

# Akumulacija i unutarstanična raspodjela metala u probavnim žlijezdama dviju vrsta slatkovodnih školjkaša iz rijeke Mrežnice

---

**Mandić, Antonela**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2021**

*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:217:232721>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-25**



*Repository / Repozitorij:*

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Antonela Mandić

**Akumulacija i unutarstanična raspodjela  
metala u probavnim žlijezdama dviju vrsta  
slatkovodnih školjkaša iz rijeke Mrežnice**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Antonela Mandić

**Accumulation and intracellular  
distribution of metals in the digestive  
glands of two freshwater bivalve species  
from the Mrežnica River**

Master thesis

Zagreb, 2021.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za biološke učinke metala, Zavoda za istraživanje mora i okoliša Instituta „Ruđer Bošković“ u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Dušice Ivanković uz suvoditeljicu izv. prof. dr. sc. Jasnu Lajtner sa Zoologijskog zavoda Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar struke znanosti o okolišu.

## ZAHVALE

*U sklopu projekta „Biomolekule koje vežu metale i zdravstveni poremećaji kod slatkovodnih organizama izloženih industrijskom otpadu (METABIOM)“, koji je omogućila Hrvatska zaklada za znanost, provedeno je uzorkovanje školjkaša korištenih za ovaj rad.*

*Najveće hvala mentorici dr. sc. Dušici Ivanković, na nesebičnom dijeljenju znanja, strpljenju, motivaciji, vedrom pristupu rada i naravno ukazanom povjerenju, bez nje rad ne bi bio potpun ni moguć.*

*Veliko hvala suvoditeljici rada izv. prof. dr. sc. Jasni Lajtner na savjetima, trudu, optimizmu i pomoći ne samo prilikom pisanja ovog rada nego općenito tijekom studija.*

*Također, zahvaljujem na strpljenju, pomoći i ugodnom okruženju prilikom izvođenja laboratorijskih analiza dr. sc. Zrinki Dragun i dr. sc. Nesreti Krasnići, te hvala ostalim djelatnicima sa Zavoda za istraživanje mora i okoliša Instituta Ruđer Bošković.*

*Zahvaljujem i svojoj obitelji i prijateljima na bezuvjetnoj ljubavi i podršci.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

## Akumulacija i unutarstanična raspodjela metala u probavnim žlijezdama dviju vrsta slatkovodnih školjkaša iz rijeke Mrežnice

Antonela Mandić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Kapacitet akumulacije metala i njihova unutarstanična sudbina se razlikuje kod različitih vrsta školjkaša. Ovim istraživanjem definirane su najveće razlike u unosu i unutarstaničnoj raspodjeli 9 odabranih esencijalnih i neesencijalnih metala i metaloida u probavnim žlijezdama dviju slatkovodnih vrsta školjkaša, *Unio pictorum* (Linnaeus, 1758) i *Anodonta anatina* (Linnaeus, 1758), uzorkovanih na istom lokalitetu na rijeci Mrežnici. Procjena unosa se odredila ukupnom koncentracijom odabranih metala i metaloida akumuliranih u probavnoj žlijezdi, a unutarstanična raspodjela je praćena na dvije razine, utvrđivanjem raspodjele odabranih elemenata između netopljive i topljive frakcije tkiva probavne žlijezde te definiranjem njihove raspodjele među citosolskim biomolekulama različitih molekulskih masa. Analiza citosolskih biomolekula koje sudjeluju u vezanju metala provela se pomoću kromatografije s isključenjem molekula prema veličini te mjerenjem metala u razdvojenim frakcijama pomoću spektrometrije masa s induktivno spregnutom plazmom. Dobiveni kromatografski profili su bili usporedivi u obje pokusne vrste za sve analizirane elemente. Ukupne koncentracije esencijalnih elemenata te neesencijalnih Cd i As bile su značajno više kod vrste *U. pictorum*. Analizom sadržaja ukupnih proteina utvrđen je značajno veći sadržaj proteina u citosolima probavnih žlijezda kod vrste *U. pictorum*. Rezultati ovog istraživanja pridonijet će boljem razumijevanju mehanizama unosa, akumulacije i detoksikacije odabranih elemenata u proučavanim vrstama školjkaša.

(57 stranica, 21 slika, 4 tablice, 82 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: citosol, kromatografija, metaloproteini, esencijalni metali, neesencijalni metali

Voditelj: dr. sc. Dušica Ivanković, viši znanstveni suradnik, Institut "Ruđer Bošković"

Suvoditelj: izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner

Ocjenitelji:

Rad prihvaćen:

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Master Thesis

# Accumulation and intracellular distribution of metals in the digestive glands of two freshwater bivalve species from the Mrežnica River

Antonela Mandić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

The capacity of metal accumulation and their intracellular destiny differ in different types of bivalves. This study defined the largest differences in the uptake and intracellular distribution of 9 selected essential and non-essential metals and metalloids in the digestive glands of two freshwater bivalve species, *Unio pictorum* (Linnaeus, 1758) and *Anodonta anatina* (Linnaeus, 1758), sampled at the same site on the Mrežnica River. Estimation of intake was determined by the total concentration of selected metals and metalloids accumulated in the digestive gland, and intracellular distribution was monitored at two levels, by determining the distribution of selected elements between insoluble and soluble digestive tissue fractions and by defining their distribution among cytosolic biomolecules. Analysis of cytosolic biomolecules involved in metal binding was performed by size exclusion chromatography and by measuring metals in separated fractions by inductively coupled plasma mass spectrometry. The obtained chromatographic profiles were comparable in both experimental species for all analyzed elements. The total concentrations of essential elements and non-essential Cd and As were significantly higher in *U. pictorum*. Analysis of total protein content revealed a significantly higher protein content in the cytosols of the digestive glands in *U. pictorum*. The results of this study will contribute to a better understanding of the mechanisms of uptake, accumulation and detoxification of selected elements in the studied bivalve species.

(57 pages, 21 figures, 4 tables, 82 references, original in: croatian)

Keywords: cytosol, chromatography, metalloproteins, essential metals, non-essential metals

Supervisor: Dr. Dušica Ivanković, Senior Research Associate, Ruđer Bošković Institute

Co-supervisor: Dr. Jasna Lajtner, Assoc. Prof.

Reviewers:

Thesis accepted:

# SADRŽAJ

1. Uvod .....	1
1.1. Metali u vodenom ekosustavu .....	1
1.2. Karakteristike školjkaša kao bioindikatorskog organizma .....	2
1.3. Akumulacija, unutarstanična raspodjela i toksičnost metala u školjkaša .....	3
1.4. Metalomika .....	4
1.4.1. Principi metalomike .....	4
1.4.2. Analitički pristupi u metalomičkim istraživanjima .....	5
1.5. Ciljevi istraživanja .....	7
2. Materijali i metode .....	9
2.1. Područje istraživanja i uzorkovanje školjkaša .....	9
2.2. Pokusni organizmi .....	10
2.3. Seciranje pokusnih organizama .....	12
2.4. Priprema homogenata i citosola tkiva probavnih žlijezda .....	13
2.5. Određivanje koncentracije proteina .....	16
2.6. Razgradnja homogenata i citosola .....	17
2.7. Određivanje koncentracije metala i metaloida .....	18
2.8. Razlučivanje citosola pomoću visokodjelotvorne tekućinske kromatografije uz isključenje molekula po veličini (SE-HPLC) .....	19
2.9. Statistička obrada podataka .....	21
3. Rezultati .....	23
3.1. Morfološki pokazatelji i indeks kondicije školjkaša .....	23
3.2. Ukupne koncentracije odabranih esencijalnih i neesencijalnih elemenata u probavnim žlijezdama <i>U. pictorum</i> i <i>A. anatina</i> .....	24
3.3. Koncentracije proteina u citosolima probavnih žlijezda <i>U. pictorum</i> i <i>A. anatina</i> .....	25
3.4. Koncentracije odabranih esencijalnih i neesencijalnih elemenata u citosolima probavnih žlijezda <i>U. pictorum</i> i <i>A. anatina</i> .....	26
3.5. Subcelularna i citosolska raspodjela odabranih esencijalnih i neesencijalnih elemenata u probavnim žlijezdama <i>U. pictorum</i> i <i>A. anatina</i> .....	29
3.5.1. Analiza raspodjele elemenata između vodotopljive (citosol) i netopljive frakcije tkiva probavnih žlijezda .....	29
3.5.2. Analiza citosolske raspodjele odabranih elemenata između biomolekula različitih molekulskih masa primjenom HPLC-a s isključenjem molekula po veličini .....	31



3.5.2.1. Kobalt .....	32
3.5.2.2. Molibden .....	33
3.5.2.3. Selen .....	33
3.5.2.4. Bakar .....	34
3.5.2.5. Željezo .....	35
3.5.2.6. Cink .....	36
3.5.2.7. Srebro .....	36
3.5.2.8. Arsen .....	37
3.5.2.9. Kadmij .....	38
4. Rasprava .....	39
5. Zaključak .....	47
6. Literatura .....	48
7. Životopis .....	57

# 1. Uvod

## 1.1. Metali u vodenom ekosustavu

Metali koji se nalaze u vodenom ekosustavu su proizašli iz prirodnih i antropogenih izvora (Gaillardet i sur., 2003). Koncentracije metala koje su prirodno prisutne u vodenom ekosustavu ovise o sastavu stijena i tla (Cukrov i sur., 2011). U nekim tipovima vodotoka, kao što su primjerice vodotoci u krškim područjima Hrvatske, prirodne koncentracije metala u tragovima su uglavnom izuzetno niske, uslijed čega su vodeni sustavi tih područja vrlo osjetljivi na dodatni unos metala iz antropogenih izvora (Cukrov i sur., 2008). Antropogeni unos zagađivala u vodeni ekosustav može biti iz točkastog izvora onečišćenja poput cijevi industrijskih postrojenja ili iz raspršenog izvora poput poljoprivredne površine (Gupta i Singh, 2011). Nepovoljna osobina metala, kao zagađivala, je da se ne uklanjaju iz vodenih ekosustava kemijskim procesima ili biološkom razgradnjom, odnosno kada su uneseni u vodeni ekosustav, tamo se zadržavaju i raspodjeljuju kroz stupac vode te se akumuliraju u sedimentu i u živim organizmima (Cukrov i sur., 2011).

S obzirom na funkciju u živim organizmima, uključujući vodene organizme, metali se mogu podijeliti na esencijalne i neesencijalne. Oni metali i metaloidi koji imaju važnu biološku ulogu i neophodni su živim organizmima, a dio su enzima, vitamina i drugih složenih molekula, tzv. metaloproteina, ubrajaju se u esencijalne. To su, npr., kobalt (Co), bakar (Cu), željezo (Fe), selen (Se) i cink (Zn) (Zoroddu i sur., 2019). Ovi elementi, takozvani, esencijalni elementi u tragovima, su organizmima potrebni u malim količinama, a prekomjernim unosom mogu narušiti homeostazu organizma i postati toksični (Yılmaz i sur., 2017). Oni metali i metaloidi koji nemaju poznatu ulogu u živim organizmima i uglavnom su toksični čak i u vrlo malim količinama nazivaju se neesencijalnim elementima. Neki od njih su srebro (Ag), arsen (As), kadmij (Cd), živa (Hg), nikal (Ni) i olovo (Pb) (Ali i Khan, 2018).

Vodeni organizmi su zbog prirode svoga staništa neprestano izloženi metalima. Metal u organizam ulazi vanjskom površinom, respiratornim putem ili probavnim epitelom iz vode ili hrane, te zajednički preko ta tri puta (Yılmaz i sur. 2017). S obzirom da metal može postojati u više kemijskih oblika, ovisno o tome varira koliko će biti toksičan i bioraspoloživ. Bioraspoloživost se definira kao udio tvari prisutne u okolišu u onom obliku kojeg bi organizam potencijalno mogao asimilirati. Bioraspoloživost se mijenja s okolišnim promjenama poput

godišnjeg doba, koncentracije organske tvari i otopljenog kisika, protoka, saliniteta, tvrdoće i pH vode te veličine čestica koje grade sediment (Gupta i Singh, 2011). Također su važni biološki čimbenici poput razlika u vrsti, ponašanja, morfoloških osobina, spola, reproduktivnih stadija i prehrane organizma (Hare, 1992).

Organizmi unose i zadržavaju određene tvari tijekom vremena, a kada je unos te tvari veći od njene eliminacije, dolazi do bioakumuliranja te tvari, npr. metala (Hare, 1992). Ako se metali bioakumuliraju u nižim organizmima potencijalno će doći do povećanja koncentracija metala kroz više trofičke razine hranidbenog lanca procesom koji se naziva biomagnifikacija. Biomagnifikacija metala i metaloida je djelomično razjašnjena, od velike je važnosti jer neki metali tim procesom mogu imati štetne posljedice na ljudsko zdravlje (Ali i Khan, 2019).

## **1.2. Karakteristike školjkaša kao bioindikatorskog organizma**

Bioindikator su organizmi ili biološki parametri koji pružaju uvid u razinu kontaminacije ekosustava. Parametri se koriste na temelju biokemijskih, fizioloških, morfoloških ili ekoloških mjerenja (Hare, 1992). Oni pružaju relativni uvid u stupanj lokalne kontaminacije koja je od ekotoksikološkog značaja.

Školjkaši se zbog svojih karakteristika odlikuju kao jedni od obećavajućih bioindikatora (Coelhoa i sur., 2014). Metali koji su nedetektirani u vodi i sedimentu se mogu detektirati u školjkašima gdje im je koncentracija veća nego u okolini, pa se na taj način može pratiti njihova koncentracija (Zuykov i sur., 2013). Školjkaši imaju toleranciju na akumuliranje velikog raspona koncentracije metala tako da u većini vrsta ne dolazi do povećanja mortaliteta među populacijom. Slabo su pokretni organizmi i zbog svog načina prehrane u mogućnosti su filtrirati velike količine vode, a time i akumulirati tvari otopljene u vodi i plankton. Životni vijek im je dovoljno dug, što je pogodno za duža istraživanja, često se nalaze u velikom broju na području istraživanja, dovoljno su veliki za kemijske analize tkiva, relativno lako se uzorkuju i determiniraju, a i ostanu zdravi tijekom uzorkovanja i pripreme u laboratoriju, te najvažnije, imaju visoku stopu akumuliranja metala i brzo reagiraju na promjene koncentracija metala u okolišu (Elder i Collins, 1991). Složenost u uporabi školjkaša kao bioindikatora stvaraju varijabilni faktori poput toga da neke vrste imaju povećanu sintezu metalotioneina pa su zbog toga otpornije na toksični utjecaj metala, stoga se ta varijabla treba uzeti u obzir prilikom

odabira školjkaša kao bioindikatora, no ipak imaju značajni potencijal kao korisni bioindikator onečišćenja vode i sedimenta (Elder i Collins, 1991; Naimo, 1995).

### **1.3. Akumulacija, unutarstanična raspodjela i toksičnost metala u školjkaša**

Metali se nakon ulaska u organizam školjkaša prema različitim afinitetima raspodjeljuju po tkivu i organima. Različita razina akumulacije metala po tkivima ovisi i o sposobnosti tkiva da akumulira metale (Jebali i sur. 2014). Jedan od najučestalijih organa koji se proučava za istraživanja akumulacije metala je probavna žlijezda, upravo zato što je to ciljani organ pri dugotrajnijoj izloženosti metalima. Osim probavne žlijezde velika količina metala je akumulirana i u škrgama, a znatno manja je akumulacija zabilježena u ljušturi i mišićima školjkaša (Gupta i Singh, 2011). Akumulacija metala u određenom ciljanom tkivu bi mogla biti posljedica pojave specifičnih vezivnih mjesta ili možda detoksikacijskih mehanizama u stanici ili tkivu (Naimo, 1995).

Metal preko stanične membrane ulazi u stanicu školjkaša procesom olakšane difuzije, aktivnim transportom ili endocitozom (Marigómez i sur., 2002). Organeli, citosol, granule i stanična membrana su neki od unutarstaničnih odjeljaka po kojima se metal u stanici raspodjeljuje (Wallace i sur., 2003). Preko vezanja na biomolekule, koje imaju razne metaboličke funkcije, metali mogu sudjelovati u detoksifikaciji, pohrani, izlučivanju ili u mehanizmima toksičnosti (Klaassen i sur., 1999; Rainbow, 2002). Iako znaju imati funkcionalne uloge u biokemijskim reakcijama, ako se koncentracija i takvih metala povisi, mogu imati toksičan učinak na stanicu (Khati i sur., 2012). Ukupna koncentracija metala u organizmu ne mora biti direktno povezana sa štetnim djelovanjem metala. Veliki udio akumuliranog metala može biti vezan u granulama te prisutan u detoksiciranom obliku. Također se dio metala veže za citosolski protein metalotionein (MT) koji je poznat po visokom afinitetu vezanja raznih metala (Viarengo i Nott, 1993; Langston i sur., 1998). Neki metali se ne mogu odmah izlučiti ili detoksicirati pa su prisutni u nedetoksiciranim oblicima u strukturi enzima ili u staničnim organelima, ali imaju potencijal da postanu toksični što može uzrokovati negativne posljedice na organizam (Wallace i sur., 2003; Rainbow, 2002).

Osim što se analizira ukupna koncentracija akumuliranog metala, također su istraživanja krenula u smjeru određivanja subcelularne raspodjele metala. Subcelularna raspodjela daje informacije o metabolički raspoloživom metalu i mogućoj toksičnosti esencijalnih i

neesencijalnih metala (Barst i sur., 2016). Centrifugiranje homogenata tkiva na  $50.000\times g$  i mjerenje koncentracije metala u vodotopljivim citosolskim frakcijama je jedan od jednostavnijih načina analize razine metala i metaloida u subcelularnoj frakciji koja bi mogla biti osjetljiva na njih (Giguère i sur., 2006). Sličan pristup subcelularnog frakcioniranja metala korišten je u ovom radu. Centrifugiranjem na  $50.000\times g$  se odvajaju dijelovi stanične membrane, jezgre, mitohondrija i lizosoma u talog koji nazivamo netopljiva frakcija, a citosolska, topljiva, frakcija s otopljenim biomolekulama i mikrosomima se nalazi u supernatantu (Dragun i sur., 2013). Takav princip je omogućio analiziranje subcelularne raspodjele metala i metaloida između netopljive i citosolske frakcije tkiva.

Toksičnost metala većinom nastaje prilikom reakcija u citosolu, gdje dolazi do nespecifičnog vezanja metala na fiziološki važne molekule kao što su enzimi i transportni proteini i njihove posljedične inaktivacije te iz uloge u stvaranju slobodnih radikala (Strižak i sur., 2014). Ako je organizam izložen teškim metalima može doći do oštećenja DNA, modifikacije proteina i peroksidacije lipida (Wu i sur., 2016). Toksičnost metala može dovesti do stvaranja radikala kisika koji su reaktivni (ROS), interakcije s neophodnim esencijalnim metalima i vezanja na tiolnu skupinu na proteinima i antioksidansima (Wang i Fowler, 2008). Da bi se to spriječilo aktiviraju se mehanizmi koji održavaju homeostazu. Visoka koncentracija metala u okolišu koja je toksična, osim što dovodi do ometanja funkcionalnih biokemijskih reakcija, također dovodi do stimulacije proteina koji vežu te metale. Metalotioneini su najvažniji metal vezajući ligandi u školjkaša koji se efektivno natječu s metal vezivnim mjestima stanice i tako sudjeluju u detoksikaciji metala (Elder i Collins, 1991).

## **1.4. Metalomika**

### **1.4.1. Principi metalomike**

Metalomika je relativno novo znanstveno područje koje se usredotočuje na istraživanje metala i metaloida u biološkim sustavima, odnosno unutar stanice, tkiva ili organa. Usko je povezana s genomikom koja proučava genom i proteomikom koja proučava proteine (Vogiatzis i Zachariadis, 2014). Konačni i najvažniji cilj u metalomičkim istraživanjima je razjašnjavanje funkcija biomolekula koje vežu metalne ione u biološkim sustavima (Sun i Chai, 2010). Metalomika osim što kvantificira te istražuje distribuciju, specijaciju i strukturu metala i

metaloida u živim organizmima također pruža indentifikaciju biomolekula na koje se ti metali vežu te proučava mehanizme i reakcije u koje su ti metali, metaloidi i biomolekule koje ih vežu uključeni (Li i sur., 2008).

#### 1.4.2. Analitički pristupi u metalomičkim istraživanjima

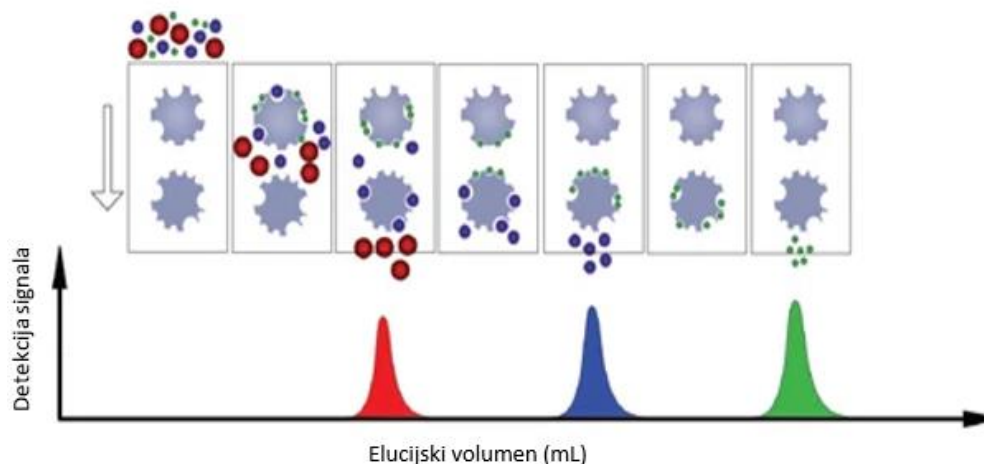
Postoji veći broj analitičkih pristupa u metalomici, a mogu se podijeliti u tri osnovne kategorije: *in vivo*, *in vitro* i *in silico*. *In vivo* kategorija obuhvaća metode pomoću kojih se detektira, indentificira i kvantificira oblik metala prisutan u biološkom uzorku. *In vitro* kategorija obuhvaća metode temeljene na *in vitro* modificiranju DNA organizma ili izolaciji dijela gena i zatim determinaciji učinka te modifikacije na stanični metalom. *In silico* kategorija obuhvaća metode korištenja baza podataka i kompjuterskih simulacija (Mounicou i sur., 2009). *In vivo* metoda zahtjeva multidimenzionalne analize te se naziva analitička, *in vitro* se naziva funkcionalna, a *in silico* bioinformatička metoda (Sun i Chai, 2010).

Postupak identifikacije i kvantifikacije metaloproteina i metalomakromolekula prisutnih u živim organizmima uključuje tri glavne komponente: tehnike razdvajanja, detektor visoke osjetljivosti i molekularni detektor. Tehnike razdvajanja kao što su tekućinska kromatografija i elektroforeza su ključna komponenta u specijaciji metaloproteina i pridonose izoliranju ciljnih vrsta iz biološke matrice. Detektor visoke osjetljivosti za određivanje elemenata, poput spektrometra masa s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS), u kromatografskim pikovima ili elektroforetskim vrpcama kvantificira elemente. Molekularni detektor se zasniva na spektrometriji masa (MS) i karakterizira razdvojene biomolekule koje vežu metale (Gómez-Ariza i sur., 2004; Mounicou i sur., 2009).

Jedan od učestalih i popularnih načina analize citosolskih spojeva koji vežu metale je povezivanje tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) i spektrometrije masa s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS) ( Szpunar, 2005). Metoda HPLC je vrlo svestrana tehnika, koja se upotrebljava na raznim okolišnim i biološkim uzorcima, s različitim mehanizma razdvajanja, a neke od njih su: kromatografija obrnutih faza (RP), kromatografija isključenjem po veličini (SEC) i ionska kromatografija (IEC). S druge strane, trenutno je komercijalno dostupna metoda ICP-MS najosjetljivija i najrobusnija tehnika određivanja metala, a

omogućuje multielementnu detekciju s vrlo niskim granicama detekcije te širokim koncentracijskim rasponom mjerenja (Montes-Bayón i sur., 2003).

U ovome istraživanju, za analizu raspodjele odabranih esencijalnih i neesencijalnih metala i metaloida između citosolskih biomolekula u probavnim žlijezdama školjkaša *Unio pictorum* (Linnaeus, 1758) i *Anodonta anatina* (Linnaeus, 1758). Korištena je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s isključenjem po veličini (SEC-HPLC) u kombinaciji s ICP-MS-om. Kromatografija s isključenjem po veličini (SEC) je kromatografska tehnika razdvajanja biomolekula u frakcije s obzirom na njihovu molekulsku masu (Slika 1). Često se koristi kao početni korak u kromatografskom razdvajanju citosolskih biomolekula koje vežu metale, a neki znanstvenici ju nazivaju kromatografijom s gel filtracijom (Montes-Bayón i sur., 2003). Korak razdvajanja po veličini se događa prolaskom uzorka kroz kolonu koja je puna poroznih čestica različite veličine, koje djeluju kao molekulsko sito (stacionarna faza). Duljina kolone i veličina pora je vrlo bitna jer determinira raspon molekulskih masa, a karakteristične stacionarne faze su na silika ili polimer bazi. Također bi stacionarna faza trebala biti sličnog polariteta kao uzorak i otapalo da se izbjegnu neželjene interakcije. Mobilna faza uzorka i otapala prolazeći kroz kolonu usporava zbog tih pora. Ako su molekule veće od pora, proći će kroz prostor između njih, odnosno njihova molekulska masa je veća od gornje granice razdvajanja baze, npr. hidratiziranog ugljikohidratnog polimera, i iz kolone će izaći prve u praznom volumenu. Ako su molekule manje od pora, imaju manju molekulsku masu i njihov prolazak je usporen jer će ulaziti u pore i tamo se zadržavati, što znači da će iz kolone prve izlaziti molekule s većom molekulskom masom, a nakon njih izlaze molekule sa sve manjim molekulskim masama (Hagel i Haneskog, 2010; URL 1). Daljnom analizom metala u razdvojenim kromatografskim frakcijama je omogućeno razlikovanje pikova na kromatografskim profilima gdje se može utvrditi prisutnost određenih metalokompleksa.



**Slika 1.** Shema tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s isključenjem po veličini (SEC-HPLC) (preuzeto i prilagođeno s URL 1)

### 1.5. Ciljevi istraživanja

Metali utječu na različite biokemijske procese te su stoga neophodni za normalno funkcioniranje organizama, no u povećanim koncentracijama mogu imati toksični učinak. Uslijed pretežno filtratorskog načina prehrane, školjkaši mogu ugraditi visoke koncentracije mnogih zagađivala, među kojima su i različiti toksični metali. Iz toga razloga školjkaši se vrlo često koriste kao bioindikatorski organizmi u procjeni izloženosti i štetnih učinaka metala u vodenim sustavima. Međutim, različite vrste školjkaša mogu se razlikovati u njihovim potrebama za metalima, brzinama unosa i kapacitetu akumulacije pojedinih metala, kao i načinu na koji raspodjeljuju metale unutar stanica i tkiva. U skladu s time, osnovni cilj ovoga istraživanja bio je produbljivanje znanja o procesima akumulacije i unutarstanične distribucije nekoliko odabranih esencijalnih i neesencijalnih elemenata u dviju vrsta slatkovodnih školjkaša, *U. pictorum* i *A. anatina*, koje pripadaju različitim rodovima porodice Unionidae i koje obitavaju u istom staništu te su stoga i jednako izložene metalima.

Specifični ciljevi rada bili su sljedeći:



- istražiti postoje li razlike u akumulaciji 6 esencijalnih (Co, Cu, Fe, Mo, Se, Zn) i 3 neesencijalna (Ag, As, Cd) metala i metaloida u probavnim žlijezdama nativnih populacija dviju slatkovodnih vrsta školjkaša, *U. pictorum* i *A. anatina*;
- utvrditi raspodjele odabranih metala i metaloida (esencijalni: Co, Cu, Fe, Mo, Se, Zn; neesencijalni: Ag, As, Cd) između topljive i netopljive frakcije tkiva probavnih žlijezda u vrsta *U. pictorum* i *A. anatina*;
- odrediti približne molekulske mase biomolekula koje vežu esencijalne elemente Co, Cu, Fe, Mo, Se i Zn te neesencijalne, Ag, As i Cd u citosolima probavnih žlijezda vrsta *U. pictorum* i *A. anatina* te utvrditi jesu li raspodjele odabranih metala i metaloida među citosolskim biomolekulama usporedive u ovih dviju vrsta školjkaša.

## 2. Materijali i metode

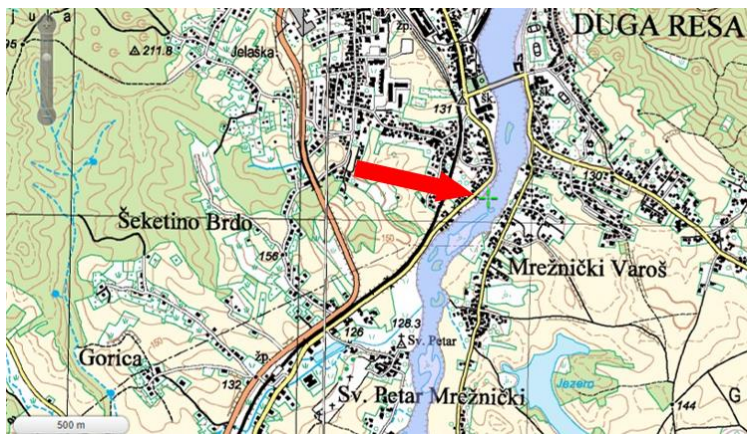
### 2.1. Područje istraživanja i uzorkovanje školjkaša

Rijeka Mrežnica je krška rijeka koja pripada crnomorskom slijevu kao dio porječja rijeke Save. Dužina toka rijeke je 64 km. Promatrajući površinsku razvodnicu porječje zauzima površinu od 1076 km<sup>2</sup> (Maradin, 2007). Izvire zapadno od Slunja, na Kordunu, a ulijeva se kod Karlovca u rijeku Koranu. Jurski i kredni vapnenci, na koje su utjecali fluviokrški procesi, su tektonski poremećeni i čine geološku osnovu tog područja (URL 2).

U usporedbi s ostalim krškim rijekama Mrežnica je posebna zbog svoje 93 sedrene barijere koje su duž toka stvorile ujezerenja i slikovite slapove. Slapovi su nejednoliko razmješteni te su najčešći u gornjem toku. Neki od njih su Rončevića slap, Milkovića slap, Klarića slap i Šušnjar slap. Naj snažniji pritok je rijeka Tounjčica, a kroz krško podzemlje povezana je s više ponornica poput Dretulje i Zagorske Mrežnice (Hršak, 2010). Područje od posebnog značaja Mrežnica – Tounjčica je dio ekološke mreže Natura 2000 (URL 3).

Rijeke u kršu su osjetljivije na antropogene utjecaje (Cukrov i sur., 2008). Jedan od primjera uvelike nepovoljnog antropogenog utjecaja bila je tvornica celuloze koja je poslovala do devedesetih godina prošlog stoljeća, a ispuštala je otpadnu vodu u ponornicu Dretulju pa je onečišćenje utjecalo na rijeku Mrežnicu gdje su za vrijeme ljetnih suša, kada bi vodostaj bio nizak, zabranili upotrebu vode za piće (Maradin, 2007). Nizvodno od mjesta uzorkovanja školjkaša za ovaj rad, kod grada Duge Rese, nalazila se bivša tvornica tekstila. Još neki od utjecaja čovjeka koji mogu potencijalno postati negativni su neprikladna gradnja objekata neposredno uz obalu rijeke, izgradnje hidroelektrana, blizina vojnog vježbališta i neprimjeren rafting (Hršak, 2010).

U sklopu projekta „Biomolekule koje vežu metale i zdravstveni poremećaji kod slatkovodnih organizama izloženih industrijskom otpadu (METABIOM)“, koji je omogućila Hrvatska zaklada za znanost, provedeno je uzorkovanje školjkaša korištenih za ovaj rad. Uzorkovanje je provedeno u svibnju 2020. godine u rijeci Mrežnici na lokalitetu smještenom 1,5 km uzvodno od grada Duge Rese (Slika 2) i poznatih industrijskih izvora onečišćenja. Uzorkovane su dvije vrste školjkaša, *U. pictorum* i *A. anatina*. Za svaku vrstu je autonomnim ronjenjem prikupljeno 15 jedinki školjkaša.



**Slika 2.** Karta područja istraživanja s označenom lokacijom uzorkovanja školjkaša (preuzeto i prilagođeno s URL 4) i fotografija lokaliteta uzorkovanja na rijeci Mrežnici (snimila dr. sc. Dušica Ivanković).

## 2.2. Pokusni organizmi

U radu se kao pokusni organizmi koriste dvije vrste školjkaša. To su *A. anatina* (Slika 3) i *U. pictorum* (Slika 4).

Razred: Bivalvia

Podrazred: Paleoheterodonta

Red: Unionida

Porodica: Unionidae

Rod: Anodonta

Vrsta: *Anodonta anatina* (Linnaeus, 1758)



**Slika 3.** Pokusni organizam, *Anodonta anatina* (Linnaeus, 1758) (snimila dr. sc. Dušica Ivanković).

Rasprostranjena je u Europi i na sjeveru Azije. Boja ljušture je često zelenkasto žuta, ali varira i može biti smeđe ili crne boje. Ljuštura je elipsoidnog oblika, čvrsta i ponekad dvostruko teža od vrste *Anodonta cygnea* (Linnaeus, 1758). Prosječne duljine je od 80 do 150 mm, visine od 50 do 60 mm i širine od 25 do 35 mm. Obitava u mirnim rijekama, riječnim uvalama i jezerima, ukopavajući se 2 do 3 metra u supstrat od mulja ili pijeska. Eutrofikaciju bolje preživljava nego *U. pictorum*. Veličina i dob sazrijevanja ovisi o temperaturi vode. U toplim vodama sazriju nakon 2 godine, a u hladnim vodama nakon 5 godina i manja im je ljuštura. U toplim eutrofnim vodama životna dob je 5 godina, a u hladnim oligotrofnim vodama do 15 godina. Povremeno se pojavljuju hermafroditi (URL 5). Ova vrsta obitava u lentičkim i lotičkim staništima. Ličinke glohidije ispušta u proljeće. Glohidije su velike, imaju kukicu i upotrebljavaju mnoge vrste riba kao domadare za preobrazbu glohidije u odraslu jedinku. Zabilježen je pad veličine populacije, međutim još uvijek je široko rasprostranjena Europom (Diaz i sur., 2020).

Razred: Bivalvia

Podrazred: Paleoheterodonta

Red: Unionida

Porodica: Unionidae

Rod: Unio

Vrsta: *Unio pictorum* (Linnaeus, 1758) – slikarska lisanka



**Slika 4.** Pokusni organizam, *Unio pictorum* (Linnaeus, 1758) (snimila dr. sc. Dušica Ivanković).

Kao i *A. anatina* i ova vrsta je iz porodice Unionidae. Rasprostranjena je u sjeverozapadnom, sjevernom i središnjom dijelu Europe te se pojavljuje u području sjeverne Azije. Boja i oblik ljuštura varira, često je zelenkasto žuta ili smeđa. Ljuštura je ovalna i izdužena. Duljina ljuštura je otprilike dvostruke veća od visine. Prosječne duljine je od 70 do 100 mm, visine od 30 do 40 mm i širine od 23 do 28 mm. Obitava u rijekama, ponekad u jezerima i kanalima. Najčešće se ukopava do 6 metara u supstrat od pijeska (URL 6).

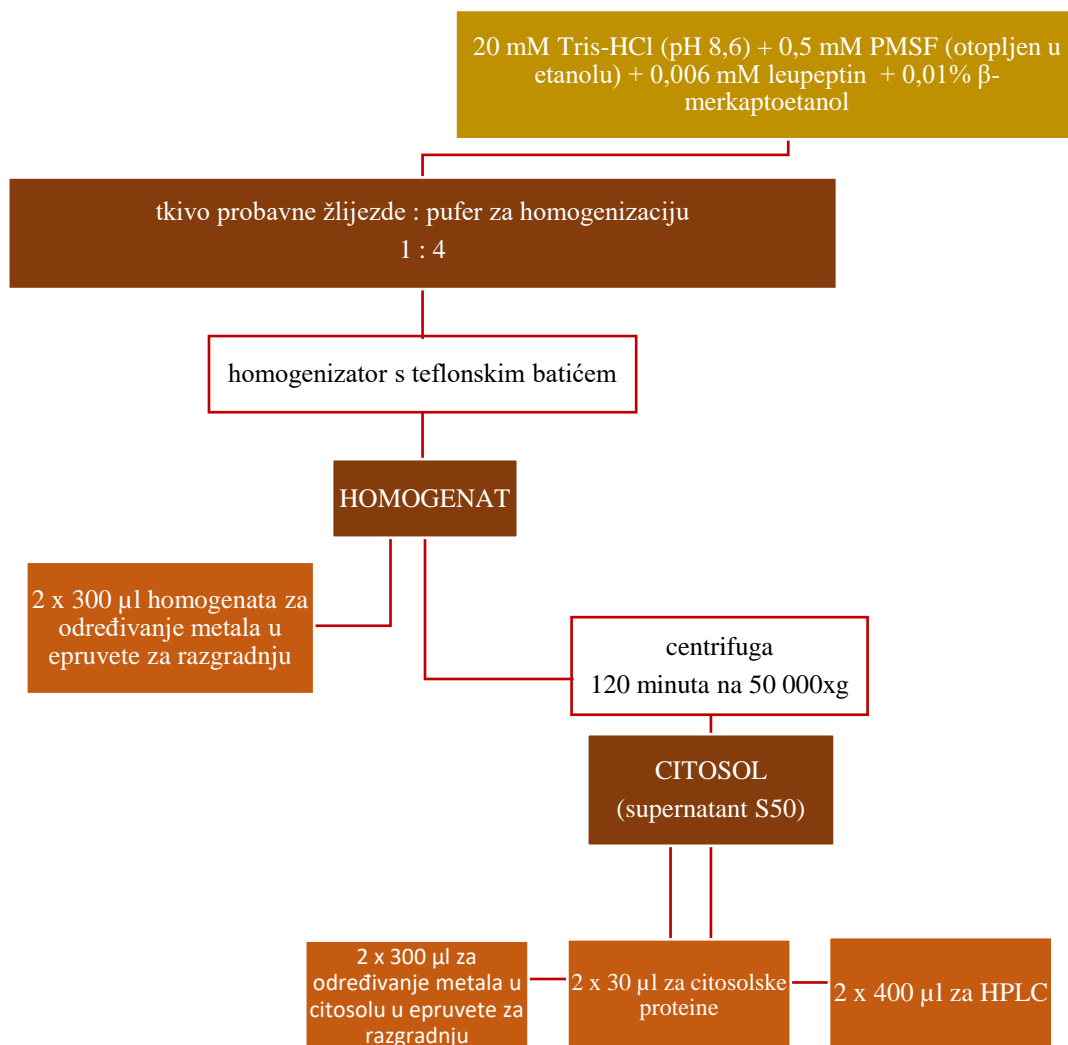
### 2.3. Seciranje pokusnih organizama

Školjkaše sam stavila u plastične posude s aeriranom dekloriranom vodom na 24-satnu purifikaciju. Nakon što su prošli kroz proces purifikacije, sastrugala sam obraštaj s njih te izmjerila i zapisala biometrijske parametre. Na početku sam izmjerila duljinu (cm), širinu (cm) i visinu (cm) školjkaša. Zatim sam iz otvorenog školjkaša pobrisala višak vode i izmjerila masu

otvorenog ocijedenog školjkaša (g). Izvadila sam unutrašnjost školjkaša i izmjerila masu ljuštore (g). Unutrašnjost je secirana i izdvojene su probavne žlijezde. Nakon mjerenja mase, probavne žlijezde sam zamrznula u tekućem dušiku, a potom su do daljnje obrade i analize pohranjene u zamrzivaču na -80 °C. Indeks kondicije školjkaša (IK) izračunat je prema formuli:  $IK (\%) = (\text{masa mesa (g)}/\text{volumen školjke (cm}^3)) \times 100$ .

#### **2.4. Priprema homogenata i citosola tkiva probavnih žlijezda**

Tkivo probavne žlijezde koje je bilo pohranjeno u zamrzivaču na -80 °C pripremila sam za određivanje metala u homogenatima i citosolskoj frakciji tkiva, određivanje sadržaja proteina u citosolima te za razdvajanje biomolekula citosola prema molekularnoj masi na HPLC-u i naknadno određivanje metala u kromatografski razdvojenim frakcijama citosola (Slika 5).



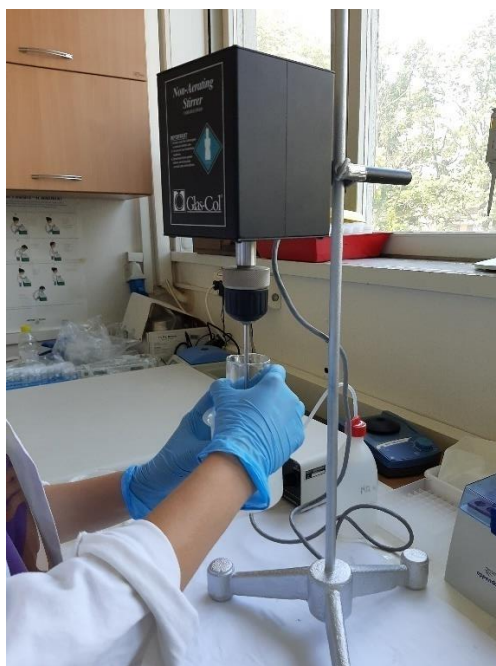
**Slika 5.** Shematski prikaz postupka pripreme homogenata i citosola tkiva probavne žlijezde za analizu sadržaja metala u homogenatu i citosolu tkiva, analizu sadržaja ukupnih proteina u citosolu te za razdvajanje biomolekula citosola prema molekularnoj masi na HPLC-u

Za homogenizaciju tkiva pripremila sam pufer za homogenizaciju sljedećeg sastava:

- 20 mM Tris-HCl, pH 8,6 (na 5 °C)
- 0,006 mM leupeptin i 0,5 mM PMSF (fenilmetilsulfonyl-fluorid)
- 0,01 % β-merkaptioetanol

Leupeptin i PMSF se koriste kao inhibitori proteolitičke aktivnosti, a β-merkaptioetanol kao reducens. Sve kemikalije korištene u pripremi pufera za homogenizaciju nabavljene su od

Sigma Chemical Co. (St. Louis, SAD), a za pripremu otopina korištena je Milli-Q voda. Tijekom postupka homogenizacije u ledenoj kupelji sam držala prethodno pripremljen pufer za homogenizaciju i tkivo probavnih žlijezda koje sam izvadila iz zamrzivača, gdje je bilo pohranjeno na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . U staklenim posudicama odvagala sam oko 600 mg tkiva te ga po potrebi isjeckala škarama. Dodala sam pufer za homogenizaciju u posudicu s tkivom, u omjeru 4:1, te sam tu smjesu prelila u staklenu epruvetu za homogeniziranje. Homogeniziranje je provedeno pomoću homogenizatora s teflonskim batićem pričvršćenim na rotirajuću osnovu (Potter-Elvehjem GLASS COL, SAD) (Slika 6). Nakon svakog homogeniziranja batić homogenizatora, škare i pincetu isprala sam Milli-Q vodom. Homogenat sam prebacila u označene epruvete za centrifugiranje i stavila na led. Iz homogenata sam odvojila  $2 \times 300\text{ }\mu\text{l}$  za određivanje metala u epruvete za razgradnju koje se pohranjuju na  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



**Slika 6.** Homogeniziranje tkiva probavne žlijezde školjkaša pomoću homogenizatora s teflonskim batićem pričvršćenim na rotirajuću osnovu (snimila dr. sc. Dušica Ivanković).

Homogenat sam centrifugirala u Avanti J-E (Beckman Coulter, SAD) centrifugi 120 minuta na  $50\,000 \times g$ . Dobiven je supernatant (S50) koji sam pomoću Pasteurove pipete, izbjegavajući talog i masnoće, prebacila u novu ohlađenu epruvetu. Supernatant sam razdijelila u prethodno označene epruvete:

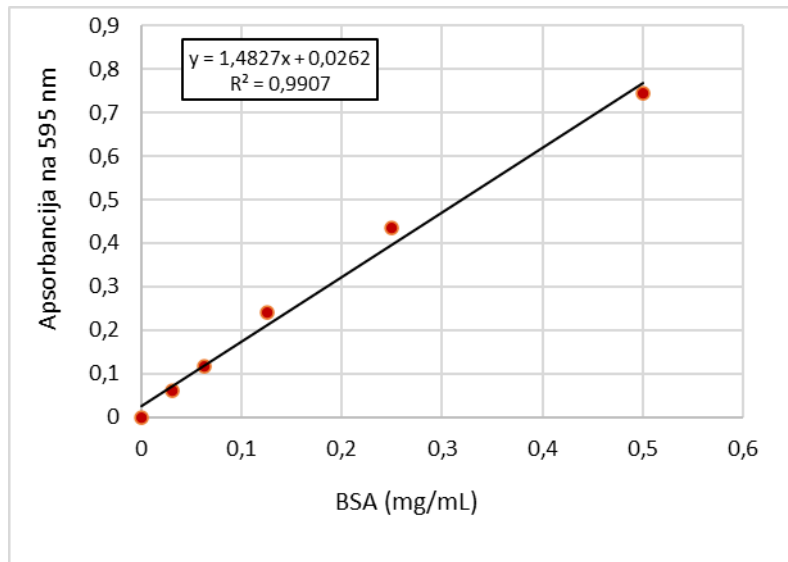


- 2 x 30  $\mu$ l za određivanje koncentracije proteina u citosolu
- 2 x 300  $\mu$ l za određivanje koncentracije metala u citosolu u epruvete za razgradnju, pohranjeno je na 4 °C
- 2 x 400  $\mu$ l za razdvajanje biomolekula citosola na HPLC-u, pohranjeno je na -80 °C.

## 2.5. Određivanje koncentracije proteina

Mjerenje koncentracija proteina u citosolima probavnih žlijezda provela sam kolorimetrijskom metodom prema Bradfordu (1976). Reakcijom otopljenih proteina s reagensom Coomassie Brilliant Blue (CBB reagens: 0,01 % Coomassie Brilliant Blue G-250; 4,7 % etanol; 8,5 %  $H_3PO_4$ ) dolazi do vezanja anionske boje za  $NH_2$  skupine proteina, što je praćeno promjenom boje reagensa i pojavom apsorpcijskog maksimuma kod 595 nm ( $A_{595}$ ). Kvantitativno određivanje proteina temelji se na linearnoj ovisnosti apsorbanije  $A_{595}$  o masi proteina u rastućem nizu standardnih otopina (albumin iz goveđeg seruma; BSA-bovine serum albumine; Serva, Feinbiochemia, Njemačka) (Slika 7).

U ovom radu koristila sam metodu u mikroploči. Iz osnovne otopine BSA (1 mg/mL) pripremila sam rastući niz standardnih otopina BSA u 20 mM Tris puferu (pH 8,6): 0,0625; 0,125; 0,250 i 0,5 mg/mL. Prije analize sam uzorke citosola razrijedila 30 puta sa istim puferom u kojem sam pripremila standarde kako bi im koncentracije bile ispod 0,5 mg/mL. Volumen od 10  $\mu$ l pripremljenog uzorka, odnosno standarda, dodala sam u triplikatu u jažice na mikropločici, a zatim sam u sve jažice dodala po 300  $\mu$ l CBB reagensa. Nakon dodavanja reagensa pločicu sam protresla kako bi se uzorak i reagens pomiješali, ostavila stajati 10 minuta prekriveno folijom, nakon čega se pomoću fotometra za mikroploče (Infinite M200, Tecan, Švicarska) izmjerila apsorbanija na 595 nm. Određivanje proteina napravljeno je u dva nezavisna razrjeđenja svakog od uzoraka citosola.



**Slika 7.** Kalibracijski pravac prema kojem su određene koncentracije proteina u citosolima probavnih žlijezda

## 2.6. Razgradnja homogenata i citosola

Za razgradnju homogenata i citosola probavnih žlijezdi koristila sam plastične epruvete volumena 10 ml, s koničnim dnom i prethodno oprane u 10 % HNO<sub>3</sub> (Kemika, p.a.). Usporedno s homogenatima i citosolom probavnih žlijezdi kroz iste postupke razgradnje je tretirana slijepa proba koja je istog sastava kao i pufer za homogenizaciju.

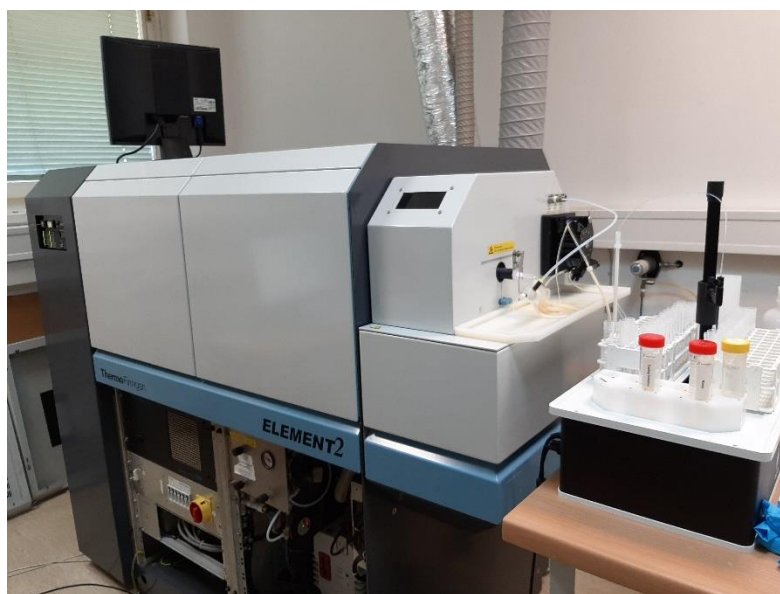
Za razgradnju homogenata odpipetirala sam 300 µl homogenata i oksidacijsku smjesu od 675 µl koncentrirane HNO<sub>3</sub> (*Rotipuran Supra 69 %*, Carl Roth GmbH + Co. KG, Njemačka) i 225 µl 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (*Suprapur*, Merck, Njemačka). Pipetirala sam dva puta, za poduzorke A i B. Oko poklopca epruvete omotala sam teflonsku trakicu, a zatim sam epruvete stavila na grijanje 3,5 sati u sušionik na 85 °C. Nakon što se razgrađeni homogenat ohladio razrijedila sam ga pet puta s Mili-Q vodom tako što sam na 500 µl razgrađenog homogenata dodala 1,975 ml Mili-Q vode i 25 µl indija (interni standard) u koncentraciji 1 µg/L (Fluka, Njemačka). Konačna koncentracija kiseline, odnosno HNO<sub>3</sub>, nakon razrjeđivanja bila je oko 8 %. Epruvetu sam protresla da indij ne zaostane na stjenkama.

Za razgradnju citosola sam dva puta, za poduzorke A i B, odpipetirala 300 µl citosola i oksidacijske smjese od 225 µl HNO<sub>3</sub> i 75 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Oko poklopca epruvete omotala sam teflonsku trakicu. Zatim sam epruvete stavila na grijanje 3,5 sati u sušionik na 85 °C. Nakon

što se razgrađeni citosol ohladi razrijedila sam ga pet puta s Mili-Q vodom i dodala indij po istom postupku kao za razrjeđenje homogenata. Konačna koncentracija kiseline bila je oko 5 %.

## 2.7. Određivanje koncentracije metala i metaloida

Razgrađeni homogenati i citosoli su korišteni za određivanje ukupnog i citosolskog metala. Mjerenje koncentracije metala i metaloida je provedeno na masenom spektrometru visoke rezolucije s induktivno spregnutom plazmom, HR ICP-MS Element 2 (Thermo Finnigan, Njemačka) (Slika 8). HR ICP-MS je opremljen automatskim dodavačem uzorka SC-2 DX FAST (Elemental Scientific, SAD). Mjerenje na uređaju obavljeno je u suradnji s dr. sc. Zrinkom Dragun sa Zavoda za istraživanje mora i okoliša Instituta Ruđer Bošković.



**Slika 8.** Maseni spektrometar visoke rezolucije s induktivno spregnutom plazmom (HR ICP-MS).

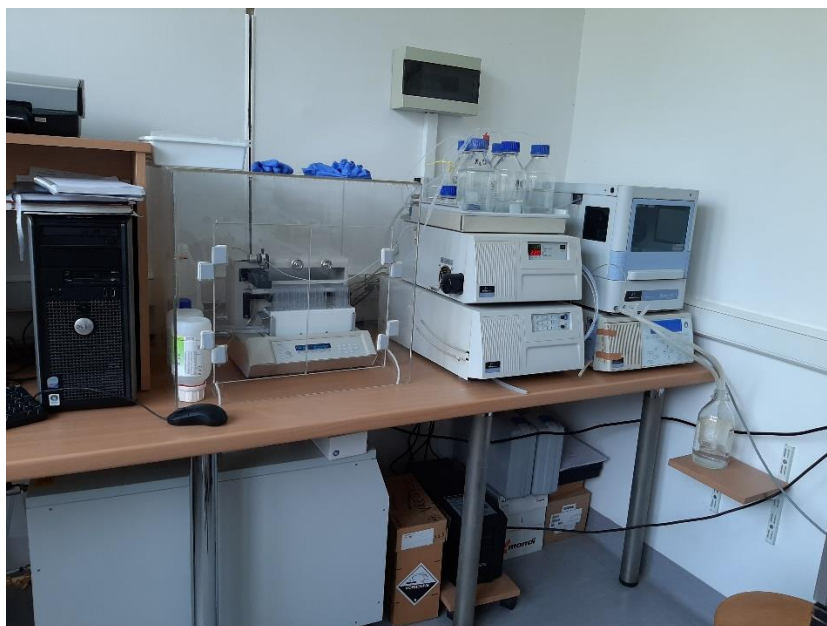
Analizirano je ukupno 9 elementa u tragovima. Mjerenje  $^{95}\text{Mo}$ ,  $^{82}\text{Se}$ ,  $^{109}\text{Ag}$  i  $^{111}\text{Cd}$  je provedeno na niskoj rezoluciji,  $^{59}\text{Co}$ ,  $^{63}\text{Cu}$ ,  $^{56}\text{Fe}$  i  $^{66}\text{Zn}$  na srednjoj rezoluciji, a  $^{75}\text{As}$  na visokoj rezoluciji. Vanjska kalibracija je obavljena korištenjem standardnih otopina. Kalibracijska otopina je pripremljena razrjeđenjem iz multielementne standardne otopine za elemente u tragovima

(Analytika, Češka) i standardne otopine koja sadrži Ag (Sigma-Aldrich, Njemačka). Kalibracijski standardi pripremani su u 1,3 % HNO<sub>3</sub> (Suprapur, Merck, Njemačka) uz dodatak indija (Fluka, Germany) kao internog standarda (1 µg/L). Točnost i preciznost mjerenja uređajem HR ICP-MS je testirana kontrolnim uzorkom za elemente u tragovima (QC, kataloški broj 8072, UNEP GEMS, Burlington, Kanada).

Određene su granice detekcije za mjerenje koncentracija metala i metaloida u homogenatima i citosolima probavnih žlijezda. Granice detekcije izračunate su kao tri standardne devijacije 10 mjerenja metala i metaloida u slijepoj probi (pufer za homogenizaciju) koja je prošla isti postupak razgradnje kao i uzorci homogenata i citosola probavnih žlijezda. Granice detekcije u homogenatima tkiva iznosile su (u µg/g tkiva): Co 0,0003; Cu 0,045; Fe 0,08; Mo 0,0008; Se 0,002; Zn 0,249; Ag 0,0002, As 0,001 i Cd 0,0002, dok su granice detekcije u citosolima bile sljedeće (u µg/g tkiva): Co 0,0003; Cu 0,006; Fe 0,101; Mo 0,0003; Se 0,002; Zn 0,389; Ag 0,0001, As 0,001 i Cd 0,0001.

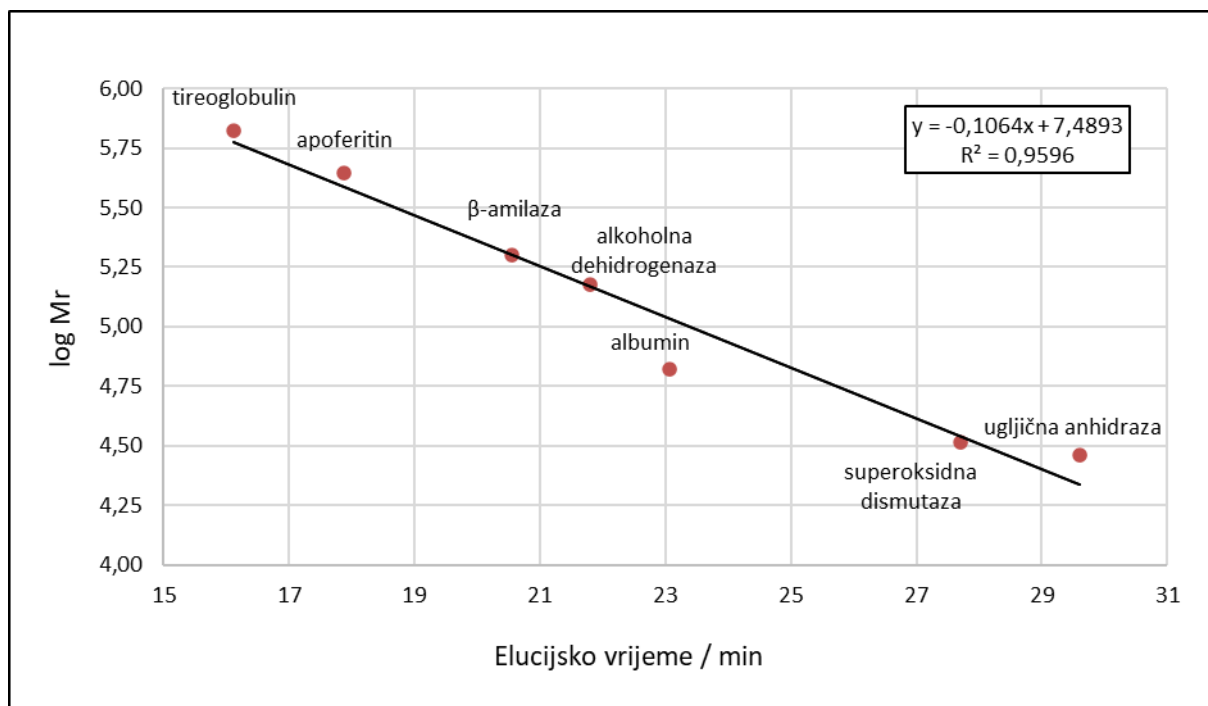
## **2.8. Razlučivanje citosola pomoću visokodjelotvorne tekućinske kromatografije uz isključenje molekula po veličini (SE-HPLC)**

Za analizu raspodjele metala među citosolskim molekulama različitih molekulskih masa korištena je kolona Superdex<sup>TM</sup> 200 10/300 GL (GE Healthcare Biosciences) i HPLC sustav Perkin-Elmer, serija 200 (Slika 9, Perkin Elmer Inc., Norwalk, CT, SAD). Kolona Superdex<sup>TM</sup> 200 10/300 GL ima granicu isključenja za globularne proteine 1300 kDa, a optimalno područje razlučivanja je između 10 i 600 kDa. HPLC sustav je opremljen s kvaterarnom visokotlačnom pumpom, otplinjačem, pećnicom kolone, termostatiranim automatskim dodavačem uzoraka s injektorom i UV/VIS detektorom s diodnim nizom (DAD detektor). Računalo s programskim paketom TotalChrome verzijom 6.3.1. (Perkin-Elmer) je prikupljalo podatke i upravljalo sustavom. Mjerenje na uređaju je obavljeno u suradnji s dr. sc. Nesrete Krasnići sa Zavoda za istraživanje mora i okoliša Instituta Ruđer Bošković.



**Slika 9.** Sustav visokodjelotvorne tekućinske kromatografije uz isključenje molekula po veličini (SE-HPLC sustav).

Plavi dekstran, molekulske mase 2 000 kDa, je korišten za određivanje praznog volumena kolone, elucijsko vrijeme mu je bilo 15,41 minuta. Za kalibraciju kolone korišteni su sljedeći proteinski standardi: tireoglobulin molekulske mase 669 kDa; apoferitin, 443 kDa;  $\beta$ -amilaza, 200 kDa; alkoholna dehidrogenaza, 150 kDa; albumin, 66 kDa; superoksidna dismutaza, 32,5 kDa i ugljična anhidraza, 29 kDa (Slika 10). Proteinski standardi su prethodno otopljeni u puferu 20 mM Tris-HCl/Base (pH 8,1, 22 °C), koji je također korišten kao mobilna faza s brzinom protoka 0,5 mL/min. Svaki je standard kromatografiran zasebno, a elucijsko vrijeme ( $t_e$ ) standarda određeno je prema položaju maksimuma apsorbancije na 280 nm. Kalibracijom kolone s proteinskim standardima poznatih molekulskih masa određuje se približna molekulska masa citosolskih biomolekula koje vežu metale (Slika 10).



**Slika 10.** Kalibracijska krivulja prikazuje linearnu ovisnost logaritma molekulske mase proteinskih standarda i elucijskog vremena.

Alikvoti S50 koji su bili pohranjeni na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  i namijenjeni za mjerenje na SE-HPLC sustavu su prije analize centrifugirani 10 minuta na  $11\ 000\times g$  na  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Na kolonu je aplicirano  $100\ \mu\text{L}$  uzorka, a brzina protoka mobilne faze ( $20\ \text{mM Tris-HCl}$ ,  $\text{pH } 8,1$ ,  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) iznosila je  $0,5\ \text{mL/min}$ . Za svaki uzorak se uzastopno dvaput radila kromatografska analiza kako bi se mogao prikupiti volumen od  $1\ \text{ml}$  za analizu metala na HR ICP-MS-u. Prikupljanje frakcija se vršilo pomoću termostatiranog automatskog sakupljača Gilson FC203B (Middleton WI, USA). Frakcije uzorka su sakupljane u intervalima od  $1$  minute, počevši od  $13.$  minute i sa završetkom u  $53.$  minuti, čineći ukupno  $40$  frakcija. Prve s kolone izlaze velike molekule, dok se molekule s manjom molekulskom masom duže zadržavaju u koloni. Nakon kromatografije, uzorci ( $950\ \mu\text{L}$  iz svake frakcije) su prebačeni u nove epruvete i zakiseljeni s  $1\ \%$  v/v  $65\ \%$   $\text{HNO}_3$  te im je dodan indij ( $1\ \mu\text{g/L}$ ) kao interni standard. Tako pripremljeni uzorci pohranjeni su na  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  do analize metala na HR ICP-MS-u.

## 2.9. Statistička obrada podataka

Rezultati mjerenja koncentracija metala i metaloida za dvije vrste obradila sam opisnim

statističkim metodama (aritmetička sredina  $\pm$  SD) te prikazala u tablicama. Izračune sam provela u računalnom programu Microsoft Excel 2013. Statističke usporedbe između vrsta za analizirane pokazatelje provela sam pomoću t-testa za nezavisne uzorke u statističkom programu SigmaPlot 11.0 za Windowse (Systat Software Inc.), s razinom značajnosti postavljenom na 95 % ( $p < 0,05$ ). U istom programu izradila sam i grafičke prikaze profila raspodjele metala i metaloida među biomolekulama različitih molekulskih masa u citosolu probavnih žlijezda dobivenih pomoću SE-HPLC-a.

## 3. Rezultati

### 3.1. Morfološki pokazatelji i indeks kondicije školjkaša

Srednje vrijednosti biometrijskih pokazatelja te njihov raspon od minimuma do maksimuma za vrste *U. pictorum* i *A. anatina* prikazane su u Tablici 1. Vrste su bile podjednake duljine, širine i visine školjke, dok je masa školjke i masa samog školjkaša veća kod *U. pictorum*. Isti trend prate i indeks kondicije kao i omjeri mase i duljine školjke koji su također bili viši kod *U. pictorum*.

**Tablica 1.** Morfološki pokazatelji i indeksi kondicije školjkaša *Unio pictorum* i *Anodonta anatina*. Prikazane su srednje vrijednosti  $\pm$  SD i raspon min-max (n=15).

	<i>Unio pictorum</i>	<i>Anodonta anatina</i>
Duljina školjke (cm)	8,45 $\pm$ 0,49 (7,50-9,30)	8,53 $\pm$ 0,87 (7,00-10,00)
Širina školjke (cm)	2,89 $\pm$ 0,20 (2,50-3,20)	2,69 $\pm$ 0,32 (2,10-3,20)
Visina školjke (cm)	3,55 $\pm$ 0,22 (3,20-3,90)	4,05 $\pm$ 0,33 (3,50-4,60)
Masa školjkaša (g)	46,09 $\pm$ 7,77 (31,59-56,53)	33,56 $\pm$ 10,80 (19,57-49,85)
Masa školjke (g)	25,35 $\pm$ 4,63 (15,75-31,90)	12,26 $\pm$ 4,43 (6,48-20,24)
Omjer masa školjke/duljina školjke (g/cm)	2,98 $\pm$ 0,44 (2,10-3,54)	1,41 $\pm$ 0,39 (0,84-2,02)
Indeks kondicije na volumen (%)	23,82 $\pm$ 1,97 (20,13-27,23)	22,30 $\pm$ 2,68 (16,92-27,97)



### 3.2. Ukupne koncentracije odabranih esencijalnih i neesencijalnih elemenata u probavnim žlijezdama *U. pictorum* i *A. anatina*

Ukupne koncentracije 6 esencijalnih i 3 neesencijalna elementa u tragovima iz probavne žlijezde dviju pokusnih vrsta su prikazane uzlaznim redoslijedom od nižih do viših koncentracija u Tablici 2.

Koncentracije esencijalnih elemenata koje su bile ispod 1 µg/g tkiva su bile zabilježene za Co, Mo i Se. Koncentracije Cu su bile oko 1 µg/g tkiva, dok su Zn i Fe bili prisutni u višim koncentracijama. Sve ukupne koncentracije esencijalnih elemenata su se statistički značajno razlikovale između dvije pokusne vrste. Sve ukupne koncentracije elemenata su bile više kod vrste *U. pictorum* u usporedbi s *A. anatina*. Najniža koncentracija esencijalnih elemenata je zabilježena za Co kod vrste *A. anatina* koja je bila trostruko niža od koncentracije Co kod *U. pictorum*, a najviša koncentracija je zabilježena za Fe kod vrste *U. pictorum* što je bilo skoro četverostruko više od koncentracije Fe kod *A. anatina*.

Sve koncentracije neesencijalnih elemenata su bile ispod 1 µg/g tkiva. Najniže koncentracije su zabilježene za Ag i bile su niže od 0,01 µg/g tkiva. Statistički značajne razlike između *U. pictorum* i *A. anatina* su zabilježene za koncentracije Cd i As. Kod *U. pictorum* su koncentracije Cd bile 13 puta više nego kod *A. anatina*. Obje vrste su imale podjednake koncentracije Ag.

**Tablica 2.** Ukupne koncentracije odabranih 6 esencijalnih i 3 neesencijalna elementa (µg/g tkiva) u probavnim žlijezdama školjkaša *Unio pictorum* i *Anodonta anatina*. Prikazane su srednje vrijednosti ± SD (n=15), rasponi min-max i razina statističke značajnosti (p vrijednost) prema t-testu. Razlike u ukupnim koncentracijama elemenata između istraživanih vrsta smatraju se statistički značajnima kada je p<0,05 (označeno crvenom bojom).

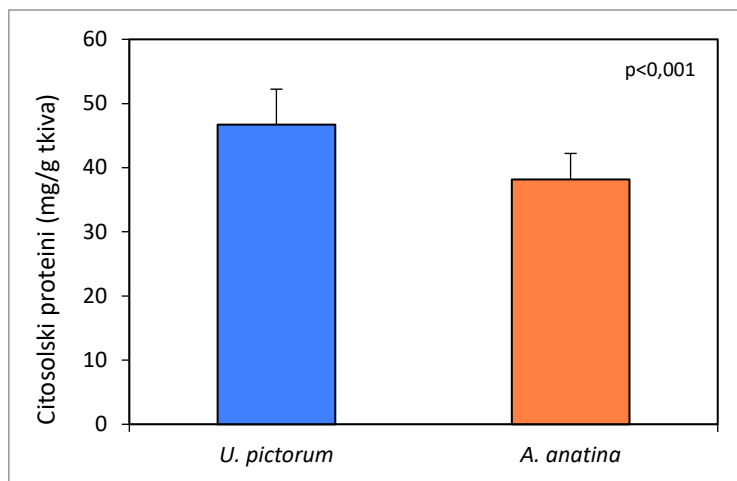
Element (µg/g tkiva)		<i>Unio pictorum</i>	<i>Anodonta anatina</i>	p
Esencijalni	Co	0,216 ± 0,082 (0,099-0,368)	0,061 ± 0,018 (0,046-0,116)	<0,001
	Mo	0,185 ± 0,017 (0,143-0,202)	0,161 ± 0,016 (0,135-0,200)	<0,001
	Se	0,585 ± 0,063	0,428 ± 0,068	<0,001

		(0,500-0,689)	(0,226-0,522)	
	Cu	1,161 ± 0,142 (0,885-1,451)	1,019 ± 0,193 (0,573-1,334)	0,027
	Zn	13,426 ± 1,630 (11,427-16,967)	8,516 ± 0,918 (6,325-9,950)	<0,001
	Fe	225,025 ± 100,559 (84,949-350,628)	59,908 ± 22,738 (28,733-113,176)	<0,001
Neesencijalni	Ag	0,008 ± 0,002 (0,006-0,012)	0,007 ± 0,002 (0,005-0,010)	0.092
	Cd	0,695 ± 0,305 (0,224-1,202)	0,053 ± 0,013 (0,032-0,081)	<0,001
	As	0,455 ± 0,063 (0,266-0,561)	0,386 ± 0,032 (0,335-0,456)	<0,001

### 3.3. Koncentracije proteina u citosolima probavnih žlijezda *U. pictorum* i *A. anatina*

Koncentracije proteina u citosolskoj frakciji probavnih žlijezda dviju pokusnih vrsta prikazane su na Slici 11.

Kao što se može vidjeti na Slici 11, statistički značajno više koncentracije citosolskih proteina utvrđene su u vrste *U. pictorum*. Srednja vrijednost koncentracije proteina u citosolima za vrstu *U. pictorum* je iznosila 46,71, a za vrstu *A. anatina* 38,16 mg/g tkiva.



**Slika 11.** Koncentracija proteina u citosolima probavnih žlijezda (mg/g tkiva) školjkaša *Unio pictorum* i *Anodonta anatina*. Prikazane su srednje vrijednosti  $\pm$  SD (n=15). Vrijednost p u gornjem desnom kutu označava statistički značajnu razliku između vrsta u sadržaju citosolskih proteina prema t-testu.

### 3.4. Koncentracije odabranih esencijalnih i neesencijalnih elemenata u citosolima probavnih žlijezda *U. pictorum* i *A. anatina*

Koncentracije 6 esencijalnih i 3 neesencijalna elementa u tragovima iz metabolički dostupnih citosolskih frakcija probavne žlijezde dviju pokusnih vrsta su u Tablici 3.

Koncentracija niža od 0,1  $\mu\text{g/g}$  tkiva kod esencijalnih elemenata je bila zabilježena za Co, dok su Mo, Se i Cu bili prisutni u koncentraciji do 1  $\mu\text{g/g}$  tkiva, a Fe i Zn su zabilježeni u višim koncentracijama, oko 10  $\mu\text{g/g}$  tkiva. Statistički značajne razlike u koncentracijama Co, Se, Zn i Fe su utvrđene između dvije pokusne vrste.

Neesencijalni elementi su bili prisutni u koncentracijama manjim od 1  $\mu\text{g/g}$  tkiva. Najmanje koncentracije, koje su ujedno i podjednake između pokusnih vrsta, su bile zabilježene za Ag. Utvrđene su statistički značajne razlike kod koncentracija Cd i As između *U. pictorum* i *A. anatina*. Koncentracije Cd su bile skoro 13 puta više kod *U. pictorum*.

**Tablica 3.** Koncentracije odabranih 6 esencijalnih i 3 neesencijalna elementa ( $\mu\text{g/g}$  tkiva) u citosolu probavnih žlijezda školjkaša *Unio pictorum* i *Anodonta anatina*. Prikazane su srednje vrijednosti  $\pm$  SD (n=15), rasponi min-max i razina statističke značajnosti (p vrijednost) prema t-testu. Razlike u citosolskim koncentracijama elemenata između istraživanih vrsta smatraju se statistički značajnima kada je  $p < 0,05$  (označeno crvenom bojom).

Element ( $\mu\text{g/g}$ tkiva)	<i>Unio pictorum</i>	<i>Anodonta anatina</i>	p	
Esencijalni	Co	0,047 $\pm$ 0,007 (0,034-0,059)	0,034 $\pm$ 0,010 (0,026-0,068)	<0,001
	Mo	0,119 $\pm$ 0,014 (0,096-0,149)	0,113 $\pm$ 0,017 (0,085-0,143)	0,315
	Se	0,586 $\pm$ 0,065 (0,499-0,694)	0,446 $\pm$ 0,073 (0,243-0,551)	0,009
	Cu	0,821 $\pm$ 0,122 (0,630-1,103)	0,743 $\pm$ 0,153 (0,462-1,032)	0,128
	Zn	9,856 $\pm$ 0,734 (8,650-11,436)	7,648 $\pm$ 0,836 (6,410-9,371)	<0,001
	Fe	8,907 $\pm$ 2,140 (5,176-12,109)	6,746 $\pm$ 1,842 (4,214-10,940)	0,006
Neesencijalni	Ag	0,003 $\pm$ 0,001 (0,002-0,005)	0,003 $\pm$ 0,001 (0,002-0,005)	0,197
	Cd	0,733 $\pm$ 0,323 (0,227-1,270)	0,058 $\pm$ 0,017 (0,033-0,096)	<0,001
	As	0,308 $\pm$ 0,054 (0,161-0,397)	0,233 $\pm$ 0,026 (0,169-0,267)	<0,001

S obzirom da su u dviju pokusnih vrsta utvrđene značajne razlike u ukupnom sadržaju proteina u citosolu, koncentracije elemenata izražene su i prema masi citosolskih proteina (ng elementa/mg proteina) (Tablica 4).

Nakon normalizacije na masu citosolskih proteina, od esencijalnih elemenata, jedino je za Mo utvrđena statistički značajna razlika između vrsta, dok za ostale analizirane esencijalne

elemente (Co, Cu, Se, Zn i Fe) nisu utvrđene značajne razlike među vrstama. Iako značajna, razlika između vrsta u normaliziranim koncentracijama Mo bila je mala i iznosila je ~16 %.

Za razliku od koncentracija izraženih na mokru masu tkiva, normalizirane koncentracije As nisu se razlikovale statistički značajno između vrsta. Normalizirane koncentracije Ag bile su značajno povišene u vrste *A. anatina*, dok su normalizirane koncentracije Cd bile višestruko (~10x) i statistički značajno povišene u vrste *U. pictorum*.

**Tablica 4.** Koncentracije odabranih 6 esencijalnih i 3 neesencijalna elementa u citosolu probavnih žlijezda školjkaša *Unio pictorum* i *Anodonta anatina* izražene prema sadržaju citosolskih proteina (ng elementa/mg proteina). Prikazani su srednja vrijednosti  $\pm$  SD i razina statističke značajnosti (p vrijednost) prema t-testu (n=15). Razlike u citosolskim koncentracijama elemenata normaliziranim na sadržaj proteina između istraživanih vrsta smatraju se statistički značajnima kada je  $p < 0,05$  (označeno crvenom bojom).

Element (ng/mg proteina)	<i>Unio pictorum</i>	<i>Anodonta anatina</i>	p	
Esencijalni	Co	1,04 $\pm$ 0,20	0,92 $\pm$ 0,26	0,162
	Mo	2,63 $\pm$ 0,40	3,05 $\pm$ 0,48	0,015
	Se	12,92 $\pm$ 1,74	11,96 $\pm$ 1,92	0,159
	Cu	18,04 $\pm$ 2,68	19,92 $\pm$ 3,62	0,116
	Zn	217,6 $\pm$ 28,4	205,8 $\pm$ 20,2	0,199
	Fe	195,3 $\pm$ 47,6	181,8 $\pm$ 52,0	0,464
Neesencijalni	Ag	0,069 $\pm$ 0,018	0,095 $\pm$ 0,023	0,002
	Cd	16,26 $\pm$ 7,27	1,60 $\pm$ 0,64	<0,001
	As	6,79 $\pm$ 1,14	6,33 $\pm$ 1,15	0,281

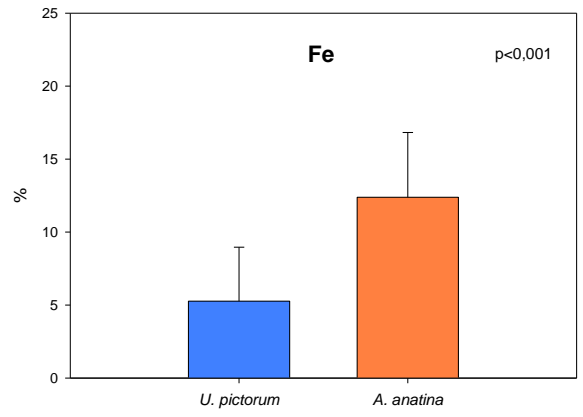
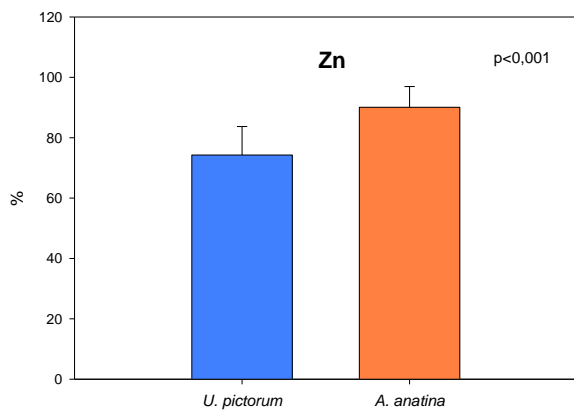
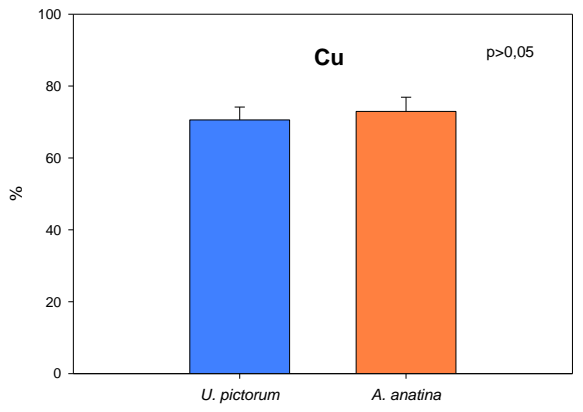
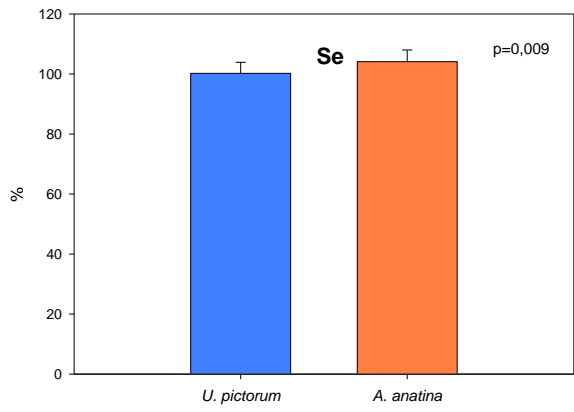
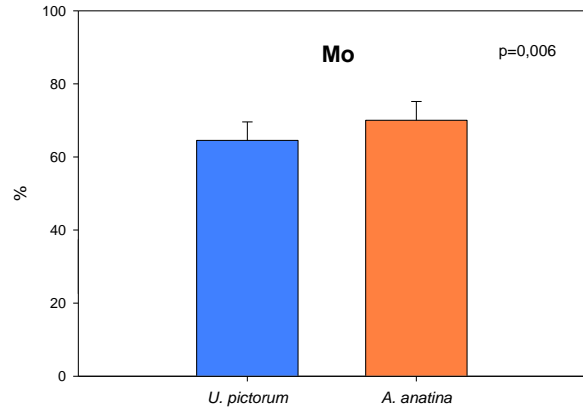
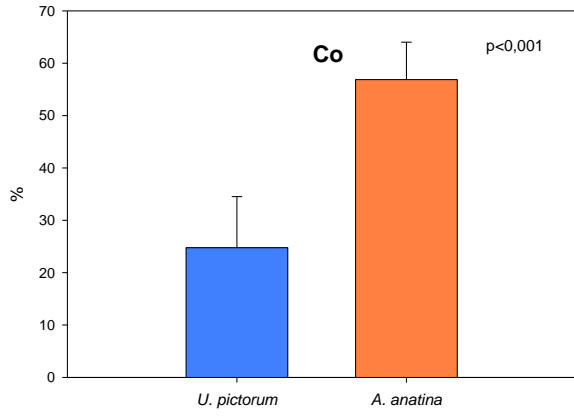
### 3.5. Subcelularna i citosolska raspodjela odabranih esencijalnih i neesencijalnih elemenata u probavnim žlijezdama *U. pictorum* i *A. anatina*

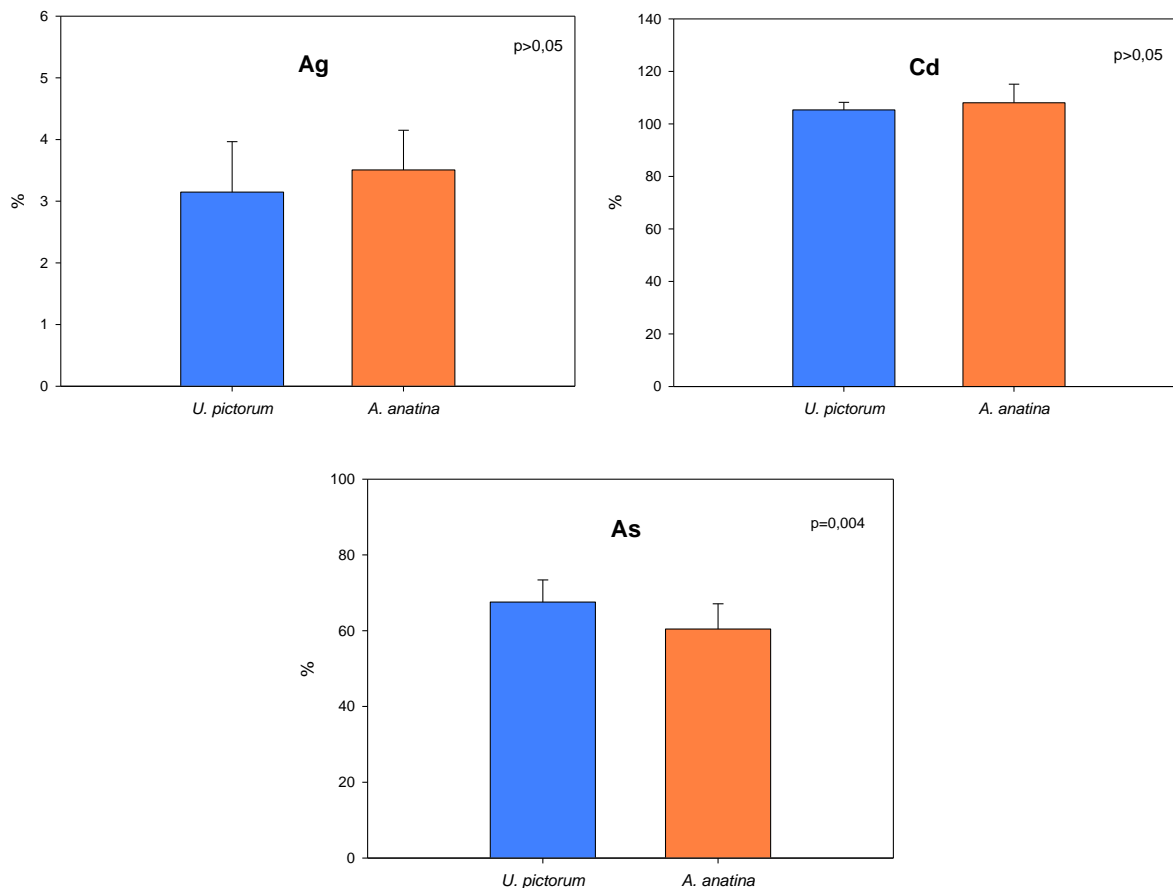
#### 3.5.1. Analiza raspodjele elemenata između vodotopljive (citosol) i netopljive frakcije tkiva probavnih žlijezda

Raspodjela elemenata u probavnim žlijezdama između vodotopljive frakcije odnosno citosola i netopljive frakcije odnosno taloga je prikazana kao postotna zastupljenost elemenata vodotopljive frakcije u ukupnim koncentracijama odabranih elemenata u probavnoj žlijezdi na Slici 12.

Najveća postotna zastupljenost citosolskih esencijalnih elemenata je zabilježena za Se, nakon čega slijede Zn, Cu i Mo. Nešto manja citosolska zastupljenost je bila za Co, a znatno manja za Fe. Statistički značajne razlike u postotnoj zastupljenosti za citosolske elemente kod dviju pokusnih vrsta su ustanovljene za sve esencijalne elemente osim za Cu. Udjeli svih citosolskih esencijalnih elemenata su viši kod *A. anatina*, te je najveća razlika između vrsta kod elemenata Co, Fe i Zn.

Za neesencijalne elemente, daleko najveća postotna zastupljenost u vodotopljivoj frakciji je ustanovljena za Cd, slijedi ga As, a najmanja zastupljenost je utvrđena za Ag. Statistički značajna razlika između vrsta je zabilježena samo za As. Od svih analiziranih elemenata jedino je As imao viši udio zastupljenosti u vodotopljivoj frakciji kod *U. pictorum*, ostali su bili zastupljeni u većem postotku kod *A. anatina*.





**Slika 12.** Postotna citosolska zastupljenost odabranih 6 esencijalnih i 3 neesencijalna elementa u probavnoj žlijezdi školjkaša *U. pictorum* i *A. anatina*. Vrijednosti p su navedene u gornjem desnom kutu grafikona i označavaju statistički značajnu razliku (ako je  $p < 0,05$ ) između istraživanih vrsta u postotnoj citosolskoj zastupljenosti elementa prema t-testu.

### 3.5.2. Analiza citosolske raspodjele odabranih elemenata između biomolekula različitih molekularnih masa primjenom HPLC-a s isključenjem molekula po veličini

Karakterizacija biomolekula koje vežu odabrane elemente iz citosola probavnih žlijezdi školjkaša je temeljena na njihovim molekularnim masama (MM). Definirane su sljedeće kategorije: VVMM, VMM, SMM, NMM (obuhvatno s NMM-MT) i VNMM. VVMM je označavala vrlo veliku molekularnu masu,  $> 400$  kDa i elucijsko vrijeme od 13 do 18 minute. VMM je označavala veliku molekularnu masu, 100–400 kDa, te elucijsko vrijeme od 19 do 23 minute. SMM je označavala srednju molekularnu masu, 30–100 kDa, te elucijsko vrijeme od 24 do 28 minute. NMM je označavala nisku molekularnu masu,  $< 30$  kDa, s elucijskim vremenom

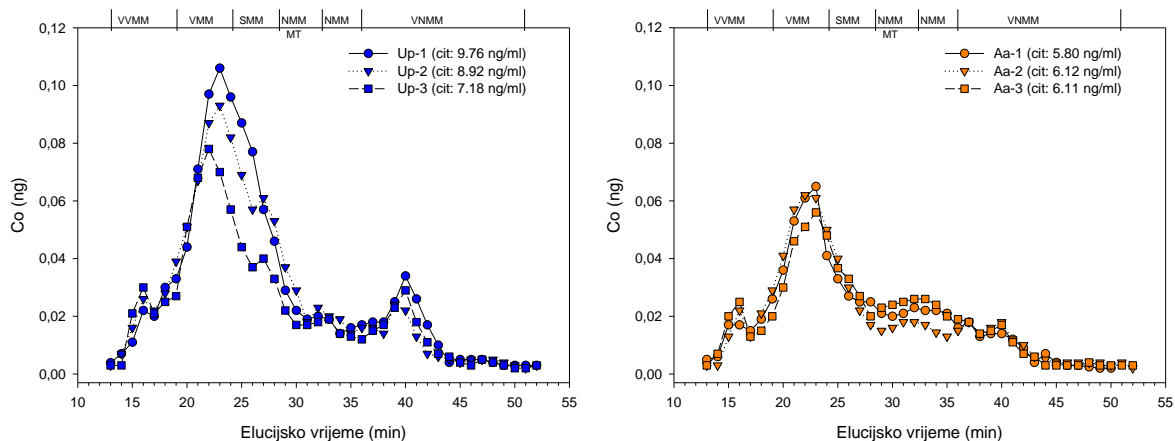


od 29 do 36 minute, a u tu kategoriju ulazi i NMM-MT niska molekulska masa metalotioneina koja je oko 9 – 20 kDa, s elucijskim vremenom od 29 do 32 minute. VNMM je označavala vrlo nisku molekulska masu, <3 kDa, te elucijsko vrijeme >36 minute.

Slike kromatograma su prikazane počevši s 6 esencijalnih elemenata poredanih od najmanjih koncentracija do najvećih koncentracija,  $Co < Mo < Se < Cu < Fe < Zn$ , zatim ih prate 3 neesencijalna elementa također poredanih uzlazno prema koncentraciji prisutnoga elementa,  $Ag < As < Cd$ .

### 3.5.2.1. Kobalt

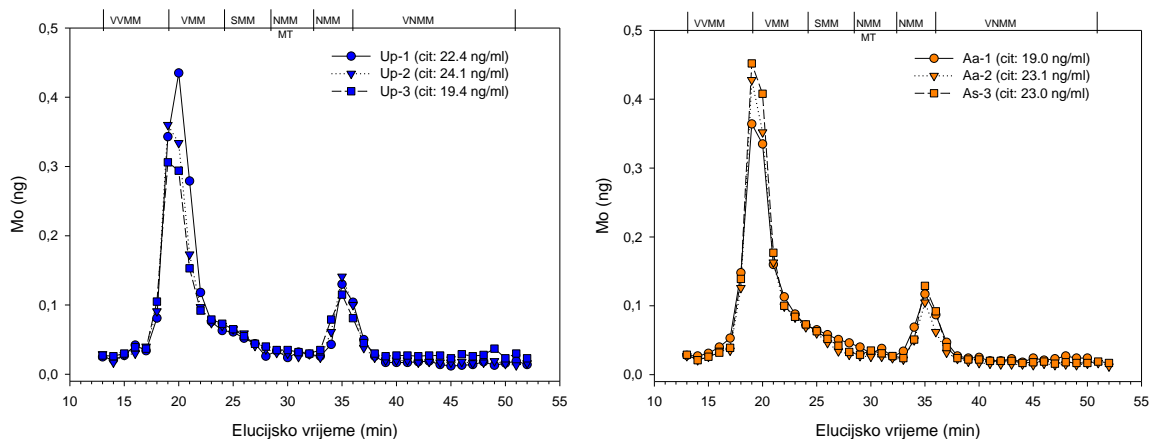
Pojava maksimuma na kromatogramu kod *U. pictorum*, na Slici 13. je vidljiva u području kategorije VMM i SMM, što znači da je citosolski kobalt bio vezan uz frakcije kojima se elucijsko područje, odnosno elucijsko vrijeme poklapalo s molekulama visoke i srednje molekulske mase. Također je zabilježen i drugi manji maksimum u području kategorije VNMM. Za vrstu *A. anatina*, zabilježen je maksimum također u području elucijskog vremena koje obuhvaća kategorije VMM i SMM. Naznake maksimuma su bile prisutne u području kategorije VNMM.



**Slika 13.** Kromatografski profili raspodjele kobalta između citosolskih frakcija probavne žlijezde različitih molekulske mase, razdvojenih SE-HPLC-om sa Superdex™ 200 10/300 GL kolonom, za *U. pictorum* (lijevo) i *A. anatina* (desno). Naznačene su citosolske koncentracije 3 uzorka dviju vrsta, „cit“ u ng/ml, te kategorije molekulske mase: VVMM, VMM, SMM, NMM i VNMM.

### 3.5.2.2. Molibden

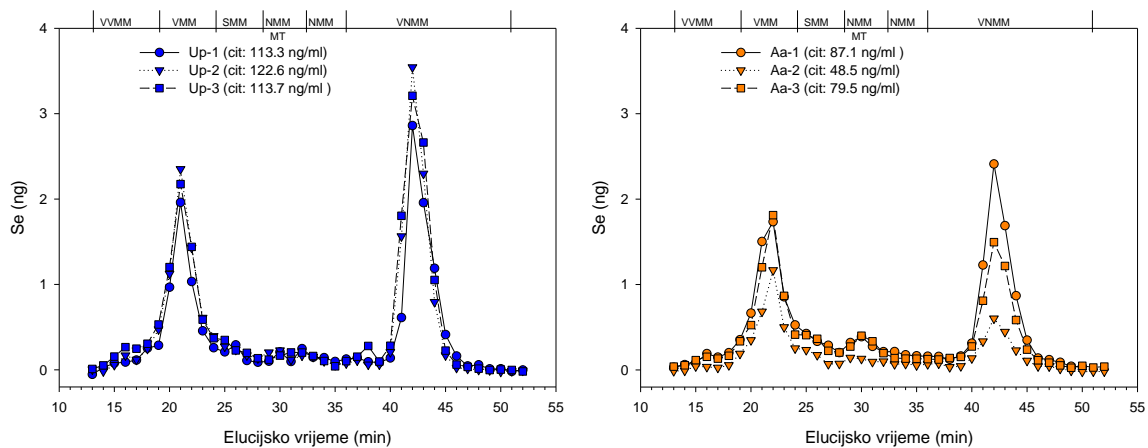
Za element molibden, prikazan na Slici 14., obje vrste su imale podjednaki uski, simetrični pik koji je zabilježen u području kategorije VMM i drugi znatno manji pik u kategoriji NMM. Elucijski maksimum prvog pika nalazi se u 19. minuti i odgovara biomolekulama molekulske mase ~ 310 kDa, dok je elucijski maksimum drugog pika u 35. minuti i odgovara biomolekulama molekulske mase ~5 kDa.



**Slika 14.** Kromatografski profili raspodjele molibdena između citosolskih frakcija probavne žlijezde različitih molekulske masa, razdvojenih SE-HPLC-om sa Superdex™ 200 10/300 GL kolonom, za *U. pictorum* (lijevo) i *A. anatina* (desno). Naznačene su citosolske koncentracije 3 uzorka dviju vrsta, „cit“ u ng/ml, te kategorije molekulske masa: VVMM, VMM, SMM, NMM i VNMM.

### 3.5.2.3. Selen

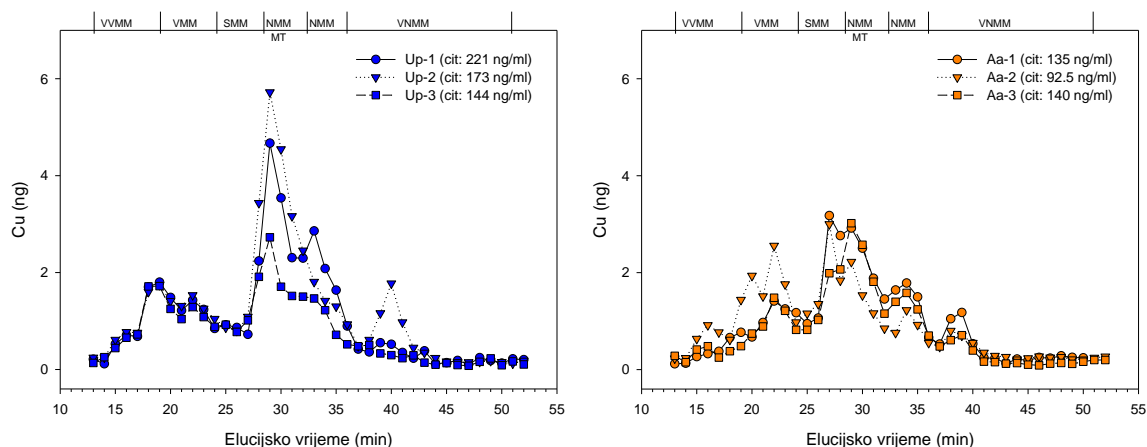
Kod vrste *U. pictorum*, na Slici 15., uočeni su pikovi selena u području kategorija VMM, NMM i VNMM. Većina citosolskog selena eluirala je u VNMM pik s maksimumom u 42. minuti (0,9 kDa) te u VMM pik s maksimumom elucije u 22. minuti (140 kDa). Udio Se u elucijskom području NMM s maksimumom u 30. minuti bio je zanemariv. Kod vrste *A. anatina* maksimumi su bili manji, što je u skladu s nižim citosolskim koncentracijama selena u ove vrste, ali uvelike sličnog trenda kao za *U. pictorum*.



**Slika 15.** Kromatografski profili raspodjele selenija između citosolskih frakcija probavne žlijezde različitih molekulskih masa, razdvojenih SE-HPLC-om sa Superdex™ 200 10/300 GL kolonom, za *U. pictorum* (lijevo) i *A. anatina* (desno). Naznačene su citosolske koncentracije 3 uzorka dviju vrsta, „cit“ u ng/ml, te kategorije molekulskih masa: VVMM, VMM, SMM, NMM i VNMM.

#### 3.5.2.4. Bakar

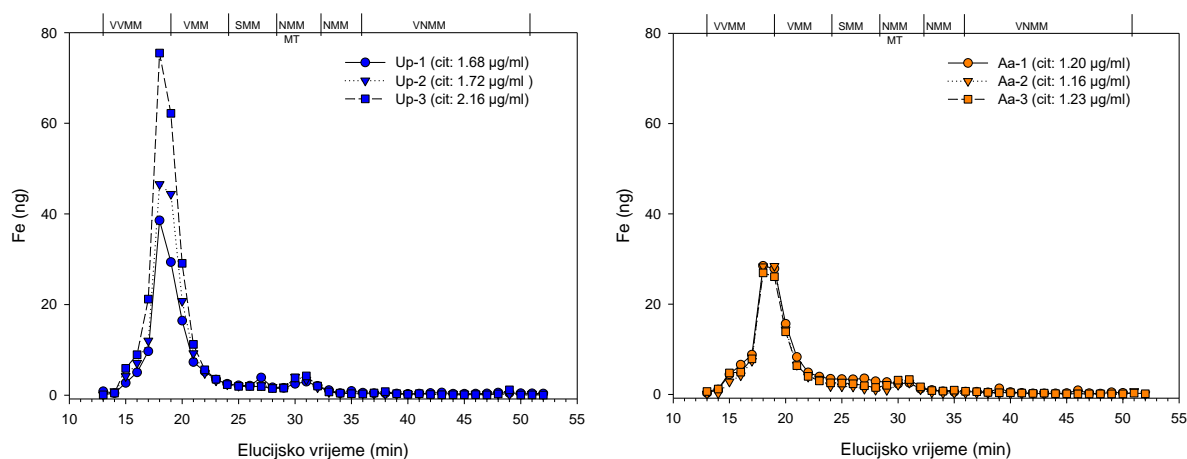
Na Slici 16. prikazani su kromatografski profili raspodjele bakra u dviju pokusnih vrsta. Prvi manji maksimum bakra iz vrste *U. pictorum* je uočen u području eluiranja VVMM (18.-19. minuta; ~400-300 kDa), a glavni maksimum je zabilježen u području NMM – MT (29. minuta; ~24 kDa). Neposredno iza glavnog maksimuma, uočava se još jedan maksimum bakra (33.-34. minute; 9-7 kDa) koji nije u potpunosti odvojen od glavnog maksimuma. Za uzorak Up-2 se pojavio i mali maksimum u području VNMM. Bakar iz vrste *A. anatina* je imao nešto nepravilniji kromatografski profil s više malih maksimuma koji su pokrivali veliki raspon molekulskih masa, no najveći je bio u području između kategorija SMM i NMM – MT.



**Slika 16.** Kromatografski profili raspodjele bakra između citosolskih frakcija probavne žlijezde različitih molekulskih masa, razdvojenih SE-HPLC-om sa Superdex™ 200 10/300 GL kolonom, za *U. pictorum* (lijevo) i *A. anatina* (desno). Naznačene su citosolske koncentracije 3 uzorka dviju vrsta, „cit“ u ng/ml, te kategorije molekulskih masa: VVMM, VMM, SMM, NMM i VNMM.

### 3.5.2.5. Željezo

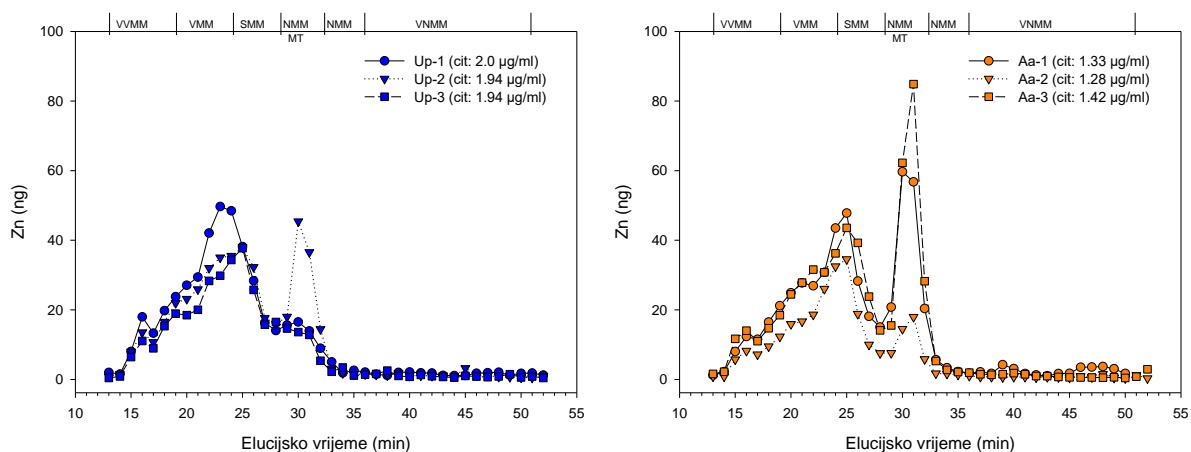
Na Slici 17. kromatografski profil raspodjele željeza kod *U. pictorum* je pokazao dominantni maksimum u području kategorije VVMM i VMM. Također su zabilježene naznake maksimuma u području NMM – MT (31. minuta; ~14 kDa). Kod vrste *A. anatina* željezo je eluiralo na isti način kao i kod *U. pictorum*, samo što je dominantni maksimum bio manji.



**Slika 17.** Kromatografski profili raspodjele željeza između citosolskih frakcija probavne žlijezde različitih molekulskih masa, razdvojenih SE-HPLC-om sa Superdex™ 200 10/300 GL kolonom, za *U. pictorum* (lijevo) i *A. anatina* (desno). Naznačene su citosolske koncentracije 3 uzorka dviju vrsta, „cit“ u ng/ml, te kategorije molekulskih masa: VVMM, VMM, SMM, NMM i VNMM.

### 3.5.2.6. Cink

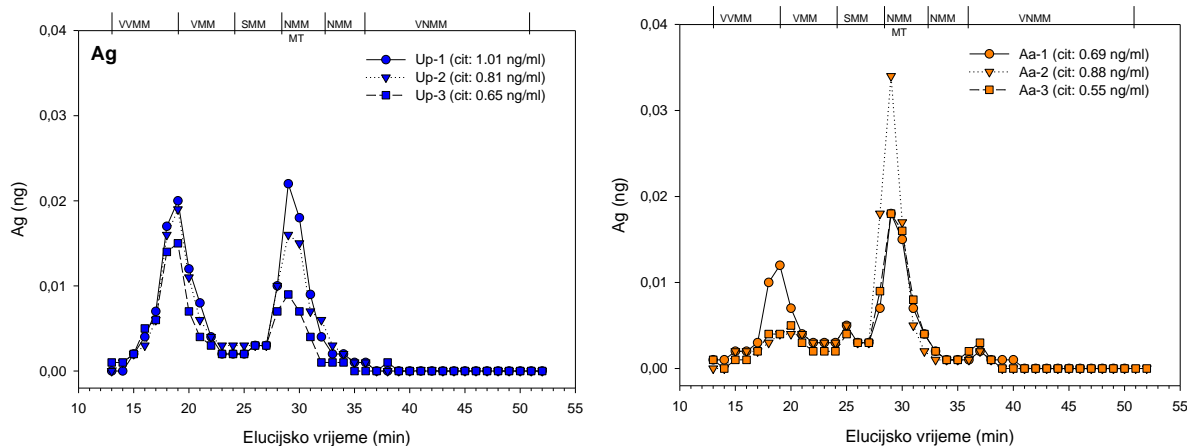
Maksimum cinka kod *U. pictorum*, prikazanog na Slici 18., se nalazi u elucijskom području između VMM i SMM, a uzorak Up-2 je imao i jasno istaknut drugi maksimum u području NMM – MT. Prvi maksimum kod vrste *A. anatina* je zabilježen u području kategorije između VMM i SMM, a drugi, viši i uži, u elucijskom području NMM – MT.



**Slika 18.** Kromatografski profili raspodjele cinka između citosolskih frakcija probavne žlijezde različitih molekulskih masa, razdvojenih SE-HPLC-om sa Superdex™ 200 10/300 GL kolonom, za *U. pictorum* (lijevo) i *A. anatina* (desno). Naznačene su citosolske koncentracije 3 uzorka dviju vrsta, „cit“ u ng/ml, te kategorije molekulskih masa: VVMM, VMM, SMM, NMM i VNMM.

### 3.5.2.7. Srebro

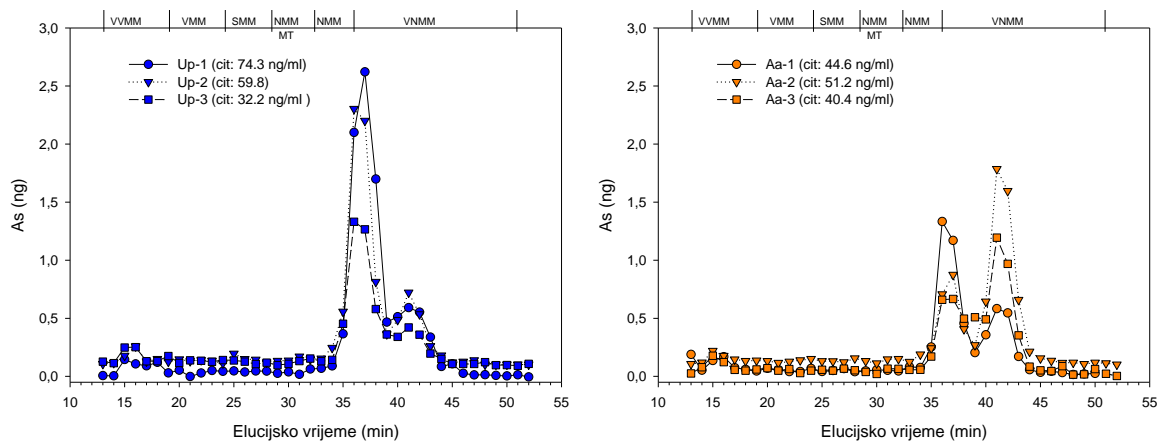
Na Slici 19. zabilježeni prvi maksimum srebra za *U. pictorum* je u području između VVMM i VMM, a drugi maksimum je u području kategorije NMM – MT. Prvi maksimum kod *A. anatina* je također u području između VVMM i VMM i malo je niži nego kod *U. pictorum*, a drugi maksimum je u području kategorije NMM – MT.



**Slika 19.** Kromatografski profili raspodjele srebra između citosolskih frakcija probavne žlijezde različitih molekularnih masa, razdvojenih SE-HPLC-om sa Superdex™ 200 10/300 GL kolonom, za *U. pictorum* (lijevo) i *A. anatina* (desno). Naznačene su citosolske koncentracije 3 uzorka dviju vrsta, „cit“ u ng/ml, te kategorije molekularnih masa: VVMM, VMM, SMM, NMM i VNMM.

### 3.5.2.8. Arsen

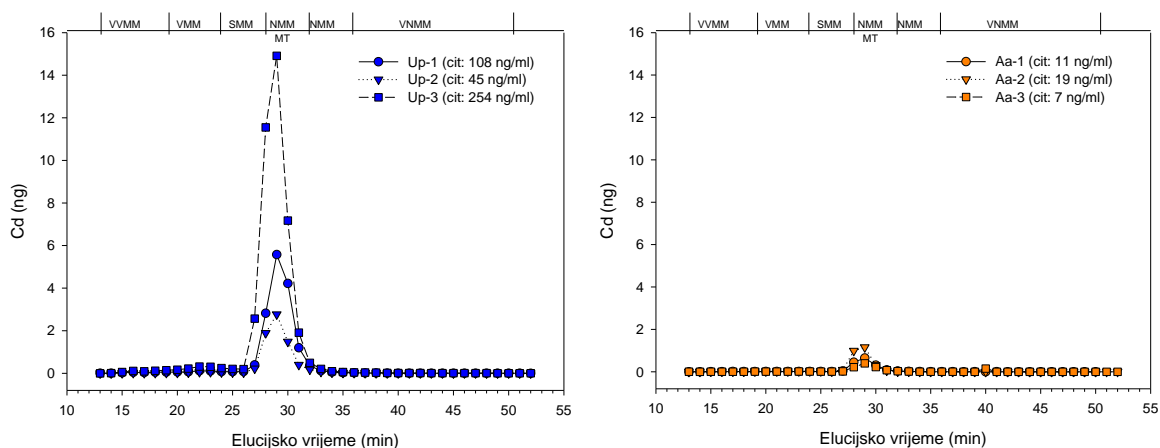
Na Slici 20. opažaju se naznake malog maksimuma arsena kod *U. pictorum* u području VVMM, a glavni maksimumi nalaze se u području VNMM. Prvi VNMM maksimum eluira u 37. minuti, što odgovara biomolekulama molekulske mase ~3 kDa. Elucijski maksimum manjeg VNMM pika je u 41. minuti i odgovara biomolekulama molekulske mase ~1 kDa. Isti mali maksimum je bio zabilježen za *A. anatina*. Glavni maksimumi su također u elucijskom području VNMM. Sva tri uzorka *U. pictorum* i uzorak Aa-1 od *A. anatina* pokazali su značajno veću eluciju u prvom VNMM piku.



**Slika 20.** Kromatografski profili raspodjele arsena između citosolskih frakcija probavne žlijezde različitih molekulskih masa, razdvojenih SE-HPLC-om sa Superdex™ 200 10/300 GL kolonom, za *U. pictorum* (lijevo) i *A. anatina* (desno). Naznačene su citosolske koncentracije 3 uzorka dviju vrsta, „cit“ u ng/ml, te kategorije molekulskih masa: VVMM, VMM, SMM, NMM i VNMM.

### 3.5.2.9. Kadmij

Maksimum kadmija za obje vrste je zabilježen u elucijskom području NMM – MT, prikazano na Slici 21. Jedino se razlikuju u tome što je maksimum puno veći kod *U. pictorum*, što je u skladu s većim citosolskim koncentracijama kadmija u ove vrste. Elucijsko vrijeme maksimuma kadmija (29 minuta) odgovara biomolekulama molekulske mase ~24 kDa.



**Slika 21.** Kromatografski profili raspodjele kadmija između citosolskih frakcija probavne žlijezde različitih molekulskih masa, razdvojenih SE-HPLC-om sa Superdex™ 200 10/300 GL kolonom, za *U. pictorum* (lijevo) i *A. anatina* (desno). Naznačene su citosolske koncentracije 3 uzorka dviju vrsta, „cit“ u ng/ml, te kategorije molekulskih masa: VVMM, VMM, SMM, NMM i VNMM.

## 4. Rasprava

Slatkovodni su školjkaši, kao organizmi koji se hrane filtriranjem, izloženi metalima otopljenim u vodi, taloženim u sedimentu i vezanim na suspendirane čestice. Unos metala iz vode u organizam odvija se procesima olakšane difuzije, aktivnog transporta i endocitoze, a metal je bioakumuliran kada njegov unos premaši eliminaciju (Naimo, 1995). Upravo zbog sklonosti nakupljanja metala, školjkaši se mogu upotrebljavati kao bioindikatorski organizmi za praćenje onečišćenja metalima u vodenim ekosustavima (Elder i Collins, 1991). Međutim, različite vrste školjkaša mogu se značajno razlikovati s obzirom na kapacitet bioakumulacije pojedinih elemenata (Elder i Collins, 1991).

Jedan od glavnih ciljeva ovog rada je bio usporediti akumulaciju odabranih elemenata u tragovima (esencijalni: Co, Mo, Se, Cu, Zn; neesencijalni: Ag, Cd, As) u probavnim žlijezdama dviju vrsta školjkaša, *U. pictorum* i *A. anatina* koje su obitavale u istom okolišu. Dobiveni rezultati ukazali su na značajne razlike između dviju vrsta u bioakumulaciji pojedinih elemenata, pri čemu su svi analizirani elementi, osim Ag, bili prisutni u višim koncentracijama kod vrste *U. pictorum*. Najveće razlike u koncentraciji elemenata zabilježene su za Cd, Fe i Co. S obzirom da su pokusni organizmi u ovom istraživanju nastanjivali jednako stanište, očekivala bi se jednaka razina bioakumulacije istih elemenata u tragovima u njihovim probavnim žlijezdama, međutim rezultati nam ukazuju na drugačiji ishod. Oblik, koncentracija i međusobno djelovanje metala, fiziološke karakteristike organizma kao što su duljina, masa, dob, reproduktivni stadij školjkaša te fizikalno kemijski parametri staništa poput temperature, pH i količine otopljenog kisika u vodi u kojoj se organizam nalazi utječu na unos elemenata u tragovima u organizam školjkaša. Svi ti čimbenici koji utječu na unos elemenata u organizam ne odražavaju se jednako za različite vrste i za različita tkiva školjkaša (Gavrilović i sur., 2004). Akumulacija je različita u ljušturama i mekom tkivu, te je u mekom tkivu kraće vrijeme kemijskih reakcija i zbog toga je kemijski sastav mekog tkiva pokazatelj trenutnog stanja okolišnih uvjeta dok je sastav ljušture pokazatelj prosječnih uvjeta od nastanka do uzorkovanja školjkaša (Beone i sur., 2011). U radu Hameed i sur. (1990) u istraživanju koncentracija metala iz raznih tkiva u školjkašu iz porodice Unionidae, u koju pripadaju i dvije pokusne vrste iz ovog rada, je navedeno da je značajna koncentracija metala bila prisutna u probavnoj žlijezdi koja igra aktivnu ulogu u unutarstaničnoj probavi i apsorpciji hrane.



Falfushynska i sur. (2014) su zabilježili koncentraciju Cd tijekom proljeća u probavnoj žlijezdi *A. anatina* od 1,10, 1,15 i 1,25  $\mu\text{g/g}$  tkiva na tri lokacije: referentnoj, lokaciji onečišćenoj okolnom poljoprivredom i lokaciji blizu nuklearne elektrane. Sve tri lokacije su sadržavale jedinke s koncentracijama Cd koje su bile više od koncentracija izmjerenih za *A. anatina* u ovom radu, gdje je koncentracija akumuliranog Cd iznosila 0,053  $\mu\text{g/g}$  tkiva. Koncentracija Cd je kod *U. pictorum* bila za 13 puta veća nego kod *A. anatina*, 0,695  $\mu\text{g/g}$  tkiva. Prema Gundackeru (2000) u usporedbi koncentracija između bioakumuliranog Cd u mekom tkivu *U. pictorum* i *A. anatina*, na dvije od tri analizirane lokacije, *U. pictorum* je imao više koncentracije bioakumuliranog Cd, što se poklapa s ovim radom. Zanimljivo je spomenuti da je navedeno da su *U. pictorum* i *A. anatina* različito bioakumulirali metale iako su nastanili jednaki tip supstrata što indicira da imaju drugačiji način unosa ili različite metaboličke puteve za određene metale. Koncentracije akumuliranih metala kod *A. anatina* su bile u pozitivnoj korelaciji s koncentracijama metala iz supstrata te se navodi kao potencijalni bioindikator metalnog zagađenja u tom sedimentu. Razlog tome može biti da je ta vrsta dobar pokazatelj onečišćenja na toj određenoj lokaciji ili da je vrsta preferirala takav sediment, odnosno postoji povezanost između bioakumulacije i načina hranjenja te vrste. Koncentracije metala kod *U. pictorum* su bile u negativnoj korelaciji s koncentracijama u okolišu što bi za koncentracije Cd moglo biti objašnjeno time što je vodeni stupac važniji za unos Cd kod školjkaša nego li supstrat.

Jedinkama pokusnih vrsta nije određena starost, stoga bi trebalo napomenuti da bi potencijalni razlog uvelike veće koncentracije akumuliranog Cd kod *U. pictorum* mogao biti veća starost tih jedinki od jedinki *A. anatina* (Naimo, 1995). Povećanje koncentracije metala sa starošću mekušaca može biti objašnjeno time što se tijekom godina metal akumulira u organizmu da bi služio za metaboličke potrebe, a kako organizam postaje stariji tako se višak metala nakuplja (Jones i Walker, 1979).

Najveća koncentracija bioakumuliranog elementa kod obje pokusne vrste je zabilježena za Fe. Kod *U. pictorum* iznosila je 225,025  $\mu\text{g/g}$  tkiva, a kod *A. anatina* je bila 59,908  $\mu\text{g/g}$  tkiva, odnosno skoro četiri puta manja koncentracija. Koncentracije Fe se smanjuju povećanjem mase školjkaša, dok je situacija obrnuta sa starenjem, odnosno starenjem se povećava koncentracija (Jones i Walker, 1979). Rzymiski i sur. (2014) su od mjerenih elemenata u tragovima u mekom tkivu školjkaša zabilježili najveću koncentraciju za Fe, *A. anatina* 78.3  $\mu\text{g/g}$  tkiva i *Unio tumidus* (L., 1758) 66.76  $\mu\text{g/g}$  tkiva. U spomenutom istraživanju, najmanja koncentracija zabilježena je za Cd te je bila jednaka za *A. anatina* i *U. tumidus* i iznosila je 0.04  $\mu\text{g/g}$  tkiva.

Sukladno s tim Khan i sur. (2018) su naveli da je izmjerena koncentracija određenih metala u tragovima u mekom tkivu *A. cygnea* najviša bila za Fe i najmanja za Cd, a s obzirom da su te lokacije bile pod utjecajem zagađenja, koncentracije za oba elementa su bile više nego li zabilježene u ovom radu.

Nadalje, za bioakumulaciju Co su zabilježene trostruko veće koncentracije kod *U. pictorum*. U većini radova za elemente u tragovima koncentracije Co nisu analizirane ili detektirane (Liu i sur., 2010). Fe je esencijalni element kod školjkaša te je njegova biokoncentracija kontrolirana biološkim potrebama i procesima u organizmu, dok se Co generalno može klasificirati toksičnim i njegove koncentracije ne ovise toliko o biološkim potrebama organizma koliko o njihovoj koncentraciji u okolišu (Rzymiski i sur., 2014).

Za bolje razumijevanje mehanizma akumulacije metala i predviđanja štetnog utjecaja na slatkovodne školjkaše važno je određivanje unutarstanične raspodjele elemenata (Bonneris i sur., 2005). Statistički značajno više koncentracije citosolskih proteina su utvrđene za *U. pictorum*, što bi značilo da *A. anatina* ima manju koncentraciju proteina, a samim time i citosolskih metala koji se vežu na proteine te je vjerojatno došlo do razrjeđenja tkiva, odnosno ova vrsta je imala veći udio vode u tkivu probavne žlijezde. Koncentracije elementa iz metabolički dostupnih citosolskih frakcija probavne žlijezde dviju pokusnih vrsta, osim u slučaju Cu i Mo, su slijedile trend razlika između vrsta opažen za ukupne koncentracije elemenata. Međutim, nakon normalizacije na masu citosolskih proteina, statistički značajne razlike između vrsta u sadržaju citosolskih elemenata utvrđene su samo za Mo, Ag i Cd.

Analizom raspodjele elemenata između topljive (citosolne) i netopljive frakcije tkiva probavih žlijezda pokusnih vrsta ustanovljena je statistički značajna razlika za sljedeće esencijalne elemente u tragovima: Se, Zn, Mo, Co, Fe, dok je za neesencijalne elemente zabilježena statistički značajna razlika samo za As. Elementi koji su većinom (>50 %) bili zastupljeni u citosolnoj frakciji, kod obje pokusne vrste su: Se, Zn, Cu, Mo, Cd i As. U netopljivoj frakciji su bili više zastupljeni Fe i Ag.

Svi analizirani elementi, osim As, su imali veći udio citosolske frakcije metala kod vrste *A. anatina*. Najveća razlika između dviju pokusnih vrsta u postotnoj zastupljenosti citosolskih elemenata je zabilježena za Co, Zn i Fe. Element Co kod *U. pictorum* je 25 % bio zastupljen u topljivoj citosolnoj frakciji, odnosno većinom se nalazio u netopljivoj frakciji, a kod *A. anatina* je postotak zastupljenosti Co u topljivoj frakciji bio 57 %. Zastupljenost Fe u citosolnoj frakciji

je za *U. pictorum* 5 %, a za *A. anatina* 12 %, odnosno, većina Fe je kod obje vrste bila prisutnija u netopljivoj frakciji.

Razlika između koncentracija elemenata u tragovima u različitim organima školjkaša prema Bonnerisu i sur. (2005) je vidljiva i prisutna na unutarstaničnoj razini, gdje je u tkivu škrge većina Cd i Cu prisutna u netopljivoj frakciji, dok su u tkivu probavne žlijezde većinom prisutni u topljivoj frakciji, Cd (51 %) i Cu (53 %), dok je Zn u probavnoj žlijezdi većinom zastupljen u netopljivoj frakciji (63 %). Prema rezultatima ovoga rada Cu i Cd su također zastupljeniji u topljivoj frakciji, međutim kod Zn zastupljenost u topljivoj frakciji je 75 % za *U. pictorum*, a 90 % za *A. anatina*, odnosno u obje pokusne vrste je Zn većinom prisutan u topljivoj frakciji.

Prema Cassini i sur. (1986) raspodjela Cd između topljive i netopljive frakcije je isto varirala u odnosu na analizirano tkivo. U probavnoj žlijezdi je za *Unio elongatulus* (Pfeiffer, 1825) Cd prisutniji u topljivoj što se poklapa s našim rezultatima, ali kod *A. cygnea* Cd je većinom prisutan u netopljivoj frakciji. S obzirom da su dvije srodne vrste s istog lokaliteta uzorkovane u isto vrijeme navodi se barem djelomična mogućnost individualnih različitih mehanizama interakcije metala. Autori također navode da distribucija Zn i Cu između frakcija nije bila u korelaciji s distribucijom Cd. U nekim radovima spominje se da postoji antagonistički odnos između koncentracija Cd i Zn s obzirom da imaju slična fizikalno-kemijska svojstva, Moolman i sur. (2007) navode da su interakcije Cd i Zn ograničene te da se Cd unosi aktivnim pumpama, a Zn pasivno kod mekušaca.

Osim određivanja unutarstanične raspodjele između topljive i netopljive frakcije tkiva probavne žlijezde, u ovome smo istraživanju definirali raspodjele odabranih esencijalnih i neesencijalnih elemenata među citosolskim biomolekulama različitih molekulskih masa, kako bi vidjeli koje su molekule uključene u vezanje pojedinih elemenata te jesu li raspodjele među citosolskim biomolekulama usporedive za dvije pokusne vrste, *U. pictorum* i *A. anatina*.

Analiza raspodjele kobalta među citosolskim biomolekulama ukazala je na uključenost istih biomolekula u vezanju Co u vrsta *U. pictorum* i *A. anatina*. Kobalt je u obje vrste eluirao u širokom rasponu molekulskih masa, od biomolekula jako velike molekulske mase, >400kDa, do biomolekula molekulske mase manje od 3 kDa, s tim da su najizraženiji maksimumi utvrđeni u elucijskom području molekula visoke (100-300 kDa) i srednje molekulske mase (30-100 kDa). Prema molekulskim masama maksimuma, elucija Co u ovim područjima mogla bi ukazivati na njegovo vezanje na protein albumin, za koji je poznato da ima ulogu u vezivanju metala, uključujući Co (Sadler i sur., 1994). Prema Krasnići i sur. (2013), maksimum u VNMM

elucijskom području, oko 1 kDa, odgovara cijanokobalminu (vitamin B12), spoju za koji je poznato da sadrži kobalt. Veća koncentracija Co u citosolima *U. pictorum* u odnosu na *A. anatina*, očitovala se u najvećoj mjeri u povećanoj eluciji Co u području biomolekula visoke molekulske mase.

Molibden služi kao kofaktor brojnim enzimima te se stoga ubraja u važne mikronutrijente (Ricketts i sur., 2015). Raspodjela Mo bila je slična u obje istraživane vrste školjkaša i uključivala je dva jasno oblikovana pika. Najveći dio Mo eluiran je u prvom piku u elucijskom području biomolekula visokih molekulskih masa (100-400 kDa), dok je drugi, znatno manji pik, eluiran u području biomolekula niskih molekulskih masa (3-30 kDa). Profili raspodjele Mo u probavnim žlijezdama *U. pictorum* i *A. anatina* iz ovog istraživanja uvelike se podudaraju s profilima za jetru europskih i vardarskih klenova (Krasnići i sur., 2013, 2018), kao i potočnih pastrva i babuška (Dragun i sur., 2018, 2020). Prvi, dominantni pik, molibdena prema Krasnići i sur. (2013), obuhvaća molekulske mase enzima u kojima je molibden kofaktor, kao što su Fe-Mo flavoproteinska ksantin oksidaza (275 kDa, Truglio i sur., 2002), aldehid oksidaza (130 kDa, Uchida i sur., 2003) te sulfid oksidaza (120 kDa, Johnson i Rajagopalan, 1976).

Raspodjela selena je kod obje vrste pratila isti trend, ali s obzirom da je vrsta *A. anatina* imala manje citosolske koncentracije tog metaloida, maksimumi kod te vrste su manji. Veći dio citosolskog Se eluiran je u području biomolekula vrlo niske molekulske mase, manje od 3 kDa, dok je ostali dio eluiran u području biomolekula velike molekulske mase, oko 140 kDa. Se ima ulogu u zaštiti prekomjernog nakupljanja metala i u antioksidativnim mehanizmima stanice (Znidarić i sur., 2006). Međutim uski je prag raspona koncentracije između fizioloških potreba i toksičnosti. Se je inkorporiran u građu selenoproteina u formi seleno-aminokiselina (selenocistein i selenometionin). Selenoproteini su bitni za funkcionalnost biokemijskih procesa koji su katalizirani glutation peroksidazom i tioredoksinreduktazom (Urien i sur., 2018). Glutacion peroksidaza štiti organizam od oksidacijskog oštećenja te ima molekulsku masu oko 88 kDa što se poklapa s biomolekulama u području VMM (Shulgin i sur., 2008). Selenocistein i selenometionin su spojevi sa selenom niske molekularne mase, što se poklapa s citosolskim Se koji je eluiran u području biomolekula molekulske mase manje od 3 kDa, a ti spojevi su potrebni kao elementi za izgradnju molekula velike molekularne mase koji sadrže selen (Chan i sur., 2010).

Kromatografski profil raspodjele bakra za *U. pictorum* prikazuje glavni maksimum u području molekula niskih molekulskih masa, oko 24 kDa. Manji maksimumi su prisutni bili i u području vrlo visokih molekulskih masa, oko 400-300 kDa i u području niskih molekulskih masa, oko

9-7 kDa. Cu ima važnu ulogu u strukturi proteina i funkcioniranju metabolizma, jer omogućuje pravilno djelovanje mnogih enzima (Osredkar i Sustar, 2011). U biomolekule prisutne u području niskih molekulskih masa pripadaju metalotioneini, te oni igraju središnju ulogu u vezanju i regulaciji Cu (Urien i sur., 2018). Metalotioneini spadaju u grupu unutarstaničnih proteina koji su bogati cisteinom, a jedna od njihovih glavnih funkcija je detoksifikacija i održavanje homeostaze iona metala u čemu im pomaže njihov veliki afinitet prema metalima (Ruttkay-Nedecky i sur., 2013). U radu Wang i sur. (2001) se također navodi većinsko vezanje Cu na proteine nižih molekulskih masa koje se poklapaju s metalotioneinima, te se spominje pik na području vrlo visoke molekulske mase. Profil raspodjele bakra za vrstu *A. anatina* je nepravilan. Najveći broj pikova je u području niske molekulske mase koja bi se poklapala s molekulskim masama metalotioneina, međutim postoji pik u području srednje molekulske mase oko 60 kDa. To bi mogao biti protein albumin koji je važan za vezanje i transport malih molekula i iona metala, a njegova molekulska masa je 66,5 kDa (Sadler i sur., 1994).

Raspodjela željeza je slična kod obje vrste, dominantni je pik u području vrlo velikih i velikih molekulskih masa kod *A. anatina* bio manji, dok je pik u području niskih molekulskih masa bio jednak kod obje vrste. Prema radu Wang i sur. (2001) također se navodi da je Fe imao pik u području oko 500 kDa te je imao drugi pik u području oko 13 kDa. Protein velike molekulske mase ~550 kDa, koji veže željezo je feritin, a njegova uloga je upravljanje metabolizmom i akumulacijom tog metala (Webb i sur., 1985). Većina Fe se upravo zato vezala za feritin, dok se puno manji ostatak Fe vezao za molekule niže molekulske mase te je moguće da je to transportni protein mioglobin čija je molekulska masa oko 16 kDa (Vandergon i sur., 1988).

Kromatografski profil raspodjele cinka za obje vrste prikazuje sličan prvi maksimum u području između velikih i srednjih molekulskih masa koji obuhvaća raspon oko 100-150 kDa. Drugi maksimum je kod vrste *A. anatina* izraženiji te se nalazi u elucijskom području metalotioneina, dok je za *U. pictorum* samo jedan uzorak pokazivao jasan pik u tom području. Zn je potreban za održavanje pravilne aktivnosti enzima u organizmu te se veže za mnoge proteine (Osredkar i Sustar, 2011). Eluiranje Zn s proteinima u području molekulske mase metalotioneina je izraženije kod *A. anatina* što bi moglo značiti da kod te vrste metalotioneini igraju važniju ulogu u održavanju homeostaze tog elementa nego li kod *U. pictorum* ili da *U. pictorum* bolje podnosi više koncentracije Zn s obzirom da je i kod te vrste bilo naznaka pika u području metalotioneina. Santovito i sur. (2015) navode važnu ulogu metalotioneina u preživljavanju školjkaša prilikom povišenih koncentracija metala te pozitivnu korelaciju između povišenja koncentracija Zn i Cu s povišenjem koncentracije metalotioneina. Biomolekula velike molekulske mase oko 150 kDa

koje bi vezale Zn bi mogla biti alkohol dehidrogenaza s obzirom da ona sadrži više mjesta gdje se veže Zn (Auld, 2009). Zn se također veže na transportni protein albumin kod obje vrste, eluirajući u području molekulske mase 66,5 kDa (Sadler i sur., 1994).

Srebro je raspodijeljeno u području velikih molekulskih masa i u području metalotioneina kod obje vrste. Eluiranje Ag u području metalotioneina može označavati uspješnu detoksifikaciju tog neesencijalnog elementa, kao što je slučaj u radu Caron i sur. (2017), kod kojih je Ag također eluirao u području metalotioneina i s biomolekulama visokih molekulskih masa. Ag se veže na metalotioneine zbog visokog afiniteta prema sulfhidrilnoj skupini (Rosabal i sur., 2016).

Arsen je metaloid poznat po toksičnosti u povećanim koncentracijama. Zbog toga su proteini koji vežu As toksikološki značajni jer interakcije s As mogu blokirati aktivnost enzima (Schmidt i sur., 2009). Kod obje vrste je As eluirao u području vrlo niskih molekulskih masa, s dva pika na području molekulske mase od 3 kDa i 1 kDa. Ti rezultati se poklapaju s radom Urien i sur. (2018), gdje je As eluirao samo s biomolekulama vrlo niske molekulske mase, otprilike 2 kDa, te je navedeno da su to vjerojatno peptidi koji se prirodno nalaze u citosolu. Potrebno je još istraživanja vezanja As u citosolskim biomolekulama slatkovodnih školjkaša. Većina trenutnih radova se temelji na školjkašima iz voda bogatih As te spominju njegovo vezanje na arsenošećere (Soeroes i sur., 2005).

Kadmij je neesencijalni metal s raznim toksičnim učincima, niskom razinom izlučivanja iz organizma i dugim biološkim poluvremenom. Uglavnom slijedi metaboličke puteve esencijalnih elemenata poput Cu i Zn, te se navodi da bi manjak Zn potencijalno mogao uzrokovati povećanu toksičnost Cd (Goering i sur., 1995). Kod obje vrste Cd je eluirao s biomolekulama u području niskih molekulskih masa, oko 29 minute. Kod *U. pictorum* je taj pik bio mnogo veći, razlog tome su veće koncentracije citosolskog Cd kod te vrste. Najvjerojatnije se Cd vezao na metalotioneine, što upućuje na potpunu detoksikaciju putem metalotioneina. S obzirom da elucijsko vrijeme maksimuma kadmija odgovara biomolekulama molekulske mase ~24 kDa, može se prepostaviti da se radi o dimernom obliku metalotioneina. Postojanje prirodnih dimera metalotioneina je već potvrđeno u više vrsta morskih školjkaša, uključujući mediteransku dagnju *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) (Ivanković i sur., 2002). Obrambena uloga metalotioneina protiv toksičnog utjecaja Cd je utvrđena u mnogim vodenim organizmima, uključujući školjkaše (Roesijadi, 1992). Takva detoksikacija je moguća zbog visokog afiniteta vezanja metala na metalotioneine, čime se odvaja Cd od kritičnih makromolekula. Metalotioneini također imaju ostale funkcije koje bi mogle pridonijeti zaštititi

od negativnog utjecaja Cd, neke od njih su održavanje homeostaze esencijalnih elemenata poput Zn, otklanjanje reaktivnih kisikovih radikala i regeneracija tkiva (Klaassen i sur., 2009).

## 5. Zaključak

Istraživanje je dalo osnovne informacije o razlikama u akumulaciji i unutarstaničnoj distribuciji odabranih esencijalnih (Co, Mo, Se, Cu, Zn) i neesencijalnih (Ag, Cd, As) elementa između dviju vrsta školjkaša koje pripadaju različitim rodovima porodice Unionidae (*U. pictorum* i *A. anatina*) te obitavaju u istom okolišu. Također je napravljena početna karakterizacija citosolskih biomolekula koje sudjeluju u vezanju metala u istraživanim vrstama.

1. Analiza sadržaja ukupnih metala u probavnoj žlijezdi dviju pokusnih vrsta ukazala je na značajne razlike između vrsta u bioakumulaciji pojedinih elemenata. Sve ukupne koncentracije esencijalnih elemenata te neesencijalnih Cd i As bile su značajno više kod vrste *U. pictorum*, dok su ukupne koncentracije Ag bile podjednake u obje vrste. Najizraženije razlike između vrsta zabilježene su za Cd, čije su koncentracije bile čak 13 puta više kod vrste *U. pictorum*.

2. Analiza sadržaja ukupnih proteina ukazala je također na značajno veći sadržaj proteina u citosolima probavnih žlijezda kod vrste *U. pictorum*.

3. Analiza raspodjele metala između topljive i netopljive frakcije tkiva probavne žlijezde ukazala je za sve analizirane elemente, osim za As, na veći udio citosolske frakcije metala kod vrste *A. anatina*.

4. Najveća razlika u postotnoj zastupljenosti citosolskih elemenata između dvije pokusne vrste je zabilježena za Co, Zn i Fe.

5. Analiza raspodjele metala među citosolskim biomolekulama pomoću SE-HPLC-a omogućila je definiranje približnih molekulskih masa proteina i drugih biomolekula uključenih u vezivanje pojedinih metala. Dobiveni kromatografski profili bili su usporedivi u obje pokusne vrste za sve analizirane elemente.

6. Rezultati ovog rada pridonijet će boljem razumijevanju procesa akumulacije, metabolizma i detoksikacije metala u proučavanim slatkovodnim vrstama školjkaša.



## 6. Literatura

Ali, H., Khan, E. (2018): Bioaccumulation of non-essential hazardous heavy metals and metalloids in freshwater fish. Risk to human health. *Environmental Chemistry Letters* 16(3): 903–917.

Ali, H., Khan, E. (2019): Trophic transfer, bioaccumulation, and biomagnification of non-essential hazardous heavy metals and metalloids in food chains/webs—Concepts and implications for wildlife and human health. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 25(6): 1353–1376.

Auld, D. S. (2009): The ins and outs of biological zinc sites. *BioMetals* 22(1): 141–148.

Barst, B. D., Rosabal, M., Campbell, P. G. C., Muir, D. G. C., Wang, X., Köck, G., Drevnick, P. E. (2016): Subcellular distribution of trace elements and liver histology of landlocked Arctic char (*Salvelinus alpinus*) sampled along a mercury contamination gradient. *Environmental Pollution* 212: 574–583.

Beone, G. M., Cattani, I., Fontanella, M. C., Ravera, O. (2011): Relationship between element concentrations and body size in the Lake Maggiore population of *Unio pictorum manicus* (Mollusca, Bivalvia). *Journal of limnology* 70: 283–288.

Bonneris, E., Giguère, A., Perceval, O., Buronfosse, T., Masson, S., Hare, L., Campbell, P. G. C. (2005): Sub-cellular partitioning of metals (Cd, Cu, Zn) in the gills of a freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*: role of calcium concretions in metal sequestration. *Aquatic Toxicology* 71(4): 319–334.

Caron, A., Rosabal, M., Drevet, O., Couture, P., Campbell, P. G. C. (2017): Binding of trace elements (Ag, Cd, Co, Cu, Ni, and Tl) to cytosolic biomolecules in livers of juvenile yellow perch (*Perca flavescens*) collected from lakes representing metal contamination gradients. *Environmental Toxicology and Chemistry* 37(2): 576–586.

Cassini, A., Tallandini, L., Favero, N., Albergoni, V. (1986): Cadmium bioaccumulation studies in the freshwater molluscs *Anodonta cygnea* and *Unio elongatulus*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Comparative* 84: 35–41.

Chan, Q., Afton, S. E., Caruso, J. A. (2010): Selenium speciation profiles in selenite-enriched soybean (*Glycine Max*) by HPLC-ICPMS and ESI-ITMS. *Metallomics* 2(2): 147–153.

- Coelho, J. P., Duarte, A. C., Pardal, M. A., Pereira, M. E. (2014): *Scrobicularia plana* (Mollusca, Bivalvia) as a biomonitor for mercury contamination in Portuguese estuaries. *Ecological indicators* 46: 447–453.
- Cukrov, N., Cmuk, P., Mlakar, M., Omanović, D. (2008): Spatial distribution of trace metals in the Krka River, Croatia: An example of the self-purification. *Chemosphere* 72(10): 1559–1566.
- Cukrov, N., Frančišković-Bilinski, S., Hlača, B., Barišić, D. (2011): A recent history of metal accumulation in the sediments of Rijeka harbor, Adriatic Sea, Croatia. *Marine Pollution Bulletin* 62(1): 154–167.
- Dias, A. R., Teixeira, A., Lopes-Lima, M., Varandas, S., Sousa, R. (2020): From the lab to the river: Determination of ecological hosts of *Anodonta anatina*. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 30: 1–3.
- Dragun, Z., Krasnići, N., Kolar, N., Filipović Marijić, V., Ivanković, D., Erk, M. (2018): Cytosolic distributions of highly toxic metals Cd and Tl and several essential elements in the liver of brown trout (*Salmo trutta* L.) analyzed by size exclusion chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Chemosphere* 207: 162–173.
- Dragun, Z., Fiket, Ž., Vuković, M., & Raspor, B. (2013): Multielement analysis in the fish hepatic cytosol as a screening tool in the monitoring of natural waters. *Environmental monitoring and assessment* 185(3): 2603–2614.
- Dragun, Z., Krasnići, N., Ivanković, D., Filipović Marijić, V., Mijošek, T., Redžović, Z., Erk, M. (2020): Comparison of intracellular trace element distributions in the liver and gills of the invasive freshwater fish species, Prussian carp (*Carassius gibelio* Bloch, 1782). *Science of The Total Environment* 730: 138923.
- Elder, J. F., Collins, J. J. (1991): Freshwater Molluscs as Indicators of Bioavailability and Toxicity of Metals in Surface-Water Systems. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 37–79.
- Falfushynska, H. I., Gnatyshyna, L. L., Gyori, J., Stolyar, O. B. (2014): Metallothioneins, Caspase-3 and oxidative stress responses in the multi-marker study of freshwater mussel inhabiting sites of various human impact. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 14: 591–603.

Gaillardet, J., Viers, J., & Dupré, B. (2003): Trace elements in river waters. *Treatise on Geochemistry* 5: 605.

Gavrilović, A., Srebočan, E., Petrincec, Z., Pompe-Gotal, J., Prevendar Crnić, A. (2004): Teški metali u kamenicama i dagnjama Malostonskog zaljeva. *Naše more* 51(1-2): 50–58.

Giguère, A., Campbell, P. G., Hare, L., Couture, P. (2006): Sub-cellular partitioning of cadmium, copper, nickel and zinc in indigenous yellow perch (*Perca flavescens*) sampled along a polymetallic gradient. *Aquatic Toxicology* 77(2): 178–189.

Goering, P. L., Waalkes, M. P., Klaassen, C. D. (1995): Toxicology of Cadmium. *Handbook of Experimental Pharmacology* 189–214.

Gómez-Ariza, J. L., García-Barrera, T., Lorenzo, F., Bernal, V., Villegas, M. J., Oliveira, V. (2004): Use of mass spectrometry techniques for the characterization of metal bound to proteins (metallomics) in biological systems. *Analytica Chimica Acta* 524(1-2): 15–22.

Gundacker, C. (2000): Comparison of heavy metal bioaccumulation in freshwater molluscs of urban river habitats in Vienna. *Environmental Pollution* 110(1): 61–71.

Gupta, S. K., Singh, J. (2011): Evaluation of mollusc as sensitive indicator of heavy metal pollution in aquatic system: a review. *IIOAB J* 2: 49–57.

Hameed, P. S., Raj, A. I. M. (1990): Freshwater Mussel *Lamellidens marginalis* (Lamarck) (Mollusca: Bivalvia: Unionidae) As an Indicator of River Pollution. *Chemistry and Ecology* 4(2): 57–64.

Hare, L. (1992): Aquatic Insects and Trace Metals: Bioavailability, Bioaccumulation, and Toxicity. *Critical Reviews in Toxicology* 22(5-6): 327–369.

Hršak, V. (2010): Stručna podloga za zaštitu poriječja rijeke Mrežnice. Državni zavod za zaštitu prirode. Preuzeto s

[http://www.naturaviva.hr/Karlovac\\_media/Mreznica\\_podloga\\_2010.pdf](http://www.naturaviva.hr/Karlovac_media/Mreznica_podloga_2010.pdf), 02.12.2020.

Ivanković, D., Pavičić, J., Kozar, S., Raspor, B. (2002): Multiple forms of metallothionein from the digestive gland of naturally occurring and cadmium-exposed mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Helgoland Marine Research* 56: 95–101.

Jebali, J., Chouba, L., Banni, M., Boussetta, H. (2014): Comparative study of the bioaccumulation and elimination of trace metals (Cd, Pb, Zn, Mn and Fe) in the digestive gland,

gills and muscle of bivalve *Pinna nobilis* during a field transplant experiment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 28(2): 212–217.

Johnson, J. L., Rajagopalan, K. V. (1976): Electron paramagnetic resonance of the tungsten derivative of rat liver sulfite oxidase. *Journal of Biological Chemistry* 251(18): 5505–5511.

Jones, W. G., Walker, K. F. (1979): Accumulation of Iron, Manganese, Zinc and Cadmium by the Australian Freshwater Mussel *Velesunio ambiguus* (Phillipi) and Its Potential as a Biological Monitor. *Marine and Freshwater Research*: 30(6): 741.

Khan, M., Khisroon, M., Khan, A., Gulfam, N., Siraj, M., Zaidi, F., Ahmadullah, Abidullah, Fatima, S., Noreen, S., Ullah, H., Shah, Z., Qadir, F. (2018): Bioaccumulation of Heavy Metals in Water, Sediments, and Tissues and Their Histopathological Effects on *Anodonta cygnea* (Linea, 1876) in Kabul River, Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *BioMed Research International* 1–10.

Khali, W., Ouali, K., Mouneyrac, C., Banaoui, A. (2012): Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use in biomonitoring. *Energy Procedia* 18: 784–794.

Klaassen, C. D., Liu, J., Choudhuri, S. (1999): Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 39(1): 267–294.

Klaassen, C. D., Liu, J., Diwan, B. A. (2009): Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 238(3): 215–220.

Krasnići, N., Dragun, Z., Erk, M., Ramani, S., Jordanova, M., Rebok, K., Kostov, V. (2018): Size-exclusion HPLC analysis of trace element distributions in hepatic and gill cytosol of Vardar chub (*Squalius vardarensis* Karaman) from mining impacted rivers in north-eastern Macedonia. *Science of the Total Environment* 613/614: 1055–1068.

Krasnići, N., Dragun, Z., Erk, M., Raspur, B. (2013): Distribution of selected essential (Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Se, Zn) and nonessential (Cd, Pb) trace elements among protein fractions from hepatic cytosol of European chub (*Squalius cephalus* L.). *Environmental Science and Pollution Research* 20(4): 2340–2351.

Langston, W. J., Bebianno, M. J., Burt, G. R. (1998): Metal handling strategies in molluscs. *Metal Metabolism in Aquatic Environments* 219–283.

- Li, Y.-F., Chen, C., Qu, Y., Gao, Y., Li, B., Zhao, Y., Chai, Z. (2008): Metallomics, elementomics, and analytical techniques. *Pure and Applied Chemistry* 80(12): 2577–2594.
- Liu, H., Yang, J., Gan, J. (2010): Trace Element Accumulation in Bivalve Mussels *Anodonta woodiana* from Taihu Lake, China. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 59(4): 593–601.
- Maradin, M. (2007): Mrežnica – važnost rijeke u kršu. Zagreb: Geografski odsjek Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Hrvatsko geografsko društvo. Dostupno na: <https://geografija.hr/528/> (02.12.2020.)
- Marigómez, I., Soto, M., Cajaraville, M. P., Angulo, E., Giamberini, L. (2002): Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Microscopy Research and Technique* 56(5): 358–392.
- Montes-Bayón, M., DeNicola, K., Caruso, J. A. (2003): Liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1000(1-2): 457–476.
- Moolman, L., Van Vuren, J. H. J., Wepener, V. (2007): Comparative studies on the uptake and effects of cadmium and zinc on the cellular energy allocation of two freshwater gastropods. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 68(3): 443–450.
- Mounicou, S., Szpunar, J., Lobinski, R. (2009): Metallomics: the concept and methodology. *Chemical Society Reviews* 38(4): 1119–1138.
- Naimo, T. J. (1995): A review of the effects of heavy metals on freshwater mussels. *Ecotoxicology* 4(6): 341–362.
- Osredkar, J., Sustar, N. (2011): Copper and zinc, biological role and significance of copper/zinc imbalance. *Journal of Clinical Toxicology* J S 3.2161: 0495.
- Rainbow, P. S. (2002): Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? *Environmental Pollution* 120(3): 497–507.
- Ricketts, C. D., Bates, W. R., Reid, S. D. (2015): The Effects of Acute Waterborne Exposure to Sublethal Concentrations of Molybdenum on the Stress Response in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. *PLOS ONE* 10(1)
- Roesijadi, G. (1992): Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquatic Toxicology* 22: 81–114.

- Rosabal, M., Mounicou, S., Hare, L., Campbell, P. G. C. (2016): Metal (Ag, Cd, Cu, Ni, Tl, and Zn) Binding to Cytosolic Biomolecules in Field-Collected Larvae of the Insect *Chaoborus*. *Environmental Science & Technology* 50(6): 3247–3255.
- Ruttkey-Nedecky, B., Nejd, L., Gumulec, J., Zitka, O., Masarik, M., Eckschlager, T., ... Kizek, R. (2013): The Role of Metallothionein in Oxidative Stress. *International Journal of Molecular Sciences* 14(3): 6044–6066.
- Rzymiski, P., Niedzielski, P., Klimaszuk, P., Poniedziałek, B. (2014): Bioaccumulation of selected metals in bivalves (Unionidae) and *Phragmites australis* inhabiting a municipal water reservoir. *Environmental Monitoring and Assessment* 186(5): 3199–3212.
- Sadler, P. J., Tucker, A., & Viles, J. H. (1994): Involvement of a lysine residue in the N-terminal Ni<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> binding site of serum albumins: Comparison with Co<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> and Al<sup>3+</sup>. *European Journal of Biochemistry* 220(1): 193–200.
- Santovito, G., Boldrin, F., Irato, P. (2015) Metal and metallothionein distribution in different tissues of the Mediterranean clam *Venerupis philippinarum* during copper treatment and detoxification. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 174-175: 46–53.
- Schmidt, A., Fahlbusch, B., Otto, M. (2009): Size exclusion chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry for analysis and quantitative characterization of arsenic interactions with peptides and proteins. *Journal of Mass Spectrometry* 44(6): 898–910.
- Shulgin, K. K., Popova, T. N., Rakhmanova, T. I. (2008): Isolation and purification of glutathione peroxidase. *Applied Biochemistry and Microbiology* 44(3): 247–250.
- Soeroes, C., Goessler, W., Francesconi, K. A., Schmeisser, E., Raml, R., Kienzl, N., ... Kuehnelt, D. (2005): Thio arsenosugars in freshwater mussels from the Danube in Hungary. *Journal of Environmental Monitoring* 7(7): 688.
- Strižak, Ž., Ivanković, D., Pröfrock, D., Helmholz, H., Cindrić, A. M., Erk, M., Prange, A. (2014): Characterization of the cytosolic distribution of priority pollutant metals and metalloids in the digestive gland cytosol of marine mussels: seasonal and spatial variability. *Science of the Total Environment* 470: 159–170.
- Sun, H., Chai, Z.-F. (2010): Metallomics: An integrated science for metals in biology and medicine. *Annual Reports Section “A” (Inorganic Chemistry)* 106: 20.

- Szpunar, J. (2005): Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics. *Analyst* 130(4): 442–465.
- Truglio, J. J., Theis, K., Leimkühler, S., Rappa, R., Rajagopalan, K., ... Kisker, C. (2002): Crystal Structures of the Active and Alloxanthine-Inhibited Forms of Xanthine Dehydrogenase from *Rhodobacter capsulatus*. *Structure* 10(1): 115–125.
- Uchida, H., Kondo, D., Yamashita, A., Nagaosa, Y., Sakurai, T., Fujii, Y., ... Uwajima, T. (2003): Purification and characterization of an aldehyde oxidase from *Pseudomonas* sp. *Microbiology Letters* 229(1): 31–36.
- Urien, N., Jacob, S., Couture, P., Campbell, P. (2018): Cytosolic Distribution of Metals (Cd, Cu) and Metalloids (As, Se) in Livers and Gonads of Field-Collected Fish Exposed to an Environmental Contamination Gradient: An SEC-ICP-MS Analysis. *Environments* 5(9): 102.
- Vandergon, T. L., Noblet, G. P., Colacino, J. M. (1988): Identification and origin of hemoglobin in a gymnophallid metacercaria (Trematoda: Digenea), a symbiote in the marine polychaete *Amphitrite ornata* (Annelida: Terebellidae). *The Biological Bulletin* 174(2): 172–180.
- Viarengo, A., Nott, J. A. (1993): Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 104(3): 355–372.
- Vogiatzis, C. G., Zachariadis, G. A. (2014): Tandem mass spectrometry in metallomics and the involving role of ICP-MS detection: A review. *Analytica Chimica Acta* 819: 1–14.
- Wallace, W. G., Lee, B. G., Luoma, S. N. (2003): Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fractions (MSF) and biologically detoxified metal (BDM). *Marine Ecology Progress Series* 249: 183–197.
- Wang, G., Fowler, B. A. (2008): Roles of biomarkers in evaluating interactions among mixtures of lead, cadmium and arsenic. *Toxicology and Applied Pharmacology* 233(1): 92–99.
- Wang, J., Dreesen, D., Wiederin, D. R., Houk, R. S. (2001) Measurement of Trace Elements in Proteins Extracted from Liver by Size Exclusion Chromatography-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry with a Magnetic Sector Mass Spectrometer. *Analytical Biochemistry* 288(1): 89–96.

Wu, X., Cobbina, S. J., Mao, G., Xu, H., Zhang, Z., Yang, L. (2016): A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. *Environmental Science and Pollution Research* 23(9): 8244–8259.

Yılmaz, A. B., Yanar, A., Alkan, E. N. (2017): Review of heavy metal accumulation on aquatic environment in Northern East Mediterranean Sea part I: some essential metals. *Reviews on Environmental Health* 32(1-2): 119–163.

Znidaric, M. T., Falnoga, I., Skreblin, M., Turk, V. (2006): Induction of Metallothionein-like Proteins by Mercury and Distribution of Mercury and Selenium in the Cells of Hepatopancreas and Gill Tissues in Mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Biological Trace Element Research* 111(1-3): 121–136.

Zoroddu, M. A., Aaseth, J., Crisponi, G., Medici, S., Peana, M., & Nurchi, V. M. (2019): The essential metals for humans: a brief overview. *Journal of Inorganic Biochemistry* 195: 120–129.

Zuykov, M., Pelletier, E., & Harper, D. A. T. (2013): Bivalve mollusks in metal pollution studies: From bioaccumulation to biomonitoring. *Chemosphere* 93(2): 201–208.

Internetski izvori:

URL 1: Chromatography online

(<https://www.chromatographyonline.com/view/tips-tricks-gpc-sec-what-are-differences-between-gpc-sec-and-gfc-and-how-do-you-get-started-technique>, 15.04.2020)

URL 2: Dinarsko gorje

(<https://www.dinarskogorje.com/sliv-rijeke-kupe-kolpe.html#>, 02.12.2020.)

URL 3: Natura 2000, Državni zavod za zaštitu prirode

(<http://natura2000.dzvp.hr/reportpublish/reportproxy.aspx?paramSITECODE=HR2000593>, 02.12.2020.)

URL 4: ARKOD preglednik

(<http://preglednik.arkod.hr/ARKOD-Web/>; 16.12.2020.)

URL 5: Animal Base



(<http://www.animalbase.uni-goettingen.de/zooweb/servlet/AnimalBase/home/species?id=2118>, 03.12.2020.)

URL 6: Animal Base

(<http://www.animalbase.uni-goettingen.de/zooweb/servlet/AnimalBase/home/species?id=1560>, 03.12.2020.)

## 7. Životopis

Rođena sam 26. rujna 1996. u Zagrebu. Pohađala sam Osnovnu školu Rudeš, zatim sam obrazovanje nastavila u prirodoslovno matematičkoj gimnaziji, V. gimnaziji Zagreb. S obzirom na moj afinitet prema prirodi za daljnje obrazovanje odabrala sam preddiplomski sveučilišni studij Znanosti o okolišu na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, gdje sam stekla zvanje prvostupnika Znanosti o okolišu. Tijekom studija stekla sam, između ostalog, i praktično znanje u Herbarium Croaticum i na laboratorijskoj stručnoj praksi na Botaničkom zavodu PMF-a.