

# Utjecaj okolišnih čimbenika na mehanizam multiksenobiotičke otpornosti gujavice *Eisenia fetida*, Savigny

---

Babić, Sanja

Master's thesis / Diplomski rad

2013

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:217:333751>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-12**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Sanja Babić

**Utjecaj okolišnih čimbenika na mehanizam multiksenobiotičke  
otpornosti gujavice *Eisenia fetida*, Savigny**

Diplomski rad

Zagreb, 2013.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za ihtiopatologiju - kemiju materijala Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Roberte Sauerborn Klobučar. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra struke znanosti o okolišu.

## ZAHVALE

*Practice does not make perfect. Perfect practice makes perfect.*

*-Vince Lombardi Jr.*

Najljepša hvala mojoj mentorici dr. sc. Roberti Sauerborn Klobučar na bezuvjetnom povjerenju, pruženoj pomoći i izrazitoj stručnosti. Hvala na podršci kada je bila najpotrebnija, optimizmu kada je bilo najteže te poticaju da idem dalje i postignem još više.

Hvala dr. sc. Ivani Bošnjak i dr. sc. Ani Bielen što su bile najbolji mogući učitelji koje su svojim brojnim i neiscrpnim savjetima olakšale izradu ovog diplomskog rada. Hvala na svim sastancima, velikom strpljenju i neizmjerljivoj pomoći. Hvala Vam što ste prije svega bile dobri i nesebični prijatelji.

Hvala dr. sc. Mirjani Pavlici na profesionalnosti i suvoditeljstvu ovog diplomskog rada.

Veliko hvala svim članovima Laboratorija za ihtopatologiju-kemiju materijala (pod voditeljstvom dr. sc. Rozelindre Čož-Rakovac) na srdačnosti i gostoprimstvu. Izrazita mi je čast što sam imala mogućnost raditi u Vašem laboratoriju i steći brojna znanja i iskustva, za koja sam sigurna da će mi mnogo pomoći u mom daljnjem napredovanju.

Posebno hvala mojim roditeljima na bezuvjetnoj podršci i potpori koju su mi pružali tijekom cijelog školovanja.

Hvala svim prijateljima, kolegama i kolegicama koji su posredno ili neposredno pomogli u ostvarivanju ovog rada.

*Hvala Vam!*

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

**UTJECAJ OKOLIŠNIH ČIMBENIKA NA MEHANIZAM MULTIKSENOBIOTIČKE  
OTPORNOSTI GUJAVICE *Eisenia fetida*, SAVIGNY**

Sanja Babić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb

Mehanizam multiksenobiotičke otpornosti (MXR) dio je staničnog detoksifikacijskog mehanizma posredovan aktivnošću ABC transportnih proteina. Glavni predstavnici MXR mehanizma su P-glikoprotein (P-gp; ABCB1), *multidrug resistance associated proteins* (MRP1-5; ABCC1-5) i *breast cancer resistance* (BCRP; ABCG2) protein. Navedeni transmembranski prijenosnici prisutni su u svim organizmima i predstavljaju prvu liniju obrane organizma. Uz pomoć ATP-a izbacuju iz stanice endogene spojeve, ksenobiotike, uključujući antropogeno stvorene spojeve, spriječavajući na taj način potencijalno toksičan učinak u stanici (organizmu). Bisfenol A, zbog sve šire upotrebe u industriji polikarbonatne plastike postao je sveprisutno okolišno zagađivalo. U ovom radu po prvi puta je identificirana prisutnost MXR mehanizma i identificiran nukleotidni slijed gena koji kodira za P-glikoprotein u gujavici vrste *E. fetida*. Uz to, u navedenom modelnom organizmu istraživana je utjecaj bisfenola A i onečišćenih uzoraka snijega na MXR mehanizam.

(65 stranica, 26 slika, 13 tablica, 62 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

**Ključne riječi:** ABC transportni proteini, P-glikoprotein (P-gp), bisfenol A

**Voditelj:** dr. sc. Roberta Sauerborn Klobučar, Institut Ruđer Bošković, Zagreb

**Suvoditelj:** dr. sc. Mirjana Pavlica, prof., Prirodoslovno-matematički fakultet,  
Zagreb

**Ocjenitelji:** dr. sc. Jasenka Sremac, prof., Prirodoslovno-matematički fakultet  
dr. sc. Danijel Orešić, prof., Prirodoslovno-matematički fakultet

Rad je prihvaćen: 21.06.2013.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Graduation Thesis

**INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL FACTORS ON MULTIXENOBIOTIC  
RESISTANCE MECHANISM IN EARTHWORM *Eisenia fetida*, SAVIGNY**

Sanja Babić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Multixenobiotic resistance mechanism (MXR) is cellular detoxification mechanism mediated by the activity of ATP-binding cassette (ABC) transporters. The main representatives of MXR mechanism are P-glycoprotein (P-gp; ABCB1), multidrug resistance associated proteins (MRP; ABCC1-5) and breast cancer resistance (BCRP; ABCG2) protein. These transmembrane efflux proteins are present in all organisms and represent a first line defence mechanism, by extrusion endogenous chemicals, xenobiotics, including man-made chemicals out of the cell (organism), thus preventing toxic effect. Bisphenol A is one of the highest volume chemicals produced worldwide because of their use in the manufacture of polycarbonate plastic. In this study was for the first time identified presence of MXR efflux activity, determined the partial sequence of P-gp/ABCB1 and defined impact of bisphenol A and polluted snow samples on detoxification mechanisms in earthworm *Eisenia fetida*.

(65 pages, 26 figures, 13 tables, 62 references, original in Croatian language)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

**Key words:** ABC transport proteins, P-glycoprotein (P-gp), bisphenol A

**Supervisors:** Roberta Sauerborn Klobučar, PhD, Ruđer Bošković Institute, Zagreb

**Cosupervisor:** Mirjana Pavlica, PhD, Professor, Faculty of Science, Zagreb

**Reviewers:** Jasenka Sremac, PhD, Professor, Faculty of Science, Zagreb

Danijel Orešić, prof., PhD, Professor, Faculty of Science, Zagreb

Thesis accepted: 21.06.2013.

---

<b>ABC</b>	ATP-vezna domena (eng. <i>ATP-binding cassette</i> )
<b>ATP</b>	adenozin trifosfat (eng. <i>adenosine triphosphate</i> )
<b>BCRP</b>	(eng. <i>breast cancer resistance protein</i> )
<b>BPA</b>	bisfenol A (eng. <i>bisphenol A</i> )
<b>CA</b>	ciklosporin A
<b>cDNA</b>	komplementarna DNA (eng. <i>complementary DNA</i> )
<b>dNTP</b>	deoksiribonukleozid-trifosfat
<b>ddNTP</b>	dideoksiribonukleozid-trifosfat
<b>F</b>	uzvodni (eng. <i>forward</i> )
<b>MCS</b>	višestruko mjesto za kloniranje (eng. <i>multiple cloning site</i> )
<b>MDR mehanizam</b>	mehanizam otpornosti na različite lijekove (eng. <i>multidrug resistance mechanism</i> )
<b>MRP</b>	(eng. <i>multidrug resistance-associated protein</i> )
<b>MXR mehanizam</b>	mehanizam multiksenobiotičke otpornosti (eng. <i>multixenobiotic resistance mechanism</i> )
<b>NBD</b>	nukleotidno-vezna domena (eng. <i>nucleotide binding domain</i> )
<b>NOAEL</b>	eng. <i>no observed adverse effect level</i>
<b>OV</b>	natrijev ortovanadat
<b>P-gp</b>	P-glikoprotein (eng. <i>P-glycoprotein</i> )
<b>PCR</b>	lančana reakcija polimerazom (eng. <i>polymerase chain reaction</i> )
<b>PROB</b>	probenecid
<b>R</b>	nizvodni (eng. <i>reverse</i> )
<b>RB</b>	rodamin B
<b>R123</b>	rodamin 123
<b>RNA</b>	ribonukleinska kiselina (eng. <i>ribonucleic acid</i> )
<b>TDI</b>	(eng. <i>tolerable daily intake</i> )
<b>TM domena</b>	transmembranska domena (eng. <i>transmembrane domain</i> )
<b>VER</b>	verapamil

---

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>3</b>
<b>3. LITERATURNI PREGLED .....</b>	<b>4</b>
3.1. Mehanizam multiksenobiotičke otpornosti (MXR) .....	4
3.1.1. ABC transportni proteini .....	5
3.1.1.1. Građa ABC proteina.....	8
3.1.1.2. Mehanizam transporta ABC proteinima .....	9
3.1.1.2.1. Kemosenzitizatori.....	10
3.1.1.3. P-glikoprotein (P-gp; ABCB1) .....	12
3.1.1.4. MRP (eng. <i>multidrug resistance-associated protein</i> ; ABCC).....	15
3.2. Funkcionalni ekotoksikološki test za MXR .....	16
3.3. Biologija gujavica vrste <i>Eisenia fetida</i> .....	19
3.3.1. Filogenija .....	19
3.3.2. Morfologija i opis vrste.....	19
3.3.3. Životni ciklus.....	20
3.3.4. Gujavica <i>E. fetida</i> kao model u ekotoksikološkim istraživanjima .....	21
3.4. Okolišna zagađivala.....	22
3.4.1. Bisfenol A (BPA).....	22
3.4.2. Uzorkovanje snijega kao metoda praćenja okolišnih zagađivala .....	26
<b>4. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>27</b>
4.1. Materijali .....	27
4.1.1. Održavanje eksperimentalnih životinja u laboratoriju .....	27
4.1.2. Kemikalije .....	28
4.1.3. Molekularni biljeg.....	32
4.1.4. Plazmidi.....	32
4.1.5. Bakterijski sojevi.....	32
4.2. Metode.....	33
4.2.1. Utvrđivanje aktivnosti MXR mehanizma .....	33
4.2.1.1. Test kontakta na filter papiru (eng. <i>filter paper contact test</i> ) .....	33
4.2.1.2. Utvrđivanje utjecaja snijega na MXR aktivnost .....	35
4.2.1.3. Mjerenje fluorescencije rodamina .....	35



---

4.2.2. Utvrđivanje djelomičnog nukleotidnog slijeda gena koji kodira za P-glikoprotein .....	36
4.2.2.1. Konstrukcija početnica .....	36
4.2.2.2. Pročišćavanje i analiza ukupne RNA .....	37
4.2.2.3. Reverzna transkripcija .....	37
4.2.2.4. Lančana reakcija polimerazom (eng. Polymerase Chain Reaction; PCR) .....	38
4.2.2.5. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu .....	39
4.2.2.6. Izdvajanje DNA iz agaroznog gela i pročišćavanje .....	39
4.2.2.7. Kloniranje odsječka DNA .....	39
4.2.2.7.1. Spajanje (ligacija) plazmida i inserta .....	40
4.2.2.7.2. Transformacija stanica <i>E.coli</i> .....	40
4.2.2.7.3. Odabir pozitivnih bakterijskih kolonija .....	41
4.2.2.8. Određivanje primarne strukture DNA (sekvenciranje) .....	42
<b>5. REZULTATI .....</b>	<b>43</b>
5.1. Utvrđivanje funkcionalne aktivnosti MXR mehanizma kod gujavice vrste <i>E. fetida</i> .....	43
5.1.1. Akumulacija fluorescentnih supstrata u tkivu gujavice <i>E. fetida</i> u prisutnosti inhibitora MXR mehanizma .....	43
5.1.2. Akumulacija rodamina 123 u tkivu gujavice <i>E. fetida</i> u prisutnosti bisfenola A .....	45
5.1.3. Akumulacija rodamina 123 u tkivu gujavice <i>E. fetida</i> u prisutnosti čistog i onečišćenog snijega .....	46
5.2. Utvrđivanje djelomičnog nukleotidnog slijeda gena koji kodira za P-gp gujavice <i>E. fetida</i> .....	47
5.3. Filogenetička analiza .....	51
<b>6. RASPRAVA .....</b>	<b>54</b>
<b>7. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>58</b>
<b>8. LITERATURA .....</b>	<b>59</b>

## 1. UVOD

Svi živi organizmi u današnje vrijeme neprestano su izloženi djelovanju različitih endogenih spojeva, ksenobiotika, uključujući antropogeno stvorene spojeve. Kako bi se obranili od potencijalno toksičnih spojeva i preživjeli, organizmi su tijekom evolucije razvili niz staničnih visoko specijaliziranih procesa obrane. Jedan od takvih učinkovitih obrambenih mehanizama je i mehanizam multiksenobiotičke otpornosti (MXR). Ksenobiotici koji izravno utječu na MXR mehanizam imaju dvojako djelovanje: a) kao supstrati povećavaju aktivnost transmembranskih proteina te bivaju izneseni iz stanice; b) kao inhibitori MXR mehanizma onemogućuju transportnu aktivnost, što dovodi do akumulacije ksenobiotika unutar stanice (Kurelec 1997; Epel i sur. 2008). Transmembranski proteini koji sudjeluju u izbacivanju ksenobiotika iz stanice pripadnici su ABC nadporodice, jedne od najvećih dosad poznatih nadporodica koja ujedinjuje više od 2000 različitih proteina. Glavni predstavnici ABC transportnih proteina uključenih u MXR mehanizam su: P-glikoproteini (P-gp, pripada ABCB podporodici); MRP (eng. *multidrug resistance-associated proteini*, pripadaju ABCC podporodici) i BCRP (eng. *breast cancer resistance protein*, pripada ABCG podporodici) proteini (Cole i Deeley 1998; Ambudakar i sur. 1999; Mao i Unadkat 2005). Zahvaljujući nespecifičnosti za supstrat, navedeni proteini uz pomoć ATP-a izbacuju širok spektar različitih spojeva predstavljajući prvu liniju obrane organizama od ksenobiotika. Dosadašnja istraživanja MXR-a kod vodenih i kopnenih organizama upućuju na inducibilnost samog mehanizma, odnosno na proporcionalnost inhibicije MXR-a s koncentracijom ksenobiotika u okolišu. Ta saznanja pružaju veliki potencijal u ekotoksikološkim istraživanjima (Kurelec 1997, Sauerborn Klobučar i sur. 2010).

Najveći broj istraživanja ABC transportnih proteina kod ljudi baziran je na istraživanju mehanizma istovremene otpornosti na različite lijekove (eng. *multidrug resistance*, MDR) S obzirom na nemogućnost djelovanja citostatika na tumorske stanice, današnja molekularna istraživanja nastoje inhibirati MDR mehanizam kako bi se omogućilo efikasno djelovanje protutumorskih lijekova (Litman i sur. 2001).

Značaj gujavica je u prošlosti neopravdano podcjenjivan zapostavljajući njihovu važnost u održavanju kvalitete tla, uklanjanju i biotransformaciji teških metala i mnogih drugih spojeva iz tla, uništavanju patogena. U današnje vrijeme, upravo

zbog neposredne izloženosti raznim spojevima u tlu, mogućnosti njihove akumulacije i biotolerancije, gujavice su vrlo čest modelni organizam u (eko)toksikološkim istraživanjima. Jedna od povoljnih karakteristika je mogućnost istovremene apsorpcije kroz polupropusnu kutikulu i probavni sustav (Phipps i sur. 1993; Sinha i sur. 2010). Vrsta *Eisenia fetida* odlikuje se visokom reproduktivnom stopom, kratkim životnim ciklusom te povoljnim uvjetima održavanja i rukovanja unutar laboratorija. Navedeni razlozi čine gujavicu vrste *E. fetida* izuzetno povoljnim organizmom pomoću kojeg laboratorijska istraživanja vrlo uspješno koreliraju sa stvarnim stanjem u okolišu, zbog čega se navedena vrsta OECD protokolom (1984) preporuča kao jedan od najboljih modelnih organizama za toksikološka ispitivanja tla.

Bisfenol A (BPA) građevni je materijal polikarbonatne plastike, koji osigurava povoljna svojstva plastične ambalaže - čvrstoću i fleksibilnost. Sve širi raspon upotrebe i sve veća potražnja svrstala je BPA među spojeve s najvećom godišnjom proizvodnjom. Istovremeno, zbog kontinuiranog otpuštanja u okoliš, BPA je postao sveprisutno okolišno zagađivalo i globalni problem. Od 30-tih godina prošlog stoljeća zna se kako posjeduje estrogena svojstva te da oponašajući hormone negativno utječe na zdravlje ljudi (Flint i sur. 2012; Paloma i sur. 2012). S obzirom na nemogućnost zaustavljanja njegove proizvodnje potrebna su brojna istraživanja BPA s različitih aspekata, kako bi se uspjele uspostaviti sigurne doze s ciljem minimalizacije štetnih i toksičnih svojstava.

Porastom urbanizacije, razvojem industrije i prometa povećao se prijenos štetnih tvari kroz atmosferu. Zagađenje atmosfere ozbiljan je problem, no ne samo nekog određenog područja nego i udaljenih područja u koje štetni spojevi dolaze strujanjem zraka i bivaju istaloženi u okolišu. Snijeg s obzirom na povoljne karakteristike poput velike dodirne površine i usporenog pada, ima mogućnost akumulacije brojnih atmosferskih zagađivača. S obzirom da istaložen snijeg predstavlja gradijent koncentracije svih spojeva kroz atmosferu, uzorkovanje snijega ide ka tome da postane jedna od vodećih metoda praćenja okolišnih zagađivala (Glenn i Sansalone 2002; Engelhard i sur. 2007).

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

- **Utvrđivanje funkcionalne aktivnosti ABC transportnih proteina kod gujavice vrste *Eisenia fetida* nakon izlaganja različitim modelnim inhibitorima MXR mehanizma, ali i okolišnim spojevima - bisfenolu A i onečišćenom snijegu.**

Upotrebom modelnih organizama gujavica *E. fetida*, koje se često koriste u procjeni ekološkog rizika, pratili smo akumulaciju fluorescentnog supstrata nakon izlaganja gujavica modelnim MXR inhibitorima - verapamilu (VER), ciklosporinu A (CA), MK571, probenecidu (PROB) i natrijevom ortovanadatu (OV) kako bismo po prvi puta utvrdili postojanje ovog obrambenog sustava u tkivu gujavice *E. fetida*. Uz to, razmotrili smo razliku između dva fluorescentna supstrata - rodamina B (RB) i rodamina 123 (R123).

- **Utvrđivanje utjecaja bisfenola A i onečišćenog snijega na MXR mehanizam**

U posljednje desetljeće provedena su mnoga ekotoksikološka istraživanja na gujavicama, no pretežno su bila fokusirana na utjecaj teških metala, nanočestica, polikloriranih bisfenola (PCB), organofosfata, karbamata i organoklorida (Markman i sur. 2007; Zhang Y. i sur. 2009; Hu C.W. i sur. 2010; Wang i sur. 2012a, 2012b). Upravo iz tog razloga cilj ovog dijela istraživanja bio je po prvi puta ispitati učinkovitost MXR mehanizma u obrani od sveprisutnog zagađivala - bisfenola A. Također, ispitali smo djeluje li onečišćeni snijeg na aktivnost MXR mehanizma.

- **Utvrđivanje djelomičnog nukleotidnog slijeda gena koji kodira za P-gp gujavice *E. fetida***

Utvrđivanje prisutnosti gena kodirajućih za proteine ABCB podporodice u gujavici *E. fetida* provedeno je uz pomoć konstrukcije početnica (engl. *primer*) za umnožavanje gena za P-gp na temelju poznatih aminokiselinskih/nukleotidnih sljedova iz drugih organizama. Iz homogeniziranog tkiva gujavica pročišćena je ukupna RNA i prevedena u cDNA, koja je poslužila kao kalup za umnožavanje fragmenta gena za P-gp lančanom reakcijom polimerazom. Dobiveni fragmenti su sekvencirani te im se utvrdio nukleotidni slijed. Djelomični sljedovi uspoređeni su s poznatim nukleotidnim i aminokiselinskim sljedovima drugih organizama, a na temelju dobivenih rezultata načinjena je filogenetska analiza.

### 3. LITERATURNI PREGLED

#### 3.1. Mehanizam multiksenobiotičke otpornosti (MXR)

Mehanizam multiksenobiotičke otpornosti (eng. *multixenobiotic resistance*; MXR) po prvi puta kao pojam uvodi i opisuje akademik Branko Kurelec na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu 1992. godine. MXR mehanizam štiti stanice od širokog spektra endogenih toksičnih spojeva, ksenobiotika, uključujući i one antropogenog porijekla, zbog čega predstavlja prvu liniju obrane organizma od štetnih okolišnih čimbenika (Kurelec 1997, Sauerborn Klobučar i sur. 2010). Akademik Kurelec (1992) navedeni fenotip otkrio je na vodnim organizmima te su uslijedila brojna istraživanja sposobnosti preživljavanja vodenih organizama uslijed izloženosti zagađenim vodama. Na njegov rad nastavili su se brojni znanstvenici koji su do danas potvrdili postojanje P-gp proteina, jednog od glavnih proteina uključenih u MXR, u više od 40 vodenih organizama (Kurelec 1992; Bard 2000; Sauerborn Klobučar i sur. 2010; Bošnjak 2010). Kao primjere se može navesti nekoliko organizmama pripadnika koljena mekušaca (*Anodonta cygnea*, *Corbicula fluminea*, *Crassostrea gigas*, *Mytilus galloprovincialis*), spužvi (*Tethya lyncurium*, *Suberites domuncula*, *Geodia cydonium*, *Verongia aerophoba*, *Dreissena polymorpha*), bodljikaša (*Paracentrotus lividus*, *Arbacia lixula*) i svitkovaca (*Mullus barbatus*, Cyprinidae) (Kurelec i sur. 1997; Sauerborn i sur. 2004; Sauerborn Klobučar i sur. 2010; Bošnjak I. 2010).

MXR mehanizam posredovan je istim tipom membranskih transportnih proteina i djeluje po istom principu kao i mehanizam istovremene otpornosti na različite lijekove (eng. *multidrug resistance*, MDR) koji je eksprimiran u tumorskim stanicama sisavaca. Jedan od prvih znanstvenika koji je postavio koncept MDR mehanizma bio je Keld Danø koji je početkom 70-tih godina 20. stoljeća primijetio kako mišje tumorske stanice (*Ehrlich ascites* tumorske stanice) aktivno izbacuju antraciklin i vinka-alkaloide (Litman i sur. 2001). Osnovu oba mehanizma predstavljaju određeni predstavnici ABC transportnih proteina koji aktivno izbacuju različite spojeve iz stanice (Litman i sur. 2001; Bard i sur. 2000).

### 3.1.1. ABC transportni proteini

ABC transportni proteini (eng. *ATP-binding cassette*) jedna su od najvećih dosad poznatih transmembranskih proteinskih porodica. Prvi puta identificirani su 1982. godine proučavanjem unosa tvari u stanice bakterije *Salmonella typhimurium*. Njihovo postojanje do danas je utvrđeno u sva tri kraljevstva, od bakterija pa sve do čovjeka (Higgins 1992; Dean i sur. 2001).

Ovisno o funkciji koju obavljaju, ABC transportni proteini razvrstani su u tri skupine: proteine za izbacivanje tvari – eksportere (eng. *efflux*), proteine za unos tvari – importere i proteine uključene u stanične procese. Eksporteri izbacuju štetne sekrecijske tvari i toksine iz stanice smanjujući tako njihovu koncentraciju u citosolu. Supstrat može biti prenesen iz citosola u stanični organel ili može biti iznesen iz stanice kroz plazmatsku membranu (Dassa i Bouige 2001; Tarling i sur. 2013). Importeri obuhvaćaju najveći broj ABC transportnih proteina te ih nalazimo većinom kod prokariota. Glavna uloga im je unos nutrijenata iz okoliša (peptida, iona, šećera) u prokariotsku stanicu, čak i ukoliko su nutrijenti prisutni u mikromolarnim ( $\mu\text{g/L}$ ) koncentracijama. Treća skupina obuhvaća proteine koji ne sudjeluju u transportu, već su uključeni u popravak DNA, translaciju ili regulaciju genske ekspresije (Dassa i Bouige 2001; Litman i sur. 2001; Tarling i sur. 2013).

Osim svoje uloge u MDR i MXR mehanizmu, ABC transportni proteini kod višestaničnih organizama vrše različite fiziološke uloge utječući na sintezu lipida, žučne kiseline, homeostazu željeza i signalnih molekula. ABC proteini kod eukariota su smješteni u plazmatskim membranama te na membranama intracelularnih organela kao što su Golgijevo tijelo, endosomi, endoplazmatski retikulum, peroksisom i mitohondrij. Presudnu ulogu imaju i u održavanju stanične homeostaze, o čemu najbolje svjedoči činjenica da je gotovo trećina defektnih humanih ABC gena povezana s fenotipskim bolestima (Fukuda i Schuetz 2012). S obzirom na brojna istraživanja MDR mehanizma, ABC transportni proteini najbolje su istraženi kod čovjeka te je do danas opisano 49 humanih ABC gena (od kojih je 14 povezano s nastankom određenih bolesti). Mutacije unutar kodirajućih regija gena odgovorne su za pojavu bolesti, od kojih su neke prikazane u Tablici 1.

**Tablica 1.** Prikaz pojedinih fenotipskih bolesti čovjeka uzrokovanih nefunkcionalnošću ABC transportnih proteina (Podaci preuzeti iz: Dean i sur. 2001; Litman i sur. 2001; Kaminski i sur. 2006).

Tip transportera	Naziv bolesti uzrokovane mutacijom transportnog proteina	Opis bolesti
ABCA1	Tangijska bolest	Poremećaj metabolizma lipida.
ABCA3	Respiratorni distress sindrom (RDS)	Primarno oboljenje pluća novorođenčeta kao posljedica nedostatka surfaktanta.
ABCA4	Stargardtova bolest	Degeneracija središnjeg dijela mrežnice (makule), što rezultira gubitkom vida u središtu vidnog polja.
ABCA12	Harlequin ihtioza (Ichthyosis congenita, Harlequin fetus type)	Bolest kože koja se manifestira nagomilavanjem rožnatih naslaga (keratodermija). U pojedinim slučajevima može imati smrtni ishod.
ABCB11, ABCB4	Intrahepatička kolestaza	Poremećaj izlučivanja soli žučanih kiselina te povećanje njihove koncentracije u krvi tijekom trudnoće. Može rezultirati spontanom pobačajem, ranijim porođajem ili smrću djeteta.
ABCC2	Dubin-Johnsonov sindrom	Poremećaj metabolizma bilirubina.
ABCC6	Pseudoxanthoma elasticum	Bolest koja uzrokuje fragmentaciju i mineralizaciju elastičnih vlakana u pojedinim tkivima.
ABCC7	Cistična fibroza	Promjena u radu žlijezdi s vanjskim izlučivanjem, zbog čega dolazi do oštećenja mnogih organa (najviše dišnog, probavnog i reproduktivnog).
ABCD1	Adrenoleukodistrofija (ALD)	Nedostatak mijelina u vlaknu živčane stanice, zbog čega dolazi do odumiranja funkcija organa i paralize.
ABCG5, ABCG8	$\beta$ -sitosterolemia	Poremećaj metabolizma lipida.

Glavni predstavnici ABC transportnih proteina uključenih u MXR mehanizam (Tablica 2) su: P-glikoproteini (P-gp, pripada ABCB podporodici); MRP (eng. *multidrug resistance-associated proteini*, pripadaju ABCC podporodici) i BCRP (eng. *breast cancer resistance protein*, pripada ABCG podporodici) (Cole i Deeley 1998; Ambudakar i sur. 1999; Mao i Unadkat 2005).

Porodica ABC proteina podijeljena je u 7 podporodica (ABCA-ABCG) s obzirom na strukturu gena, aminokiselinske sljedove, organizaciju domena i filogenetske odnose. Nakon navoda porodice i podporodice dopisuje se broj člana određene podporodice, npr. ABCB1 (Dean i Annilo, 2005; Fukuda i Schuetz 2012; [www.genenames.org](http://www.genenames.org)).

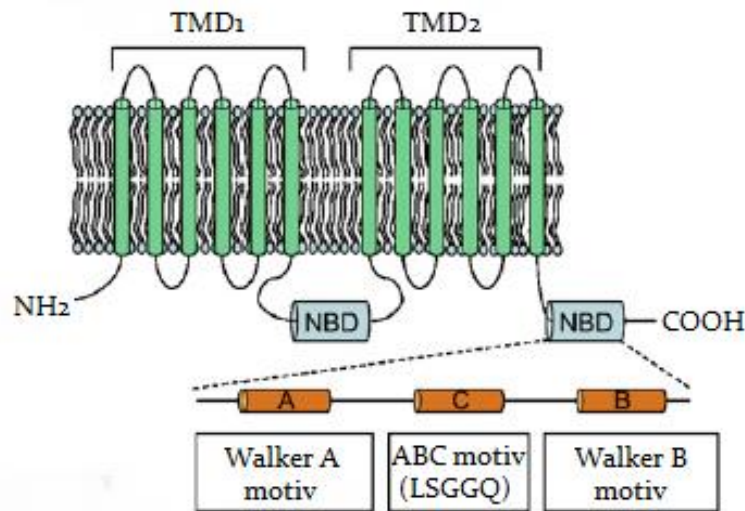
**Tablica 2.** Prisutnost glavnih predstavnika MXR mehanizma u vodenim organizmima te tkivna lokalizacija ABC transportnih proteina kod čovjeka.

Predstavnici MXR mehanizma; podporodica	Organizmi u kojima su nađeni	Tkivna lokalizacija eksportera kod čovjeka	Izvor
P-glikoprotein (P-gp); ABCB1	<i>Stronglylocentrotrus purpuratus</i> ; <i>Mytilus galloprovincialis</i> ; <i>Dreissena polymorpha</i> ; <i>Fundulus heteroclitus</i> ; <i>Crassostrea virginica</i>	Crijevo, jetra, bubrezi, placenta, krvno-moždana barijera	Gottesman i sur. 2002; Keppler i Ringwood 2001; Bard i sur. 2002; Smital i sur. 2003; Bošnjak 2010
<i>Multidrug resistance-associated protein</i> (MRP); ABCC	<i>Mullus barbatus</i> ; <i>Stronglylocentrotrus purpuratus</i> ; <i>Poeciliopsis lucida</i>	Jetra, bubrezi, crijevo, gušterača, nadbubrežna žlijezda, prostata, testisi, jajnici, pluća	Sauerborn i sur. 2004; Gottesman i sur. 2002; Žaja i sur. 2007; Bošnjak 2010
<i>Breast cancer resistance protein</i> (BCRP); ABCG	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Placenta, crijevo, dojke, jetra	Gottesman i sur. 2002; Žaja i sur. 2008



### 3.1.1.1. Građa ABC proteina

Osnovnu građu ABC transportnih proteina čine četiri strukturne domene: dvije izrazito hidrofobne transmembranske domene (TMD) i dvije hidrofilne ATP-vezne citoplazmatske domene, tzv. nukleotidno-vezne domene (NBD, eng. *nucleotide-binding domain*) (Slika 1) (Dassa i Bouige 2001; Dean i sur. 2001). TM domene sastavljene su od uzastopno ponavljajućih  $\alpha$ -uzvojnica koje grade transmembranski kanal. Njihova uloga je osiguravanje specifičnosti i vezanje širokog spektra supstrata. NB domene su visoko očuvane regije koje se nalaze u citoplazmi te vezujući i hidrolizirajući ATP (ATP-vezna kaset; eng. *ATP-binding cassette*) osiguravaju energiju za prijenos supstrata kroz membranu (Grandjean-Forestier i sur. 2009; Dean i sur. 2001).

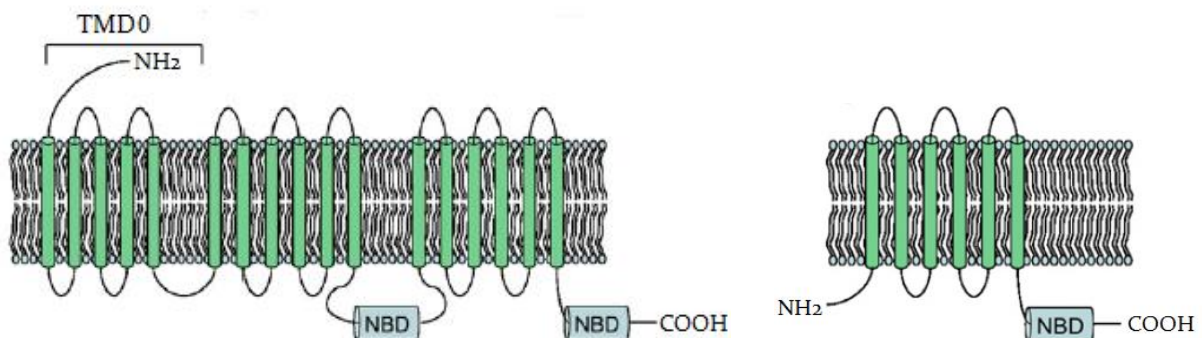


**Slika 1.** Shematski prikaz potpunog transportera građenog od četiri domene – dvije transmembranske (TMD) i dvije nukleotidno bazne domene (NBD). Unutar nukleotidno vezne domene nalaze se Walker A, Walker B i ABC motivi (LSGGQ) (Preuzeto i prilagođeno na temelju: Fukuda i Schuetz 2012).

Walker A motiv, poznat i kao P-petlja odgovoran je za vezanje nukleotida, dok je Walker B (Q-petlja) odgovoran za hidrolizu ATP-a i interakciju NB i TM domena (George i Jones 2012). Walker A i Walker B su dva karakteristična visoko očuvana motiva odijeljena sa 90-120 aminokiselina, te čine ATP veznu kazetu. Uz dva navedena motiva prisutan je ABC motiv (LSGGQ), poznatiji kao C motiv, koji omogućuje interakciju nukleotida s ATP-veznim mjestom (Dean i sur. 2001; Tarling i

sur. 2013). S obzirom na karakteristične domene koje vezuju ATP, cijela porodica ujedinjena je nazivom ABC proteini (Litman i sur. 2001).

Na osnovu broja domena koje ih grade, ABC proteini podijeljeni su u tri skupine: potpune transportere, duge transportere i polutransportere. Potpuni transporteri (P-gp), kao što je već prikazano na Slici 1. sadrže četiri domene (TMD-NBD-TMD-NBD) povezane u funkcionalan polipeptid. Dugi transporteri (MRP) slični su potpunim transporterima, no za razliku od njih imaju dodanu treću TMD domenu (tzv. TMD0) koja nije nužna za sam mehanizam transporta (Slika 2, lijevo). Polutransporteri građeni su od samo dvije domene (TMD-NBD) (Slika 2, desno). ABCA i ABCC podporodice sastavljene su od isključivo potpunih transportera, dok ABCD, ABCG i ABCH podporodice obuhvaćaju polutransportere. ABCB podporodici pripadaju potpuni transporteri i polutransporteri (Dean i Annilo 2005; Fukuda i Schuetz 2012; Coleman i sur. 2013).

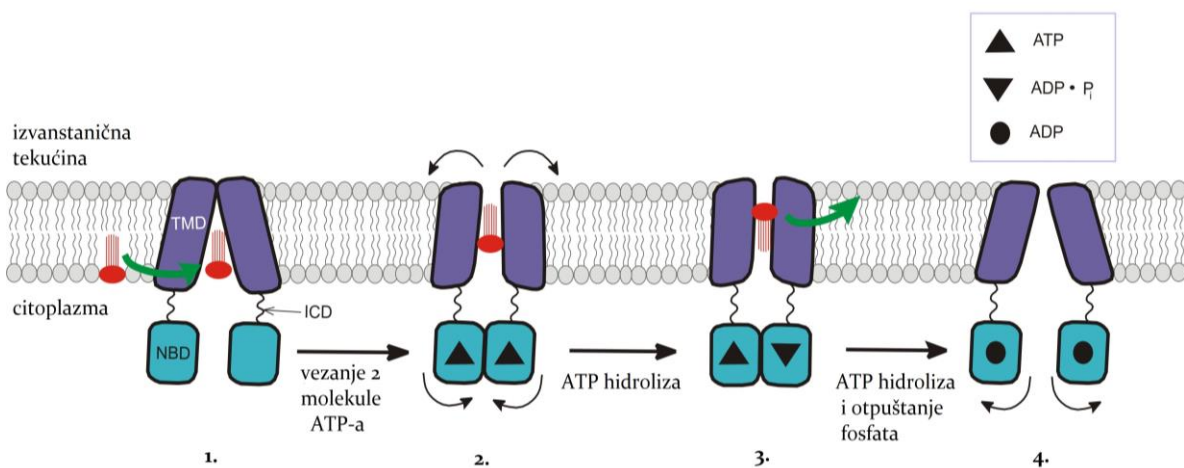


**Slika 2.** Shematski prikaz dugog transportera sa dodatnom TMD0 domenom u odnosu na potpuni transporter (na slici lijevo) te polutransportera građeni od dvije domene – jedne TM i jedne NB domene (na slici desno) (Preuzeto i prilagođeno na temelju: Fukuda i Schuetz 2012).

### 3.1.1.2. Mehanizam transporta ABC proteinima

Kako bi došlo do aktivnog prijenosa tvari preko stanične membrane potrebna je energija u obliku ATP-a, interakcija između NB i TM domena te promjena konformacije transportera (Grandjean-Forestier i sur. 2009; Gottesman i sur. 2002). S obzirom na veliku sličnost u građi eksporter i importer dijele isti mehanizam aktivnog prijenosa tvari. Stoga je u nastavku opisan samo način aktivnog eksporta (Slika 3).

U prvoj fazi (faza mirovanja) TM domene tvore obrnuti "V" oblik koji omogućava vezanje supstrata iz citoplazme na slobodno vezno mjesto. Zbog toga dolazi do velike konformacijske promjene TM domena, što omogućuje vezanje dvije molekule ATP-a na NBD. Vezanje ATP-a uzrokuje drugu konformacijsku promjenu u kojoj NB domene stvaraju zatvorenu dimersku konfiguraciju. Istovremeno TM domene se otvaraju stvarajući prolaz ka suprotnoj strani stanične membrane (treća faza), omogućujući supstratu otpuštanje u ekstracelularni prostor. Nakon otpuštanja supstrata, hidrolize ATP-a i otpuštanja fosfata, ADP u završnoj fazi vraća transporter u prvobitni položaj okrenut prema intracelularnom mediju (Honorat i sur. 2009; Fukuda i Schuetz 2012; Coleman i sur. 2013).

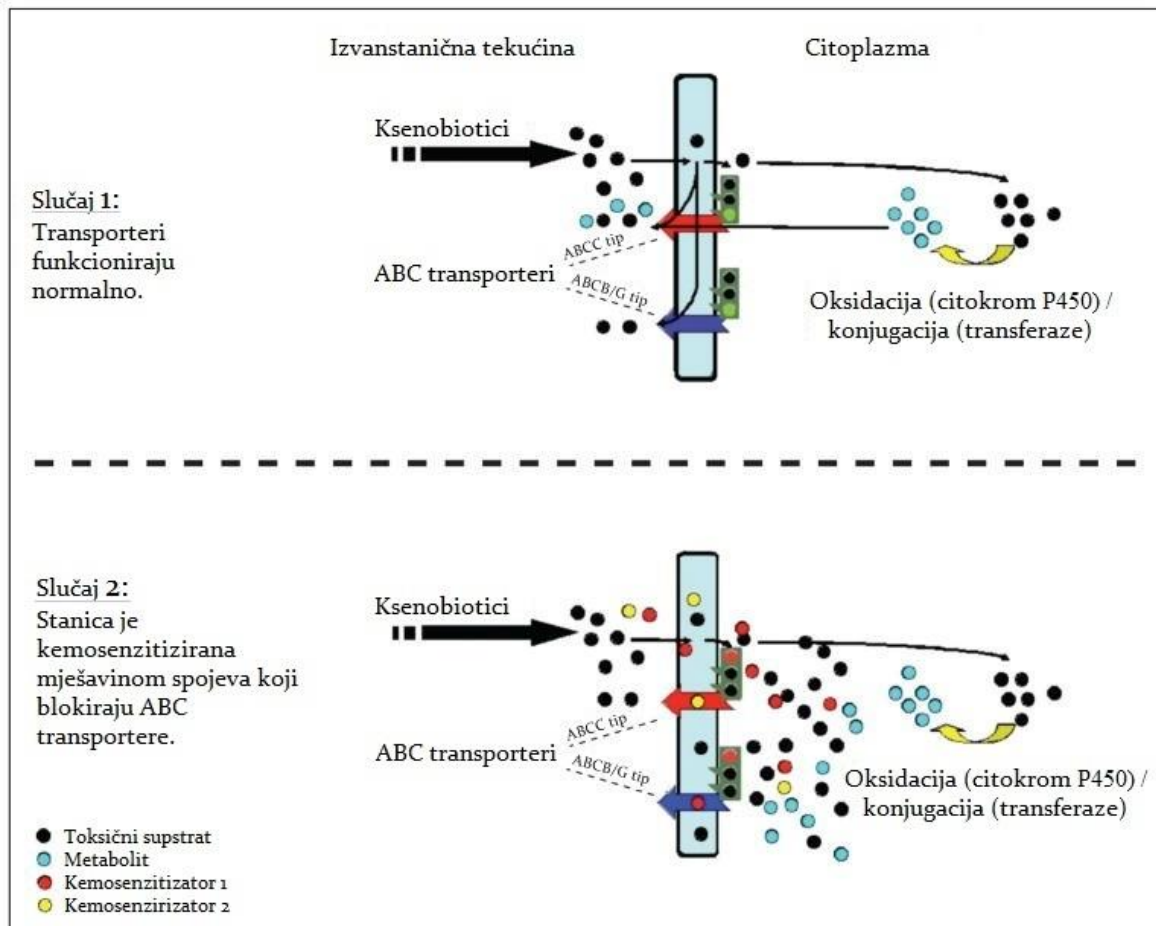


**Slika 3.** Predloženi mehanizam transporta supstrata putem ABC eksportera (Preuzeto i prilagođeno na temelju: Dong i sur. 2005).

### 3.1.1.2.1. Kemosenzitivatori

Neke tvari, bilo prirodnog ili antropogenog podrijetla mogu inhibirati ABC proteine, odnosno MXR mehanizam. Takve tvari nazivamo MXR inhibitorima ili kemosenzitivatorima. Kemosenzitivatori mogu djelovati kao pojedinačna tvar ili u sinergiji više tvari, kada blokirajući transportnu aktivnost ABC transportera onemogućuju izbacivanje drugog ksenobiotika iz stanice. S obzirom da se u okolišu nalaze mješavine različitih spojeva, blokiranjem MXR mehanizma dolazi do akumulacije štetnih, potencijalno toksičnih spojeva unutar stanice (Slika 4) (Kurelec 1992; Epel i sur. 2008). Izloženost organizama pesticidima i ostalim antropogeno stvorenim spojevima koji djeluju kao kemosenzitivatori može rezultirati povećanjem

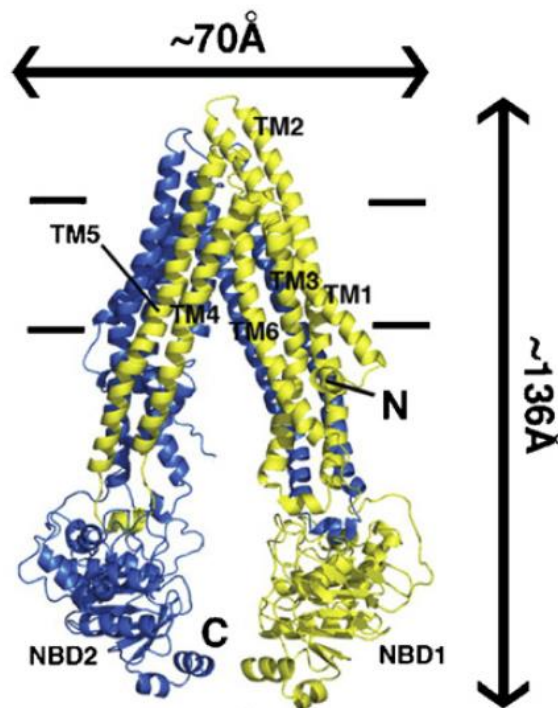
osjetljivosti organizama na prirodne toksine, na koje su organizmi otporni u slučaju normalne aktivnosti ABC transportnih proteina (Bard 2000).



**Slika 4.** Prikaz transportnih mogućnosti u stanici u normalnim uvjetima i prilikom posredovanja kemosenzitizatora. U 1. slučaju (na slici gore) svi transporteri funkcioniraju normalno. Nekolicina toksikanata koja uđe u stanicu vrlo brzo se modificira reakcijama metabolizma faze I (oksidacija-citokrom P450) i faze II (konjugacija-transferaze), nakon čega se izbacuju van iz stanice. U 2. slučaju (na slici dolje) stanica je izložena mješavini spojeva, uključujući i kemosenzitizatore koji inhibiraju djelovanje ABC transportera. Nakon što su transporteri inaktivirani, onemogućeno je izbacivanje štetnih spojeva te dolazi do njihove akumulacije unutar same stanice (Preuzeto i prilagođeno na temelju: Epel i sur. 2008).

### 3.1.1.3. P-glikoprotein (P-gp; ABCB1)

P-glikoprotein (P-gp) prvi je otkriven, stoga trenutno najpoznatiji i najviše istraživani transmembranski ABC transporter (Juliano i Ling 1976). Kodira ga *mdr1* gen koji se kod čovjeka nalazi na 7. kromosomu. Masa ljudskog P-gp proteina iznosi 170 kDa, a duljina  $\sim 136$  Å. Sastavljen je od  $\sim 1280$  aminokiselina te pripada ABCB podporodici. Polipeptidni lanac sastavljen je od dvije transmembranske domene (TMD1 i TMD2), od kojih svaki sadrži po šest  $\alpha$ -uzvojnica. Svaka od domena povezana je citosolnim petljama s dvijema NB domenama (NB1 i NB2) (Slika 5) (Grandjean-Forestier i sur. 2009; Bard 2000; Fukuda i Schuetz 2012). P-gp pripada potpunim transporterima, odnosno sastoji se od dvije TM i dvije NB domene povezane u funkcionalan polipeptid (Dean i sur. 2001; Coleman i sur. 2013). Unutar svake NB domene, kao što je već opisano, nalaze se karakteristični ABC motivi (Dean i sur. 2001; Litman i sur. 2001; Tarling i sur. 2013).

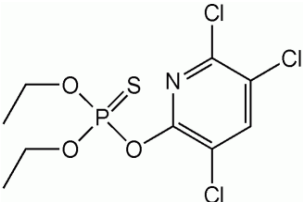
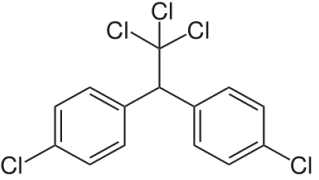
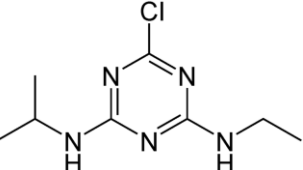
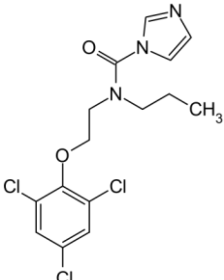
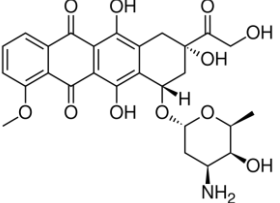
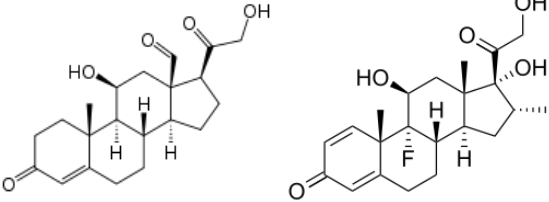


**Slika 5.** Prikaz građe P-glikoproteina te smještaja NB i TM domena (Preuzeto iz: Fukuda i Schuetz 2012)

P-gp je u svim životinjama i organizmu čovjeka eksprimiran ponajviše u epitelu gastrointestinalnog trakta, organima zaduženim za detoksikaciju (jetra i bubrež), krvno-moždanj te krvno placentarnj barijeri, krv-testis barijeri i na površini matičnih stanica krvotvornih sustava (Tablica 2) (Grandjean-Forestier i sur. 2009; Bard 2000). Njegova primarna funkcija je spriječavanje akumulacije štetnih spojeva, antropogeno stvorenih spojeva otpuštenih u okoliš, toksina i drugih ksenobiotika unutar stanice. Također, uključen je i u ostale fiziološke procese poput regulacije apoptoze, stresa, hipoksije, diferencijacije matičnih stanica, imunološkog odgovora stanice i dinamiku plazma membrane (Grandjean-Forestier i sur. 2009).

Uz pomoć energije ATP-a, P-gp je u mogućnosti prenijeti široki raspon supstrata koji su svrstani u dvije skupine. Prvu skupinu supstrata čine umjereno hidrofobni, planarni, prirodni produkti male molekularne mase koji su česti supstrati ili pak metaboliti detoksifikacijskih enzima kao što je citokrom P450 (CYP), te kemoterapeutici i steroidi. Drugu skupinu čine modulatori koji inhibiraju P-gp na način da se vežu na protein, ali se ne transportiraju P-gp mehanizmom (Bard 2000; Grandjean-Forestier i sur. 2009). Zbog izrazito široke supstratne specifičnosti kroz posljednje desetljeće sve se više širio popis supstrata za P-gp, od kojih je samo nekolicina navedena u Tablici 3.

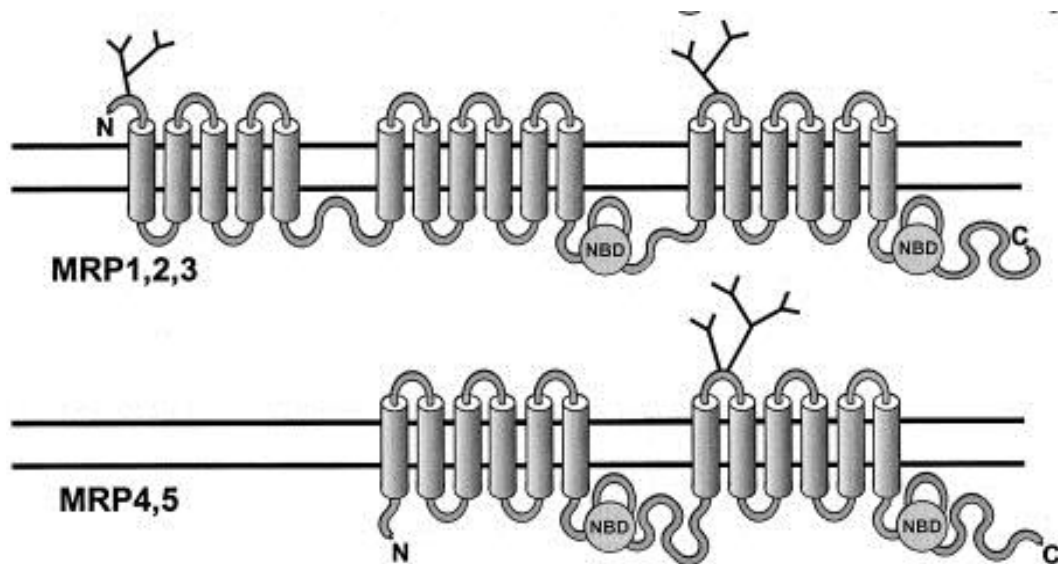
**Tablica 3.** Prikaz kemijskih struktura i kratak opis nekih od supstrata za P-gp (Podaci preuzeti iz: Ueda i sur. 1992; Buss i Callaghan 2008; Grandjean-Forestier i sur. 2009; Leslie i sur. 2005)

Naziv i kemijska struktura	Kratak opis supstrata
<p><b>Klorpirifos</b></p> 	<p>Organofosfatni insekticid. Djeluje na živčani sustav insekata inhibirajući acetilkolinesterazu.</p>
<p><b>DDT</b></p> 	<p>Organokloriran insekticid. Zbog kancerogenog utjecaja i mnogih drugih negativnih nuspojava, u SAD-u i Europi povučen je iz upotrebe do kraja 80-tih godina 20. stoljeća. Međunarodnim konvencijama zabranjen je tek 2001. godine.</p>
<p><b>Atrazin</b></p> 	<p>Pesticid koji je u širokoj upotrebi diljem svijeta.</p>
<p><b>Prokloraz</b></p> 	<p>Fungicid koji je u širokoj upotrebi u vrtlarstvu i agrikulturi diljem Europe, Australije i Sjeverne Amerike.</p>
<p><b>Doksorubicin</b></p> 	<p>Antitumorski antibiotik koji vezujući se na DNA onemogućuje njenu sintezu. Prepisuje se uz kemoterapijsko liječenje.</p>
<p><b>Aldosteron i kortizol</b></p> 	<p>Steroidni hormoni nadbubrežne žlijezde</p>

### 3.1.1.4. MRP (eng. *multidrug resistance-associated protein*; ABCC)

Nakon otkrića P-gp proteina uslijedila su istraživanja MDR mehanizma na stanicama raka. S obzirom da MDR mehanizam nije uvijek bio povezan s ekspresijom P-gp-a, potaknuta su istraživanja kako bi se saznalo o kojem je transporteru riječ. Odgovor na to pitanje dali su Cole i Deeley 1992. godine otkrivši 190-kDa težak protein koji se sastoji od 1531 aminokiseline. Protein je nazvan *multidrug resistance-associated protein* (MRP1/ABCC1) (Litman i sur. 2001; Sheps i Ling 2009). Do danas je otkriveno još 12 transportnih proteina (ABCC2, ABCC3, ABCC4, ABCC5, ABCC6, ABCC10, ABCC11, ABCC12), koji zajedno s proteinom MRP1 (ABCC1) čine ABCC nadporodicu.

S obzirom na broj domena koji ih grade, filogenetskim odnosima i membranskoj topologiji ABCC podporodica obuhvaća duže i kraće transportere. Dugi transporteri (ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC6, ABCC10) građeni su od tri TM i dvije NB domene. Uz to, imaju dodanu i treću TM domenu, TMD0. Kraći transporteri (ABCC4, ABCC5, ABCC8, ABCC9), slični građi P-gp-a, građeni su od četiri strukturne domene (dvije TM i dvije NB domene) (Sheps i Ling 2009) (Slika 6).



**Slika 6.** Prikaz osnovne građe MRP transportnih proteina. Dugi MRP transporteri građeni su od tri TM (+TM0) i dvije TM domene (na slici gore). Kraći MRP transporteri građeni su od dvije TM i dvije NB domene (na slici dolje) (Preuzeto i prilagođeno na temelju: Schinkel i Jonker 2003).



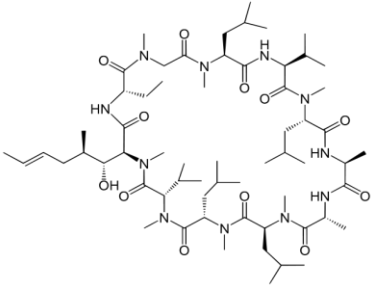
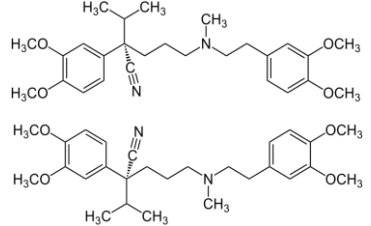
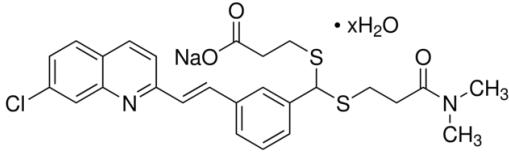
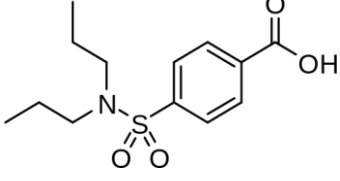
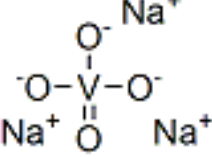
Pripadnici ABCC podporodice aktivni su membranski transporteri uključeni u transport organskih aniona i lijekova. TM domene proteina ABCC podporodice dijele nizak stupanj homologije, što objašnjava mogućnost transporta ekstremno različitih substrata, uključujući konjugate glutationa i spojeva konjugiranih sulfatom (Gottesman i sur. 2002; Honorat i sur. 2009). Prisutnost MRP proteina u jetri i bubrezima, najvažnijim organima za ekskreciju potencijalno toksičnih ksenobiotika i metabolita (Tablica 2) govori o njihovoj važnosti u obrani od štetnih spojeva (Honorat i sur. 2009). Zahvaljujući širokoj supstratnoj specifičnosti, zajedno sa proteinom P-gp pružaju prvu liniju obrane od širokog raspona ksenobiotika, što je posebno važno u vremenu kada se svakodnevno sintetiziraju novi spojevi (Epel i sur. 2008).

### **3.2. Funkcionalni ekotoksikološki test za MXR**

ABC transportni proteini uključeni u MXR mehanizam izuzetno su učinkoviti u obrani stanice (organizma) od štetnih spojeva, ksenobiotika i ostalih potencijalno toksičnih spojeva, no njihova aktivnost može se poremetiti prisustvom određenih spojeva koji imaju inhibitorno djelovanje (Kurelec 1997, Sauerborn Klobučar i sur. 2010). Stoga se mjerenje stupnja inhibicije transportnih proteina uključenih u MXR mehanizam može koristiti kao biomarker, odnosno kao učinkovito sredstvo za biomonitoring zagađenosti okoliša (Epel i sur. 2008; Hackenberger i sur. 2012).

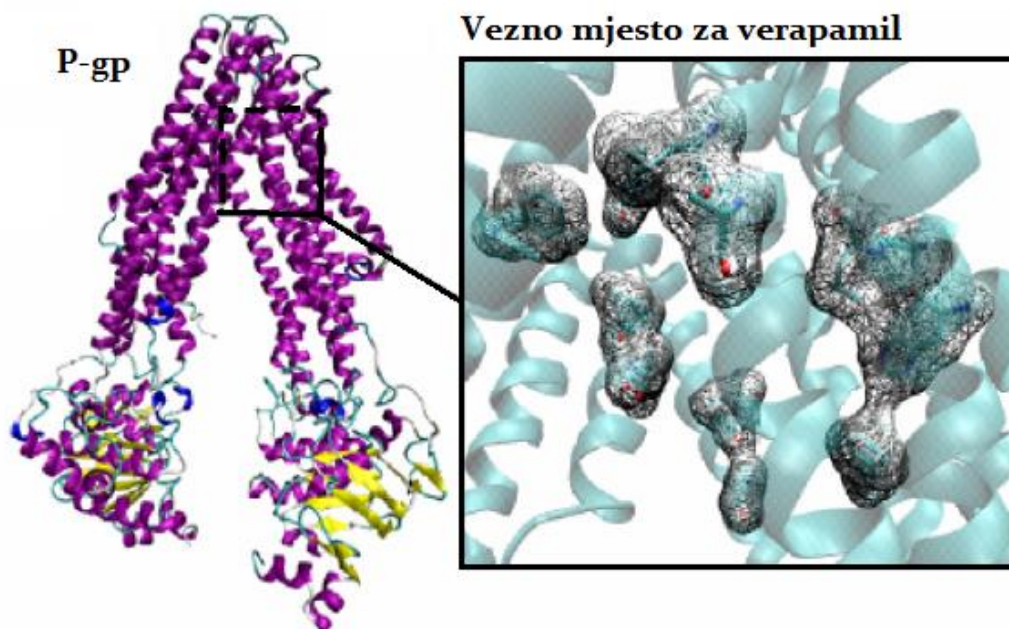
S obzirom na širok spektar spojeva koje mogu transportirati iz stanice i na taj način spriječiti ili umanjiti akumulaciju štetnih spojeva, uspostavljen je funkcionalni ekotoksikološki test za MXR. Princip testa korištenog prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela je mjerenje fluorescencije modelnih supstrata (rodamina B i rodamina 123) unutar homogeniziranog tkiva nakon dodavanja MXR modelnih inhibitora. Ukoliko je P-gp/MRP pumpa bila aktivna i ukoliko njena transportna aktivnost nije inhibirana, prethodno akumuliran fluorescentni supstrat učinkovito se izbacuje te se posredno smanjuje njegova koncentracija unutar stanice (organizma). U slučaju inhibicije transportera modelnim MXR inhibitorima (Tablica 4) dolazi do zaostajanja fluorescentnog supstrata unutar stanice, što se očituje kao porast fluorescencije u tkivima (Epel i sur. 2008).

**Tablica 4.** Popis najznačajnijih inhibitora ABC transportnih proteina uključenih u MXR mehanizam, korištenih prilikom provođenja eksperimentalnog dijela diplomskog rada.

Inhibitor	Strukturna formula	Kemijska formula	Način djelovanja
<b>Ciklosporin A</b>		$C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$	Inhibitor P-gp ATP-aze
<b>Verapamil</b>		$C_{27}H_{38}N_2O_4$	Kompetitivni P-gp inhibitor
<b>MK571</b>		$C_{26}H_{26}ClN_2NaO_3S_2 \cdot xH_2O$	Specifičan MRP inhibitor
<b>Probenecid</b>		$C_{13}H_{19}NO_4S$	MRP inhibitor
<b>Ortovanadat</b>		$Na_3VO_4$	P-gp i MRP inhibitor

Prilikom interakcije transportnih proteina MXR mehanizma i MXR modelnih inhibitora dolazi do inhibicije na više načina. S obzirom da su mehanizmi indukcije do današnjih dana nedovoljno istraženi, navodim primjer interakcije između proteina P-gp i inhibitora verapamila (Slika 7). Unutar P-gp proteina nalaze se dvije hidrofobne šupljine. Prva šupljina (CAV-1) nalazi se u samoj unutrašnjosti proteina te sadrži tri aromatska aminokiselinska ostatka (Phe953, Phe71 i Tyr949). Druga šupljina (CAV-2) okrenuta je prema središtu proteina te sadrži aromatske i alifatske aminokiselinske

ostatke (Phe724, Phe332, Phe339, Leu335, Leu336 i Ile977). Prilikom inhibicije verapamilom jedan dio molekule ulazi u šupljinu CAV-1, čime dolazi do interakcija s Phe953, Phe71 i Tyr949. Drugi dio molekule verapamila ulazi u šupljinu CAV-2, što rezultira intermolekularnim interakcijama s Phe339, Phe724 i Phe332. S obzirom da P-gp prilikom transporta ksenobiotika i ostalih štetnih spojeva izvan stanice mora proći kroz značajne konformacijske promjene, vezanjem verapamila na vezna mjesta šupljina onemogućene su navedene promjene te dolazi do smanjenja/inhibicije aktivnosti P-gp-a (Quevedo i sur. 2011). Na taj način kemoterapeutici, ksenobiotici, antropogeni spojevi te ostali potencijalno toksični spojevi zaostaju unutar same stanice, gdje dolazi do njihove akumulacije.



**Slika 7.** Prikaz trodimenzionalne strukture proteina P-gp i veznog mjesta za verapamil (Preuzeto i prilagođeno na temelju: Quevedo i sur. 2011.)

### 3.3. Biologija gujavica vrste *Eisenia fetida*

#### 3.3.1. Filogenija

Znanstvena klasifikacija:

Carstvo:	Animalia
Koljeno:	Annelida
Razred:	Clitellata
Podrazred:	Oligochaeta
Red:	Haplotaxida
Porodica:	Lumbricidae
Rod:	<i>Eisenia</i>
Vrsta:	<i>Eisenia fetida</i>



**Slika 8.** Kompostna gujavica (*Eisenia fetida*)  
(<http://urbanfishfarmer.com/vermicomposting-worm-tea/>)

#### 3.3.2. Morfologija i opis vrste

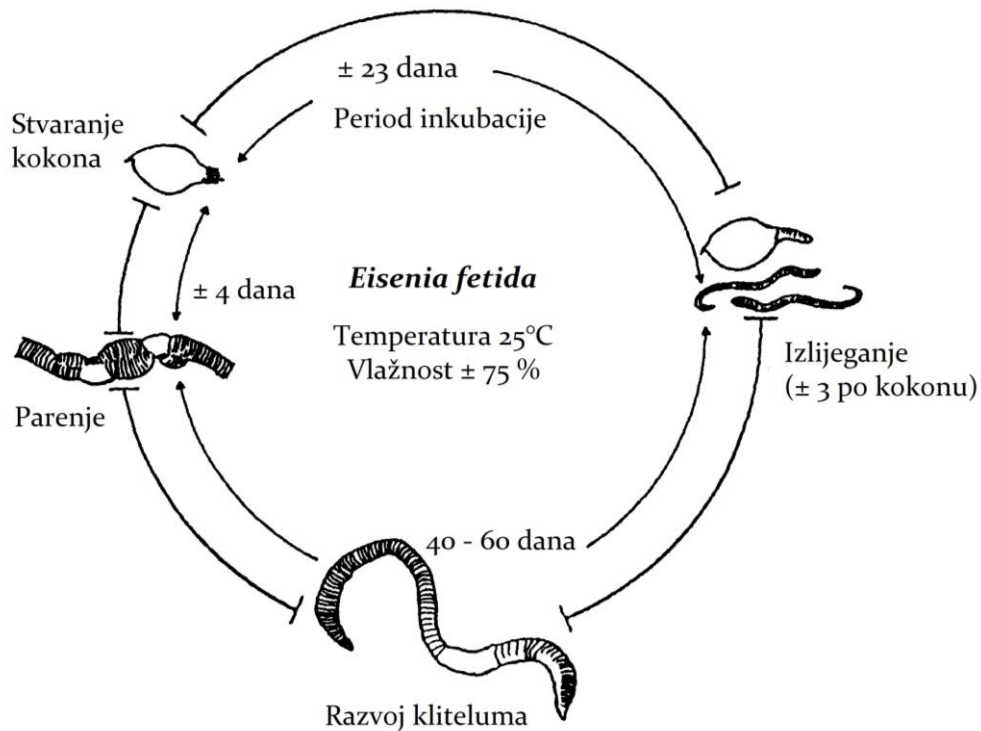
Vrsta *E. fetida* spada u porodicu Lumbricidae, gujavice, kojoj pripada većina terestričkih gujavica u Europi i općenito u Palearktičkoj regiji. Tijelo gujavica je bilateralno simetrično i kolutičavo što se odražava u vanjskoj i unutrašnjoj građi. Kutikula obavija jednoslojnu epidermu sastavljenu od cilindričnih epitelnih stanica između kojih su smještene žljezdane stanice. Epiderma ima zaštitnu i pokrovnu ulogu, a preko nje se odvija i izmjena plinova. Ispod epiderme nalazi se sloj prstenastih i uzdužnih mišića koji omogućavaju pokretanje naizmjeničnim stezanjem duž tijela. Jedna od najvažnijih evolucijskih promjena je nastanak celoma (sekundarne trbušne šupljine) čija je funkcija mnogostruka: pruža potporu tijelu, utječe na pokretanje ždrijela te sudjeluje u prijenosu tvari. Probavni sustav je otvoren i sastoji se od usta, ždrijela, jednjaka, volje, želuca, crijeva i analnog otvora. Krećući se kroz zemlju gujavica guta zemlju i lišće, nakon čega se glavni dio probave odvija u želucu i prednjem dijelu crijeva, a apsorpcija hranjivih tvari u optjecajni sustav u zadnjem dijelu crijeva. S obzirom na segmentiranost, u svakom kolutiću se nalazi i

jedan par živčanih ganglija međusobno povezanih živčanim vrpčama u ljestvičast živčani sustav. Gujavice su dvospolci, stoga imaju ženski (na trbušnoj strani 14. kolutića) i muški (na trbušnoj strani 15. kolutića) spolni otvor. Oplodnja je vanjska (Edwards i Bohlen, 1996).

S obzirom na opće karakteristike poput oblika i veličine tijela, dubine tla koju nastanjuju, pigmentacije i afiniteta prema tipu hrane Bouché (1977) je razdijelio gujavice u tri ekološke kategorije: epigejne (koje su pigmentirane i žive u površinskim slojevima tla bogatim hranjivim tvarima), anecične (koje su relativno velike i nastanjuju dublje dijelove tla) i endogejne (koje grade vertikalne tunele kroz tlo na dubini od 10-15 cm, probavljajući na taj način najviše hrane u odnosu na preostale dvije kategorije). *E. fetida* je epigejna vrsta, stoga nastanjuje površinske slojeve tla bogate organskom materijom, a manje mineralnim tvarima. Svojim djelovanjem povećava kvalitetu, strukturu i plodnost tla, uklanja i biotransformira teške metale i brojne druge spojeve iz tla, uništava patogene i dezinficira tlo zbog čega se razmatra njihov potencijal u liječenju nekih bolesti kod ljudi (Sinha i sur. 2010).

### 3.3.3. Životni ciklus

Vrstu *E. fetida* karakterizira visoka reproduktivna stopa te kratak životni ciklus (Slika 9). Nakon spajanja dviju jedinki parenjem, dolazi do razmjene spermatozoida. Nakon otprilike 4 dana (ovisno o temperaturi, vlažnosti i ostalim okolišnim uvjetima) stvara se kokon čija inkubacija traje od tri do četiri tjedna. Nakon navedenog perioda iz kokona izlaze prosječno tri gujavice. Spolnu zrelost postižu između šestog i osmog tjedna na temperaturi od 20°C, nakon čega svaka jedinka proizvede dva do pet kokona tjedno (OECD 1984; Venter i Reinecke 1988).



**Slika 9.** Životni ciklus gujavice *E. fetida* (Preuzeto i prilagođeno na temelju: Venter i Reinecke 1988).

### 3.3.4. Gujavica *E. fetida* kao model u ekotoksikološkim istraživanjima

S obzirom na način života u tlu, mogućnosti tolerancije i bioakumulacije visokih količina endogenih kemikalija, ksenobiotika i tvari antropogenog porijekla gujavice vrste *E. fetida* jedan su od najboljih modelnih organizama među organizmima u tlu, što je potvrđeno OECD protokolom kojim se preporučaju za toksikološke testove (OECD 1984; Luo i sur. 1999; Sinha i sur. 2010; Hackenberger i sur. 2012). Njihovo tijelo obavijeno je polupropusnom kutikulom koja omogućuje apsorpciju i bioakumulaciju različitih molekula manje molekularne mase, dok se istovremeno apsorpcija odvija i kroz probavni sustav (Phipps i sur. 1993). Upravo zbog izravnog kontakta s tlom te osjetljivosti na promjenjive okolišne čimbenike, vrlo su korisne u praćenju zagađenja tla. Zbog toga toksikološka ispitivanja unutar laboratorija vrlo uspješno koreliraju sa stvarnim stanjem u okolišu (Hackenberger i sur. 2012). Uz to, laka dostupnost te jednostavnost za održavanje i rukovanje prilikom istraživanja čini ih izuzetno prihvatljivim eksperimentalnim organizmom (OECD 1984).

### 3.4. Okolišna zagađivala

#### 3.4.1. Bisfenol A (BPA)

Bisfenol A (BPA) po prvi puta sintetizirao je A. P. Dianin 1891. godine. Iako tada nije bilo posve jasno čemu može poslužiti, danas je BPA osnovni građevni element polikarbonatne plastike koji plastičnoj ambalaži osigurava čvrstoću, fleksibilnost i otpornost na promjenu oblika (Paloma i sur. 2012). Tijekom 2003. godine proizvedeno je 3.2 miliona tona BPA širom svijeta, a s obzirom na porast potražnje pretpostavlja se kako je ta količina 2011. godine dosegla brojku od 5.5 miliona tona. S obzirom na široki raspon upotrebe te nezaustavljiv porast proizvodnje u posljednjih 80-tak godina, BPA postao je sveprisutno okolišno zagađivalo. Unatoč kratkom vremenu poluraspada same molekule (2.5 - 4 dana), zbog kontinuiranog otpuštanja u okoliš akumulirane koncentracije u stalnom su porastu (Flint i sur. 2012; Paloma i sur. 2012).

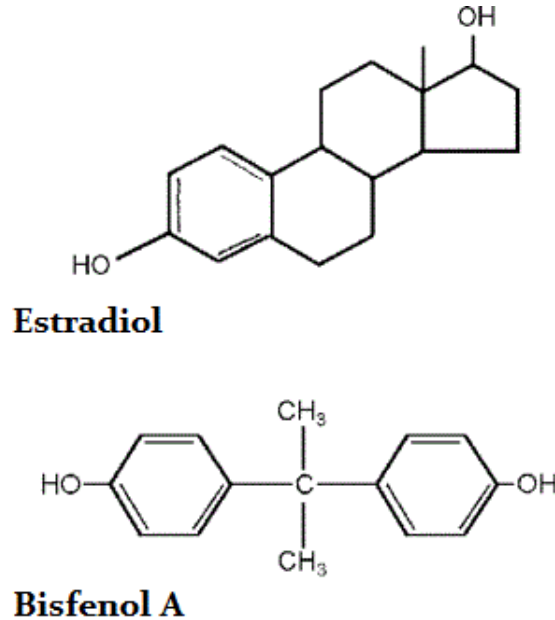
Prema European Food Safety Authority za Europu dozvoljena dnevna doza (TDI; eng. *tolerable daily intake*) koja se može bez posljedica unijeti u organizam iznosi 0.05 mg/kg tjelesne težine. Sukladno s time, najviša doza koja ne uzrokuje štetan učinak (NOAEL; eng. *no observed adverse effect level*) iznosi 5 mg/kg tjelesne mase/dan (EFSA 2010). S obzirom da postoji više od 40 publiciranih studija koje jasno ukazuju na postojanje širokog raspona biokemijskih promjena unutar organizma prilikom konzumacije BPA u koncentraciji manjoj od 50 µg/kg/dan, nije posve pouzdano je li upravo propisana sigurna dnevna doza (EFSA 2010) zaista sigurna (vom Saal i Welshons 2006).

Prekomjerno nakupljanje BPA u organizmu (stanici) dovodi do mnogobrojnih neželjenih posljedica, a između ostalog 30-tih godina 20. stoljeća utvrđeno je kako je BPA ozbiljan endokrini disruptor (Flint i sur. 2012; Paloma i sur. 2012). S obzirom na sličnost u obliku molekule s prirodnim estradiolom (Slika 10), BPA ima mogućnost blokiranja ili pak vezivanja s estrogenskim receptorima. Na taj način onemogućuje normalan rad hormonskih receptora ili pak aktivira specifičan hormonski proces unutar organizma (Flint i sur. 2012). Iako je BPA par tisuća puta slabije aktivniji od prirodnog estrogena, koncentracija u plazmi od svega 2-3 ppb-a\* dovoljna je da izvrši

---

\* ppb – *parts per billion*,  $10^{-9}$

veliki utjecaj na hormonsku aktivnost. Uz to, BPA pokazuje i određeni afinitet prema androgenskim i tiroidnim receptorima (Paloma i sur. 2012).



**Slika 10.** Prikaz oblika molekula prirodnog hormona estradiola i bisfenola-A  
(Prilagođeno na temelju [www.edrv.endojournals.org](http://www.edrv.endojournals.org)).

Nakon što je 1993. godine postalo jasno kako BPA može istjecati iz plastike, uslijedile su brojne studije koje su se bazirale na otkrivanju već postojećeg stanja te utjecaja na okoliš i pripadajuće organizme (Tablica 5). Zbog lakše usporedbe postojećih okolišnih stanja s pojavom bolesti, u Tablici 6. navodim izmjerene koncentracije BPA u pojedinim državama. Za Republiku Hrvatsku, kao niti za većinu susjednih zemalja, do sada nisu izmjerene okolišne koncentracije BPA.



**Tablica 5.** Prikaz utjecaja BPA na nastanak promjena unutar organizma (stanice) u ovisnosti o dozi (Podaci preuzeti iz: Richter i sur. 2007; Flint i sur. 2012).

Organizam	Koncentracija BPA	Zamjećene promjene
<b>Beskralježnjaci</b>		
<i>Chironomus riparius</i>	0.08-0.1 µg/L	Zaustavljanje razvoja larve
<i>Marisa cornuarietis</i>	>1.0 µg/L	Feminizacija jedinki, uvećanje spolnih žlijezda, deformacije i napuknuća jajovoda, ugibanje
<i>Acartia tonsa</i>	100 µg/L	Zaustavljanje razvoja, smanjenje fertiliteta, povećana učestalost smrtnosti potomaka
<b>Ribe</b>		
<i>Cyprinus carpio</i>	1 µg/L	Strukturne promjene gonada
<i>Salmo trutta f. fario</i>	1.75 µg/L	Smanjena kvaliteta spermatozoida mužjaka
<i>Dicentrarchus labrax</i>	10 µg/L	Spriječavanje stvaranja vitelogenina kod ženki
<b>Vodozemci</b>		
<i>Silurana tropicalis</i>	2.28 µg/L	Spriječavanje metamorfoze
<i>Xenopus laevis</i>	20 µg/L	Malformacije centralnog živčanog sustava
	4600 µg/L	Abnormalnosti crijeva, nastanak edema, smanjenje dužine tijela
<b>Reptili</b>		
<i>Caiman latirostris</i>	90 µg/jaje	Abnormalni sjemenovodi kod mužjaka
	9 mg/jaje	Izlijeganje jedinki isključivo ženskog spola
<b>Ptice</b>		
White Leghorn Chicken	2 µg/jaje	Odgođen razvoj spolnih karakteristika mužjaka (krijeste, testisa)
<i>Coturnix japonica</i>	200 µg/jaje	Abnormalnosti jajovoda ženki
<b>Sisavci</b>		
Mladunčad CD-1 miša (embrionalno izloženi BPA)	2 µg/kg	Povećana agresivnost
	10 µg/kg	Smanjena briga za potomke kod ženki.
Odrasli CF-1 miševi (embrionalno izloženi BPA)	2 µg/kg	Smanjenje sjemenovoda, povećanje prostate
	20 µg/kg	Smanjenje dnevne količine proizvedene sperme kod mužjaka
Wistar štakor (mladunčad)	20 µg/kg	Hiperaktivnost
<i>Microtus agrestis</i>	250 µg/L	Povećana razina testosterona

**Tablica 6.** Prikaz koncentracije BPA u vodi i tlu u pojedinim državama svijeta (Podaci preuzeti iz: Huang i sur. 2012).

Država	Lokacija	Ispitivan materijal	Izmjerena koncentracija BPA (ng/L)
Kina	Rijeka Songhua	Riječna voda	29-64
	Guangzhou- Estuarij rijeke Pearl	Riječna voda i voda ribnjaka	950-3920
		Riječni sediment	0.6-4
	Sjeverni Taiwan	Riječna voda	59-228
Industrijska otpadna voda iz industrijskog parka		623-16200	
Japan	Tokyo Bay	Voda morske površine	20.2-30.1
		Procjedna voda sa odlagališta opasnog otpada	149-12300
	Okinawa i Ishigaki otoci	Morska voda	<5-58
USA	Cape Cod	Otpadne vode	94-150
	Bayou rijeka	Riječna voda	9-44
	Dever	Površinski sediment	40-800
Kanada	Toronto	Industrijski izljevi	230-149200
		Kanalizacijski mulj	33-36700
Njemačka	Sjeverno more	Morska voda	<0.05-248
	Baltičko more		<0.04-5.7
	Rijeka Elba	Riječna voda	8.9-776
Španjolska	Katalonija	Riječna i morska voda	10-20
Italija	Rijeka Tiber	Suspendirani materijal	5.6-56

### 3.4.2. Uzorkovanje snijega kao metoda praćenja okolišnih zagađivala

U zadnjih par desetljeća došlo je do porasta svijesti ljudi, kako o zagađenju okoliša toksičnim tvarima, tako i o njihovom prijenosu kroz atmosferu i taloženju u okolišu. Promjena klime, litologija te iznenadne i nepredvidive pojave poput vulkanizama i oluja, uzrok su heterogene raspoređenosti teških metala i ostalih potencijalno toksičnih spojeva u atmosferi (okolišu) (Telmer i sur. 2004).

Uzorkovanje i analiza snijega kao jednog od odličnih načina biomonitoringa zagađenja okoliša, započela je sa studijom Murozumi i suradnika (1969) koji su ispitali udio olova u snijegu na Grenlandu u ovisnosti o razvitku industrije kroz desetljeća. Pahulje snijega sposobne su akumulirati brojne atmosferske zagađivače. Zbog veće dodirne površine i usporenog pada pahulje na sebe vežu čak i elemente u tragovima, i to u znatno većoj količini nego kapi li kiše. Jedne od brojnih povoljnih karakteristika ove metode su mogućnost uzorkovanja željenog broja uzoraka s različitih područja te mogućnost uporedbe kontaminacije urbaniziranih i ruralnih područja. Uz to, apsorpcija teških metala i ostalih štetnih, potencijalno toksičnih spojeva odvija se u kratkom vremenu. Uslijed atmosferskih taloženja, snijeg koji se gomila na podlozi predstavlja gradijent koncentracije svih spojeva kroz atmosferu. Ukoliko se radi o urbaniziranim ili izrazito prometnim područjima (npr. uz autoceste), povećanje onečišćujućih tvari utvrđeno je 12 sati nakon taloženja snijega na podlogu (Glenn i Sansalone 2002; Engelhard i sur. 2007).

Uzimajući u obzir navedene karakteristike pahulja, Telmer i sur. (2004) metodom uzorkovanja snijega identificirali su 33 elementa u tragovima i tri aniona, te dokazali kako se najmanje 27 elemenata prenosi na udaljenosti veće od 50 km od talionice u Quebecu. Ovisno o vremenskim uvjetima i ostalim klimatskim prilikama, prijenos spojeva može biti i do 5000 km (Telmer i sur. 2004).

S obzirom na sve progresivniju urbanizaciju diljem svijeta te istovremeno rastući unos brojnih antropogeno stvorenih spojeva, uzorkovanje i analiza snijega ide ka tome da postane jedna od vodećih metoda identifikacije i kvantifikacije zagađenja okoliša (Cereceda-Balic i sur. 2012).

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Materijali

#### 4.1.1. Održavanje eksperimentalnih životinja u laboratoriju

Gujavice vrste *E. fetida* potječu iz uzgajališta Eršek d.o.o. u Donjoj Bistri (Slika 11). U laboratoriju su držane u kontroliranim uvjetima; u tlu određenog sastava (ilovača, kompost i treset u jednakim udjelima), u tami i na temperaturi  $20 \pm 1$  °C. Vlažnost tla redovito je održavana.



Slika 11. Uzgajalište u Donjoj Bistri.

#### 4.1.2. Kemikalije

Popis korištenih kemikalija, reagensa korištenih u PCR reakcijama, kompleta, instrumenata i početnica navedeni su u Tablicama 7 – 12.

**Tablica 7.** Popis korištenih kemikalija.

Ime (kratica)	Kemijska formula	Proizvođač
Agaroz	/	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD
Ampicilin	$C_{16}H_{19}N_3O_4S$	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD
Ciklosporin A (CA)	$C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD
Etidijev bromid	$C_{21}H_{20}BrN_3$	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD
Fosfatni pufer (ph=7.4) Sastav: NaCl 8g, KCl 0.2g, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O 1.15g, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.2g, dH <sub>2</sub> O 1000ml	PBS	/
IPTG	$C_9H_{18}O_5S$	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD
Natrijev ortovanadat (OV)	$Na_3VO_4$	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD
MK571	$C_{26}H_{26}ClN_2NaO_3S_2 \cdot xH_2O$	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD
Probenecid	$C_{13}H_{19}NO_4S$	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD
Verapamil (VER)	$C_{27}H_{38}N_2O_4$	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD
X-gal	$C_{14}H_{15}BrClNO_6$	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD

**Tablica 8.** Popis reagensa korištenih u PCR reakcijama.

Naziv reagensa	Koncentracija matične otopine	Opis reagensa	Proizvođač
dNTP (smjesa deoksiribonukleotid-trifosfata; dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	2 mM	Prirodni supstrati za sintezu DNA. Omogućuju ugradnju nukleotida u novosintetiziranu DNA tijekom produljivanja lanaca u PCR reakciji.	New England BioLabs, Beverly, MA, USA
Q5 High-Fidelity DNA polimeraza	20 U/μL	Enzim koji sintetizira DNA dodajući nukleotide na novi lanac s obzirom na komplementarnost baza.	New England BioLabs, Beverly, MA, USA
Q5 reakcijski pufer (MgCl <sub>2</sub> )	5x	Utječe na vezanje početnica, razdvajanje nizova pri denaturaciji, specifičnost produkata i pravilnost kopiranja fragmenata.	New England BioLabs, Beverly, MA, USA

**Tablica 9.** Popis korištenih kompleta

Naziv kompleta	Kratak opis	Proizvođač
EZ-10 Spin Column Total RNA Mini-preps Super Kit	Pročišćavanje ukupne RNA iz bakterija, kvasaca, gljivica, biljaka i životinjskih tkiva.	Bio Basic Inc., Ontario, Kanada
pGEM-T Vector System	Komplet za ligaciju plazmidne DNA i određenog DNA odsječka. Komplet sadrži: pGEM-T vektor, T4 DNA ligazu i ligacijski pufer.	Promega, Madison, WI, USA
PrimeScript First Strand cDNA Synthesis Kit	Komplet za sintezu jednolančane cDNA prilikom reverzne transkripcije.	TaKaRa Bio Inc, Kyoto, Japan
QIAGEN MiniPrep Kit	Komplet za pročišćavanje plazmidne DNA.	Qiagen, Hilden, Njemačka
QIAquick Gel Extraction Kit	Komplet za pročišćavanje DNA fragmenta iz agaroznog gela nakon elektroforeze.	Qiagen, Hilden, Njemačka

**Tablica 10.** Popis hranjivih podloga korištenih za uzgoj bakterije *Escherichia coli*.

Naziv hranjive podloge	Sastav	Kratak opis
LB hranjiva podloga	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 5 g/L ekstrakt kvasca (Fluka, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD)</li> <li>• 10 g/L bakto tripton (eng. <i>bacto tryptone</i>) (Fluka, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD)</li> <li>• 10 g/L NaCl (Kemika, Hrvatska)</li> <li>• 15 g/L agar (za krutu hranjivu podlogu)</li> </ul>	Medij korišten za uzgoj bakterija <i>E.coli</i> . Za selektivan rast bakterijskih kolonija s plazmidom pGEM-T, podlozi je dodan ampicilin, a za potrebe plavobijele selekcije IPTG (0.5 Mm) i X-gal (80 µg/mL).
SOC hranjiva podloga	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2% bakto tripton (Fluka, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD)</li> <li>• 0.5% kvašćev ekstrakt (Fluka, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD)</li> <li>• 10 nM NaCl,</li> <li>• 2.5 mM KCl,</li> <li>• 10 mM MgCl<sub>2</sub>,</li> <li>• 10 mM MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O,</li> <li>• 20 mM glukoza</li> </ul>	Hranjiva podloga za oporavak bakterija nakon podvrgavanja temperaturnom šoku.

**Tablica 11.** Popis korištenih instrumenata.

Ime uređaja	Namjena uređaja u istraživanju	Proizvođač
BioSpec nano spektrofotometar	Provjera količine i kvalitete pročišćene RNA.	Shimatzu Biotech, Kyoto, Japan
FLUOstar OPTIMA platereader	Određivanje akumulacije fluorecentnog supstrata unutar tkiva.	BMG Labtech Ltd., Aylesbury, UK
Mikrocentrifuga 5417C	Razdvajanje faza, krute od tekuće.	Eppendorf, Hamburg, Njemačka
Ultra-Turray T18 homogenizator	Homogenizacija tkiva gujavice.	IKA, Njemačka
Mastercycler personal	Umnožavanje određenog odsječka DNA .	Eppendorf, AG, Hamburg, Njemačka

Tablica 12. Popis korištenih početnica

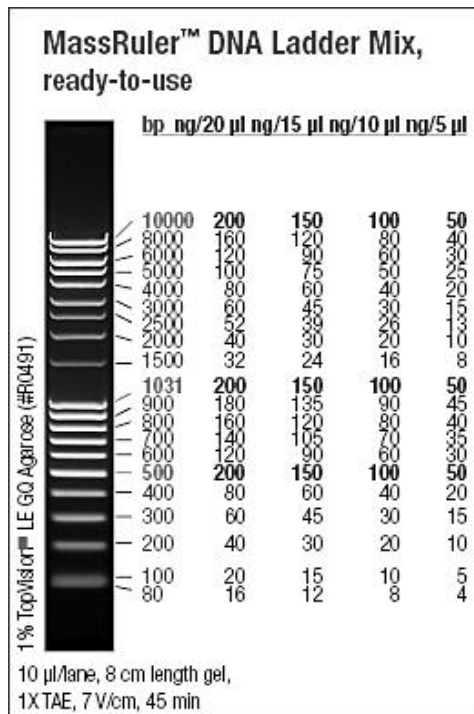
Oznaka početnica	Orijentacija početnica	Nukleotidni slijed 5' → 3'	Očekivana dužina (pb)	Tm	Opis
Pgp 1	F	GCGGCTGTGGGAAGAGCAC	199	64	Detekcija gena <i>Abcb1</i> P-gp
Pgp 2	R	TGTTGTCTCCGTAGGCAATGTT	199	58	Detekcija gena <i>Abcb1</i> P-gp
202	F	GTNGGNMGNACNGGNGCNGGNAA	410	55-69	Detekcija gena <i>Abcc MRP2</i>
203	R	TCNACNGCNGTNGCYTCRTC	410	50-62	Detekcija gena <i>Abcc MRP2</i>
204	F	TCNCCHATMTWYTCHCAYTT	481	50-62	Detekcija gena <i>Abcc MRP2</i>
205	F	TGTBSCHCARCARBCHTGG	292	66-54	Detekcija gena <i>Abcc MRP2</i>
206	F	GARATNRTSAACYTKATGTC	502	60-50	Detekcija gena <i>Abcc MRP2</i>
207	R	NCCVACNYDCCVYCTTYTC	481	68-52	Detekcija gena <i>Abcc MRP2</i>
208	R	AAVAKRTKYTTBCCNACATG	292	62-48	Detekcija gena <i>Abcc MRP2</i>
209	R	GGGWABYKMAKDARTRGAA	502	62-50	Detekcija gena <i>Abcc MRP2</i>
300	F	TTYRTWCAYGARTACATCAG	341	60-52	Detekcija gena <i>Abcg BCRP</i>
pUC/M 13 reverse	R	CAGGAAACAGCTATGAC	/	/	Sekuenciranje P-gp fragmenta gena iz tkiva <i>E. fetida</i> kloniranog u pGEM-T vektoru
T7f/3nt extended	F	GCTAGTTATTGCTCAGCGGTGG	/	/	

Sve navedene oligonukleotidne početnice sintetizirane su u Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, SAD) i Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).



### 4.1.3. Molekularni biljeg

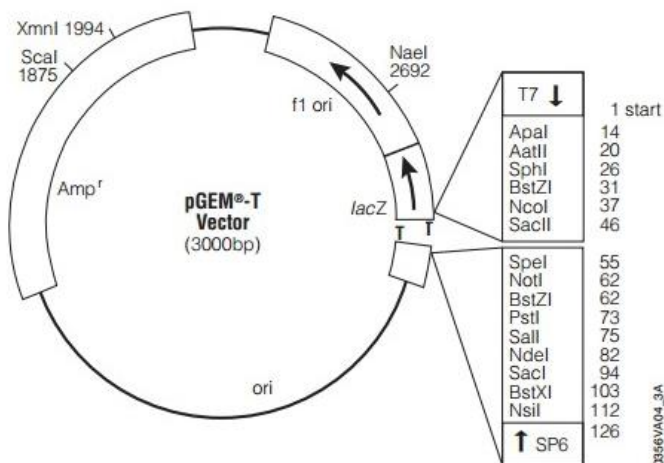
Slika 12. prikazuje korišteni MassRuler™ DNA Ladder molekularni biljeg.



**Slika 12.** MassRuler™ DNA Ladders, ready-to-use (80 bp – 10000 bp), Fermentas.

### 4.1.4. Plazmidi

Plazmid pGEM-T (Slika 13, Promega), velik 3000 pb. Sadrži gen za rezistenciju na ampicilin ( $Amp^r$ ) i gen za enzim  $\beta$ -galaktozidazu ( $lacZ$ ).



**Slika 13.** Mapa plazmida pGEM® - T (Promega) (Preuzeto iz: pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems – Technical Manual, Promega).

### 4.1.5. Bakterijski sojevi

*E. coli* XL1-Blue<sup>r</sup> genotipa: *supE44 hsdR17 recA1 end A1 gyrA46 thi relA1 lac F* [*proAB*<sup>+</sup> *lacI*<sup>q</sup> *lacZ*Δ*M15 Tn10*(*tet*<sup>r</sup>)].

## 4.2. Metode

### 4.2.1. Utvrđivanje aktivnosti MXR mehanizma

#### 4.2.1.1. Test kontakta na filter papiru (eng. *filter paper contact test*)

Za istraživanje su odabrane odrasle, spolno zrele jedinke težine između 120-250 mg. Gujavice su 24 h prije izvođenja pokusa stavljene u staklenke obložene filter papirom navlaženim destiliranom vodom kako bi se probavni trakt očistio od zemlje. Staklenke su prekrivene perforiranom aluminijskom folijom i držane u tami na temperaturi od  $20 \pm 1$  °C (Slika 14; gore lijevo).

Nakon čišćenja, proveden je test kontakta na filter papiru (OECD 1984; Hackenberger i sur. 2012.). Gujavice su izlagane sljedećim tvarima:

- fluorescentnim supstratima MXR mehanizma:
  - Rodamin B (RB) u koncentraciji 2,5 i 10  $\mu\text{M}$
  - Rodamin 123 (R123) u koncentraciji 10  $\mu\text{M}$
- poznatim MXR inhibitorima (Tablica 4, poglavlje 3.2):
  - verapamil (VER) u koncentraciji 10  $\mu\text{M}$
  - ciklosporin A (CA) u koncentraciji 10  $\mu\text{M}$
  - MK571 u koncentraciji 50  $\mu\text{M}$
  - probenecid (PROB) u koncentraciji 1 i 500  $\mu\text{M}$
  - natrijev ortovanadat (OV) u koncentraciji 50, 100, 500  $\mu\text{M}$  i 2 mM
- sveprisutnom okolišnom zagađivalu i poznatom endokrinom disruptoru:
  - bisfenol A (BPA) u koncentraciji 100 nM i 10, 50, 250  $\mu\text{M}$
- uzorcima čistog i onečišćenog snijega (Slika 15).

Izlaganje je učinjeno na slijedeći način: po pet gujavica stavljeno je u Petrijevu zdjelicu (promjera 90 mm) čije je dno bilo obloženo filter papirom natopljenim s 1,7 mL jednoliko rapoređene ispitivane kemikalije. Prije izlaganja fluorescentnim supstratima gujavice su kroz 24 h bile izložene inhibitorima (predtretman) (kontrola je sadržavala samo destiliranu vodu). Nakon toga su premještene na filter papir s mješavinom modulatora i fluorescentnog supstrata (RB ili R123) (kontrolna skupina bila je izložena isključivo fluorescentnom supstratu) i izlagane kroz 24 h ili 48 h.

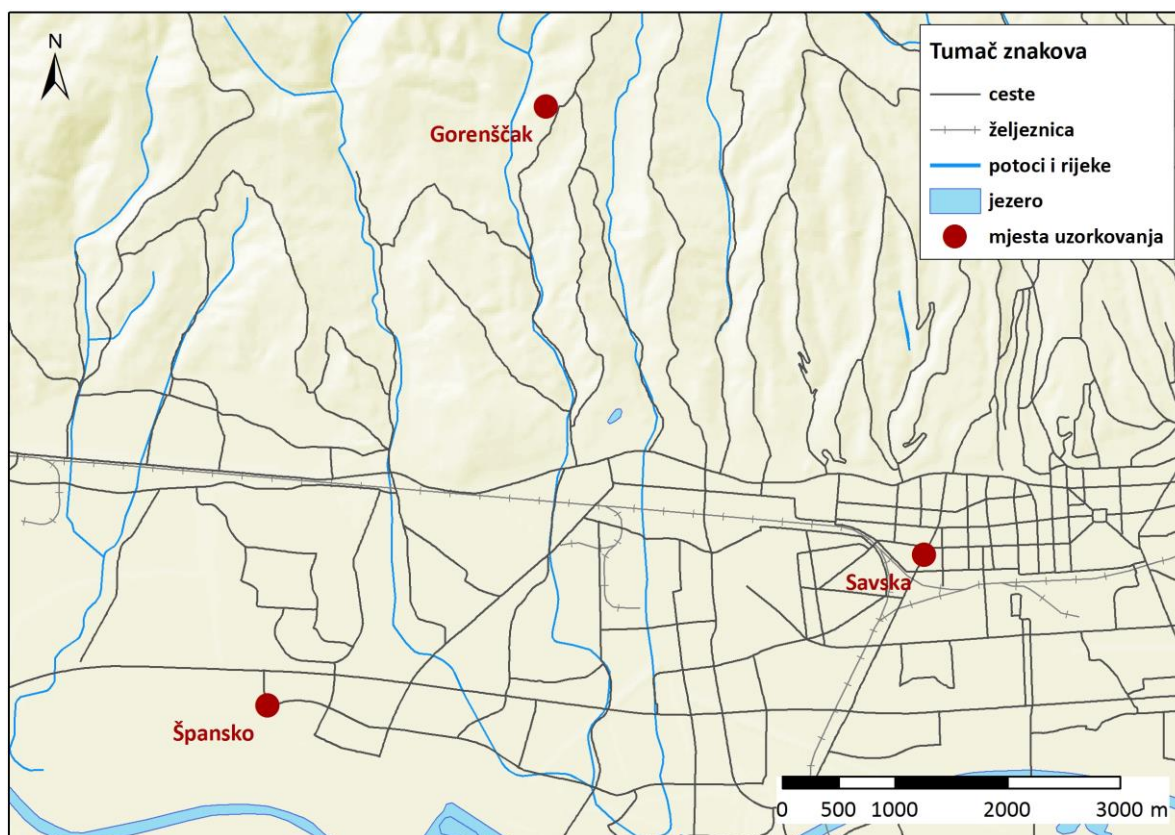
U zasebnim pokusima, umjesto poznatih MXR inhibitora gujavice su izložene mješavini BPA ili uzorka snijega s fluorescentnim supstratom. Tijekom trajanja pokusa Petrijeve zdjelice bile su zatvorene perforiranim poklopcima te su pokusne životinje držane u tami na temperaturi od  $20 \pm 1$  °C (Slika 14; dolje).



**Slika 14.** Prikaz čišćenja gujavica (na slici gore lijevo) i test kontakta na filter papiru (na slici dolje).

#### 4.2.1.2. Utvrđivanje utjecaja snijega na MXR aktivnost

Uzorci snijega uzorkovani su 18. siječnja 2013. godine na tri lokacije - Savska cesta, Ulica Gorenščak i Špansko naselje (grad Zagreb) (Slika 15). U Savskoj ulici i Španskom naselju uzeti su uzorci onečišćenog snijega (neposredno uz prometnicu), dok je u Ulici Gorenščak sakupljen uzorak čistog snijega. Uzorci su do početka izvođenja pokusa pohranjeni na  $-20^{\circ}\text{C}$ . Nakon otapanja su profiltrirani kroz Sterile Cellulose Acetate Syringe filtere (Veličine: 33mm,  $0.45\ \mu\text{m}$  i  $0.2\ \mu\text{m}$ ) te im je izmjeren pH.



**Slika 15.** Prikaz mjesta uzorkovanja. Karta je izrađena uz pomoć softverskog programa ArcMap 10.0.

#### 4.2.1.3. Mjerenje fluorescencije rodamina

Nakon 24 i 48-satnog izlaganja mješavini modulatora/BPA/snijega i fluorescentnog supstrata uslijedilo je mjerenje akumulacije fluorescentnog supstrata rodamina u stanici, što neposredno ukazuje na stupanj aktivnosti ABC transportera.

Gujavice su izvagane i pojedinačno homogenizirane (~30 sekundi) Ultra-Turray T18 homogenizatorom (IKA, Germany) u 2 mL hladnog fosfatnog pufera (pH=7.4). Homogenat je prebačen u plastične kivete volumena 2 mL i centrifugiran pri brzini 9000 g u trajanju 10 minuta (Eppendorf 5417C centrifuga, Hamburg, Njemačka) pri 4°C. Supernatant je prenesen u crnu mikroploču (Nunc, Thermo Fisher Scientific, Denmark), nakon čega je izmjerena fluorescencija rodamina u triplikatima (po 200 µL) (FLUOstar OPTIMA platereader (BMG Labtech Ltd., Aylesbury, UK)). Valne duljine za mjerenje fluorescence iznosile su 544 nm (ekscitacija) i 590 nm (emisija) za rodamin B, te 490 nm (ekscitacija) i 544 nm (emisija) za rodamin 123. Tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela uzorci su držani na ledu i u tami kako bi se spriječila fotodegradacija rodamina. Količina akumuliranog rodamina u pojedinom uzorku prikazana je kao fluorescentna jedinica (FJ) / masa gujavice (mg) te je za potrebe prikaza rezultata pretvorena u postotke.

#### **4.2.2. Utvrđivanje djelomičnog nukleotidnog slijeda gena koji kodira za P-glikoprotein**

##### **4.2.2.1. Konstrukcija početnica**

Konstrukcija početnica (eng. *primer*) izvedena je pomoću više programa; upotrebljen je primerSelect iz programskog paketa DNASTar (DNASTar, Inc., USA), Primer3Output te Pairwise Alignment/Optimal Global Alignment iz BioEdit-a. Početnice su dizajnirane na temelju konzerviranosti poznatih proteinskih i genskih slijedova između taksonomski različitih vrsta.

Za detektiranje MRP i BRCA proteine korištene su i degenerirane početnice koje sadrže smjesu oligonukleotida sa svim mogućim kodonima za svaku aminokiselinu u slijedu određenog peptida. Ukoliko na nekom od položaja može biti bilo koja od četiri baze, početnice se sintetiziraju na način da smjesa sadrži slijed u kojem je svaka baza zastupljena po 25%. Degenerirane početnice korištene su za pokušaj detektiranja MRP2 proteina, a dizajnirane su na temelju poznatih proteinskih slijedova iz genoma školjkaša (*Mytilus californianus*), oblića (*Caenorhabditis elegans*), plaštenjaka (*Ciona intestinalis*), čovjeka (*Homo sapiens*), ribe zebrice (*Danio rerio*). Oligonukleotidne početnice sintetizirane su u Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, SAD) i Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

#### 4.2.2.2. Pročišćavanje i analiza ukupne RNA

Pročišćavanje ukupne RNA napravljeno je uz pomoć kompleta EZ-10 Spin Column Total RNA Mini-preps Super Kit (Bio Basic Inc., Ontario, Canada). Komplet je korišten prema uputama proizvođača, osim prvog koraka kada je komadić tkiva gujavice (~ 100 mg) homogeniziran u RTL puferu 30 sekundi u 450  $\mu\text{L}$  RTL pufera uz pomoć Ultra-Turray T18 homogenizatora (IKA, Germany). Pročišćena RNA je eluirana s kolone uz pomoć 35  $\mu\text{L}$  deionizirane vode bez RNA, te su uzorci pohranjeni na  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Spektrofotometrijska provjera količine i čistoće RNA analizirana je uz pomoć uređaja BioSpec nano (Shimatzu Biotech, Kyoto, Japan), uz apsorpciju pri valnim duljinama od 260 i 280 nm. Analizirani volumen uzorka iznosio je 1  $\mu\text{L}$ . Koncentracija RNA iznosila je 120 ng/ $\mu\text{L}$ , a čistoća 2.17 (OD 260/280) i 0.35 (OD 260/230). Dobiveni iznosi upućivali su kako izolirana RNA ima zadovoljavajuću koncentraciju i čistoću te da nije kontaminirana.

#### 4.2.2.3. Reverzna transkripcija

Ukupna izolirana RNA metodom reverzne transkripcije prevedena je u stabilniju cDNA (komplementarna DNA, eng. *complementary DNA*). Postupak reverzne transkripcije napravljen je uz pomoć kompleta PrimeScript First Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa Bio Inc, Kyoto, Japan) prema uputama proizvođača, koristeći OligodT i nasumične heksamerne početnice.

##### Postupak:

- Na ledu je dodano:

Ukupna RNA	3 $\mu\text{L}$
OligodT	1 $\mu\text{L}$
Deionizirana voda ( $\text{dH}_2\text{O}$ )	4 $\mu\text{L}$

- Smjesa je inkubirana pri  $65^{\circ}\text{C}/5$  min, nakon čega je odmah prebačena na led.
- Smjesi je na ledu dodano (do ukupnog volumena 20  $\mu\text{L}$ ):

5x PrimeScript pufer	4 $\mu\text{L}$
RNase inhibitor	0.5 $\mu\text{L}$
PrimeScript Reverse Transcriptase (200 U)	1 $\mu\text{L}$
Deionizirana voda ( $\text{dH}_2\text{O}$ )	4.5 $\mu\text{L}$

- Smjesa je inkubirana pri 42°C/60 min (reverzna transkripcija).
- Smjesa je inkubirana pri 70°C/15 min (inaktivacija enzima), nakon čega je odmah prebačena na led.

#### 4.2.2.4. Lančana reakcija polimerazom (eng. *Polymerase Chain Reaction*; PCR)

Lančana reakcija polimerazom (PCR) je metoda umnažanja određenog DNA fragmenta u *in vitro* uvjetima. Reakcija se odvija u nekoliko ciklusa koji uključuju denaturaciju kalupa DNA, specifično vezanje oligonukleidnih početnica na jednolančane DNA i sintezu komplementarnih lanaca DNA. Prethodno dobivena cDNA poslužila je kao kalup za umnožavanje fragmenta gena za P-gp.

##### Reakcijska smjesa sadržavala je:

- |                               |            |
|-------------------------------|------------|
| • Q5 reakcijski pufer (5x)    | 5 µL       |
| • dNTP (2 mM)                 | 0.5 µL     |
| • Oligonukleotidne počenicice |            |
| - Uzvodne                     | 1.25 µL    |
| - Nizvodne                    | 1.25 µL    |
| • Q5 polimeraza (20 U/µL)     | 0,25 µL    |
| • Deionizirana voda           | do 25 ml   |
| • cDNA                        | 1 ili 2 µL |

Volumen reakcijske mjesa je iznosio 25 µL.

Reakcijsko umnožavanje odvijalo se u tubicama volumena 200 µL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) u uređaju Mastercycler personal (Eppendorf, AG, Hamburg, Njemačka).

##### Program izvođenja PCR-a bio je slijedeći:

- |   |               |
|---|---------------|
| • Početna denaturacija kalupa:            | 98°C / 30 sec |
| • 32 ciklusa pri navedenim temperaturama: |               |
| - Denaturacija:                           | 98°C / 10 sec |
| - Sparivanje početnica:                   | * °C / 20 sec |

\* Temperatura prilikom sparivanja početnica ovisila je o samim početnicama te je navedena u Tablici 12 (poglavlje 4.1.2.).

- Produljivanje lanaca: 72°C / 2 min
- Završno produljivanje lanaca: 72°C / 2 min

Nakon završetka PCR reakcije, uzorci su pohranjeni na 4°C do provođenja elektroforeze.

#### 4.2.2.5. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu

Elektroforeza u agaroznom gelu je metoda koja brzo i jednostavno omogućuje identifikaciju, razdvajanje, određivanje količine i pročišćavanje DNA. Zasniva se na pokretljivosti fragmenata DNA pod utjecajem istosmjernog električnog polja u ovisnosti o njihovoj molekularnoj masi, zbog čega se kraći DNA fragmenti kreću brže u odnosu na duže fragmente koji brzinom zaostaju.

Elektroforezom u 1%-tnom agaroznom gelu analizirane su molekule DNA dobivene PCR-om i kloniranjem. Dobivene smjese DNA produkata razdvojene su u električnom polju napona 60 V, u 1xTAE puferu s etidijevim bromidom, oko 30 minuta. Slike gelova fotografirane su digitalnom kamerom (Canon SD850 IS, Japan).

#### 4.2.2.6. Izdvajanje DNA iz agaroznog gela i pročišćavanje

Nakon elektroforetskog razdvajanja određene su veličine dobivenih fragmenata usporedbom s molekularnim biljegom MassRuler™ DNA Ladder (Fermentas). Fragmenti DNA očekivane veličine su izrezani i pročišćeni uz pomoć kompleta QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany), prema uputama proizvođača.

#### 4.2.2.7. Kloniranje odsječka DNA

Kloniranje odsječka DNA odvija se u nekoliko koraka te obuhvaća: a) pripremu plazmidne DNA (plazmid, vektor) i odsječka DNA (insert) koji namjeravamo klonirati; b) ligaciju (spajanje) plazmidne DNA i inserta u novu molekulu rekombinantnog plazmida; c) transformaciju bakterija rekombinantnim plazmidom; d) odabir "pozitivnih" kolonija (one kolonije koje posjeduju željeni rekombinantni plazmid).

S obzirom na krajeve DNA vektora i inserta provodili smo "AT kloniranje" koristeći komplet pGEM-T Vector System (Promega, Madison, WI, USA) i slijedeći



upute proizvođača. Radi se o specifičnoj vrsti kloniranja koja se provodi najčešće na DNA odsječcima (insertima) dobivenih PCR-om. Kako bi se uspješno klonirao DNA odsječak potrebna je prethodna reakcija u kojoj *Taq* polimeraza na 3' kraj PCR odsječka dodaje A-deoksinukleotid.

Za dodavanje deoksiadenina (eng. *A-tailing*) upotrijebljeno je:

- 7  $\mu$ L DNA fragmenta,
- 1  $\mu$ L dATP (2 mM),
- 1  $\mu$ L pufera (10x)
- 1  $\mu$ L Ex-Taq polimeraze (5 U)

Ukupni volumen od 10  $\mu$ L inkubiran je 30 minuta na 72 °C.

#### 4.2.2.7.1. Spajanje (ligacija) plazmida i inserta

Spajanje (ligacija) je postupak u kojem se stvaraju fosfodiesterske veze između plazmida i inserta uz pomoć enzima T4 DNA-ligaze. Inserti dobiveni prethodnom PCR reakcijom klonirani su u komercijalno dostupan plazmid pGEM – T Easy iz *pGEM – T Vector System I* kompleta (Promega, Madison, WI, USA).

Smjesa za ligaciju plazmida s fragmentom DNA sadržavala je:

- 2  $\mu$ L ligacijskog pufera (5x Rapid Ligation Buffer),
- 1  $\mu$ L pGEM-vektora (50 ng),
- 3  $\mu$ L DNA produkta (120 ng/ $\mu$ L),
- 1  $\mu$ L T4 DNA ligaze,
- 3  $\mu$ L dH<sub>2</sub>O.

Ukupni volumen od 10  $\mu$ L inkubiran je preko noći pri 16 °C.

#### 4.2.2.7.2. Transformacija stanica *E. coli*

Transformacija je naziv za unos plazmidne DNA u bakteriju. Postupak se odvija u dva koraka: a) pripreme kompetentnih bakterija kako bi mogle prihvatiti stranu DNA; b) postupak transformacije u kojem plazmidna DNA ulazi u bakterijsku stanicu, nakon čega se odabiru bakterije koje sadrže unesen plazmid.

Ligacijska smjesa koja sadrži plazmidnu DNA unosi se u *E. coli* s ciljem identifikacije i izdvajanja rekombinantnog plazmida. Kako bi *E. coli* postala

kompetentna i sposobna prihvatiti plazmidnu DNA, obrađivana je solima (rubidij kloridom). Nakon što je bakterijskim stanicama laganim miješanjem dodano po 3  $\mu$ L ligacijske smjese, izložene su temperaturnom šoku (30 min na ledu, zatim 20 sec na 42°C pa ponovno 2 min na ledu) kako bi nastanak pora na membranama samih stanica *E. coli* omogućio ugradnju plazmidne DNA. Bakterije su nakon temperaturnog šoka regenerirane u 1 mL SOC-a (pri sobnoj temperaturi), nakon čega su nacijspljene na selektivne krute LB podloge s dodatkom antibiotika ampicilina, IPTG i X-galte inkubirane preko noći inkubirane pri 37 °C.

#### **4.2.2.7.3. Odabir pozitivnih bakterijskih kolonija**

Nakon transformacije izvršili smo odabir pozitivnih bakterijskih kolonija (one bakterijske stanice koje u sebi sadrže plazmid u koje je uspješno ukloniran željeni odsječak DNA), na principu plavo-bijele selekcije.

Plazmid pGEM-T Easy (Promega) nosi dio gena lacZ koji kodira N-kraj enzima  $\beta$ -galaktozidaze, dok sama bakterijska stanica *E. coli* u svom genomu nosi dio gena koji kodira C-kraj. Spajanjem djelova gena koji kodiraju za N-kraj i C-kraj nastaje aktivna molekula enzima  $\beta$ -galaktozidaze koja uz prisutnost IPTG-a razgrađuje supstrat (X-gal) te nastala kolonija poprimi plavu boju. Ugradnjom inserta u bakterijsku stanicu onemogućena je sinteza N-kraja enzima  $\beta$ -galaktozidaze, zbog čega nastala kolonija poprima bijelu boju. S obzirom na prisutnost ampicilina (omogućava rast bakterija koje sadrže rezistenciju na navedeni antibiotik) te IPTG i X-gal spojeva (koji omogućuju plavo-bijelu selekciju u ovisnosti o postojanju inserta), omogućena nam je izolacija bakterijskih stanica s umetnutim željenim DNA odsječkom.

Za izolaciju plazmidne DNA iz dvije bijele kolonije korišten je QIAGEN MiniPrep Kit (Qiagen, Njemačka), slijedeći protokol proizvođača.

#### 4.2.2.8. Određivanje primarne strukture DNA (sekvenciranje)

Jednu od najčešće korištenih metoda za određivanje slijeda nukleotida razvio je Frederick Sanger 70-tih godina 20. stoljeća, za što je 1980. godine nagrađen Nobelovom nagradom. Metoda je u čast znanstveniku nazvana Sangerovom dideoksi metodom, a zasniva se na zaustavljanju enzimatske sinteze DNA ugradnjom dideoksiribonukleozid-fosfata (ddNTP). DNA polimeraza (enzim koji sintetizira DNA) u DNA lanac može umjesto dNTP-ova ugraditi ddNTP koji ne posjeduju hidroksilnu skupinu. Zbog nemogućnosti stvaranja fosfodiesterne veze sa sljedećim nukleotidom, zaustavlja se daljnja sinteza DNA. Pošto se u smjesi nalazi veća količina dNTP-ova (dATP, dCTP, dGTP i dTTP) u odnosu na ddNTP-ove, oni se manjom učestalošću ugrađuju u DNA. Svaki puta kada se u DNA lanac ugradi ddNTP, sinteza završava. S obzirom da sinteza novih lanaca završava na različitim mjestima (ovisno o ugradnji ddNTP-a), nastat će fragmenti DNA različitih dužina. Kako bismo uspjeli odrediti slijed nukleotida, koristili smo ddNTP-ove obilježene s četiri različite fluorescentne boje ("četverbojna kemija"). Prilikom provođenja kapilarne elektroforeze, uzorci se razdvajaju putujući kroz dugu i tanku kapilaru te na taj način četiri odvojene reakcije (svaka s različitim ddNTP-om) daju potpunu informaciju o slijedu nukleotida u molekuli DNA (Ćetković 2007).

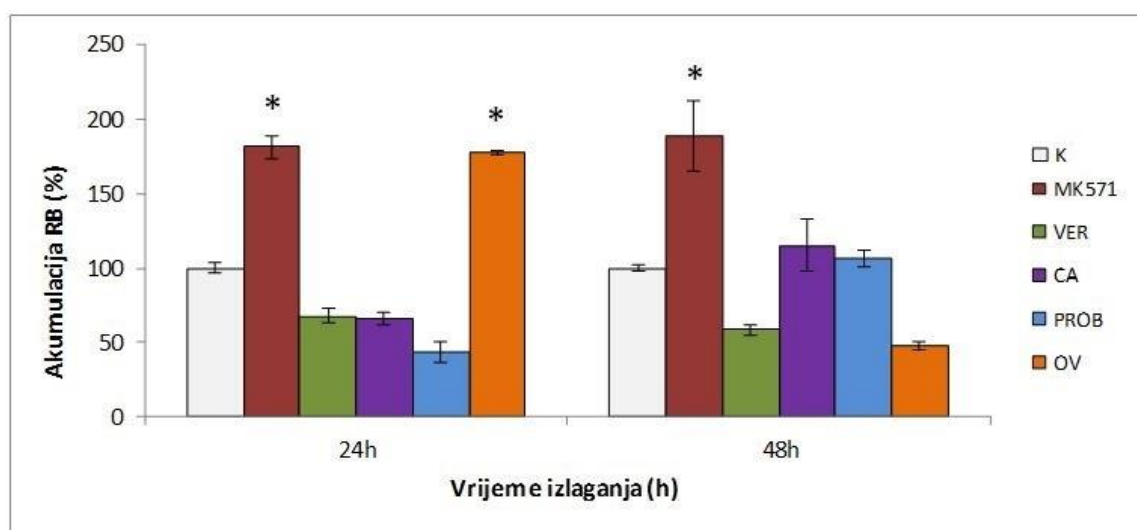
Primarna struktura molekule DNA svih konstrukata određena je sekvenciranjem u DNA servisu Laboratorija za molekularnu genetiku Instituta Ruđer Bošković (ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyser, Applied Biosystem).

## 5. REZULTATI

### 5.1. Utvrđivanje funkcionalne aktivnosti MXR mehanizma kod gujavice vrste *E. fetida*

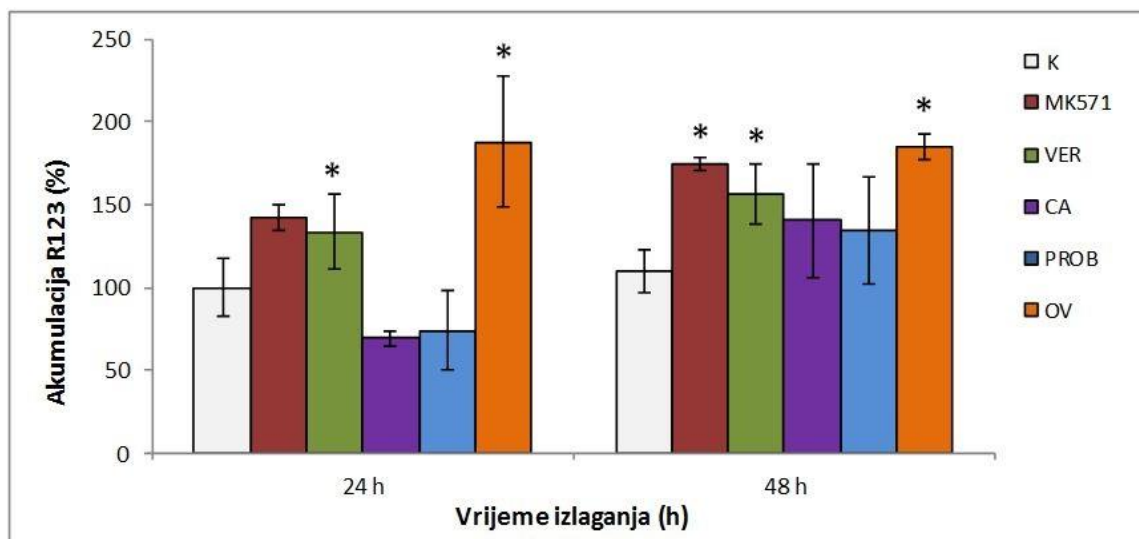
#### 5.1.1. Akumulacija fluorescentnih supstrata u tkivu gujavice *E. fetida* u prisutnosti inhibitora MXR mehanizma

Kako bismo istražili zaštitnu ulogu ABC transportera u obrani stanice (organizma) od okolišnih čimbenika, u prvoj fazi rada gujavice vrste *E. fetida* su izložene fluorescentnim supstratima - rodaminu B (RB) i rodaminu 123 (R123), u prisutnosti različitih MXR inhibitora - verapamila (VER), ciklosporina A (CA), MK571, probenecida (PROB) i natrijevog ortovanadata (OV). Izlaganje gujavica je izvršeno metodom kontakta na filter papiru (poglavlje 4.2.1.1.).



**Slika 16.** Akumulacija rodamina B (RB) u tkivu *E. fetida* nakon 24 i 48 h, u prisutnosti MXR modelnih inhibitora (50  $\mu$ M MK571, 10  $\mu$ M VER, 10  $\mu$ M CA, 500  $\mu$ M PROB, 100  $\mu$ M OV). Rezultati su izraženi u postocima (%) inhibicije MXR mehanizma, s obzirom na akumulaciju RB u kontroli (100%), kao prosječna vrijednost pentaplikata (n=5), s oznakama za SD.

\* Statistički značajna razlika ( $p < 0.05$ ) u usporedbi s kontrolom koja nije tretirana inhibitorima.

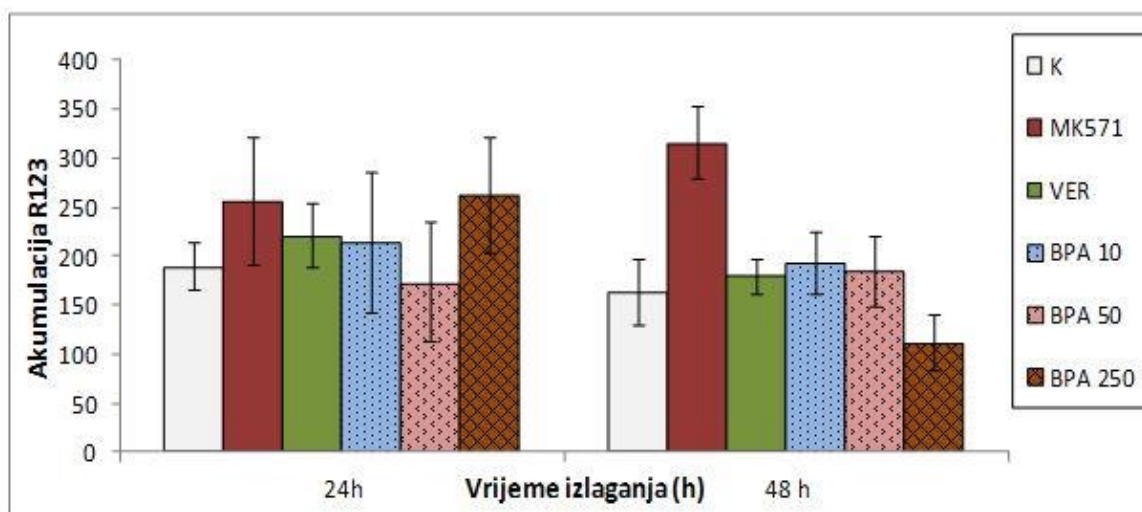


**Slika 17.** Akumulacija rodamina 123 (R123) u tkivu *E. fetida* nakon 24 i 48h, u prisutnosti MXR modelnih (50  $\mu$ M MK571, 10  $\mu$ M VER, 10  $\mu$ M CA, 500  $\mu$ M PROB, 100  $\mu$ M OV). Rezultati su izraženi u postocima (%) inhibicije MXR mehanizma, s obzirom na akumulaciju R123 u kontroli (100%), kao prosječna vrijednost pentaplikata (n=5), s oznakama za SD.

\* Statistički značajna razlika ( $p < 0.05$ ) u usporedbi s kontrolom koja nije tretirana inhibitorima.

Akumulacija RB u tkivima nakon 24-satnog izlaganja MXR inhibitorima iznosila je  $13.87 \pm 4$  FJ/mg, a nakon 48h akumulirana vrijednost iznosila je  $13.13 \pm 2$  FJ/mg. Istovremeno, akumulacija R123 nakon 24h iznosila je  $177 \pm 27$  FJ/mg, a nakon 48h  $194 \pm 44$  FJ/mg. Akumulacija RB u tkivu gujavica u prisutnosti MK571 i OV inhibitora nakon 24h povećala se za 81.6 FJ/mg, odnosno za 78%. Nakon produženog perioda izlaganja (48h), zabilježen je porast koncentracije RB u tkivima samo u prisutnosti MK571 inhibitora (88 %) (Slika 16). Nakon 24-satnog izlaganja inhibitorima udio R123 u tkivima se, u odnosu na kontrolnu vrijednost, povećao: 42 % u prisutnosti MK571, 34% za VER i 88% za OV. Izlaganje gujavica inhibitorima CA i PROB nije rezultiralo povećanjem akumulacije R123 nakon 24h. Kroz vremenski period od 48h zabilježen je porast koncentracije R123 u tkivu gujavica prilikom tretiranja svakim inhibitorom pojedinačno, i to u rasponu od 35 do 85% (Slika 17). U nastavku eksperimentalnog dijela kao fluorescentni modelni supstrat korišten je R123.

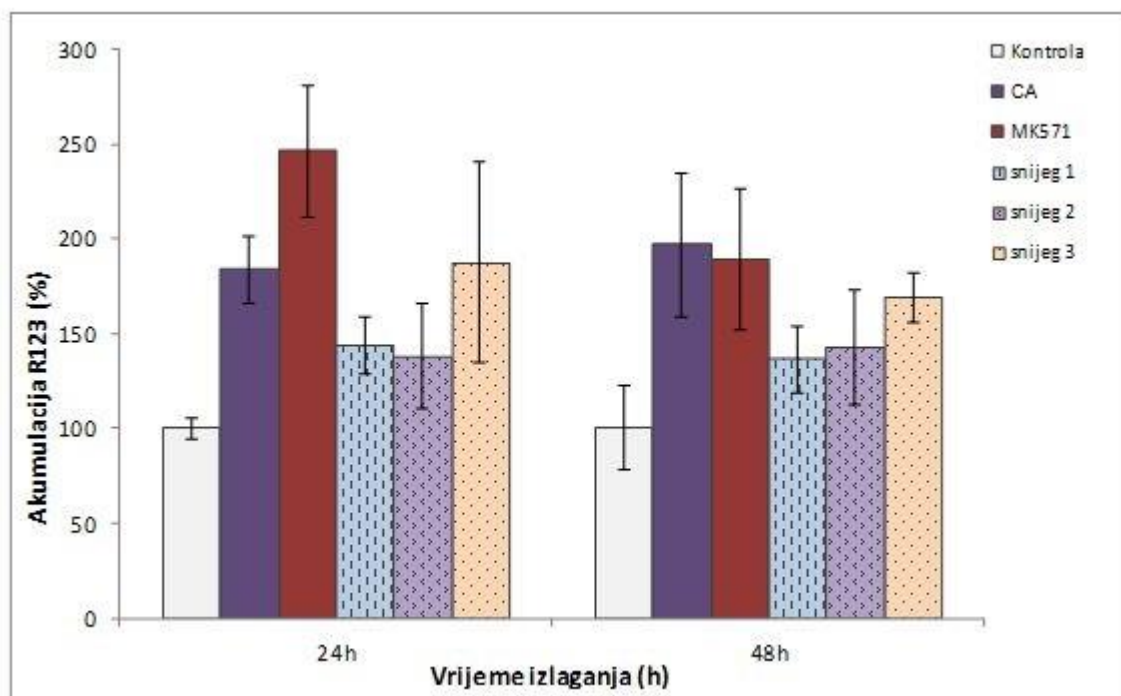
### 5.1.2. Akumulacija rodamina 123 u tkivu gujavice *E. fetida* u prisutnosti bisfenola A



**Slika 18.** Akumulacija rodamina 123 (R123) u tkivu *E. fetida* nakon 24 i 48h u prisutnosti 10, 50 i 250  $\mu\text{M}$  bisfenola A te MXR modelnih inhibitora (50  $\mu\text{M}$  MK571) i VER 10  $\mu\text{M}$ ). Rezultati su izraženi u postocima (%) inhibicije MXR mehanizma, s obzirom na akumulaciju R123 u kontroli (100%), kao prosječna vrijednost triplikata ( $n=3$ ), s oznakama za SD.

Kako bi se utvrdilo ima li BPA inhibitorni učinak na MXR mehanizam, gujavice su izlagane trima koncentracijama - 10, 50 i 250  $\mu\text{M}$ . Kao kontrola, izlagane su i najučinkovitijim modelnim inhibitorima koji su utvrđeni prethodnim pokusom: MK571 i VER, te R123 kao fluorescentnom supstratu (Slika 18). Najveća akumulacija R123 u tkivima gujavica izmjerena je nakon 24h izlaganja 250  $\mu\text{M}$  BPA - 72.7 FJ/mg, odnosno 38% više od kontrole. Za vrijeme izlaganja 10  $\mu\text{M}$  BPA (24h) akumulacija R123 iznosila je 24.7 FJ/mg, odnosno 13.1%. Nakon 48-satnog izlaganja porast koncentracije R123 zabilježen je kod 10 i 50  $\mu\text{M}$  koncentracije BPA i to 28.9 FJ/mg (17%) te 20.8 FJ/mg (12.8%). 24-satno izlaganje 50  $\mu\text{M}$  i 48-satno izlaganje 250  $\mu\text{M}$  BPA nije rezultiralo povećanjem akumulacije R123 unutar tkiva.

### 5.1.3. Akumulacija rodamina 123 u tkivu gujavice *E. fetida* u prisutnosti čistog i onečišćenog snijega



**Slika 19.** Akumulacija rodamina 123 (R123) u tkivu *E. fetida* nakon 24 i 48-satnog izlaganja uzorcima čistog i onečišćenog snijega. Čisti snijeg je uzorkovan u Ulici Gorenščak (snijeg 1), dok su uzorci zagađenog snijega sakupljeni u u naselju Špansko (snijeg 2) i u Savskoj ulici (snijeg 3) (Slika 15, poglavlje 4.2.1.2.). Za pozitivnu kontrolu, gujavice su tretirane MXR modelnim inhibitorima MK571 (50  $\mu$ M) i CA (10  $\mu$ M). Rezultati su izraženi u postocima (%) inhibicije MXR mehanizma, s obzirom na akumulaciju R123 u kontroli (100%), kao prosječna vrijednost triplikata ( $n=3$ ), s oznakama za SD.

Izlaganje gujavica svima trima uzorcima snijega rezultiralo je povećanom akumulacijom fluorescentnog supstrata u tkivima u odnosu na kontrolu. Uzorak 1 uzrokovao je porast akumulacije R123 od 32.2 FJ/mg (44%) nakon 24h, a 41.4 FJ/mg (36.7%) nakon 48h. Nakon 24-satnog izlaganja uzorku 2 akumulacija R123 povećala se za 28.4 FJ/mg (38.5%), dok se nakon 48h vrijednost povećala na 48.1 FJ/mg (42.6%). Najveće koncentracije supstrata u tkivima izmjerene su nakon

izlaganja gujavica uzorku 3, što se očituje porastom akumulacije R123 od 64.8 FJ/mg, odnosno 88% nakon 24h. Uslijed produženog izlaganja (48h) vrijednost se smanjila na 78.2 FJ/mg, odnosno 69.3%. Dobivene vrijednosti akumulacije modelnog substrata (Slika 19) ukazuju na inhibitorni učinak onečišćenog snijega na transportnu aktivnost MXR mehanizma.

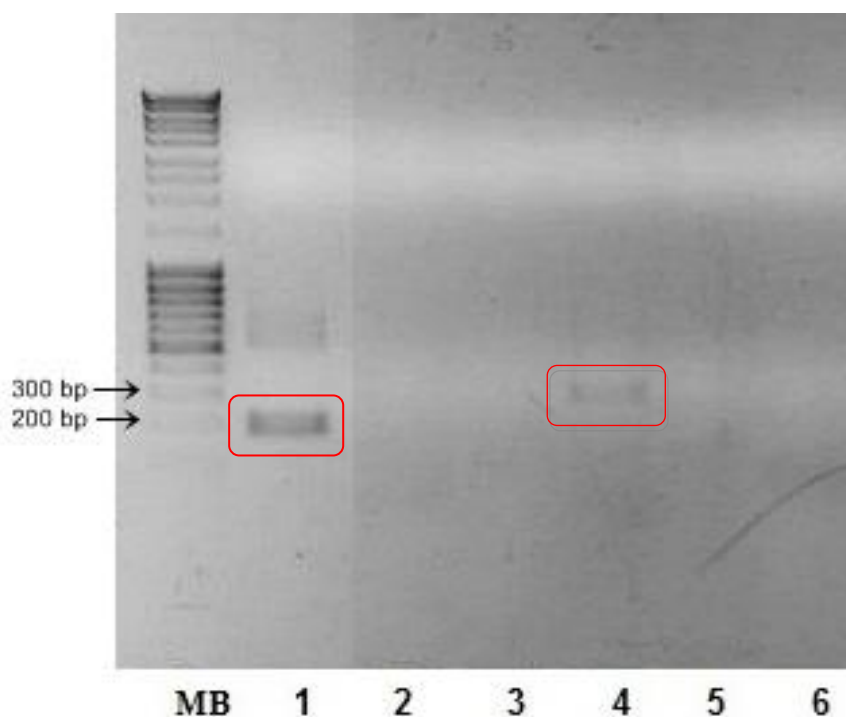
Koncentracija R123 uslijed 24h izlaganja inhibitorima CA povećala se za 61.7 FJ/mg, odnosno 83.85%. Za MK571 povećanje je iznosilo 107.9 FJ/mg, odnosno 146%. Nakon 48h akumulacija R123 uslijed izlaganja CA povećala se za 109.8 FJ/mg, odnosno za 97.2% u odnosu na kontrolnu vrijednost. Uslijed 48-satnog izlaganja MK571 nije zabilježen porast koncentracije R123 u tkivima u odnosu na 24-satnu vrijednost.

Izmjerene pH vrijednosti iznosile su: uzorak 1 (Gorenščak) pH = 4.78, uzorak 2 (Špansko naselje) = 8.23 i uzorak 3 (Savska) = 8.79.

## **5.2. Utvrđivanje djelomičnog nukleotidnog slijeda gena koji kodira za P-gp gujavice *E. fetida***

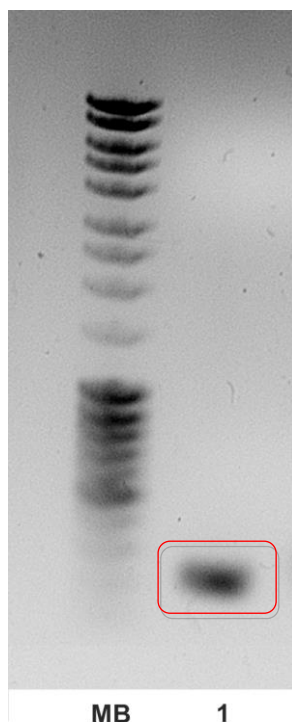
Nakon pročišćavanja ukupne RNA iz tkiva gujavica, provjerena je njezina količina i kvaliteta. Koncentracija RNA iznosila je 120 ng/ $\mu$ L, a sekundarna mjera čistoće 2.17. Nakon prevođenja RNA u cDNA postupkom reverzne transkripcije, dobivena cDNA je poslužila kao kalup za pokušaj umnožavanja fragmenata gena koji kodiraju za P-gp, MRP i ABCG2 proteine, uz pomoć lančane reakcije polimerazom (PCR). Kao što je prikazano na Slici 20, korištenjem početnica guje 1 i guje 2 (Tablica 12, poglavlje 4.1.2.) dobiven je odsječak očekivane veličine (oko 200 pb), kao i veći nespecifični odsječak (500-700 pb). Zaključeno je da je odsječak očekivane veličine umnožen dio gena koji kodira za Pgp protein gujavice *E. fetida*. Nadalje, u jamici br. 4, uz početnice 205 i 298, dobiven je odsječak odgovarajuće veličine (oko 300 pb). Međutim, iako je veličina upućivala na fragment gena koji kodira za MRP2 protein, zbog malog prinosa odlučeno je da se ovaj fragment neće dalje klonirati. S ostalim kombinacijama početnica nije došlo do umnažanja željenog produkta.





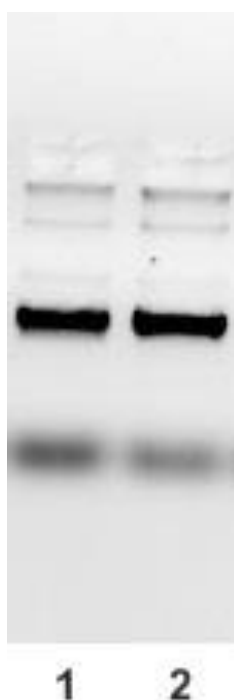
**Slika 20.** Pokušaj umnažanja odsječaka koji kodiraju za P-gp, MRP i ABCG2 proteine gujavice *E. fetida*. (MB) Molekularni biljeg Mass RulerDNA™ Ladder Mix (Fermentas), (1) umnažanje fragmenta gena koji kodira za Pgp protein uz pomoć početnica guje 1 i 2, (2) početnice 202 i 203, (3) početnice 204 i 207, (4) početnice 205 i 208, (5) početnice 206 i 209, (6) početnice 300 i 301. Elektroforeza u 1% agaroznom gelu. Pozitivni rezultati očekivanih fragmenta DNA dobivenih uz pomoć početnica guje 1 i guje 2 na mjestu 1, te kombinacijom početnica 205 i 208 na mjestu 4 označeni su crvenim okvirom.

Kako bismo se riješili nespecifičnog fragmenta, gel smo pročistili. Na Slici 21. vidi se kako je u ponovnom pokušaju umnožavanja dobiven fragment očekivane veličine (oko 200 pb), a istovremeno nije došlo do odvajanja nespecifičnog fragmenta.



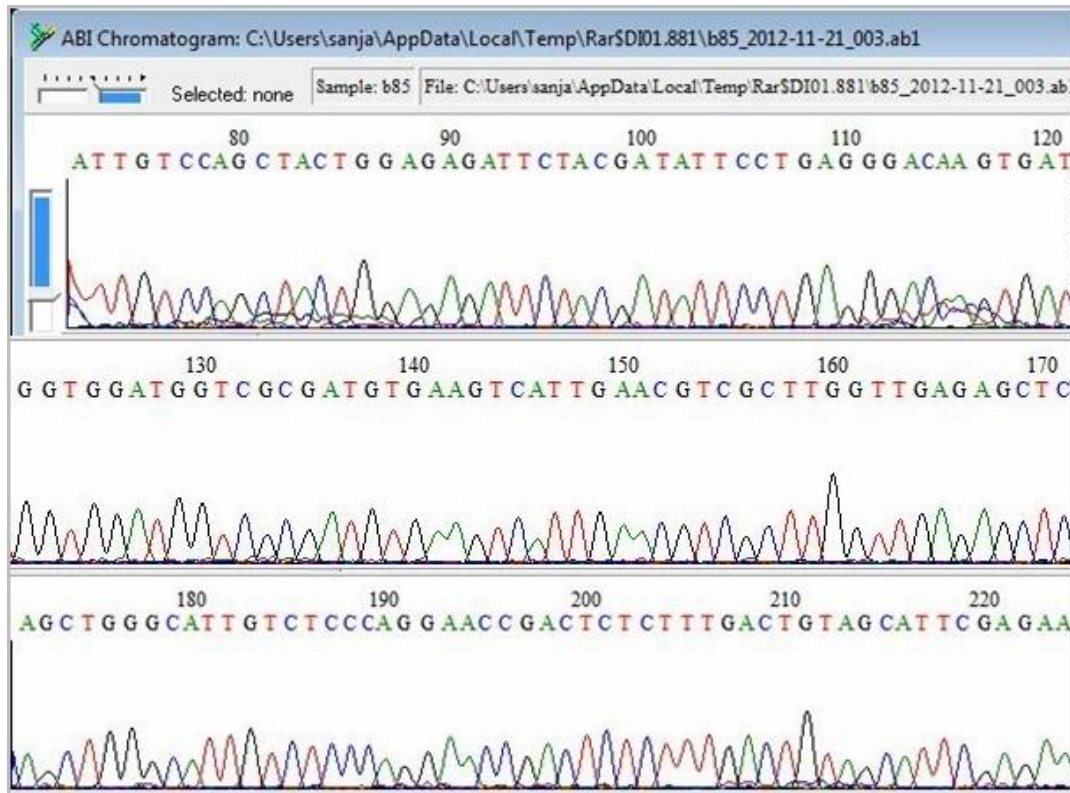
**Slika 21.** Pokušaj umnažanja odsječaka koji kodira za P-gp gujavice *E. fetida*. (MB) Molekularni biljeg Mass RulerDNA™ Ladder Mix (Fermentas), (1) umnažanje fragmenta gena koji kodira za Pgp protein uz pomoć početnica guje 1 i 2. Elektroforeza u 1% agaroznom gelu. Pozitivan rezultat očekivanog fragmenta DNA dobiven uz pomoć početnica guje 1 i guje 2 na mjestu 1 označen je crvenim okvirom.

Nakon izrezivanja i pročišćavanja veličinski očekivanog fragmenta, ubacili smo željeni odsječak DNA u pGEM-T vektor kako bismo ga umnožili i lakše odredili slijed nukleotida. Postupak kloniranja (poglavlje 4.2.2.7), napravljen je uz pomoć početnica pUC/M13 reverse i T7f/3nt extended (Tablica 12, poglavlje 4.1.2.). Nakon transformacije izvršen je odabir pozitivnih bakterijskih kolonija (na principu plavobijele selekcije), a ugradnja inserta potvrđena je PCR metodom na bakterijskim kolonijama (Slika 22). Iz pozitivnih bakterijskih kolonija pročišćena su 2 plazmida.

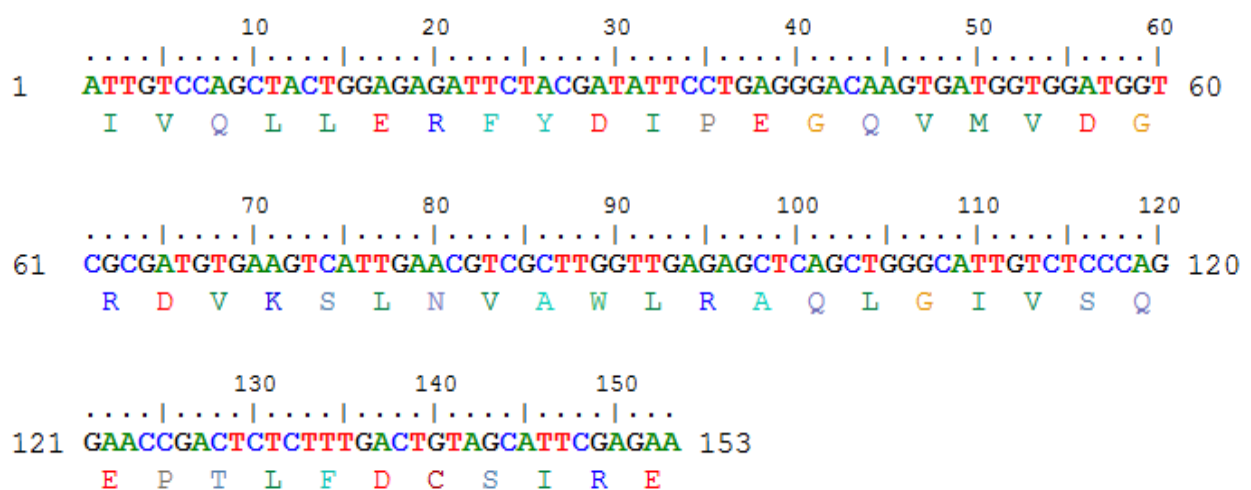


**Slika 22.** Pročišćeni pGEM-T plazmidi koji sadržavaju fragment gena koji kodira za P-gp protein gujavice *E. fetida*.

Pomoću Sangerove dideoksi metode (poglavlje 4.2.2.8.) određen je primarni slijed nukleotida naše sekvence (Slika 23). Dobiveni slijed sekvence sastoji se od od 153 pb, odnosno predikcijom od 51 aminokiseline (Slika 24).



Slika 23. Elektroferogram sekvenciranja DNA Sangerovom dideoksi metodom.



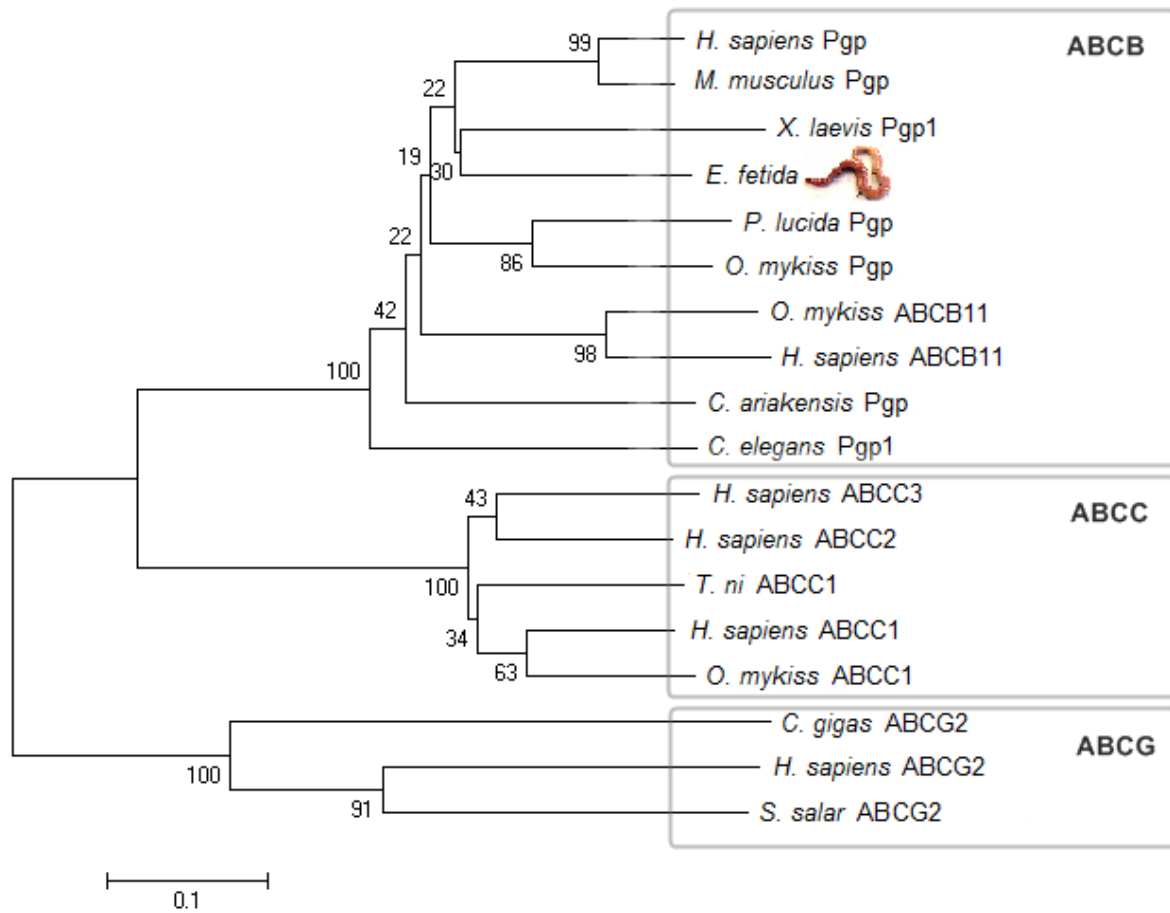
Slika 24. Prikaz dobivene ABCB/Pgp sekvence. Gore - nukleotidni slijed. Dolje - aminokiselinski slijed.

### 5.3. Filogenetička analiza

Kako bi se utvrdilo pripada li dobivena sekvenca doista ABCB1 podporodici, uspoređen je njezin aminokiselinski slijed s već poznatim proteinskim slijedovima ABC transportera ABCB, ABCC i ABCD podporodica iz drugih kralježnjaka i beskralježnjaka (Tablica 13).

**Tablica 13.** Popis upotrebljenih sekvenci korištenih tijekom filogenetičke analize.

I: ABCB transporteri		
Ime vrste	Vrsta ABC transportera	NCBI broj
<i>Homo sapiens</i> (čovjek)	Pgp	AAA59575.1
<i>Mus musculus</i> (kućni miš)	Pgp	AAA39514.1
<i>Caenorhabditis elegans</i> (oblič)	Pgp1	NP_502413.1
<i>Xenopus laevis</i> (Afrička žaba pandžašica)	Pgp1	NP_001081394.1
<i>Poeciliopsis lucida</i>	Pgp	ADQ20481.1
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (kalifornijska pastrva)	Pgp	AAW56424.3
<i>Crassostrea ariakensis</i>	Pgp	AET34454.1
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (kalifornijska pastrva)	ABCB11	NP_001118128.1
<i>Homo sapiens</i> (čovjek)	ABCB11	NP_003733.2
II: ABCC transporteri		
Ime vrste	Vrsta ABC transportera	NCBI broj
<i>Homo sapiens</i> (čovjek)	ABCC1	ABN79590.1
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (kalifornijska pastrva)	ABCC1	NP_001161802.1
<i>Trichoplusia ni</i> (gusjenica)	ABCC1	ADB45217.1
<i>Homo sapiens</i> (čovjek)	ABCC2	CAB45309.1
<i>Homo sapiens</i> (čovjek)	ABCC3	O15438.3
III: ABCG transporteri		
Ime vrste	Vrsta ABC transportera	NCBI broj
<i>Homo sapiens</i> (čovjek)	ABCG2	AAH21281.1
<i>Salmo salar</i> (losos)	ABCG2	ACN10892.1
<i>Crassostrea gigas</i> (oštriga)	ABCG2	EKC19658.1



**Slika 25.** Prikaz filogenetskog stabla dobivenog poravnavanjem (usporedbom) odabranih poznatih proteinskih sekvenci i dobivene sekvence za P-gp iz vrste *E. fetida*. Filogenetsko stablo konstruirano je Neighbor Joining metodom uz pomoć MEGA5 softvera. Bootstrap vrijednost iznosila je 1000.

Dobivena sekvenca za ortolog P-gp u vrsti *E. fetida* najveću identičnost pokazuje s ortologom iz vrste *X. laevis* (NP\_001081394.1; Tablica 12). Izradom filogenetskog stabla te s obzirom na visoku aminokiselinsku identičnost s odabranim P-gp sekvencama (Slika 26), potvrđena je pripadnost dobivene sekvence ABCB podporodici transportnih proteina.

<b><i>E. fetida</i></b>	<b>100</b>																		
<i>H. sapiens</i> ABCC1	29,4	100														<b>ABCC</b>			
<i>H. sapiens</i> ABCC3	31,3	72,5	100																
<i>O. mykiss</i> ABCC1	25,4	80,3	74,5	100															
<i>H. sapiens</i> ABCC2	35,2	76,4	76,4	70,5	100														
<i>T. ni</i> ABCC1	31,3	74,5	70,5	74,5	74,5	100													
<hr/>																			
<i>H. sapiens</i> Pgp	70,5	27,4	27,4	25,4	31,3	29,4	100												<b>ABCB</b>
<i>M. musculus</i> Pgp	72,5	27,4	29,4	27,4	31,3	27,4	90,1	100											
<i>X. laevis</i> Pgp1	66,6	27,4	31,3	23,5	25,4	27,4	66,6	66,6	100										
<i>P. lucida</i> Pgp	64,7	31,3	31,3	31,3	25,4	33,3	60,7	64,7	60,7	100									
<i>O. mykiss</i> Pgp	66,6	31,3	27,4	27,4	29,4	31,3	68,6	68,6	62,7	76,4	100								
<i>O. mykiss</i> ABCB11	60,7	33,3	29,4	31,3	35,2	29,4	64,7	64,7	60,7	58,8	56,8	100							
<i>H. sapiens</i> ABCB11	60,7	33,3	27,4	31,3	29,4	31,3	62,7	60,7	54,9	60,7	64,7	80,3	100						
<i>C. ariakensis</i> Pgp	66,6	33,3	25,4	33,3	35,2	31,3	66,6	64,7	56,8	64,7	60,7	60,7	56,8	100					
<i>C. elegans</i> Pgp1	58,8	33,3	31,3	33,3	31,3	31,3	64,7	66,6	54,9	54,9	56,8	54,9	52,9	58,8	100				
<hr/>																			
<i>H. sapiens</i> ABCG2	7,8	13,7	9,8	13,7	9,8	11,7	11,7	11,7	7,8	9,8	11,7	7,8	11,7	11,7	11,7	100	<b>ABCG</b>		
<i>S. salar</i> ABCG2	7,8	11,7	13,7	15,6	13,7	11,7	11,7	11,7	9,8	7,8	9,8	7,8	9,8	9,8	9,8	54	100		
<i>C. gigas</i> ABCG2	7,8	11,7	9,8	13,7	11,7	9,8	9,8	9,8	5,8	9,8	9,8	7,8	9,8	13,7	9,8	27,4	39,2	100	
	<b><i>E. fetida</i></b>	<i>H. sapiens</i> ABCC1	<i>H. sapiens</i> ABCC3	<i>O. mykiss</i> ABCC1	<i>H. sapiens</i> ABCC2	<i>T. ni</i> ABCC1	<i>H. sapiens</i> Pgp	<i>M. musculus</i> Pgp	<i>X. laevis</i> Pgp1	<i>P. lucida</i> Pgp	<i>O. mykiss</i> Pgp	<i>O. mykiss</i> ABCB11	<i>H. sapiens</i> ABCB11	<i>C. ariakensis</i> Pgp	<i>C. elegans</i> Pgp1	<i>H. sapiens</i> ABCG2	<i>S. salar</i> ABCG2	<i>C. gigas</i> ABCG2	

**Slika 26.** Prikaz identičnosti (%) aminokiselinske sekvence za P-gp iz vrste *E. fetida* usporedene s ostalim odabranim proteinskim sekvencama iz različitih ABC podporodica.

## 6. RASPRAVA

Temelje mehanizma multiksenobiotičke otpornosti (MXR) postavio je akademik Branko Kurelec (1992) polazeći od pretpostavke da vodeni organizmi, s obzirom na mogućnost preživljavanja u iznimno zagađenom okolišu, zasigurno posjeduju učinkovit obrambeni mehanizam. Dosadašnja istraživanja upućuju na to kako glavnu ulogu u obrani stanice (organizma) imaju ABC transporteri koji pripadaju jednoj od najvećih poznatih transmembranskih proteinskih porodica. Za transport i izbacivanje ksenobiotika iz stanica/tkiva životinja odgovorni su ABC transporteri koji pripadaju trima najvažnijim podporodicama: ABCB (P-glikoprotein; P-gp), ABCC (engl. *multidrug resistance-associated proteini*; MRP) i ABCG (engl. *breast cancer resistance protein*; BCRP) podporodici (Cole i Deeley 1998; Ambudakar i sur. 1999; Mao i Unadkat 2005). Glavne karakteristike ABC transportnih proteina uključenih u prijenos ksenobiotika izvan stanice su prisutnost visoko konzerviranih ATP-aznih domena i nespecifičnost za supstrat, zbog čega imaju mogućnost prijenosa širokog spektra endogenih spojeva, ksenobiotika, uključujući i one antropogenog podrijetla. Ukoliko inhibitor ili modulator inhibiraju transportnu aktivnost ABC crpki, onemogućena je obrambena uloga ABC transportnih proteina te dolazi do akumulacije veće količine supstrata, što može u konačnici dovesti do povećanja potencijalne toksičnosti unutar stanice (organizma) (Kurelec 1992; Epel i sur. 2008).

P-gp, MRP i BCRP transmembranski su proteini izrazito eksprimirani i u tumorskim stanicama, gdje imaju sposobnost transporta većine kancerostatika izvan stanice. Tako razvijen fenomen otpornosti stanica raka naziva se mehanizmom otpornosti na različite lijekove (eng. *multidrug resistance*; MDR) (Litman i sur. 2001).

Gujavice vrste *Eisenia fetida* zbog svog načina života u tlu u direktnom su kontaktu s tlom koji ih okružuje, ali istovremeno i sa širokim spektrom endogenih spojeva i ksenobiotika koje apsorbiraju preko polupropusne kutikule i probavnog sustava. Zbog navedenih karakteristika, OECD (1984) organizacija i protokol za testiranje nepoznatih kemikalija preporuča ih kao jedan od najboljih modelnih organizama za ekotoksikološka istraživanja tla. Unatoč povoljnim karakteristikama za ekotoksikološka istraživanja, MXR mehanizam do sada je utvrđen u samo jednoj vrsti gujavica - *Eisenia andrei* (Hackenberger i sur. 2012).

Kako je i prilazano u rezultatima, početni cilj ovog diplomskog rada bio je metodom test kontakta na filter papiru (OECD 1984) utvrditi prisutnost MXR mehanizma u gujavici vrste *E. fetida*, a zatim utvrditi imaju li BPA i uzorci onečišćenog snijega inhibitorni učinak na MXR mehanizam. Provođenjem OECD standardiziranog testa gujavice su bile u mogućnosti preko kutikule apsorbirati testirane spojeve te je praćen utjecaj na aktivnost njihovog MXR mehanizma. Kako bismo utvrdili prisutnost navedenog fenotipa tretirali smo gujavice s pet modelnih inhibitora (verapamil, ortovanadat, ciklosporin A, MK571 i probenecid). Prilikom provođenja funkcionalnog testa za MXR koristili smo dva fluorescentna supstrata - rodamin B i rodamin 123. Princip testa je taj da modelni MXR inhibitori blokiraju aktivnost ABC transportnih proteina, nakon čega zbog nemogućnosti izbacivanja ksenobiotika dolazi do povećane akumulacije fluorescentnih supstrata unutar stanice (organizma). Prema tome, uz pomoć fluorescence je određena koncentracija fluorescentnih supstrata koja je proporcionalna s inhibicijom transportnih proteina. Akumulacija rodamina 123 u prisutnosti MXR inhibitora bila je značajno povećana nakon 24h, dok je u periodu od 48h došlo do inhibicije prilikom testiranja svih pet MXR inhibitora. Pošto s rodaminom B nismo dobili jednako dobre vrijednosti zaključujemo kako bi prilikom korištenja test kontakta na filter papiru dosad korišten rodamin B trebalo zamijeniti rodaminom 123.

Dobiveni rezultati ukazuju kako je došlo do inhibicije MXR mehanizma uz sve korištene inhibitore, što potvrđuje prisutnost ABC transportnih proteina koji sudjeluju u obrani stanice (organizma) od endogenih spojeva i ksenobiotika iz okoliša u tkivu gujavice. Dodatno, povećana akumulacija fluorescentnih supstrata prilikom korištenja specifičnog inhibitora za MRP proteine - MK571, upućuje na postojanje MRP proteina u tkivu gujavice *E. fetida*. Prema tome potvrđujemo kako je provedeni OECD standardiziran filter papir kontakt test valjan test za ekotoksikološka istraživanja, što je potvrđeno i radom Hackenbergera i sur. (2012). Zbog uspješne korelacije dobivenih rezultata sa stvarnim stanjem u okolišu, preporučamo ga kao valjan test u ovakvom tipu ekotoksikoloških istraživanja.

Bisfenol A građevni je materijal polikarbonatne plastike. Iako je vrijeme poluraspada same molekule kratko (2.5-4 dana), zbog široke primjene, sve veće proizvodnje i svakodnevnog ispuštanja u okoliš, BPA postao je sveprisutno okolišno zagađivalo. Kako bismo ispitali djeluje li kao inhibitor (kemosenzitizator) MXR



mehanizma u gujavici vrste *Eisenia fetida*, testirali smo tri koncentracije BPA (250  $\mu$ M, 50  $\mu$ M i 10  $\mu$ M).

Iako naši rezultati upućuju kako BPA nema inhibitorni učinak na aktivnost MXR mehanizma, nastavili smo naše istraživanje praćenjem genske ekspresije Pgp proteina nakon izlaganja gujavica različitim koncentracijama BPA tijekom 10 dana. te ćemo nakon obrade RT-PCR (reverse transcriptase PCR) podataka sa sigurnošću moći potvrditi dolazi li do povećanja ekspresije ABCB1 gena prilikom izloženosti vrste *E. fetida* dvijema okolišno relevantnim koncentracijama BPA (100 nM i 10  $\mu$ M).

Uzorkovanje snijega izvrsna je metoda praćenja onečišćenja okoliša s obzirom da pahulje snijega zbog svojih karakteristika imaju mogućnost akumulacije brojnih atmosferskih spojeva. Tijekom padanja na podlogu, snijeg na sebe akumulira i brojne druge onečišćivače koji se nalaze u donjem sloju, posebice u gradovima. Kako bismo istražili utjecaj snijega na MXR aktivnost, uzorkovali smo snijeg na tri lokacije. Čisti snijeg je uzorkovan u Ulici Gorenščak (snijeg 1), dok su uzorci zagađenog snijega sakupljeni u Španskom (snijeg 2) i u Savskoj ulici (snijeg 3). Rezultati ukazuju na to kako su i uzorci onečišćenog snijega imali blagi inhibitorni učinak, što objašnjavamo mogućnošću snijega da padajući kroz atmosferu akumulira na sebe brojne atmosferske onečišćivače. Iako vizualno čist, snijeg može s kemijskog stajališta biti izrazito onečišćen. Prema očekivanjima, uzorak prljavog snijega imao je najizrazitiji inhibitorni učinak, s obzirom da je u odnosu na uzorke čistog snijega u nižim slojevima na sebe akumulirao čestice čađe te razne spojeve ispušnih plinova. Nakon otapanja snijega, organizmi u tlu bivaju neposredno izloženi svim spojevima koje je snijeg akumulirao prolazeći kroz atmosferu, ali i iz prizemnog sloja nakon taloženja na podlogu. Prema tome zaključujemo kako bi prema dobivenim rezultatima, snijeg mogao narušiti MXR mehanizam kopnenih organizama, posebice u gradovima s razvijenom industrijom te prometom.

U nastavku istraživanja, s obzirom na potvrđenu prisutnost MXR fenotipa u vrsti *E. fetida*, uslijedio je pokušaj identifikacije P-gp i MRP proteina. Zbog limitiranosti mRNA informacijama iz korištenog modelnog organizma, početnice su dizajnirane na temelju konzerviranih nukleotidnih slijedova iz drugih organizama za Pgp i MRP proteine. Kao kalup za umnožavanje fragmenta gena za P-gp poslužila je cDNA molekula dobivena metodom reverzne transkripcije koju smo dobili nakon izolacije ukupne RNA iz tkiva gujavice. Uz pomoć lančane reakcije polimerazom

dobili smo odsječak odgovarajuće veličine (oko 200 pb), za koji smo pretpostavili da je dio gena koji kodira za Pgp protein gujavice *E. fetida*. Uz navedeni odsječak dobili smo i veći nespecifično umnoženi odsječak (500-700 pb), zbog čega kao glavni uzrok navodimo nižu temperaturu prilikom umnažanja lančanom reakcijom polimeraze. Iako smo uz korištenje odgovarajućih početnica za MPR proteine dobili odsječak odgovarajuće veličine, zbog malog prinosa odlučili smo kako taj odsječak neće biti kloniran. Razlog slabog prinosa na agaroznom gelu je premala količina DNA u uzorku zbog čega bi u budućim istraživanjima trebalo povećati količinu DNA u uzorku. S ostalim korištenim kombinacijama početnica nisu dobiveni odsječci gena, zbog čega bi u buduću trebalo optimizirati metodu lančane reakcije polimerazom kako bi došlo do umnažanja željenog produkta. Nakon uklanjanja neželjenog nespecifičnog odsječka ponovljena je metoda lančane reakcije polimerazom pri višoj temperaturi, nakon čega je na gelu došlo do pojave isključivo odsječka odgovarajuće veličine (oko 200 pb). Za dobiveni odsječak pretpostavili smo da je odsječak gena koji kodira za P-gp. Kako bismo to utvrdili, nakon izrezivanja i pročišćavanja veličinski očekivanog fragmenta, ligacijom smo ubacili željeni odsječak u pGEM-T vektor kako bismo ga umnožili i lakše odredili slijed nukleotida. Nakon transformacije stanice *E. coli*, izvršili smo odabir na temelju plavo-bijele selekcije te potvrdili ugradnju inserta PCR metodom na bakterijskim kolonijama.

Sekvenciranjem je dobiven slijed od 153 parova baza te 51 aminokiseline. Filogenetska analiza utvrdila je pripadnost dobivene sekvence ABCB podporodici. Unutar filogenetskog stabla dobivena sekvenca smjestila se uz odabrane proteinske sekvence drugih organizama iz ABCB podporodice. Istovremeno, preostale dvije podporodice (ABCC i ABCG) se odvajaju sugerirajući kako njima ne pripada dobivena sekvenca. Analizirajući identičnost dobivene aminokiselinske sekvence s odabranim proteinskim sekvencama iz različitih ABC podporodica, vidimo kako naša sekvenca s najvećim udjelom pokazuje sličnost s odabranim sekvencama unutar ABCB podporodice (58.8 – 72.5 %). Pri tome, najveću identičnost pokazuje s vrstama *M. musculus* (miš) – 72.5 i *H. sapiens* (čovjek) – 70.5%. Za detaljniju izradu filogenetskog stabla bilo bi potrebno dobiti dužu sekvencu, što je u planu u budućim istraživanjima. Na osnovu dobivene sekvence dizajnirali smo početnice za RT-PCR pomoću kojeg istražujemo gensku ekspresiju transportnih proteina prilikom izlaganja vrste *E. fetida* BPA.

## 7. ZAKLJUČCI

1. Svi testirani modelni inhibitori MXR mehanizma uzrokovali su značajno povećanu akumulaciju fluorescentnih supstrata unutar tkiva gujavice potvrđujući kako je MXR mehanizam prisutan u vrsti *E. fetida* te kako je integralni dio detoksifikacijskog obrambenog sustava;
2. Inhibitorski učinak MK571, specifičnog inhibitora MXR mehanizma, upućuje na postojanje MRP proteina u gujavici *E. fetida*;
3. Prilikom provođenja filter papir kontakt testa (eng. *filter paper contact test*), dosad korišten rodamin B trebalo bi zamijeniti boljim fluorescentnim supstratom - rodaminom 123;
4. Bisfenol A nije ukazao na inhibitorski učinak MXR mehanizma, no potrebna su dodatna istraživanja kako bi se utvrdilo utječe li na povećanu ekspresiju ABCB1 gena koji kodira za P-glikoprotein u testiranoj vrsti gujavica;
5. Usporedba uzoraka čistog i onečišćenog snijega uzrokovala su povećanu akumulaciju rodamina 123 unutar tkiva gujavice, sugerirajući kako snijeg u Zagrebu ima inhibitorski učinak na MXR mehanizam u vrsti *E. fetida*;
6. Određivanjem nukleotidnog slijeda gena dobivena je sekvenca od 153 pb;
7. Filogenetska analiza potvrdila je pripadnost dobivene sekvence ABCB1 podporodici;
8. Filter papir kontakt test pokazao se kao efikasan i relevantan test kojim se na jednostavan način može pratiti koncentracija okolišno opasnih tvari (MXR inhibitora) u uzorcima iz okoliša. Uz to, mjerenje aktivnosti MXR mehanizma pokazalo se kao odličan biomarker praćenja izloženosti okolišnim, potencijalno štetnim spojevima.

## 8. LITERATURA

- Ambudkar S.V., Dey S., Hrycyna C.A., Ramachandra M., Pastan I., Gottesman M.M. (1999): Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 39, 361–398.
- Bard S.M. (2000): Multixenobiotic resistance as a cellular defence mechanism in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology* 48, 357-389.
- Bard M.S., Bello M.S., Hahn E.M., Stegeman J.J. (2002): Expression of P-glycoprotein in killifish (*Fundulus heteroclitus*) exposed to environmental xenobiotics. *Aquatic toxicology* 59, 237-251.
- Bošnjak I. (2010): Zaštitna uloga ABC transportnih proteina tijekom ranog embrionalnog razvoja morskih ježinaca. Doktorska dizertacija, 149 str. Zagreb, Prirodoslovno-matematički fakultet. Voditelji: Smital Tvrтко i Šver Lidija.
- Bouché, M.B. (1977): Strategies lombiciennes. In *Soil organisms as Components of Ecosystems. Ecological Bulletins* 25, 122-132. U: Edwards C.A., Bohlen P.J. (1996): *Biology and Ecology of Earthworms*. Chapman and Hall, London, 1-426.
- Buss D.S., Callaghan A. (2008): Interaction of pesticides with p-glycoprotein and other ABC proteins: A survey of the possible importance to insecticide, herbicide and fungicide resistance. *Pesticide biochemistry and physiology* 90, 141-153.
- Cereceda-Balic F., Palomo-Marín R.M., Bernalte E., Vidal V., Christie J., Fafic X., Guevara L.J., Miro C., Pinilla Gil E. (2012): Impact of Santiago de Chile urban atmospheric pollution on antropogenic trace elements enrichment in snow precipitation at Cerro Colorado, Central Andes. *Atmospheric Environment* 47, 51-57.
- Cole S.P.C., Deeley R.G. (1998): Multidrug resistance mediated by the ATP-binding cassette transporter protein MRP. *Bioessays* 20, 931–940.

- Coleman J.A., Quazi F., Molday R.S. (2013): Mammalian P<sub>4</sub>-ATPases and ABC transporters and their role in phospholipid transport. *Biochimica et biophysica acta* 1831, 555-574.
- Ćetković Helena (2007): Određivanje slijeda nukleotida u molekuli DNA Sangerovom dideoksi metodom, 8.1. U: Amriović Ristov A., Brozović A., Bruvo Mađarić B., Ćetković H., Hrenilović D., Herak Bosnar M., Katušić Hećimović S., Meštrović Radan N., Mihaljević S., Slade N., Vujaklija D. (ur.) *Metode u molekularnoj biologiji*, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, 473-482.
- Dassa E., Bouige P. (2001): The ABC of ABCs: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. *Research in microbiology* 152, 211-229.
- Dean M., Hamon Y., Chimini G. (2001): The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *The Journal of Lipid Research* 42, 1007–1017.
- Dean M., Annilo T. (2005): Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annual review of genomics and human genetics* 6, 123-42.
- Dong J., Yang G., McHaourab H.S. (2005): Structural basis of energy transduction in the transport cycle of MsbA. *Science* 308, 1023-1028.
- Edwards, C.A., Bohlen, P.J. (1996): *Biology and Ecology of Earthworms*. Chapman & Hall, London, 1-426.
- EFSA (2010): Scientific opinion on bisphenol A: evaluation of a study investigating its neurodevelopmental toxicity, review of recent scientific literature on its toxicity and advice on the Danish risk assessment of bisphenol A. *EFSA journal* 8(9), 1829.
- Engelhard C., De Toffol S., Lek I., Rauch W., Dallinger R. (2007): Environmental impacts of urban snow management – The alpine case study of Innsbruck. *Science of the total environment* 382, 286-294.
- Epel D., Luckenbach T., Stevenson C.N., Macmanus-Spencer L.A., Hamdoun A., Smital T. (2008): Efflux transporters: Newly appreciated roles in protection against pollutants. *Environmental science and technology* 42, 3914-3920.

- Flint S., Markle T., Thompson S., Wallace E. (2012): Bisphenol A exposure, effects, and policy: A wildlife perspective. *Journal of environmental management* 104, 19-34.
- Fukuda Y., Schuetz J.D. (2012): ABC transporters and their role in nucleotide drug resistance. *Biochemical pharmacology* 83, 1073-1083.
- George A.M., Jones P.M. (2012): Perspectives on the structure-function of ABC transporters: The Switch and constant contact models. *Progress in biophysics and molecular biology* 109, 95-107.
- Glenn D.W., Sansalone J.J. (2002): Accretion of pollutants in snow exposed to urban traffic and winter storm maintenance activities. II. *Journal of environmental engineering* 128(2), 167–185. U: Engelhard C., De Toffol S., Lek I., Rauch W., Dallinger R. (2007): Environmental impacts of urban snow management – The alpine case study of Innsbruck. *Science of the total environment* 382, 286-294.
- Gottesman M.M., Fojo T., Bates S.E. (2002): Multidrug resistance in cancer: Role of ATP-dependent transporters. *Nature Reviews Cancer* 2(1), 48-58.
- Grandjean-Forestier F., Stenger C., Robert J., Verdier M., Ratinaud M.H. (2009): The P-glycoprotein 170: Just a multidrug resistance protein or a protean molecule? U: Boumendjel A., Boutonnat J., Robert J. (ur.): ABC transporters and multidrug resistance, USA, 17-46.
- Hackenberger B.K., Velki M., Stepic S. and Hackenberger D.K. (2012): First evidence for the presence of efflux pump in the earthworm *Eisenia andrei*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 75(1), 40–45.
- Higgins C.F. (1992): ABC transporters: from microorganisms to man. *Annual Review of Cell Biology* 8, 67–113.
- Honorat M., Dumontet C., Payen L. (2009): Multidrug resistance- associated protein (MRP/ABCC proteins). U: Boumendjel A., Boutonnat J., Robert J. (ur.): ABC transporters and multidrug resistance, USA, 47-82.
- Hu C.W., Li M., Cui Y.B., Li D.S., Chen J., Yang L.Y. (2010): Toxicological effects of TiO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles in soil on earthworm *Eisenia fetida*. *Soil biology and biochemistry* 42, 586-591.

- Huang Y.Q., Wong C.K.C., Zheng J.S., Barra R., Wahlstrom B., Neretin L., Wong M.H. (2012): Bisphenol A (BPA) in China: A review of sources, environmental levels, and potential human health impacts. *Environmental International* 42, 91-99.
- Juliano R.L., Ling V. (1976): A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica and biophysica acta* 455, 152-162.
- U: Epel D., Luckenbach T., Stevenson C.N., Macmanus-Spencer L.A., Hamdoun A., Smital T. (2008): Efflux transporters: Newly appreciated roles in protection against pollutants. *Environmental science and technology* 42, 3914-3920.
- Kaminski E.W., Piehler A., Wenzel J.J. (2006): ABC A-subfamily transporters: Structure, function and disease. *Biochimica et biophysica acta* 1762, 510-524.
- Keppler C., Ringwood H.A. (2001): Expression of P-glycoprotein in the gills of oysters, *Crassostrea virginica*: seasonal and pollutant related effects. *Aquatic Toxicology*, 54, 195-204.
- Kurelec B. (1992): The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organism. *Critical reviews in toxicology* 22, 23–43.
- Kurelec B. (1997): A new type of hazardous chemical: The chemosensitizers of multixenobiotic resistance. *Environmental health perspectives* 105(4), 855-860.
- Leslie E.M., Deeley R.G., Cole S.P.C. (2005): Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRO (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology and applied pharmacology* 204, 216-237.
- Litman T., Druley T.E., Stein W.D., Bates S.E. (2001): From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. *Cellular and molecular life sciences* 58, 931-959.
- Luo Y., Zang Y., Zhong Y., Kong Z. (1999): Toxicological study of two novel pesticides on earthworm *Eisenia foetida*. *Chemosphere* 39: 2347–2356.
- Mao Q., Unadkat J.D. (2005): Role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in drug transport. *The AAPS Journal* 7(1), 118–133.

- Markman S., Guschina I.A., Barnsley S., Buchanan K.L., Pascoe D., Muller C.T. (2007): Endocrine disrupting chemicals accumulate in earthworms exposed to sewage effluent. *Chemosphere* 70: 119-125.
- Murozumi M., Chow T.J., Patterson C. (1969): Chemical concentrations of pollutant lead aerosols, terrestrial dusts and sea salts in Greenland and Antarctic snow strata. *Geochimica et cosmochimica acta* 33, 1247–1294.
- OECD, 1984. Guidelines for Testing of Chemicals, Earthworm Acute Toxicity Tests (Filter Paper Test and Artificial Soil Test). Vol. 207. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris.
- Paloma A.M., Ropero B.A., Soriano S., García-Arévalo M., Ripoll C., Fuentes E., Quesada I., Nadal A. (2012): Bisphenol-A acts as a potent estrogen via non-classical estrogen triggered pathways. *Molecular and cellular endocrinology* 335, 201-207.
- Phipps G.L., Ankley G.T., Benoit D.A., Mattison V.R. (1993): Use of the aquatic oligochaete *Lumbriculus-variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. *Environmental toxicology and chemistry* 12, 269-279. U: Markman S., Guschina I.A., Barnsley S., Buchanan K.L., Pascoe D., Muller C.T. (2007): Endocrine disrupting chemicals accumulate in earthworms exposed to sewage effluent. *Chemosphere* 70, 119-125.
- Quevedo A.M., Nieto E.L., Briñón C.M. (2011): P-glycoprotein limits the absorption of the anti-HIV drug zidovudine through rat intestinal segments. *European journal of pharmaceutical sciences* 43, 151-159.
- Richter A.C., Birnbaum S.L., Frabollini F., Newbold R.R., Rubin S.B., Talsness E.C., Vandenberg G.J., Walser-Kuntz R.D., vom Saal S.F. (2007): *In vivo* effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reproductive toxicology* 24, 199-224.
- Sauerborn R., Polančec D.S., Žaja R., Smítal T. (2004): Identification of the multidrug resistance-associated protein (mrp) related gene in red mullet (*Mullus barbatus*). *Marine environmental research* 58, 199-204.



- Sauerborn Klobučar R., Žaja R., Franjević D., Brozović A., Smital T. (2010): Presence of ecotoxicologically relevant Pgp and MRP transcripts and proteins in Cyprinid fish. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 61, 175-182.
- Schinkel A.H., Jonker J.W. (2003): Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Advanced drug delivery reviews* 55, 3-29.
- Sheps J.A., Ling V. (2009): Introduction: What is multidrug resistance? U: Boumendjel A., Boutonnat J., Robert J. (ur.): *ABC transporters and multidrug resistance, USA*, 1-14.
- Sinha R.K., Chauhan K., Valani D., Chandran V., Soni B.K., Patel V. (2010): Earthworms: Charles Darwin's "unheralded soldiers of mankind": Protective & productive for man & environment. *Journal of environmental protection* 1, 251-260.
- Smital T., Sauerborn R., Hackenberger K.B. (2003): Inducibility of the P-glycoprotein transport activity in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* and the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. *Aquatic Toxicology* 65(4), 443-465.
- Tarling E.J., Aguiar Vallim T.Q., Edwards P.A. (2013): Role of ABC transporters in lipid transport and human disease. *Trends in endocrinology and metabolism*, u postupku izdavanja (dostupan online).
- Telmer K., Bonham-Carter F.G., Kliza A.D., Hall E.M.G. (2004): The atmospheric transport and deposition of smelter emissions: Evidence from the multi-element geochemistry of snow, Quebec, Canada. *Geochimica et cosmochimica acta* 68, 2961-2980.
- Ueda K., Okamura N., Hirai M., Tanigawara Y., Saeki T., Kioka N., Komano T., Hori R. (1992): Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone. *The journal of biological chemistry* 267(34), 24248-24252.
- Venter J.M., Reinecke A.J. (1988): The life cycle of the compost worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *South African Journal of Zoology* 23(3), 161-165.

- vom Saal S.F., Welshons V.W. (2006): Large effects from small exposures. II. The importance of positive controls in low-dose research on bisphenol A. *Environmental research* 100, 50-76.
- Wang Y., Cang T., Zhao X., Yu L., Chen L., Wu C., Wang Q. (2012a): Comparative acute toxicity of twenty-four insecticides to earthworm, *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and environmental safety* 79, 122-128.
- Wang Y., Wu S., Chen L., Wu C., Yu R., Wang Q., Zhao X. (2012b): Toxicity assessment of 45 pesticides to the epigenetic earthworm *Eisenia fetida*. *Chemosphere* 88, 484-491.
- Zhang Y., Shen G., Yu Y., Zhu H. (2009): The hormetic effect of cadmium on the activity of antioxidant enzymes in the earthworm *Eisenia fetida*. *Environmental pollution* 157, 3064-3068.
- Žaja R., Klobučar S.R., Smital T. (2007): Detection and functional characterization of Pgp1 (ABCB1) and MRP3 (ABCC3) efflux transporters in the PLHC-1 fish hepatoma cell line. *Aquatic toxicology* 81, 365-376.
- Žaja R., Munić V., Smital T. (2008): Cloning and mRNA expression analysis of an ABCG2 (BCRP) efflux transporter in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and primary hepatocytes. *Marine Environmental Research* 66(1), 77-79.

Internetski izvori:

[www.genenames.org/cgi-bin/quick\\_search.pl?cgifields=type&type=contains&num=50&search=ABC&submit=Submit](http://www.genenames.org/cgi-bin/quick_search.pl?cgifields=type&type=contains&num=50&search=ABC&submit=Submit)