjerena spektrofotometrijski na  $412\ \text{nm}$  svakih  $10$  sekundi kroz dvije minute ( $\epsilon = 0,07\ \text{mM}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$ ). Slijepa proba je reakcijska smjesa bez uzorka.

Aktivnost enzima određena je prema formuli:

$$(\Delta A * V_{\text{kivete}} * \text{razrjeđenje uzorka}) / (V_{\text{uzorka}} * \epsilon * C_{\text{proteina}} * d_{\text{kivete}} * t)$$

gdje je  $\Delta A$  = promjena apsorbancije u vremenu,  $V_{\text{kivete}}$  = volumen kivete,  $V_{\text{uzorka}}$  = volumen uzorka u kiveti,  $\epsilon$  = apsorpcijski koeficijent,  $C_{\text{proteina}}$  = koncentracija ukupnih proteina,  $d_{\text{kivete}}$  = promjer kivete,  $t$  = vrijeme mjerenja.

Aktivnost AChE je izražena kao  $\text{nmol}$  nastalog tiokolina po minuti i mg proteina pri  $25\text{ }^\circ\text{C}$ .

#### **2.4.5. Određivanje koncentracije karbonila**

Sadržaj karbonila određen je po protokolu preuzetom i prilagođenom iz Levine i sur. (1994).  $200\ \mu\text{l}$  ekstrakta (razrijeđenog u omjeru 1:1 s KP puferom,  $50\ \text{mM}$ , pH 7 +  $10\ \text{mM}$  EDTA) stavljeno je u Eppendorf epruvete sa  $300\ \mu\text{l}$   $10\ \text{mM}$  2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (otopljenog u  $2\ \text{M}$  HCl) te je smjesa inkubirana  $1$  sat u tami, na sobnoj temperaturi uz miješanje svakih  $15$  minuta. Nakon inkubacije, smjesi je dodano  $500\ \mu\text{l}$   $10\%$  trikloroctene kiseline (TCA) te je ohlađena  $5$  minuta na  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ . Smjesa je centrifugirana  $10$  minuta pri  $12000\ \text{g}$  i  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . Dobiveni talog ispran je tri puta s  $500\ \mu\text{l}$  otopine etanola i etilacetata (1:1). Talog je otopljen u  $1\ \text{ml}$   $6\ \text{M}$  uree u KP puferu ( $20\ \text{mM}$ , pH 2,4). Sadržaj karbonila određen je spektrofotometrijski na  $370\ \text{nm}$  ( $\epsilon = 22\ \text{mM}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$ ), a sadržaj proteina procijenjen mjerenjem apsorbancije uzorka na  $280\ \text{nm}$ .

Slijepa proba bila je 200 µl ekstrakta (razrijeđenog u omjeru 1:1 s KP puferom, 50 mM, pH 7 + 10 mM EDTA) i 300 µl 2 M HCl.

Koncentracija proteina u svakom uzorku izračunata je na temelju baždarne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancije niza razrjeđenja (od 0,096 mg mL<sup>-1</sup> do 0,8 mg mL<sup>-1</sup>) otopine albumina iz goveđeg seruma poznatih koncentracija (Sigma-Aldrich Protein Standard 2 mg proteina ml<sup>-1</sup>) prema formuli:

$$(A_{(280)} - I) / k$$

gdje je  $A_{(280)}$  = apsorbancija izmjerena pri 280 nm,  $I$  = odsječak pravca dobiven iz baždarne krivulje,  $k$  = nagib pravca dobiven iz baždarne krivulje.

Koncentracija karbonila određena je prema formuli:

$$(A_{(370)} * C_{\text{proteina}}) / (\epsilon * 1000)$$

gdje je  $A_{(370)}$  = apsorbancija izmjerena pri 370 nm,  $C_{\text{proteina}}$  = koncentracija ukupnih proteina,  $\epsilon$  = apsorpcijski koeficijent.

Sadržaj karbonila izražen je u µmol po mg proteina.

#### **2.4.6. Određivanje koncentracije malondialdehida**

Stupanj lipidne peroksidacije određen je mjerenjem sadržaja malondialdehida po protokolu preuzetom i prilagođenom iz Buege i Aust (1978). 150 µl nerazrijeđenog uzorka stavljeno je u Eppendorf epruvete sa 450 µl 10% TCA i centrifugirano 15 minuta pri 10000 g i 4 °C. U male staklene epruvete dvojeno je 550 µl supernatanta i dodano 550 µl 0,7% tiobarbiturne kiseline (TBA) (otopjene u 10% TCA) te je smjesa stavljena u sušionik (uređaj Bari, serija "est") na 15 minuta pri 90 °C do pojave crvenog obojenja. Nakon zagrijavanja smjesa je ohlađena na ledu. Apsorbancija supernatanta određena je spektrofotometrijski na 532 nm ( $\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), a korekcija za nespecifični turbiditet napravljena oduzimanjem apsorbancije izmjerene na 600 nm. Za slijepu probu korišten je KP pufer (50 mM, pH 7 + 10 mM EDTA).

Koncentracija malondialdehida određena je po formuli:

$$(A_{(532)} - A_{(600)}) / (\epsilon * C_{\text{proteina}} * d_{\text{kivete}})$$

gdje je  $A_{(532)}$  = apsorbancija izmjerena pri 532 nm,  $A_{(600)}$  = apsorbancija izmjerena pri 600 nm,  $\epsilon$  = apsorpcijski koeficijent,  $C_{\text{proteina}}$  = koncentracija ukupnih proteina,  $d_{\text{kivete}}$  = promjer kivete.

Sadržaj MDA izražen je kao  $\mu\text{mol}$  po  $\text{mg}$  proteina.

#### **2.4.7. Određivanje ukupnih proteina**

Sadržaj ukupnih proteina određen je spektrofotometrijski prema protokolu preuzetom i prilagođenom iz Bradford (1976) mjerenjem apsorbancije reakcijske smjese koja se sastojala od  $950 \mu\text{l}$  filtriranog Bradford reagensa (Sigma-Aldrich Bradford Reagent  $1-1,400 \mu\text{g mL}^{-1}$  proteina) i  $50 \mu\text{l}$  uzorka (pet puta razrijeđen u KP puferu,  $50 \text{ mM}$ ,  $\text{pH } 7 + 10 \text{ mM EDTA}$ ), nakon nastajanja plavog obojanja, pri  $595 \text{ nm}$ .

Koncentracija ukupnih proteina u svakom uzorku izračunata je na temelju baždarne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancije niza razrjeđenja (od  $0,096 \text{ mg mL}^{-1}$  do  $0,8 \text{ mg mL}^{-1}$ ) otopine albumina iz goveđeg seruma poznatih koncentracija (Sigma-Aldrich Protein Standard  $2 \text{ mg proteina mL}^{-1}$ ) prema formuli:

$$(A - I) / k$$

gdje je  $A$  = apsorbancija,  $I$  = odsječak pravca dobiven iz baždarne krivulje,  $k$  = nagib pravca dobiven iz baždarne krivulje.

### **2.5. Statistička obrada podataka**

Dobiveni rezultati statistički su obrađeni korištenjem programa STATISTICA 12 (StatSoft, Inc. 2013) i R (R Core Team version 3.2.0).

Statistički značajne razlike među postajama utvrđene su jednosmjernom analizom varijance ANOVA i post-hoc Tukey testom u programu STATISTICA. Rezultati su predstavljeni dijagramima na kojima su iznad svake postaje prikazana slova koja označavaju statistički značajnu razliku ( $p < 0.05$ ). Ukoliko postaja ima barem jedno isto slovo kao i neka druga, znači da između te dvije postaje nije utvrđena statistički značajna razlika.

Analize glavnih komponenti (PCA) biomarkera oksidativnog stresa te regresijske analize biomarkera i metala u tkivu dagnji metodom parcijalnih najmanjih kvadrata (PLS) dobivene su pomoću statističkog programa R.

## **3. Rezultati**

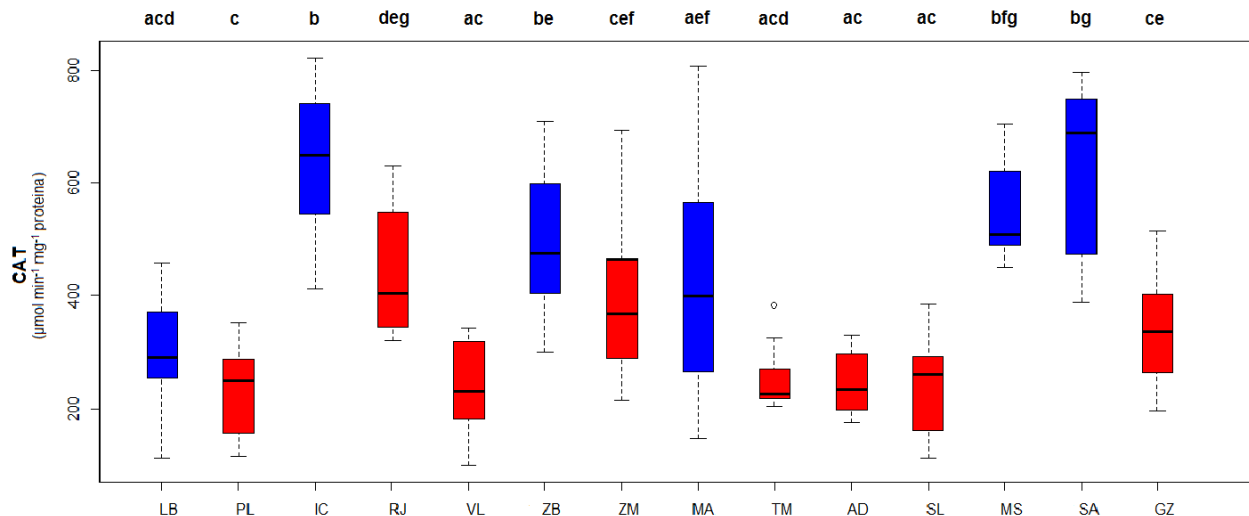
### **3.1. Biomarkeri oksidativnog stresa i neurotoksičnosti u dagnjama uzorkovanim u jesen 2013. godine**

Aktivnost antioksidativnih enzima te količina produkata oksidativnog stresa u jedinkama uzorkovanim u jesen 2013. godine su dosta varirali i između i unutar postaja različite kvalitete okoliša.

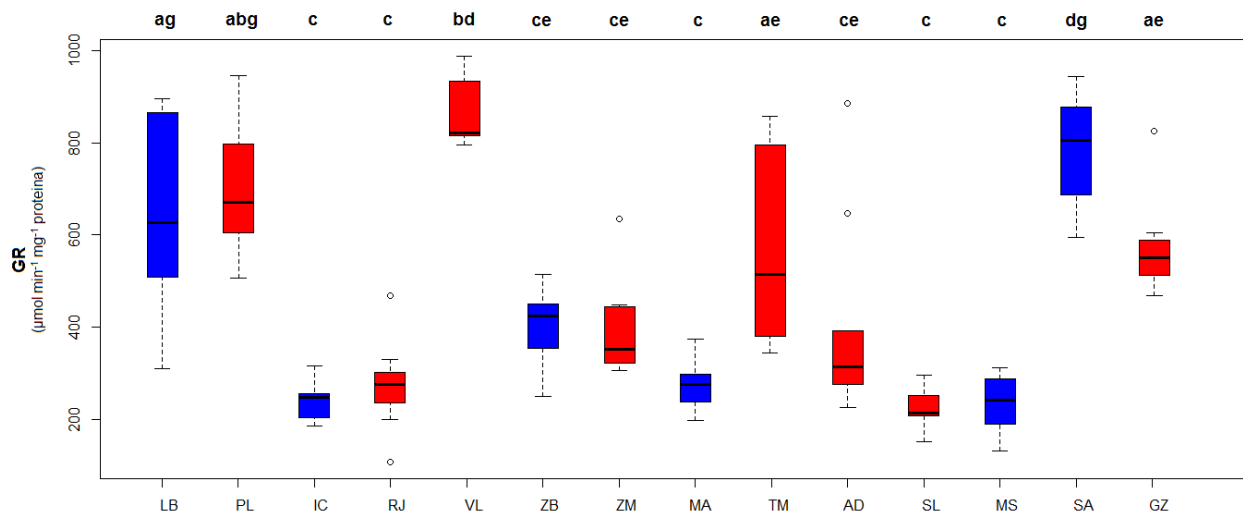
Najveće aktivnosti enzima katalaze izmjerene su u lčićima i na Mljetu, a najmanje na postajama Pula, Viktor Lenac, Trogir, Adriavinil i Split (Slika 9). Aktivnost katalaze je općenito bila viša na čistim nego na onečišćenim postajama, pri čemu je jedino u Limskom zaljevu zabilježena relativno niska aktivnost enzima.

Enzim glutation reduktaza pokazao je povećanu aktivnost na nekoliko čistih i onečišćenih postaja. Najveće aktivnosti izmjerene su u Limskom zaljevu, Puli, Viktor Lencu, Trogiru, Mljetu i Gružu, dok su na ostalim postajama aktivnosti enzima bile relativno niske (Slika 10).

Najveća aktivnost enzima glutation S-transferaza zabilježena je na Mljetu, a najmanja na postajama Marina, Split i Mali Ston (Slika 11).

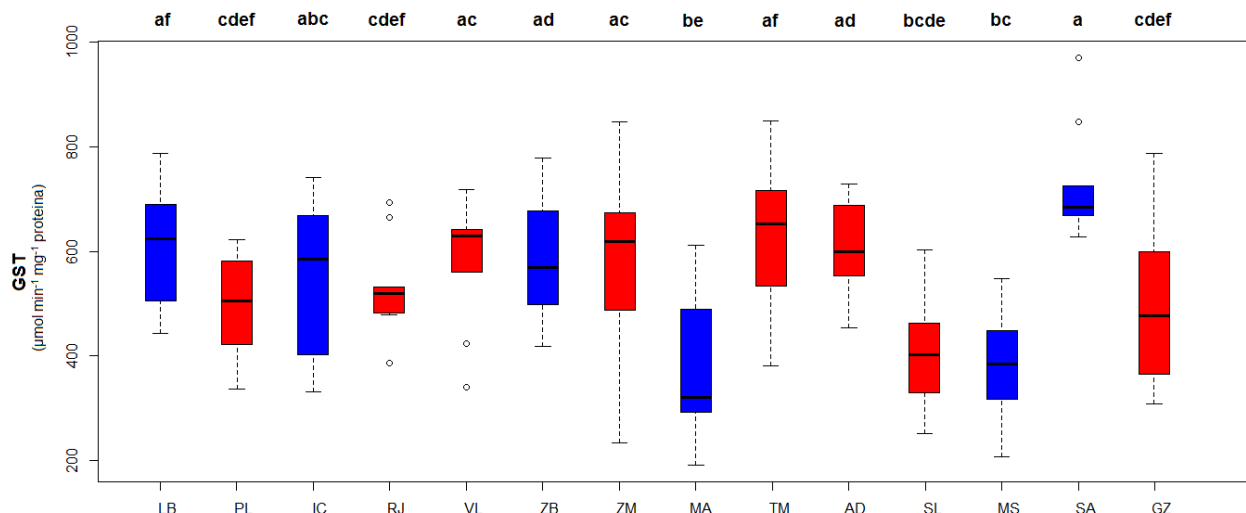


**Slika 9** Aktivnosti enzima katalaze mjerene spektrofotometrijski u probavnim žlijezdama dagnji *M. galloprovincialis* uzorkovanih na istraživanim postajama u jesen 2013. godine (medijan+donji/gornji kvartil+min./max. vrijednost+netipične vrijednosti). Plava boja predstavlja čiste, crvena onečišćene postaje, a različita slova statistički značajno različite postaje ( $p < 0,05$ ). (LB = Limski zaljev, PL = Pula, IC = Ičići, RJ = Rijeka, VL = Viktor Lenac, ZB = Zadar Seline, ZM = Zadar marina, MA = Marina, TM = Trogir, AD = Adriavinil, SL = Split, MS = Mali Ston, SA = Mljet, GZ = Gruž)



**Slika 10** Aktivnosti enzima glutation reduktaze mjerene spektrofotometrijski u probavnim žlijezdama dagnji *M. galloprovincialis* uzorkovanih na istraživanim postajama u jesen 2013. godine (medijan+donji/gornji kvartil+min./max. vrijednost+netipične vrijednosti). Plava boja predstavlja čiste, crvena onečišćene postaje, a različita slova statistički značajno različite postaje ( $p < 0,05$ ). (LB = Limski zaljev, PL = Pula, IC = Ičići, RJ = Rijeka, VL = Viktor Lenac, ZB = Zadar Seline, ZM = Zadar marina, MA = Marina, TM = Trogir, AD = Adriavinil, SL = Split, MS = Mali Ston, SA = Mljet, GZ = Gruž)



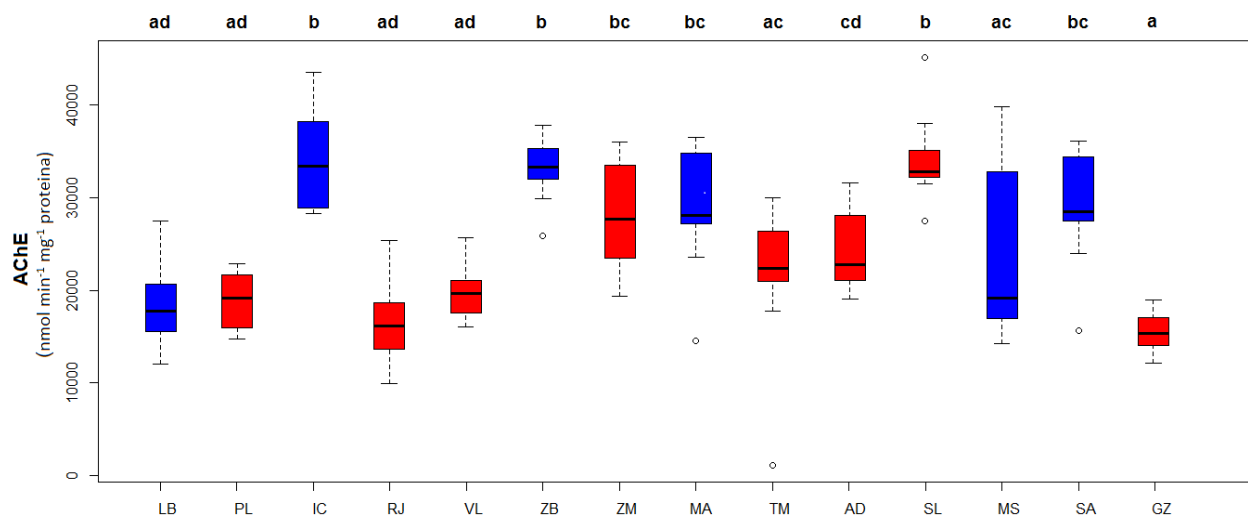


**Slika 11** Aktivnosti enzima glutation S-transferaza mjerene spektrofotometrijski u probavnim žlijezdama dagnji *M. galloprovincialis* uzorkovanih na istraživanim postajama u jesen 2013. godine (medijan+donji/gornji kvartil+min./max. vrijednost+netipične vrijednosti). Plava boja predstavlja čiste, crvena onečišćene postaje, a različita slova statistički značajno različite postaje ( $p < 0,05$ ). (LB = Limski zaljev, PL = Pula, IC = Ičići, RJ = Rijeka, VL = Viktor Lenac, ZB = Zadar Seline, ZM = Zadar marina, MA = Marina, TM = Trogir, AD = Adriavinil, SL = Split, MS = Mali Ston, SA = Mljet, GZ = Gruž)

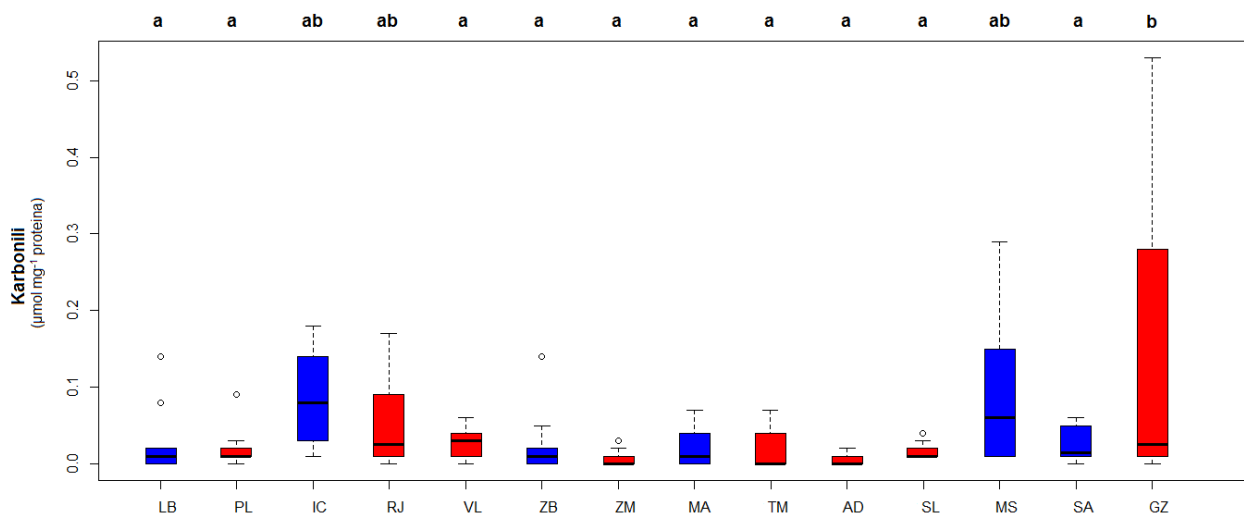
Aktivnost acetilkolinesteraze općenito je bila veća na čistim nego na onečišćenim postajama, pri čemu je jedino Limski zaljev pokazao nižu, a Split veću aktivnosti ovog enzima. Najveća aktivnost zabilježena je na postajama Ičići, Zadar Seline i Split, a najmanja u Limskom kanalu, Rijeci i Gružu (Slika 12).

Najveće razine karbonila zabilježene su u Gružu, koji se i statistički razlikovao od većine ostalih postaja, uz iznimku Ičića, Rijeke i Malog Stona koje su također pokazale nešto višu koncentraciju karbonila (Slika 13). Ostale postaje su pokazale dosta nisku razinu karbonila, iako je ukupno ona bila veća na čistim nego na onečišćenim postajama.

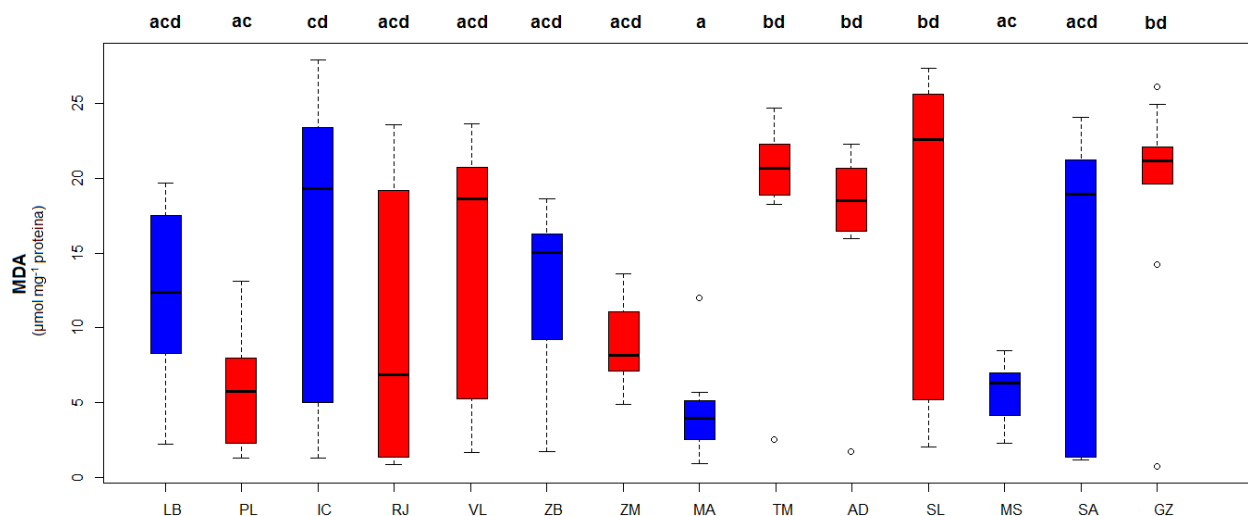
Najviše koncentracije malondialdehida izmjerene su u Trogiru, Adriavinilu i Gružu, a najmanje u Puli, Marini i Malom Stonu, dok su ostale postaje pokazale velik raspon izmjerenih vrijednosti (Slika 14). Općenito je veća količina malondialdehida izmjerena na onečišćenim, nego na čistim postajama.



**Slika 12** Aktivnosti enzima acetilkolinesteraze mjerene spektrofotometrijski u probavnim žlijezdama dagnji *M. galloprovincialis* uzorkovanih na istraživanim postajama u jesen 2013. godine (medijan+donji/gornji kvartil+min./max. vrijednost+netipične vrijednosti). Plava boja predstavlja čiste, crvena onečišćene postaje, a različita slova statistički značajno različite postaje. (LB = Limski zaljev, PL = Pula, IC = Ičići, RJ = Rijeka, VL = Viktor Lenac, ZB = Zadar Seline, ZM = Zadar marina, MA = Marina, TM = Trogir, AD = Adriavini, SL = Split, MS = Mali Ston, SA = Mljet, GZ = Gruž)



**Slika 13** Sadržaj karbonila određen spektrofotometrijski u probavnim žlijezdama dagnji *M. galloprovincialis* uzorkovanih na istraživanim postajama u jesen 2013. godine (medijan+donji/gornji kvartil+min./max. vrijednost+netipične vrijednosti). Plava boja predstavlja čiste, crvena onečišćene postaje, a različita slova statistički značajno različite postaje. (LB = Limski zaljev, PL = Pula, IC = Ičići, RJ = Rijeka, VL = Viktor Lenac, ZB = Zadar Seline, ZM = Zadar marina, MA = Marina, TM = Trogir, AD = Adriavini, SL = Split, MS = Mali Ston, SA = Mljet, GZ = Gruž)



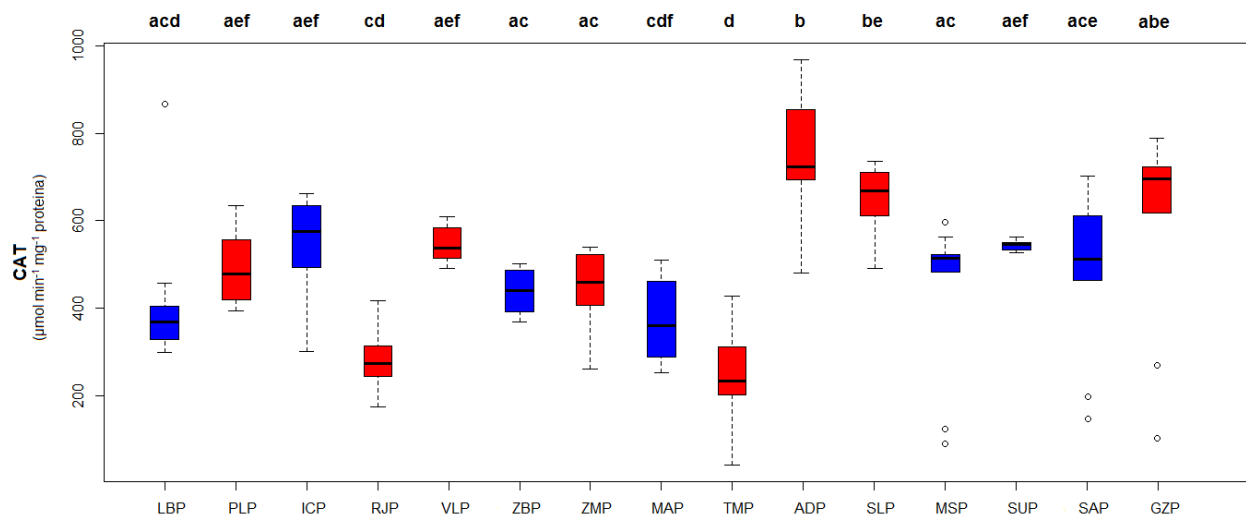
**Slika 14** Sadržaj malondialdehida određen spektrofotometrijski u probavnim žlijezdama dagnji *M. galloprovincialis* uzorkovanih na istraživanim postajama u jesen 2013. godine (medijan+donji/gornji kvartil+min./max. vrijednost+netipične vrijednosti). Plava boja predstavlja čiste, crvena onečišćene postaje, a različita slova statistički značajno različite postaje. (LB = Limski zaljev, PL = Pula, IC = Ičići, RJ = Rijeka, VL = Viktor Lenac, ZB = Zadar Seline, ZM = Zadar marina, MA = Marina, TM = Trogir, AD = Adriavinil, SL = Split, MS = Mali Ston, SA = Mljet, GZ = Gruž)

### 3.2. Biomarkeri oksidativnog stresa i neurotoksičnosti u dagnjama uzorkovanim u proljeće 2014. godine

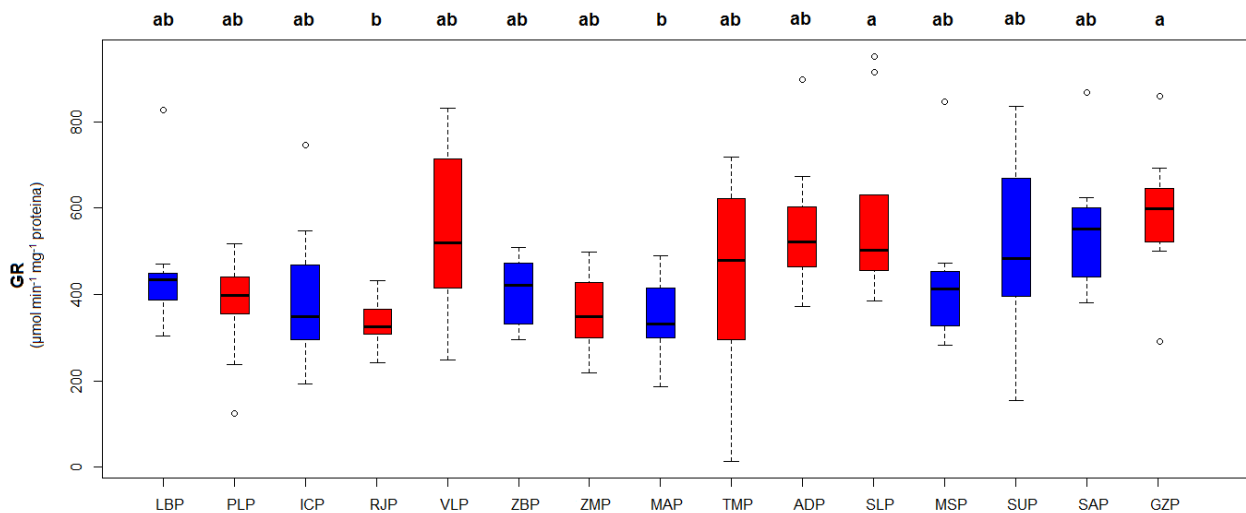
Svi biomarkeri oksidativnog stresa mjereni u dagnjama uzorkovanim u proljeće 2014. godine su bili izrazito varijabilni i između i unutar postaja, pri čemu onečišćene postaje pokazuju veći raspon vrijednosti za sve biomarkere.

Aktivnost enzima katalaze je na čistim postajama u većini uzoraka bila u vrijednostima između 300 i 600  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteina, dok su onečišćene postaje pokazale veći raspon vrijednosti. Najveće vrijednosti zabilježene su na postajama Adriavinil, Split i Gruž, a najmanje u Rijeci i Trogiru (Slika 15). Postaja Adriavinil se pokazala statistički najrazličitijom od ostalih pokazujući najveću aktivnost ovog enzima.

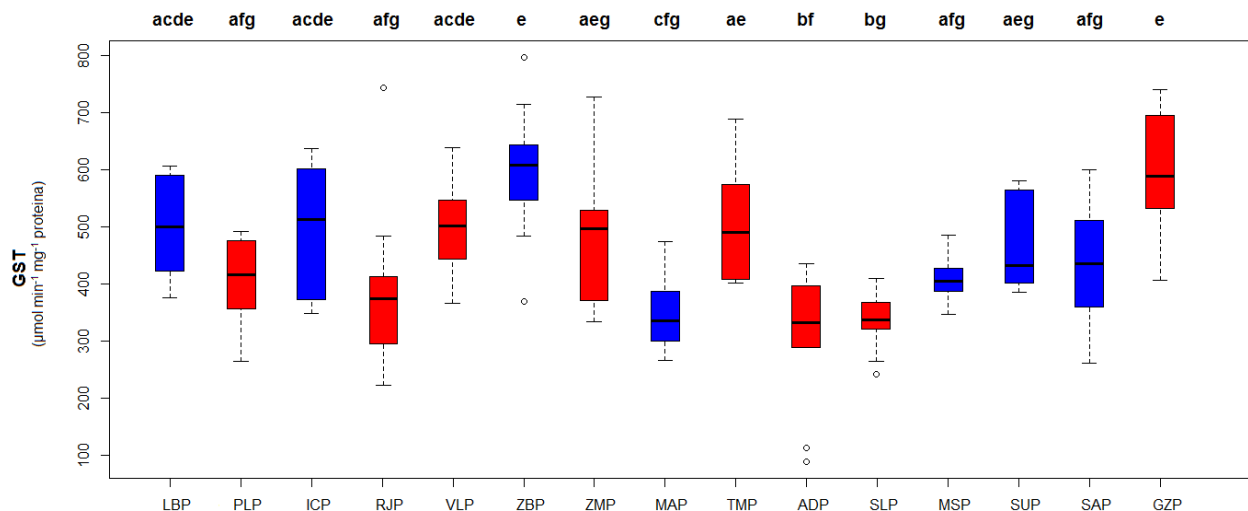
Glutation reduktaza je pokazala statistički značajnu razliku samo između postaja Rijeka i Marina te postaja Split i Gruž (Slika 16). Najveće aktivnosti glutacion S-transferaza zabilježene su na postajama Zadar Seline i Gruž, a najmanje u Rijeci, Marini, Adriavinilu i Splitu (Slika 17).



**Slika 15** Aktivnosti enzima katalaze mjerene spektrofotometrijski u probavnim žlijezdama dagnji *M. galloprovincialis* uzorkovanih na istraživanim postajama u proljeće 2014. godine (medijan+donji/gornji kvartil+min./max. vrijednost+netipične vrijednosti). Plava boja predstavlja čiste, crvena onečišćene postaje, a različita slova statistički značajno različite postaje. (LBP = Limski zaljev, PLP = Pula, ICP = Ičići, RJP = Rijeka, VLP = Viktor Lenac, ZBP = Zadar Seline, ZMP = Zadar marina, MAP = Marina, TMP = Trogir, ADP = Adriavinil, SLP = Split, MSP = Mali Ston, SUP = Ston, SAP = Mljet, GZP = Gruž)



**Slika 16** Aktivnosti enzima glutation reduktaze mjerene spektrofotometrijski u probavnim žlijezdama dagnji *M. galloprovincialis* uzorkovanih na istraživanim postajama u proljeće 2014. godine (medijan+donji/gornji kvartil+min./max. vrijednost+netipične vrijednosti). Plava boja predstavlja čiste, crvena onečišćene postaje, a različita slova statistički značajno različite postaje. (LBP = Limski zaljev, PLP = Pula, ICP = Ičići, RJP = Rijeka, VLP = Viktor Lenac, ZBP = Zadar Seline, ZMP = Zadar marina, MAP = Marina, TMP = Trogir, ADP = Adriavinil, SLP = Split, MSP = Mali Ston, SUP = Ston, SAP = Mljet, GZP = Gruž)

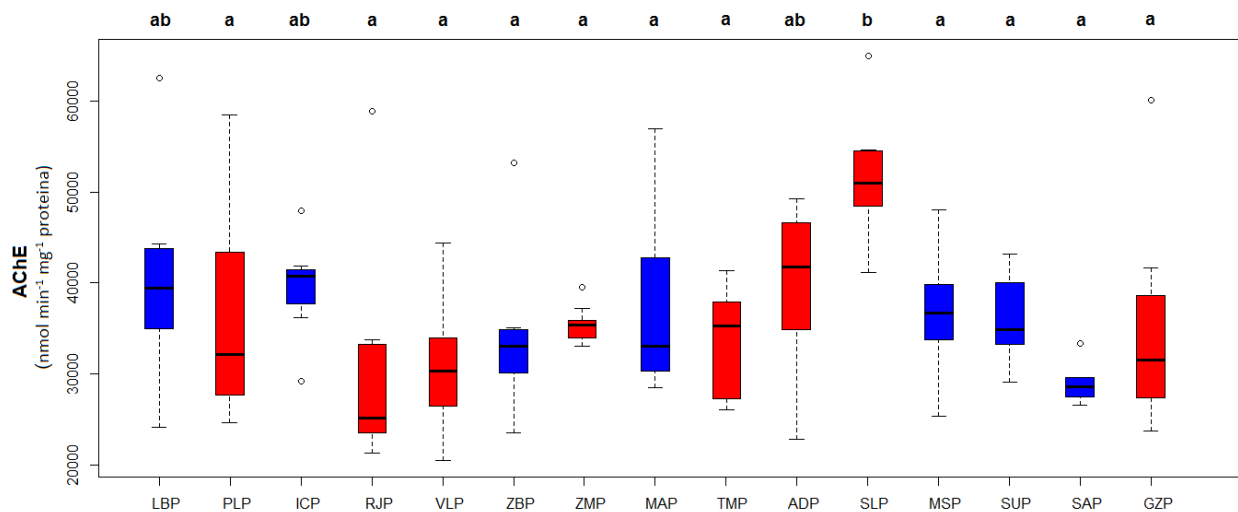


**Slika 17** Aktivnosti enzima glutation S-transferaza mjerene spektrofotometrijski u probavnim žlijezdama dagnji *M. galloprovincialis* uzorkovanih na istraživanim postajama u proljeće 2014. godine (medijan+donji/gornji kvartil+min./max. vrijednost+netipične vrijednosti). Plava boja predstavlja čiste, crvena onečišćene postaje, a različita slova statistički značajno različite postaje. (LBP = Limski zaljev, PLP = Pula, ICP = Ičići, RJP = Rijeka, VLP = Viktor Lenac, ZBP = Zadar Seline, ZMP = Zadar marina, MAP = Marina, TMP = Trogir, ADP = Adriavinil, SLP = Split, MSP = Mali Ston, SUP = Ston, SAP = Mljet, GZP = Gruž)

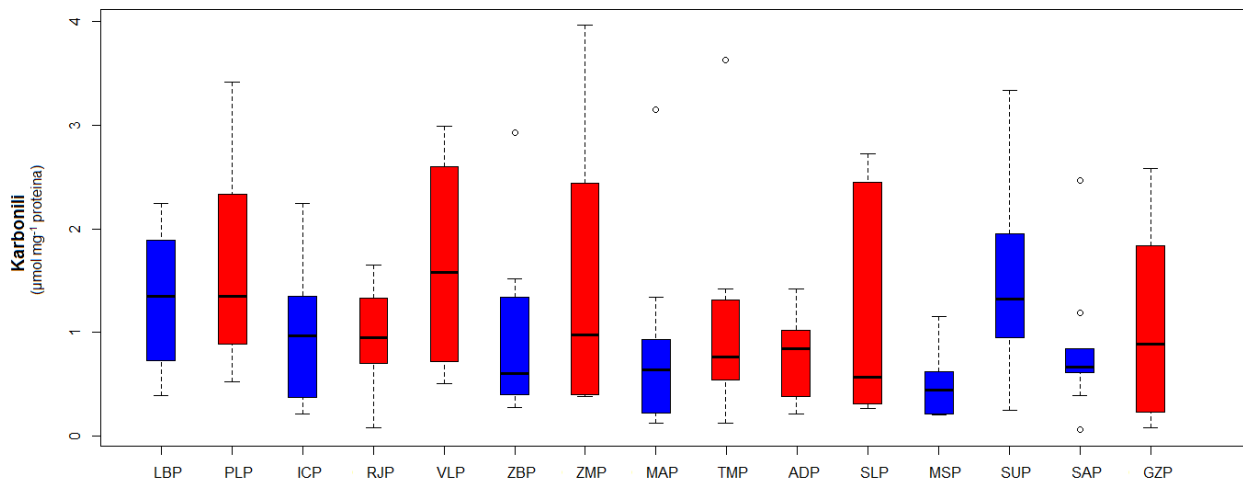
Najveća aktivnost enzima acetilkolinesteraze zabilježena je na postaji Split (Slika 18) te se ona statistički razlikuje se od ostalih postaja. Među ostalim postajama nije zabilježena značajna razlika.

Onečišćene postaje su pokazale veći raspon izmjerenih vrijednosti karbonila od čistih dok se medijani nisu značajnije razlikovali među postajama. Najveća vrijednost izmjerena je na postaji Zadar marina, a najmanja u Malom Stonu (Slika 19).

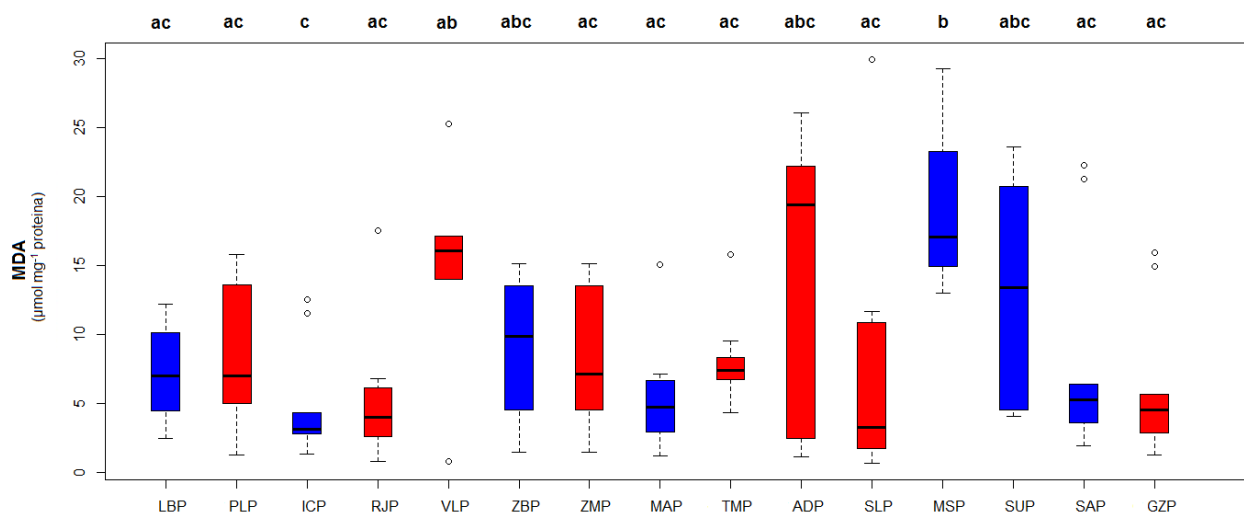
Najveće koncentracije malondialdehida su izmjerene na postajama Viktor Lenac, Adriavinil, Mali Ston i Ston, a najmanje u Ičićima, Rijeci, Marini, Mljetu i Gružu (Slika 20). Postaja Mali Ston se statistički najviše razlikovala od ostalih i slična je samo s postajama Zadar Seline, Adriavinil i Ston.



**Slika 18** Aktivnosti enzima acetilkolinesteraze mjerene spektrofotometrijski u probavnim žlijezdama dagnji *M. galloprovincialis* uzorkovanih na istraživanim postajama u proljeće 2014. godine (medijan+donji/gornji kvartil+min./max. vrijednost+netipične vrijednosti). Plava boja predstavlja čiste, crvena onečišćene postaje, a različita slova statistički značajno različite postaje. (LBP = Limski zaljev, PLP = Pula, ICP = Ičići, RJP = Rijeka, VLP = Viktor Lenac, ZBP = Zadar Seline, ZMP = Zadar marina, MAP = Marina, TMP = Trogir, ADP = Adriavinil, SLP = Split, MSP = Mali Ston, SUP = Ston, SAP = Mljet, GZP = Gruž)



**Slika 19** Sadržaj karbonila određen spektrofotometrijski u probavnim žlijezdama dagnji *M. galloprovincialis* uzorkovanih na istraživanim postajama u proljeće 2014. godine (medijan+donji/gornji kvartil+min./max. vrijednost+netipične vrijednosti). Plava boja predstavlja čiste, a crvena onečišćene postaje. (LBP = Limski zaljev, PLP = Pula, ICP = Ičići, RJP = Rijeka, VLP = Viktor Lenac, ZBP = Zadar Seline, ZMP = Zadar marina, MAP = Marina, TMP = Trogir, ADP = Adriavinil, SLP = Split, MSP = Mali Ston, SUP = Ston, SAP = Mljet, GZP = Gruž)



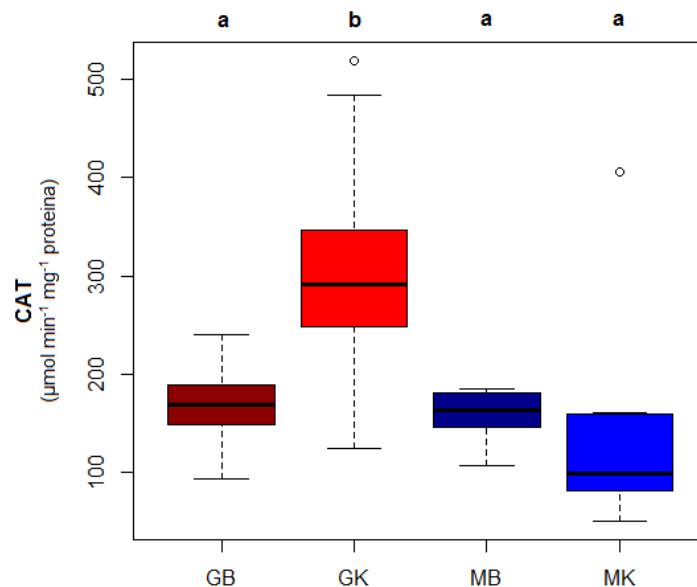
**Slika 20** Sadržaj malondialdehida određen spektrofotometrijski u probavnim žlijezdama dagnji *M. galloprovincialis* uzorkovanih na istraživanim postajama u proljeće 2014. godine (medijan+donji/gornji kvartil+min./max. vrijednost+netipične vrijednosti). Plava boja predstavlja čiste, crvena onečišćene postaje, a različita slova statistički značajno različite postaje. (LBP = Limski zaljev, PLP = Pula, ICP = Ičići, RJP = Rijeka, VLP = Viktor Lenac, ZBP = Zadar Seline, ZMP = Zadar marina, MAP = Marina, TMP = Trogir, ADP = Adriavinil, SLP = Split, MSP = Mali Ston, SUP = Ston, SAP = Mljet, GZP = Gruž)

### 3.3. Biomarkeri oksidativnog stresa i neurotoksičnosti u dagnjama izlaganima u mezokozmos eksperimentu

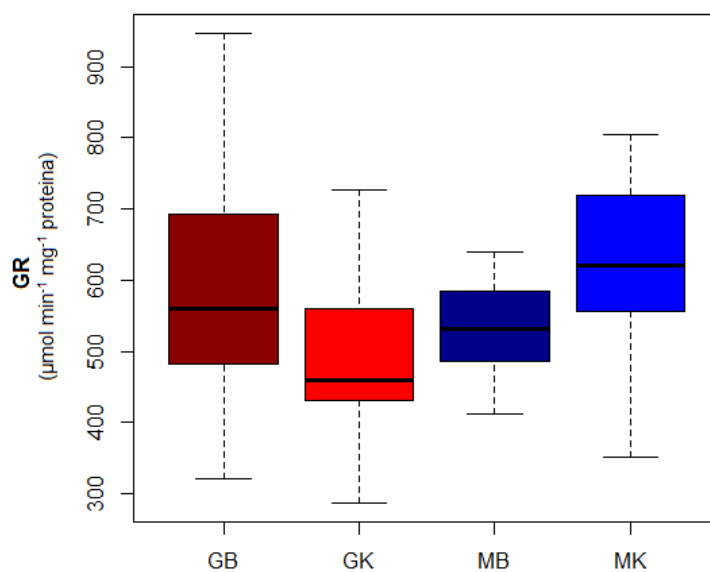
Aktivnost enzima katalaze generalno je bila veća u jedinkama s postaje Gruž za koju je zabilježen i veći raspon aktivnosti. Za obje populacije izložene bakru aktivnost katalaze bila je podjednaka (Slika 21). Statistički se razlikovala samo postaja Gruž u kontroli.

Najveću aktivnost enzima glutation reduktaze su pokazale jedinke iz Gruža izlagane bakru, a najmanju jedinke iste postaje u kontroli. Obje populacije izložene bakru pokazale su slične medijane aktivnosti enzima iako su jedinke iz Gruža imale puno veći raspon vrijednosti (Slika 22).

Aktivnost enzima glutation S-transferaze nije se značajno razlikovala među jedinkama iz različitih bazena, no u jedinkama s postaje Marina koje su izlagane bakru izmjeren je najveći raspon vrijednosti (Slika 23).

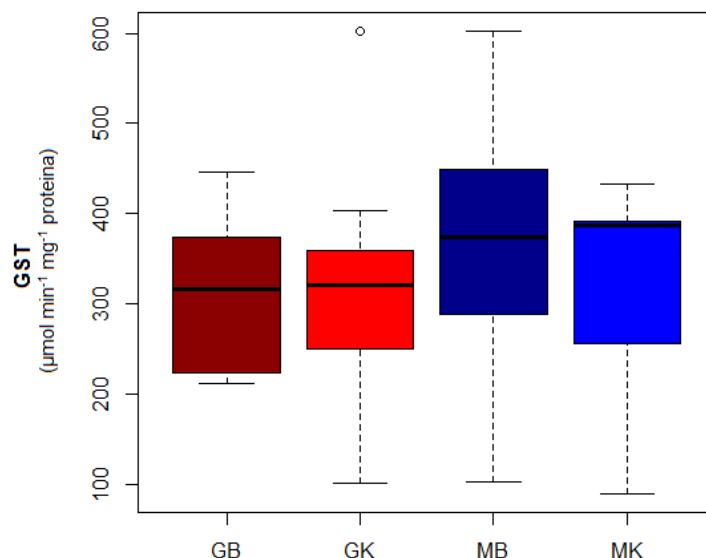


**Slika 21** Aktivnosti enzima katalaze mjerene spektrofotometrijski u probavnim žlijezdama dagnji *M. galloprovincialis* izlaganih u mezokozmos eksperimentu (medijan+donji/gornji kvartil+min./max. vrijednost+netipične vrijednosti). Različita slova označavaju statistički različite populacije. (GB = Gruž bakar, GK = Gruž kontrola, MB = Marina bakar, MK = Marina kontrola)



**Slika 22** Aktivnosti enzima glutacion reduktaze mjerene spektrofotometrijski u probavnim žlijezdama dagnji *M. galloprovincialis* izlaganih u mezokozmos eksperimentu (medijan+donji/gornji kvartil+min./max. vrijednost+netipične vrijednosti). (GB = Gruž bakar, GK = Gruž kontrola, MB = Marina bakar, MK = Marina kontrola)



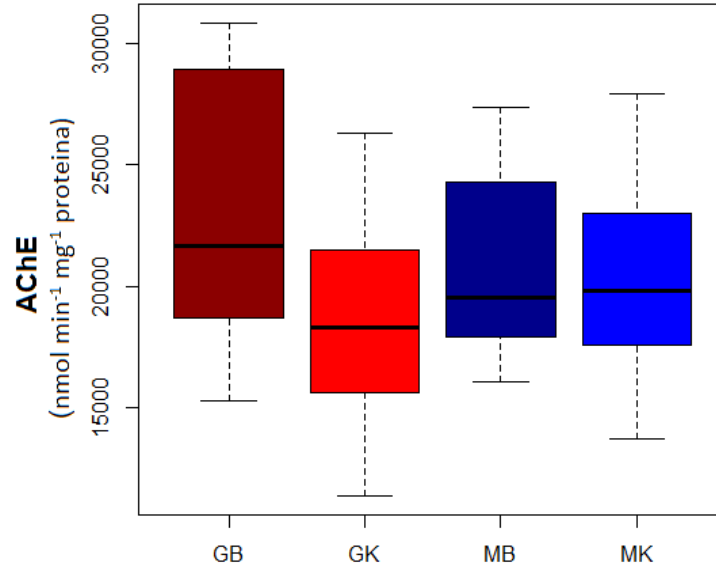


**Slika 23** Aktivnosti enzima glutation S-transferaza mjerene spektrofotometrijski u probavnim žlijezdama dagnji *M. galloprovincialis* izlaganih u mezokozmos eksperimentu (medijan+donji/gornji kvartil+min./max. vrijednost+netipične vrijednosti). (GB = Gruž bakar, GK = Gruž kontrola, MB = Marina bakar, MK = Marina kontrola)

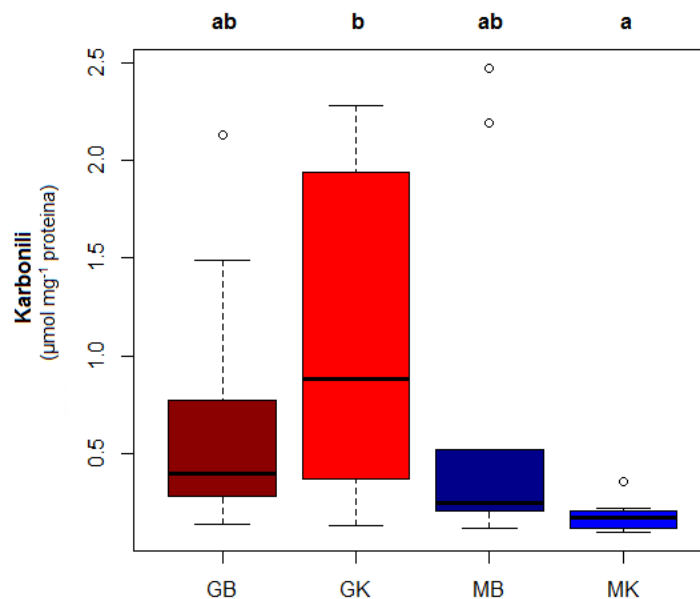
Aktivnost enzima acetilkolinesteraze nije se značajno razlikovala među izlaganjima. Najveći raspon aktivnost su pokazale jedinke s postaje Gruž izlagane bakru, najmanju jedinke iz Gruža u kontroli (Slika 24).

Koncentracija karbonila bila je generalno veća u jedinkama iz Gruža te manja u jedinkama iz Marine (Slika 25). Statistički su se razlikovale jedinke iz Gruža i Marine koje nisu izlagane bakru.

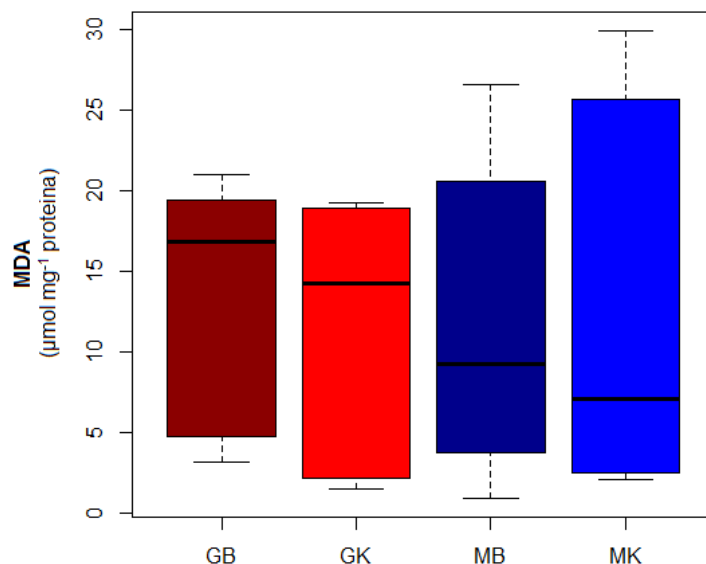
Sadržaj malondialdehida nije se značajno razlikovao između jedinki iz različitih bazena, iako je u jedinkama iz Marine u kontroli izmjeren najveći raspon vrijednosti (Slika 26).



**Slika 24** Aktivnosti enzima acetilkolinesteraze mjerene spektrofotometrijski u probavnim žlijezdama dagnji *M. galloprovincialis* izlaganih u mezokozmos eksperimentu (medijan+donji/gornji kvartil+min./max. vrijednost+netipične vrijednosti). (GB = Gruž bakar, GK = Gruž kontrola, MB = Marina bakar, MK = Marina kontrola)



**Slika 25** Sadržaj karbonila određen spektrofotometrijski u probavnim žlijezdama dagnji *M. galloprovincialis* izlaganih u mezokozmos eksperimentu (medijan+donji/gornji kvartil+min./max. vrijednost+netipične vrijednosti). Različita slova označavaju statistički različite populacije. (GB = Gruž bakar, GK = Gruž kontrola, MB = Marina bakar, MK = Marina kontrola)



**Slika 26** Sadržaj malondialdehida određen spektrofotometrijski u probavnim žlijezdama dagnji *M. galloprovincialis* izlaganih u mezokozmos eksperimentu (medijan+donji/gornji kvartil+min./max. vrijednost+netipične vrijednosti). (GB = Gruž bakar, GK = Gruž kontrola, MB = Marina bakar, MK = Marina kontrola)

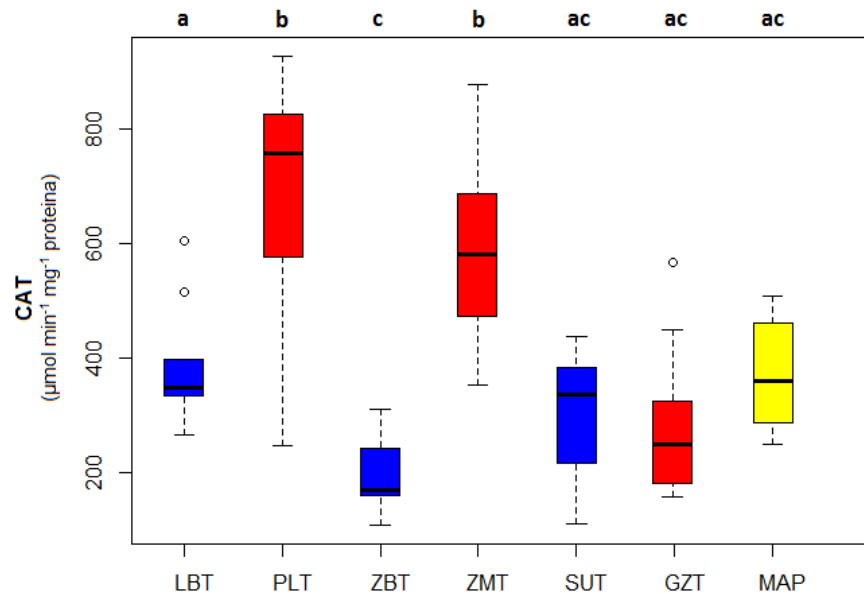
### 3.4. Biomarkeri oksidativnog stresa i neurotoksičnosti u kavezno izlaganim dagnjama unutar transplant eksperimenta

Rezultati dobiveni mjerenjem aktivnosti biomarkera u dagnjama korištenim u transplant eksperimentu uspoređene su s aktivnostima istih izmjerenim u jedinkama na nativnoj postaji Marina iz koje su dagnje uzimane za kavezno izlaganje i koja je korištena kao kontrola.

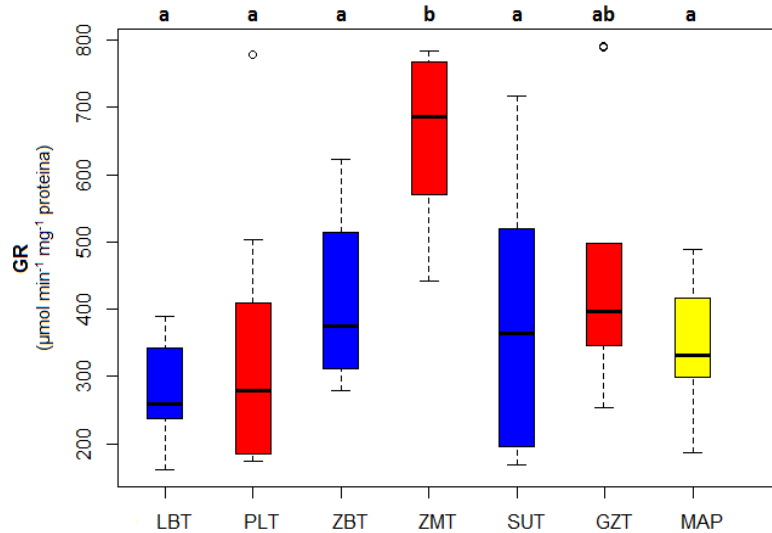
Aktivnosti enzima katalaze općenito su bile više na onečišćenim nego na čistim postajama, iako je postaja Gruž pokazala dosta niske vrijednosti. Statistički su se od ostalih postaja razlikovale Pula i Zadar marina koje su pokazale i najviše izmjerene vrijednosti aktivnosti enzima (Slika 27).

Najviša aktivnost enzima glutation reduktaze zabilježena je na postaji Zadar marina, a najniža na postajama Limski zaljev i Pula (Slika 28). Onečišćene postaje su pokazale višu aktivnost enzima, iako su vrijednosti izmjerene u jedinkama iz Pule bile dosta niske. Statistički se od ostalih značajno razlikovala postaja Zadar marina koja je slična jedino s Gružom.

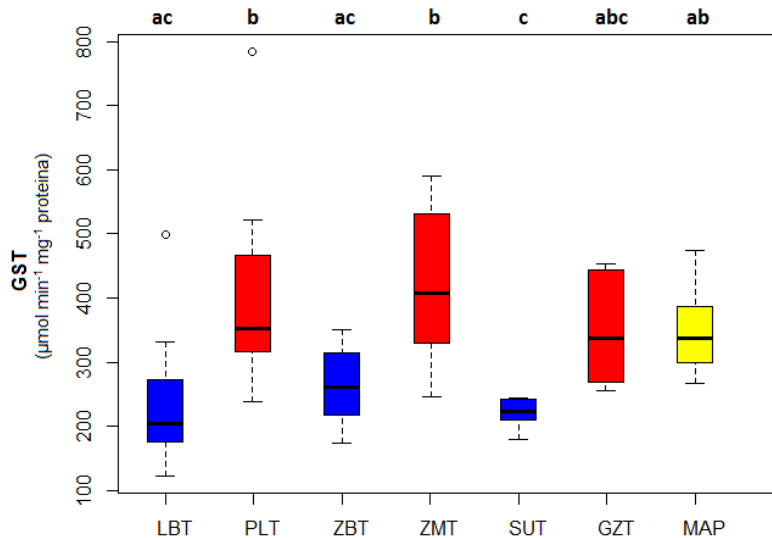
Onečišćene postaje su pokazale veću aktivnost enzima glutation S-transferaza, pri čemu se od čistih postaja statistički razlikuju postaje Pula i Zadar marina, koje su pokazale najviše izmjerene vrijednosti, dok se postaja Gruž nije razlikovala od čistih postaja (Slika 29).



**Slika 27** Aktivnosti enzima katalaze mjerene spektrofotometrijski u probavnim žlijezdama kavezno izlaganih dagnji *M. galloprovincialis* unutar transplant eksperimenta (medijan+donji/gornji kvartil+min./max. vrijednost+netipične vrijednosti). Plava boja predstavlja čiste, crvena nečiste, a žuta nativnu populaciju Marina, koja predstavlja kontrolu. Različita slova označavaju statistički različite populacije. (LBT = Limski zaljev, PLT = Pula, ZBT = Zadar Seline, ZMT = Zadar marina, SUT = Ston, GZT = Gruž, MAP = Marina)



**Slika 28** Aktivnosti enzima glutation reduktaze mjerene spektrofotometrijski u probavnim žlijezdama kavezno izlaganih dagnji *M. galloprovincialis* unutar transplant eksperimenta (medijan+donji/gornji kvartil+min./max. vrijednost+netipične vrijednosti). Plava boja predstavlja čiste, crvena nečiste, a žuta nativnu populaciju Marina, koja predstavlja kontrolu. Različita slova označavaju statistički raličite populacije. (LBT = Limski zaljev, PLT = Pula, ZBT = Zadar Seline, ZMT = Zadar marina, SUT = Ston, GZT = Gruž, MAP = Marina)

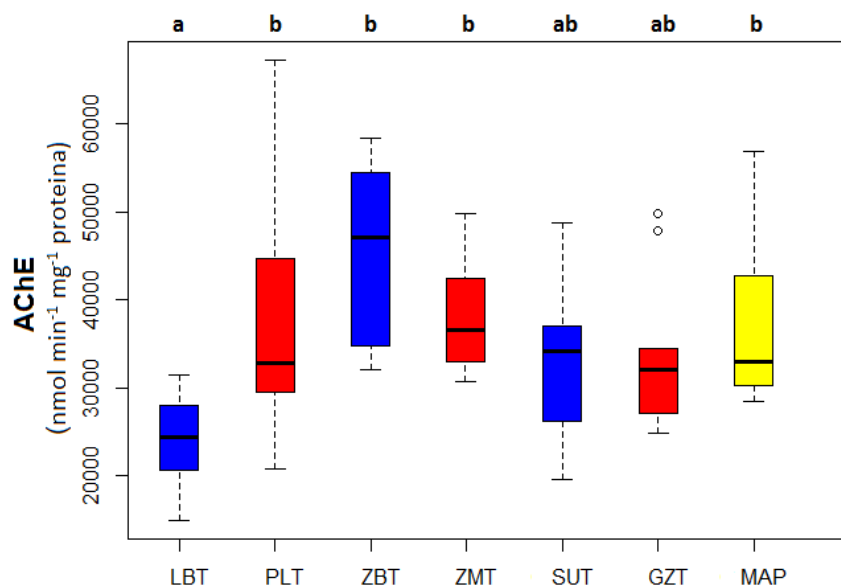


**Slika 29** Aktivnosti enzima glutatuion S-transferaza mjerene spektrofotometrijski u probavnim žlijezdama kavezno izlaganih dagnji *M. galloprovincialis* unutar transplant eksperimenta (medijan+donji/gornji kvartil+min./max. vrijednost+netipične vrijednosti). Plava boja predstavlja čiste, crvena nečiste, a žuta nativnu populaciju Marina, koja predstavlja kontrolu. Različita slova označavaju statistički raličite populacije. (LBT = Limski zaljev, PLT = Pula, ZBT = Zadar Seline, ZMT = Zadar, SUT = Ston, GZT = Gruž, MAP = Marina)

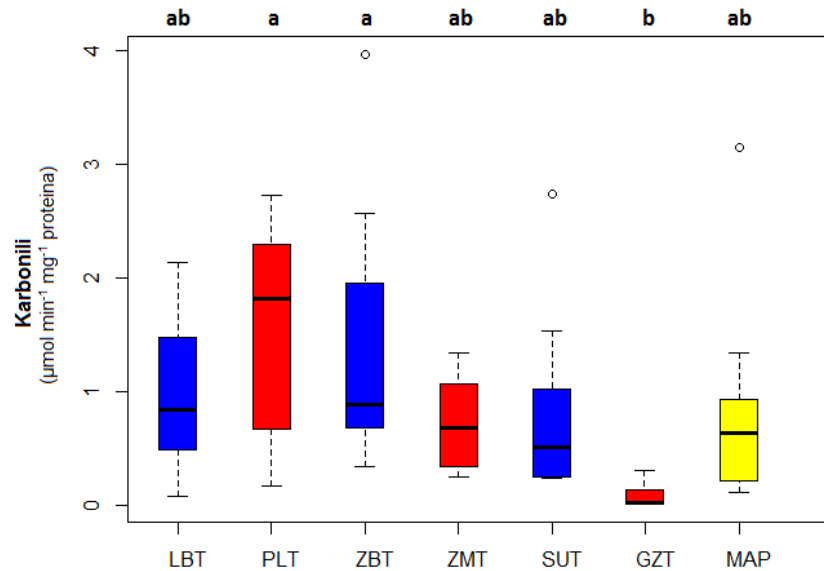
Aktivnost enzima acetilkolinesteraze bila je najveća na postajama Pula i Zadar Seline, a najmanja u Lirskom zaljevu koji je bio i statistički različit od postaja Pula, Zadar Seline i Zadar marina (Slika 30). Nije bilo velike razlike u aktivnosti enzima između čistih i onečišćenih postaja.

Sadržaj karbonila općenito je bio viši na čistim postajama, iako je postaja Gruž pokazala najniže vrijednosti, a Pula najveće (Slika 31). Statistički se značajno nije razlikovala postaja Gruž od Pule i Zadar Selina.

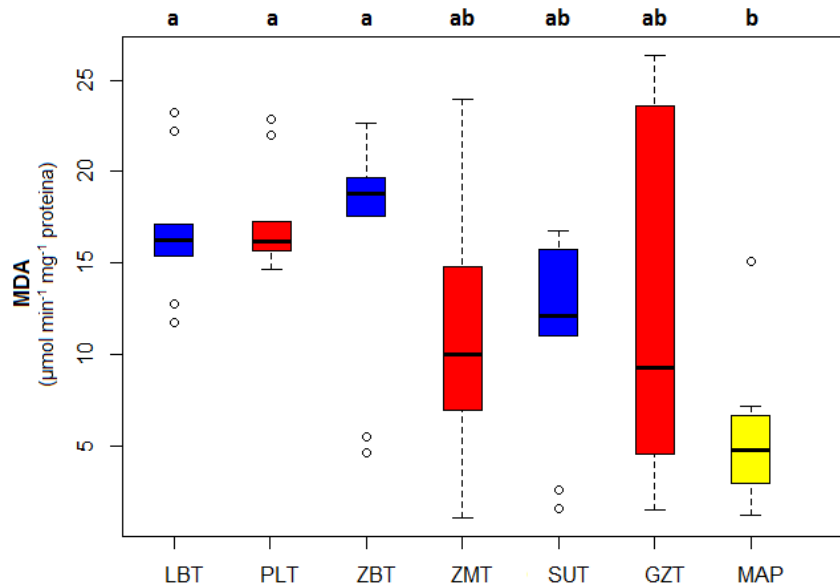
Postaje Zadar marina i Gruž su pokazale jako veliki raspon sadržaja malondialdehida, dok su ostale postaje imale dosta visoke koncentracije MDA s puno manjim rasponom (Slika 32).



**Slika 30** Aktivnosti enzima acetilkolinesteraze mjerene spektrofotometrijski u probavnim žlijezdama kavezno izlaganih dagnji *M. galloprovincialis* unutar transplant eksperimenta (medijan+donji/gornji kvartil+min./max. vrijednost+netipične vrijednosti). Plava boja predstavlja čiste, crvena nečiste, a žuta nativnu populaciju Marina, koja predstavlja kontrolu. Različita slova označavaju statistički različite populacije. (LBT = Lirski zaljev, PLT = Pula, ZBT = Zadar Seline, ZMT = Zadar marina, SUT = Ston, GZT = Gruž, MAP = Marina)



**Slika 31** Sadržaj karbonila određen spektrofotometrijski u probavnim žlijezdama kavezno izlaganih dagnji *M. galloprovincialis* unutar transplant eksperimenta (medijan+donji/gornji kvartil+min./max. vrijednost+netipične vrijednosti). Plava boja predstavlja čiste, crvena nečiste, a žuta nativnu populaciju Marina, koja predstavlja kontrolu. Različita slova označavaju statistički različite populacije. (LBT = Limski zaljev, PLT = Pula, ZBT = Zadar Seline, ZMT = Zadar marina, SUT = Ston, GZT = Gruž, MAP = Marina)

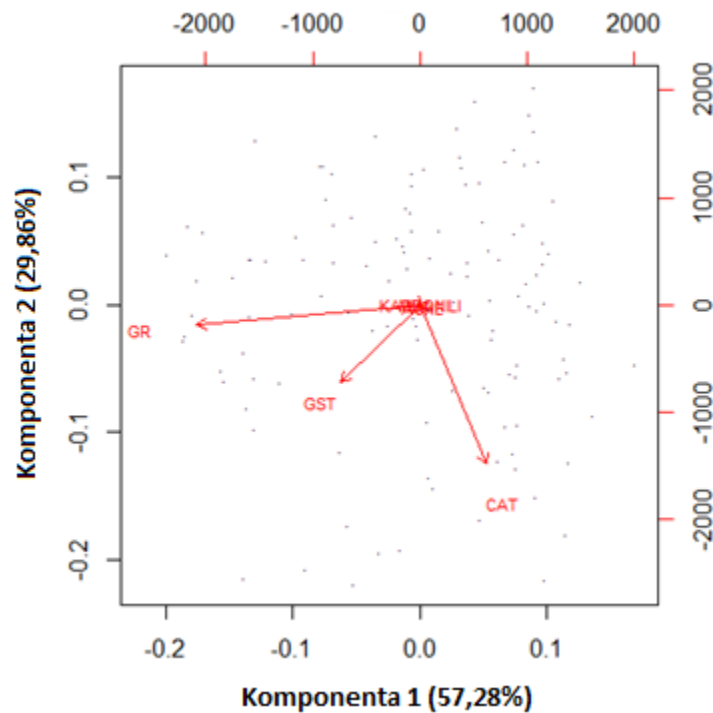


**Slika 32** Sadržaj malondialdehida određen spektrofotometrijski u probavnim žlijezdama kavezno izlaganih dagnji *M. galloprovincialis* unutar transplant eksperimenta (medijan+donji/gornji kvartil+min./max. vrijednost+netipične vrijednosti). Plava boja predstavlja čiste, crvena nečiste, a žuta nativnu populaciju Marina, koja predstavlja kontrolu. (LBT = Limski zaljev, PLT = Pula, ZBT = Zadar Seline, ZMT = Zadar marina, SUT = Ston, GZT = Gruž, MAP = Marina)

### 3.5. Analiza glavnih komponenti (PCA) biomarkera oksidativnog stresa i neurotoksičnosti

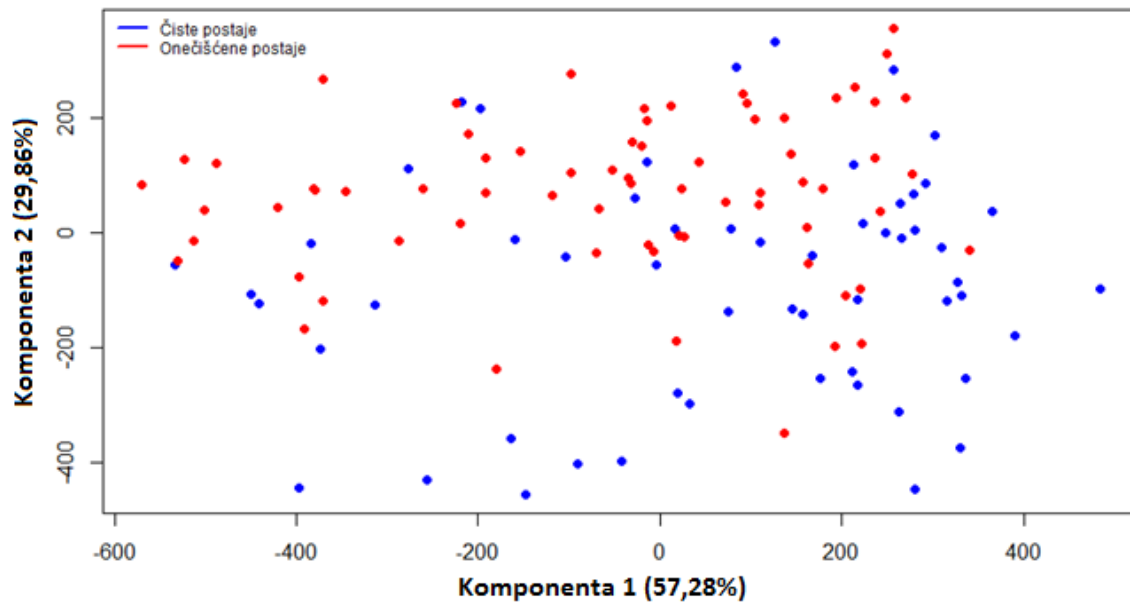
Prve dvije glavne komponente u PCA analizi (eng. *principal component analysis*) biomarkera iz dagnji uzorkovanih u jesen 2013. godine objasnile su 87,14% ukupne varijance, pri čemu je prva komponenta objasnila 57,28%, a druga 29,86% varijance (Prilog 1). Te glavne komponente su pokazale visoka faktorska opterećenja za katalazu, glutation reduktazu i glutation S-transferazu, no ne i značajnu korelaciju između ova tri biomarkera (Slika 33).

Jedinke se nisu odvajale s obzirom na kvalitetu okoliša (Slika 34), niti su se jedinke s istih postaja grupirale skupa (Slika 35).

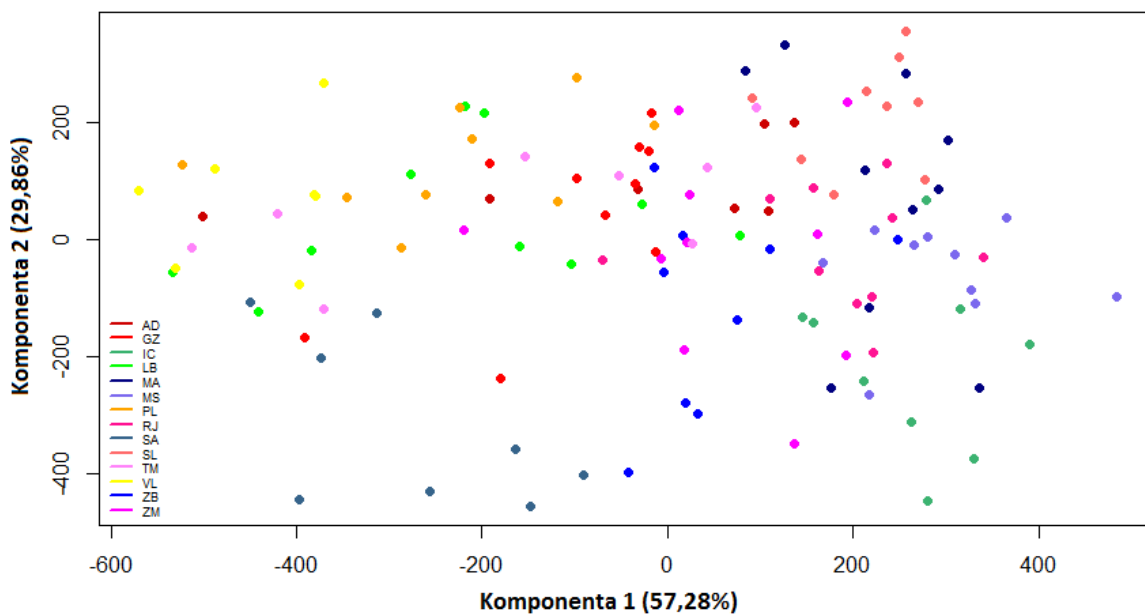


**Slika 33** Biplot PCA analize provedene na prikupljenim podacima o biomarkerima za dagnje *M. galloprovincialis* uzorkovane u jesen 2013. godine





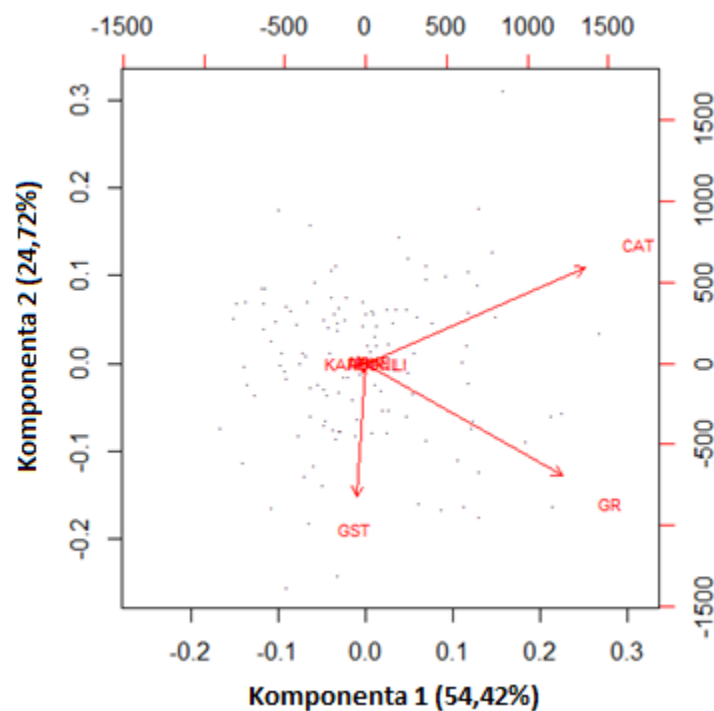
**Slika 34** PCA analiza provedena na prikupljenim podacima o biomarkerima za dagnje *M. galloprovincialis* uzorkovane u jesen 2013. godine s obzirom na kvalitetu okoliša



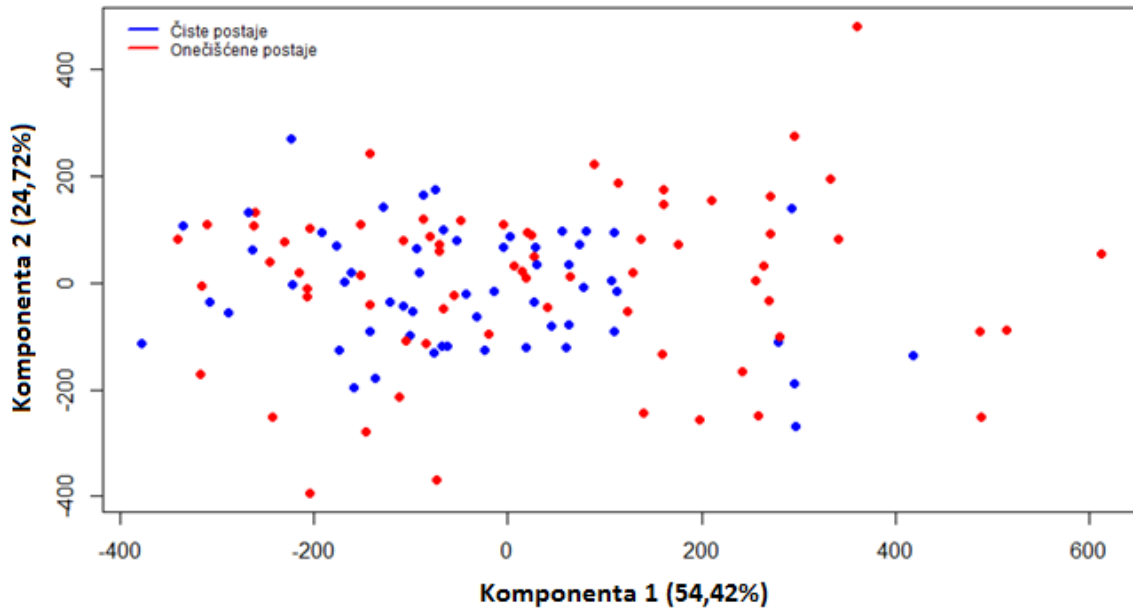
**Slika 35** PCA analiza provedena na prikupljenim podacima o biomarkerima za 14 populacija dagnji *M. galloprovincialis* uzorkovanih u jesen 2013. godine (LB = Limski zaljev, PL = Pula, IC = Ičići, RJ = Rijeka, VL = Viktor Lenac, ZB = Zadar Seline, ZM = Zadar marina, MA = Marina, TM = Trogir, AD = Adriavini, SL = Split, MS = Mali Ston, SA = Mljet, GZ = Gruž)

U PCA analizi biomarkera u dagnjama uzorkovanim u proljeće 2014. godine prve dvije glavne komponente su objasnile 79,14% ukupne varijabilnosti u uzorku, pri čemu je prva objašnjavala 54,42%, a druga 24,72% varijance (Prilog 2). Prva glavna komponenta je pokazala visoka faktorska opterećenja za katalazu i glutation reduktazu, a druga za CAT, GR, ali i glutation S-transferaze. Biomarkeri nisu međusobno korelirali (Slika 36).

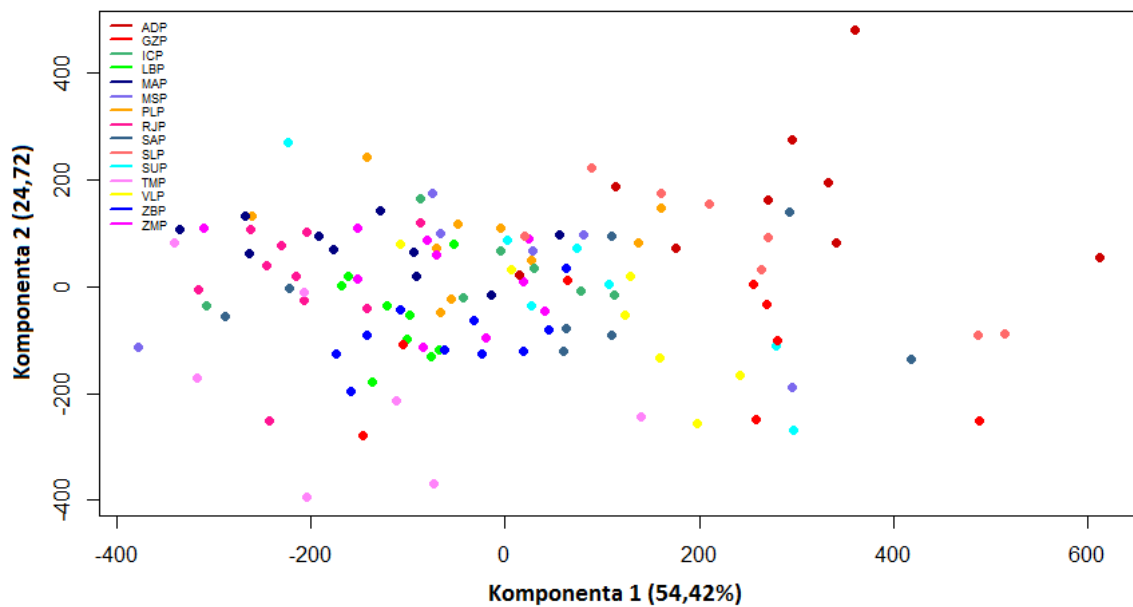
Postaje se nisu odvajale s obzirom na kvalitetu okoliša, budući da su jedinke s onečišćenih postaja pokazale veliku varijabilnost, iako su se jedinke s čistih postaja većinom grupirale skupa (Slika 37). Jedinke su pokazale i veliku varijabilnost unutar samih postaja, pa su se tako tek dagnje s postaja Limski zaljev, Zadar Seline i Rijeka grupirale zajedno (Slika 38).



**Slika 36** Biplot PCA analize provedene na prikupljenim podacima o biomarkerima za dagnje *M. galloprovincialis* uzorkovane u proljeće 2014. godine



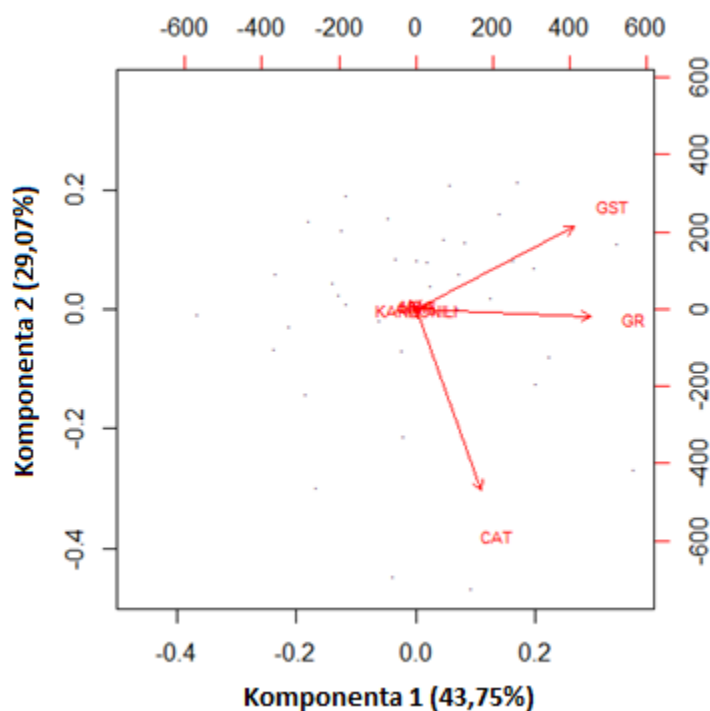
**Slika 37** PCA analiza provedena na prikupljenim podacima o biomarkerima za dagnje *M. galloprovincialis* uzorkovane u proljeće 2014. godine s obzirom na kvalitetu okoliša



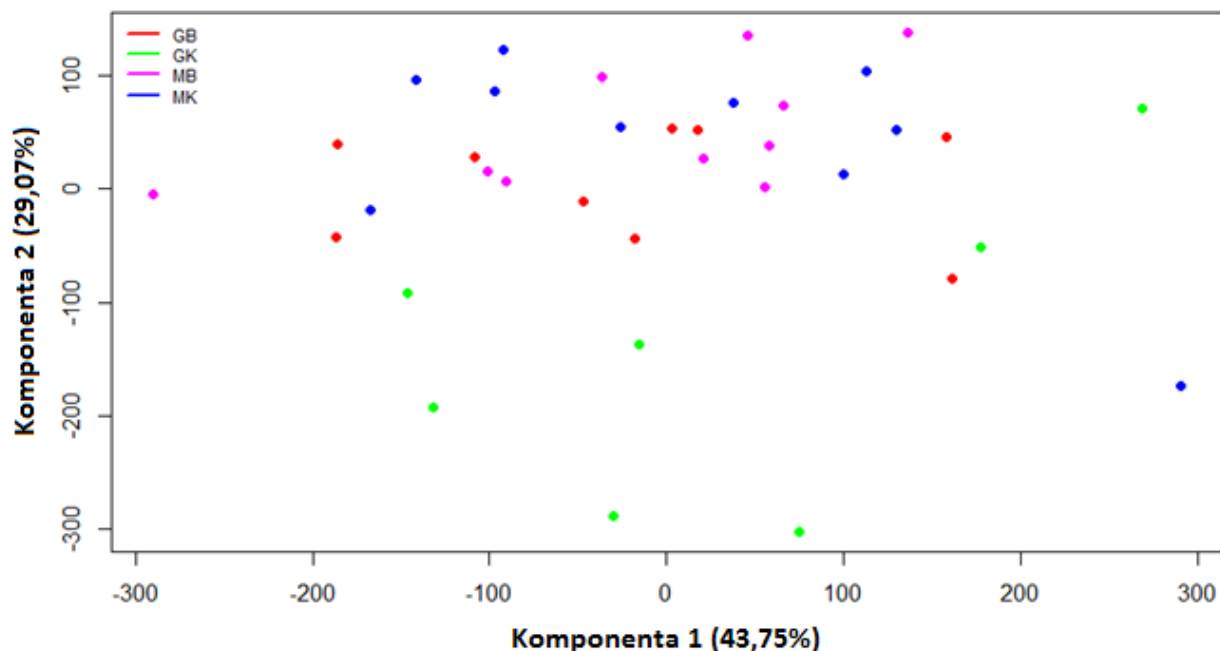
**Slika 38** PCA analiza provedena na prikupljenim podacima o biomarkerima za 15 populacija dagnji *M. galloprovincialis* uzorkovanih u proljeće 2014. godine (LBP = Limski zaljev, PLP = Pula, ICP = Ičići, RJP = Rijeka, VLP = Viktor Lenac, ZBP = Zadar Seline, ZMP = Zadar marina, MAP = Marina, TMP = Trogir, ADP = Adriavinil, SLP = Split, MSP = Mali Ston, SUP = Ston, SAP = Mljet, GZP = Gruž)

Prve dvije komponente u PCA analizi biomarkera iz dagnji izlaganih u mezokozmos eksperimentu su objasnile 72,82% varijabilnosti u uzorku, pri čemu prva 43,75%, a druga 29,07% varijance (Prilog 3). Najveća faktorska opterećenja u prvoj komponenti bila su za katalazu, glutation reduktazu i glutation S-transferaze, a u drugoj za CAT i GST. Glutacion reduktaza je korelirala s GST (Slika 39).

Analiza je pokazala odvajanje populacije iz Gruža u kontroli na temelju katalaze, te je u jedinkama iz te populacije zabilježen i široki raspon vrijednosti. (Slika 40).



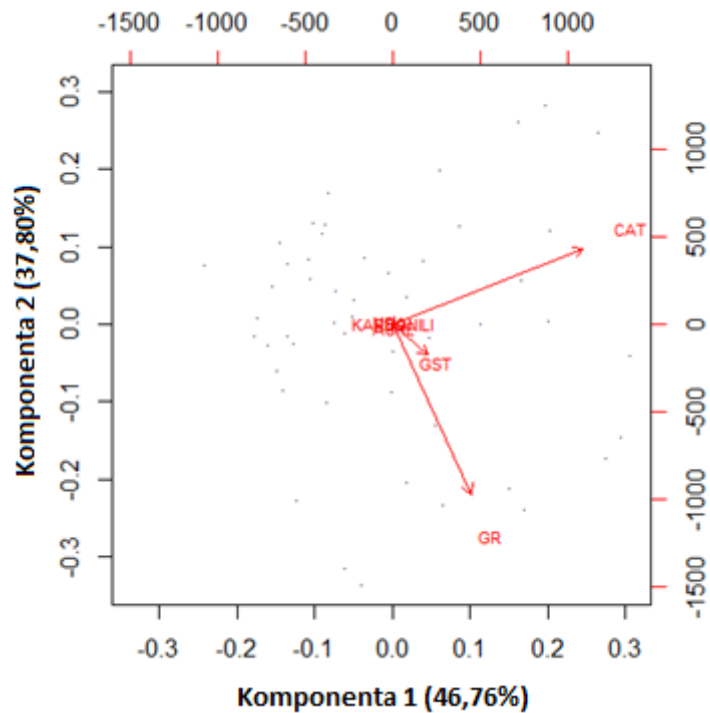
**Slika 39** Biplot PCA analize provedene na prikupljenim podacima o biomarkerima za dagnje *M. galloprovincialis* izlagane u mezokozmos eksperimentu



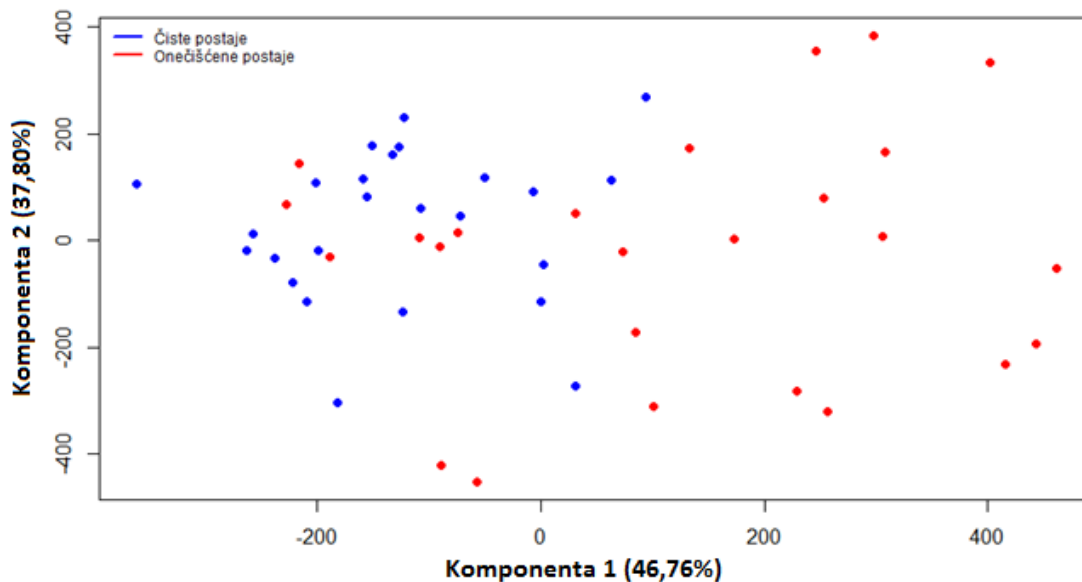
**Slika 40** PCA analiza provedena na prikupljenim podacima o biomarkerima za populacije dagnji *M. galloprovincialis* izlaganih u mezokozmos eksperimentu (GB = Gruž bakar, GK = Gruž kontrola, MB = Marina bakar, MK = Marina kontrola)

U PCA analizi biomarkera iz kavezno izlaganih dagnji unutar transplant eksperimenta, prve dvije komponente su objasnile 84,56% varijabilnosti uzorka, pri čemu prva 46,76%, a druga 37,80% varijance (Prilog 4). Najveća faktorska opterećenja u obje ove komponente bila su za katalazu, glutation reduktazu i glutation S-transferaze. Glutacion reduktaza je korelirala s GST (Slika 42).

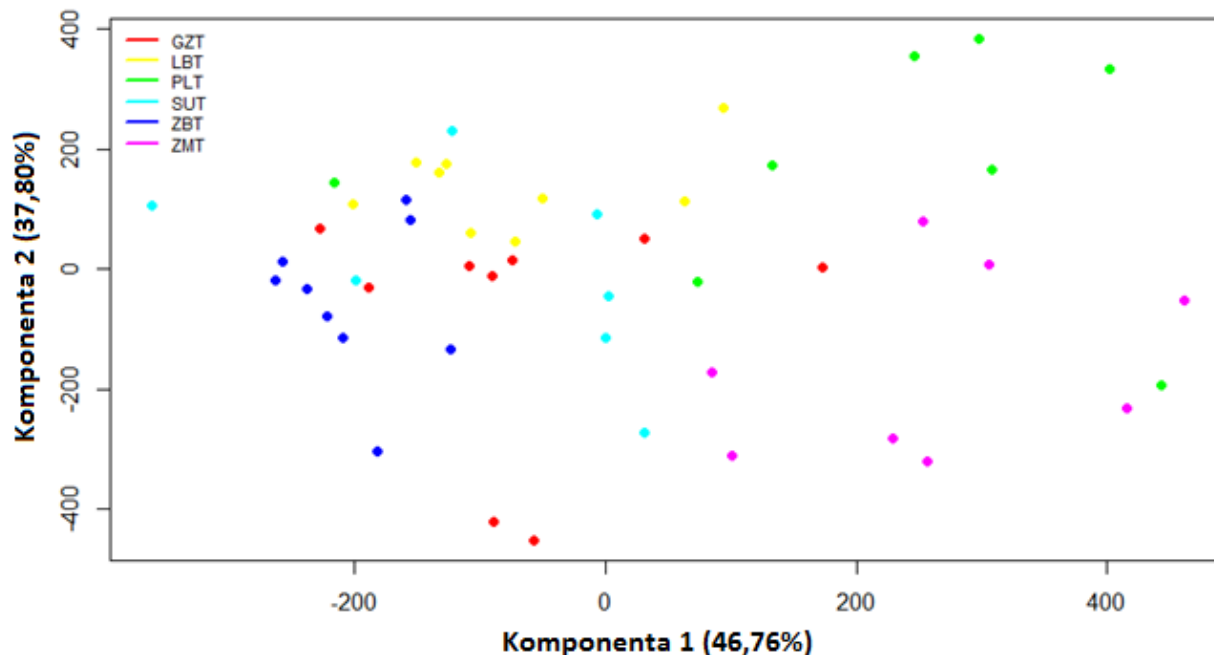
Čiste i onečišćene postaje su se odvojeno grupirale, pri čemu su onečišćene postaje pokazale veći raspon podataka (Slika 43). Najveće varijacije unutar postaja su zabilježene za Pulu i Zadar marinu (Slika 44).



**Slika 41** Biplot PCA analize provedene na prikupljenim podacima o biomarkerima za kavezno izlagane dagnje *M. galloprovincialis* unutar transplant eksperimenta



**Slika 42** PCA analiza provedena na prikupljenim podacima o biomarkerima za kavezno izlagane dagnje *M. galloprovincialis* unutar transplant eksperimenta s obzirom na kvalitetu okoliša u koji su transplantirane

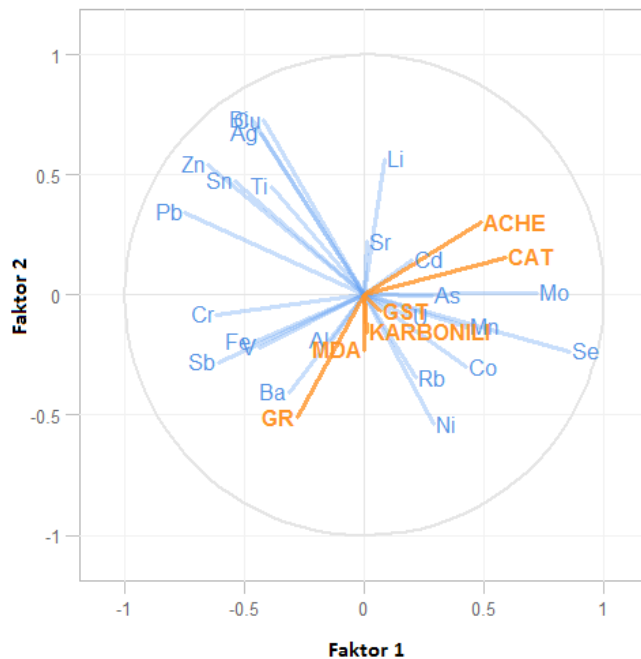


**Slika 43** PCA analiza provedena na prikupljenim podacima o biomarkerima za 6 populacija kavezno izlaganih dagnji *M. galloprovincialis* unutar transplant eksperimenta (LBT = Limski zaljev, PLT = Pula, ZBT = Zadar Seline, ZMT = Zadar marina, SUT = Ston, GZT = Gruž, MAP = Marina)

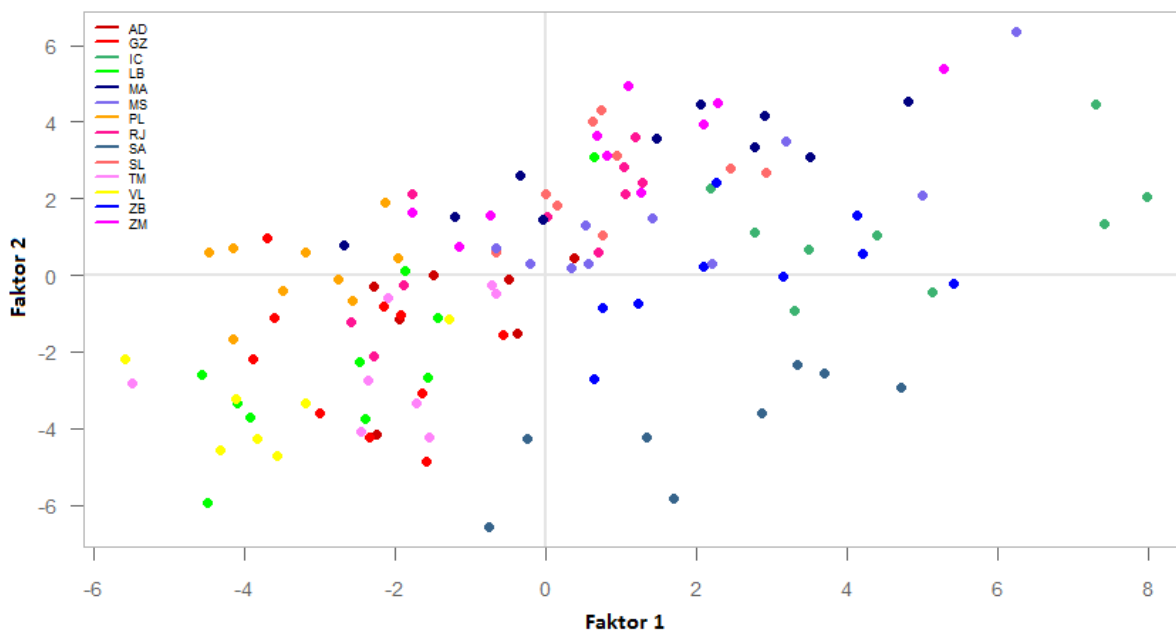
### 3.6. Korelacije između koncentracije metala u tkivu dagnji i biomarkera oksidativnog stresa i neurotoksičnosti

Regresijska PLS analiza (eng. *partial least squares*), metoda parcijalnih najmanjih kvadrata, na jedinkama uzorkovanim u jesen 2013. godine pokazala je korelaciju biomarkera acetilkolinesteraze i katalaze s kadmijem, arsenom, molbidenom te manganom i selenom. Glutation S-transferaze su također korelirale s manganom i selenijem no i s uranijem, kobaltom, rubidijem i niklom, dok je glutacion reduktaza korelirala s barijem i aluminijem. Karbonili i MDA su pokazali korelaciju s rubidijem i niklom te aluminijem i barijem (Slika 44).

Postaje su se odvajale po kvaliteti okoliša najviše na temelju aktivnosti GST i s njime koreliranih metala, no postaje Limski zaljev i Marina su grupirane s onečišćenim postajama. Jedinke su se unutar postaja većinom grupirale zajedno uz izutetak Limskog zaljeva i Marine za koje je zabilježena veća varijabilnost (Slika 45).



**Slika 44** PLS analiza korelacije biomarkera i metala u tkivu dagnji *M. galloprovincialis* uzorkovanih u jesen 2013. godine

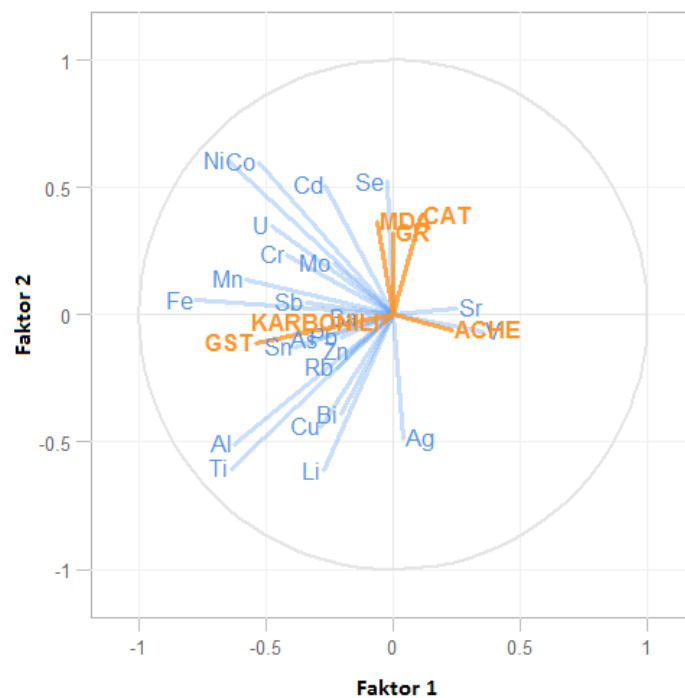


**Slika 45** PLS analiza biomarkera i metala u tkivu dagnji *M. galloprovincialis* uzorkovanih na 14 postaja u jesen 2013. godine (LB = Limski zaljev, PL = Pula, IC = Ičići, RJ = Rijeka, VL = Viktor Lenac, ZB = Zadar Seline, ZM = Zadar marina, MA = Marina, TM = Trogir, AD = Adriavinil, SL = Split, MS = Mali Ston, SA = Mljet, GZ = Gruž)

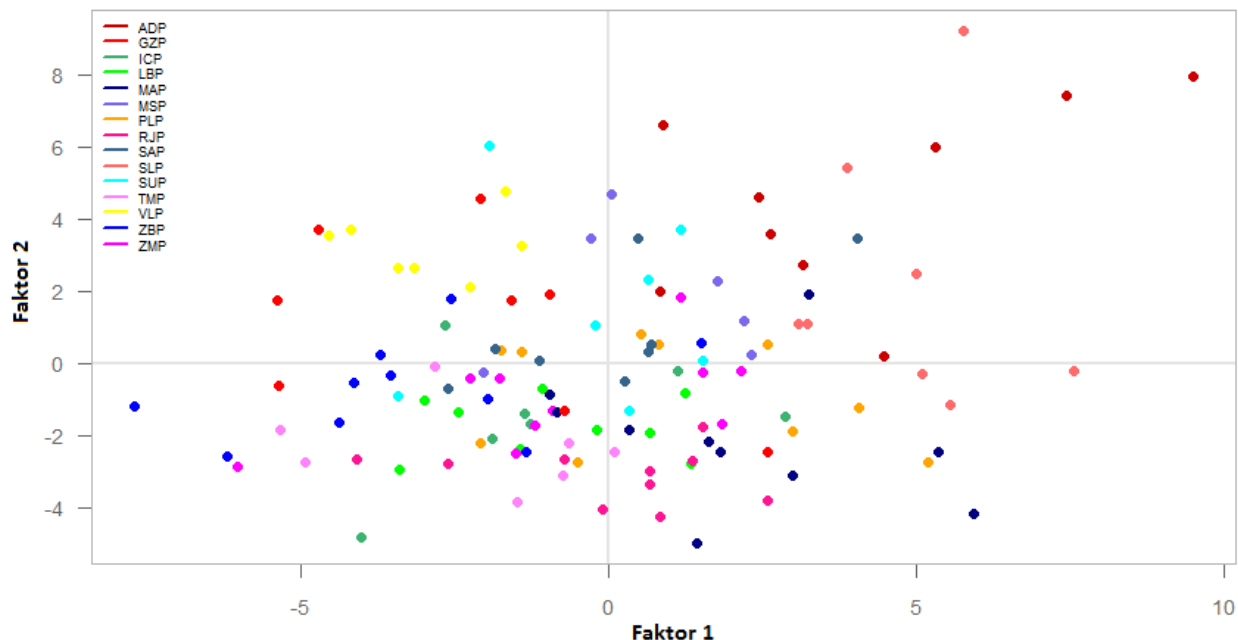


Analiza korelacije biomarkera oksidativnog stresa i metala u tkivu dagnji uzorkovanih u proljeće 2014. godine PLS metodom pokazala je korelaciju acetilkolinesteraze sa stroncijem i vanadijem, karbonila s cinkom i rubidijem, a glutation S-transferaza s kositrom, arsenom, olovom i barijem. Glutacion reduktaza i katalaza su korelirale sa selenom, a malondialdehidi sa selenom i kadmijem (Slika 46).

Postaje se nisu grupirale skupa s obzirom na kvalitetu okoliša, a kod onečišćenih postaja se pokazala i velika varijabilnost između i unutar samih postaja s obzirom na PLS analizu korelacije biomarkera s metalima u tkivu jedinki (Slika 47).



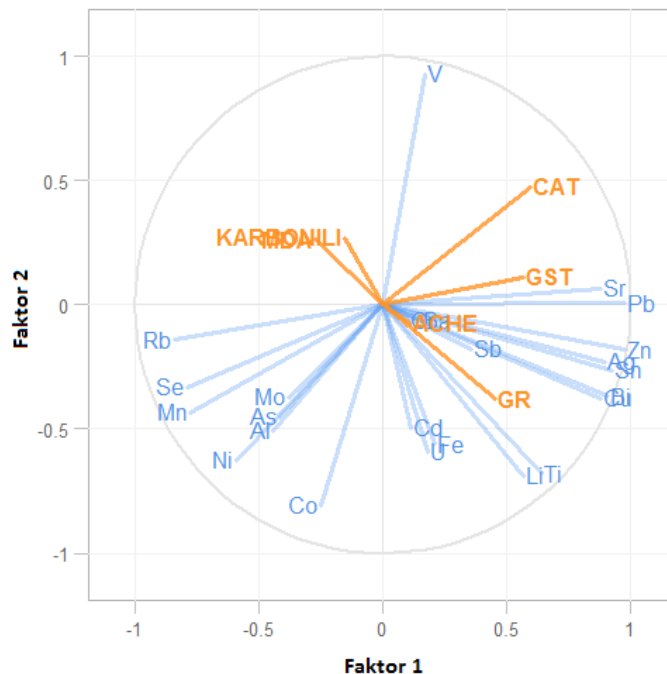
**Slika 46** PLS analiza korelacije biomarkera i metala u tkivu dagnji *M. galloprovincialis* uzorkovanih u proljeće 2014. godine



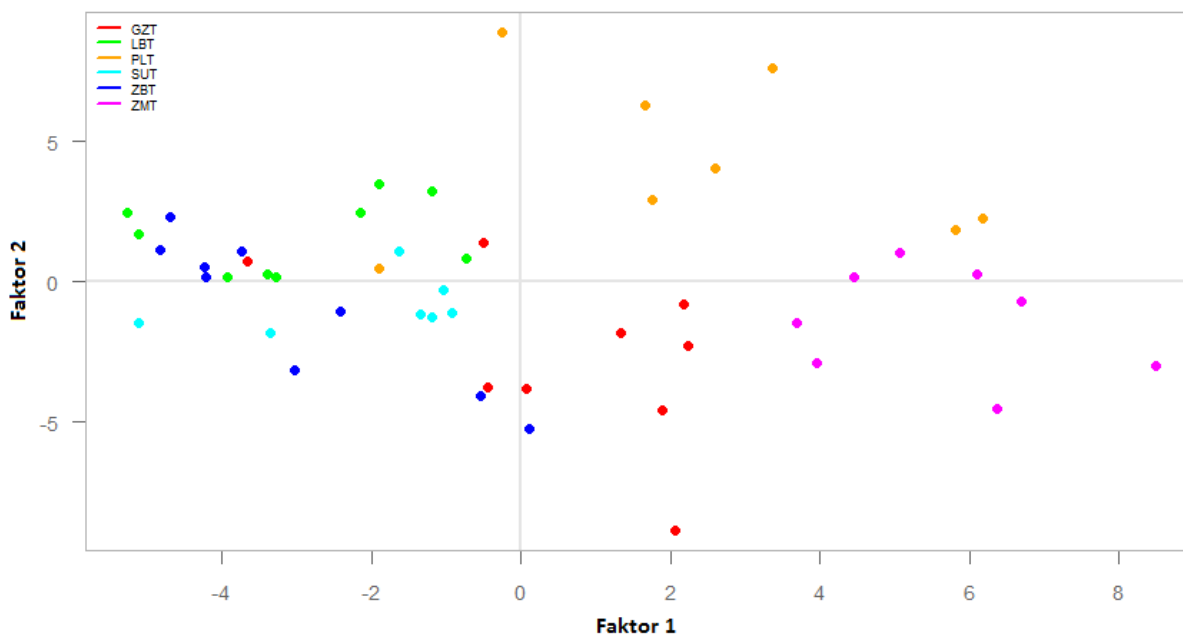
**Slika 47** PLS analiza biomarkera i metala u tkivu dagnji *M. galloprovincialis* uzorkovanih na 15 postaja u proljeće 2014. godine (LBP = Limski zaljev, PLP = Pula, ICP = Ičići, RJP = Rijeka, VLP = Viktor Lenac, ZBP = Zadar Seline, ZMP = Zadar marina, MAP = Marina, TMP = Trogir, ADP = Adriavinil, SLP = Split, MSP = Mali Ston, SUP = Ston, SAP = Mljet, GZP = Gruž)

PLS analiza kavezno izlaganih dagnji u transplant eksperimentu pokazala je korelaciju glutation S-transferaza sa stroncijem i olovom, te cinkom, srebrom i kositrom, a acetilkolinesteraze i glutation reduktaze s litijem i titanijem. Katalaza, karbonili i MDA nisu pokazali nikakvu korelaciju s metalima (Slika 48).

Postaje su se grupirale s obzirom na kvalitetu okoliša te je za onečišćene postaje zabilježena puno veća varijabilnost podataka (Slika 49).



**Slika 48** PLS analiza korelacije biomarkera i metala u tkivu kavezno izlaganih dagnji *M. galloprovincialis* u transplant eksperimentu



**Slika 49** PLS analiza biomarkera i metala u tkivu kavezno izlaganih dagnji *M. galloprovincialis* unutar transplant eksperimenta na 6 postaja različite kvalitete okoliša (LBT = Limski zaljev, PLT = Pula, ZBT = Zadar Seline, ZMT = Zadar marina, SUT = Ston, GZT = Gruž, MAP = Marina)

## 4. Rasprava

### 4.1. Utjecaj kvalitete okoliša i sezonalnosti na biomarkere oksidativnog stresa i neurotoksičnosti

Analiza biomarkera oksidativnog stresa i neurotoksičnosti u nativnim populacijama dagnje *Mytilus galloprovincialis* je pokazala značajnu varijabilnost između postaja s obzirom na kvalitetu okoliša i sezonu uzorkovanja. Dobiveni rezultati su u skladu s prijašnjim studijama rađenim na ovom području (Petrović i sur. 2004, Borković i sur. 2005, Štambuk i sur. 2013).

Mnogi autori su već utvrdili da su promjene u vrijednostima biomarkera oksidativnog stresa povezane s varijacijama u abiotičkim faktorima kao što su temperatura i salinitet (Petrović i sur. 2004, Bocchetti i Regoli 2006, Fernández i sur. 2010, Attig i sur. 2014). Također, utvrđeno je da su oksidativne promjene tipični odgovor školjkaša u periodima intenzivnog hranjenja kao rezultat povećanog aerobnog metabolizma (Regoli i sur. 2002b). Ipak, smatra se da do najveće promjene u hidrobiontima dolazi tijekom mrijesta jer je otpuštanje spolnih produkata popraćeno s aktivnom degradacijom tkiva i staničnih struktura, što povećava oksidacijske procese u stanicama (Shulman i Love 1999). Proljeće u Jadranu je karakterizirano naglim povećanjem temperature i najvećim pikom fitoplanktonskog razvoja koji počinje krajem siječnja i traje sljedeća 2 mjeseca (Zoppini i sur. 1995), što uvelike pridonosi povećanju dostupne hrane za školjkaše. Ti faktori utječu i na to da je proljeće glavni period gametogeneze u dagnjama s ovog područja (Regoli i Orlando 1994, Pampanin i sur. 2005). Dodatno, Soldatov i sur. (2007) su uočili da antioksidativni enzimski kompleks dagnje pokazuje određenu specifičnost za tkiva. S obzirom da neki unutrašnji faktori (prehrana, razmnožavanje) imaju puno veći utjecaj na antioksidativni kompleks probavne žlijezde, Manduzio i sur. (2004) su predložili da, za razliku od škrga, probavna žlijezda kao metabolički najaktivniji organ može pokazati veće fluktuacije stupnja enzimatske aktivnosti između sezona.

Aktivnost biomarkera oksidativnog stresa u dagnjama uzorkovanim u proljetnom periodu ovog istraživanja je stoga bila dosta promjenjiva između i unutar istraživanih

postaja te se bitno razlikovala od vrijednosti izmjerenih u jesen, što je potvrdila i PCA analiza rezultata.

Brojnim istraživanjima utvrđeno je da odgovori antioksidativnih enzima, poput katalaze, glutathion reduktaze i glutathion S-transferaza u gradijentu onečišćenja pokazuju zvonasti profil u kojem im se aktivnost povećava dok se ne dosegnu visoke razine staničnog stresa, pri čemu sintezu proteina nadvlada kataliza istog te dolazi do inhibicije enzima (Winston i Di Giulio 1991, Regoli i Principato 1995, Dagnino i sur. 2007, Banni i sur. 2010). U takvim uvjetima, aktivnost biomarkera više nije korisna za opisivanje stresa uzrokovanog onečišćenjem što se pokazalo i na rezultatima dobivenim analizom prirodnih populacija. Tako je primjerice aktivnost enzima katalaze u jesen 2013. bila vrlo visoka za postaje Ičići, Marina i Mljet koje su smatrane čistim postajama, dok je za luke poput Pule, Splita i Gruža bila znatno niža te se može pretpostaviti da je u tom slučaju došlo do inhibicije aktivnosti ovog enzima. Slični rezultati zabilježeni su i za aktivnost glutathion S-transferaza. Aktivnost enzima glutathion reduktaze bila je veća za onečišćene postaje poput Pule, Viktor Lenca, Trogira i Gruža, ali i za postaje Limski zaljev i Mljet koje su smatrane čistim postajama. Razlog tome može biti činjenica da je Limski zaljev dugačka, zatvorena uvala sa slabom strujom vode te većina onečišćivača koji se u nju unesu tamo i ostaju, dok se onečišćenje koje je moglo uzrokovati oksidativni stres u dagnjama s postaje Mljet može pripisati porastu nautičkog turizma u tom području. S druge strane, niska aktivnost reduktaze je očekivano zabilježena za čiste postaje Ičići, Zadar Seline, Marina, Mali Ston, ali i za onečišćene postaje kao što su Rijeka, Zadar marina ili Split gdje je moglo doći do inhibicije ovog enzima. Slične su varijacije zabilježene i u jedinkama uzorkovanim u proljeće pri čemu je većina postaja imala povećane vrijednosti u odnosu na jesenski period za tri prethodno navedena biomarkera.

Dagnje uzorkovane u jesen 2013. godine pokazuju generalno veću aktivnost enzima acetilkolinesteraze za čiste postaje, uz iznimku postaje Limski zaljev, te manju za onečišćene postaje, dok se aktivnost smanjila na svim postajama istraživanim u proljeće. Acetilkolinesteraza je jako dobro proučen enzim u životinjskom svijetu, no zbog svoje uloge u neuroprijenosu smatra se jako podložnim biotičkim i abiotičkim promjenama (Banni i sur. 2010) te je zbog toga rezultate dobivene mjerenjem njegove

aktivnosti teško protumačiti u kontekstu oksidativnog stresa. AChE se stoga koristi kao biomarker generalnog fiziološkog statusa dagnji (Bellas i sur. 2014). Vrijedi spomenuti da, dok karabimati i organofosfati inhibiraju aktivnost AChE, drugi faktori, poput metala i različitih prirodnih fluktuacija (temperatura, biotoksini ili cijanobakterije) također mogu modulirati njegovu aktivnost (Najimi i sur. 1997, Dellali i sur. 2001, Dailianis i sur. 2003, Frasco i sur. 2005, Gorbi i sur. 2008). Uz to, aktivnost acetilkolinesteraze je također kontrolirana koncentracijom onečišćivača i duljinom izlaganja, kao što su nedavno pokazali Jebali i sur. (2006) eksperimentom na ribi *Seriola dumerilli* s kadmijem te Attig i sur. (2010) tretiranjem dagnji niklom. U oba istraživanja manja koncentracija metala je inducirala, a povećana inhibirala aktivnost AChE.

Izmjerene koncentracije karbonila su bile mnogo veće kod dagnji uzorkovanih u proljeće nego kod dagnji uzorkovanih u jesen, pri čemu je koncentracija znatno veća za onečišćene postaje Pula, Viktor Lenac, Split i Gruž. Puno veća razina karbonila izmjerena u proljetnom razdoblju, može se pripisati različitoj sezonskoj indukciji proteolitičkih sustava za koje je pokazano da su podložni abiotičkim promjenama u okolišu (Hofmann and Somero 1995). Uz to, Grune i sur. (2003) su pokazali da, dok se pri višim koncentracijam oksidansa povećava količina karbonila, umjerene koncentracije oksidansa mogu inducirati proteolitičku razgradnju oštećenih proteina. Tako bi i povećanje i smanjenje u razini karboniziranih proteina, ako se uspoređuje s kontrolom, moglo služiti kao biomarker oksidativnog stresa, pri čemu bi povećanje bio odgovor na kronično, a smanjenje na umjereno zagađenje. Koncentracije malondialdehida, produkata lipidne peroksidacije, bile su visoke i širokog raspona vrijednosti na uzorcima iz jeseni, dok su na proljeće koncentracije bile niže i pokazale manji raspon vrijednosti. Ipak, važno je uzeti u obzir da se količina MDA mjerena kao konjugati TBA kiseline može precijeniti, kao što je i predloženo u istraživanjima koje su proveli Mendes i sur. (2009) te Attig i sur. (2014). Niska razina MDA, ali povećana razina karbonila, ukazuju da indukcija katalaze nije uspjela spriječiti oksidativnu štetu na postaji Mali Ston, ali i različit mehanizam nastanka karbonila i MDA te njihove povezanosti s oksidativnim stresom. Smatra se da su različiti oksidansi povezani s formacijom različitih produkata. Mijeloperoksidaza će, na primjer, inducirati stvaranje karbonilnih grupa na proteinima, ali će imati mali ili nikakav učinak na DNK i lipide, dok neki drugi ROS mogu bolje oksidirati

DNK i lipide od proteina (Dalle-Donne i sur. 2003). Za metale se isto tako zna da potiču stvaranje karbonila putem metal-kataliziranih oksidativnih reakcija (MCO), dok nemaju tako štetan učinak na lipide (Stadtman i Oliver 1991).

## **4.2. Utjecaj bakra na biomarkere oksidativnog stresa i neurotoksičnosti**

U mezokozmos eksperimentu provedenom u proljeće 2014. godine dagnje sa čiste postaje Marina i onečišćene postaje Gruž izlagane su povećanim koncentracijama bakra.

Bakar je esencijalni element za mnoge biološke sustave i prisutan je u niskim koncentracijama u različitim stanicama i tkivima. Velik broj enzima ima bakar u svojoj strukturi ili im je on potreban kao kofaktor (Nath 1997, Suzuki i sur. 2002). Ipak, bakar je dobro poznat okolišni zagađivač, budući da se u prošlosti koristio u bojama protiv obraštaja i pesticidima. Za veće koncentracije prijelaznih metala poput željeza i bakra ustanovljeno je da mogu pridonjeti formaciji ROS-a u biološkim sustavima (Aust i sur. 1985, Cheeseman i Slater 1993).

Nekoliko istraživanja se već temeljilo na istraživanju utjecaja bakra na dagnje. Maria i Bebianno (2011) su ustanovili da se pri izlaganju različitim koncentracijama bakra, aktivnost CAT, GR i GST te količina MDA znatno povećala u škragama *M. galloprovincialis*, dok su u probavnoj žlijezdi isti oksidativni biomarkeri bili inhibirani. Suprotno tome, Canesi i sur. (1999) su primjetili indukciju GST, a Viarengo i sur. (1990) zabilježili povećane koncentracije MDA u oba tkiva *M. galloprovincialis* izlaganih bakru. Lehtonen i Leiniö (2003) su mjerli aktivnost AChE u *M. edulis* izlagnim bakru te su zabilježili inhibiciju tog enzima, dok su u sličnom eksperimentu Brown i sur. (2004) primjetili indukciju AChE. Za izlaganje bakru zabilježeno je da također utječe i na karbonilaciju proteina u probavnoj žlijezdi *M. edulis* (Kirchin i sur. 1992).

Između dagnji sa obje postaje izlagane bakru u našem eksperimentu uočena je određena varijacija, ali ne i statistički značajna razlika te nije moguće utvrditi da su dagnje s onečišćene postaje pokazale bolju ili lošiju aklimatizaciju na okolišno

onečišćenje od jedinki sa čiste postaje. Značajna razlika u vrijednostima biomarkera nije zabilježena ni između pojedinačnih izlaganja, uz iznimku katalaze i karbonila. Aktivnost katalaze bila je veća kod kontrolne populacije Gruž, nego kod kontrolne populacije Marina te se može zaključiti da je prilikom izlaganja bakru došlo do inhibicije enzima u populaciji Gruž i indukciji aktivnosti kod populacije Marina. Pri tome se kontrolna populacija Gruž statistički značajno razlikovala od ostalih izlaganja. Ista populacija je imala visoku koncentraciju karbonila koja se značajno razlikovala od koncentracije istih u kontrolnoj populaciji Marina. Jedinke s postaje Marina u kontrolnom bazenu su pokazale slične vrijednosti svih biomarkera s dagnjama iz obje populacije izlaganim bakru.

Važno je uzeti u obzir da su Khessiba i sur. (2001) primijetili da aklimatizacijski period pri izlaganju *M. galloprovincialis* u mezokozmos eksperimentu može utjecati na aktivnost CAT i količinu MDA, pri čemu se oboje povećalo u periodu prije izlaganja, dok se tijekom izlaganja vrijednosti nisu mijenjale.

#### **4.3. Utjecaj kaveznog izlaganja unutar transplant eksperimenta na biomarkere oksidativnog stresa i neurotoksičnosti**

Predloženo je da transplantiranje dagnji s kontrolne postaje na druge lokacije smanjuje fiziološku varijabilnost među populacijama što omogućuje bolje istraživanje promjena potaknutih degradacijom okoliša (Box i sur. 2007). Transplantiranje dagnji se smatra dobrom metodom kojom se reducira utjecaj genetičkih i populacijskih razlika, sezonalne varijabilnosti ili kompenzacijskih prilagodba jedinki s kronično onečišćenih postaja, faktora koji mogu smanjiti sposobnost za razlikovanje između različitih razina okolišnih poremećaja (Gorbi i sur. 2008).

U našem eksperimentu, dagnje s čiste postaje Marina su izlagane na 6 lokacija duž Jadrana. Značajna aktivnost enzima katalaze, glutation reduktaze i glutation S-transferaza zabilježena je na postaji Zadar marina, kao i povećana aktivnost katalaze i glutation S-transferaza na postaji Pula. Za Pulu je zabilježena i veća koncentracija karbonila te aktivnost acetilkolinesteraze, pri čemu ona nije odskakala od vrijednosti zabilježenih i za obje Zadarske postaje. Koncentracije MDA se nisu značajnije razlikovale među izlaganjima ali su sve postaje pokazale puno veću količinu MDA od



kontrolne. Ti rezultati mogu biti posljedica stresa nastalog tijekom transportacije ili izlaganja drugačijem okolišu, ali i moguće precijene MDA mjerene kao konjugata TBA kiseline. Uz to, smatra se da se MDA može relativno brzo razgraditi u tkivu zdravih jedinki (Siu i Draper 1982), što bi moglo objasniti njihovu malu količinu na kontrolnoj postaji. Grintzalis i sur. (2012) su stoga predložili da se umjesto MDA, kao biomarker oksidativne štete, koriste neki drugi produkti lipidne peroksidacije poput lipidnih hidroperoksida (LOOH).

Transplantirane jedinke su u PCA analizi pokazale bolje razdvajanje i samih postaja i postaja na temelju kvalitete okoliša od nativnih jedinki podvrgnutih analizi biomarkera direktno nakon uzorkovanja. Gruž je pri tome pokazao bolje svrstavanje uz postaje koje su smatrane čistima, što potvrđuju i relativno niske aktivnosti antioksidativnih enzima na toj postaji. Uz to, niska razina oksidativne štete u tkivima dagnji iz Gruža govori da organizmi na tom području, unatoč velikom pomorskom prometu, nisu izloženi snažom oksidativnom stresu.

Iako je period od 4-5 tjedana za izlaganje unutar transplant eksperimenta često korišten u drugim studijama (Pampanin i sur. 2005, Gorbi i sur. 2008, Moschino i sur. 2011) i smatra se optimalnim, treba uzeti u obzir da promjene u okolišnim faktorima poput temperature, saliniteta i dostupnosti hrane mogu direktno utjecati na fiziološki status životinja. Primjerice, Rank i sur. (2007) su u svom radu konstatirali da kavezno izlaganje unutar transplant eksperimenta ima potencijalno negativan učinak na aktivnost AChE.

#### **4.4. Integracija bioloških i kemijskih analiza**

Metali, kao što su kadmij, nikal, krom, olovo i živa, su toksični za vodene organizme zbog svog oksidativnog potencijala, dok su drugi poput željeza, cinka, bakra, selenija i mangana esencijalni za njihov metabolizam, ali postaju toksični kada se njihova koncentracija u tkivu poveća. Metali su generatori slobodnih radikala i imaju tendenciju oksidiranja drugih staničnih molekula (Viarengo i sur. 1990, Vlahogianni i sur. 2007). Attig i sur. (2010) su pokazali da se pri većoj koncentraciji nikla u dagnjama

povećava aktivnost CAT i GST te količina MDA. Slične su rezultate dobili Verlecar i sur. (2008) izlaganjem školjkaša *Perna viridis* živi, pri čemu je zabilježena indukcija CAT, GR i GST te veća količina malondialdehida i karbonila. Dailianis i sur. (2009) su zabilježili povećanje koncentracije karbonila, a Jebali i sur. (2006) zvonolik odgovor aktivnosti AChE prilikom izlaganja kadmiju.

Kemijske analize metala u tkivu dagnji su u ovom eksperimentu korištene kao indikator promjene njihove bioraspoloživosti na različitim postajama (Prilog 5). Kada su podaci o koncentracijama metala integrirani s odgovorom biomarkera u tkivu dagnji uzorkovanih u jesen i proljeće 2013/14 te kavezno izlaganih jedinki unutar transplant eksperimenta, dobivene su veoma varijabilne korelacije ovisno o sezoni ili eksperimentu (Prilozi 6, 7 i 8). Rezultate za native populacije je stoga teško protumačiti, no u PLS analizi transplanata se jasno odvajaju čiste postaje on onečišćenih i to na temelju razlika u indukciji enzima te koncentraciji stroncija, olova, cinka, bakra, srebra i kositra koji su korelirali s njima. Native populacije su pokazale znatno drugačije korelacije što je vjerojatno rezultat promijenjene biodostupnosti metala i same varijabilnosti biomarkera s obzirom na biotičke čimbenike.

Za biomarkere oksidativnog stresa korištene u ovom istraživanju, dokazano je da pokazuju odgovor i na organsko zagađenje poput PAH čestica (Cheung i sur. 2001, Lima i sur. 2007, Grintzalis i sur. 2012). Budući da su provedene analize uzimale u obzir samo koncentracije metala u tkivu dagnji, ne može se isključiti da su uz njih i organski onečišćivači pridonjeli promjeni odgovora antioksidativnih enzima te stvaranju oksidativne štete u jedikama. Sinergistički učinak organskih i anorganskih zagađivača je primjećen u prijašnjim istraživanjima (Banni i sur. 2009, Maria i Bebianno 2011).

## 5. Zaključak

Analizom biomarkera oksidativnog stresa i neurotoksičnosti u nativnim populacijama dagnji *Mytilus galloprovincialis* utvrđena je značajna varijabilnost između postaja različite kvalitete okoliša.

Ustanovljena je i sezonska varijacija u vrijednostima biomarkera, pri čemu je u proljetnom periodu zabilježena veća aktivnost antioksidativnih enzima, najvjerojatnije kao rezultat učinka fizičko-kemijskih i bioloških parametara drugačijih od specifičnog zagađenja mora.

Snažna inhibicija enzima katalaze, glutation reduktaze i glutation S-transferaza na jako onečišćenim postajama objašnjena je zvonolikim profilom aktivnosti tih enzima. Utvrđena je niža aktivnost enzima acetilkolinesteraze u proljeće te na onečišćenim postajama. U proljetnom periodu izmjerena je veća koncentracija karbonila, dok su razine malondialdehida pokazale širok raspon i visoke vrijednosti u jesen, a u proljeće niže vrijednosti i manji raspon.

Uspoređujući aktivnost biomarkera među postajama izloženim povećanim koncentracijama bakra pri istim kontroliranim uvjetima nije utvrđen populacijski efekt fenotipskog odgovora na stres. Razlike su ustanovljene samo za kontrolna izlaganja, pri čemu je Gruž, kao onečišćena postaja, pokazao veće vrijednosti katalaze i karbonila od čiste postaje Marina.

Jedinke transplahirane na postaje različite kvalitete okoliša su dale najbolju kvalitetu podataka, pokazujući bolje razdvajanje i samih postaja i postaja na temelju kvalitete okoliša od nativnih jedinki podvrgnutih analizi biomarkera izravno nakon uzorkovanja.

Integracijom podataka o odgovoru biomarkera i koncentracijama metala u tkivu nativnih populacija dagnji dobivene su korelacije koje variraju ovisno o sezoni, no analizom kavezno izlaganih dagnji je utvrđeno jasno odvajanje čistih postaja od onečišćenih na temelju razlika u indukciji enzima te koncentraciji stroncija, olova, cinka, bakra, srebra i kositra.

## 6. Literatura:

1. Aebi H. (1984): Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology* **105**: 121-126
2. Almroth B.C., Sturve J., Berglund A., Forlin L. (2005): Oxidative damage in eelpout (*Zoarces viviparus*), measured as protein carbonyls and TBARS, as biomarkers. *Aquatic Toxicology* **73**: 171-180
3. Almroth B.C., Sturve J., Stephensen E., Holth T.F., Förlin L. (2008): Protein carbonyls and antioxidant defenses in corkwing wrasse (*Symphodus melops*) from a heavy metal polluted and a PAH polluted site. *Marine Environmental Research* **66**: 271-277
4. Ames B.N., Shigenaga M.K., Hagen T.M. (1993): Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **90**: 7915-7922
5. Attig H., Dagnino A., Negri A., Jebali J., Boussetta H., Viarengo A., Dondero F., Banni M. (2010): Uptake and biochemical responses of mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed to sublethal nickel concentrations. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **73**: 1712-1719
6. Attig H., Kamel N., Sforzini S., Dagnino A., Jamel J., Boussetta H., Viarengo A., Banni M. (2014): Effects of thermal stress and nickel exposure on biomarkers responses in *Mytilus galloprovincialis* (Lam). *Marine Environmental Research* **94**: 65-71
7. Aust S.D., Morehouse L.A., Thomas C.E. (1985): Role of metals in oxygen radical reactions. *Journal of Free Radicals in Biology and Medicine* **1**: 3-25
8. Bakeas E.B., Argyris D.I., Siskos P.A. (2003): Carbonyl compounds in the urban environment of Athens, Greece. *Chemosphere* **52**: 805-813
9. Banni M., Bouraoui Z., Clerandeanu C., Narbonne J.F., Boussetta H. (2009): Mixture toxicity assessment of cadmium and benzo[a]pyrene in the sea worm *Hediste diversicolor*. *Chemosphere* **77**: 902-906
10. Banni M., Negri A., Dagnino A., Jebali J., Ameer S., Boussetta H. (2010): Acute effects of benzo[a]pyrene on digestive gland enzymatic biomarkers and DNA damage on mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **79**: 842-848
11. Bellas J., Albentosa M., Vidal-Liñán L., Besada V., Franco M.Á., Fumega J., González-Quijano A., Viñas L., Beiras R. (2014): Combined use of chemical, biochemical and physiological variables in mussels for the assessment of marine pollution along the N-NW Spanish coast. *Marine Environmental Research* **96**: 105-117
12. Betteridge D.J. (2000): What is oxidative stress?. *Metabolism* **49**: 3-8
13. Bocchetti R. i Regoli F. (2006): Seasonal variability of oxidative biomarkers, lysosomal parameters, metallothioneins and peroxisomal enzymes in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* from Adriatic Sea. *Chemosphere* **65**: 913-921
14. Borković S.S., Šaponjić J.S., Pavlović S.Z., Blagojević D.P., Milošević S.M., Kovačević T.B., Radojičić R.M., Spasić M.B., Žikić R.V., Saičić Z.S. (2005): The activity of

- antioxidant defence enzymes in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Adriatic Sea. *Comparative Biochemistry and Physiology C* **141**: 266-374
15. Box A., Sureda A., Galgani F., Pons A., S. Deudero S. (2007): Assessment of environmental pollution at Balearic Islands applying oxidative stress biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Comparative Biochemistry and Physiology C* **146**: 531-539
  16. Boyland E., L. F. Chasseaud L.F. (1969): The role of glutathione and glutathione s-transferases in mercapturic acid biosynthesis. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* **32**: 172-219
  17. Bradford M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254
  18. Brown R.J., Galloway T.S., Lowe D., Browne M.A., Dissanayake A., Jones M.B., Depledge M.H. (2004): Differential sensitivity of three marine invertebrates to copper assessed using multiple biomarkers. *Aquatic Toxicology* **66**: 267-278
  19. Buege J.A., Aust S.D. (1978): Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* **52**: 302-310
  20. Camus L., Pampanin D.M., Volpato E., Delaney E., Sanni S., Nasci C. (2004): Total oxyradical scavenging capacity responses in *Mytilus galloprovincialis* transplanted into the Venice lagoon (Italy) to measure the biological impact of anthropogenic activities. *Marine Pollution Bulletin* **49**: 801-808
  21. Canesi L., Viarengo A. (1997): Age-related Differences in Glutathione Metabolism in Mussel Tissues (*Mytilus edulis* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology B* **116**: 217-221
  22. Canesi L., Viarengo A., Leonzio C., Filippelli M., Gallo G. (1999): Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. *Aquatic Toxicology* **46**: 67-76
  23. Ceccherelli V.U., Rossi R. (1984): Settlement, growth and production of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Ecology Progress Series* **16**: 173-184
  24. Charissou A.M., Cossu-Leguille C., Vasseur P. (2004): Relationship between two oxidative stress biomarkers, malondialdehyde and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, in the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Science of the Total Environment* **322**: 109-122
  25. Cheeseman K.H., Slater T.F. (1993): An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin* **49**: 481-493
  26. Cheung C.C., Zheng G.J., Li A.M., Richardson B.J., Lam P.K. (2001): Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Aquatic Toxicology* **52**: 189-203
  27. Dagnino A., Allen J.I., Moore M.N., Broeg K., Canesi L., Viarengo A. (2007): Development of an expert system for the integration of biomarker responses in mussels into an animal health index. *Biomarkers* **12**: 155-172
  28. Dailianis S., Domouhtsidou G.P., Raftopoulou E., Kaloyianni M., Dimitriadis V.K. (2003): Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity

- and a signal transduction molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L.), in pollution monitoring. *Marine Environmental Research* **56**: 443–470
29. Dailianis S., Patetsini E., Kaloyianni M. (2009): The role of signalling molecules on actin glutathionylation and protein carbonylation induced by cadmium in haemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lmk). *Journal of Experimental Biology* **212**: 3612-3620
  30. Dalle-Donne I., Rossi R., Giustarini D., Milzani A., Colombo R. (2003): Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta* **329**: 23-38
  31. Danellakis D., Ntaikou I., Kornaros M., Dailianis S. (2011): Olive oil mill wastewater toxicity in the marine environment: Alterations of stress indices in tissues of mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology* **101**: 358-366
  32. Das S., Jana B.B. (1999): Dose-dependent uptake and Eichhornia-induced elimination of cadmium in various organs of the freshwater mussel, *Lamellidens marginalis* (Linn.). *Ecological Engineering* **12**: 207-229
  33. Davies K.J., Goldberg A.L. (1987): Proteins damaged by oxygen radicals are rapidly degraded in extracts of red blood cells. *The Journal of Biological Chemistry* **262**: 8227-8234
  34. Davies M.J. (2005): The oxidative environment and protein damage. *Biochimica et Biophysica Acta* **1703**: 93-109
  35. Del Rio D., Stewart A.J., Pellegrini N. (2005): A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* **15**: 316-328
  36. Dellali M., Gnassia-Barelli M., Romeo M., Aissa P. (2001): The use of acetylcholinesterase activity in *Ruditapes decussatus* and *Mytilus galloprovincialis* in the biomonitoring of Bizerta lagoon. *Comparative Biochemistry and Physiology C* **130**: 227-235
  37. Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V. Jr., Feather-Stone R.M. (1961): A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* **7**: 88-95
  38. Fernández B., Campillo J.A., Martínez-Gómez C., Benedicto J. (2010): Antioxidant responses in gills of mussel (*Mytilus galloprovincialis*) as biomarkers of environmental stress along the Spanish Mediterranean coast. *Aquatic Toxicology* **99**: 186-197
  39. Fitzpatrick P.J., O'Halloran J., Sheehan D., Walsh A.R. (1997): Assessment of a glutathione S-transferase and related proteins in the gill and digestive gland of *Mytilus edulis* (L.), as potential organic pollution biomarkers. *Biomarkers* **2**: 51-56
  40. Frasco M.F., Fournier D., Carvalho F., Guilhermino L. (2005): Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity. *Biomarkers* **10**: 360-375
  41. Galgani F., Bocquené G. (1989): A method for routine detection of organophosphates and carbamates in sea water. *Environmental Technology Letters* **10**: 311-322

42. Galloway T.S., Sanger R.C, Smith K.L., Fillmann G., Readman J.W., Ford T.E., Depledge M.H. (2002): Rapid assessment of marine pollution using multiple biomarkers and chemical immunoassays. *Environmental Science and Technology* **36**: 2219-2226
43. Goldberg E.D. (1975): The mussel watch: a first step in global marine monitoring. *Marine Pollution Bulletin* **6**: 111-132
44. Goldberg E.D. (1986): The Mussel Watch concept. *Environmental Monitoring and Assessment* **7**: 91-103
45. Gorbi S., Virno Lamberti C., Notti A., Benedetti M., Fattorini D., Moltedo G., Regoli F. (2008): An ecotoxicological protocol with caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, for monitoring the impact of an offshore platform in the Adriatic Sea. *Marine Environmental Research* **65**: 34-49
46. Grintzalis K., Georgiou C.D., Dailianis S. (2012): Total thiol redox status as a potent biomarker of PAH-mediated effects on mussels. *Marine Environmental Research* **81**: 26-34
47. Grune T. Merker K., Sandig G., Davies K.J. (2003): Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **305**: 709-718
48. Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. (1974): Glutathione s-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry* **249**: 7130-7139
49. Halliwell B., Gutteridge J.M. (1984): Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal* **219**: 1-14
50. Halliwell B., Gutteridge J.M. (1997): Lipid peroxidation in brain homogenates: the role of iron and hydroxyl radicals. *Journal of Neurochemistry* **69**: 1330-1331
51. Handy R.D., Galloway T.S., Depledge M.H. (2003): A proposal for the use of biomarkers for the assessment of chronic pollution and in regulatory toxicology. *Ecotoxicology* **12**: 331-343
52. Hofmann G., Somero G. (1995): Evidence for protein damage at environmental temperatures: seasonal changes in levels of ubiquitin conjugates and hsp70 in the intertidal mussel *Mytilus trossulus*. *Journal of Experimental Biology* **198**: 1509-1518
53. [http://genomics.unl.edu/RBC\\_EDU/gp.html](http://genomics.unl.edu/RBC_EDU/gp.html), datum pristupa 13.01.2016.
54. <http://www.fao.org/fishery/species/3529/en>, datum pristupa 04.02.2016.
55. <http://www.intechopen.com/books/lipid-peroxidation/the-effect-of-plant-secondary-metabolites-on-lipid-peroxidation-and-eicosanoid-pathway>, datum pristupa 26.02.2016.
56. <http://www.issg.org/database/species/ecology.asp?si=102&fr=1&sts=sss&lang=EN>, datum pristupa 28.02.2016.
57. <http://www.swims.hku.hk/nonnative%20webpage/galloprovincialis.dwt>, datum pristupa 28.02.2016.

58. ICES (2008): Report of the fourth ICES/OSPAR workshop on integrated monitoring of contaminants and their effects in coastal and open sea areas (WKIMON IV). ICES, Copenhagen, str. 70
59. Jebali J., Banni M., Guerbej H., Almeida E.A., Bannaoui A., Boussetta H. (2006): Effects of malathion and cadmium on acetylcholinesterase activity and metallothionein levels in the fish *Seriola dumerili*. *Fish Physiology and Biochemistry* **32**: 93-98
60. Kaloyianni M., Dailianis S., Chrisikopoulou E., Zannou A., Koutsogiannaki S., Alamdari D.H., Koliakos G., Dimitriadis V.K. (2009): Oxidative effects of inorganic and organic contaminants on haemolymph of mussels. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* **149**: 631-639
61. Khessiba A., Hoarau P., Gnassia-Barelli M., Aissa P., Roméo M. (2001): Biochemical response of the mussel *Mytilus galloprovincialis* from Bizerta (Tunisia) to chemical pollutant exposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **40**: 222-229
62. Kirchin M.A., Moore M.N., Dean R.T., Winston G.W. (1992): The role of oxyradicals in intracellular proteolysis and toxicity in mussels. *Marine Environmental Research* **34**: 315-320
63. Klobučar G.I., Štambuk A., Hylland K., Pavlica M. (2008): Detection of DNA damage in haemocytes of *Mytilus galloprovincialis* in the coastal ecosystems of Kaštela and Trogir bays, Croatia. *Science of the Total Environment* **405**: 330-337
64. Kregel K.C., Zhang H.J. (2007): An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **292**: 18-36
65. Lam P.K.S. (2009): Use of biomarkers in environmental monitoring. *Ocean & Coastal Management* **52**: 348-354
66. Lehtonen K.K., Leiniö S. (2003): Effects of exposure to copper and malathion on metallothionein levels and acetylcholinesterase activity of the mussel *Mytilus edulis* and the clam *Macoma balthica* from the northern Baltic sea. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **71**: 489-496
67. Leuratti C., Singh R., Lagneau C., Farmer P.B., Plastaras J.P., Marnett L.J., Shuker D.E. (1998): Determination of malondialdehyde-induced DNA damage in human tissues using an immunoslot blot assay. *Carcinogenesis* **19**: 1919-1924
68. Levine R.L., Garland D., Oliver C.N., Amici A., Climent I., Lenz A.G., Ahn B.W., Shaltiel S., Stadtman E.R. (1990): Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology* **186**: 464-478
69. Levine R.L., Williams J.A., Stadtman E.R., Shacter E. (1994): Carbonyl assay for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology* **233**: 346-357
70. Lima I., Moreira S.M., Osten J.R., Soares A.M., Guilhermino L. (2007): Biochemical responses of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* to petrochemical environmental contamination along the North-western coast of Portugal. *Chemosphere* **66**: 1230-1242



71. Livingstone D.R., Garcia Martinez P., Michel X., Narbonne J.F., O'Hara S., Ribera D., Winston G.W. (1990): Oxyradical production as a pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel, *Mytilus edulis* L., and other molluscs. *Functional Ecology* **4**: 415-424
72. Livingstone D.R. (1991): Organic xenobiotic metabolism in marine invertebrates. *Advances in Comparative and Environmental Physiology* **7**: 45-185
73. Livingstone D.R., Lips F., Garcia Martinez P., Pipe R.K. (1992): Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology* **112**: 265-276
74. Livingstone D.R. (1998): The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. *Comparative Biochemistry and Physiology* **120**: 43-49
75. Livingstone D.R. (2001): Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin* **42**: 656-666
76. Manduzio H., Monsinjon T., Galap C., Leboulenger F., Rocher B. (2004): Seasonal variations in antioxidant defences in blue mussels *Mytilus edulis* collected from a polluted area: major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/Zn-superoxide dismutase and of glutathione S-transferase. *Aquatic Toxicology* **70**: 83-93
77. Manduzio H., Rocher B., Durand F., Galap C., Leboulenger F. (2005): The point about oxidative stress in molluscs. *Invertebrate Survival Journal* **2**: 91-104
78. Maria V.L., Bebianno M.J. (2011): Antioxidant and lipid peroxidation responses in *Mytilus galloprovincialis* exposed to mixtures of benzo(a)pyrene and copper. *Comparative Biochemistry and Physiology C* **154**: 56-63
79. Marnett L.J. (1999): Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research* **424**: 83-95
80. Matés J.M., Sánchez-Jiménez F.M. (2000): Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **32**: 157-170
81. McCarthy J.F., Shugart L.R. (1990): Biomarkers of environmental contamination. Lewis Publishers, Chelsea
82. McDonagh B., Tyther R., Sheehan D. (2005): Carbonylation and glutathionylation of proteins in the blue mussel *Mytilus edulis* detected by proteomic analysis and Western blotting: Actin as a target for oxidative stress. *Aquatic Toxicology* **73**: 315-326
83. Mendes R., Cardoso C., Pestana C. (2009): Measurement of malondialdehyde in fish: A comparison study between HPLC methods and the traditional spectrophotometric test. *Food Chemistry* **112**: 1038-1045
84. Michel X.R., Suteau P., Robertson L.W., Narbonne J.F. (1993): Effects of benzo(a)pyrene, 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl and 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl on the xenobiotic-metabolizing enzymes in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Aquatic Toxicology* **27**: 335-344
85. Moschino V., Delaney E., Meneghetti F., Ros L.D. (2011): Biomonitoring approach with mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) and clam *Ruditapes philippinarum* (Adams and

- Reeve, 1850) in the Lagoon of Venice. *Environmental Monitoring and Assessment* **177**: 649-663
86. Najimi S., Bouhaimi A., Daubèze M., Zekhnini A., Pellerin J., Narbonne J.F., Moukrim A. (1997): Use of acetylcholinesterase in *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of pollution in Agadir Marine Bay (South of Morocco). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **58**: 901-908
  87. Nath R. (1997): Copper deficiency and heart disease: molecular basis, recent advances and current concepts. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **29**: 1245-1254
  88. Orbea A., Ortiz-Zarragoitia M., Solé M., Porte C., Cajaraville M.P. (2002): Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalve molluscs, crabs and fish from the Urdaibai and Plentzia estuaries (Bay of Biscay). *Aquatic Toxicology* **58**: 75-98
  89. OSPAR (2000): Quality status report: Region IV Bay of Biscay and Iberian coast. OSPAR Commission, London, str. 132
  90. Pampanin D.M., Camus L., Gomiero A., Marangon I., Volpato E., Nasci C. (2005): Susceptibility to oxidative stress of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in the Venice Lagoon (Italy). *Marine Pollution Bulletin* **50**: 1548-1557
  91. Parvez S., Raisuddin S. (2005): Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). *Environmental Toxicology and Pharmacology* **20**: 112-117
  92. Pedrajas J.R., Peinado J., López-Barea J. (1995): Oxidative stress in fish exposed to model xenobiotic: Oxidatively modified forms of Cu,Zn-superoxide dismutase as potential biomarkers. *Chemico-Biological Interactions* **98**: 267-282
  93. Pellerin-Massicotte J. (1997): Influence of elevated temperature and air-exposure on MDA levels and catalase activities in digestive glands of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.). *Journal de Recherche Océanographique* **22**: 91-98
  94. Petrović S., Semenčić L., Ozretić B., Ozretić M. (2004): Seasonal variations of physiological and cellular biomarkers and their use in the biomonitoring of north Adriatic coastal waters (Croatia). *Marine Pollution Bulletin* **49**: 713-720
  95. Phillips D.J.H., Rainbow P.S. (1989): Strategies of trace metal sequestration in aquatic organisms. *Marine Environmental Research* **28**: 207-210
  96. Prevodnik A., Gardeström J., Lilja K., Elfving T., McDonagh B., Petrović N., Tedengren M., Sheehan D., Bollner T. (2007): Oxidative stress in response to xenobiotics in the blue mussel *Mytilus edulis* L.: evidence for variation along a natural salinity gradient of the Baltic Sea. *Aquatic Toxicology* **82**: 63-71
  97. Prohaska J.R. (1980): The glutathione peroxidase activity of glutathione S-transferases. *Biochimica et Biophysica Acta* **611**: 87-98
  98. Ramos-Martinez J.I., Bartolomé T.R., Pernas R.V. (1983): Purification and properties of glutathione reductase from hepatopancreas of *Mytilus edulis* L. *Comparative Biochemistry and Physiology B* **75**: 689-692

99. Rank J., Lehtonen K.K., Strand J., Laursen M. (2007): DNA damage, acetylcholinesterase activity and lysosomal stability in native and transplanted mussels (*Mytilus edulis*) in areas close to coastal chemical dumping sites in Denmark. *Aquatic Toxicology* **84**: 50-61
100. Regoli F., Orlando E. (1994): Seasonal variation of trace metal concentrations in the digestive gland of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*: comparison between a polluted and a non-polluted site. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **27**: 36-43
101. Regoli F., Principato G. (1995): Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquatic Toxicology* **31**: 143-16
102. Regoli F. (1998): Trace metals and antioxidant enzymes in gills and digestive gland of the mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **34**: 48-63
103. Regoli F., Gorbi S., Frenzilli G., Nigro M., Corsi I., Focardi S., Winston G.W. (2002a): Oxidative stress in ecotoxicology: from the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach. *Marine Environmental Research* **54**: 419-423
104. Regoli F., Nigro M., Chiantore M., Winston G.W. (2002b): Seasonal variations of susceptibility to oxidative stress in *Adamussium colbecki*, a key bioindicator species for the Antarctic marine environment. *Science of the Total Environment* **289**: 205-211
105. Rickwood C.J., Galloway T.S. (2004): Acetylcholinesterase inhibition as a biomarker of adverse effect: A study of *Mytilus edulis* exposed to the priority pollutant chlorfenvinphos. *Aquatic Toxicology* **67**: 45-56
106. Roesijadi G., Unger M.E. (1993): Cadmium uptake in gills of the mollusc *Crassostrea virginica* and inhibition by calcium channel blockers. *Aquatic Toxicology* **24**: 195-205
107. Schafer F.Q., Buettner G.R. (2001): Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine* **30**: 1191-1212
108. Shacter E., Williams J.A., Lim M., Levine R.L. (1994): Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: examination by western blot immunoassay. *Free Radical Biology and Medicine* **17**: 429-437
109. Sheehan D., Power A. (1999): Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology C* **123**: 193-199
110. Shulman G.E. i Love R.M. (1999): *The Biochemical Ecology of Marine Fishes, Advances in Marine Biology*. Academic Press, San Diego
111. Siu G.M., Draper H.H. (1982): Metabolism of malonaldehyde in vivo and in vitro. *Lipids* **17**: 349-355

112. Soldatov A.A., Gostiukhina O.L., Golovina I.V. (2007): Antioxidant enzyme complex of tissues of the bivalve *Mytilus galloprovincialis* Lam. under normal and oxidative-stress conditions: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology* **43**: 556-562
113. Stadtman E.R., Oliver C.N. (1991): Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *The Journal of Biological Chemistry* **266**: 2005-2008
114. Stadtman E.R., Levine R.L. (2000): Protein oxidation. *Annals of the New York Academy of Sciences* **899**: 191-208
115. Suzuki K.T., Someya A., Komada Y., Ogra Y. (2002): Roles of metallothionein in copper homeostasis: responses to Cu-deficient diets in mice. *Journal of Inorganic Biochemistry* **88**: 173-182
116. Štambuk A., Šrut M., Šatović Z., Tkalec M., Klobučar G.I.V. (2013): Gene flow vs. pollution pressure: Genetic diversity of *Mytilus galloprovincialis* in eastern Adriatic. *Aquatic Toxicology* **136-137**: 22-31
117. Valbonesi P., Sartor G., Fabbri E. (2003): Characterization of cholinesterase activity in three bivalves inhabiting the North Adriatic sea and their possible use as sentinel organisms for biosurveillance programs. *Science of The Total Environment* **312**: 79-88
118. Van der Oost R., Beyer J., Vermeulen N.P.E. (2003): Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **13**: 57-149
119. Van Gestel C.A., Van Brummelen T.C. (1996): Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology* **5**: 217-225
120. Verlecar X.N., Jena K.B., Chainy G.B.N. (2008): Modulation of antioxidant defences in digestive gland of *Perna viridis* (L.), on mercury exposures. *Chemosphere* **71**: 1977-1985
121. Viarengo A., Canesi L., Pertica M., Poli G., Moore M.N., Orunesu M. (1990): Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lam. *Comparative Biochemistry and Physiology C* **97**: 37-42
122. Viarengo A., Lowe D., Bolognesi C., Fabbri E., Koehler A. (2007): The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **146(3)**: 281-300
123. Vidal-Liñán L., Bellas J., Campillo J.A., Beiras R. (2010): Integrated use of antioxidant enzymes in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, for monitoring pollution in highly productive coastal areas of Galicia (NW Spain). *Chemosphere* **78**: 265-272
124. Vlahogianni T., Dassenakis M., Scoullou M.J., Valavanidis A. (2007): Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. *Marine Pollution Bulletin* **54**: 1361-1371
125. Wang Y., Evans D.D. (1993): Influence of calcium concentrations on cadmium uptake by the freshwater mussel *Elliptio complanata*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **50**: 2591-2596

126. Widdows J. (1978): Combined effects of body size, food concentration and season on the physiology of *Mytilus edulis*. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom **58**: 109-124
127. Winston G.W., Livingstone D.R., (1990): Oxygen reduction metabolism by the digestive gland of the common marine mussel, *Mytilus edulis* L. Journal of Experimental Zoology **255**: 296-308
128. Winston G.W., Di Giulio R.T. (1991): Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. Aquatic Toxicology **19**: 137-161
129. Yin H., Xu L., Porter N.A. (2001): Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. Chemical Reviews **111**: 5944-5972
130. Zoppini A., Pettine M., Totti C., Puddu A., Artegiani A., Pagnotta R. (1995): Nutrients, standing crop and primary production in Western coastal waters of the Adriatic Sea. Estuarine, Coastal and Shelf Science **41**: 493–513

## 7. Prilozi

**Prilog 1** PCA analiza provedena na prikupljenim podacima o biomarkerima za dagnje *M. galloprovincialis* uzorkovane u jesen 2013. godine

**Prilog 2** PCA analiza provedena na prikupljenim podacima o biomarkerima za dagnje *M. galloprovincialis* uzorkovane u jesen 2014. godine

**Prilog 3** PCA analiza provedena na prikupljenim podacima o biomarkerima za populacije dagnji *M. galloprovincialis* izlaganih u mezokozmos eksperimentu

**Prilog 4** PCA analiza provedena na prikupljenim podacima o biomarkerima za kavezno izlagane dagnje *M. galloprovincialis*

**Prilog 5** Koncentracije teških metala i metaloida određene masenom spektrometrijom visoke rezolucije s induktivno spregnutom plazmom u uzorcima tkiva dagnji *M. galloprovincialis* sakupljenih na istraživanim postajama u proljeće 2014. godine

**Prilog 6** Regresijski koeficijenti PLS analize korelacije biomarkera i metala u tkivu dagnji *M. galloprovincialis* uzorkovanih u jesen 2013. godine

**Prilog 7** Regresijski koeficijenti PLS analize korelacije biomarkera i metala u tkivu dagnji *M. galloprovincialis* uzorkovanih u proljeće 2014. godine

**Prilog 8** Regresijski koeficijenti PLS analize korelacije biomarkera i metala u tkivu kavezno izlaganih dagnji *M. galloprovincialis*

**Prilog 1** PCA analiza provedena na prikupljenim podacima o biomarkerima za dagnje *M. galloprovincialis* uzorkovane u jesen 2013. godine

	<b>PC1</b>	<b>PC2</b>	<b>PC3</b>	<b>PC4</b>
<b>Rotacija:</b>				
CAT	0.2694875	-0.8934381	0.3591265	-0.0018728
GR	-0.9078636	-0.1115448	0.4040425	-0.0043003
GST	-0.3209742	-0.4349747	-0.8411621	0.0147568
AChE	0.0088857	-0.0108827	-0.0064862	-0.5548228
Karbonili	0.0000398	-0.0000121	0.0000543	-0.0007489
MDA	-0.0075343	0.0021304	-0.0134936	-0.8318240
<b>Standardna devijacija:</b>				
	255.693449	184.600031	120.638045	8.031880
<b>Udio varijance:</b>				
	0.5728	0.2986	0.1275	0.0005
<b>Ukupni udio:</b>				
	0.5728	0.8714	0.9989	0.9994

**Prilog 2** PCA analiza provedena na prikupljenim podacima o biomarkerima za dagnje *M. galloprovincialis* uzorkovane u proljeće 2014. godine

	<b>PC1</b>	<b>PC2</b>	<b>PC3</b>	<b>PC4</b>
<b>Rotacija:</b>				
CAT	0.7443613	0.480118	0.4640426	-0.0083786
GR	0.6670324	-0.566826	-0.4835034	0.0005441
GST	-0.0308499	-0.6694112	0.7422181	0.006541
AChE	0.005747	0.0082685	-0.0005944	0.9913427
Karbonili	0.0007968	-0.0002783	0.0003434	-0.007862
MDA	0.0029436	0.0039086	-0.0008564	0.1306316
<b>Standardna devijacija:</b>				
	202.726097	136.641948	124.993189	8.982092
<b>Udio varijance:</b>				
	0.5442	0.2472	0.2068	0.0010
<b>Ukupni udio:</b>				
	0.5442	0.7914	0.9982	0.9992

**Prilog 3** PCA analiza provedena na prikupljenim podacima o biomarkerima za populaciju dagnji *M. galloprovincialis* izlaganih u mezokozmos eksperimentu

	PC1	PC2	PC3	PC4
<b>Rotacija:</b>				
CAT	0.2666069	-0.9087416	-0.3210210	-0.0013557
GR	0.7146967	-0.0370577	0.6984272	-0.0054431
GST	0.6465536	0.4154773	-0.6394477	0.0192729
AChE	0.0024078	0.0062927	0.0034049	0.3386913
Karbonili	0.0000186	-0.0014926	-0.0013081	-0.0183518
MDA	0.0095953	0.0123337	-0.0154313	-0.9405043
<b>Standardna devijacija:</b>				
	132.241069	107.783160	103.748152	8.508666
<b>Udio varijance:</b>				
	0.4375	0.2907	0.2693	0.0018
<b>Ukupni udio:</b>				
	0.4375	0.7282	0.9975	0.9993

**Prilog 4** PCA analiza provedena na prikupljenim podacima o biomarkerima za kavezno izlagane dagnje *M. galloprovincialis* unutar transplant eksperimenta

	PC1	PC2	PC3	PC4
<b>Rotacija:</b>				
CAT	0.9106499	0.4032074	-0.0902109	-0.0000587
GR	0.3771160	-0.9002106	-0.2165909	0.0202116
GST	0.1685643	-0.1632138	0.9720792	0.0027714
AChE	0.0078992	-0.0184718	-0.0015687	-0.9989499
Karbonili	0.0004548	-0.0000574	-0.0009954	-0.0309415
MDA	-0.0048552	0.0080409	0.0029854	0.0269349
<b>Standardna devijacija:</b>				
	212.110832	190.713832	121.267297	10.112926
<b>Udio varijance:</b>				
	0.4676	0.3780	0.1528	0.0011
<b>Ukupni udio:</b>				
	0.4676	0.8456	0.9984	0.9995



**Prilog 5** Koncentracije teških metala i metaloida određene masenom spektrometrijom visoke rezolucije s induktivno spregnutom plazmom u uzorcima tkiva dagnji *M. galloprovincialis* sakupljenih na istraživanim postajama u proljeće 2014. godine. Koncentracije su izražene u mg kg<sup>-1</sup>.

	Mljet	Ston	Marina	Zadar Seline	Limski zaljev	Mali Ston	Ičići	Gruž	Split	Adriavi nil	Trogir	Zadar marina	Viktor Lenac	Rijeka	Pula
<b>Pb</b>	0.55	0.65	1.12	0.96	0.74	2.28	1.03	6.04	3.27	2.71	2.10	14.05	11.23	5.10	8.41
<b>Bi</b>	0.01	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.04	0.04	0.02	0.02	0.13	0.03	0.02	0.03
<b>Sn</b>	0.05	0.05	0.08	0.06	0.07	0.21	0.12	0.40	0.18	0.22	0.29	2.39	1.70	0.22	0.45
<b>Cu</b>	5.20	5.41	5.08	5.24	4.76	13.31	5.88	43.99	9.78	7.49	55.82	312.98	46.65	19.28	16.21
<b>Cd</b>	0.71	0.90	0.69	0.87	0.72	1.96	0.96	0.65	0.86	0.94	0.70	0.95	1.29	1.02	0.64
<b>Zn</b>	72.45	70.64	111.84	64.15	107.71	126.20	86.70	172.11	209.25	148.01	102.03	410.94	278.06	152.89	176.89
<b>Ag</b>	0.01	0.03	0.00	0.04	0.03	0.01	0.01	0.04	0.07	0.01	0.11	0.25	0.03	0.23	0.07
<b>Sb</b>	0.03	0.03	0.02	0.02	0.03	0.04	0.03	0.13	0.03	0.02	0.03	0.05	0.07	0.05	0.07
<b>Cr</b>	0.81	6.47	2.26	1.25	1.44	2.77	1.61	2.90	1.70	1.72	1.66	3.13	5.17	1.82	2.48
<b>Ni</b>	2.03	2.00	1.39	1.78	1.49	1.73	1.77	1.97	1.55	1.26	1.53	1.30	2.42	1.52	1.13
<b>Li</b>	1.44	1.52	1.78	1.37	1.52	1.55	1.45	1.53	1.26	1.22	1.40	1.86	1.00	1.28	1.20
<b>Rb</b>	6.02	6.64	6.70	6.74	5.95	5.78	6.08	6.12	5.16	6.25	6.99	5.61	5.96	5.59	5.97
<b>Mo</b>	9.23	3.41	2.42	7.21	0.99	1.78	5.01	1.26	1.52	1.33	1.49	3.11	2.69	1.00	1.25
<b>U</b>	0.17	0.10	0.11	0.14	0.10	0.17	0.13	0.19	0.12	0.10	0.09	0.14	0.14	0.12	0.11
<b>Al</b>	151.49	393.54	453.50	408.44	619.51	293.66	342.27	507.70	168.99	186.53	410.21	328.36	318.05	242.15	184.57
<b>Ti</b>	9.12	21.10	28.66	22.61	32.37	23.39	21.51	36.48	10.71	10.05	23.95	54.16	23.12	16.36	13.08
<b>V</b>	1.83	2.41	2.78	2.54	3.23	1.52	2.42	2.65	1.25	1.39	1.74	1.77	2.12	1.01	18.13
<b>Mn</b>	6.63	11.55	9.05	17.32	9.19	17.13	8.48	8.96	6.64	6.77	8.81	6.33	10.27	6.48	5.15
<b>Fe</b>	143.34	289.71	304.00	284.48	425.26	345.62	274.57	388.78	207.61	179.40	279.98	386.93	661.64	264.07	234.99
<b>Co</b>	0.98	0.59	0.82	0.71	0.75	1.05	1.03	0.75	0.69	0.68	0.64	0.67	1.27	0.52	0.44
<b>Sr</b>	95.56	58.19	80.81	36.07	33.34	65.30	47.68	55.20	55.52	60.74	84.67	80.54	55.98	56.09	65.86
<b>Ba</b>	7.31	2.47	16.39	6.68	3.46	5.06	2.66	18.69	4.54	9.36	6.10	5.36	8.93	1.98	11.16
<b>As</b>	22.19	23.04	29.23	32.39	24.00	23.09	31.70	27.24	27.13	26.33	23.62	24.82	27.50	27.30	23.79
<b>Se</b>	8.87	5.37	5.04	5.30	3.67	5.28	7.28	3.96	4.28	4.91	4.15	3.12	4.83	3.93	3.22

**Prilog 6** Regresijski koeficijenti PLS analize korelacije biomarkera i metala u tkivu dagnji *M. galloprovincialis* uzorkovanih u jesen 2013. godine

	<b>CAT</b>	<b>GR</b>	<b>GST</b>	<b>AChE</b>	<b>Karbonili</b>	<b>MDA</b>
<b>Li</b>	0.111719	-0.308409	-0.123834	0.107873	0.014286	-0.111702
<b>Rb</b>	-0.022175	0.16785	0.090778	-0.01883	-0.019102	0.066289
<b>Mo</b>	0.11875	0.15015	0.188437	0.149249	-0.086456	0.072559
<b>Ag</b>	0.006318	-0.063621	-0.00891	0.031371	-0.025088	-0.032824
<b>Cd</b>	0.07091	-0.294285	-0.165345	0.040863	0.05558	-0.104591
<b>Sn</b>	-0.028251	0.12061	0.096681	0.012119	-0.058005	0.03512
<b>Sb</b>	-0.11837	0.119969	-0.01224	-0.134155	0.034952	0.03696
<b>Pb</b>	-0.070208	0.098936	0.047483	-0.041923	-0.029663	0.023045
<b>Bi</b>	0.030297	-0.068792	0.010495	0.063989	-0.0413	-0.033792
<b>U</b>	0.050234	-0.101278	-0.056185	0.026021	0.029915	-0.028195
<b>Al</b>	-0.053789	0.068792	-0.000331	-0.064198	0.018175	0.023706
<b>Ti</b>	0.005078	-0.054457	-0.015999	0.018454	-0.011319	-0.025883
<b>V</b>	-0.082151	0.081091	0.004689	-0.07883	0.006702	0.020735
<b>Cr</b>	-0.08618	0.018788	-0.044089	-0.092052	0.026818	-0.003496
<b>Mn</b>	0.06774	-0.184116	-0.100175	0.038971	0.04131	-0.059102
<b>Fe</b>	-0.101777	0.164783	0.041204	-0.100578	0.004073	0.053553
<b>Co</b>	0.048426	0.029762	0.034879	0.037985	-0.002848	0.022773
<b>Ni</b>	-0.026362	0.255068	0.131816	-0.031467	-0.018165	0.104701
<b>Cu</b>	0.022584	0.015257	0.063601	0.06358	-0.05875	-0.001664
<b>Zn</b>	-0.029545	-0.00038	0.012562	-0.000257	-0.029045	-0.012846
<b>Sr</b>	0.01791	0.041638	0.052647	0.035232	-0.031244	0.015362
<b>Ba</b>	-0.079585	0.025037	-0.05233	-0.100981	0.043764	0.004484
<b>As</b>	0.11582	-0.308697	-0.137051	0.096795	0.032231	-0.106946
<b>Se</b>	0.118049	0.045017	0.095131	0.118749	-0.036222	0.036601

**Prilog 7** Regresijski koeficijenti PLS analize korelacije biomarkera i metala u tkivu dagnji *M. galloprovincialis* uzorkovanih u proljeće 2014. godine

	<b>CAT</b>	<b>GR</b>	<b>GST</b>	<b>AChE</b>	<b>Karbonili</b>	<b>MDA</b>
<b>Li</b>	-0.105828	-0.07537	0.044959	0.005766	-0.008437	-0.093286
<b>Rb</b>	-0.087193	-0.039864	0.109681	-0.033431	-0.020336	-0.052469
<b>Mo</b>	-0.046904	-0.008696	0.090572	-0.035515	-0.022733	-0.017273
<b>Ag</b>	-0.131772	-0.087562	0.070896	-0.001183	-0.016586	-0.110952
<b>Cd</b>	0.085521	0.062665	-0.025506	-0.009877	0.007837	0.078844
<b>Sn</b>	0.031878	0.013363	0.023808	-0.015057	0.035908	0.038282
<b>Sb</b>	0.00587	0.013162	0.057408	-0.028963	0.007554	0.024225
<b>Pb</b>	0.029541	0.010684	0.008789	-0.007694	0.031143	0.031287
<b>Bi</b>	0.030108	0.00137	-0.019155	0.007213	0.038692	0.022344
<b>U</b>	0.002306	0.024138	0.068797	-0.037148	-0.014879	0.025592
<b>Al</b>	-0.149348	-0.084317	0.158989	-0.039895	-0.015567	-0.100385
<b>Ti</b>	-0.103911	-0.067297	0.116678	-0.027755	0.008373	-0.069001
<b>V</b>	-0.026324	-0.024382	-0.006813	0.010931	0.00146	-0.029262
<b>Cr</b>	0.100488	0.059882	-0.010685	-0.01577	0.043736	0.096886
<b>Mn</b>	-0.031328	0.002334	0.107918	-0.046711	-0.011574	0.003663
<b>Fe</b>	-0.026814	-0.005619	0.115395	-0.047628	0.014265	0.009201
<b>Co</b>	0.060629	0.0566	0.028571	-0.030884	0.001039	0.071321
<b>Ni</b>	0.024322	0.045546	0.102532	-0.058728	-0.006609	0.058619
<b>Cu</b>	-0.021998	-0.024174	0.033754	-0.006776	0.024708	-0.013011
<b>Zn</b>	0.073904	0.029093	-0.048237	0.010412	0.04462	0.057402
<b>Sr</b>	0.005229	-0.000616	-0.046121	0.020025	-0.009122	-0.009098
<b>Ba</b>	0.048198	0.02896	-0.029551	0.002931	0.010531	0.039145
<b>As</b>	-0.065293	-0.035191	0.061255	-0.014379	-0.013416	-0.046181
<b>Se</b>	0.022519	0.032829	0.007343	-0.013645	-0.023827	0.026847

**Prilog 8** Regresijski koeficijenti PLS analize korelacije biomarkera i metala u tkivu kavezno izlaganijh dagnji *M. galloprovincialis* unutar transplant eksperimenta

	<b>CAT</b>	<b>GR</b>	<b>GST</b>	<b>AChE</b>	<b>Karbonili</b>	<b>MDA</b>
<b>Li</b>	-0.029702	0.056806	0.006673	-0.016324	-0.060338	-0.044251
<b>Rb</b>	-0.074687	0.008476	-0.038551	0.060908	0.039323	0.005983
<b>Mo</b>	-0.060604	0.062645	-0.002142	0.136499	0.06942	-0.01389
<b>Ag</b>	0.037283	0.071941	0.05787	0.063857	0.009333	-0.034297
<b>Cd</b>	-0.041097	0.067971	0.009863	0.090373	0.026315	-0.027697
<b>Sn</b>	0.034855	0.071342	0.055501	0.050665	-0.002441	-0.037001
<b>Sb</b>	-0.003593	0.033769	0.011819	-0.023738	-0.046765	-0.029138
<b>Pb</b>	0.061594	0.061046	0.067036	0.049541	0.007503	-0.029298
<b>Bi</b>	0.021734	0.079818	0.051344	0.050596	-0.010402	-0.043312
<b>U</b>	-0.053729	0.076215	0.003361	0.037125	-0.02942	-0.046129
<b>Al</b>	-0.071172	-0.039449	-0.066371	-0.11673	-0.085276	-0.001577
<b>Ti</b>	-0.021376	0.058157	0.012322	-0.016341	-0.060299	-0.044952
<b>V</b>	0.10107	-0.04596	0.0413	0.013579	0.058864	0.038149
<b>Cr</b>	-0.015267	0.023224	0.001053	-0.002106	-0.020938	-0.017126
<b>Mn</b>	-0.091645	0.023031	-0.042059	0.066076	0.031126	-0.003467
<b>Fe</b>	-0.033539	-0.008283	-0.029256	-0.109433	-0.09691	-0.020514
<b>Co</b>	-0.088401	0.015286	-0.049178	-0.051556	-0.068947	-0.025173
<b>Ni</b>	-0.10939	0.027658	-0.05432	-0.008944	-0.042243	-0.024561
<b>Cu</b>	0.021041	0.075255	0.048775	0.048388	-0.009121	-0.040661
<b>Zn</b>	0.046147	0.060743	0.056616	0.03017	-0.011707	-0.034019
<b>Sr</b>	0.054015	0.061968	0.06303	0.053164	0.009139	-0.029326
<b>Ba</b>	-0.003839	0.027783	0.010179	0.001218	-0.019856	-0.019201
<b>As</b>	-0.068854	0.055173	-0.012109	0.10255	0.04324	-0.016773
<b>Se</b>	-0.08971	0.018766	-0.043383	0.053813	0.023442	-0.003272

## 8. Životopis

### Iva Sabolić

- Datum i mjesto rođenja: 15.11.1990., Koprivnica, Republika Hrvatska
- Adresa prebivališta: Tome Čikovića 42, 48000 Koprivnica
- Email: iva.sabolic@gmail.com
- Broj mobitela: +385989416124

### *Završeno obrazovanje:*

- Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, smjer Znanosti o okolišu (sveučilišna prvostupnica struke Znanosti o okolišu)
- Gimnazija "Fran Galović", Koprivnica, smjer opća gimnazija
- Osnovna škola "Braća Radić", Koprivnica

### *Kongresna priopćenja:*

- Sabolić I., Dorić V., Dobrović A., Orlović A., Crnčan P., Rezo M. (2015): Istraživanje rijetkih i ugroženih svojti malakofaune Istre, 12. Hrvatski biološki kongres, Sveti Martin na Muri, Hrvatska

### *Nagrade i priznanja:*

- Dobitnica posebne Rektorove nagrade za projekt "Noć biologije 2012/13." i "Istraživačko-edukacijski projekt "Grabovača 2014." 2014/15."

### *Udruge:*

- Članica Udruge studenata biologije "BIUS", voditeljica Sekcije za mekušce i Biotop kolektiva

### *Dodatne aktivnosti:*

- Položen C2 stupanj engleskog jezika (Cambridge English Proficiency (CPE))
- Položen tečaj za ronioca s 1 zvijezdicom (CMAS) u RC Draulik, Milna, otok Brač