

Količina lipofucina i neutralnih masti u probavnoj žlijezdi dagnje *Mytilus Galloprovincialis* izložene benzo(a)pirenu

Matešković, Mauro

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Pula / Sveučilište Jurja Dobrile u Puli**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:137:237377>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-17**



Repository / Repozitorij:

[Digital Repository Juraj Dobrila University of Pula](#)



SVEUČILIŠTE JURJA DOBRILE U PULI
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ ZNANOST O MORU

MAURO MATEŠKOVIĆ

**KOLIČINA LIPOFUSCINA I NEUTRALNIH MASTI
U PROBAVNOJ ŽLIJEZDI DAGNJE *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*
IZLOŽENE BENZO(A)PIRENU**

ZAVRŠNI RAD

Pula, 2019.

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli

Sveučilišni preddiplomski studij Znanost o moru

MAURO MATEŠKOVIĆ

**KOLIČINA LIPOFUSCINA I NEUTRALNIH MASTI
U PROBAVNOJ ŽLIJEZDI DAGNJE *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*
IZLOŽENE BENZO(A)PIRENU**

Završni rad

JMBAG: 0303068438, redoviti student

Studijski smjer: Znanost o moru

Predmet: Biološki učinci zagađivala

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Interdisciplinarno

Znanstvena grana: Znanost o moru

Mentor: doc. dr. sc. Ines Kovačić

Komentor: izv.prof. dr.sc. Maja Fafandžel

Pula, 2019.



IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, dolje potpisani _____, kandidat za prvostupnika Znanosti o moru ovime izjavljujem da je ovaj Završni rad rezultat isključivo mogega vlastitog rada, da se temelji na mojim istraživanjima te da se oslanja na objavljenu literaturu kao što to pokazuju korištene bilješke i bibliografija. Izjavljujem da niti jedan dio Završnog rada nije napisan na nedozvoljen način, odnosno da je prepisan iz kojega necitiranog rada, te da ikoji dio rada krši bilo čija autorska prava. Izjavljujem, također, da nijedan dio rada nije iskorišten za koji drugi rad pri bilo kojoj drugoj visokoškolskoj, znanstvenoj ili radnoj ustanovi.

Student:

U Puli, 2019. godine



IZJAVA

o korištenju autorskog djela

Ja, _____ dajem odobrenje Sveučilištu Jurja Dobrile u Puli, kao nositelju prava iskorištavanja, da moj završni rad pod nazivom "

_____ " koristi na način da gore navedeno autorsko djelo, kao cjeloviti tekst trajno objavi u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice Sveučilišta Jurja Dobrile u Puli te kopira u javnu internetsku bazu završnih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice (stavljanje na raspolaganje javnosti), sve u skladu sa Zakonom o autorskom pravu i drugim srodnim pravima i dobrom akademskom praksom, a radi promicanja otvorenoga, slobodnoga pristupa znanstvenim informacijama.

Za korištenje autorskog djela na gore navedeni način ne potražujem naknadu.

U Puli, 2019. godine

Potpis

Ovaj rad, izrađen u Laboratoriju za morsku ekotoksikologiju Centra za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković u Rovinju, pod voditeljstvom doc. dr. sc. Ines Kovačić, predan je na ocjenu Sveučilišnom preddiplomskom studiju Znanost o moru Sveučilišta Jurja Dobrile u Puli radi stjecanja zvanja prvostupnika (*Baccalaureus*) znanosti o moru.

Voditelj Sveučilišnog preddiplomskog studija Znanost o moru je za mentora završnog rada imenovao doc. dr. sc. Ines Kovačić i za komentoricu izv. prof. dr. sc. Maja Fafandžel.

Mentor: doc. dr. sc. Ines Kovačić

Komentor: izv. prof. dr. sc. Maja Fafandžel

Povjerenstvo za ocjenjivanje i obranu:

doc. dr. sc. Ines Kovačić

izv. prof. dr. sc. Maja Fafandžel

doc. dr. sc. Paolo Paliaga

Datum i mjesto obrane završnog rada: 19. rujna 2019., u 10:00 sati u Centru za istraživanje mora Institut Ruđer Bošković u Rovinju.

Rad je rezultat samostalnog istraživačkog rada.

Mauro Matešković

ZAHVALA

Zahvaljujem se Centru za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković u Rovinju na ustupljenom prostoru i laboratorijskoj opremi.

Zahvaljujem se svim djelatnicima instituta Centra za istraživanje mora koji su podijelili svoje znanje samnom tokom svojeg studija.

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Maji Fafandžel u pomoći pri pisanju i izradi ovog završnog rada.

Posebno bih zahvalio doc. dr. sc. Ines Kovačić na strpljenju, razumijevanju, pomoći, i podršci u pisanju i izvođenju završnog rada.

SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
1.1 Mediteranska dagnja (<i>Mytilus galloprovincialis</i>).....	1
1.2 Lipofuscin	6
1.3 Neutralne masti.....	7
1.4 Sezonska varijabilnost (biomarkera) lipofuscina I neutralnih masti u dagnji <i>M.galloprovincialis</i>	8
1.5 Policiklički aromatski ugljikovodici.....	11
1.6 Benzo(a)piren	12
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	17
3. MATERIJALI I METODE.....	18
3.1. Izlaganje školjkaša	18
3.2. Histokemijska priprema tkiva i mjerenje količine lipofuscina	19
3.3. Histokemijska priprema tkiva i mjerenje količine neutralnih masti.....	20
3.3 Obrada podataka	20
4. REZULTATI	21
4.1. Količina lipofuscina.....	21
4.2. Količina neutralnih masti	23
5. RASPRAVA	25
6. ZAKLJUČAK	29
7. LITERATURA	30
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA	42
9. BASIC DOCUMENTATION CARD	43

1. UVOD

1.1 Mediteranska dagnja (*Mytilus galloprovincialis*)

Morski su ekosustavi pod stalnim pritiskom antropogenih onečišćivala koji potječu iz različitih izvora. Utjecaj tih onečišćivala vidljiv je na svim razinama biološke organizacije: od molekularne do one čitavog organizma, populacije i zajednice. Za praćenje učinaka uzrokovanih ljudskom aktivnošću na vodeni okoliš koristimo biomonitoring. Taj pristup uključuje upotrebu biomarkera i bioindikatorskih vrsta čije nam proučavanje daje podatke o biološkim promjenama u određenom vremenu i prostoru. Beskralješnjaci, posebice školjkaši, su najčešće upotrebljavani kao biološki indikatori zagađenja. Oni zauzimaju vrlo bitnu poziciju u hranidbenoj mreži, njihov dugi životni vijek, široka geografska rasprostranjenost, odgovarajuće dimenzije (veličine i težine), jednostavna identifikacija, prikupljanje i lako održavanje u laboratorijskim uvjetima čini ih idealnim organizmima za praćenje kakvoće mora.

Mediteranska dagnja (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck 1819) koristi se kao test organizam, morski je beskralješnjak koji pripada porodici *Mytilidae*, razreda *Bivalvia* i koljena *Mollusca*. U Jadranskom je moru komercijalno najvažnija vrsta, te postoji još 12 podvrsta. Sedentarni je organizam koji se svojom bisusnom niti pričvršćuje za morsku podlogu koja može biti prirodna (stijene, kamenja, međusobno vezanje više dagnji) ili neprirodna (raznovrsne plutače, konopi, izgrađena pristaništa). (Slika 1.)



1.2 Lipofuscin

Lipofuscin je rezultat oksidacije membranskih lipida i proteina pod utjecajem slobodnih radikala. Ova se molekula ne razgrađuje staničnim enzimima i tijekom vremena se akumulira kao agregat sivo smeđe pigmentiran u dugovječnim stanicama poput miocita i hepatocita. Metali (živa, aluminij, željezo, bakar i/ili cink) prisutni su u granulama lipofuscina, a poznato je da je željezo aktivno uključeno u sintezu lipofuscina pokretanjem reakcije peroksidacije (Brunk i Terman, 2002a). Lipofuscini nastaju unutar lizosoma, gdje su prisutni prijelazni metali i oksidirani lipidni peroksidi u visokim koncentracijama te podvrgnuti Fentonovim reakcijama stvarajući hidroksilne radikale, što naposljetku uzrokuje peroksidaciju lizosomalnog sadržaja (Brunk i sur., 1992). Prisutnost velikih količina unutarstaničnog lipofuscina može biti znak neobičnog oksidativnog stresa ili neispravne detoksifikacije slobodnih radikala u zahvaćenim stanicama. Lipofuscini su autoflorescentni, njihovo otkrivanje u stanicama i fiksiranim tkivima fluorescentnom mikroskopijom prilično je jednostavno (Cho i Hwang, 2011). Za detekciju lipofuscina postoji nekoliko metoda bojanja lipida: Sudan III i ulje crvenom bojom, karbolnim fuksinom (daje brzo kiselinsko obojenje), metil-zelena i reakcija perjodne kiseline-Schiff. Posebice dobro obojenje daje Schmorlova metoda I sa željezo-fericijanidom (Schmorlova reakcija, Moore 1988). Pod pobudnim svjetlom valne duljina u rasponu od 360 do 647 nm, lipofuscini se pojavljuju kao nepravilne granule koje emitiraju žuto-narančastu fluorescenciju između 500 i 640 nm (Slika 5.) (Eldred i sur., 1982; Eldred i Katz, 1988; Sohal i Brunk, 1989; Strehler, 1964).

Tablica 1. Odgovor lipofuscina (LF) i neutralnih masti (NM) na pojedina zagađivala u laboratorijskim (Lab) ili terenskim uvjetima (Ter),

AUTOR	ORGANIZAM	LOKACIJA	ZAGAĐIVALO	KONCENTRACIJE	ODGOVOR
Zorita i sur. (2006)	Plava dagnja <i>M.edulis</i>	Ter	Cu	6,23; 6,88; 17,10; 52,27 µg Cu sm	Povećana akumulacija LF i NM
Moore (1988)	Plava dagnja <i>M.edulis</i>	Lab	PAH i PCB	* 3,0 ± 0,7 ppb PAH * 6,4 ± 1,8 ppb PAH i 0,8 ppb Cu * 31,5 ± 22,3 ppb PAH i 5 ppb Cu * 124,5 ± 65,3 ppb PAH i 20 ppb Cu	Povećana akumulacija LF i NM
Krishnakumar i sur.(1994)	Plava dagnja <i>M.edulis</i>	Ter	PAH , PCB , DDT	40-37490 ng g ⁻¹ 50-500 ng g ⁻¹ 9-29 ng g ⁻¹	Povećana akumulacija LF i NM
Canesi i sur.(2010)	Meditranska dagnja <i>M.galloprovincialis</i>	Lab	Nanočestice: NCB , Fuleren (C ₆₀), TiO ₂ i SiO ₂	0,05–0,2–1–5 mg/L	Povećana akumulacija LF i NM
Martin-Diaz i sur.(2009)	Meditranska dagnja <i>M.galloprovincialis</i>	Lab	Karbamazepin (CBZ)	0, 01 -10 µg/L	Povećana akumulacija LF i NM

Tablica 2. Usporedba koncentracija PAH-ova i B(a)P-a u sedimentima iz različitih morskih priobalnih područja.

Koncentracijski opseg ukupnih PAH-ova i individualnog B(a)P izraženi su u $\mu\text{g kg}^{-1}$ suhe mase				
AUTOR	DRŽAVA	LOKACIJA	PAH/ $\mu\text{g kg}^{-1}$	B(a)P/ $\mu\text{g kg}^{-1}$
Guzella i De Paolis (1994)	ITALIJA	Duž obalno područje Bari-Trst	31-527	<1-28
Cardelicchio i sur.(2007)	ITALIJA	Mar Piccolo,Taranto	380-12750	28-1180
Fattore i sur.(1997) Frignani i sur.(2003)	ITALIJA	Venecijanska laguna	184–201678 315–16474	N.D.
Notar i sur.(2001)	ITALIJA/ SLOVENIJA	Trščanski zaljev	30–600	0,83-53,31
Bihari i sur.(2006)	HRVATSKA	Rovinjsko područje	32–13681	2,06-141

Juretić (2006)	HRVATSKA	Riječki zaljev	53–12532	0,25-41,57
Gogou i sur.(2000)	GRČKA	Kreta	15–159	0,54-6,65
Baumard i sur.(1998)	FRANCUSKA	Obalno područje Toulousea	45–13000	0,049-1607
El Nemr i sur.(2007)	EGIPAT	Obalno područje Egipta	88–6338	0,05-1606
Er-Raioui i sur.(2009)	MAROKO	Obalno područje Maroka	27–254	N.D.
Readman i sur.(2002)	TURSKA	Bosfor,Crno more	14–531	N.D.
Wang i sur.(2007)	KINA	Zaljev Laizhou, Bohai more	105 ± 23	N.D.
Basheer i sur.(2003)	SINGAPUR	Obalno područje	15000–94000	510-1820

Miles i Delfino(1999)	SAD	Florida	50–1086000	58-3170
Simpson i sur.(1998)	KANADA	Kitimat	1169–3576574	N.D.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

1) Utvrditi utjecaj benzo(a)pirena na količinu lipofuscina u probavnoj žlijezdi dagnje

M.galloprovincialis

2) Utvrditi utjecaj benzo(a)pirena na količinu neutralnih masti u probavnoj žlijezdi dagnje *M.galloprovincialis*

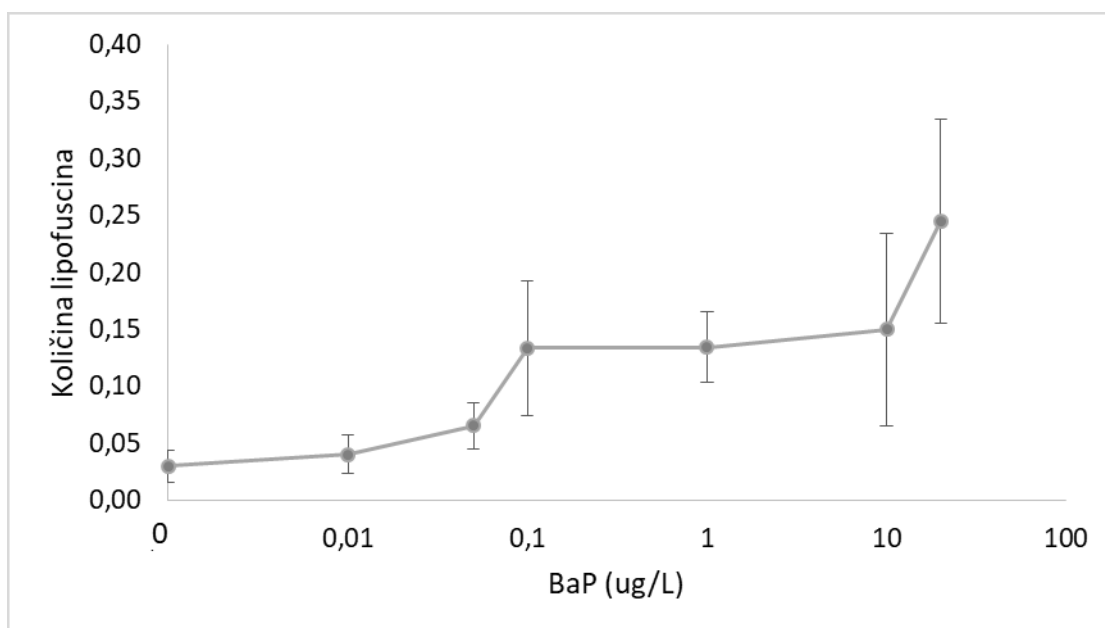
3) Usporediti analizirane parametre u dagnji *M.galloprovincialis* i usporediti ih s podacima iz literature

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Izlaganje školjkaša

Jedinke dagnje (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck 1819) uzete su iz uzgajališta u Limskom kanalu početkom srpnja 2013. godine (Slika 8.). Jedinke su u spremnicima s morskom vodom, prenesene u bazene sa stalnim dotokom morske vode na aklimatizaciju 48h.

Nakon aklimatizacije, jedinke približno iste veličine su prebačene u bazene ispunjene morskom vodom. Po deset jedinki stavljeno je u kontrolni bazen (bez zagađivala i nosioca zagađivala), bazen u kojem je dodavano otapalo (nosilac zagađivala, DMSO) i šest bazena s različitim koncentracijama benzo(a)pirena (0,01, 0,05, 0,1, 1, 10 i 20 µg/L). Dagnje su izlaganje kroz 4 dana. Svaki dan morska se voda s pripadajućom koncentracijom benzo(a)pirena izmjenjivala u isto vrijeme kada je eksperiment postavljen. Nakon 96h od početka eksperimenta, iz školjkaša je izolirano tkivo. Poprečni presjeci probavne žlijezde naglo su smrznuti u N-heksanu, prethodno ohlađenom u tekućem dušiku. Tako obrađeni uzorci pohranjeni su na -80 °C, do pripreme histoloških preparata.



Slika 9. Sadržaj lipofuscina (izražen kao optička gustoća) izmjerene u probavnoj žlijezdi dagnji izloženih benzo(a)pirenu kroz 96 sati.

Tablica 3. Testiranje učinka benzo(a)pirena na količinu lipofuscina. U tablici su prikazane p vrijednosti testa. Kruskal Wallis test ($H=24,96$, $df=6$, $p=0,0003$), a potom Mann-Whitney U testom. Statističke značajne promjene u odnosu na kontrolni uzorak su podebljane.

BaP $\mu\text{g/L}$	0,01	0,05	0,1	1	10	20
Kontrola	0,347	0,028	0,009	0,009	0,009	0,009
0,01		0,075	0,028	0,009	0,028	0,009
0,05			0,047	0,009	0,117	0,009
0,1				0,916	0,916	0,075
1					0,075	0,028
10						0,174

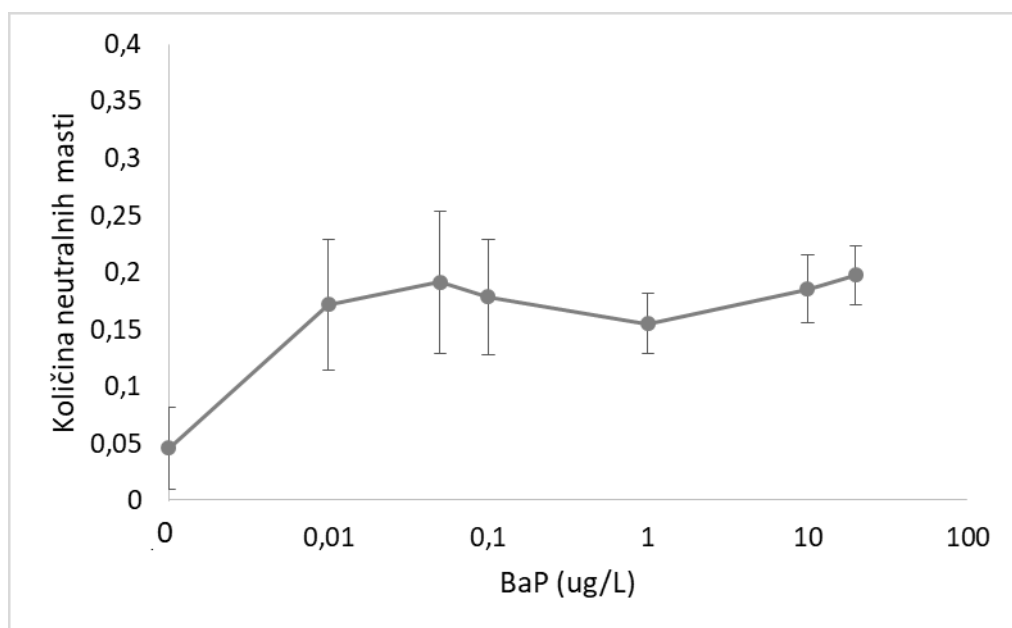
4.2. Količina neutralnih masti

Vrijednosti neutralnih masti u probavnim žlijezdama dagnji prikazane su na Slici 10. Već uz početnu koncentraciju benzo(a)pirena (0-0,01 $\mu\text{g} / \text{L}$) može se uočiti njihov nagli porast sa 0,05 na 0,17.

Minimalni porast količine neutralnih masti (+0,1 optičke gustoće) prikazan je povećanjem koncentracije BaP-a s 0,01 na 0,05 $\mu\text{g} / \text{L}$ nakon čega počinju padati za 0,1 optičke gustoće pri 0,1 $\mu\text{g} / \text{L}$ BaP-a i za dodatnih 0,2 optičke gustoće pri koncentraciji od 1 $\mu\text{g} / \text{L}$ BaP-a.

Posljednje zabilježeni porasti neutralnih masti događaju se pri koncentracijama upotrijebljenog zagađivala od 10 i 20 $\mu\text{g} / \text{L}$ i iznose 0,17 optičke gustoće.

Postoje statistički značajne razlike ($p < 0.05$) između količine neutralnih masti u kontrolnim jedinkama i jedinkama izloženih benzo(a)pirenu različitim koncentracijama BaP-a (0,01; 0,05; 0,5; 1; 10 i 20 $\mu\text{g} / \text{L}$). Statistički značajne razlike su prikazane u Tablici 4.



Slika 10. Prikaz količine neutralnih masti (izraženoj prema optičkoj gustoći) izmjerenih u probavnoj žlijezdi dagnji izloženih benzo(a)pirenu nakon 96 sati.

Tablica 4. Testiranje učinka benzo(a)pirena na količinu neutralnih masti. U tablici su prikazane p vrijednosti testa. Kruskal Wallis test ($H=24,96$, $df=6$, $p=0,0003$), a potom Mann-Whitney U testom. Statističke značajne promjene u odnosu na kontrolni uzorak su podebljane.

BaP $\mu\text{g/L}$	0,01	0,05	0,1	1	10	20
Kontrola	0,016	0,028	0,117	0,009	0,047	0,009
0,01		0,601	0,028	0,464	0,028	0,464
0,05			0,075	0,601	0,174	0,601
0,1				0,047	0,464	0,009
1					0,009	0,075
10						0,009

1992a , 1995, 1998; Johnson i sur., 1998, 1999; Landahl i sur., 1997; Myers i sur., 1994, 1998a, 1998b; Stein i sur., 1992).

U ovom radu dokazali smo da BaP kao predstavnik zagađivala skupine PAH-ova, nakon što uđe u određeni morski okoliš, biva potencijalno opasan za organizme koji taj ekosustav nastanjuju. Zahvaljujući test organizmu porodice mekušaca, dagnji *Mytilus galloprovincialis* bili smo u mogućnosti prikazati sami odgovor dagnje izložene raznim koncentracijama BaPa putem njene probavne žlijezde što je rezultiralo akumulacijom lipofuscina i neutralnih masti u lizosomima. Povećana količina lipofuscina i neutralnih masti u lizosomima dobar su pokazatelj izloženosti organizama PAH-ovima što ih čini dobrim biomarkerima u tom području istraživanja.

6. ZAKLJUČAK

1. Količina lipofuscina u probavnoj žlijezdi mediteranske dagnje (*Mytilus galloprovincialis*) povećava se s povećanjem koncentracije benzo(a)pirena za koncentracije od 0,01 do 0,5 i od 10 do 20 $\mu\text{g} / \text{L}$.

2. Količina neutralnih masti u probavnoj žlijezdi mediteranske dagnje (*Mytilus galloprovincialis*) povećava se s povećanjem koncentracije benzo(a)pirena od 1 do 20 $\mu\text{g} / \text{L}$, s tim da je primijećena stagnacija porasta već pri nižim koncentracijama zagađivala (0,01; 0,05; 0,1 i 1 $\mu\text{g} / \text{L}$)

