Metalotioneini kao biomarkeri izloženosti metalima u školjkaša

Redžović, Zuzana

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:568221

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

METALOTIONEINI KAO BIOMARKERI IZLOŽENOSTI METALIMA U ŠKOLJKAŠA

BIVALVE METALLOTHIONEINS AS BIOMARKERS OF METAL EXPOSURE

SEMINARSKI RAD

Zuzana Redžović

Preddiplomski studij biologije
(Undergraduate Study of Biology)

Mentor: doc. dr. sc. Jasna Lajtner

Zagreb, 2015.

Sadržaj:

1. Uvod ……1
   1.1. Mekušci ……....2
   1.2. Školjkaši …….……3
      1.2.1. Školjkaši kao bioindikatorski organizmi ……5
      1.2.2. *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819)…….…..6
      1.2.3. *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771)…….....……..7
2. Biomonitoring ……...…...9
3. Metalotioneini (MT-i) …….. ……..…..…….10
   3.1. Funkcija MT-a ……...…….....10
   3.2. Određivanje MT-a Brdička reakcijom ……..……....11
   3.3. Primjena MT-a kao biomarkera izloženosti metalima *in situ* i *in vitro*……...…...12
   3.4. MT-i kao biomarkeri izloženosti metalima u školjkaša……...….....13
      3.4.1. MT-i kao biomarkeri izloženosti metalima u škrgama dagnji ……....13
      3.4.2. MT-i kao biomarkeri izloženosti metalima u probavnoj žlijezdi dagnji……..14
      3.4.3. Upotreba MT-a za procjenu zdravstvenog rizika konzumacije školjkaša……...…16
      3.4.4. Usporedba MT-a kao biomarkera oksidativnog stresa i stresa uzrokovanog metalima……...17
      3.4.5. Mjerenje MT-a u ukupnom tkivu slatkovodnih školjkaša……..…..18
   3.5. Polimorfizam MT-a kod mediteranske dagnje, *Mytilus galloprovincialis* ……19
   3.6. Problemi korištenja MT-a kao biomarkera……...……..20
      3.6.1. Utjecaj biometričkih parametara na razinu MT-a i metala kod dagnji …….....20
      3.6.2. Sezonska varijabilnost MT-a……..…….…22
4. Zaključak ……..…...24
5. Literatura ……....26
6. Sažetak ……..…...31
7. Summary ……..……32

POPIS KRATICA I KEMIJSKIH SIMBOLA

Ag – srebro

AgCl – srebro klorid

Cd – kadmij

Cl - klor

$Co(NH_3)_6Cl_3$ – heksaaminokobalt (III) klorid

Cr - krom

Cu – bakar

DME/SMDE - kapajuća živina elektroda

DNA - deoksiribonukleinska kiselina

DPV - diferencijalna pulsna voltametrija

Fe – željezo

GISD - Global Invasive Species Database

Hg – živa

HMDE - stacionarna viseća živina elektroda

H_2O_2 - vodikov peroksid

KCl – kalijev klorid

MME - Multi Mode elektroda

Mn - mangan

MT- metalotionein

MT-10 - monomerni oblik metalotioneina

MT-20- dimerni oblik metalotioneina

NH_4Cl – amonijev klorid

NH_4OH – amonijev hidroksid

Ni – nikal

Pb - olovo

PCP – pentaklorofenol

-SH skupina - tiolna skupina, sulfhidrilna skupina

Zn - cink

1. Uvod

Uslijed neizbježne i intenzivne uporabe teških metala u raznim granama suvremene industrijske proizvodnje te uslijed urbanih onečišćenja koja doprinose zagađenju našeg okoliša, u današnje je vrijeme nemoguće izbjeći izlaganje teškim metalima (Srebočan i sur., 2014). Brojne ljudske aktivnosti, poput industrije, agrikulture, rudarstva, naftnih bušotina i djelatnosti u morskim lukama utječu na prisutnost metala u okolišu. Morske luke i brodogradilišta su često onečišćena metalima poput Zn i Cu. Ovi metali se nalaze u sedimentu i morskoj vodi, a potječu od protuobraštajnih boja koje ih sadrže. U brojnim industrijaliziranim zemljama veliki problem predstavlja onečišćenje metalima zbog njihove toksičnosti, otpornosti i bioakumulacije u vodenim organizmima (Dragun i sur., 2010). Metali su toksični jer se vežu za esencijalne biomolekule, poput enzima i transportnih proteina. Neki metali sudjeluju u stvaranju radikala. Stoga, organizmi žele ukloniti metalne ione iz blizine bitnih molekula. To najčešće rade akumulacijom metala u granule i lizosome ili se metali vežu na citosolne proteine, poput metalotioneina (MT) (Strižak i sur., 2014).

Mekušci, posebno školjkaši koji žive u obalnoj zoni, akumuliraju visoke razine metala u svoja tkiva. Kada su izloženi topljivim metalima, npr. Cd, oni se akumuliraju u plaštu i škrgama. Unos metala putem hrane uzrokuje nakupljanje u tkivima za pohranu, poput probavne žlijezde (Raspor i sur., 2004). Neki mekušci su prilagođeni na određene razine metala te uspijevaju preživjeti i u ovakvim teškim životnim uvjetima. Zbog ovakve tolerancije na metale, mekušci se koriste za biomonitoring onečišćenja u morskim ekosustavima. Njihova tolerancija ovisi o sposobnosti da reguliraju metale u svojim tkivima i stanicama te da akumuliraju metale u netoksičnom obliku. Dagnje se hrane filtracijom morske vode i imaju visoke stope filtracije te dnevno profiltriraju veliki volumen vode. Stoga unos metala značajno doprinosi njihovoj akumulaciji u škrgama. Na primjer, dagnje roda *Mytilus* su otporne na toksičnost teških metala djelomično zahvaljujući velikom broju kopija izoformi MT-a (Baršyte i sur., 1999; citirano prema Raspor i sur., 2005).

Regionalna ekonomija je u mnogim dijelovima svijeta bazirana na ribarskim aktivnostima koje mogu biti ugrožene antropogenim utjecajima u priobalnim ekosustavima (Pellerin i Amiard, 2009). Akvatični organizmi, poput školjkaša predstavljaju vrlo cijenjenu i, u pojedinim geografskim područjima, učestalo konzumiranu hranu. Stoga je važno da takva hrana bude što nižeg rizika za zdravlje potrošača (Srebočan i sur., 2014). Primjena biomarkera kao indikatora zagađenja kod akvatičnih organizama se razvila tijekom zadnjih nekoliko desetljeća.

Pomoću biomarkera moguće je izraziti kemijski stres kojem su organizmi izloženi. Da bi se biomarkeri mogli ispravno upotrijebiti, potrebno je znati raspon njihove prirodne varijabilnosti kod istraživanih vrsta koje naseljavaju geografska područja sa sličnim hidrografskim i klimatološkim karakteristikama kao i onim kod područja istraživanog zbog onečišćenosti (Leiniö i Lehtonen, 2005). Idealan biomarker u ekotoksikološkim istraživanjima ne pokazuje sezonsku varijabilnost kao odgovor na dostupnost hrane i reproduktivni status, nego varira samo zbog onečišćenja. Međutim, u praksi je ovo rijedak slučaj (Sheehan i Power, 1999; citirano prema Leiniö i Lehtonen, 2005).

1.1. Mekušci

Koljeno Mollusca (mekušci) spada u skupinu nekolutićavih Coelomata, zajedno sa štrcaljcima (koljeno Sipuncula) i zvjezdanima (koljeno Echiura). Mekušci su jedna od najbolje i najsvestranije istraženih skupina beskralježnjaka. Oni su vrlo raznolika i rasprostranjena skupina. Poznato je oko 130 000 vrsta mekušaca, od čega ih je oko 35 000 fosilnih. Danas su sistematski raspoređeni u sedam razreda: Aplacophora (bezljušturaši), Polyplacophora (mnogoljušturaši), Monoplacophora (jednoljušturaši), Gastropoda (puževi), Cephalopoda (glavonošci), Bivalvia (školjkaši) i Scaphopoda (koponošci). Uglavnom žive u moru, ali prisutni su i u slatkim vodama te na kopnu (Habdija i sur., 2011).

Mekušci su bilateralno simetrične ili sekundarno asimetrične protostomične životinje. Njihovo tijelo se može razlučiti na glavu (osim školjkaša), stopalo, utrobnu vreću i vapnenačku ljušturu s plaštom. Mišićavo i trepetljikavo stopalo nalazi se na ventralnoj strani tijela te im služi za puzanje po podlozi, za ukopavanje ili za uvlačenje tijela u ljušturu u slučaju opasnosti. Utroba je smještena dorzalno te je zaštićena sa vapnenačkom ljušturom koja može biti jednodijelna, dvodijelna ili višedijelna, dok je neki mekušci uopće nemaju. Stijenka tijela mekušaca je građena od epiderme i mišića. Plašt je dio stijenke tijela koja se nalazi s dorzalne strane. Na mjestu gdje nije srastao s tijelom stvara plaštanu šupljinu. U plaštanoj šupljini se nalaze škrge, osfradiji, nefridiopori, gonopori i analni otvor. Škrge ili ktenidije mekušaca se sastoje od središnje osi i dva niza škržnih listića, koji su nanizani sa svake strane središnje osi. Listići usmjeravaju strujanje vode i na taj način dolazi do izmjene plinova i izbacivanja nepoželjnih čestica. Mekušci imaju tetraneuralan živčani sustav koji se sastoji od 5-6 pari živčanih ganglija i dva para uzdužnih živčanih vrpci. Gangliji su međusobno povezani živčanim komisurama i konektivama. Kod mekušaca je prisutan proces cefalizacije živčanog sustava te su svi gangliji koncentrirani blizu

okoždrijelnog prstena. Glavonošci imaju najrazvijeniji živčani sustav od svih mekušaca te se on može usporediti s onim kod kralježnjaka. Probavilo mekušaca prilagođeno je njihovom načinu prehrane. Oni mogu biti filtratori, herbivori i karnivori. Njihovo probavilo je izgrađeno od prednjeg (stomodeum), srednjeg (mezenteron) i stražnjeg dijela (proktodeum). Svi mekušci, osim školjkaša, u ustima imaju radularni aparat koji je sastavljen od radule (trenice) i odontofora. Radularni aparat služi za otkidanje i žvakanje hrane. Osnovna tjelesna šupljina je hemocel tj. primarna tjelesna šupljina. Sekundarna tjelesna šupljina, celom, ograničenaje na gonocel i male prostore oko srca i nefridija. Svi mekušci, osim glavonožaca, imaju otvoren optjecajni sustav. Izgrađen je od srca, aorte, krvnih žila, hemocela i hemolimfe. U hemolimfi se nalaze respiratorni pigmenti hemocijanin, hemoglobin ili hemeritrin. Za ekskreciju mekušci imaju složeno građene metanefridije sa nefrostomima i nefridioporima. Pretežno su razdvojena spola i imaju vanjsku oplodnju. Razvijaju se preko ličinke trohofore koja je karakteristična ne samo za mekušce, već i za kolutićavce, štrcaljce, zvjezdane i druge protostomične životinje. Kod puževa, školjkaša i koponožaca trohofora prelazi u odvedeniji ličinački stadij, veliger. Iz ličinke veliger razvija se mladi mekušac nakon što nađe pogodnu podlogu (Habdija i sur., 2011).

1.2. Školjkaši

Razred školjkaši (Bivalvia) su isključivo vodeni organizmi te mogu biti sjedilački ili polusjedilački oblici. Oni naseljavaju morske i slatkovodne ekosustave. Do danas je opisano oko 25 000 vrsta školjkaša. Tijekom evolucije su se specijalizirali na život u vrlo raznolikim staništima. Najveći broj školjkaša živi ukopan u mekanom sedimentu, ali postoje i oni koji su pričvršćeni na podlozi ili žive slobodno u bentalu. Neki buše hodnike u kamenu ili drvetu, a mali broj školjkaša su nametnici i komenzali na drugim beskralježnjacima. Mišićavo stopalo im služi za ukopavanje te im takav život omogućuje zaštitu od grabežljivaca. U stopalu se nalazi i veliki stopalni sinus koji pomaže u zakopavanju. Strujanje vode kroz plaštanu šupljinu je vrlo važno za sve životne aktivnosti školjkaša. Oni iz vode uzimaju kisik i hranjive tvari, a u nju izbacuju ugljikov dioksid, ekskrecijske i izmetne produkte te gamete (Habdija i sur., 2011).

Tijelo školjkaša je bočno spljošteno te je zatvoreno dvodijelnom vapnenačkom ljušturom koja se naziva školjka. Školjku izlučuje plašt, koji potpuno obavija cijelo tijelo školjkaša i zatvara plaštanu šupljinu. Na stražnjoj strani plašt tvori ulazni i izlazni otvor, koji mogu biti produženi u sifo ili tulajicu. Otvaranje i zatvaranje školjke omogućuje antagonističko djelovanje ligamenta i mišića zatvarača. Mogućnost brzog zatvaranja ljuštura je bitna u obrani od grabežljivaca.

Škrge imaju bitnu ulogu u disanju, procjeđivanju vode i sakupljanju hrane. Školjkaši su prema građi škrga podijeljeni na četiri reda: Protobranchia, Filibranchia, Eulamellibranchia i Septibranchia. Predstavnici Protobranchia imaju par jednostavnih trepetljikavih ktenidija u plaštanoj šupljini. Trepetljike stvaraju struju vode i odnose čestice sa škrga. Škrge im služe samo za disanje, a pomoću trepetljikavih pipala uzimaju hranu iz sedimenta. Filibranchia i Eulamellibranchia su evolucijski odvedenije skupine. Oni se hrane procjeđivanjem vode na škrgama i koriste čestice iz struje vode. Ovakav način hranjenja, neovisan o sedimentu, omogućio im je osvajanje novih staništa (epibentos, čvrsti supstrat). Kod njih je došlo do povećanja površine škrga tako što su škržna vlakanca postala duža i brojnija. Vlakna su preklopljena i tvore škržni list ili lamelu pa se ovakve škrge nazivaju listaste. Trepetljike imaju ulogu u razvrstavanju čestica na vlaknima. Predstavnici Septibranchia imaju mišićne pregrade za izmjenu plinova. Oni nemaju lamele za procjeđivanje jer su grabežljivci ili detritivori. Kod školjkaša je došlo do decefalizacije živčanog sustava zbog sjedilačkog načina života te su osjetilni organi raspoređeni svugdje po tijelu. Najveća koncentracija osjetila je na rubu plašta te se tu nalaze mehanoreceptori, kemoreceptori i fotoreceptori. Zbog karakterističnog načina prehrane, školjkaši nemaju radulu niti čeljust. Njihov optjecajni sustav je otvoren. Izmjena plinova se odvija preko škrga, plašta i stopala. Školjkaši su većinom razdvojena spola, ali postoje i dvospolci. Morski školjkaši uglavnom imaju vanjsku oplodnju u slobodnoj vodi, dok se kod slatkovodnih školjkaša oplodnja odvija u plaštanoj šupljini. Iz oplođenog jaja se razvija ličinka trohofora, a zatim slobodnoplivajuća planktonska ličinka veliger. Nakon što se veliger pričvrsti za podlogu, iz nje se razvija mladi školjkaš. Zbog strujanja vode u rijekama i male gustoće vode, kod slatkovodnih školjkaša ne postoji planktonska ličinka, osim kod raznolike trokutnjače (*Dreissena polymorpha*). Stoga se kod njih iz trohofore razvija ličinka glohidija, koja je nametnik na ribama. Glohidija se razvija u mladog školjkaša i pada na dno (Habdija i sur., 2011).

Školjkaši su se prilagodili na razne uvjete staništa. Oni koji žive ukopani u mekanom sedimentu imaju ulaznu i izlaznu cijev tulajice na stražnjoj strani tijela. Pomoću tulajice su povezani sa vodom iznad sedimenta. Neki školjkaši su prešli u epibentička staništa te se mogu pričvrstiti za podlogu pomoću bisusnih niti (npr. *Mytilus, Pinna, Dreissena, Modiolus*) ili cementa (npr. *Ostrea*). Školjkaši koji žive slobodno u bentalu mogu u opasnosti plivati otvaranjem i zatvaranjem školjke te se tako stvara mlazni vodeni pogon (npr. *Pecten*). Postoje i školjkaši koji buše čvrste supstrate (kamen, drvo) te si sami stvaraju životni prostor. Oni stružu kamen ljušturama (npr. *Teredo*), a neki kao dodatnu pomoć koriste kemijske tvari koje

omekšavaju stijene (npr. *Lithophaga*). Manji broj školjkaša su nametnici i komenzali na spužvama, mnogočetinašima, rakovima i bodljikašima (Habdija i sur., 2011).

1.2.1. Školjkaši kao bioindikatorski organizmi

Sesilni bentički organizmi su optimalni bioindikatori zagađenosti morskog okoliša (Leiniö i Lehtonen, 2005). Školjkaši se vrlo često koriste kao organizmi za praćenje utjecaja onečišćenja u vodenom okolišu jer su široko rašireni i brojni u ekosustavima diljem svijeta. Oni ispunjavaju većinu kriterija važnih za dobre bioindikatore: vrlo su brojni, lako se sakupljaju tijekom cijele godine, široko su rasprostranjeni, predstavljaju bitnu kariku u hranidbenom lancu, sedentarni su organizmi, akumuliraju zagađivače, prikladne su veličine za istraživanja, dovoljno su robusni da prežive transport, preživljavaju u bočatim vodama, lako se određuju i imaju ekonomsku veliku važnost (Raspor i sur., 2005).

Zbog njihove velike sposobnosti filtracije vode i sesilnog načina života, oni predstavljaju vremensku i prostornu sliku biološke dostupnosti metala u okolišu. Škrge školjkaša se koriste za istraživanja kratkoročnog onečišćenja metalima. Probavna žlijezda je bitna za metabolizam metala te predstavlja tkivo za dugotrajnu pohranu metala (Hamza-Chaffai i sur., 2000). Brojni školjkaši, poput dagnji, pokazuju odgovor na okolišne uvjete. Zbog svoje sposobnosti bioakumulacije se također koriste za biomonitoring zagađenja u mnogim zemljama. Dagnje se često uzgajaju u kavezima za procjenu kvalitete vode. Uzgoj u kavezima se primjenjuje jer sprječava izmjenu genetičkog materijala između populacija te omogućava kontrolu starosti i spolne zrelosti uzoraka (Pellerin i Amiard, 2009).

Unos metala u školjkaše se odvija putem škrga, probavne žlijezde i površine plašta, ovisno o specijaciji tj. obliku metala (Cossa, 1989; citirano prema Dragun i sur., 2006). Plašt utječe na ukupnu masu dagnje jer se gonade tijekom gametogeneze razvijaju unutar plašta i između folikula probavne žlijezde (Regoli, 1998; citirano prema Dragun i sur., 2006). Probavna žlijezda dagnji predstavlja tkivo sa najvišom razinom MT-a i Cd te se zbog toga često u njoj mjere MT-i kao biomarkeri izloženosti metalima. Međutim, moguće je mjeriti njihovu koncentraciju i u čitavom tkivu dagnji što je brži i jednostavniji proces. Razina MT-a i metala u citosolu se mijenja kao odgovor na okolišne uvjete (Dragun i sur., 2006).

1.2.2. *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819)

Mediteranska dagnja, *Mytilus galloprovincialis*(Slika 1) je vrsta morskog školjkaša koja dominira u Mediteranu, ali živi i u Crnom moru te uz europske obale sjevernog Atlantika (Gardner i sur., 1992). Naseljava kamenitu zonu plime i oseke te uz to osigurava ekološke niše za druge organizme. Ima ljušturu trokutasta oblika, tamno modre do crne boje. Hrani se filtracijom morske vode, u čemu joj pomažu filibranhijalne škrge. Spada u nadred Filibranchia (Habdija i sur., 2011). Za čvrsti supstrat se prihvaća bisusnim nitima. Kod dagnje, kao i kod ostalih školjkaša sa bisusnim nitima, stopalo je svedeno na bisusni kompleks s bisusnim stopalnim žlijezdama. Bisusne žlijezde luče tekući konhiolin u bisusni žlijeb na stopalu, u kojem se izlučeni protein oblikuje u nit (Habdija i sur., 2011). Kao i ostale dagnje, ima agregacijsko ponašanje te se jedinke često mogu naći u nakupinama. Mediteranska dagnja je gonohorist. Kod nje dolazi do razvoja gonada od travnja do lipnja/srpnja, a razdoblje mrijesta je najučestalije u listopadu (Regoli i Orlando, 1994; citirano iz Bocchetti i Regoli, 2006).Na razmnožavanje dagnji utječu egzogeni i endogeni čimbenici. Najvažniji egzogeni čimbenici su temperatura, salinitet, fotoperiod i dostupnost hrane, a endogeni su zalihe hranjivih tvari, hormonalni ciklus i genotip (Bajnoci, 2014).

Ova vrsta je jedna od najvažnijih akvakulturnih vrsta u Europi. Visoko je tolerantna vrsta i može podnijeti široki raspon okolišnih uvjeta. Zbog toga je jedna od najistraživanijih vrsta u području ekotoksikologije. Zbog sjedilačkog načina života, filtracijske prehrane i visokog bioakumulacijskog kapaciteta većine morskih onečišćivača vrlo je prikladna vrsta za dobivanje bioloških izvještaja. Također, ima visok potencijal rasprostranjivanja zbog planktonskih ličinki dugog životnog vijeka (Štambuk i sur., 2013). Ova vrsta ima brojne osobine snažnog kompetitora kao što su brzi rast duž velikog raspona temperature vode, otpornost na isušivanje, parazite i nanose pijeska te ima veliki reproduktivni kapacitet (Hockey i van Erkom Schurink, 1992). Zbog toga je diljem svijeta prisutna kao invazivna vrsta.



Slika 1. Mediteranska dagnja, *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck 1819), foto: Luigi Rignanese http://eol.org/data_objects/13265746

1.2.3. *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771)

Školjkaš raznolika trokutnjača, *Dreissena polymorpha* (Slika 2) je slatkovodna vrsta. Naziv raznolika trokutnjača je dobila zbog svoje ljušture koja ima oblik trokuta izvedenog na različite načine. Njezina školjka je žuto-smeđe do sive boje te je prošarana prugama poput zebre, pa se na engleskom naziva *zebra mussel*. Spada u nadred Eulamellibranchia te diše pomoću listastih trepetljikavih škrga. Njihova velika površina im omogućava laku izmjenu plinova i izdvajanje hranjivih tvari iz vode (Habdija i sur., 2011). Raznolika trokutnjača predstavlja iznimku među slatkovodnim školjkašima, jer se njezin razvojni ciklus odvija preko veliger ličinke, a ne glohidije. Planktonska veliger ličinka je inače karakteristična za morske školjkaše. Pomoću slobodnoplivajuće veliger ličinke, raznolika trokutnjača može se lako raširiti i dominirati u novom prostoru.

Jedna je od najinvazivnijih vrsta na svijetu jer uzrokuje brojne probleme u funkcioniranju vodoopskrbnih i hidroenergetskih objekata. Uvrštena je na listu 100 najgorih svjetskih invazivnih vrsta, prema Global Invasive Species Database (GISD) (Hudina i sur., 2009). Gusto obrasta dno te na taj način mijenja sastav životne zajednice. Ova vrsta se u 19. stoljeću rasprostranila pomoću brodova u mnogim vodotocima središnje i zapadne Europe, a u jezera su je prenijele ptice. Danas stvara velike probleme i u Sjevernoj Americi, gdje se proširila balastnim vodama prekooceanskih brodova. Ima brojne karakteristike koje joj omogućuju veliku prilagodljivost na ekološke uvjete i otpornost na razne promjene u okolišu. Uz pomoć bisusnih niti se pričvršćuje za čvrstu podlogu, poput brodova, dokova i cjevovoda. Također obrasta i druge školjkaše te im na taj način

onemogućava otvaranje ljušture i filtraciju vode. Zbog iznimno velike plodnosti istiskuje autohtone vrste školjkaša i drugih bentičkih organizama (Lajtner, 2005). Filtracijom fitoplanktona i zooplanktona smanjuje dostupnost hrane drugim vrstama te tako utječe na cijeli hranidbeni lanac (Karatayev i sur., 1997).

Redovito se koristi kao indikator onečišćenja slatkovodnih ekosustava te kao bioindikator izloženosti teškim metalima zbog visokih stopa filtracije i visoke sposobnosti bioakumulacije teških metala (Lecoeur i sur., 2004).



Slika 2. Raznolikatrokutnjača, *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771), foto: Biopix http://eol.org/data_objects/19158843

2. Biomonitoring

Akvatični organizmi, poput školjkaša, predstavljaju vrlo značajan izvor kvalitetnih bjelančevina i masnih kiselina te stoga zauzimaju važno mjesto u ljudskoj prehrani. Zbog toga je nužno u njima kontinuirano pratiti prisutnost toksičnih elemenata i drugih onečišćivača kako bi se mogla procijeniti razina rizika za zdravlje ljudi (Srebočan i sur., 2014).

Biomonitoring je istraživački pristup u kojem se detektiraju i kvantificiraju biokemijske interakcije između zagađivača i biološkog odgovora živog organizma. Koncentracije zagađivača koje su potrebne da bi potaknule ovaj odgovor trebaju biti niže od onih koje dovode organizam u životnu opasnost ili izazivaju degradaciju ekosustava (Hamza-Chaffai i sur., 2000). Biomarkeri se preporučuju za biomonitoring jer rano upozoravaju na onečišćenje okoliša i na štetne učinke koje imaju zagađivači na staničnoj razini. Oni su odraz zdravstvenog stanja organizma na staničnoj ili molekularnoj razini te brzo odgovaraju na stres. Stoga imaju velik toksikološki značaj (Erk i sur., 2002). Glavna poteškoća pri korištenju biomarkera u biomonitoringu je njihova interferencija sa okolišnim čimbenicima i zagađenjem. Biomarkeri koji se koriste moraju biti u mogućnosti razlikovati utjecaj okolišnih čimbenika od antropogenog onečišćenja (Hamer i sur., 2008). Potrebno je odrediti bazalne koncentracije biomarkera u istraživanom organizmu kako bi se stres uzrokovan onečišćenjem mogao razlikovati od prirodne varijabilnosti biomarkera (Ivanković i sur., 2003). Prije korištenja biomarkera kao bioloških indikatora kemijskog zagađenja, potrebno je odrediti kako različiti zagađivači utječu na specifični odgovor biomarkera u organizmu (Ivanković i sur., 2010).

3. Metalotioneini (MT-i)

Metalotioneini (MT-i) su niskomolekularni, termostabilni proteini koji vežu metale. Imaju visok sastav cisteina i visok afinitet za vezanje kationa poput Ag, Cd, Cu, Hg i Zn. Oni su sveprisutni kod prokariota i eukariota te su identificirani u mnogim tkivima kod kralješnjaka i beskralješnjaka (Hamza-Chaffai i sur., 2000). Imaju strukturu koja je ostala konzervirana tijekom evolucije (Marie i sur., 2006). Sadrže puno metala, imaju specifičan aminokiselinski sastav (puno cisteina, nema aromatskih aminokiselina niti histidina), jedinstven aminokiselinski slijed i svojstva metalnih tiolata. Oni se nalaze u citosolu te su topljivi u vodi (Raspor i sur., 2004). Glavno mjesto razgradnje MT-a je u probavnoj žlijezdi (Raspor i sur., 2005).

3.1. Funkcija MT-a

MT-i su topljivi stanični ligandi čija je primarna funkcija održavanje homeostaze esencijalnih metala (kao što su Zn i Cu) i detoksifikacija neesencijalnih metala (Cd, Hg i Ag) kod morskih beskralješnjaka (Dragun i sur., 2010). Cu i Zn su potrebni za metaboličke procese proteina, ugljikohidrata i lipida, za staničnu signalizaciju, rast stanica i disanje. Međutim, u visokim koncentracijama mogu biti toksični (Strižak i sur., 2014). MT-i sudjeluju u homeostazi Zn i Cd tako što održavaju intracelularnu koncentraciju ovih iona na niskoj razini te tako što pohranjuju Cu i Zn za kasnije potrebe organizma (Raspor i sur., 2005). Biološka funkcija MT-a uključuje i detoksifikaciju esencijalnih metala unutar stanice (Amiard i sur., 2006). Zahvaljujući ovim funkcijama, organizmi koji žive u okolišu zagađenom metalima su tolerantni na metale.

To su specifični inducibilni proteini. MT-i štite organizme od toksičnosti metala jer imaju visok afinitet za vezanje metala. Na taj način služe kao koristan „surogat“ toksičnim metalima kod vodenih organizama prije nego su organizmi izloženi subletalnim i letalnim koncentracijama (Pavičič i sur., 1987; citirano prema Figueira i sur., 2012). Indukcija MT-a je biokemijski odgovor na izloženost metalima, kao što su Cd, Cu, Zn i Hg (Raspor i sur., 2004). Sa povećanom koncentracijom metala u tkivima dolazi do povećane ekspresije MT-a (Amiard i sur., 2006). Na ekspresiju MT-a utječu i drugi „nemetalni“ zagađivači, poput pesticida pentaklorofenola (PCP-a) (Ivanković i sur., 2010). Nadalje, MT-i su inducirani spojevima koji stvaraju oksidativni stres. Oni prikupljaju oksiradikale i vežu metale te na taj način štite stanicu od oksidativnog stresa (Viarengo i sur., 2000; citirano prema Figueira i sur., 2012). Na primjer, MT-i vežu Zn jer on štiti stanicu od peroksidacije lipida i stabilizira DNA (Figueira i sur., 2012). Pojačana ekspresija MT-a povećava otpornost tkiva i stanica na oksidativni stres. Ovi proteini služe i kao intermedijeri u

imunološkom odgovoru (Viarengo i sur., 2000; citirano prema Marie i sur., 2006). Također, MT-i su biomarkeri hipoosmotskog stresa te pri niskom salinitetu dolazi do njihove smanjene koncentracije, a pri jako sniženom salinitetu se njihova koncentracija povećava (Hamer i sur., 2008).

Međutim, biotički i abiotički faktori dodatno utječu na razinu MT-a (Raspor i sur., 2004). Hormoni, citokini i drugi endogeni faktori potiču biosintezu MT-a. Odgovor MT-a na metale je specifičan za svako tkivo (Raspor i sur., 2004). Pokazano je da bazalne razine MT-a u organizmima variraju ovisno o sezoni, reproduktivnom statusu, temperaturi vode, salinitetu i razini otopljenog kisika (Leiniö i Lehtonen, 2005).

MT-i su jedni od biomarkera onečišćenja morskog okoliša koji se najviše koriste kao biokemijski indikatori izloženosti metalima (Figueira i sur., 2012). Oni predstavljaju rani odgovor organizma na izloženost teškim metalima, na primjer: Cd, Cu, Hg, Ag (Lecoeur i sur., 2004). Zbog njihove biološke reaktivnosti kao odgovor na bioakumulaciju metala, predstavljaju molekularne indikatore zagađenja metalima (Marie i sur., 2006). Međutim, MT-i se kao biomarkeri moraju koristiti sa oprezom. Brojni faktori, poput gladovanja, anoksije, prisutnosti antibiotika, vitamina ili herbicida, mogu doprinijeti varijaciji MT-a (Amiard i sur., 2006). Kod morskih školjkaša zabilježen je utjecaj dostupnosti hrane, reproduktivnog ciklusa i sezonskih faktora na razinu MT-a (Raspor i sur., 2004; Ivanković i sur., 2005). Zbog ovih faktora, razina MT-a se može pogrešno interpretirati kao posljedica antropogenih aktivnosti. Uz koncentraciju MT-a, koncentracija metala koji su se akumulirali u tkivima školjkaša također se može koristiti kao indikator biološke dostupnosti metala u vodi (Sunlu, 2006; citirano prema Dragun i sur., 2010).

Određivanje MT-a kod školjkaša se bazira na njihovoj topljivosti, termostabilnosti i visokom sastavu cisteina (Hamza-Chaffai i sur., 2000). Najčešće metode koje se koriste za kvantifikaciju MT-a su diferencijalna pulsna polarografija i spektrofotometrijska metoda, a baziraju se na određivanju sulfhidrilnih (-SH) skupina (Ivanković i sur., 2003).

3.2. Određivanje MT-a Brdička reakcijom

Za određivanje koncentracije MT-a u toplinski obrađenom citosolu znanstvenici koriste elektrokemijsku metodu koja se zove diferencijalna pulsna voltametrija (DPV). Ovu metodu je prvi opisao češki znanstvenik Rudolf Brdička pa se po njemu naziva Brdička reakcija. Ova metoda se bazira na polarografskom određivanju proteina koji sadrže –SH grupe u otopini kobaltove(III)soli, u kojoj se nalazi amonijačni pufer. Elektrokemijski signal potječe od redukcije

tiolnih skupina (-SH skupina) na cisteinskim ostacima koji se nalaze na MT-ima (Dragun i sur., 2010).

Brdička reakcija se koristi za analizu proteina. Provodi se u otopini amonijačnog pufera i $Co(NH_3)_6Cl_3$, pri diferencijalnom pulsu pomoću živine elektrode (Raspor, 2001). Ova metoda se može primijeniti na određivanje MT-a kod organizama koji su bili izloženi metalima u okolišu. Mjerenje se izvodi na uređaju za voltametriju 797 VA Computrace. Uređaj se sastoji od spremnika za živu, kapilare kroz koju prolazi živa, membrane za živu, igle za Multi Mode elektrodu, Ag/AgCl referentne elektrode sa posudom za elektrolit te protuelektrode od platine. Ovaj uređaj ima Multi Mode elektrodu (MME) koja može kombinirati kapajuću živinu elektrodu (engl. *dropping mercury electrode*, DME/SMDE) i stacionarnu viseću živinu elektrodu (engl. *stationary hanging mercury drop electrode*, HMDE). Stacionarna viseća živina elektroda (HMDE) sadrži živu pomoću koje se provodi cijeli korak s naponom. Živa koja se nalazi u spremniku prolazi kroz staklenu kapilaru, tvoreći kapljicu na kraju kapilare. Tok žive je kontroliran pomoću igle koja se može pneumatski podići ili spustiti. Tlak inertnog plina u spremniku žive pritišće iglu prema gore te omogućava da živa iscuri van. Osim radne živine elektrode, uređaj sadrži referentnu i protuelektrodu (engl. *auxiliary electrode*). Napon radne elektrode je kontroliran pomoću referentne i protuelektrode. Ag/AgCl referentna elektroda sadrži unutrašnji sustav sa elektrolitom KCl čija je koncentracija c(KCl)=3 mol/L. Ova elektroda se nalazi u posudi koja sadrži elektrolit NH_4Cl + NH_4OH. Elektrolit NH_4Cl + NH_4OH služi kao most između referentne elektrode i tekućeg uzorka te se koristi da bi se izbjegla kontaminacija sa Ag^+/Cl^- u uzorku. Elektroda omogućava stabilan i konstantan referentni potencijal, neovisan o kemijskom sastavu različitih uzoraka. Uređaj je povezan sa kompjuterom pomoću 797 VA Computrace Software 1.0, koji može raditi kvalitativne i kvantitativne analize.

3.3. Primjena MT-a kao biomarkera izloženosti metalima *in situ* i *in vitro*

Većina istraživanja koja ispituju upotrebu MT-a kao biokemijskog indikatora onečišćenja metalima provode se u laboratorijskim uvjetima. Istraživanja u laboratoriju su od velikog interesa u toksikologiji, ali je teško uspostaviti uvjete koji vladaju u okolišu. Laboratorijska istraživanja se provode u kontroliranim abiotičkim uvjetima (temperatura, salinitet, razina onečišćivača), a organizmi često nemaju dovoljno hrane (Raspor i sur., 2005). Tu se organizmi kratkotrajno izlažu visokim i nerealnim koncentracijama onečišćivača, često većim nego što su to u prirodi (Hamza-Chaffai i sur., 2000). Vrijeme izlaganja onečišćivačima je kraće u laboratorijskim uvjetima, a način na koji organizmi asimiliraju metale je drugačiji. Stoga je teško ekstrapolirati ove rezultate

na istraživanja provedena na terenu (Cairns, 1992; citirano prema Hamza-Chaffai i sur., 2000). Pri istraživanju *in vitro*, školjkaši se uzimaju iz svojeg prirodnog staništa te se moraju aklimatizirati na nove uvjete u laboratoriju, što za njih može predstavljati veliki stres.

S druge strane, *in situ* istraživanja omogućuju uvid u stanje organizma u određenom prostoru i vremenu. Rezultati ovih istraživanja ukazuju na složene biološke odgovore te je potrebno razumjeti fiziologiju i metabolizam proučavanog organizma (Raspor i sur., 2005). Istraživanja na terenu su potrebna kako bi pružila informacije o odgovoru organizama u prirodnim uvjetima, gdje brojni biotički i abiotički čimbenici utječu na razinu MT-a. Ovi čimbenici mogu maskirati indukciju MT-a uzrokovanu zagađenjem metalima. Istraživanja koja uključuju transplantaciju organizama *in situ* omogućuju kontrolu porijekla populacija i bioloških karakteristika jedinki. Prednost istraživanja na terenu je i to što se organizmi uzgajaju u njihovom prirodnom okolišu te što se mogu koristiti izabrani organizmi iz iste populacije (Hamza-Chaffai i sur., 2000).

3.4. MT-i kao biomarkeri izloženosti metalima u školjkaša

3.4.1. MT-i kao biomarkeri izloženosti metalima u škrgama dagnji

Znanstvenici su pokazali da su škrge pogodno indikatorsko tkivo za mjerenje MT-a kao biomarkera izloženosti metalima kod raznih školjkaša (Bebianno i sur., 1993, Dragun i sur., 2004). Škrge su respiratorni organ i organ za filtriranje morske vode te je stoga u njima najznačajniji odgovor MT-a. Kroz njih se odvija unos metala pošto su direktno izložene vanjskom mediju. Uključene su u pohranu i ekskreciju metala te imaju visok kapacitet za sintezu MT-a (Dragun i sur., 2010). U škrgama dagnji metali se akumuliraju brže u usporedbi sa rastom organa, što dovodi do njihove pohrane u ovom tkivu (Dragun i sur., 2004). Tijekom reproduktivnog ciklusa masa škrga se neznatno mijenja, za razliku od probavne žlijezde čija se masa značajno poveća. One pokazuju najmanju sezonsku varijabilnost, što je još jedna prednost njihova korištenja u istraživanjima.

Dragun i sur. (2004) su koristili škrge dagnje *Mytilius galloprovincialis* kao ciljani organ da bi istražili izloženost dagnja metalima putem MT-a. Istraživanje je provedeno u Kaštelanskom zaljevu u trajanju od jedne godine. Tijekom jedne godine se povećala koncentracija metala u škrgama. U njima je najviše prisutan Zn, zatim Fe, Mn, Cu i Cd. Uočena je sezonska varijabilnost MT-a te je njihova razina povećana na jesen i ljeto. Razina MT-a je najviše povezana sa Zn i Cd. Cd i Zn se unose u otopljenom obliku. Unos Cu, Mn i Fe kroz škrge se odvija u partikularnom

obliku iz okolne vode. Povećana razina MT-a na ljeto je povezana sa razinom Cd. Tijekom ljeta došlo je do povećane akumulacije Zn i Cd u škrgama zbog veće dostupnosti ovih metala u otopljenom stanju, više temperature vode ili zbog veće stope difuzije. To je dovelo do indukcije MT-a. Sastav metala i MT-a je značajno povezan sa masom školjke, koja predstavlja starost dagnje. Stoga sa rastom dagnje dolazi do povećanja sastava metala i MT-a. Škrge također rastu paralelno sa starošću dagnje. Varijabilnost u masi škrga je rezultat različite dostupnosti hrane. Veća dostupnost hrane je posebno izražena u jesen, kada dolazi do resuspenzije sedimenta zbog jakog vjetra i valova. To rezultira većim sastavom suspendiranih čestica u vodenom stupcu. U škrgama dagnji niska razina akumuliranog Cd uzrokuje povećanje MT-a (Dragun i sur., 2004), dok to nije slučaj kod probavne žlijezde (Raspor i sur., 2004).

Međutim, u istraživanju koje je provedeno u jesenskom periodu (Dragun i sur., 2010) pokazano je da postoji puno faktora koji mogu otežati upotrebu škrga dagnje *Mytilius galloprovincialis* kao indikatorskog tkiva za procjenu razine zagađenosti metalima. Naime, sinteza MT-a je povezana sa biotičkim i abiotičkim faktorima, kao što su vrijeme uzorkovanja, ukupna koncentracija citosolnih proteina, veličina dagnje i masa škrga, a ne sa razinom esencijalnih metala (Cu i Zn) u citosolu. Ovo ograničava korištenje škrga kao biomarkera izloženosti niskim koncentracijama metala. Potrebne su više koncentracije Cd da bi potakle sintezu MT-a u škrgama. Stoga je za procjenu zagađenosti morske obale sa niskom koncentracijom metala bolje istražiti koncentraciju metala (Cu i Cd) u toplinski obrađenom citosolu škrga.

3.4.2. MT-i kao biomarkeri izloženosti metalima u probavnoj žlijezdi dagnji

Probavna žlijezda je glavno tkivo za pohranu nutrijenata i metala te zato ima visoku bazalnu razinu MT-a (oko 2 mg g^{-1} mokre mase kod dagnje) (Raspor i sur., 2005). Ona pohranjuje visoke razine Cu i Zn (Geffard i sur., 2001; citirano prema Raspor i sur., 2004). Također, ima značajnu ulogu u intracelularnoj i ekstracelularnoj probavi. Akumulira tvari potrebne za razvoj gonada (glikogen, lipide i proteine) i potiče gametogenezu (Raspor i sur., 2005). Od svih organa, probavna žlijezda ima najviši sastav MT-a. Prema Mediteranskom akcijskom planu (UNEP/MAP, 1999), probavna žlijezda *Mytilus galloprovincialis* je ciljani organ za procjenu izloženosti dagnji teškim metalima putem MT-a.

U Kaštelanskom zaljevu provedeno je istraživanje na dagnjama da bi se utvrdilo je li probavna žlijezda pogodno tkivo za procjenu izloženosti Cd putem MT-a (Raspor i sur., 2004).

Određena je koncentracija metala (Cd, Zn, Cu, Mn i Fe) i MT-a u citosolu kako bi se istražila njihova međusobna povezanost. Cd, Zn i Cu su metali koji potiču sintezu MT-a, a Mn i Fe su esencijalni za metabolizam dagnji. Razina MT-a u probavnoj žlijezdi mediteranske dagnje ovisi o biotičkim i abiotičkim parametrima. Dostupnost hrane i reproduktivni ciklus utječu na vremensku varijabilnost mase probavne žlijezde. Razdoblje sa višom koncentracijom MT-a i metala se preklapa sa razvojem gonada i povećanom dostupnosti hrane. U razdoblju između veljače i lipnja dolazi do povećanja mase probavne žlijezde jer ona služi za intracelularnu i ekstracelularnu probavu te za pohranu nutrijenata. Tada je koncentracija MT-a dva puta viša, a koncentracija metala u tragovima tri puta viša nego u ostalim mjesecima. Veća količina hrane omogućava akumulaciju glikogena, lipida i proteina te potiče gametogenezu. Dostupnost hrane povećava stopu filtracije i prolaz vode kroz škrge, što utječe na unos metala. Bitan izvor metala u probavnoj žlijezdi je fitoplankton jer primarni producenti pokazuju jednu od najviših razina akumulacije metala u hranidbenim lancima. Zbog povećanog izvora hrane, povećava se i koncentracija metala.

Međutim, istovremeno dolazi do razvoja gonada. Prilikom razvoja, folikuli gonade „prodiru“ u probavnu žlijezdu pa utječu na povećanje njene ukupne mase (Regoli i Orlando, 1993; citirano prema Raspor i sur., 2004). Niske koncentracije metala u tragovima u gonadama uzrokuju „biološko razrjeđenje“ metala u probavnoj žlijezdi i nižu koncentraciju MT-a u tom organu. Zato je najviša masa probavne žlijezde zabilježena u travnju, kada je izmjerena i najniža koncentracija MT-a (Raspor i sur., 2004). Sa starošću dolazi do povećanja koncentracije Cd što ukazuje na akumulaciju ovog toksičnog metala u probavnoj žlijezdi dagnji, koje su uzgajane u priobalnoj zoni izloženoj urbanom zagađenju. Probavna žlijezda ima najvišu koncentraciju Zn i Cu jer MT-i imaju visok afinitet vezanja ovih metala. Cd u probavnoj žlijezdi nije dosegao razinu pri kojoj bi uzrokovao dodatnu sintezu MT-a. Bazalna razina MT-a u probavnoj žlijezdi je već visoka zbog visoke koncentracije esencijalnih metala, Zn i Cu, koji potiču sintezu MT-a (Geffard i sur., 2001; citirano prema Raspor i sur., 2004). Ova razina MT-a je dovoljna za detoksifikaciju metala u citosolu (Cd, Zn i Cu) te zato ne dolazi do *de novo* sinteze MT-a. Razvoj gonada i dostupnost hrane više utječu na promjene razine MT-a nego biološki raspoložive koncentracije Cd. Stoga, probavna žlijezda nije pogodna za procjenu izloženosti mediteranske dagnje (*Mytilus galloprovincialis*) subletalnim razinama Cd, unatoč visokoj akumulaciji metala (Raspor i sur., 2004).

Hamza-Chaffai i sur. (2000) su istražili potencijal MT-a kao biomarkera izloženosti metalima (Cd, Cu i Zn) kod morskog školjkaša *Ruditapes decussatus*. Školjkaš je uzgajan *in situ*

na mjestu onečišćenja sa industrijskim ispustima. Na metabolizam metala i MT-a utječe reproduktivna aktivnost, posebno kod ženki školjkaša. Da bi se izbjegao utjecaj ovog biotičkog čimbenika, školjkaši su se uzorkovali u fazi kada nisu bili reproduktivno aktivni. Koncentracije MT-a i metala su određene u probavnoj žlijezdi. Cd i Cu se podjednako nalaze u topljivoj i netopljivoj frakciji, a Zn je većinom prisutan u netopljivoj frakciji. Metali koji se nalaze u topljivoj frakciji se mogu vezati za MT-e ili mogu nespecifično reagirati sa staničnim komponentama (npr. enzimima) te imati toksične učinke. Na lokaciji koja je izložena tvorničkim ispustima sa visokom koncentracijom Cd, Cu i Zn, razina MT-a i metala u tkivu školjkaša se povećala. Na drugoj lokaciji, gdje je ograničena industrijska aktivnost, razina MT-a je ostala niska tj. nije se mijenjala. Rezultati su pokazali da su MT-i značajno povezani sa metalima, a najviše sa Cd. To se slaže sa afinitetom metala za MT-e: Hg > Ag > Cu > Cd > Zn. Da bi MT bio biomarker izloženosti metalima, njegova razina treba pokazivati količinu metala u tkivu školjkaša. Pokazano je da su koncentracije metala u citosolu proporcionalne koncentracijama u čitavoj probavnoj žlijezdi i da postoji velika povezanost između metala i MT-a u citosolu. Istraživanje je pokazalo da do sinteze MT-a dolazi i pri manjim varijacijama u količini metala. MT je efikasan biomarker izloženosti metalima kod školjkaša *Ruditapes decussatus*, što dokazuje snažna korelacija između MT-a i metala (Cd, Cu i Zn).

3.4.3. Upotreba MT-a za procjenu zdravstvenog rizika konzumacije školjkaša

Pellerin i Amiard (2009) su istražili indukciju MT-a kod plave dagnje (*Mytilus edulis*) i pješčanog zijala (*Mya arenaria*) kako bi procijenili zdravstveni rizik konzumenata školjkaša koji su uzgajani u estuariju izloženom otpadnim vodama i metalima. Zbog učestalog prometa brodova, estuarij rijeke St. Lawrence (Quebec, Kanada) zagađen je metalima u tragovima (Pb, Zn, Cu, Cr i Ni). Koncentracija metala i MT-a je određena u probavnoj žlijezdi i citosolu škrga kako bi se ispitala razina zagađenja metalima. Plava dagnja i pješčano zijalo imaju različite sposobnosti filtracije i različitu ekofiziologiju metala pa pokazuju drugačije zagađenje metalima. Plava dagnja ima veću sposobnost bioakumulacije metala, posebno u probavnoj žlijezdi. Dužina reproduktivnog ciklusa, asinkrono ispuštanje gameta i sezonske promjene u dostupnosti hrane imaju utjecaj na težinu organa, a samim time i na koncentraciju metala i MT-a. Povećana koncentracija MT-a u škrgama kod pješčanog zijala, izloženog metalima u tragovima, pokazuje da indukcija MT-a ima ulogu u detoksifikacijskim procesima metala. Najviše koncentracije MT-asu pronađene u probavnoj žlijezdi, u usporedbi sa škrgama i ostalim tkivima. Međutim, niska razina *de novo* sinteze MT-a kao odgovor na izloženost kadmiju smanjuje mogućnost primjene

probavne žlijezde za biomonitoring metala putem MT-a. Unatoč tome, prema Mediteranskom akcijskom planu (UNEP/ RAMOGE, 1999), preporuča se analiza probavne žlijezde. Kod pješčanog zijala Cd i Cu su u probavnoj žlijezdi pronađeni u topivoj frakciji, dok su kod dagnje u škrgama pronađeni u netopivoj frakciji. U probavnoj žlijezdi dagnje pronađeni su također u topivoj frakciji. Ovo pokazuje da ova dva školjkaša imaju različite mehanizme detoksifikacije i indukcije MT-a. Pošto je kod dagnji najveća količina metala pronađena u netopivoj frakciji, manji je rizik za konzumente. Kod pješčanog zijala toksični metali (Cd i Cu) su prisutni u topivoj frakciji u tkivima. Spojevi koji sadrže Cd se smatraju karcinogenima kod ljudi. Stoga su konzumenti ovog školjkaša na istraživanom području izloženi zdravstvenom riziku (Pellerin i Amiard, 2009).

3.4.4. Usporedba MT-a kao biomarkera oksidativnog stresa i stresa uzrokovanog metalima

Figueira i sur. su 2012. istražili i usporedili osjetljivost MT-a na izloženost Cd i vodikovom peroksidu (H_2O_2) kod školjkaša *Cerastoderma edule*. Također, procijenili su broj metalnih iona koji su vezani za MT-e, kada su organizmi izloženi stresu. Cd predstavlja izvor stresa uzrokovanog metalima, a H_2O_2 uzrokuje oksidativni stres. Sinteza MT-a se povećala sa izloženošću školjkaša Cd i H_2O_2. Kod organizama koji su bili izloženi Cd, MT-i su se značajno povećali. U prisutnosti oksidansa (H_2O_2) MT-i su se značajno povećali samo kada je oksidativni stres bio jako velik, a polovica organizama uginula. Ovi rezultati pokazuju da MT-i nisu dobri biomarkeri oksidativnog stresa jer je smrtnost organizama jednostavniji parametar koji ukazuje na stres. Za razliku od H_2O_2, MT-i su se povećali pri bilo kojoj korištenoj koncentraciji Cd te su svi školjkaši preživjeli. Ovo dokazuje da metali induciraju ekspresiju MT-a, čak i kada organizmi nisu izloženi stresu te da se indukcija MT-a povećava sa koncentracijom metala. Stoga, MT-i se mogu koristiti kao jako osjetljiv biomarker izloženosti Cd kod školjkaša *Cerastoderma edule*. U kontrolnim uvjetima, MT-i vežu većinu esencijalnih metala (Zn i Cu) u otopini. U stresnim uvjetima, kao što je izloženost Cd ili H_2O_2, MT-i ne vežu Cu i vežu manje Zn. Kada su organizmi bili izloženi Cd, nije se promijenio ukupan broj vezanih iona metala, u usporedbi sa kontrolom. Međutim, dio iona Zn i svi ioni Cu su zamijenjeni sa ionima Cd (Figueira i sur., 2012). Rezultati pokazuju da su MT-i odlični biomarkeri stresa uzrokovanog metalima, ali ne i oksidativnog stresa.

3.4.5. Mjerenje MT-a u ukupnom tkivu slatkovodnih školjkaša

Osim mjerenja MT-a u škrgama i probavnoj žlijezdi, provode se mjerenja u ukupnom tkivu školjkaša. Lecoeur i sur. (2004) istražili su utjecaj smjese metala (Cd + Cu) i pojedinačnih metala na odgovor MT-a i bioakumulaciju metala kod slatkovodnog školjkaša raznolike trokutnjače, *Dreissena polymorpha*. Jedinke su sakupljene na nezagađenom području i prenesene u laboratorij. U istraživanju se ispitala izloženost smjesi metala, a ne samo pojedinačnom metalu kako bi se dobili uvjeti slični onima u prirodi. Određena je ukupna koncentracija MT-a i metala. Rezultati su pokazali značajno povećanje biosinteze MT-a nakon kratkog vremena izloženosti Cd. Povećanje koncentracije MT-a je povezano sa bioakumulacijom Cd u tkivu školjkaša. Bioakumulacija Cd je ovisna o koncentraciji i trajanju izloženosti metalu. Sa povećanjem koncentracije Cd dolazi do veće akumulacije Cd i veće koncentracije MT-a. Povećana akumulacija Cd pokazuje da ga *Dreissena polymorpha* ne može eliminirati iz tkiva. Međutim, velike količine MT dozvoljavaju školjkašima da koncentriraju puno Cd bez oštećenja. Za razliku od Cd, Cu nije utjecao na ukupnu razinu MT-a te su dagnje pokazale ograničenu bioakumulaciju Cu. Sa svakim povećanjem koncentracije Cu dolazi do nove uspostave ravnoteže Cu u organizmu. Ova ravnoteža ukazuje da školjkaši mogu aktivno uklanjati Cu. Smjesa metala Cd i Cu je samo slabo utjecala na akumulaciju metala i na odgovor MT-a. Oblik MT-a koji se nalazi kod raznolike trokutnjače nije inducibilan putem Cu (Lecoeur i sur., 2004). Ovo ograničava korištenje MT-a kao biomarkera izloženosti teškim metalima u slatkovodnim ekosustavima kod školjkaša *Dreissena polymorpha*. Odgovor Cu je specifičan za svako tkivo te je moguće da se ne uočava prilikom mjerenja MT-a u ukupnom tkivu. Iz tog razloga može doći do manjka indukcije MT-a u prisutnosti Cu.

U istraživanju provedenom 2006. Marie i sur. su usporedili odgovor MT-a kod dva slatkovodna školjkaša, *Corbicula fluminea* i *Dreissena polymorpha*u okolišu onečišćenom metalima (Cd i Zn). Oni zauzimaju različite ekološke niše: *Corbicula fluminea* živi zakopana u gornjem sloju sedimenta, a *Dreissena polymorpha* živi pričvršćena za čvrsti supstrat. Kod raznolike trokutnjače, varijacije u koncentraciji MT-a su snažno povezane sa bioakumulacijom Cd i Zn. Također, ona je pokazala veću akumulaciju metala, posebice Zn. Kod školjkaša *Corbicula fluminea* koncentracije MT-a su povezane samo sa akumulacijom Cd. U kraćem vremenskom razdoblju je došlo do značajnog povećanja koncentracije MT-a zbog akumulacije Cd. Ovaj školjkaš ima efikasne detoksifikacijske mehanizme koji ograničavaju akumulaciju Cd te smanjuju koncentraciju Zn. Ovi detoksifikacijski mehanizmi uključuju izlučivanje metala kroz

staničnu membranu i postojanje povećanog broja transmembranskih proteina. Sposobnost regulacije Zn kod slatkovodnih školjkaša ovisi o vrsti, razini i trajanju izloženosti metalu. *Corbicula fluminea* je pokazala veću osjetljivost odgovora MT-a na onečišćenost metalima.

Ivanković i sur. (2010) su istražili inducibilnost biosinteze MT-a u ukupnom tkivu raznolike trokutnjače, *Dreissena polymorpha* izložene raznim koncentracijama Cd, Cu i PCP (pentaklorofenola). PCP je organski zagađivač tj. pesticid. Istraživanje je provedeno kako bi se procijenila iskoristivost MT-a kao biomarkera izloženosti metalima kod ove vrste. Metali u citosolu više utječu na razinu MT-a, nego netopljivi metali u stanicama. Razina MT-a se povećala sa povećanjem koncentracije Cd, dok pri najvišoj koncentraciji Cd nije došlo do dodatne sinteze MT-a. Moguć razlog je što je ova koncentracija (500 μg/L) toksična i prelazi obrambeni kapacitet stanice te uzrokuje prestanak filtracije. Ovo povećanje MT-a je pratilo povećanje Cd u citosolu. Izloženost povećanim koncentracijama Cd je rezultiralo povećanjem Cd u topljivoj frakciji u tkivu školjkaša. Povećana koncentracija MT-a u tkivu je povezana sa većom akumulacijom Cd u tkivu. Razlog ovakve indukcije MT-a može biti prisutnost slobodnih metala sa prooksidativnim svojstvima (Cu i Cd). Izloženost subletalnim koncentracijama Cu dovela je do promjena u koncentraciji MT-a u tkivu, ali nije pokazana linearna ovisnost MT-a u tkivu sa koncentracijom Cu u vodi. Izloženost povećanim koncentracijama Cu u vodi dovela je do povećane akumulacije Cu u tkivu. Nakon većih koncentracija Cu i Cd, došlo je do smanjenja Zn u citosolu. Do toga je došlo zbog kompetitivne zamjene Zn u molekuli MT-a i njegova transporta u lizosome i jezgru. Remobilizacija Zn u jezgru ukazuje na njegovu važnost u indukciji MT-a. Korištene koncentracije PCP-a nisu uzrokovale sintezu MT-a, moguće jer nije došlo do biotransformacije PCP-a. Veće koncentracije PCP-a su uzrokovale povećane koncentracije Cd i smanjene koncentracije Cu i Zn u citosolu. Mnogi drugi autori su također pokazali da Cd ima veliki potencijal da uzrokuje biosintezu MT-a kod drugih slatkovodnih i morskih školjkaša, a da Cu ima mali potencijal biosinteze MT-a (Lecoeur i sur., 2004, Marie i sur., 2006). Ovi rezultati dokazuju da je MT dobar specifičan biomarker izloženosti kadmiju kod raznolike trokutnjače.

3.5. Polimorfizam MT-a kod mediteranske dagnje, *Mytilus galloprovincialis*

Polimorfizam MT-a je fenomen koji je pronađen kod morskih beskralješnjaka. Različite izoforme MT-a mogu imati fiziološku i zaštitnu funkciju. Do sada su kod dagnji *Mytilus galloprovincialis* i *Mytilus edulis*, koje su izložene povišenim razinama Cd i Hg, pronađena dva oblika MT-a, monomerni i dimerni (Ivanković i sur., 2002).

U probavnoj žlijezdi mediteranskih dagnji koje su bile izložene Cd, kao i onih koje uopće nisu bile izložene metalima, su istraženi višestruki oblici MT-a (Ivanković i sur., 2002). Pronađena su dva različita oblika MT-a koji imaju različite molekularne mase, monomerni (MT-10) i dimerni (MT-20) oblik. Dimerni oblik ima veću sposobnost kompleksiranja metala. Veće razine MT-a su izolirane iz dagnji izloženih Cd, nego iz onih koje uopće nisu bile izložene metalima. U dagnjama koje nisu bile izložene metalima (kontrolne dagnje) prevladava MT-10 oblik, koji sadrži više razine Zn i Cu nego Cd. To je zato jer je MT uključen u homeostazu Zn i Cu. U dagnjama izloženim Cd pronađeno je više MT-20 oblika te je više Cd vezano za dimerni nego za monomerni oblik. Veći udio dimernih oblika ukazuje na izloženost metalima u prirodno živućim populacijama dagnji. Dimerni oblici MT-a nastaju u organizmima oksidacijom zbog izloženosti metalnim ionima u suvišku ili zbog nastajanja S-S mostova tijekom pripreme uzoraka. Najizraženiji dimerni oblik MT-a kod dagnji izloženih Cd je MT-20-I (Ivanković i sur., 2002). Stoga, ovaj oblik MT-a može biti bolji biomarker izloženosti metalima od ukupnog sastava MT-a u probavnoj žlijezdi. Istraživanje potvrđuje postojanost višestrukih oblika MT-a kod dagnji roda *Mytilus* koje su izložene visokim koncentracijama metala u laboratoriju i u okolišu.

3.6. Problemi korištenja MT-a kao biomarkera

Postoji mnogo čimbenika koji mogu utjecati na sastav MT-a te samim time otežati primjenu MT kao biomarkera izloženosti metalima. Povećanje koncentracije metala u tkivu školjkaša nije uvijek razlog povećane sinteze MT-a. Na povećanu sintezu MT-a mogu utjecati i brojni biotički i abiotički čimbenici.

3.6.1. Utjecaj biometričkih parametara na razinu MT-a i metala kod dagnji

Istraživanja su pokazala da biometrički parametri, kao što su masa školjke/ljušture, ukupna masa svježeg tkiva i indeks kondicije, u znatnoj mjeri utječu na razinu MT-a u čitavom organizmu(Dragun i sur., 2006). Promjene ovih parametara uzrokuju varijabilnost MT-a. Zbog toga je teško razlikovati je li povezanost između metala i MT-a odraz indukcije MT-a putem metala ili je odraz akumulacije metala tijekom godina. Ukupno svježe tkivo obuhvaća brojne organe sa različitim biokemijskim funkcijama. Iz ovog razloga se ukupno svježe tkivo dagnje ne smatra pogodnim za mjerenje MT-a kao biomarkera izloženosti metalima. Bolja opcija je izolirati specifično tkivo koje pokazuje nepromjenjivu povezanost između indukcije MT-a i akumulacije metala.

U istraživanju(Dragun i sur., 2006) koje je provedeno u Kaštelanskom zaljevu, u koji se ulijevaju urbane i industrijske otpadne vode, zabilježene su najviše koncentracije Zn u citosolu dagnji. Ostali metali su prisutni u znatno nižim koncentracijama: Fe > Cu > Mn> Cd. Tijekom jedne godine se povećala masa školjke, što ukazuje na starenje dagnji. Varijabilnost mase ukupnog tkiva dagnji nije strogo povezana sa starošću, već na nju utječu razlike u dostupnosti hrane i različite faze reproduktivnog ciklusa (Mourgaud i sur., 2002; citirano prema Dragun i sur., 2006). Na dostupnost hrane mogu utjecati alge koje stvaraju obraštaje na kavezima za uzgajanje dagnji te uzrokuju manju cirkulaciju vode, a samim time i manji dotok hrane. Zbog toga je dugoročno uzgajanje dagnji u kavezima u eutrofičnom području, poput Kaštelanskog zaljeva, nepovoljno.

Metali, a samim time i MT-i su ovisni o biometričkim parametrima. Cd, Fe i Zn su metali koji su ovisni o masi školjke, tj. o starosti dagnje te se akumuliraju proporcionalno sa starošću. Što je dagnja starija to je više metala prisutno u njoj. Na unos metala i njihovu akumulaciju ne utječe samo starost, već i abiotički faktori poput koncentracije metala u vodi, hrani ili sedimentu. Masa ukupnog svježeg tkiva također ima utjecaj na koncentraciju metala kod akvatičnih mekušaca (Boyden, 1974; citirano prema Dragun i sur., 2006). Dragun i sur. (2006) su pokazali da se koncentracija Mn i Fe kod dagnji povećava sa masom ukupnog svježeg tkiva. Brojni metabolički procesi su ovisni o masi tkiva te su povezani sa koncentracijom metala, posebno sa prisutnošću Mn. Ovaj je metal povezan sa prehrambenim i reproduktivnim stanjem dagnji te ima bitnu ulogu tijekom gametogeneze zbog čega je dobar indikator cjelokupnog zdravlja dagnje.

Metali koji potiču sintezu MT-a (Cd, Zn i Cu) ne pokazuju ovisnost o promjeni mase ukupnog svježeg tkiva. Međutim, povećanje mase tkiva dagnji uzrokuje povećanje koncentracije MT-a. Kako je MT protein, na količinu MT-a u tkivu utječu faktori koji potiču metabolizam proteina. To može biti veća dostupnost hrane, koja povećava somatski rast, a samim time i sintezu svih proteina (Mourgaud i sur., 2002; citirano prema Dragun i sur., 2006). Količina MT-a se povećava sa starošću dagnji, a na nju utječe i cjelokupno stanje dagnje. Cd je toksičan metal i uzrokuje sintezu MT-a. Dragun i sur. (2006) su pokazali da se akumulacija Cd odvija istovremeno sa povećanom sintezom MT-a. Poznato je da se akumulacija metala povećava sa sintezom proteina koji vezuju metale, poput MT-a (Dragun i sur., 2006). Akumulacija Cd je posljedica sinteze MT-a koji se induciraju zbog starenja dagnji. Zbog različitih biokemijskih odgovora različitih organa dolazi do slabije povezanosti između Cd i MT-a u ukupnom tkivu dagnji.

3.6.2. Sezonska varijabilnost MT-a

Razumijevanje prirodnih promjena biomarkera je bitno za interpretaciju rezultata na terenu te da se spozna razlika između prirodne varijabilnosti i bioloških onečišćenja. Koncentracije metala u tragovima kod dagnji pokazuju sezonske fluktuacije vezane za reproduktivni ciklus (Bocchetti i Regoli, 2006). Međutim, na razinu MT-a mogu utjecati i drugi okolišni i biološki čimbenici (Ivanković i sur., 2005). Bocchetti i Regoli (2006) su istraživali sezonsku varijabilnost MT-a kod mediteranske dagnje *Mytilus galloprovincialis* u nezagađenom području u Jadranskom moru. Određene su bazalne razine i sezonske fluktuacije MT-a u probavnoj žlijezdi. Tijekom proljeća u sjevernom dijelu Jadranskog mora dolazi do najvećeg razvoja fitoplanktona, posebno dijatomeja koje predstavljaju izvor hrane za dagnje. Mnogi znanstvenici su istraživali MT-e kao biomarkere izloženosti metalima u tkivu mediteranske dagnje, ali su došli do različitih rezultata. Dagnje koje žive u Jadranskom moru su imale više razine MT-a zimi, a niže ljeti (Ivanković i sur., 2005). Viarengo i sur. su 1997. dobili suprotne rezultate (citirano prema Bocchetti i Regoli, 2006). Rezultati ovog istraživanja (Bocchetti i Regoli, 2006) pokazuju da razina MT-a u istraživanju nije značajno varirala tijekom godine dana. Probavna žlijezda je karakteristična zbog povišene bazalne razine MT-a pa ove povišene razine mogu maskirati sezonske varijacije u biološkoj dostupnosti metala. S druge strane, MT-i se ponašaju kao antioksidansi pa razina ovih proteina može varirati u istim okolišnim čimbenicima. Na varijacije antioksidanata kod mediteranske dagnje utječu dostupnost nutrijenata, temperatura i reproduktivni status. Sezonske razlike u temperaturi i dostupnosti hrane variraju duž istočne i zapadne obale Jadranskog mora zbog dubine, morskih struja i prisutnosti rijeka. Ove varijacije utječu na reproduktivni ciklus dagnji, koji nije sinkroni kod različitih populacija. Ovisno o intenzitetu ovih oscilacija, okolišni čimbenici mogu inducirati ili inhibirati antioksidanse. Okolišni čimbenici pokazuju različite oscilacije na različitim područjima. Stoga se različiti podaci mogu dobiti za iste parametre u istraživanim populacijama (Bocchetti i Regoli, 2006).

Ovisno o dostupnosti hrane, reproduktivnom statusu i rastu, fluktuira razina zagađivača i odgovor biomarkera tijekom godine. Zbog toga promjene u razini biomarkera ne moraju biti povezane sa promjenama izloženosti kemijskom zagađenju (Sheehan i Power, 1999; citirano prema Leiniö i Lehtonen, 2005). U priobalnom sjevernom dijelu Baltičkog mora istraživana je sezonsku varijabilnost MT-a kod školjkaša *Mytilus edulis* i *Macoma balthica* (Leiniö i Lehtonen,

2005). *Mytilus edulis* se hrani filtracijom u području litorala, a *Macoma balthica* je detritivor. Zbog različitih staništa ovih dviju vrsta, mjerenjem biomarkera na istom geografskom području može se dobiti točnija slika razine onečišćenja. U Baltičkom moru je izražena sezonska varijabilnost temperature vode, dostupnosti hranjivih tvari i zasićenosti kisikom. MT-i su izmjereni u probavnoj žlijezdi. Razina MT-a nije povezana sa sezonskim promjenama težine probavne žlijezde, nego samo povremeno slijedi sezonske oscilacije u temperaturi mora (Leiniö i Lehtonen, 2005). Također, njihova razina je povezana sa reproduktivnim ciklusom i periodom rasta. Kod ovih školjkaša dolazi do istovremenog razvoja gonada i obilja hrane. Zbog velikih sezonskih razlika u dostupnosti hrane u Baltičkom moru, razvoj gonada kod *Mytilus edulis* i *Macoma balthica* je reguliran više sa dostupnošću hrane nego sa temperaturom mora. Hormonalni status i ostali endogeni faktori induciraju biosintezu MT-a. Stoga, maksimalna razina MT-a odgovara periodu mrijesta kod ovih dvaju školjkaša (od svibnja do lipnja kod *Macoma balthica*, u srpnju kod *Mytilus edulis*), a ne količini metala u okolišu.

Promjene težine također utječu na vremenske i prostorne promjene razine MT-a kod *Mytilus edulis* i *Macoma balthica*. Kod *Macoma balthica* koncentracija MT-a varira ovisno o godišnjem dobu zbog fluktuacija u tjelesnoj masi. Smanjena koncentracija MT-a ljeti je povezana sa višom tjelesnom masom (Bordin i sur., 1997; citirano prema Leiniö i Lehtonen, 2005). Razlike u tipu sedimenta na kojem žive školjkaši (npr. sulfidni mulj, pijesak) također mogu utjecati na koncentraciju i biološku dostupnost metala (Hummel i sur., 1998; citirano prema Leiniö i Lehtonen, 2005) te mogu doprinijeti razini MT-a kod *Macoma balthica*. Sezonske promjene MT-a mogu biti pod utjecajem promjena razine metala tijekom godišnjih doba (Sheehan i Power, 1999). Na istraživanom području Baltičkog mora, gdje nije prisutno visoko onečišćenje, sezonske promjene više utječu na razinu MT-a nego onečišćenje metalima. Izražena sezonska varijabilnost u temperaturi i povećana dostupnost hrane u proljeće, koje reguliraju reproduktivni ciklus školjkaša,objašnjavaju prirodnu varijabilnost biomarkera u Baltičkom moru (Leiniö i Lehtonen, 2005).

Također, Baudrimont i sur. (1997) su pokazali da promjene razine MT-a nisu povezane sa koncentracijom metala u tkivu jer je ona ostala nepromijenjena tijekom godine. Kod slatkovodnog školjkaša *Corbicula fluminea* fluktuacije u razini MT-a koreliraju sa reproduktivnim ciklusom te su povećane tijekom proljeća, kada dolazi do sazrijevanja gonada. Nakon perioda mrijesta dolazi do naglog pada razine MT-a u kolovozu (Baudrimont i sur., 1997; citirano prema Leiniö i Lehtonen, 2005).

4. Zaključak

Zbog brojnih bioindikatorskih karakteristika, školjkaši su danas jedni od najčešćih organizama koji se koriste u istraživanjima MT-a. Indukcija MT-a je biokemijski odgovor na visoke razine metala u okolišu te su metali poput Cd, Cu, Zn i Hg poznati po tome što potiču sintezu ovog proteina. Međutim, brojna istraživanja školjkaša pokazala su mnoge kontradikcije oko indukcije MT-a. Isti metal različito utječe na sintezu MT-a kod različitih vrsta ili različiti metali drugačije utječu na sintezu MT-a kod iste vrste.

Unatoč brojnim istraživanjima koja su provedena u posljednjih nekoliko desetljeća, izbor najpogodnije vrste za biomonitoring i najboljeg organa za određivanje MT-a su predmet brojnih rasprava. Potvrđeno je da probavna žlijezda ima najvišu koncentraciju MT-a, u usporedbi sa ostalim tkivima. Stoga se ona koristi kao ciljani organ za procjenu izloženosti metalima putem MT, kako je predloženo prema Mediteranskom akcijskom planu (UNEP/RAMOGE, 1999). Međutim, niska razina *de novo* sinteze MT-a smanjuje njezinu mogućnost korištenja u biomonitoringu za procjenu izloženosti Cd kod dagnji. S druge strane, kod vrste *Ruditapes decussatus* do sinteze MT-a u probavnoj žlijezdi dolazi i pri niskim koncentracijama metala. Jedan od razloga ovako kontradiktornih rezultata može biti varijacija anatomskih i fizioloških karakteristika organa unutar istih vrsta te između različitih vrsta školjkaša. Stoga je pri korištenju MT-a kao biomarkera vrlo važno odabrati prikladan organ za mjerenje koncentracije ovog proteina. Zbog ovakvih razlika između organa, neki znanstvenici provode mjerenja MT-a u ukupnom tkivu školjkaša, dok neki smatraju da je kao indikator izloženosti metalima bolje koristiti razinu metala u toplinski obrađenom citosolu. Iako su mnoga istraživanja pokazala indukciju MT-a u prisutnosti metala, postoji mnogo čimbenika koji također utječu na njihovu indukciju. Neki od njih su prisutnost antibiotika, vitamina, herbicida, gladovanje i anoksija. Nadalje, sezonske varijacije u temperaturi i dostupnosti hrane, kao i biometrički parametri (poput mase školjke, ukupne mase svježeg tkiva i indeks kondicije) mogu znatno utjecati na koncentraciju MT-a. Ovi čimbenici mogu znatno otežati primjenu MT-a kao biomarkera izloženosti metalima. Također, rezultati istraživanja indukcije MT-a u određenom organu na terenu se razlikuju od rezultata dobivenih u laboratoriju te interpretacija rezultata predstavlja problem. Kako bi se smanjila razlika između populacija istih vrsta provode se eksperimenti premještanja iste populacije školjkaša sa nezagađenog na zagađeno područje istraživanja. Vrijeme uzorkovanja je također vrlo bitno jer reproduktivna aktivnost utječe na metabolizam MT-a te je zato bolje uzorkovati školjkaše kada nisu reproduktivno aktivni.

Za računanje koncentracije MT u tkivima postoje različite metode pomoću kojih se dobiju različiti podaci za istu vrstu. Stoga bi trebalo ujednačiti korištenje metoda u istraživanjima kako bi se lakše mogli usporediti podaci različitih znanstvenika. Sve više istraživanja u današnje vrijeme kombinira kvantifikaciju nekoliko biomarkera, a MT je samo jedan od njih. Tehnike molekularne biologije doprinose otkriću različitih izoformi MT-a te se postavlja pitanje ima li svaka od njih specifičnu ulogu u organizmu. Također, smatram da bi bilo korisno istražiti utjecaj patogenih organizama (bakterija, virusa, nametnika) na akumulaciju metala kod dagnji (Mytilidae) i trokutnjača (Dreissenideae). Istraživanja kod nekih vrsta porodice ladinki (Veneridae) pokazuju da infekcija sa patogenima utječe na povećanu akumulaciju metala (Paul-Pont i sur., 2010). Zaključno, MT ima vrlo bitnu ulogu kao biomarker izloženosti metalima kod školjkaša ukoliko se pravilno koristi u dobro dizajniranim istraživanjima. Posebno je važno obratiti pozornost na odabir organizma, organa te metode za analizu MT-a.

5. Literatura:

Amiard J.-C., Amiard- Triquet C., Barka S., Pellerin J., Rainbow P. S., 2006: Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. Aquatic Toxicology **76**, 160-202.

Bajnoci A., 2014: Učinci organskog unosa kaveznim uzgojem ribe na kondiciju dagnji (*Mytilus galloprovincialis*) u Bistrini. Diplomski rad. Odjel za akvakulturu, Sveučilište u Dubrovniku.

Baršyte D., White K.N., Lovejoy D.A., 1999: Cloning and characterization of metallothionein cDNAs in the mussel *Mytilus edulis* L. digestive gland. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology **122**, 287-296.; citirano prema Raspor i sur., 2005

Baudrimont M., Lemaire-Gony S., Ribeyre F., Métivaud J., Boudou A., 1997: Seasonal variations of metallothionein concentrations in the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology **188**, 361– 367.;citirano prema Leiniö i Lehtonen, 2005

Bebianno M. J., Nott J. A., Langston W. J.: 1993: Cadmium metabolism in the clam *Ruditapes decussata*: The role of metallothioneins, Aquatic Toxicology **27**, 315–334.

Bocchetti R., Regoli F., 2006: Seasonal variability of oxidative biomarkers, lysosomal parameters, metallothioneins and peroxisomal enzymes in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* from Adriatic Sea. Chemosphere **65**, 913-921.

Bordin G., McCourt J., Cordeiro Raposo F., Rodriguez A.R., 1997: Metallothionein-like metalloproteins in the Baltic clam *Macoma balthica*: seasonal variations and induction upon metal exposure. Marine Biology **129**, 453–463.; citirano prema Leiniö i Lehtonen, 2005

Boyden C. R., 1974: Trace element content and body size in mollusks. Nature **251**, 311–314.; citirano prema Dragun i sur., 2006

Cairns J. Jr., 1992: The threshold problem in ecotoxicology. Ecotoxicology **1**, 3–16.; citirano prema Hamza-Chaffai i sur., 2000

Cossa, D., 1989: A review of the use of *Mytilus* spp. as quantitative indicators of cadmium and mercury contamination in coastal waters. Oceanologica Acta **12**, 417–432.; citirano prema Dragun i sur., 2006

Dragun Z., Erk M., Ivanković D., Žaja R., Filipović Marijić V., Raspor B., 2010: Assessment of low-level metal contamination using the Mediterranean mussel gills as the indicator tissue. Environmental Science and Pollution Research **17**, 977-986.

Dragun Z., Raspor B., Erk M., Ivanković D., Pavičić J., 2006: The influence of the biometric parameters on metallothionein and metal level in the heat-treated cytosol of the whole soft tissue of transplanted mussel. Environmental Monitoring and Assesment **114**, 49-64.

Dragun Z., Erk M., Raspor B., Ivanković D., Pavičić J., 2004: Metal and metallothionein level in the heat-treated cytosol of gills oftransplanted mussels *Mytilus galloprovincialis* Lmk. Environment International **30**, 1019-1025.

Erk M., Ivanković D., Raspor B., Pavičić J., 2002: Evaluation of different purification procedures for the electrochemical quantification of mussel metallothioneins. Talanta **57**, 1211-1218.

Figueira E., Branco D., Antunes S.C., Gonçalves F., Freitas R., 2012: Are metallothioneins equally good biomarkers of metal and oxidative stress? Ecotoxicology and Environmental Safety **84**, 185-190.

Gardner J. P. A., 1992: *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) (Bivalvia, Mollusca): the taxonomic status of the Mediterranean mussel. Ophelia **35**, 219–243.

Geffard A., Amiard-Triquet C., Amiard J.-C., Mouneyrac C., 2001: Temporal variations of metallothionein and metal concentrations in the digestive gland of oysters (*Crassostrea gigas*) from a clean and a metal-rich site. Biomarkers **6**, 91–107.; citirano prema Raspor i sur., 2004

Habdija I., Primc Habdija B., Radanović I., Špoljar M., Matoničkin Kepčija R., Vujčić Karlo S., Miliša M., Ostojić A., Sertić Perić M., 2011: Protista-Protozoa i Metazoa- Invertebrata. Strukture i funkcije. Alfa, Zagreb, 216- 279.

Hamer B., Jakšić Ž., Pavičić-Hamer D., Perić L., Medaković D., Ivanković D., Pavičić J., Zilberberg C., Schroderd H.C., Muller W.E.G., Smodlaka N., Batel R., 2008: Effect of hypoosmotic stress by low salinity acclimation of Mediterranean mussels *Mytilus galloprovincialis* on biological parameters used for pollution assessment. Aquatic Toxicology **89**, 137-151.

Hamza-Chaffai A., Amiard J.C., Pellerin J., Joux L., Berthet B., 2000: The potential use of metallothionein in the clam *Ruditapes decussatus* as a biomarker of in situ metal exposure. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C **127**, 185-197.

Hockey C. L., van Erkom Schurink C., 1992: The invasive biology of the mussel *Mytilus galloprovincialis* on the southern African coast. Transactions of the Royal Society of South Africa **48**, 123–139.

Hudina S., Lucić A., Lajtner J., Žganec K., Gottstein S., 2009: Invazivne vrste beskralješnjaka u vodotocima Hrvatske, stručni prikazi. Hrvatske vode **69/70**, 281-285

Hummel H., Magni P., Amiard-Triquet C., Rainglet F., Modderman R., van Duijn Y., Herssevoort M., de Jong J., Snitsevorg L., Ystma M., Bogaards R., de Wolf L., 1998: Influence of the level of oxygenation in sediment and water on copper bioavailability to marine bivalves: laboratory experiments and translocation experiments in the field. Hydrobiologia **373/374**, 297–310. U: Oceans, Rivers and Lakes: Energy and Substance Transfers at Interfaces, Amiard. J. -C., Le Rouzic B., Berthet B., Bertru G. (ur.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht

Ivanković D., Pavičić J., Beatović V., Sauerborn Klobučar R., Klobučar G.I.V., 2010: Inducibility of Metallothionein Biosynthesis in the Whole Soft Tissue of Zebra Mussels *Dreissena polymorpha* Exposed to Cadmium, Copper, and Pentachlorophenol. Environmental Toxicology **25**, 198-211.

Ivanković D., Pavičić J., Erk M., Filipović-Marijić, Raspor B., 2005: Evaluation of the *Mytilus galloprovincialis* Lam. digestive gland metallothionein as a biomarker in a long-term field study: Seasonal and spatial variability. Marine Pollution Bulletin **50**, 1303-1313.

Ivanković D., Pavičić J., Raspor B., Falnoga I., Tušek-Žnidarič M., 2003: Comparison of two SH-based methods for estimation of metallothionein level in the digestive gland of naturally occurring mussels, *Mytilus galloprovincialis*. International Journal of Environmental Analytical Chemistry **83**, 219-231.

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.

Karatayev A.Y., Burlakova L.E., Padilla D.K., 1997: The effects of *Dreissena polymorpha* (Pallas) invasion on aquatic communities in eastern Europe. Journal of Shellfish Research **16**, 187-203.

Lajtner J., 2005: Reproduktivni ciklus školjkaša *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) u rijeci Dravi. Doktorska disertacija. Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

Lecoeur S., Videmann B., Berny Ph., 2004: Evaluation of metallothionein as a biomarker of single and combined Cd/Cu exposure in *Dreissena polymorpha*. Environmental Research **94**, 184-191.

Leiniö S., Lehtonen K.K., 2005: Seasonal variability in biomarkers in the bivalves *Mytilus edulis* and *Macoma balthica* from the northern Baltic Sea. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C **140**, 408-421.

Marie V., Baudrimont M., Boudou A., 2006: Cadmium and zinc bioaccumulation and metallothionein response in two freshwater bivalves (*Corbicula fluminea* and *Dreissena polymorpha*) transplanted along a polymetallic gradient. Chemosphere **65**, 609-617.

Mourgaud Y., Martinez E., Geffard A., Andral B., Stanisiere J.Y., Amiard J.C., 2002: Metallothionein concentration in the mussel *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of response to metal contamination: validation in the field. Biomarkers **7**, 479–490.; citirano prema Dragun i sur., 2006

Paul-Pont I., de Montaudouin X., Gonzalez P., Jude F., Raymond N., Paillard C., Baudrimont M., 2010: Interactive effects of metal contamination and pathogenic organisms on the introduced marine bivalve *Ruditapes philippinarum* in European populations. Environmental Pollution **158**, 3401-3410.

Pavičič J., Škreblin M., Raspor B.,Branica M.,1987: Metal pollution assessment of marine environment by determination of metal-binding proteinin *Mytillus* sp. Marine Chemistry **22**,235–248.; citirano prema Figueira i sur., 2012

Pellerin J., Amiard J.-C., 2009: Comparison of bioaccumulation of metals and induction of metallothioneins in two marine bivalves (*Mytilus edulis* and *Mya arenaria*). Comparative Biochemistry and Physiology, Part C **150**, 186-195.

Rainbow P.S., 2002: Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? Environmental Pollution **120**, 497– 507.

Raspor B., Dragun Z., Erk M., 2005: Examining the suitability of mussel digestive gland to serve as a biomonitoring target organ. Arhiv za higijenu rada i toksikologiju **56**, 139-147.

Raspor B., Dragun Z., Erk M., Ivanković D., Pavičić J., 2004: Is the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* a tissue of choice for estimating cadmium exposure by means of metallothioneins? Science of the Total Environment **333**, 99-108.

Raspor B., 2001: Short communication: Elucidation of the mechanism of the Brdička reaction. Journal of Electroanalytical Chemistry **503**, 159-162.

Raspor B., Pavičić J., Branica M., 1987: Possible biological referencematerial for environmental control analyses—cadmium induced proteins from *Mytilus galloprovincialis*. Fresenius´ Zeitschrift für Analytische Chemie **326**, 719– 22.

Regoli, F., 1998: Trace metals and antioxidant enzymes in gills and digestive gland of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology **34**, 48–63.; citirano prema Dragun i sur., 2006

Regoli F., Orlando E., 1994: Seasonal variation of trace metal concentrations in the digestive gland of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*: comparison between a polluted and a non-polluted site. Archives of Environmental Contamination and Toxicology **27**, 36–43.; citirano prema Bocchetti i Regoli, 2006

Regoli F, Orlando E., 1993: *Mytilus galloprovincialis* as a bioindicator of lead pollution: biological variables and cellular responses. Science of the Total Environment Supplement **2**, 1283–92.; citirano prema Raspor i sur., 2004

Sheehan, D., Power, A., 1999: Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology **123**, 193– 199.;citirano prema Leiniö i Lehtonen, 2005

Srebočan E., Strunjak-Perović I., Lasić D., Opačak A., Knežević D., 2014: Znanstveno mišljenje o prisutnosti žive, olova, kadmija i arsena u akvatičnim organizmima na tržištu Republike Hrvatske, Hrvatska agencija za hranu

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 **470-471**, 159-170

Sunlu U., 2006: Trace metal levels in mussels (*Mytillus galloprovincialis* L. 1758) from Turkish Aegean sea coast. Environmental Monitoring and Assessment **114**, 273-286.; citirano prema Dragun i sur., 2010

Štambuk A., Šrut M., Šatović, Z., Tkalec M., Klobučar G. I. V., 2013: Gene flow vs. pollution pressure: Genetic diversity of *Mytilus galloprovincialis* in eastern Adriatic. Aquatic Toxicology **136–137**, 22–31.

Viarengo, A., Burlando, B., Ceratto, N., Panfoli, I., 2000: Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. Cellular and Molecular Biology **46**, 407–417.; citirano prema Figueira i sur., 2012 i prema Marie i sur., 2006

Viarengo A., Ponzano E., Dondero F., Fabbri R., 1997: A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. Marine Environmental Research **44**, 69–84.; citirano prema Bocchetti i Regoli, 2006

Internetski izvori:

Encyclopedia of Life, http://eol.org/data_objects/13265746, pristupljeno 31. kolovoza 2015.

Encyclopedia of Life, http://eol.org/data_objects/19158843, pristupljeno 31. kolovoza 2015.

6. Sažetak

Organizmi koji žive u morskim, estuarijskim i slatkovodnim ekosustavima često su izloženi antropogenom utjecaju. Među onečišćujućim tvarima, metali imaju posebnu važnost jer nisu biorazgradivi. Školjkaši se hrane filtracijom vode i pri tome akumuliraju visoke razine teških metala pa se koriste kao bioindikatorski organizmi onečišćenja metalima. Izloženost toksičnim metalima za njih predstavlja stres jer se oni vežu za esencijalne biomolekule. Stoga školjkaši razvijaju mnoge detoksikacijske mehanizme kako bi uklonili metale iz blizine bitnih molekula. Jedan od načina je taj da se metali vežu na metalotioneine (MT-e). MT-i su citosolni proteini male molekulske mase, koji su odgovorni za održavanje homeostaze esencijalnih (Zn, Cu) i detoksikaciju toksičnih metala (Cd, Hg, Ag). Ovi metali induciraju sintezu MT-a i vežu se na njega. Pobudna sinteza MT-a predstavlja biomarker izloženosti metalima. MT-i se kao biomarkeri koriste u biomonitoringu jer rano upozoravaju na onečišćenje okoliša i na štetne učinke zagađivača. Unos metala u školjkaše se odvija putem škrga, probavne žlijezde i površine plašta te se stoga u njima mjeri razina MT-a. Međutim, brojni biotički i abiotički parametri mogu utjecati na povećanu sintezu MT-a. Stoga je potrebno razlikovati utjecaj okolišnih čimbenika od antropogenog utjecaja. Također, odgovor MT-a na izloženost metalima ovisi o organizmu, tkivu koje se ispituje i o izoformi MT-a koja se proučava. Primjena MT-a kao biomarkera izloženosti metalima kod školjkaša korisna je u mnogim ekotoksikološkim istraživanjima te je od velikog značaja za procjenu razine zagađenosti vodenih ekosustava.

7. Summary

Organisms that live in marine, estuary and fresh ecosystems are often exposed to anthropogenic influence. Among the pollutants, metals are of major concern because they are not biodegradable. Bivalves are filter-feeding organisms and accumulate high levels of heavy metals. Therefore, they are widely used as bioindicators of metal contamination. Exposure to toxic metals is stressful because metals can bind to essential biomolecules. Therefore, bivalves develop detoxification mechanisms to remove metals from the vicinity of important molecules. This may be achieved by binding metals to metallothioneins (MT-s). MT-s are cytosolic low-molecular weight proteins which are responsible for maintaining homeostasis of essential (Zn, Cu) and detoxification of non-toxic metals (Cd, Hg, Ag). These metals are inducers of MT synthesis and bind on MT. Induction of MT is considered as biomarker of metal exposure. MT-s are used as biomarkers in biomonitoring because they are early-warning indicators of pollution and signal harmful effects of contaminants. The uptake of metals may take place via gills, digestive gland or via the surface of the mantle so level of MT is measured in them. However, many biotic and abiotic factors can influence higher synthesis of MT. Therefore, it is necessary to distinguish between the impact of environment factors and anthropogenic contaminants. Also, MT response to metals depends on the organism, the tissue examined and the MT isoform studied. Applying MT-s in bivalves as biomarkers of metal exposure is useful in many ecotoxicological studies and is of great importance to assess level of contamination in aquatic environment.