

METALI I STANIČNI BIOMARKERI (0098130)

Voditeljica: dr. sc. Biserka Raspor

Tel: ++385 1 4680 216, fax: ++385 1 4680 262, e-mail: raspor@irb.hr

Cilj:

- Provesti interdisciplinarna izučavanja staničnih biomarkera u prirodno rasprostranjenim reprezentativnim morskim organizmima (školjkašima i ribama) izloženim smjesi metala.
- Provesti interdisciplinarna izučavanja staničnih biomarkera u kavezno izloženim morskim organizmima.
- Ustanoviti bazalnu razinu biomarkera i njihovu ovisnost o prirodnim abiotičkim čimbenicima (salinitetu, temperaturi, godišnjem dobu) te biotičkim čimbenicima (reprodukcijom ciklusu, raspoloživosti hrane, starosti organizma).
- Odabrati uvjete u kojima je doprinos prirodnih čimbenika (abiotičkih i biotičkih) ukupnoj koncentraciji biomarkera najmanji, te ustanoviti doprinos antropogenih čimbenika tj. zagađenja.

Glavna postignuća:

U skladu s bibliografskim prikazom (bib.irb.hr), tijekom izvedbe projekta 0098130 objavljena su 2 poglavlja u međunarodno recenziranim knjigama, 10 znanstvenih radova koje citira CC, a 1 rad prihvaćen za objavljivanje u CC časopisu, 6 radova u ostalim relevantnim časopisima, izrađene su i obranjene 1 doktorska disertacija i 2 magistarska rada, dok je 1 doktorska disertacija u postupku pripreme za obranu. Također je izrađen i 1 diplomski rad. Brojna su sudjelovanja na pretežno međunarodnim konferencijama, simpozijima ili radionicama.

Primijenjeni su provjereni biokemijski i analitički postupci izolacije i određivanja biomarkera te metala koji pobuđuju sintezu specifičnog biomarkera tj. metalotioneina (MT). Sa svrhom određivanja metala u frakciji u kojoj se određuju i MT, objavljen je analitički postupak za pouzdano određivanje malenih količina Cd uz minimalnu obradu uzorka. Toplinska obrada citosolne frakcije radi odvajanja MT od ostalih citosolnih proteina provodi se nakon deseterostrukog razrijeđenja S50 frakcije s otopinom NaCl. Primjenom AAS tehnike sa grafitnom kivetom, NaCl prekriva signal Cd. Soga je potrebno upotrijebiti EDTA da se atomizacija provede kod niže temperature i spriječi gubitak Cd prilikom određivanja. Razrađena je i validirana metoda atomizacije Cd na 900°C, u otopini pH≈7.0, koja sadrži EDTA. Pouzdana i ponovljiva određivanja Cd postignuta su kako sa standardnim otopinama koje sadrže 0.9% NaCl, tako i u toplinski obrađenim uzorcima citosola iz tkiva riba, koji sadrže znatnu količinu MT.

Sudjelovanjem u međunarodnim laboratorijskim poredbenim ispitivanjima uspostavljen je sustav vanjske kontrole za ocjenu prihvatljivosti rezultata određivanja metala. Ispunjen je temeljni zahtjev da je za procjenu bazalne razine biomarkera, varijancija primijenjene metode manja od varijancije mjerljivog učinka pobuđenog djelovanjem prirodnih i antropogenih čimbenika.

Prirodna razina MT uspoređena je sa citosolnom koncentracijom metala koji pobuđuju sintezu tog proteina, a to su Zn, Cu i Cd. Višegodišnja izučavanja sezonske i prostorne varijabilnost MT u citosolnoj frakciji probavne žlijezde prirodno rasprostranjenih dagnji (*Mytilus galloprovincialis*) na 12 postaja srednjedalmatinskog obalnog područja pokazuju da su promjene koncentracija MT i metala veće u različitim godišnjim dobama nego što su za

različita mjesta obitavanja dagnji. U zimsko/ranoproljetnom razdoblju određene su više vrijednosti nego u ljetno/jesenskom razdoblju. Obrnuto proporcionalna ovisnost temperature vode i kondicijskog indeksa dagnji prema koncentraciji MT i metala ukazuje na njihovu povezanost sa dostupnosti hrane i s reprodukcijom ciklusom dagnji. Znatno više koncentracije MT i toksičnog metala Cd određene su u dagnjima koje obitavaju u estuariju rijeke Krke. Pozitivna korelacija između MT i Cd u svim godišnjim dobama, osim jeseni, opravdavaju odabir MT u probavnoj žlijezdi dagnje za praćenje izloženosti kadmiju, uz potrebu odabira određenog godišnjeg doba za sustavno praćenje tog staničnog biomarkera.

Izučavanja s dagnjama (*Mytilus galloprovincialis*), koje su godinu dana bile kavezno izložene na 4 postaje u Kaštelanskom zaljevu, nadopunila su opažanja o promjeni koncentracije MT i metala u probavnoj žlijezdi prirodno rasprostranjene skupine dagnji, ovisi o abiotičkim i biotičkim čimbenicima. Stoga smo za razlikovanje bazalne od pobuđene razine MT uzeli u obzir dodatne pokazatelje: masu ljuštore (kao mjeru starosti dagnji), masu probavne žlijezde (kao mjeru reprodukcijom ciklusa) i koncentraciju citosolnih metala koji pobuđuju sintezu MT (Zn, Cu i Cd). Ustanovili smo, da se u razdoblju od prosinca do travnja povećava masa probavne žlijezde dagnje i postiže maksimum, nakon čega se od lipnja do kolovoza masa smanjuje na vrijednost izmjerenu u prosincu. Promjena mase probavne žlijezde dagnje uzrokuje "biološko razrijeđenje" MT i metala u tkivu i prividno smanjuje koncentraciju navedenih pokazatelja u citosolu. U razdoblju od veljače do lipnja povećava se raspoloživost hrane (fitoplanktona) što u probavnoj žlijezdi dagnji uzrokuje akumulaciju hranjivih tvari (glikogena, lipida, proteina) potrebnih za gametogenezu. Povećana raspoloživost hrane pridonosi većem unosu metala. U usporedbi s ostalim tkivima, probavna žlijezda, kao organ namijenjen pohranjivanju hranjivih tvari, ima najveću koncentraciju ukupnih citosolnih proteina, a time i specifičnog proteina MT.

Laboratorijska izučavanja provedena tijekom 21 dana, izlaganjem dagnji (*Mytilus edulis*) različitim koncentracijama radioaktivnog kadmija (Cd^{109}), pokazala su kakva je raspodjela tog toksičnog metala u tkivu školjkaša i kadmijem pobuđena sinteza MT. Najveća koncentracija akumuliranog Cd, a time i MT, izmjerena je u tkivu probavne žlijezde dagnje. Više od 60% Cd nalazilo se u citosolnoj (S50) frakciji, u kojoj je prisutan i MT.

Jednogodišnja istraživanja provedena sa skupinom kavezno izloženih dagnji, *Mytilus galloprovincialis*, na 4 postaje u Kaštelanskom zaljevu, omogućila su usporedbu različitih tkiva (probavna žlijezda, škrge i jestivi dio dagnje) te odabir najprikladnijeg za vremensko i prostorno praćenje koncentracije MT, kao pokazatelja izloženosti dagnji metalima. Koncentracije MT, Cd, Cu, Zn, Fe i Mn uspoređene su sa biometrijskim pokazateljima, radi procjene doprinosa biotičkih čimbenika (reproduktivnog ciklusa i starosti dagnji) ukupnoj koncentraciji staničnih biomarkera. Za razliku od probavne žlijezde, količina analiziranih metala (Zn, Cu, Cd, Fe, Mn) u toplinski obrađenom citosolu škrge, u kojem se određuju i MT, povećava se sa starosti školjaka, što odražava masa škrge. Pozitivna korelacija ukazuje na akumulaciju metala te posljedično povećanje razine MT sa starosti dagnji. Statističkim razlučivanjem glavnih komponenti (principal component analysis) ustanovljeno je da se 74% ukupne varijancije dobivenih rezultata može objasniti njihovim povezivanjem u dvije komponente. U prvoj komponenti visoko su korelirani indeksi MT, Cd i Zn, izraženi kao omjer količine MT ili metala na masu ljuštore. U drugoj komponenti visoko su korelirani Cu, Mn, Fe i indeks škrge (omjer mase škrge i mase ljuštore). Grupiranje pokazatelja u komponente ukazuje na različite kemijske oblike metala u okolišnoj vodi, tj. na pretežito otopljeni oblik (Cd i Zn) odnosno pretežito partikularni oblik (Cu, Fe i Mn). Visoka korelacija MT sa Zn i Cd u skladu je s njihovom sposobnosti da pobude sintezu ovog specifičnog

proteina. Stoga škrge preporučujemo za sustavno praćenje izloženosti dagnji metalima putem MT kao staničnog biomarkera.

U citosolu cijelog jestivog dijela kavezno izloženih dagnji (*Mytilus galloprovincialis*) u Kaštelanskom zaljevu ustanovljena je povezanost razine MT i metala sa biometrijskim pokazateljima (masa ljušture, masa ukupnog jestivog dijela školjkaša, kondicijski indeks). Čak se 65% varijabilnosti razine MT može objasniti promjenama mase ljušture i ukupnog jestivog dijela dagnje. Pozitivna korelacija citosolnih koncentracija metala (Cd, Fe, Zn) sa masom ljušture ukazuje na akumulaciju tih metala sa starosti jedinki.

Petotjedno kavezno izlaganje dagnji (*Mytilus edulis*) u Sjevernom moru u okviru BECPELAG projekta omogućava usporedbu s prethodno provedenim dugotrajnim kaveznim izlaganjem dagnji (*Mytilus galloprovincialis*) u Kaštelanskom zaljevu. Ustanovljena je velika varijabilnost u parametrima kao što su koncentracija MT, masa ukupnog jestivog dijela školjkaša, ukupni citosolni proteini, citosolne koncentracije metala unutar kavezno izložene skupine dagnji na određenoj postaji. Bazalne koncentracije MT povezuju su s raspoloživim koncentracijama Zn i Cu. Sa ciljem raspoznavanja ranog učinka metala, umjesto određivanja staničnih biomarkera u citosolu cijelog jestivog dijela dagnje preporučujemo njihovo određivanje u specifičnom tkivu kao što su škrge,

Detaljno izučavanje MT i citosolnih metala u tkivima divlje i kavezno izložene skupine dagnji dopunjeno je opsežnim istraživanjima na ribama, kao organizmima na višoj razvojnoj i trofičkoj razini. Naročito su iscrpna izučavanja provedena o raspodjeli MT u raznim organima trlje blatarice i trlje kamenjarke (*Mullus sp.*) bentičkih riba jadranskog područja, koje imaju važnost i za ljudsku prehranu. Za tu prirodno rasprostranjenu skupinu riba, karakterističnu za mediteransko područje, definirali smo bazalne razine MT i citosolnih metala. U ukupnom učinku metala na staničnoj razini razlučen je doprinos biotičkih čimbenika, koji utječu na koncentraciju MT. Stoga smo pratili utjecaj biometrije (duljine i starosti riba) u starosnoj skupini riba od 1 s onima od 8 godina, na razinu MT, te njihovu korelaciju s biološki neophodnim (Zn, Cu, Fe, Mn) i toksičnim (Cd) metalima. Koncentracija MT u organima trlje opada u nizu: bubreg>probavilo>jetra>mozak. Maseni udjel MT u jetri najviše ovisi o masenoj koncentraciji Zn, koji pobuđuje sintezu MT. Usporediv je postotni udjel MT i Zn u citosolu jetre, bubrega i probavila trlje blatarice. U citosolu jetre i bubrega trlja izrazita je akumulacija Cd sa starosti jedinki, koji predstavljaju primarne organe za akumulaciju i detoksikaciju Cd. Uspoređujući jedinke od 1 do 8 godina starosti, u citosolu jetre Cd se poveća 43 puta, a u citosolu bubrega 5 puta. U svim organima najviše su vrijednosti masenih koncentracija Zn i Fe, a u mozgu Cu. Masene koncentracije Cd, kao toksičnog metala, 500 do 800 puta su niže od biološki neophodnih metala. Rezultati naših istraživanja opravdavaju određivanje MT i metala koji pobuđuju njegovu sintezu u citosolu jetre trlja radi ocjene kroničnog učinka metala na bentičku vrstu riba kao što su *Mullus sp.* Negativna korelacija između citosolne koncentracije metala i kondicijskog indeksa riba dodatni je pokazatelj kronične izloženosti trlja metalima što uzrokuje metaboličke promjene. Povišene koncentracije Cu i MT u citosolu probavila trlja predstavljaju mjerljivi biokemijski odgovor u bentičkih riba, koje obitavaju u priobalnom morskom području iznad sedimenata zagađenih bakrom.

Primjena istraživanja:

Ciljana temeljna istraživanja o kombiniranim učincima zagađivala i mjerljivom biološkom odgovoru s pomoću staničnih biomarkera provodimo u nacionalnom projektu Jadran,

tematska skupina 1.5. "Razina i utjecaj onečišćenja na području većih naselja "vruće točke". U okviru MED POL-Phase III za potrebe Nacionalnog monitoring programa, koji je Vlada Republike Hrvatske 2000. godine potpisala sa United Nations Environment Programme iz Atene, dostavljamo godišnje podatke o razini MT u probavnoj žlijezdi dagnji sa 12 "vrućih točaka" srednjedalmatinskog obalnog područja, od Zadra do Omiša.

Od 2002. do 2004. godine sudjelovali smo s norveškim Institutom za vode iz Osla (NIVA) u hrvatsko-norveškom projektu CROWAT (No. 150463). Projekt pod naslovom "An integrated environmental monitoring system for Croatian freshwater, estuarine and coastal marine areas", odobrio je Norveški znanstveni savjet (RCN). Primijenjeno je kavezno izlaganje školjkaša i riba u onečišćenom i čistom morskom području, radi smanjenja učinka endemske otpornosti i promjenljivosti, koja je povezana s različitim starosti organizama, prethodnom izloženosti, različitim uvjetima prehrane i sl. Primijenjeno je istovremeno izučavanje više staničnih biomarkera u indikatorskim organizmima različitih trofičkih razina što pruža mogućnost dijagnosticiranja i predskazivanja rizika izloženosti školjkaša i riba metalima i organskim zagađivačima.

Od 2004. godine sudjelujemo u europskom istraživačkom projektu SARIB (INCO-CT-2004-509160) "Sava River Basin: Sustainable Use, Management and Protection of Resources (SARIB)". Svrha tog projekta je primjena novih metoda i tehnika radi ocjene kakvoće vodnih i bioloških bogatstava Republike Hrvatske, što je povezano i sa primjenom europske Okvirne direktive o vodama. Dodatni podaci o tom projektu dostupni su na adresi www.sarib.net. Dio istraživačkih rezultata sadržan je u doktorskoj disertaciji znanstvene novakinje mr.sc. Zrinke Dragun, koju je pod naslovom "Određivanje biološki raspoložive koncentracije metala u škragama klena (*Leuciscus cephalus* L.) i u vodi" prijavila iz područja prirodnih znanosti, polja biologija.

Dodatna postignuća:

Postdoktorsko usavršavanje znanstvene suradnice dr.sc. Erk, M., u Norwegian Institute for Water Research, Oslo, Norveška, 01.09.2002.-17. 06.2003.

Postdoktorsko usavršavanje znanstvene suradnice dr.sc. Erk, M., u Laboratoriju za toksikologiju okoliša i akvatičku ekologiju, Sveučilišta u Gentu, Gent, Belgija , 09.01.2006. – 03.11.2006.

Sudjelovanje znanstvenih novakinja (Vlatke Filipović Marijić i Zrinke Dragun) na 10 međunarodnih kongresa, simpozija ili radionica s usmenim izlaganjima ili posterskim prikazima rezultata vlastitih istraživanja u okviru obrazovanja za određeni akademski stupanj.

Tijekom međunarodnog kongresa EUROTOX2006 u Cavtatu, od 20. do 24. rujna 2006. godine, znanstvena novakinja mr.sc. Vlatka Filipović Marijić dobila je priznanje European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (ECETOC) za posterski prikaz vlastitih istraživanja «Metal exposure assessment in native fish, *Mullus barbatus* L., from the Eastern Adriatic Sea». Nagrada ECETOC-a (www.ecetoc.org) pokriva troškove njezinog sudjelovanja na sljedećem EUROTOX kongresu koji će se 2007. godine održati u Amsterdamu, Nizozemska. Osim toga, izvršni odbor EUROTOX-a ponudio je dobitnici nagrade namijenjene mladim istraživačima da u službenom časopisu EUROTOX-a, a to je Toxicology Letters, objavi međunarodno recenzirani znanstveni rad, vezan uz istraživanja za

koja je nagrađena. Rad će biti objavljen u posebnom broju u skupini odabranih, najistaknutijih znanstvenih radova.

Dodatna izobrazba putem seminara:

- znanstvene novakinje mr.sc. Dragun, Z. “Ustrojstvo laboratorija prema HRN EN ISO/IEC 17025” u Centru za transfer tehnologije (CTT), Zagreb, u organizaciji Državnog zavoda za normizaciju i mjeriteljstvo, 11-13.03.2003.
- dr. sc. Raspor B. “Osposobljavanje za provedbu programa međulaboratorijskih poredbenih ispitivanja (“Proficiency testing”) u Centru za transfer tehnologije (CTT), Zagreb, u organizaciji Nacionalne službe za ovlašćivanje, Projekt CARDS 2001, 08-09.03.2004.

Sudjelovanje na Otvorenim danima Instituta R. Bošković,

➤ 13-15.05.2004., Zagreb, Hrvatska,

Raspor, B., ZIMO_LBUM, PP prezentacija i Erk, M., ME otv_dani, PP prezentacija 13.05.2004. Kao vodiči sudjelovale: Dragun, Z., Filipović Marijić, V., Ivanković, D.

➤ 21-24.04.2005, Zagreb, Hrvatska

Pokazno mjesto (soba 204/III krilo) C3 “Metalotionein: mala molekula-veliki izazovi”, časopis Ruđer, Vol 6, ožujak/travanj 2005, str 15. Sudjelovale: Erk, M., Dragun, Z., Ivanković, D, Podrug, M., Raspor, B.