Mjerna obilježja aktivnosti acetilkolin-esteraze i katalaze kao biokemijskih biljega izloženosti babuške (Carassius gibelio) s posebnim osvrtom na inhibitorna svojstva bilijarnog ekstrakta

Klisurić, Mirela

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:299313

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

ODJEL ZA BIOLOGIJU

Diplomski sveučilišni studij: Zaštita prirode i okoliša

Mirela Klisurić

MJERNA OBILJEŽJA AKTIVNOSTI ACETILKOLIN – ESTERAZE I KATALAZE KAO BIOKEMIJSKIH BILJEGA IZLOŽENOSTI BABUŠKE (*Carassius gibelio* Bloch.) S POSEBNIM OSVRTOM NA INHIBITORNA SVOJSTVA BILIJARNOG EKSTRAKTA

Diplomski rad

Osijek, 2016.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku **Diplomski rad**

Odjel za biologiju

Diplomski sveučilišni studij: Zaštita prirode i okoliša

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Biologija

MJERNA OBILJEŽJA AKTIVNOSTI ACETILKOLIN - ESTERAZE I KATALAZE KAO BIOKEMIJSKIH BILJEGA IZLOŽENOSTI BABUŠKE (*Carassius gibelio* Bloch.) S POSEBNIM OSVRTOM NA INHIBITORNA SVOJSTVA BILIJARNOG EKSTRAKTA

Mirela Klisurić

Rad je izrađen: Odjel za biologiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Mentor: Dr. sc. Branimir K. Hackenberger**.** izv. prof

Biokemijski biljezi, odnosno biomarkeri, definiraju se kao mjerljivi pokazatelji biološkog stanja pojedinog organizma. Smanjena aktivnost acetilkolin-esteraze jasno ukazuje na izloženost organizma različitim skupinama pesticida. Povišena aktivnost katalaze prikazuje izloženost organizma oksidativnom stresu, odnosno nastajanju štetnog vodikovog peroksida u stanicama. Poznato je kako žuč, odnosno komponente žuči, značajno inhibiraju različite enzime kod živih organizama, te je ovim radom istražen isti učinak kod babuške. Babuška predstavlja vrstu vrlo otpornu na loše životne uvjete. Babuška polaže veći broj jaja te se uglavnom razmnožava ginogenetički, što znači da aktivaciju ikre mogu potaknuti spermiji drugih vrsta riba. Kako je genetička varijabilnost babuške u odnosu na druge vrste zbog navedenih svojstava bitno manja, za očekivati je da će i mjerna obilježja biokemijskih biljega biti mjerljivo drukčija, tj. da će njihova varijabilnost biti manja nego je to uobičajeno u drugih vrsta.

Ključne riječi: biološki biljezi, acetilkolin – esteraza, katalaza, babuška, žuč
Broj stranica: 43
Broj slika: 26
Broj tablica: 4
Broj literaturnih navoda: 32
Jezik izvornika: hrvatski

Datum obrane: 14. 12. 2016.

Stručno povjerenstvo za obranu:
1. doc. dr. sc. Davorka K. Hackenberger,
2. doc. dr. sc. Alma Mikuška
3. izv. prof. dr. sc. Branimir K. Hackenberger
4. doc. dr. sc. Sandra Ečimović

Rad je pohranjen u:
u knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i u Nacionalnoj sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, u elektroničkom obliku, te je objavljen na web stranici Odjela za biologiju.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek **MS thesis**
Department of Biology
Graduate university study programme in Nature and Environmental Protection

Scientific Area: Natural science
Scientific Field: Biology

Measurement properties of acetylcholinesterase and catalase, as biomarkers of exposure, in prussian carp (*Carassius gibelio* Bloch.), with special emphasis on inhibitory properties of bile extract

Mirela Klisurić

Thesis performed at: Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Supervisor: Branimir K. Hackenberger**,** PhD, Associate Professor

Biomarkers are defined as measurable indicators for biological state of certain organism. Low activity of acetylcholine esterase shows exposure of organisms to different group of pesticides. High activity of catalase indicates oxidative stress in certain organism, respectively producing harmful hydrogen peroxide in the cells. It is known that bile, especially some components of bile, inhibits various enzymes of living organisms. Prussian carp represents a species which is very resistant to poor environmental conditions. It is known that Prussian carp lays large number of eggs and mainly reproduce gynogenesis, meaning that parthenogenesis of spawn can be stimulated by sperm of different fish species. Genetic variability of Prussian carp is very different from other fish species due to previously mentioned properties, and it is very probably that theirs measurable properties of biomarkers and theirs variability would differ from other fish species.

Key words: biomarkers, acetylcholinesterase, catalase, Prussian carp, bile

Number of pages: 43
Number of figures: 26
Number of tables: 4
Number of references: 32
Original in: Croatian

Date of the thesis defence: 14. 12. 2016.

Reviewers:
1. doc. dr. sc. Davorka K. Hackenberger, assistant professor
2. doc. dr. sc. Alma Mikuška, assistant professor
3. izv. prof. dr. sc. Branimir K. Hackenberger, associate professor
4. doc. dr. sc. Sandra Ečimović, assistant profesor

Thesis deposited in:

Library of Department of Biology, J.J. Strossmayer University of Osijek and in National university library in Zagreb in elektronic form. It is also disposable on the web site of Departmetnt of Biology, J.J. Strossmayer University of Osijek.

Zahvaljujem se mentoru izv.prof.dr.sc. Branimiru K. Hackenbergeru na izuzetnoj pomoći i srdačnosti tijekom izrade ovog rada.

Veliko hvala svim kolegama s diplomskog studija, s kojima sam dijelila dobre i loše trenutke, te koji su svojim nesebičnim zalaganjem i pozitivnim stavom omogućili izuzetno ugodno provedene studentske dane.

Hvala svim članovima Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku zbog izuzetnog doprinosa mom obrazovanju.

Hvala mojoj obitelji i prijateljima na velikoj podršci, potpori i strpljenju tijekom cijelog studija.

Sadržaj:

1. UVOD **1**
1.1. Toksikologija vodenog okoliša i njen značaj **1**
1.2. Biokemijski biljezi izloženosti i njihov značaj **3**
1.2.1. Acetilkolin – esteraza (AChE) 4
1.2.2. Oksidativni stres 6
1.2.2.1. Katalaza (CAT) 7
1.3. Žuč **8**
1.4. Cilj istraživanja ..... Pogreška! Knjižna oznaka nije definirana.
2. MATERIJALI I METODE **10**
2.1. Eksperimentalni organizam **10**
2.1.1. Sistematika upotrebljavanog organizma 10
2.1.2. Biologija babuške 10
2.2. Ulov ribe na terenu **12**
2.3. Kavezno izlaganje riba na području riječnog otoka rijeke Dunav **14**
2.4. Žrtvovanje riba i izolacija jetre **17**
2.5. Priprava postmitohondrijske frakcije jetre **17**
2.6. Mjerenje aktivnosti enzima acetilkolin – esteraze (AChE) **17**
2.7. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT) **18**
2.8. Razrjeđenja žuči pri različitim koncentracijama te tretiranje uzorka **18**
2.9. Izračun kondicijskog faktora (K) te hepatosomatskog indeksa (HSI) **19**
2.10. Obrada podataka **19**
3. REZULTATI **20**
3.1. Podatci o dužini, ukupnoj masi te masi jetre jedinki **20**
3.2. Kondicijski faktor (K) **21**
3.3. Hepatosomatski indeks (HSI) **22**
3.3.1. Izmjerene vrijednosti 22
3.3.2. Simulacija 23
3.3.3. Metaanaliza 25
3.4. Aktivnost acetilkolin – esteraze u jetri babuške **27**
3.4.1. Simulacija 28
3.4.2. Metaanaliza 29
3.5. Aktivnost katalaze u jetri babuške **30**
3.5.1. Simulacija 31

3.5.2. Simulacija raspodjele aktivnosti katalaze u babuškama u okolišu 32
3.5.3. Metaanaliza 33
3.6. Korelacija aktivnosti acetilkolin – esteraze i katalaze u jetri babuške 34
3.7. Aktivnost enzima jetre babuške uz dodatak bilijarnog ekstrakta 35
4. RASPRAVA 36
5. ZAKLJUČAK 39
6. LITERATURA 40
7. PRILOG 43

1. UVOD

1.1. Toksikologija vodenog okoliša i njen značaj

Toksikologija vodenog okoliša, odnosno akvatička toksikologija, temelji se na proučavanju štetnosti kemikalija, kao izravnog antropogenog utjecaja, na vodene ekosustave i organizme i to na različitim razinama organizacije. Izravan negativni učinak antropogeniziranog okoliša može se prepoznati od sub-celularne razine pojedinačnih organizama do razine životnih zajednica i ekosustava. Naime, učinak u nerijetkim slučajevima može biti i pozitivan, no toksikologija vodenog okoliša češće se osvrće na negativan utjecaj te potrebno vrijeme procesa oporavka sustava ukoliko se negativan učinak smanji. Toksikologija vodenog okoliša prepoznaje negativan učinak u kratkotrajnom ili dugotrajnom obliku, što se definira mortalitetom, ili stopom preživljavanja. Nadalje, proučava pojavu sub - letalnih učinaka na razini jedinke poput promjena u ponašanju, rastu, razvoju, reprodukciji, unosu tvari i sposobnosti detoksikacije te strukturi tkiva. Također proučava pojavu učinka na molekularnoj razini poput inhibicije, ili indukcije enzima te cjelokupnih enzimskih sustava. Toksikologija vodenog okoliša, na višim razinama, proučava genotipske ili fenotipske promjene jedinki te u konačnici promjene u brojnosti jedinki i strukturi populacije. Učinci, na različitim razinama organizacije, mogu se kvantificirati različitim kriterijima poput izračuna stope mortaliteta ili stope preživljavanja jedinki, reproduktivne uspješnosti, dužine i mase tijela organizma, broja teratogenih abnormalnosti poput tumorskih struktura, indukcije ili inhibicije aktivnosti enzima, te brojnosti vrste unutar ekološke zajednice.

Toksikologija vodenog okoliša svoje početke pronalazi unutar mlade interdisciplinarne znanosti ekotoksikologije. Autor Connell (1999) opisuje ekotoksikologiju kao granu toksikologije usmjerenu na proučavanje toksičnih učinaka brojnih prirodnih ili umjetnih tvari na cjelokupnu biosferu, odnosno na prisutne organizme u terestričkom ili akvatičkom ekosustavu. Nadalje, toksikologija vodenog okoliša objedinjuje zakonitosti iz brojnih drugih prirodnih znanosti, posebice kemije i fizike. Naime, radi što boljeg razumijevanja toksičnog učinka određene tvari, potrebno je poznavati procese prema kojima se određena tvari može ponašati poput hidrolize, oksidacije, fotolize. Nužno je poznavati i fizikalne čimbenike tvari poput molekularne strukture tvari, topljivosti, hlapljivosti, sorpcije, te u konačnici biološke

procese poput biotransformacije u okolišu i organizmima. Poveznica između strukture i aktivnosti tvari predstavlja u cjelokupnom nizu još jedan vrlo važan čimbenik tzv. sudbine tvari u okolišu. Kroz razumijevanje veze između strukture i aktivnosti tvari, jasno se može uočiti te definirati moguć biološki utjecaj tvari, toksičnosti, bioakumulacije i biodegradacije, te u konačnici pravodobno reagirati.

Smještajući toksikologiju vodenog okoliša, te posebice općenito toksikologiju zasebno unutar povijesnog okvira, potrebno je proučiti događaje i okolnosti 20. stoljeća. Rodricks (1992) navodi kako sistematsko proučavanje tvari u *in vitro* uvjetima započinje dvadesetih godina prošlog stoljeća, uslijed sveopće zabrinutosti stanovništva zbog prisutnosti aditiva, lijekova te pesticida u hrani. No, revolucijski utjecaj te osvješćivanje stanovništva započinje tek nakon publiciranja knjige "Nijemo proljeće" autorice Rachel Carson 1962.godine, te posebice nakon završetka Drugog svjetskog rata. Pravi zamah u razvoju toksikologija vodenog okoliša postiže u 21.stoljeću, gdje se uspješno implementira na međunarodnoj razini, posebice unutar zaštite okoliša i prirode, također i u Republici Hrvatskoj.

1.2. Biokemijski biljezi izloženosti i njihov značaj

Biokemijski biljezi izloženosti, odnosno biomarkeri, predstavljaju mjerljiv biološki odgovor potaknut izloženošću organizma tvarima u okolišu. U pojedinim slučajevima biomarkeri mogu ukazivati na specifičan učinak tvari poput učinka na metabolički put ili različite fiziološke procese unutar izloženog organizma. Stoga, biomarkeri predstavljaju učinkovit alat kako u dijagnosticiranju tako i u predikciji učinka. Prisutni su brojni biomarkeri koje pronalazimo na različitim razina organizacije od sub-celularne do razine cjelokupnog organizma (Connell i sur., 1999). Učinak tvari na organizam najprije se pojavljuje kod biomarkera na molekularnoj razini, potom staničnoj razini, poput biokemijskih i fizioloških promjena, morfoloških i histoloških promjena te u konačnici na cjelokupnom organizmu. Stoga, monitoring molekularnih, biokemijskih i fizioloških parametara može ukazati na rano otkrivanje štetnog utjecaja određene tvari te rano otkrivanje posljedica prije nego li disturbanca i šteta zahvati više razine organizma (Lam i Gray, 2003). Iako biomarkeri s mogućnošću ranog upozoravanja posjeduju veliku osjetljivost na okolišne stresore, se smatraju da su od malog ekološkog značaja (Lam i Gray, 2003). Danas je poznat i opisan veliki broj biomarkera, no zbog lakše procjene ekološkog rizika te pravodobnog reagiranja najčešće se proučavaju povećanje razine normalno prisutnih enzima, te strukturalne promjene stres proteina.

U toksikološkim studijama akutne izloženosti oštećenje stanica određenog tkiva ili organa najčešće se opisuje kroz promjene u koncentraciji i aktivnosti pojedinih enzima (Casillas i sur., 1983). Općenito biokemijski i fiziološki gledano aktivnost enzima mijenja se promjenama temperature, pH vrijednosti, inhibitorima te vezanjem malih molekula ili iona. Za potrebe toksikoloških analiza od značaja su svi navedeni parametri, no nešto veći značaj ipak se usmjerava na potencijalne inhibitore enzima u okolišu. Enzimi koji se najčešće koriste poput biomarkera u slučaju prisutnosti inhibitora, jesu enzimi citokrom P450 monooksigenaze, glutation-S-transferaza, te acetilkolin-esteraza (Lam i Gray, 2003).

Nadalje, ukoliko u okolišu postoji prisutnost teških metala inducirati će se metabolizam proteina. Proteini koji pri tome nastaju jesu tzv. *"heat shock proteini"* (HSP) te metalotioneini (MT).

Mjerenje razine stres proteina poput HSP te MT pruža rani pokazatelj sub – letalnog učinka te rani odgovor na prisutnost teških metala u okolišu (Casillas i sur., 1983).

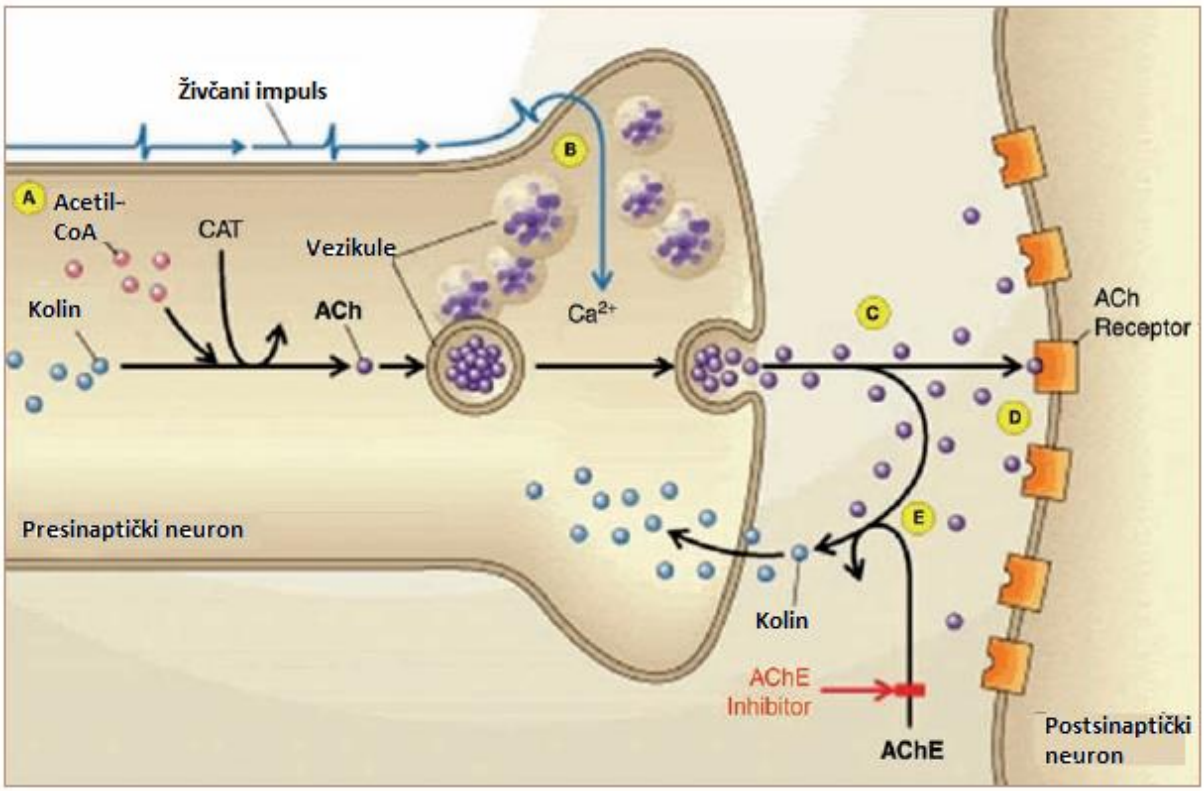
1.2.1. Acetilkolin – esteraza (AChE)

Enzim acetilkolin – esteraza pripada porodici enzima kolinesteraza (ChE) to su specijalizirane hidrolaze koje sudjeluju u razgradnji kolinskih estera. Osim acetilkolin – esteraze, iz ove porodice enzima, koja sudjeluje u hidrolizi neurotransmitera acetilkolina, nalaze se i nespecifične pseudokolinesteraze poput butirilkolin – esteraze (BChE) koja koristi butirilkolin kao supstrat. Acetilkolin – esteraza pretežno je locirana unutar neuromuskularnih spojeva, odnosno čvorišta i kolinergičnih sinapsa u središnjem živčanom sustavu. Na spomenutim sinapsama acetilkolin – esteraza hidrolizira acetilkolin na acetat i kolin nakon aktivacije pripadajućih receptora na postsinaptičkoj membrani. Primarna uloga acetilkolin – esteraze jest završetak sinaptičkog prijenosa impulsa, sprječavajući kontinuirano podražavanje receptora na živčanim završetcima. U skladu s tim, enzim jest izuzetno važan za normalno fiziološko funkcioniranje središnjeg i perifernog živčanog sustava. Acetilkolin – esteraza pronađena je i na membranama crvenih krvnih zrnaca, gdje čini tzv. Yt skupinu antigena te pomaže pri određivanju krvne grupe, no fiziološka funkcija na samim membranama crvenih krvnih zrnaca nije poznata (Daniels, 2007). Butirilkolin – esteraza pronađena je u krvnoj plazmi te također njezina fiziološka funkcija u krvi nije poznata (Costa i sur., 2005).

Molekulu enzima acetilkolin – esteraze čine dvije proteinske domene: veća, katalitička domena, od oko 500 rezidua, odnosno aminokiselina, te manji C – terminalni peptid s oko 50 rezidua. Enzim jest produkt samo jednog gena koji se ekspresira u različitim tkivima i u različitim oblicima. AChE pre – mRNA producira tri varijante enzima: primarnu, "sinaptičku" (AChE – S), AChE – R varijantu, topljivu, koja se producira pod utjecajem stresa, te eritorocitnu (AChE – E varijantu). Navedeni izoformi posjeduju sličnu katalitičku domenu, no razlikuju se u C – terminalnoj domeni (Meshorer i Soreq, 2006). Upravo navedena razlika u C – terminalnoj domeni utječe na njihov molekularni oblik, lokalizaciju te specifične osobine (Park i sur., 2005).

Aktivno mjesto acetilkolin – esteraze uključuje anionsko te estersko mjesto. Prilikom razgradnje supstrata acetilkolina, na anionskom mjestu, vezan je pozitivni, kvarternarni amin

acetilkolina, a na esterskom mjestu se odvija sama razgradnja do acetata i kolina. Hidroliza karboksil estera dovodi do formacije acil – enzima te slobodnog kolina. Potom u konačnici acil – enzim dolazi pod nukleofilni napad molekulama vode, pritom oslobađajući octenu kiselinu i regenerirani enzim (Taylor i Radić, 1994). Cjelokupni mehanizam prijenosa živčanog impulsa te uloga acetilkolin – esteraze prikazani su na slici 1.



Slika 1. Prijenos živčanog impulsa s presinaptičkog na postsinaptički neuron (izvor: web 1)

Danas najpoznatiji inhibitori acetilkolin – esteraze jesu organofosforni i karbamatni pesticidi. Prestankom korištenja organoklornih pesticida prilikom prošlog stoljeća prepoznaje se veća upotreba prethodno spomenutih pesticida. Mehanizam inhibicije acetilkolin – esteraze sastoji se u vezanju organofosfornih i karbamatnih pesticida na estersko mjesto enzima te reakcijama fosforilacije ili dekarbamilacije inaktiviraju enzim. Organofosforni pesticidi smatraju se ireverzibilnim inhibitorima acetilkolin – esteraze zbog vrlo sporog vremena oslobađanja enzima u odnosu na vrijeme potrebno za sintezu novog enzima. Dok nasuprot, karbamilacija enzima jest vrlo brz proces, te omogućava lakšu regeneraciju enzima nakon inhibicije (Lam i Gray, 2003). U posljednjih nekoliko godina u porastu je zanimanje prema

inhibiciji acetilkolin – esteraze teškim metalima, policikličkim aromatskim ugljikovodicima te detergentima.

1.2.2. Oksidativni stres

Kisik, u svom molekularnom obliku O_2, ključan je za brojne metaboličke procese u živim organizmima. No, nasuprot tome postoji i "paradoks aerobnog života" gdje živi organizmi ne mogu preživjeti bez prisustva kisika, ali isto tako riskiraju i oksidativni stres (Davies, 2000). Paradoks proizlazi iz činjenice kako se kisik u svom atomskom obliku ponaša kao slobodni radikal uzrokujući stres. Slobodni radikali predstavljaju atome, atomske grupe ili molekule koji imaju jedan ili više ne sparenih elektrona zbog čega su veoma nestabilni i reaktivni, te reagiraju sa susjednim biomolekulama u sredini u kojoj se nađu. Pri takvim reakcijama uglavnom nastaju novi slobodni radikali, čime se stvara začarani krug. Oksidativni stres predstavlja neravnotežu između slobodnih radikala i sustava antioksidativne zaštite organizma u korist slobodnih radikala, koji potencijalno vodi ka oštećenju. Oksidativni stres, dakle nastaje ukoliko brzina stvaranja slobodnih radikala kisika premaši brzinu oslobađanja iz tijela. U tom slučaju započinje niz nepoželjnih reakcija i mehanizama poput oksidacije proteina, DNK, steroida, peroksidacija lipida na staničnim membranama i druge. No, unatoč mogućnosti nastanka nepoželjnih slobodnih radikala i njihove reakcije sa staničnim strukturama, postoje efektivni mehanizmi obrane.

Antioskidativna zaštita kao fiziološki proces funkcionira neprestano u zdravom organizmu i cilj joj je sprječavanje štetnog djelovanja slobodnih radikala. Antioksidansi su definirani kao tvari koje u malim koncentracijama dovode do odlaganja ili inhibicije oksidacije supstrata (Davies, 2000). Sustav antioksidativne zaštite obuhvaća enzimske i neenzimske antioksidanse. Svi antioksidansi još se mogu podijeliti i na stanične, membranske i izvanstanične antioksidanse. Enzimatski antioksidansi spadaju u celularne antioksidanse te ovdje pripadaju superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation peroksidaza (GPX), glutation reduktaze (GR) i transferaze te drugi. U skupinu neenzimatskih antioksidansa pripadaju glutation, askorbinska kiselina, α-tokoferol, β-karoten, mokraćna kiselina, bilirubin i drugi.

1.2.2.1. Katalaza (CAT)

Katalaza metabolizira vodikov peroksid (H_2O_2) koji može nastati u reakcijama dismutacije $O_2^{\cdot-}$ ili u reakcijama koje kataliziraju enzimi oksidaze uključujući i ksantin oksidazu. Enzim je prisutan u svim živim organizmima koji su izloženi kisiku, počevši od mikroorganizama (aerobnih i anaerobnih), biljaka, životinja sve do čovjeka. Katalaza direktno razgrađuje H_2O_2 do vode i molekularnog kisika. Reakcija prema kojoj katalaza uklanja štetan vodikov peroksid jest:

$$\mathbf{2\ H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2}$$

Enzim pokazuje vrlo visok stupanj učinkovitosti pretvorbe supstrata, te se procjenjuje kako jedna molekula katalaze može razgraditi milijun molekula supstrata u jednoj sekundi (Goodsell, 2007). Katalaza jest hem protein koji se nalazi u peroksisomima, posebice zastupljena u većim količinama u jetri, no u stanicama kao što su eritrociti koji ne sadrže ove organele, katalaza je citoplazmatski enzim. Prema građi katalaza je tetramer, izgrađen od četiri polipeptidna lanca te svaki sadrži više od 500 aminokiselina. Sadrži četiri porfirinska hema, grupe koje omogućavaju enzimu reagiranje s vodikovim peroksidom. Enzim je vrlo osjetljiv na promjenu temperature te pH vrijednosti. Optimalne pH vrijednosti za djelovanje katalaze kreću se između 4 i 11, ovisno o vrsti organizma (Goodsell, 2007). Osim vodikovog peroksida kao supstrata, katalaza također može kao supstrat koristiti i brojne druge toksine i metabolite poput formaldehida, fenola, alkohola i to prema sljedećoj reakciji, no točan mehanizam još uvijek nije razjašnjen:

$$\mathbf{H_2O_2 + H_2R \rightarrow 2H_2O_2 + R}$$

Aktivnost katalaze određuje se prema koncentraciji supstrata preostalog u otopini, odnosno aktivnost katalaze jest obrnuto proporcionalna količini supstrata.

1.3. Žuč

Žuč je tekućina koju proizvodi jetra, a sastoji se od soli žučnih kiselina, elektrolita, bilirubina (produkt razgradnje hemoglobina), kolesterola, i drugih lipida. Može sadržavati metabolite i razgradne produkte ksenobiotika poput lijekova i otrova. Uloga žuči u organizmu jest emulgacija masti i vitamina topivih u uljima u probavnom sustavu, čime omogućava bolju apsorpciju masnih tvari iz tankog crijeva. Jednom proizvedena u jetri, žuč se pohranjuje u žučnjaku ili žučnom mjehuru. Tijekom probave žučni mjehur biva stimuliran na kontrakciju, te na taj način istiskuje žuč u žučovod koji tako dospijeva do dvanaesnika. Žuč djeluje u određenoj mjeri kao surfaktant, pomažući emulgaciju masti iz hrane.

Kod toplokrvnih životinja postoji značajna razlika u pH vrijednosti žuči pohranjene u žučnom mjehuru te jetrene žuči. Žuč pohranjena u jetri više je alkalna nego li žuč pohranjena u žučnom mjehuru (Okada, 1915). No, nasuprot pH vrijednosti žuči kod toplokrvnih životinja, žuč ribljih vrsta niske je pH vrijednosti (Babkin i Bowie, 1928). Stupanj kiselosti žuči varira od vrste do vrste. Vrlo važan sastojak žuči kako kod toplokrvnih životinja, tako i kod riba jesu žučne soli. Žučne soli topljive u vodi, amfipatski produkt metabolizma kolesterola, pospješuju intestinalnu apsorpciju lipida, utječu na proteolitičku razgradnju proteina u ishrani, te čine potentnu antimikrobnu zaštitu u tankom crijevu (Hofmann i Hagey, 2008). Većina kiselina žučnih soli može se klasificirati u tri specifične skupine: C_{27} žučne alkohole, C_{27} žučne kiseline te C_{24} žučne kiseline. Žučne soli riba iz reda šaranki (Cypriniformes), pokazuju neobičnu strukturu žučni soli nazvanih 5α C_{27} žučni alkoholi (Goto i sur., 2003). Spomenute žučne soli svrstavaju se u "primitivne" žučne soli koje se pronalaze kod primitivnijih vrsta poput onih iz reda sleđevki (Clupeiformes) (Lavoué i sur. 2008). Poznato je kako žučne kiseline inhibiraju probavne enzime. Naime, istraživanje autora Radymska-Wawrzyniak (1987) provedeno kod zečeva i svinja ukazuje na učinak žučnih kiselina na aktivnosti enzima koji sudjeluju u metabolizamu neurohormona. Istraživanje se temeljilo na proučavanju aktivnosti monoaminooksidaze (MAO) te acetikolin – esteraze (AChE) u tankom crijevu organizama. Inhibiciju MAO i AChE prouzročile su sekundarne žučne kiseline litokolna i deoksikolna kiselina (Radymska-Wawrzyniak, 1987).

1.4. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja jest utvrđivanje aktivnosti enzima acetilkolin – esteraze i katalaze, kao biokemijskih biljega izloženosti kod babuške, nakon vremena izlaganja od četrnaest dana, te inhibitorni učinak žuči na navedene enzime. Naime, babuška pokazuje smanjenju genetičku varijabilnost u odnosu na druge vrste riba, te se očekuje nešto drugačiji mjerljivi učinak. Također mjerenjem dužine i mase jedinki na terenu moguće je utvrditi njihov kondicijski faktor (K) te hepatosomatski indeks (HSI). Navedena mjerna obilježja enzima acetilkolin – esteraze i katalaze, kondicijski faktor te hepatosomatski indeks, proučavani u okviru ovog rada, mogu pružiti potencijalno značajne informacije vezane uz zaštitu prirode i okoliša.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Eksperimentalni organizam

2.1.1. Sistematika eksperimentalnog organizma

Sistematika babuške (*Carassius gibelio* Bloch.)

Koljeno: svitkovci (Chordata)
Potkoljeno: kralješnjaci (Vertebrata)
Nadrazred: ribe (Pisces)
Razred: koštunjače (Osteichtyes)
Podrazred: zrakoperke (Actinopterygii)
Nadred: prave koštunjače (Teleostei)
Red: šaranke (Cyprinoidei)
Porodica: bjelice (Cyprinidae)
Potporodica: šarani (Cyprinae)
Rod: karasi (*Carassius*)
Vrsta: zlatni karas (*Carassius auratus*)
Podvrsta: srebrni karas ili babuška (*Carassius gibelio* Bloch.)

2.1.2. Biologija babuške

Srebrni karas ili babuška (*Carassius gibelio* Bloch.) je slatkovodna invazivna riblja vrsta koja se proteklih pedesetak godina brzo proširila Europom (slika 2). Vrsta je unesena iz Azije u Europu tijekom 17. stoljeća. Najvažnija osobina, uz pomoć koje babuška ostvaruje svoju invazivnost jest njezina reprodukcija. Naime, vrsta se razmnožava ginogenetički, gdje je za stimulaciju razvoja ikre potrebna sperma babuške ili srodne vrste mužjaka.

U Europi su prisutne samo ženke, dok se mužjaci rijetko pojavljuju (Al-Sabti, 1984; Jevtić, 1978). Kottelat i Freyhov (2007) navode prisutnost različitih populacija, diploidne populacije s odvojenim spolovima, diploidi i tetrapoidi odvojenih spolova s triploidnim ženkama, te populacije koje se sastoje samo od triploidnih ženki. Babuška je izuzetno otporna na onečišćenja i manjak kisika u vodi (Plančić, 1967), a prisutna je i u slanoj vodi Baltičkog mora (Holopainen i sur., 1997). Na području Republike Hrvatske je zabilježen neprestani rast populacije babuške. Nedostatak vrste jest količina masti u odnosu na kilogram težine mesa. Naime, kod babuške ukupna količina masti iznosi 5,52 % dok je kod ljuskavog šarana 3 % (Hänfling i sur., 2005).



Slika 2. Babuška (*Carassius gibelio* Bloch.)

(izvor: web 2)

2.2. Ulov ribe na terenu

Babuške korištene u ovom radu potječu iz potoka smještenog uz naselje Opatovac, u Vukovarsko – srijemskoj županiji (slika 3). Potok se proteže od akumulacije izvan naselja te svojim ulijevanjem završava u rijeci Dunav (slika 4). Babuške su prikupljene uz pomoć ručne mreže s drškom u svibnju 2015. godine (slika 5 i 6). Ribe su bile stare od nekoliko mjeseci do godine dana, te su težile između 13 – 26 grama.



Slika 3. Ortofoto karta područja naselja Opatovac
(izvor: web 3)



Slika 4. Potok uz naselje Opatovac

(foto: M. Klisurić)



Slika 5. Način prikupljanja ribe mrežom

(foto: M. Klisurić)



Slika 6. Način prikupljanja ribe mrežom
(foto: M. Klisurić)

2.3. Kavezno izlaganje riba na području riječnog otoka rijeke Dunav

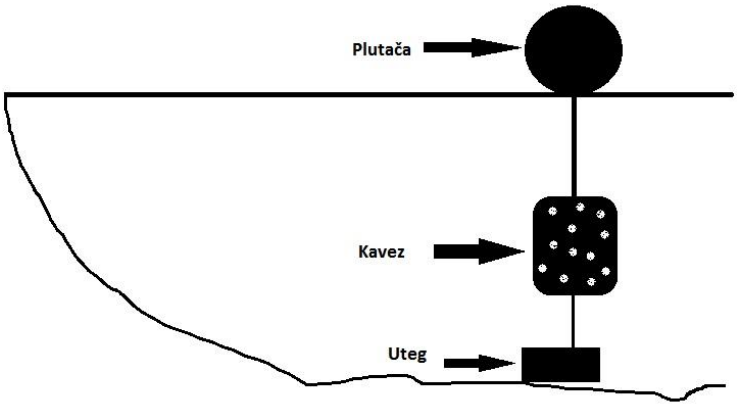
Nakon prikupljanja jedinki, ribe su premještene u ručno izrađene kaveze (slika 7). Kavezi su izrađeni od priručnog materijala poput plastičnih kanti s probušenim otvorima za dotok vode te poklopcem. Na kaveze su se potom vezali utezi na donjoj strani zbog omogućenog plutanja u stupcu vode (slika 8). Način izlaganja prikazan je na slici 9. Kavezi su preneseni na područje riječnog otoka unutar kojeg se nalazila privremeno stajaće vodeno tijelo (slika 10). Naime, spomenuta privremena vodena površina nastala je dotokom vode iz rijeke uslijed visokog vodostaja rijeke Dunav u mjesecu svibnju. Unutar kaveza postavljeno je 14 jedinki. Izlaganje riba je provedeno u svibnju 2015. godine u trajanju od četrnaest dana. Osnovna prednost kaveznog izlaganja, kao jedne od metoda biomonitoringa, su realni okolišni uvjeti kojima su organizmi izloženi tijekom istraživanja.



Slika 7. "Kavez" za potrebe izlaganja riba
(foto: M. Klisurić)



Slika 8. Kavezno izlaganje na lokalitetu
(foto: M. Klisurić)



Slika 9. Skica kaveznog izlaganja riba u okolišu



Slika 10. Privremena vodena površina na riječnom otoku rijeke Dunav (foto: M. Klisurić)

2.4. Žrtvovanje riba i izolacija jetre

Nakon izlaganja ribe su eutanizirane sekcijom dorzalno u okcipitalnom dijelu. Sekcija je započela rezom škarica u blizini područja škržnog otvora. Nakon eutanazije, načinio se pažljivi rez na području trbušne šupljine kako bi se utroba ostavila intaktna. Izmjerene i zabilježene su proporcije tijela jedinki poput dužine i mase. Potom je pincetom obavljeno pažljivo odstranjivanje dijelova trbušne šupljine, posebice jetre te žuči na hladnu podlogu. Jetra su izvagana na analitičkoj vagi te se zasebno odvojila, kao i žuč, u posebne omotnice od aluminijske folije te pohranjene u tekućem dušiku do daljnje upotrebe.

2.5. Priprava postmitohondrijske frakcije jetre

Za izradu homogenata jetra je najprije izvađena iz tekućeg dušika te pohranjena na +4°C. Nakon postignuća temperature od +4°C jetra je kratkotrajno isprana hladnim fosfatnim puferom (0.1 M, pH 7.4) nakon čega je prenesena u homogenizator uz dodatak jednako hladnog fosfatnog pufera u omjeru 1:5 (W:V). Homogenat se potom centrifugirao na 9000g, pri temperaturi od +4 °C trajanju od 30 minuta. Supernatant, postmitohondrijska, odnosno S9 frakcija zatim se odlila u Eppendorf epruvetice s poklopcem i pohranjena na -80 °C i tako bila čuvana do upotrebe.

2.6. Mjerenje aktivnosti enzima acetilkolin – esteraze (AChE)

Aktivnost enzima acetilkolin – esteraze mjerena je spektrofotometrijski metodom po Ellmanu (1961) u homogenatima jetre pokusnih životinja pri 412 nm. Princip metode je sljedeći: aktivnost enzima se određuje mjerenjem nastanka tiokolina kao nusprodukta hidrolize acetiltiokolina (ATCh). Tiokolin odmah po nastanku reagira sa Ellmanovim reagensom, odnosno sa 5,5´ditiobisnitrobenzoatom (DTNB), pri čemu nastaje žuto obojenje, odnosno 5-tio-2- nitrobenzoični kiseli anion (TNB). TNB ima apsorpcijski maksimum pri 412 nm. Reakcija se odvija pri neutralnom ili alkalnom pH.

acetilitokolin → acetat + tiokolin

tiokolin + 5,5´ditiobisnitrobenzoat → anion 5-tio-2- nitrobenzojeve kiseline (žute boje)

Volumen reakcijske smjese iznosio je 1.5 mL od čega je bilo 1.4 mL fosfatnog pufera (PBS), 25µL DNTB, 40µL S9 frakcije (postmitohondrijska frakcija) te 35µL acetiltiokolin jodida. Aktivnost acetilkolin – esteraze mjerena je tijekom 30 sekundi te se aktivnost izrazila u količini prerađenog supstrata u jedinici vremena.

2.7. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT)

Za mjerenje aktivnosti katalaze korištena je metoda po Claiborne (1985). Enzim katalaza katalizira razgradnju dviju molekula H_2O_2 na dvije molekule H_2O. Razgradnja vodikovog peroksida prati se na 240 nm, a mjera aktivnosti enzima jest razlika u apsorbanci po jedinici vremena. pH optimum aktivnosti enzima je od pH 6.8 – 7.5.

$$\text{(katalitička aktivnost)}\ 2H_2O_2 \xrightarrow{\text{katalaza}} O_2 + 2H_2O$$

Reakcijska smjesa sadržavala je 260µL fosfatnog pufera, 7µL S9 frakcije, te 234µL vodikovog peroksida.

2.8. Razrjeđenja žuči pri različitim koncentracijama te tretiranje uzorka

Za potrebe tretiranja uzorka S9, postmitohondrijske frakcije jetre, potrebno je učiniti razrjeđenja žuči pri različitim koncentracijama. Razrjeđenja su učinjena u četiri navrata, odnosno serije. Prva serija razrjeđenja kretala se od koncentracija 10^{-1} do 10^{-6}. Za razrjeđenja od 10^{-1} reakcijska smjesa činila je 40µL žuči te 360 µL pufera (PBS). Sljedeća razrjeđenja, 10^{-2} činila su se tako da se unutar reakcijske smjene nalazilo 40µL prethodnog razrjeđenja, dakle razrjeđenja 10^{-1} te 360 µL pufera. Isti postupci razrjeđivanja su se koristili za sva sljedeća razrjeđenja. Nakon izrade razrjeđenja potrebno je bilo utvrditi koji od prikupljenih uzoraka ima najveću apsorbancu, te istog uzorka dalje koristiti u tretiranjima žuči. Tretiranje žuči odvijalo se dodatkom 20 µL načinjenog razrjeđenja žuči unutar smjese s uzorkom te potom mjerenja reakcije inhibicije acetilkolin-esteraze spektrometrijski pri 412 nm, tijekom 30 sekundi. Nakon prve serije tretiranja uzorka načinila se i druga serija tretiranja. Unutar druge serije razrjeđivanja su se kretala od 10^{-7} do 10^{-12}. Slijed postupaka izrade razrjeđenja te mjerenja je bio isti. Treća serija razrjeđivanja sadržavala je 40 µL žuči te 80 µL pufera (razrjeđenje A1), odnosno daljnja razrjeđivanja su sadržavala 20 µL prethodno razrijeđenog uzorka (A1, odnosno A2 te A3) te 180 µL pufera. Četvrta serija razrjeđivanja kretala se od 10^{-}

^{13} do 10^{-25}. Slijed postupka je bio isti, odnosno reakcijska smjesa razrjeđenja 10^{-13} sadržavala je 40 µL razrjeđenja 10^{-12} te 360 µL pufera. Daljnja razrjeđenja te mjerenja su se činila prema istom postupku.

2.9. Izračun kondicijskog faktora (K) te hepatosomatskog indeksa (HSI)

Za izračun kondicijskog faktora te hepatosomatskog indeksa potrebni su podatci o masi jedinke, duljini jedinke te masi izolirane jetre iz jedinke.

Kondicijski faktor temelji se na izračunu prema autoru Fultonu (1902), odnosno postoje brojne varijacije izračuna. U ovom radu korištena je sljedeća jednadžba izračuna:

$$K = 100 \times (\text{masa [g]} / \text{dužina [cm}^3\text{]})$$

Hepatosomatski indeks izračunat je prema jednadžbi:

$$HSI = \text{masa jetre [g]} \times 100 / \text{ukupna tjelesna masa [g]}$$

2.10. Obrada podataka

Za obradu podataka korišten je standardni skup statističkih paketa u okviru "R" programskog okruženja (R version 3.3.0 / 03.05.2016) (R Core Team, 2016). Statistički testovi koji su korišteni za obradu podataka su: Shapiro-Wilk i Anderson-Darling test za testiranje normalnosti, te t-test za testiranje razlike dviju aritmetičkih sredina.

3. REZULTATI

3.1. Podatci o dužini, ukupnoj masi te masi jetre jedinki

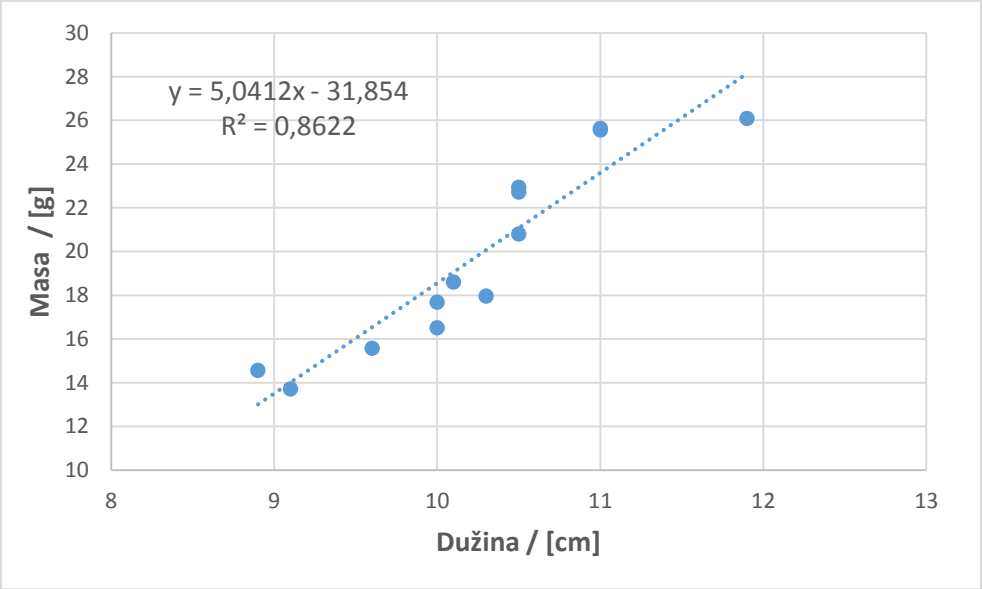
Nakon izlaganja u vremenu od četrnaest dana, jedinke su prikupljene s lokaliteta izlaganja te im je izmjerena dužina, ukupna masa te masa izolirane jetre, što je prikazano u tablici 1. Izmjerene vrijednosti su se kasnije koristile u izračunima kondicijskog faktora te hepatosomatskog indeksa, odnosno prilikom izrade reakcijskih smjesa za potrebe mjerenja aktivnosti acetilkolin – esteraze i katalaze.

Tablica 1. Izmjereni podatci o dužini, ukupnoj masi te masi jetre jedinki

Oznaka	Dužina (cm)	Masa (g)	Masa jetre (g)
U1	10	17,68	0,1
U2	10,30	17,96	0,15
U3	9,6	15,57	0,35
U4	10,5	22,94	/
U5	10	16,52	0,14
U6	11	25,64	/
U7	11,9	26,09	0,17
U8	8,9	14,57	0,23
U9	10,5	20,81	0,23
U10	10,5	22,72	0,12
U11	10,1	18,61	0,14
U12	11	25,56	0,19
U13	9,1	13,72	0,24
U14	9,5	18,72	0,07

3.2. Kondicijski faktor (K)

Prema jednadžbi K= 100 * (masa/dužina^3), kondicijski faktor babuški s navedenog lokaliteta iznosi 1,758. Srednja vrijednost dužine jedinki iznosila je 10,2 cm, te srednja vrijednost mase jedinki iznosila je 18,665 g. Iz grafičkog prikaza na slici 11. moguće je utvrditi jasnu korelaciju između mase i dužine (r = 0,93). Kondicijski faktor, vrijednosti 1,758, ukazuje na povoljne uvjete okoliša unutar kojeg su jedinke bile izložene.

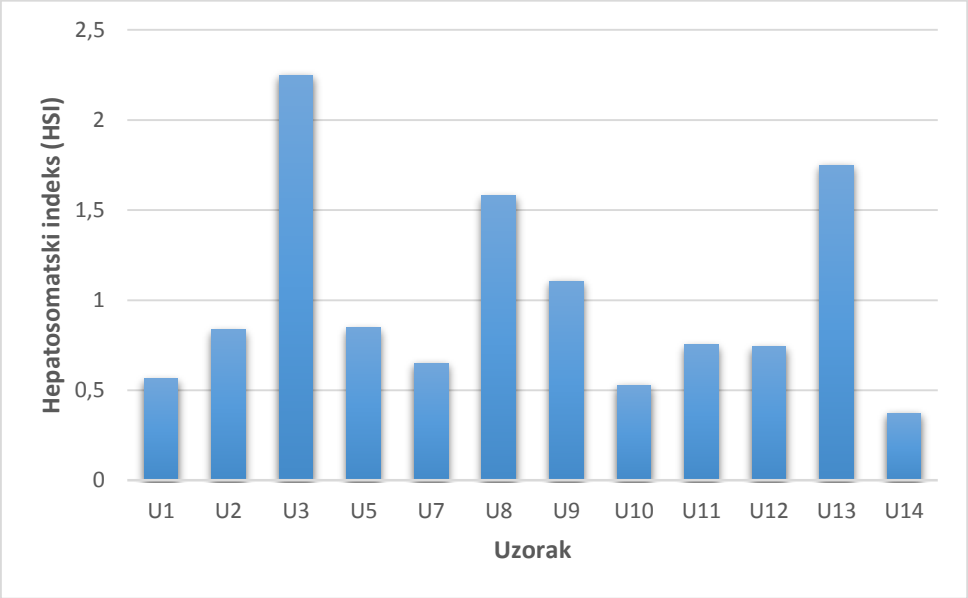


Slika 11. Korelacija mase i dužine jedinki

3.3. Hepatosomatski indeks (HSI)

3.3.1. Izmjerene vrijednosti

Hepatosomatski indeks babuški izračunat je prema jednadžbi HSI = masa jetre [g] x 100 / ukupna tjelesna masa [g]. Uzorci U3, U8 te U13 zabilježili su najveću vrijednost hepatosomatskog indeksa (slika 12). Naime, navedeni uzorci su imali i najveću masu izolirane jetre.



Slika 12. Hepatosomatski indeks kod babuške

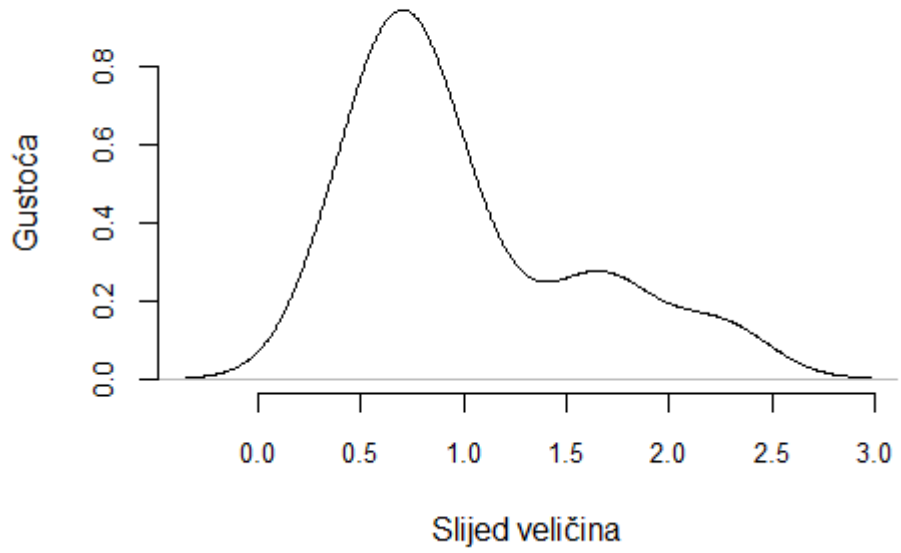
3.3.2. Simulacija

Gustoća izmjerenih vrijednosti

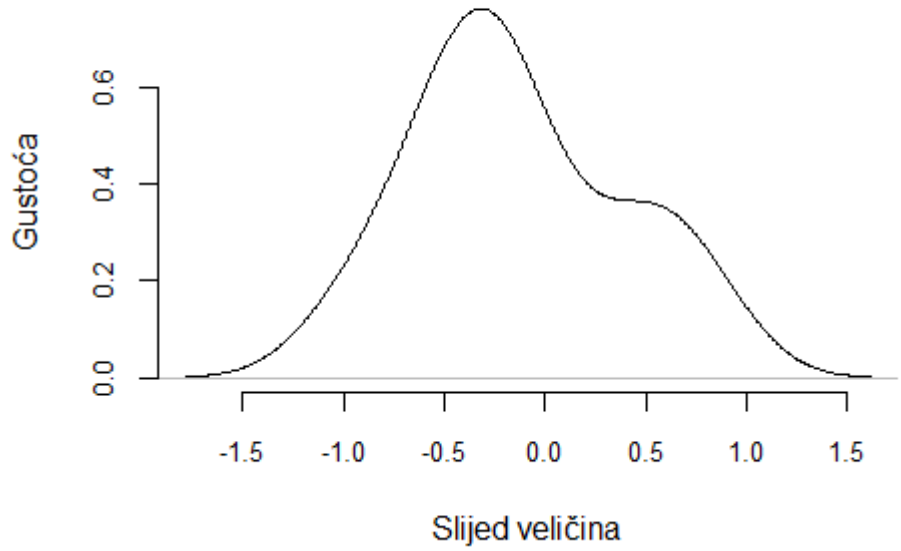
Temeljem izmjerenih vrijednosti načinila se procjena vjerojatnosnih gustoća te simulacija populacije podataka odgovarajuće razdiobe. Nakon testiranja normalnosti originalno izmjerenih vrijednosti testirala se normalnost logaritamski transformiranih vrijednosti pomoću Shapiro i Anderson-Darling testova za normalnost (tablica 2.)

Tablica 2. Statistike i pripadajuće vrijednosti vjerojatnosti prihvaćanja nulte hipoteze o normalnoj raspodjeli izmjerene veličine.

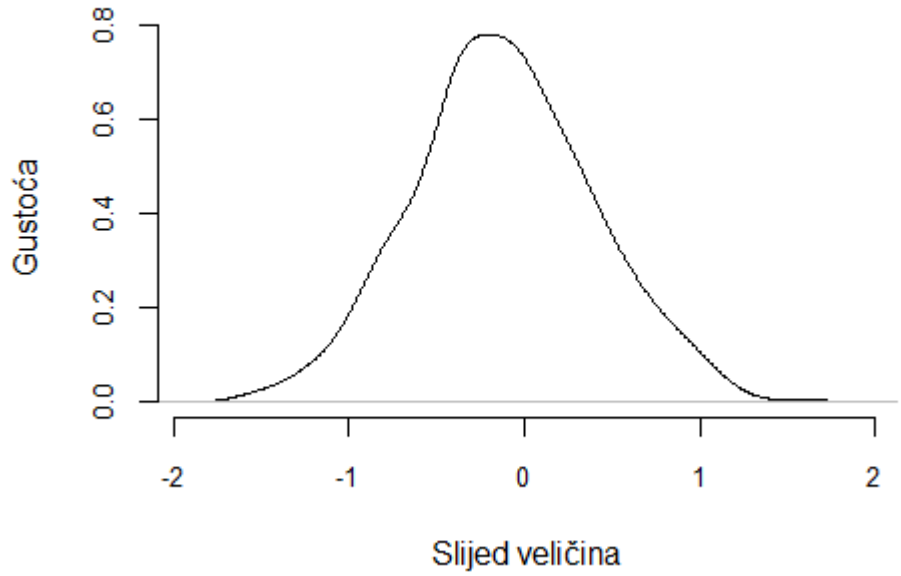
Statistički test	Veličina	Statistika	p
Shapiro	HSI	W = 0.86232	0.05228
Anderson-Darling	HSI	A = 0.7465	0.03729
Shapiro	log(HSI)	W = 0.96059	0.7923
Anderson-Darling	log(HSI)	A = 0.27835	0.5823



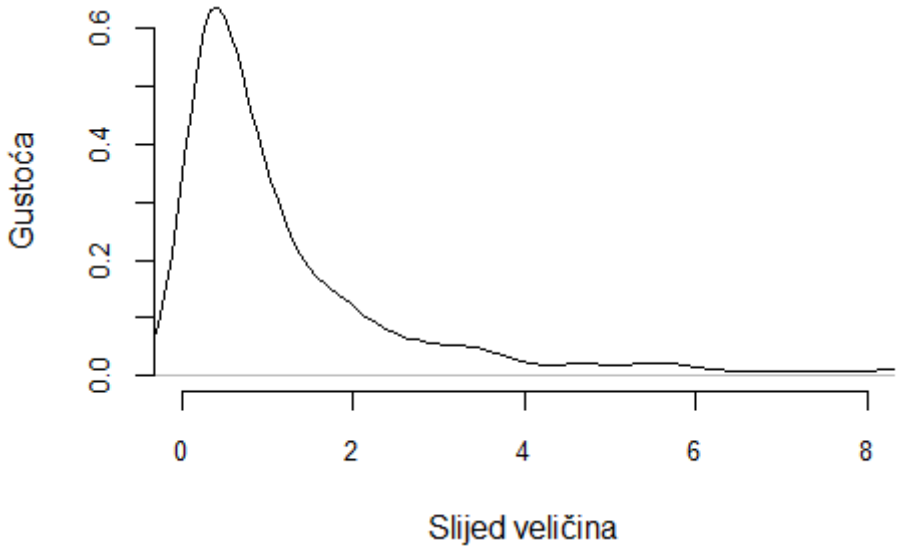
Slika 13. Gustoća vjerojatnosti izmjerenih podataka hepatosomatskog indeksa



Slika 14. Gustoća vjerojatnosti logaritamski transformiranih izmjerenih podataka hepatosomatskog indeksa



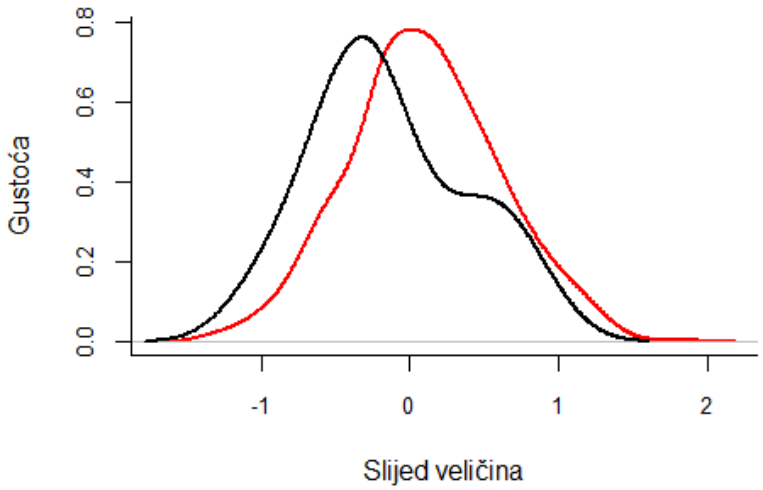
Slika 15. Simulacija gustoća vjerojatnosti transformiranih podataka hepatosomatskog indeksa u okolišu prema izmjerenim podacima



Slika 16. Simulacija gustoća vjerojatnosti hepatosomatskog indeksa u okolišu prema izmjerenim podacima

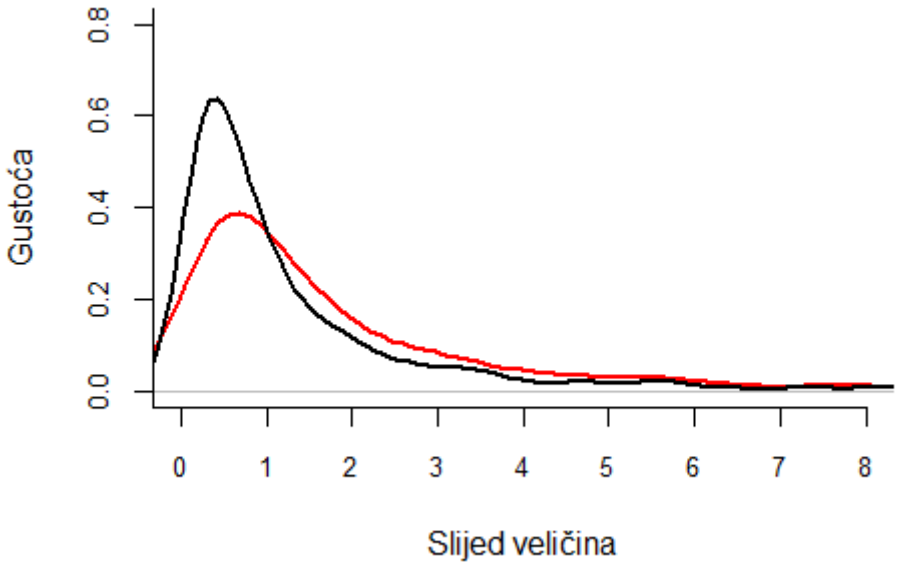
3.3.3. Metaanaliza

Dobiveni podaci simulacijom su uspoređeni s podacima dobivenim u prethodnim istraživanjima Zavoda za kvantitativnu ekologiju. Za kvantitativnu procjenu jednakosti simuliranih podataka upotrijebljen je t-test (t = 1.5109, df = 11.505, p-value = 0.1578) s intervalom povjerenja [-0.104798, 0.571617], p=0.95.



Slika 17. Usporedba teoretskih distribucija dobivenih simulacijama raspodjela transformiranih vrijednosti HSI temeljem izmjerenih podataka i svih prethodnih mjerenja. Crveno: prethodni podaci, crno: izmjereni podatci

.

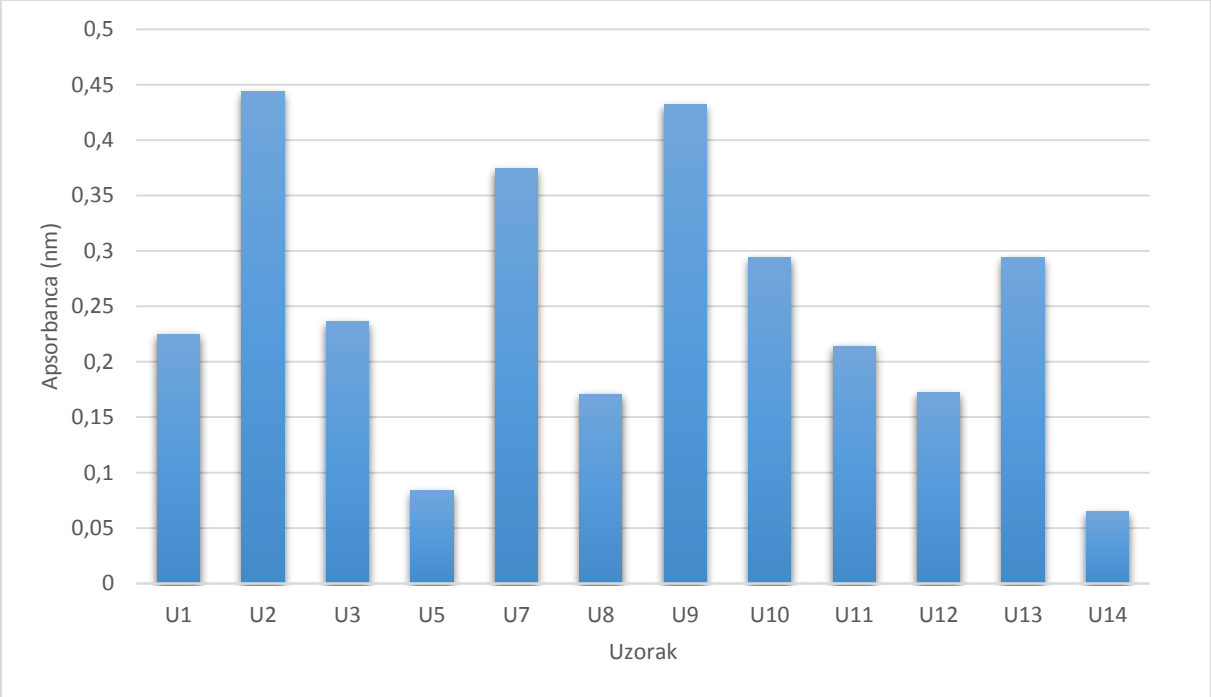


Slika 18. Usporedba teoretskih distribucija dobivenih simulacijama raspodjela nativnih vrijednosti HSI temeljem izmjerenih podataka i svih prethodnih mjerenja. Crveno: prethodni podaci, crno: izmjereni podatci

Na temelju izmjerenih rezultata izvedena je procjena parametara populacije. Pomoću procjenjenih parametara populacije načinjena je simulacija distribucija izmjerenih vrijednosti u hipotetskoj teorijskoj populaciji. Isto je učinjeno metaanalitički s podatcima iz prethodnih istraživanja i iz literature. Izmjerene vrijednosti hepatosomatskog indeksa ukazuju na sličnost s podatcima iz svih prethodnih mjerenja.

3.4. Aktivnost acetilkolin – esteraze u jetri babuške

Rezultati mjerenja aktivnosti acetilkolin – esteraze u jetri babuške prikazani su na slici 19. Iz rezultata je vidiljiva razlika između aktivnosti enzima kod različitih uzoraka, odnosno postoji značajna razlika. Uzorci pod brojem 2, 7 i 9 pokazuju najveću aktivnost acetilkolin – esteraze. Mjerenjem aktivnosti utvrđene su sljedeće vrijednosti: za uzorak broj 2 (0,0444 µmol min^{-1} mg^{-1}) uzorak broj 7 (0,0374 µmol min^{-1} mg^{-1}), te uzorak broj 9 (0,0432 µmol min^{-1} mg^{-1}).



Slika 19. Aktivnost acetilkolin – esteraze u jetri babuške

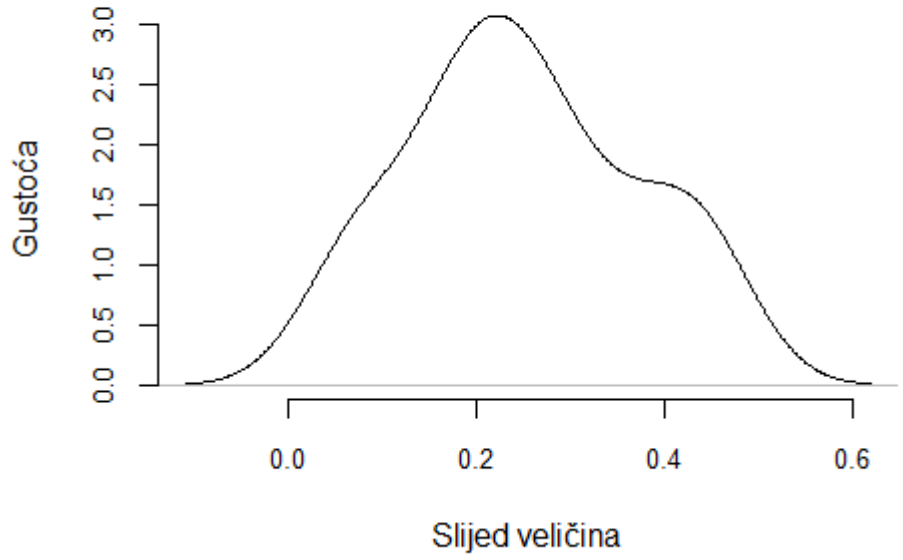
3.4.1. Simulacija

Gustoća izmjerenih vrijednosti

Temeljem izmjerenih vrijednosti načinila se procjena vjerojatnosnih gustoća te simulacija populacije podataka odgovarajuće razdiobe. Testiranje normalnosti originalno izmjerenih vrijednosti izvedeno je pomoću Shapiro i Anderson-Darling testova za normalnost (Tablica 3.)

Tablica 3. Statistike i pripadajuće vrijednosti vjerojatnosti prihvaćanja nulte hipoteze o normalnoj raspodjeli izmjerene veličine.

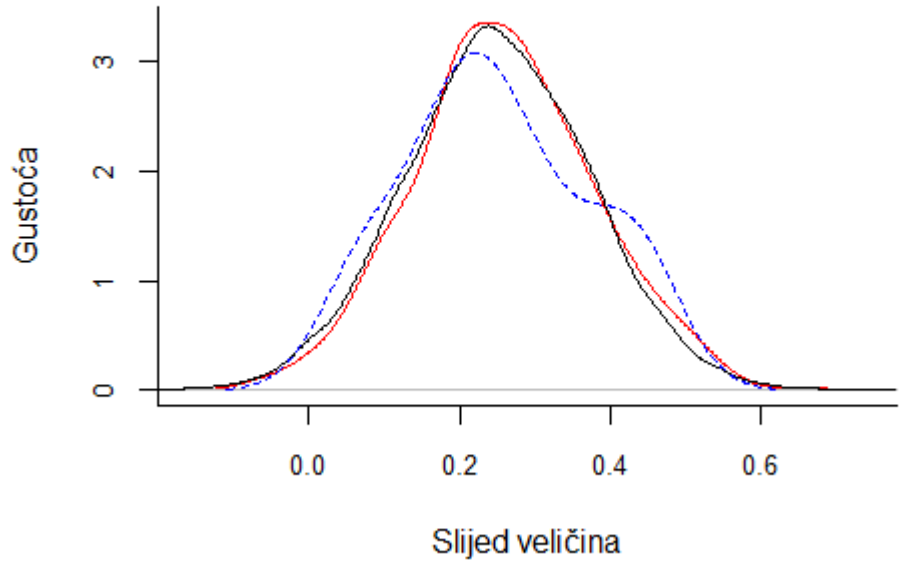
Statistički test	Veličina	Statistika	p
Shapiro	AChE	W = 0.95261	0.6754
Anderson-Darling	AChE	A = 0.23375	0.738



Slika 20. Gustoća vjerojatnosti izmjerenih podataka aktivnosti acetilkolin - esteraze

3.4.2. Metaanaliza

Dobiveni podaci simulacijom su uspoređeni s podacima dobivenim u prethodnim istraživanjima Zavoda za kvantitativnu ekologiju. Za kvantitativnu procjenu jednakosti simuliranih podataka upotrijebljen je t-test (t = 1.6184, df = 550.14, p-value = 0.1062) s intervalom povjerenja -0.00189554 0.01963344], p=0.95.

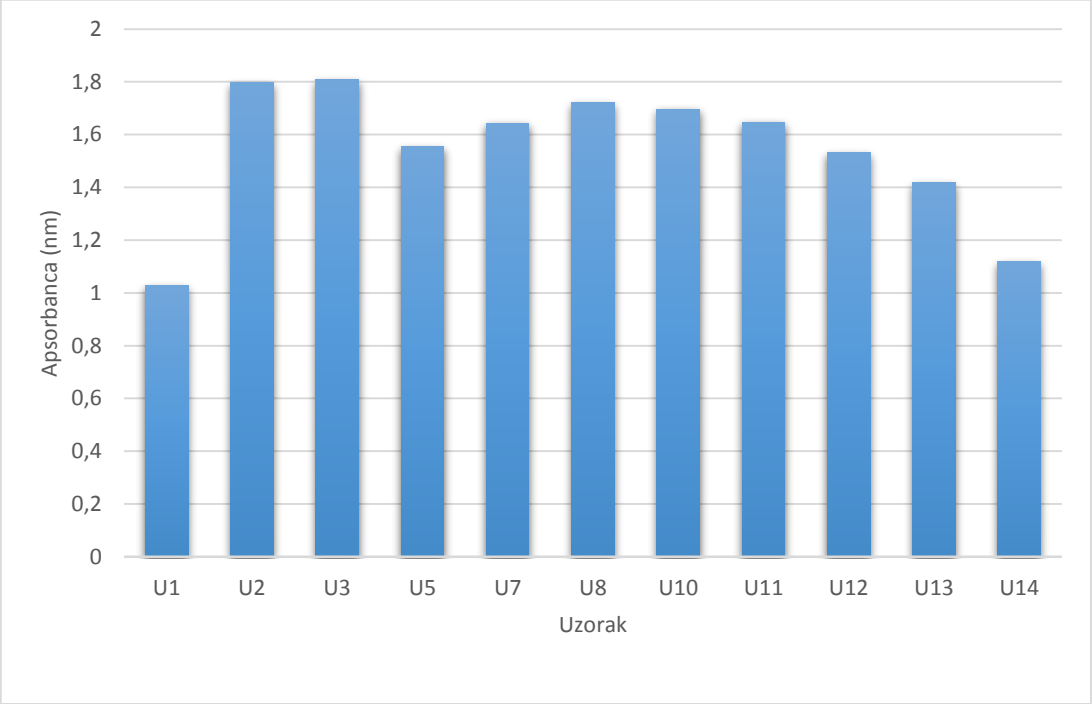


Slika 21. Usporedba teoretskih raspodjela dobivenih simulacijama raspodjela izmjerenih vrijednosti aktivnosti acetilkolin - eseteraze i svih prethodnih mjerenja. Crveno: prethodni podaci, plavo isprekidano: izmjereni podatci, crno: simulirani podaci iz svih prethodnih mjerenja

Na temelju izmjerenih rezultata izvedena je procjena parametara populacije. Pomoću procjenjenih parametara populacije načinjena je simulacija distribucija izmjerenih vrijednosti u hipotetskoj teorijskoj populaciji. Isto je učinjeno metaanalitički s podatcima iz prethodnih istraživanja i iz literature. Izmjerene vrijednosti aktivnosti acetilkolin-esteraze ukazuju na sličnost s podatcima iz svih prethodnih mjerenja.

3.5. Aktivnost katalaze u jetri babuške

Rezultati mjerenja aktivnosti katalaze u jetri babuške prikazani su na slici 22. Iz rezultata je vidljiva podjednaka aktivnost kod većine uzoraka, no nešto višu aktivnost su pokazali uzorci U2 te U3. Naime, uzorak U3 prethodno je pokazao i najvišu vrijednost hepatosomatskog indeksa, što može ukazati na povoljno stanje jetre navedene jedinke.



Slika 22. Aktivnost katalaze u jetri babuške

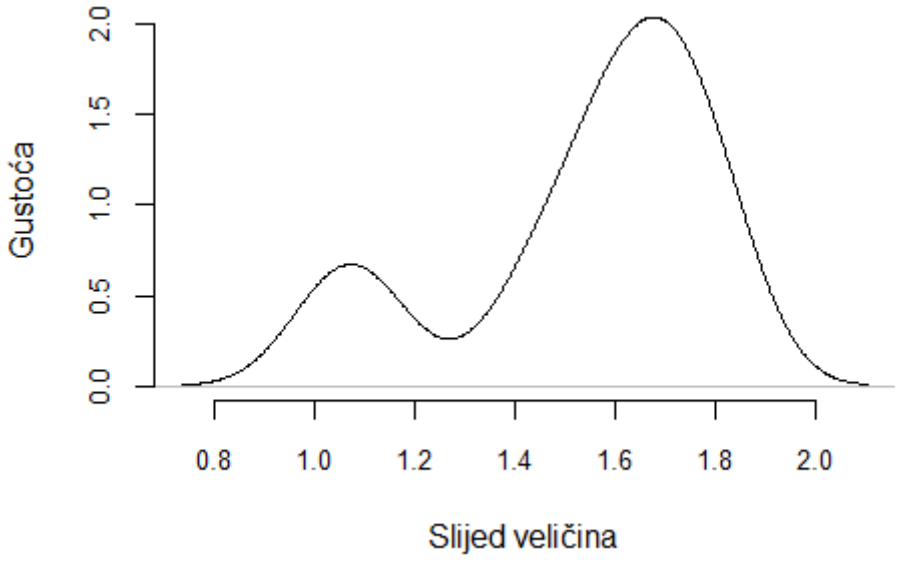
3.5.1. Simulacija

Gustoća izmjerenih vrijednosti

Temeljem izmjerenih vrijednosti načinila se procjena vjerojatnosnih gustoća te simulacija populacije podataka odgovarajuće razdiobe. Testiranje normalnosti originalno izmjerenih vrijednosti izvedeno je pomoću Shapiro i Anderson-Darling testova za normalnost (tablica 4.).

Tablica 4. Statistike i pripadajuće vrijednosti vjerojatnosti prihvaćanja nulte hipoteze o normalnoj raspodjeli izmjerene veličine.

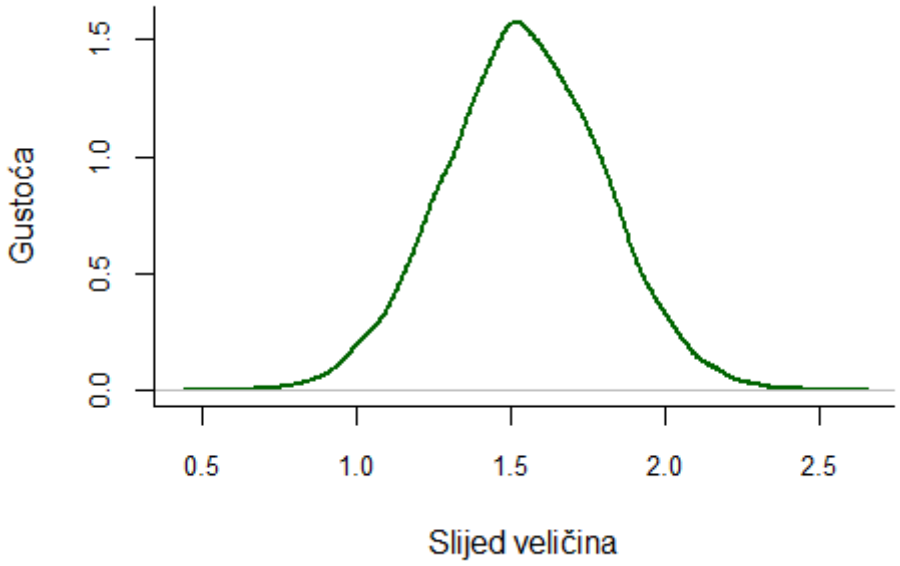
Statistički test	Veličina	Statistika	p
Shapiro	AChE	W = 0.8597	0.05707
Anderson-Darling	AChE	A = 0.64391	0.06773



Slika 23. Gustoća vjerojatnosti izmjerenih podataka aktivnosti katalaze

3.5.2. Simulacija raspodjele aktivnosti katalaze u babuškama u okolišu

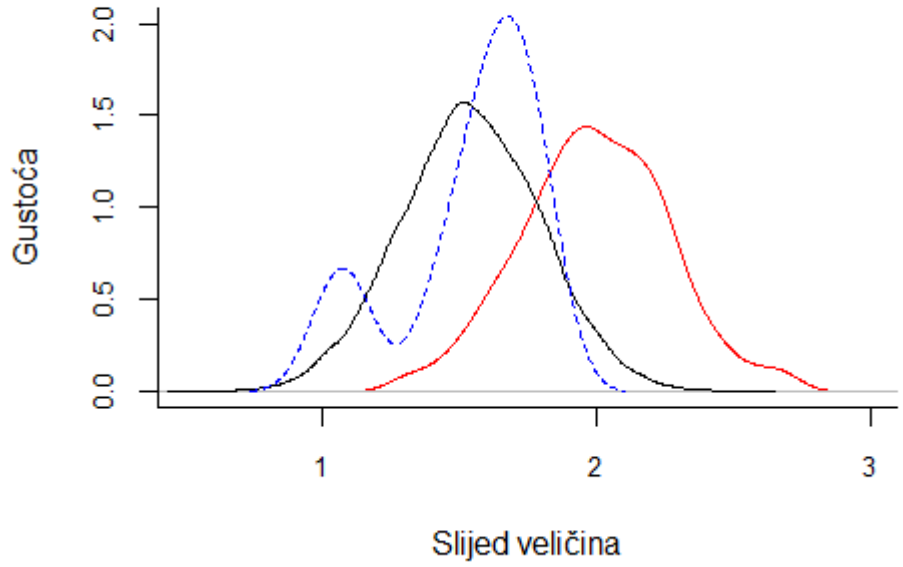
Temeljem izmjerenih vrijednosti katalaze u uzorcima izračunati su procjenitelji parametara raspodjele u babuškama u okolišu (slika 23).



Slika 23. Gustoća vjerojatnosti izmjerenih podataka aktivnosti katalaze

3.5.3. Metaanaliza

Dobiveni podaci simulacijom su uspoređeni s podacima dobivenim u prethodnim istraživanjima Zavoda za kvantitativnu ekologiju. Za kvantitativnu procjenu jednakosti simuliranih podataka upotrijebljen je t-test (t = 36.764, df = 543.74, p-value < 2.2e-16) s intervalom povjerenja [0.429072 0.477512], p=0.95.

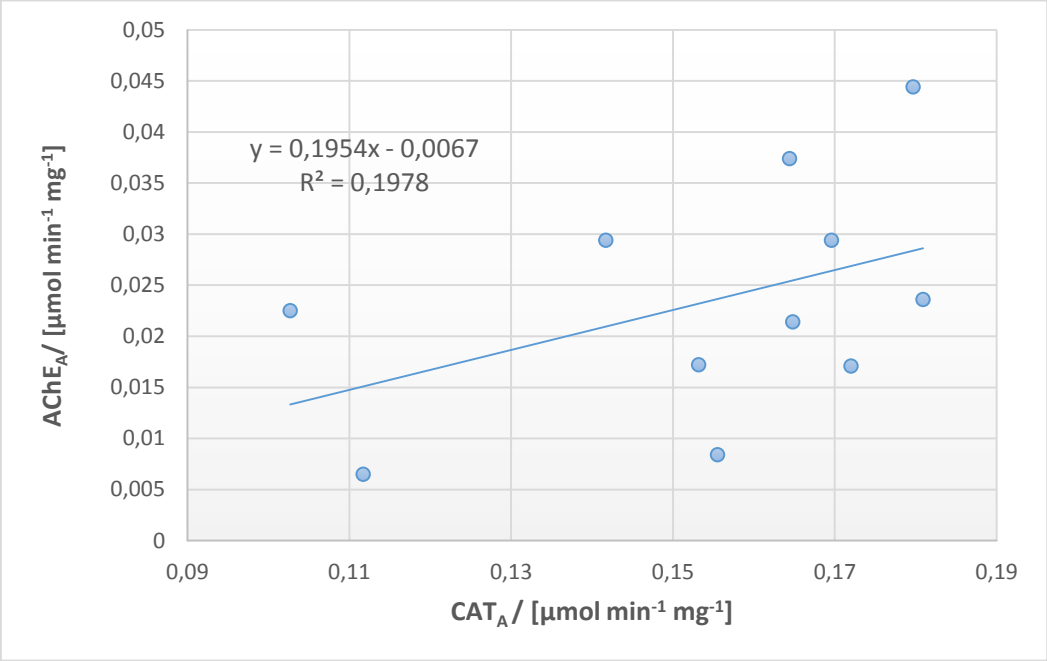


Slika 24. Usporedba teoretskih raspodjela dobivenih simulacijama raspodjela izmjerenih vrijednosti aktivnosti katalaze i svih prethodnih mjerenja. Crveno: prethodni podaci, plavo isprekidano: izmjereni podatci, crvno: simulirani podaci iz svih prethodnih mjerenja.

Na temelju izmjerenih rezultata izvedena je procjena parametara populacije. Pomoću procjenjenih parametara populacije načinjena je simulacija distribucija izmjerenih vrijednosti u hipotetskoj teorijskoj populaciji. Isto je učinjeno metaanalitički s podatcima iz prethodnih istraživanja i iz literature. Izmjerene vrijednosti aktivnosti katalaze ne ukazuju na sličnost s podatcima iz svih prethodnih mjerenja, odnosno postoji značajna razlika.

3.6. Korelacija aktivnosti acetilkolin – esteraze i katalaze u jetri babuške

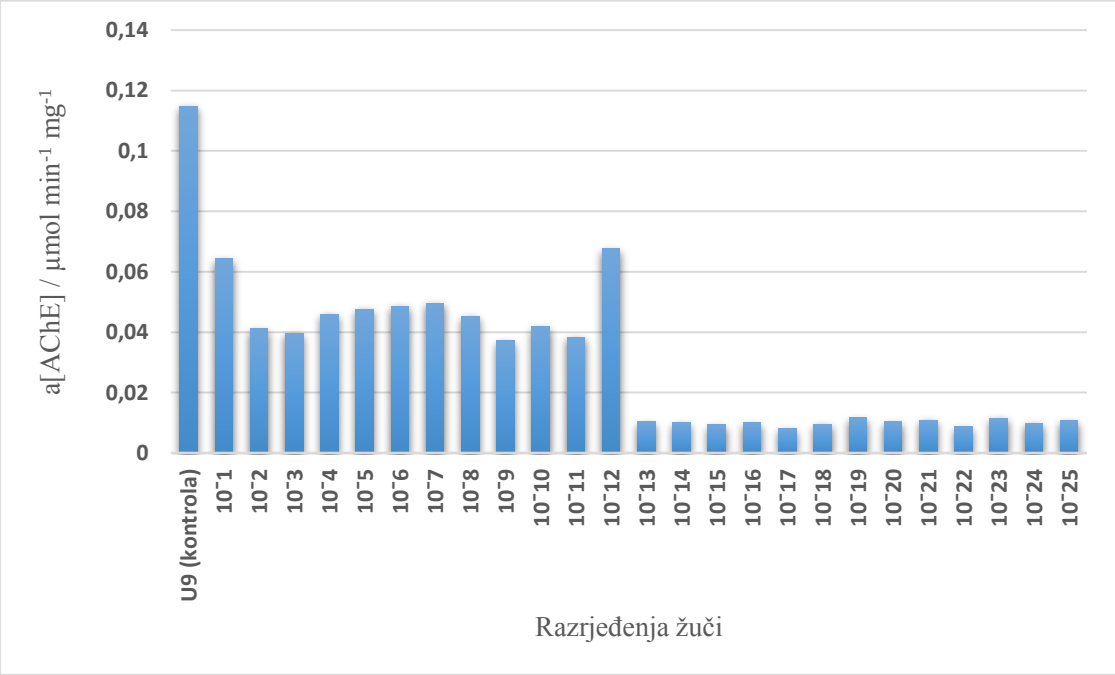
Rezultati prikazani na slici 25. ukazuju na vrlo slabu korelaciju aktivnosti acetilkolin – esteraze te katalaze u jetri babuške (r = 0,44). Odnosno, aktivnost acetilkolin – esteraze u jetri babuške ne ovisi o aktivnosti katalaze, te obrnuto.



Slika 25. Korelacija aktivnosti acetilkolin - esteraze i katalaze u jetri babuške

3.7. Aktivnost enzima jetre babuške uz dodatak bilijarnog ekstrakta

Rezultati aktivnosti enzima jetre babuške dodatkom bilijarnog ekstrakta različitih razrjeđenja prikazani su na slici 26. Naime, mjerenjem aktivnosti enzima kod pripremljenih uzoraka, utvrđeno je kako uzorak U9 pokazuje najveću aktivnost. Isti se uzorak tada podvrgavao tretiranju različitim razrjeđenjima žuči, odnosno od koncentracije žuči pri 10^{-1} µL do koncentracije 10^{-25} µL. Mjerenjem se utvrđivala inhibicija enzima jetre koju bi žuč, odnosno bilijarni ekstrakt mogao polučiti. Nakon tretiranja uzorka razrjeđenjem žuči pri 10^{-1} µL postignuta je inhibicija, te se aktivnost enzima s početnih 0,1148 µmol min^{-1} mg^{-1} smanjila na 0,0642 µmol min^{-1} mg^{-1}. Daljnja razrjeđenja postizala su sličan učinak inhibicije, odnosno moguće je uočiti tzv. krivulju ovisnosti o dozi. Krivulja ovisnosti o dozi opisuje učinak inhibicije enzima dodatkom inhibirajuće tvari pri velikim koncentracijama, dok se kod malih koncentracija inhibirajuće tvari ne očekuje inhibitorni učinak. No, unutar ovog eksperimenta izrazita inhibicija enzima postignuta je pri vrlo malom razrjeđenju od 10^{-13} µL. Spomenuti učinak može se objasniti farmakološkim fenomenom, odnosno idiosinkratskom reakcijom koja uvjetuje posebnu preosjetljivost organizma na vrlo male koncentracije određene tvari.



Slika 26. Inhibicija aktivnosti acetilkolin – esteraze dodatkom različitih koncentracija žuči

4. RASPRAVA

Tekuća voda pokriva otprilike 71% Zemljine površine, od čega najveći postotak čini slana voda. No, iako u mnogo manjem postotku, slatka voda zastupljena unutar rijeka, jezera te manjih vodenih tijela, čini vrlo važan dio zemljine biosfere. Potaknuta upravo niskim postotkom zastupljenosti, ali od izričite neophodnosti za održavanje života razvijena je akvatička ekologija. Nadalje, pod snažnim antropogenim pritiskom današnjice, alarmantnim promjenama na višim ili nižim razinama ekosustava, iz akvatičke ekologije razvijena je akvatička toksikologija. Unutar akvatičke toksikologije i same ekotoksikologije, moguće i najznačajniji tzv. alat, prema kojem se stanje u okolišu vrlo jednostavno može kvantificirati predstavljaju biološki biljezi, odnosno biomarkeri. Na ovaj način biološki biljezi predstavljaju prediktivni i dijagnostički alat. U smislu predikcije vrlo važan aspekt predstavljaju minimalne promjene na nižim razinama sustava, odnosno promjene na molekularnoj razini. Promjene na molekularnoj razini predstavljaju prvi znak nastupanja promjena unutar okoliša. Kasnije promjene, posebice one na histološkoj, morfološkoj razini, te promjene unutar populacija predstavljaju krajnji učinak određenog stresora unutar okoliša. Takav učinak se upravo mogao i može predvidjeti u vrlo ranoj fazi, odnosno na razini bioloških biljega te njegov kumulativni učinak pravodobno i spriječiti. Jedan od načina prikupljanja podataka potrebnih za procjenu stanja unutar okoliša jest i kavezno izlaganje odabranih eksperimentalnih organizama. Naime, metoda poput kaveznog izlaganja pokazala se prilično pouzdanom gdje su tijekom eksperimenta očuvani realni životni uvjeti jedinki. No, nasuprot tome, mnogi znanstvenici kao nedostatak metode navode stres kojem organizmi bivaju izloženi (Randall i Perry, 1992). Stres prouzrokovan tijekom eksperimenta može prouzročiti različite rezultate u odnosu na očekivane. Zbog minimiziranja spomenutog učinka potrebno je izabrati vrste relativno tolerantne na eksperimentalne uvjete. Vrste poput jegulje, te vrste iz porodice Cyprinidae pokazale su visok stupanj tolerancije prema nepovoljnim okolišnim uvjetima (Oikari, 2006).

U ovom radu kao eksperimentalni organizam korištena je babuška. Upravo zbog njene biologije kao vrste, iznimne prilagodljivosti okolišnim uvjetima, te njezine genetičke i bihevioralne razlike u odnosu na druge vrste slatkovodnih riba, moguć je različit rezultat nego što je to očekivano kod ostalih eksperimentalnih vrsta. U okviru eksperimenta od interesa su bile aktivnosti acetilkolin – esteraze i katalaze kao najčešće korištenih biomarkera. Mjerenjem aktivnosti prethodno spomenutih enzima dobiven je uvid u trenutno stanje unutar jedinki, te dodatno obradom izmjerenih podataka različitim simulacijama, odnosno metaanalizama,

dobiven je uvid odnosa izmjerenih podataka prema ranije prikupljenim podatcima različitih istraživanja. Naime, usporedba izmjerenih te literaturnih podataka hepatosomatskog indeksa te aktivnosti acetilkolin – esteraze, ukazuje na jasnu sličnost. Nasuprot, usporedba izmjerenih te literaturnih podataka katalaze ukazuje na drugačiji ishod. Nemogućnost povezivanja izmjerenih te literaturnih podataka kod katalaze ukazuju na iznimnu osjetljivost katalaze kao biomarkera. Hepatosomatski indeks te acetilkolin – esteraza, kao biomarker, ne pokazuju spomenutu iznimnu osjetljivost prema različitim okolišnim faktorima. Jedan od mogućih razloga ne poklapanja izmjerenih podataka tijekom ovog eksperimenta, s podatcima iz svih prethodnih mjerenja, jest vremenska komponenta. Naime, eksperiment je proveden u mjesecu svibnju, dok se većina sličnih istraživanja ove problematike provodi tijekom ljetnih mjeseci, odnosno u srpnju i kolovozu. Tijekom mjeseca svibnja prevladavaju bitno različiti okolišni uvjeti u odnosu na ljetne mjesece kada vrlo često dolazi do smanjenje razine kisika, više temperature vode, promjenama u količini nutrijenata i slično. Upravo promjena okolišnih uvjeta tijekom godine najbolje se uočava kod aktivnosti katalaze što je i dokazano ovim eksperimentom. Brojne okolnosti poput biotičkih ili abiotičkih faktora potiču antioksidativnu zaštitu kod riba. Primjerice, intrizični faktori poput dobi jedinke, načina ishrane te čak i filogentskog smještaja vrlo snažno utječu na antioksidatvne sustave organizma (Martinez – Alvarez, 2005).

Također istražena je i moguća korelacija acetilkolin – esteraze i katalaze u jetri babuške, te je utvrđeno kako ne postoji značajna korelacija između navedenih enzima. Prikupljenim podatcima o ukupnoj masi jedinki, dužini jedinki te masi izolirane jetre pojedinačnih jedinki tijekom eksperimenta izračunati su kondicijski faktor te ranije spomenuti hepatosomatski indeks. Naime, uvidom u kondicijski faktor te hepatosomatski indeks, preko fiziološkog stanja jedinki, može se uvidjeti i stanje ekosustava. Činjenica koja potkrjepljuje navedenu hipotezu jest kako organizmi s okolišem komuniciraju putem protoka tvari i energije te doista mogu biti podložni različitim promjena u okolišu, što ispoljavaju preko svog fiziološkog statusa. Tijekom izračuna kondicijskog faktora utvrđena je jasna korelaciju između mase i dužine. Jasna korelacija dakle ukazuje na proporcionalan odnos mase i dužine, odnosno povećanjem dužine povećava se i masa jedinki. Kondicijski faktor, izračunat prema jednadžbi, iznosio je 1,758. Ovaj iznos kondicijskog faktora ukazuje na povoljno stanje jedinki tijekom eksperimenta. Za usporedbu, kondicijski faktor babuški prikupljenih na području Vranskog jezera, iznosio je visokih 2,02 (Treer i sur., 2010). Unutar okoliša sa smanjenim protokom energije, odnosno tzv. "siromašnom okolišu" kod jedinki se pronalazi manja jetra, s manjim energetskim zalihama poput glikogena, te sukladno tome i manjim

hepatosomatskim indeksom. Hepatosomatski indeks također pokazuje najviše vrijednosti prije mriještenja, gdje dostiže svoj maksimum, te neposredno poslije opada (Schreck, 1981). Pad razine hepatosomatskog indeksa proizlazi iz potrošnje jetrenog glikogena u svrhu reprodukcije, odnosno mriještenja (Schreck, 1981). Naime, babuška postiže svoju spolnu zrelost u trećoj ili četvrtoj godini života kada dosegne dužinu od oko otprilike dvadesetak centimetara, što nije slučaj u eksperimentu gdje su jedinke bile stare svega nekoliko mjeseci do godine dana. Stoga prikazane razine HSI se u ovom eksperimentu ne mogu povezati sa spolnom zrelošću i mriještenjem, nego potencijalno mogu ukazivati na povoljne uvjete u okolišu u kojem su se jedinke nalazile. Sukladno tome, uzevši u obzir starost jedinki od nekoliko mjeseci do najviše godinu dana, povoljan kondicijski faktor te hepatosomatski indeks sugeriraju povoljne uvjete okoliša unutar kojeg su jedinke bile izložene tijekom eksperimenta.

Eksperimentom je utvrđen i poseban fenomen. Naime, testiranjem aktivnosti enzima postmitohondrijske frakcije jetre dodatkom bilijarnog ekstrakta utvrđen je inhibitorni učinak žuči. Koncentracija žuči u iznosu 10^{-1} µL polučila je inhibitorni učinak, te su sve daljnje koncentracije imale sličan učinak, što se jasno može pratiti i prikazati tzv. krivuljom ovisnosti o dozi. No, zanimljivo je kako se pri vrlo niskoj koncentraciji od 10^{-13} µL bilijarnog ekstrakta dogodila snažna inhibicija jetrenih enzima. Pretpostavka je kako se dogodio poseban fenomen, pod nazivom idiosinkratska reakcija. Idiosinkratska reakcija svrstava se u tip B farmakoloških reakcija. Tzv. tip B farmakološke reakcije karakterizira brz, često nepredvidljiv hepatotoksični učinak koji se često ne može povezati s dozom te ima vrlo varijabilan period latencije. Također fenomen se ne može prikazati krivuljom ovisnosti i dozi. Autori Goldstein (1974) i Levine (1978) navode pojam kemijske idiosinkratske reakcije koju definiraju kao genetički determinirati abnormalnu reaktivnost prema određenoj supstanci. Smatra se kako genetski polimorfizam, odnosno nasljedna promjena određenog gena, može rezultirati upravo idiosinkratskom reakcijom. Kao što je i ranije spomenuto, kako je genetička varijabilnost babuške u odnosu na druge vrste bitno manja, za očekivati je da će i mjerna obilježja izmjerenih biokemijskih biljega biti mjerljivo drukčija tj. da će njihova varijabilnost biti manja nego je to uobičajeno u drugih vrsta.

U novije vrijeme od posebnog značaja za društvo predstavlja adekvatna i praktična zaštita prirode i okoliša. Brojna područja biologije pa i drugih znanstvenih disciplina daju značajan naglasak na zagađenja i onečišćenja okoliša, posebice vodenih ekosustava. Vodeni ekosustavi predstavljaju okosnicu biosfere, podržavajući brojne biološke, fizikalne i kemijske procese, te na taj način omogućavaju ispravan protok tvari i energije unutar biosfere.

5. ZAKLJUČAK

Najčešći biljezi detekcije promjenu jesu upravo acetilkolin – esteraza i katalaza. Dokazano, određena odstupanja od normalne aktivnosti spomenutih enzima ukazuju na prisutnost alohtone tvari, odnosno zagađivala, posljedično oksidativni stres, promjene unutar živčanog sustava organizama, te u konačnici moguće letalne posljedice i negativne promjene unutar samog ekosustava.

Ključni zaključci istraživanja su sljedeći:

- Aktivnost acetilkolin-esteraze tijekom izrade ovog rada pokazuje izrazitu sličnost s podatcima iz svih prethodnih mjerenja.
- Eksperimentom je ukazana važnost katalaze, kao biomarkera iznimne osjetljivosti prema okolišnim uvjetima. Podatci vezani uz aktivnost katalaze tijekom izrade ovog rada ne pokazuju sličnost s podatcima iz svih prethodnih mjerenja.
- Osim acetilkolin – esteraze i katalaze, potencijalni indikatori stanja okoliša mogu predstavljati i kondicijski faktor te hepatosomatski indeks. Povoljan kondicijski faktor te hepatosomatski indeks ukazuju na povoljne uvjete u okolišu tijekom eksperimenta.
- Tijekom tretiranja uzoraka bilijarnim ekstraktom uočen je fenomen idiosinkratske reakcije. Naime, očekivani rezultat bila bi pravilna ovisnost o dozi, no u ovom slučaju kod babuške, pojavio se rijedak fenomen, gdje inhibicija enzima ne ovisi o koncentraciji inhibitora.

6. LITERATURA

Al-Sabti, K. 1984. Ginogeneza riba. Ribarstvo Jugoslavije. 39.

Babkin, B. P. 1928. The digestive system and its function. Woods Hole. 54: 254-277.

Casillas, E., Myers, M., Ames, E. 1983. Relationship of serum chemistry values to liver and kidney histophathology in English sole (Parophrys vetulus) after acute exposure to carbon tetrachloride. Aquat. Toxicol. 3: 61-78

Claiborne, A. 1985. Catalase activity. In: Greenwald, R.A. (Ed.), CRC Handbook of methods in oxygen radical research. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 283-284.

Connell, D.W., Lam, P.K.S., Richardson, B.R., Wu, R.S.S., 1999. Introduction to Ecotoxicology. Blackwell Science, Abingdon. 170 pp.

Costa, L.G. 2005. Measurement of paraoxonase (PON1) status as a potential biomarker of susceptibility to organophosphate toxicity. Clinica Chimica Acta. 352. 1-2.37–47.

Daniels G. 2007. Functions of red cell surface proteins. Vox Sanguinis. 93. 4. 331–340.

Davies, K.J.A. 2000. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. Biochem. Soc. Symp. 61, 1–31.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Jr., Featherstone, R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of AChE activity. Biochem. Pharmacol. 7: 88–95.

Goldstein A, Aronow L, Kalman SM. 1974. Principles of Drug Action. New York

Goodsell, D.S. 2004. Catalase. Molecule of the Month. RCSB Protein Data Bank.

Goto,T. 2003. Physicochemical and physiological properties of 5α-cyprinol sulfate, the toxic bile salt of cyprinid fish. Journal of Lipid Research Volume 44. 123 – 134.

Hagey LR., Hofmann AF,.2008. Diversity of bile salts in fish and amphibians: evolution of a complex biochemical pathway. Physiol Biochem Zool. 83(2):308–321.

Hanfling, B., Bolton, P., Harley, M., Carvalho, G.R. 2005. A molecular approach to detect hybriidisation between crucian carp (*Carassius carassius*) and non-indigenous carp species (*Carassius spp.* and *Cyprinus carpio).* Freswater Biology (50): 403 – 417.

Holopainen, I.J., Tonn, W.M., Paszkowski, C.A. 1997. Tales of two fish: the dichotomus biology of crucian carp (*Carassius carasius)* in northern Europe. Finnish zoological and botanical publishing bord.

Kottelat, M., Freyhof, J.2007. Handbook of European freshwater fishes. Publications Kottelat, Cornol,Switzerland.

Lam PK, Gray JS. 2003. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. Mar Pollut Bull.46(2):182-6.

Lavoué S, Miya M, Poulsen JY, Møller PR, Nishida M. 2008. Monophyly, phylogenetic position and inter-familial relationships of the Alepocephaliformes (Teleostei) based on whole mitogenome sequences. Mol Phylogenet Evol.47:1111–1121.

Levine RR. 1978. *Pharmacology: Drug Actions and Reactions.* Boston: Little, Brown.

Martinez – Alvarez, M. 2005. Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. Reviews in Fish Biology and Fisheries 15: 75–88

Meshorer E. 2006. Virtues and woes of AChE alternative splicing in stress-related neuropathologies. Trends in Neurosciences. 29. 216–224.

Oikari, A.2006. Caging techniques for field exposures of fish to chemical contaminants. Aquatic Toxicology 78. 370–381.

Okada, S. 1915. On the reaction of bile. The Journal of Physiology.57. 114–118.

Park,S.E. 2004. Acetylcholinesterase plays a pivotal role in apoptosome formation. Cancer Research 64. 2652–2655.

Plančić, J. 1967. Srebri karas – *Carassius auratus gibelio* nova vrsta naše ihtiofaune. Ribarstvo Jugoslavije 22.

Radymska-Wawrzyniak K, Studziński T. 1987. Effect of bile and bile acids on monoamine oxidase and acetylcholinesterase activity in the jejunum of rabbits, guinea pigs and swine. Pol Arch Weter. 24(4):457-66.

R Core Team 2016. A language and envrionment for statcitival computing, R Foundation,

Randall, D.J., Perry, S.F., 1992. Catecholamines. In: Hoar. Fish Physiology.12. 255–300

Rodricks, J.V.1992. Calculated Risk. Cambridge University Press

Schreck, C.B. 1981. Stress and compensation in teleoste fishes: Response to social and physical factors. In: "Stress and Fish". Pickering, A.D.ed. Academic Press, New York pp. 295-321.

Taylor P., Radić, Z. 1994. The cholinesterases: from genes to Proteins Annual Review of Pharmacology and Toxicology.34. 281–320.

Treer, D. 2010. The condition of allochtonous fishes in the Mediterranean Vransko Lake. J. Appl. Ichthyol. 1–3.

7. PRILOG

Web 1: http://www.mdpi.com/1424-8220/15/1/499/htm

Web 2: https://www.dreamstime.com/royalty-free-stock-photos-freshwater-fish-carassius-auratus-gibelio-image11256468)

Web 3: http://geoportal.dgu.hr/preglednik/?fsb=false