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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:137:237377

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Image not found or type unknown *Repository / Repozitorij:*

Digital Repository Juraj Dobrila University of Pula

zir.nsk.hr Image not found or type unknown

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 Fafanđel

Pula, 2019.

IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, dolje potpisani_____, kandidat za prvostupnika Znanosti o moru ovime izjavljujem da je ovaj Završni rad rezultat isključivo mojega 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 (B*accalaureus*) 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 Fafanđel.

Mentor: doc. dr. sc. Ines Kovačić

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

Povjerenstvo za ocjenjivanje i obranu:

doc. dr. sc. Ines Kovačić

izv. prof. dr. sc. Maja Fafanđel

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 Fafanđel 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 (*Mytilus galloprovincialis*).....1
1.2 Lipofuscin.....6
1.3 Neutralne masti.....7
1.4 Sezonska varijabilnost (biomarkera) lipofuscina I neutralnih masti u dagnji *M.galloprovincialis*.....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.

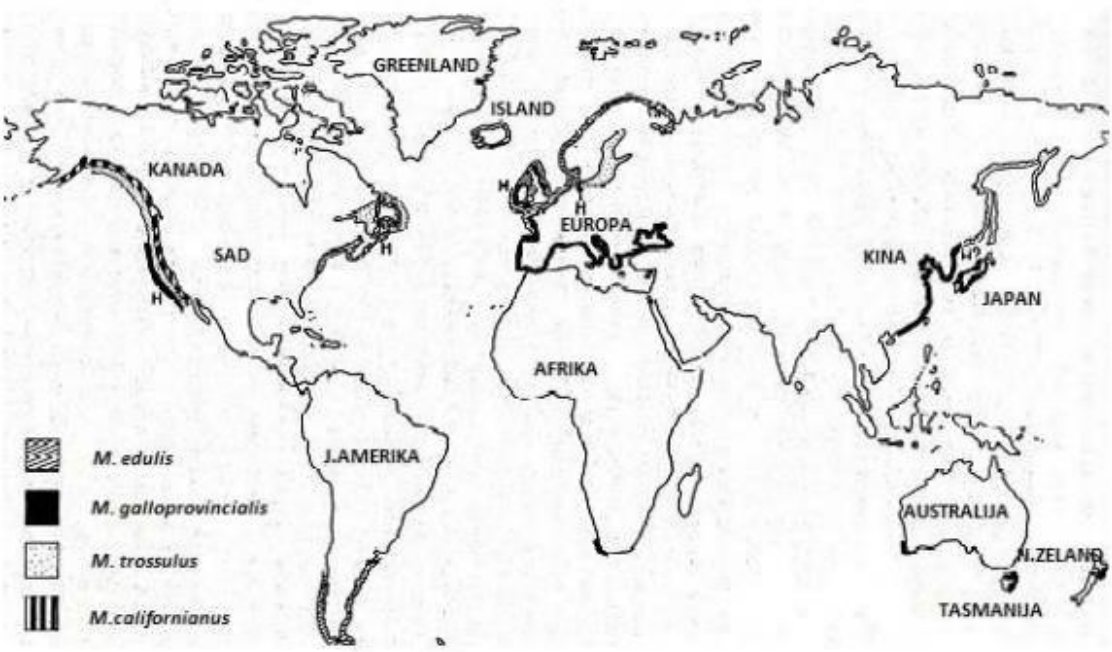
Mediteranska dagnja (*Mytilus galloprovicialis* Lamarck 1819) koristi se kao test organizam, morski je beskralješnjak koji pripada porodici *Mytilidae*, razreda *Bivalvia i* koljena *Mollusca*. U Jadranskom je moru komercijalno najvažnija vrsta, te postoji još 12 podvrsta. Sedentarni je organizam koji 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.)



Slika 1. Vanjski izgled mediteranske dagnje (*Mytilus galloprovincialis*, Lamarck,1819)

(Izvor:http://www.elrincondelmalacologo.com/Web%20fotos%20marinos%20no%20gasteropodos/Mytilidae2.htm)

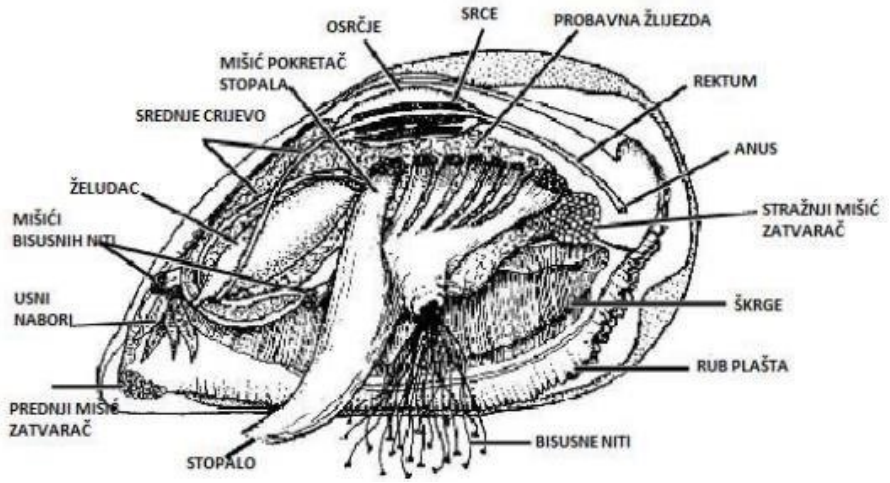
M. galloprovincialis živi na tvrdim podlogama koje se nalaze između intertidalne zone i dubine od 40 metara. Raspon izvornih vrsta nalazi se u Sredozemlju (Barsotti i Meluzzi, 1968.) i istočnom Atlantiku: od Irske i Ujedinjenog Kraljevstva (Gosling, 1992.) do sjeverne Afrike (Comesana i sur., 1998.). Ova vrsta se nalazi i na pacifičkoj obali Sjeverne Amerike (McDonald i Koehn, 1988.), Japanu (Wilkins i sur., 1983.), Hong Kongu (Lee i Morton, 1985.), Južnoj Africi (Grant i Cherry, 1985), Čile (Hilbish i sur., 2000; Gérard i sur., 2008) i Australija (Hilbish i sur., 2000; Gérard i sur., 2008). Širenje ove vrste u područja Atlantika je vjerojatno prirodna pojava, dok u ostale navedene krajeve je nesumnjivo posljedica ljudskih aktivnosti. Povijesni dovodi vjerojatno su bili slučajni, ali ova vrsta se aktivno uzgaja pa će akvakultura biti i izvor sekundarnih dovoda vrste (Wonham, 2004) (Slika 2).



Slika 2. Karta rasprostranjenosti vrsta *Mytilus: Mytilus edulis (M.edulis), Mytilus galloprovincialis (M.galloprovincialis), Mytilus trossulus* (*M.trossulus*) i *Mytilus californianus (M.californianus)* u svijetu. (Prilagođeno prema Gosling, 1992)

Vanjska građa školjke mediteranske dagnje je trokutastog, izduženog jajolikog oblika. Ljušture su jednake te spojene sa leđne strane pomoću elastičnog ligamenta. Za njihovo otvaranje i zatvaranje zadužen je mišić zatvarač, odnosno njegovo otpuštanje (otvaranje ljušture) ili kontrakcija (zatvaranje ljušture). Unutrašnjost dagnje obavija plašt koji se sastoji od dva nabora: lijevog i desnog. Ovi nabori su međusobno srasli u području ispod zgloba do regije usta, odakle se slobodno pružaju dalje pokrivajući tijelo svaki sa svoje strane i zatvarajući na taj način plaštenu šupljinu. Ispod plašta nalazi se visceralna masa (koju čine srce,probavni sustav i gonade) a iznad visceralne mase nalaze se škrge. Iza prednjeg mišića zatvarača, na spoju lijevog i desnog para usnih nabora smješten je usni otvor, omeđen s dva para (desnih i lijevih) usnih palpa, na koje se nastavlja par (lijevih i desnih) rešetkastih škrga. One se protežu prema stražnjem dijelu tijela do mjesta spajanja unutarnjih površina plaštanih nabora. Slobodni rubovi škrga spojeni su s unutarnjom površinom plašta, dok su obje škrge u srednjoj liniji međusobno spojene formirajući na taj način

kompletnu pregradu kroz plaštenu šupljinu i dijeleći je na veću inhalantnu i manju ekshalantnu komoru. Dagnje posjeduju stopalo različitih oblika te ga njegovi mišići uvlače i izvlače između ljuštura (Slika 3.). Unutar stopala nalaze se mnogobrojne žlijezde koje izlučuju sluz koja se u vodi skrutne u čvrsta vlakna zvanih bisusne niti koje joj služe za pričvršćivanje za podlogu.

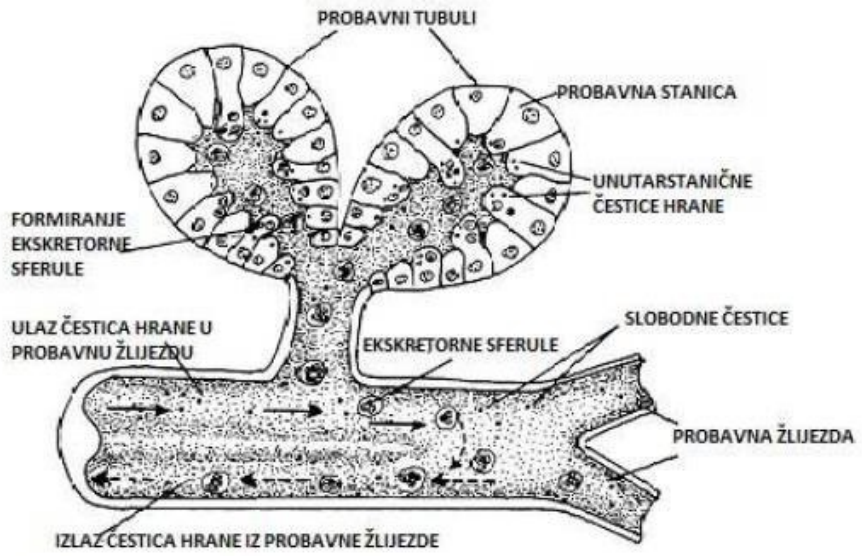


Slika 3. Anatomska građa dagnje. (Ivošević, 2013)

Ishrana dagnje odvija se filtracijom morske vode pomoću škrga, istim organom zaslužnim i za disanje. Školjkaši koriste mukocilijarne mehanizme na škrgama i parnom organu - usnim naborima za filtraciju i ingestiju suspendiranih tvari koje uključuju fitoplankton, bakterije, detritus, mikrozooplankton i anorganske tvari iz morske vode (Bayne i Newell, 1983; Griffiths i Griffiths, 1987;Jørgensen, 1991; Jones i sur., 1990; Gavrilović, 2011).

Intenzitet filtracije (pumpanja) definira se kao volumen vode koja u jedinici vremena prođe kroz škrge, dok intenzitet pročišćavanja (eng. "clearance rate") predstavlja onaj volumen vode iz kojeg su u potpunosti izdvojene suspendirane čestice u jedinici vremena. Na filtracijsku sposobnost školjkaša utječu brojni čimbenici kao što su: vrsta i veličina jedinke, koncentracija i sastav partikularne tvari, temperatura, slanost,

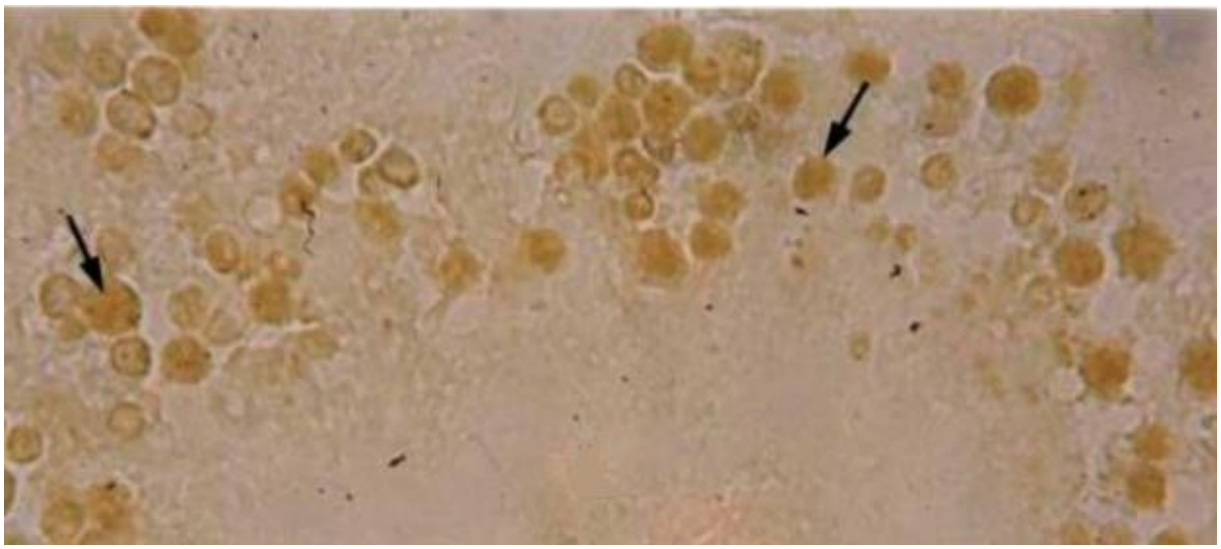
koncentracija otopljenog kisika, pH, brzina strujanja vode, godišnje doba, zemljopisno područje, način uzgoja i slično. Hrana koja je dospjela u usta, ulazi u probavni sustav koji se sastoji od usta, jednjaka, želuca, probavne žlijezde, crijeva i analnog otvora (Gosling, 1992). Glavno mjesto unutarstanične probave jest probavna žlijezda (Slika 4.). Ovaj se organ sastoji od brojnih slijepih tubula koji sa želucem komuniciraju sustavom kanala. Probavni su tubuli sastavljeni od dviju vrsta stanica: probavnih i bazofilnih. Probavne su stanice najzastupljenije u tubularnom epitelu i odgovorne su za unutarstaničnu probavu. Čestice hrane, dospjele u lumen tubula, unose se preko mikrovila u probavne stanice pinocitozom i skladište u velikim vezikulama koje se nazivaju fagozomi. Probava se odvija u vezikulama lizosomalnog sustava koje sadrže hidrolitičke enzime. Probavljeni sadržaj koji se nalazi unutar hranidbenih vakuola u probavnim stanicama tubula izravno se ispušta u okolni hemocel, a potom ga probavljaju hemociti. U dugačkim crijevima još uvijek se obavlja probava jednog dijela hrane, resorpcija i konsolidacija probavljene hrane. Neprobavljene i nereapsorbirane čestice (feces) se miješaju sa sluzi i pri tome se stvara kruti (peletasti) sadržaj koji biva izbačen (Gavrilović, Osnovne morfološke značajke školjkaša, interna skripta).



Slika 4. Probavna žlijezda dagnje (Ivošević 2013)

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).

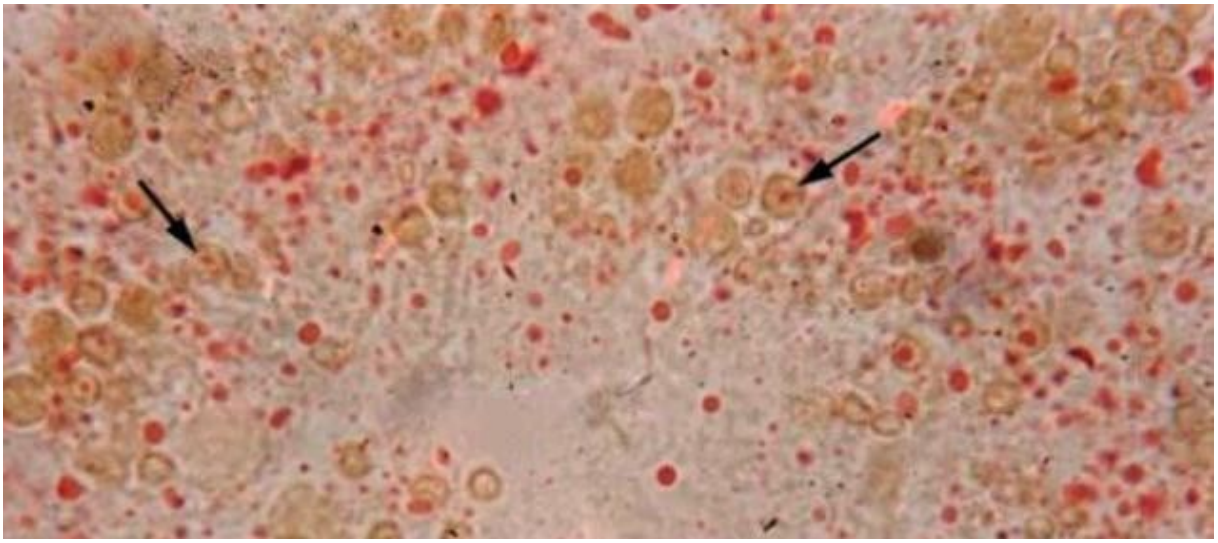


Slika 5. Granule lipofuscina i njegova akumulacija u lizosomima (strelice) probavne žlijezde mediteranske dagnje (*Mytilus galloprovincialis*) (Dimitriadis i sur., 2003)

1.3 Neutralne masti

Neutralne masti su molekule koje čine tri masne kiseline povezane esterskom vezom s glicerolom. Triacilgliceroli su točan kemijski naziv, ali poznatiji su pod nazivom trigliceridi. Trigliceridi su glavni sastojak životinjske prehrane kao i tjelesnih masnih zaliha. Lipaze ih hidroliziraju u masne kiseline i monogliceride. Glavna mjesta sinteze endogenih triglicerida su jetra i masno tkivo. U normalnim okolnostima, triglicerid se izlučuje iz probavne žlijezde u lipoproteinskim česticama vrlo niske gustoće. U određenim patološkim stanjima trigliceridi se nakupljaju u hepatocitima što dovodi do jetrene steatoze. Masne kiseline se mobiliziraju iz triglicerida iz masnog tkiva djelovanjem hormonski osjetljive lipaze koja se aktivira glukagonom i adrenalinom (epinefrin), dok se inzulinom inhibira. Trigliceridi se mogu mjeriti korištenjem enzimskih reagensa, uključujući lipazu, glicerol-kinazu i glicerol-3-fosfat oksidazu koje su povezane sa sustavom detekcije peroksidaze i kromogena (Evans, 2009). Metoda koja se najčešće koristi za detekciju i analizu neutralnih lipida jest bojanje lizokromom, odnosno bojom topivom u mastima poznatijom pod nazivom *Oil red O*

(ORO). Akumulacija neutralnih masti u stanici, kao odgovor na organsko zagađivalo, također je prikazano u terenskim istraživanjima: povećanje obojenja *Oil reda O* (ORO) u stanicama probavne žlijezde su povezane s povećanjem razine onečišćenja PAH-om i PCB-om (Moore,1988, Krishnakumar i sur.,1994).



Slika 6. Histokemijski obojene neutralne masti (crveno obojenje) akumulirane u lizosomima (strelice) probavne žlijezde mediteranske dagnje (*Mytilus galloprovincialis*) (Dimitriadis i sur., 2003)

1.4 Sezonska varijabilnost (biomarkera) lipofuscina I neutralnih masti u dagnji *M.galloprovincialis*

Unatoč korisnosti biomarkera, sezonske vremenske varijacije temperature, saliniteta, klorofila (a), količine otopljenog kisika, promjene u pH te ostalih biotskih i abiotskih čimbenika koji se odvijaju u moru mogu zakomplicirati kvantifikaciju i interpretaciju dobivenih podataka.

Proljetni fitoplaktonski cvat uglavnom je karakteriziran dijatomejama (Totti i sur., 2002) koje povećavaju dostupnost hrane za dagnje.Povećanje dostupnosti hrane uvjetuje povećanom intenzitetu hranjenja školjkaša, kao posljedica dolazi do

oksidativnih promjena i veće metaboličke aktivnosti i/ili unos antioksidansa u prehrani (Regoli i sur., 2002b). Varijacije antioksidanata tijekom ljetnog perioda, kada je dostupnost hrane mala, može prikazati reakcije na prirodni oksidantni učinak uzrokovan zbog jačeg sunčevog zračenja i viših temperatura morske vode koji su putem izravnih i neizravnih mehanizama poznati za modulaciju stvaranja kisika i metabolizma (Downs i sur., 2002; Regoli i sur., 2004a).

Mjerenja neutralnih masti i lipofuscina u sjevernom Jadranu (Petrović i sur., 2004) pokazuju slične sezonske varijacije s najvišim vrijednostima zabilježenim u kasno proljeće i tijekom ljetnih mjeseci kao što je zabilježeno i za ostale populacije *M. galloprovincialis* (Regoli, 1992 .; Domouhtsidou i Dimitriadis, 2001).

Prijašnja ispitivanja (Petrović i sur., 2004; Koukouzika i sur., 2009) ovih bioloških indikatora ukazuju da je u rano ljeto (krajem svibnja, početak lipnja) bilo ograničenih koncentracija lipofuscina i umjerenih količina lipida. U periodu rane zime (krajem studenog, početak prosinca) koncentracije lipofuscina bile su visoke a koncentracije neutralnih masti ograničene,međutim, u rano je proljeće (krajem ožujka, početak travnja) razina lipofuscina povišena a neutralnih masti viša nego zimi. Ova snažna sezonalnost sugerira da rana zima i proljeće nisu primjerena razdoblja za uzorkovanje i biomonitoring (Koukouzika i sur.,2009). Akumulacija lipofuscina predstavlja jedan generalni odgovor na zagađenje (Viarengo i sur., 1990; Regoli, 1992), dok je akumulacija neutralnih masti strože povezana s organskim i kemijskim zagađivalima (Moore, 1988 .; Lowe i Clarke, 1989; Cajaraville, 1991; Domouhtsidou i Dimitriadis, 2001).

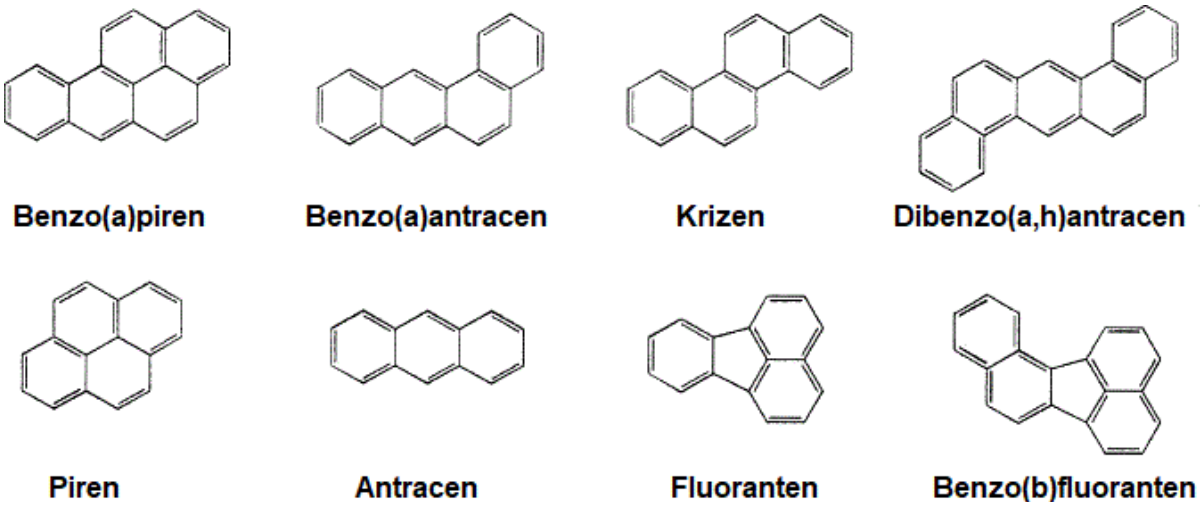
Tablica 1. Odgovor lipofuscina (LF) i neutralnih masti (NM) na pojedina zagađivala u laboratorijskim (Lab) ili terenskim uvjetima (Ter),

AUTOR	ORGANIZAM	LOKACIJA	ZAGAĐIVALO	KONCENTRACIJE	ODGOVOR
Zorita i sur. (2006)	Plava dagnja *M.edulis*	Ter	Cu	6,23; 6,88; 17,10; 52,27 µg Cu sm	Povećana akumulacija LF i NM
Moore (1988)	Plava dagnja *M.edulis*	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 *M.edulis*	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)	Mediteranska dagnja *M.galloprovincialis*	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)	Mediteranska dagnja *M.galloprovincialis*	Lab	Karbamazepin (CBZ)	0, 01 -10 µg/L	Povećana akumulacija LF i NM

1.5 Policiklički aromatski ugljikovodici

Policiklički aromatski ugljikovodici (PAH) nastaju kao posljedica nepotpunog izgaranja drva, duhana i drugih izvora goriva sastavljenih od ugljičnih spojeva. Njihova se struktura sastoji od dva ili više kondenziranih aromatskih prstena. Na temelju rasporeda prstena možemo ih podijeliti na linearne, angularne i klasterske. PAH-ovi se sastoje od dva ili više prstena benzena koji dijele dva ili više atoma ugljika. Prstenaste strukture međusobno su povezane tako da imaju zajedničke stranice prstena, stoga se kaže da imaju kondenzirane šesteročlane prstene (Vančik, 2012). PAH-ovi su zagađivala koji se zadržavaju u okolišu zbog svoje kemijske stabilnosti i inertnosti. Većina ih je pri sobnoj temperaturi u stanju krutine, tlak para im je nizak, a temperature tališta i vrelišta su visoke (Jakovljević i Žužul, 2011). Zbog njihove slabe topljivosti i velike hidrofobnosti brzo se vežu s ostalim organskim i anorganskim česticama u tlu što je razlog njihove veće prisutnosti u tlu (95%) nego u zraku (0,2%) (Bihari i sur., 2006;Khillare i sur., 2013). Hidrofobnost PAH-ova raste s porastom broja prstena (Dučić,2017). Prstenasti spojevi poput PAH-ova također pokazuju i veću stabilnost od ravnolančastih konjugiranih alkena s istim brojem C–atoma (Vančik, 2012). Do ljudi PAH-ovi dospijevaju najčešće putem hrane, bilo dugogodišnjim akumuliranjem u vodenim organizmima, kontaminacijom plodnog tla ili pak prženjem, pečenjem ili dimljenjem hrane (Jakovljević i Žužul, 2011). PAH-ovi u okolišu mogu poticati iz prirodnih izvora, poput šumskih požara i erupcija vulkana, međutim, njihova prisutnost u prirodi uglavnom je posljedica antropogenih aktivnosti poput elektrana na izgaranje ugljena, brodskih aktivnosti, odlagališta otpada, te se koriste u industriji za proizvodnju plastike (sagorijevanje), pesticida i bojila.

Platforme za ekstrakciju nafte smještene po morima i oceanima ispuštaju PAH-ove u atmosferu u procesima proizvodnje. Nusprodukti izgaranja onečišćuju i zagađuju morska staništa putem oborina i vodotoka ili se talože iz atmosfere u oceanske površinske vode.



Slika 7. Molekularna struktura najznačajnijih PAH-ova (Phillips, 1999)

1.6 Benzo(a)piren

Benzo(a)piren (B(a)P) je policiklički aromatski ugljikovodik (PAH) i rezultat je nepotpunog izgaranja organske tvari pri temperaturama između 300 i 600 °C, klasificiran je kao moćan kancerogen i/ili mutagen. B(a)P u školjkama već je dokumentiran kako *in vitro* (Martinez i Livingstone, 1995) tako i *in vivo* (Michel i sur., 1995) i potvrđuje proizvodnju B(a)P-diola, kinona i fenola. Njegovi diol epoksid metaboliti reagiraju i vežu se na DNA, rezultirajući mutacijama i na kraju karcinomom. B(a)P-ove subletalne količine obično se nalaze u morskim sustavima, posebice nakon izlijeva nafte u more. Određivanje aktivnosti benzo(a)piren hidroksilaze (BPH) koristi se kao biomarker izloženosti PAH-ova u školjkama (Narbonne i sur., 1999; Akcha i sur., 2000; Sole i Livingstone, 2005).

Utjecaj benzo(a)pirena na morske organizme je tema mnogih istraživanja koja se bave morskom toksikologijom i ekotoksikologijom (Zahn i sur., 1982; Hawkins i sur., 1988; Lemaire-Gony i sur., 1995; Camus i sur., 2002; Gopalakrishnan i sur., 2009; Palanikumar i sur., 2012), kao primjer su reakcije biotransformacije i detoksikacije na akutno izlaganje BaP-a u jetri orade (*Sparus aurata*) (Banni i sur., 2008) i brancina (*Dicentrarchus labrax*) (Gravato i Guilhermino, 2009). Izmjereni su sljedeći biološki

odgovori: aktivnost etoksiresorufin-O-deetilaze (EROD), aktivnost jetrene glutation-transferaze (GST) te oštećenje DNA. Prisutnost BaP-a u stanicama jetre orade i brancina potakla je nagli porast aktivnosti enzima EROD i GST nakon 48 sati. Genotoksična priroda benzo(a)pirena je također pokazana nastalim oštećenjima jetrene DNA koje se povećavaju s vremenskom izloženošću organizma. Pri takvim oštećenjima je moguće i pucanje same zavojnice koja vodi ili do stanične smrti ili do transformacije radi mutacije somatskih stanica (Banni i sur., 2017, Gravato i sur., 2009). Rezultati sugeriraju da pri koncentraciji BaP-a jednakoj ili većoj od 8 µg/L kapacitet detoksikacije opada, dolazi do nakupljanja jetrenih BaP metabolita koji uzrokuju peroksidaciju lipida, što utječe na rast i indeks kondicije ribe (Gravato i sur., 2009).

Analogno je pokazano da BaP ima genotoksične učinke na jetrene stanice pacifičke kamenice (*Crassostrea gigas*) *,* izmjereno oksidativnim oštećenjima DNA, tj. pucanjem lanaca molekula DNA (Wessel i sur., 2007).

U slatkovodnoj japanskoj ribi *Oryzias latipes* i ribi zvanoj gupi iz porodice živorotki (*Poecilia reticulata*) primjećeno je da pri velikim koncentracija BaP-a u morskoj vodi mogu ugrađivat BaP u biosintetske reakcije i metabolizirati njegove kancerogene intermedijere koji tako potiču nastanak jetrenih tumora, moguće je da tu sposobnost posjeduju i neke ostale vrsta riba. (Hawkings i sur., 1988).

U mediteranskoj dagnji (*Mytilus galloprovincialis*), uz povećanu akumulaciju lipofuscina u lizosomima probavne žlijezde, pri izlaganju organizma velikim koncentracijama benzo(a)pirena uočeno je da također dolazi do značajnog oštećenja DNA u stanicama probavne žlijezde (Banni i sur., 2017).

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 μg kg^{-1} suhe mase				
AUTOR	**DRŽAVA**	**LOKACIJA**	**PAH/ μg kg^{-1}**	**B(a)P/ μg 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*

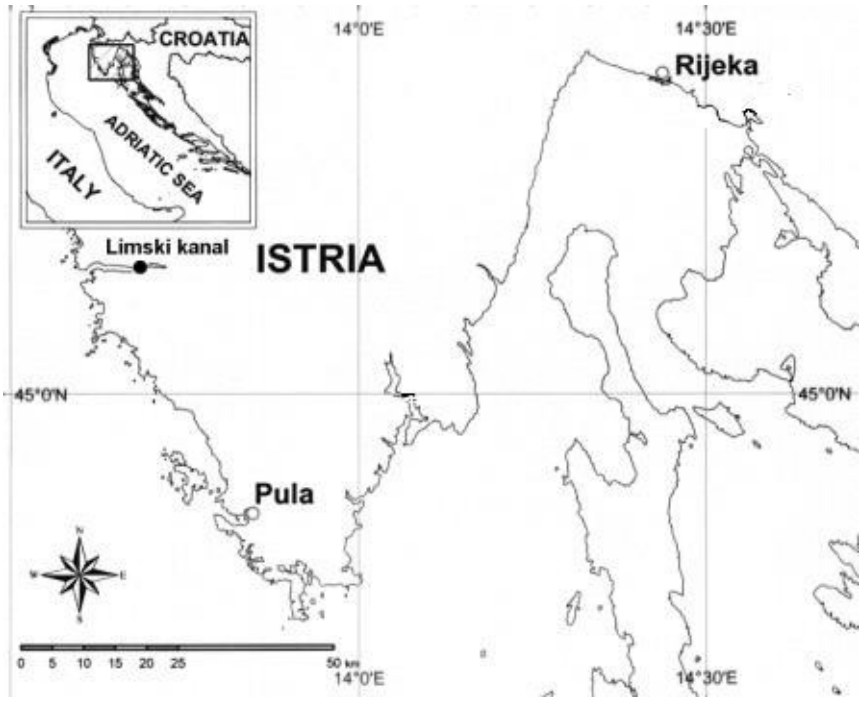
3) Usporediti analizirane parametre u dagnji *M.galloprovincialis* i usporediti ih s podacima iz literature

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 ºC, do pripreme histoloških preparata.



Slika 8. Lokacija uzorkovanja dagnje *M. galloprovincialis* u uzgajalištu smještenom u Limskom zaljevu.

3.2. Histokemijska priprema tkiva i mjerenje količine lipofuscina

Nakupljanje lipofuscina u lizosomima određeno je Schmorlovom reakcijom (Moore, 1988). Za pojedini uzorak od pet žlijezda po postaji pripremljen je krioprerez debljine 10μm. Prerezi su naneseni na predmetno stakalce zagrijano na sobnu temperaturu, a potom fiksirani u stabiliziranom fiksativu (Ca-formol 2% Ca-acetat, 10% formaldehid) 15 minuta pri temperaturi +4 ˚C. Nakon ispiranja destiliranom vodom preparati su inkubirani u reakcijskom mediju boje (1% željezo klorid, 1% kalij fericijanid 3:1) 5 minuta na sobnoj temperaturi. Preparati su ispirani u 1% octenoj kiselini 1 minutu, a potom u destiliranoj vodi. Osušeni preparati uklopljeni su u glicerol želatinu (Sigma – Aldrich, USA). Količina lipofuscina procijenjena je na svjetlosnom mikroskopu Nikon-SA povezan s CCD kamerom Ikegami ICD-803P. Analiza slika izvođena je pomoću programa Lucija 4,60.

Količina lipofuscina mjeri se prema intenzitetu zeleno-plavog obojenja granula lipofuscina do kojeg je došlo zbog Schmorlove reakcije željeznog klorida i kalijevog fericijanida.

3.3. Histokemijska priprema tkiva i mjerenje količine neutralnih masti

Nakupljanje neutralnih masti u lizosomima određeno je prema Moore-u (1988). Za pojedini uzorak pripremljen je krioprerez debljine 10μm od pet probavnih žlijezda po postaji. Prerezi su naneseni na predmetno stakalce zagrijano na sobnu temperaturu, a potom fiksirani u stabiliziranom fiksativu (Ca-formol 2% Ca-acetat, 10% formaldehid) 15 minuta pri temperaturi +4 ˚C. Nakon ispiranja destiliranom vodom preparati su inkubirani u 60% - oj otopini trietilfosfata 3 minute, a potom u reakcijskom mediju boje (1% Oil Red O, 60% trietilfosfat, 1:100) na sobnoj temperaturi 15 minuta. Preparati su ispirani u 60% - oj otopini trietilfosfata 30 sekundi, a potom u destiliranoj vodi. Osušeni preparati uklopljeni su u glicerol želatinu. Količina neutralnih masti procijenjena je na svjetlosnom mikroskopu Nikon-SA povezan s CCD kamerom Ikegami ICD-803P. Analiza slika izvođena je pomoću programa Lucija 4,60.

Količina neutralnih masti mjeri se prema intenzitetu crvenog obojenja granula neutralnih masti do kojeg je došlo zbog vezanja otopine boje Oil Red na neutralne masti.

3.3 Obrada podataka

Rezultati su prikazani histogramima aritmetičke sredine (X) i standardne devijacije (SD) pomoću programa Microsoft Excel 2013 (Slike 9. i 10.). U programu Statistica 9.0. izračunate su statistički značajne razlike između kontrolnih uzoraka i uzoraka dagnje izloženih različitim koncentracijama Benzo(a)pirena. Neparametrijski test Kruskal Wallis korišten je za utvrđivanje razlike među uzorcima, a *post hoch* Mann-Whitney U testom razlika između dva uzorka.

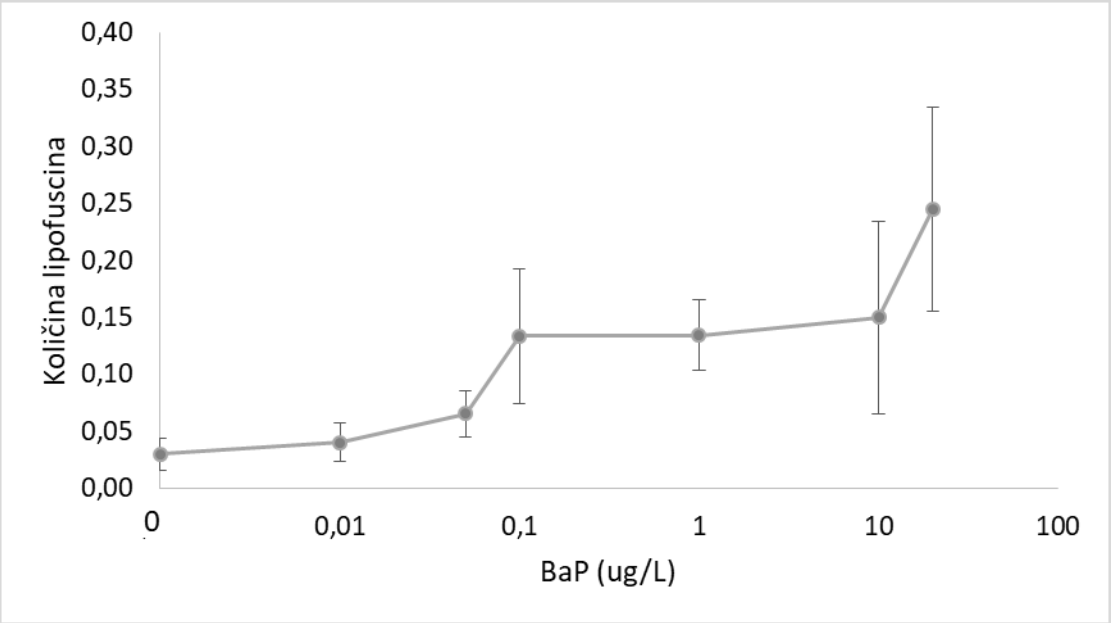
4. REZULTATI

Količina lipofuscina u dagnjama u bazenima s morskom vodom (X=0,03, SD=0,02) bila je ista (Mann-Whitney U test, p=0,601) kao kod uzorka dagnje koji su bili u bazenu izloženim DMSO-u (X=0,03, SD=0,02), te je zbog toga uzeta jedna kontrolna vrijednost (za kontrolu uzeta vrijednost za DMSO).

Količina neutralnih masti u dagnjama u bazenima s morskom vodom (X=0,05, SD=0,02) bila je ista (Mann-Whitney U test, p=0,464) kao kod dagnji koje su bile u bazenu s nosiocem zagađivala izloženim DMSO-u (X=0,04, SD=0,03), te je zbog toga uzeta jedna kontrolna vrijednost (za kontrolu uzeta vrijednost za DMSO).

4.1. Količina lipofuscina

Nakon 96 sati izmjereno je zeleno-plavog obojenje svjetlosnim mikroskopom, odnosno količina lipofuscina. Rezultati u Slici 7. pokazuju postepenu akumulaciju lipofuscina (<0,05-0,06 optičke gustoće pri koncentracijama benzo(a)pirena od 0,01 i 0,05 µg / L. Uočen je nagli porast (<0,05-0,15 optičke gustoće) pri povećanju koncentracije između 0,05 i 0,1 µg / L. Nakon toga slijedi stagnacija uz povećanje koncentracije našeg ispitanog zagađivala s 0,05 do 10 µg / L. Posljednji porast lipofuscina događa se pri koncentraciji BaP-a od 20 µg / L i iznosi 23 optičke gustoće. Postoje statistički značajne razlike ($p<0.05$) između količine lipofuscina u kontrolnim dagnjama i dagnjama izloženih benzo(a)pirenu različitim koncentracijama BaP-a (0,05; 0,1; 0,5; 1;10 i 20 µg / L). Statistički značajne razlike su prikazane u Tablici 3.



Slika 9. Sadržaj lipofuscina (izražen kao optička gustoća) izmjerenog 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 µg/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

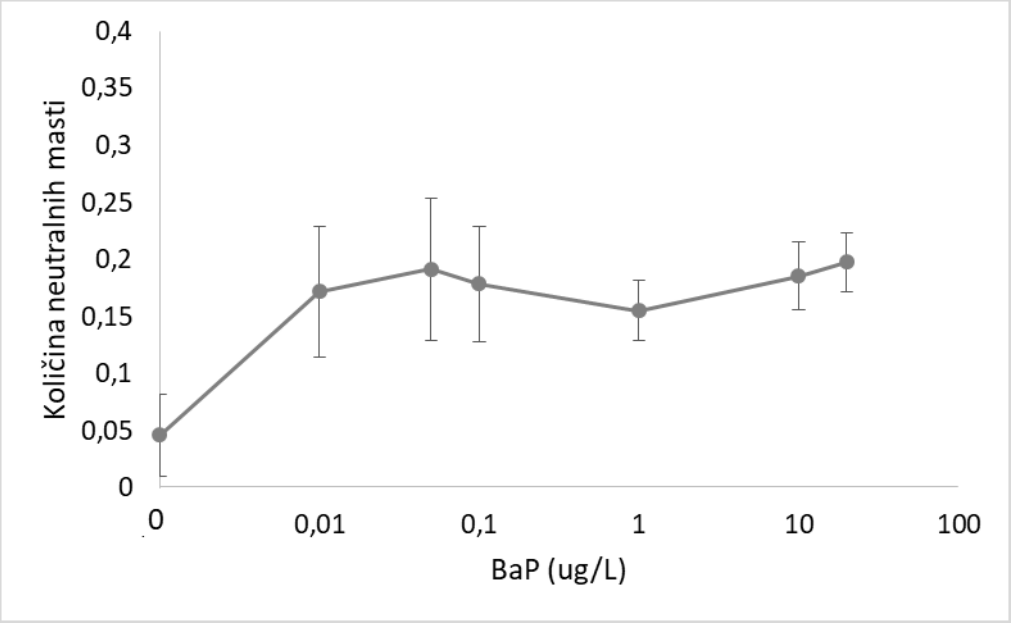
4.2. Količina neutralnih masti

Vrijednosti neutralnih masti u probavnim žlijezdama dagnji prikazane su na Slici 10. Već uz početnu koncentraciju benzo(a)pirena (0-0,01 µg / 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 µg / L nakon čega počinju padati za 0,1 optičke gustoće pri 0,1 µg / L Bap-a i za dodatnih 0,2 optičke gustoće pri koncentraciji od 1 µg / L BaP-a.

Posljednje zabilježeni porasti neutralnih masti događaju se pri koncentracijama upotrjebljenog zagađivala od 10 i 20 µg / 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 µg / 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 µg/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**

5. RASPRAVA

Utjecaj pojedinog onečišćivala u morskom ekosustavu na prirodne populacije dagnje teško je procijeniti, jer je u okolišu prisutan velik broj onečišćivala. Onečišćivala dolaze u mješavinama te tako utječu na različite stupnjeve biološke organizacije u morskim organizmima, od substanične, preko stanične razine do razine ekosistema (Kovačić, 2015). Kako bi se osiguralo pravilno praćenje stanja u okolišu potrebno je razviti pristup kojim bi se više pokazatelja uključilo u skup alata ili indeks sposoban za otkrivanje i praćenje promjena u određenom organizmu (Hagger i sur., 2008). U indekse kojima se prate promjene u morskom okolišu uključene su promjene u lizosomima dagnji koje mogu dati uvid u stanje organizma na različitim razinama organizacije.(Kovačić, 2015) U ovom radu istražen je biološki odgovor mediteranske dagnje (*Mytilus galloprovincialis*, Lamarck 1819), najpogodnijeg bioindikatora onečišćenja morskog ekosustava i ujedno najvažnije komercijalne vrste u Jadranskom moru, izložene različitim koncentracijama benzo(a)pirena (BaP) koje uzrokuju promjene u količini lipofuscina i neutralnih masti u lizosomima probavne žlijezde. Akumulacija neutralnih lipida u lizosomima je odgovor na stres prouzročen sa strane BaP-a, vjerojatno povezanog s peroksidacijom lipida koji sudjeluje u tvorbi pigmenta lipofuscina, te koji predstavlja neprobavljene ostatke oštećenih stanica. Isto tako, dokazano je povećanje količine lipofuscina u dagnjama pod utjecajem zagađivala na području Italije gdje je duž obalnog područja Bari-Trst izmjerena koncentracija BaP-a od <1-28 μg kg^{-1} i ukupna koncentracija PAH-ova od 31-527 μg kg^{-1} (Guzella i De Paolis, 1994), u Mar Piccolo (Taranto) od 28-1180 μg kg^{-1} BaP-a i ukupne koncetracije PAH-ova od 380-12750 μg kg^{-1} (Cardelicchio i sur., 2007), u Venecijanskoj laguni ukupna koncetracija PAH-ova od 184-201678 μg kg^{-1} dok koncentracija BaP-a nije definirana (Fattore i sur., 1997), te su također izmjerene ukupne koncentracije PAH-ova od 315-16474 μg kg^{-1} dok koncentracije BaP-a nisu definirane (Frignani i sur., 2003), na području Italije i Slovenije, u Tršćanskom zaljevu izmjerene su koncentracije BaP od 0,83-53,31 μg kg^{-1} i ukupne koncetracije PAH-ova od 30-600 μg kg^{-1} (Notar i sur., 2001).

Na području Hrvatske u Rovinjskom akvatoriju izmjerene su koncentracije BaP od 2,06-141 μg kg^{-1} i ukupne koncetracije PAH-ova od 32-13681 μg kg^{-1} (Bihari i sur.,

2006) dok su u Riječkom zaljevu izmjerene koncentracije BaP od 0,25-41,57 μg kg^{-1} i ukupne koncetracije PAH-ova od 53-12532 μg kg^{-1} (Juretić, 2006).

U Sredozemnom moru u Grčkoj, na području otoka Krete, izmjerene su koncentracije BaP od 0,54-6,65 μg kg^{-1} i ukupne koncetracije PAH-ova od 15-159 μg kg^{-1} (Gogou i sur., 2000), u Francuskoj, na obalnom području Toulousea izmjerene su koncentracije BaP od 0,049-1607 μg kg^{-1} i ukupne koncetracije PAH-ova od 45-13000 μg kg^{-1} (Baumard i sur., 1998), na obalnom području Egipta, izmjerene su koncentracije BaP od 0,05-1606 μg kg^{-1} i ukupne koncetracije PAH-ova od 88-6338 μg kg^{-1} (El Nemr i sur., 2007), na obalnom području Maroka, izmjerene su ukupne koncetracije PAH-ova od 27-254 μg kg^{-1} dok koncentracije BaP-a nisu definirane (Er-Raioui i sur., 2009),u Turskoj, na području Bosfora, Crno More, izmjerene su ukupne koncetracije PAH-ova od 14-531 μg kg^{-1} dok koncentracije BaP-a nisu definirane (Readman i sur., 2002).

U ostalim lokacijama u svijetu: u Kini, Zaljev Laizhou, Bohai more, izmjerene su ukupne koncetracije PAH-ova od 105±23 μg kg^{-1} dok koncentracije BaP-a nisu definirane (Wang i sur., 2007), na obalnom području Singapura, izmjerene su koncentracije BaP od 510-1820 μg kg^{-1} i ukupne koncetracije PAH-ova od 15000-94000 μg kg^{-1} (Basheer i sur., 2003), u SAD-u, na području Floride, izmjerene su koncentracije BaP od 58-3170 μg kg^{-1} i ukupne koncetracije PAH-ova od 50-1086000 μg kg^{-1} (Miles i Delfino, 1999), u Kanadi, na području Kitimata, izmjerene su ukupne koncetracije PAH-ova od 1169-356574 μg kg^{-1} dok koncentracije BaP-a nisu definirane (Simpson i sur., 1998).

U ovom radu smo dokazali da se količina lipofuscina povećanja pri koncentraciji BaP-a od 0,01, 0,05, 0,1, 1, 10 i 20 μg L^{-1} što možemo usporediti sa zagađivalima:

bakar (Cu) koncentracija 6,23;6,88;17,10;52,27 μg suhe mase u plavoj dagnji (*Mytilus edulis*) pri terenskom radu (Zorita i sur., 2006), PAH i PCB koncentracija 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 u plavoj dagnji (*Mytilus edulis*) u laboratoriju (Moore, 1988), PAH, PCB i DDT koncentracija 40-37490 ng g^{-1}; 50-500 ng g^{-1}; 9-29 ng g^{-1} u plavoj dagnji (*Mytilus edulis*) pri terenskom radu (Krishnakumar i sur., 1994), nanočestice: NCB, fuleren (C_{60}),TiO_2 i SiO_2 koncentracija 0,05 mg/L; 0,2mg/L; 1mg/L;6mg/L u mediteranskoj dagnji (*Mytilus galloprovincialis*) u laboratoriju (Canesi i

sur., 2010), karbamazepin (CBZ) koncentracija 0,01 µg/L-10 µg/L u mediteranskoj dagnji (*Mytilus galloprovincialis*) u laboratoriju (Martin-Diaz i sur., 2009). Dokazano je da se količina lipofuscina povećava u probavnim žlijezdama mekušaca izloženih ksenobioticima (Moore 1988, Marigomez i Angulo 1990).

Postoji jedno opsežno znanje ekotoksikoloških istraživanja (Neff, 2003) o načinu na koji kancerogeni PAH-ovi, (među kojima spada i BaP) djeluju na biološke sustave. Te studije pokazuju učinke oksidativnog stresa (Dizdaroglu i sur., 2002) kao i učinke na imunološki sustav (Holladay i sur., 1998), endokrinu regulaciju (Gozgit i sur., 2004; Navas & Segner, 2000), te razvoj (Rhodes i sur., 2005). PAH-ovi se metaboliziraju kroz stanični sustav putem detoksikacije ksenobiotika faze I (oksidacije, redukcije, hidrolize (bioaktivacija ili inaktivacija)) i faze II (konjugacije (bioinaktivacije)) (Guengerich, 1987; Morgan i sur., 1998; Williams, 1974), za koje se utvrdi da su prisutne kod svih kralježnjaka (uključujući i ribe) i nekih beskralješnjaka. Kancerogeni potencijal različitih PAH-ova jest povezan sa sklonošću enzima faze I da stvaraju reaktivne epokside koji se mogu detoksificirati kroz fazu II ili se vežu na druge stanične dijelove, kao što je DNA (Collier i sur., 1992b). Aktivnost faze I uvelike varira između različitih skupina morskih beskralježnjaka (Livingstone, 1998, 2001). Veliki udio studija koji se bave beskralješnjacima koriste plavu školjku (*M.edulis*) kao uzornu test vrstu u istraživanju. Međutim, školjkaši ne posjeduju veliku aktivnost metabolizacije prema benzo(a)pirenu. Pored školjkaša, glavni dio studija o metabolizmu i učincima PAH-ova odnosi se na rakove (James & Boyle, 1998.) i, u novije vrijeme, seriju studija o metabolizmu PAH-ova u polihetima koji žive u sedimentu (Christensen i sur., 2002 .; Giessing i sur., 2003; Rust i sur., 2004b). Beskralježnjaci općenito imaju niži kapacitet za metabolizam faze I od kralježnjaka, ali postoje velike razlike između i unutar taksonomskih skupina,kao što su pokazale nedavne studije s kolutićavcem *Nereis virens* (Rewitz i sur., 2004). Morski organizmi unose PAH-ove izravno iz vode (tjelesne površine ili škrge) ili putem prehrane. Bilo je nekih prijedloga da je dijeta manje bitna od direktne izloženosti u vodi (Neff & Burns, 1996.), a da prehrambeni unos ribe uglavnom nije vrlo učinkovit (Lemaire i sur., 1992.). U nizu opsežnih studija Puget Sounda, WA, ukazana je uzročno-posljedična veza između izlaganja PAH-ova (iz sedimenta) i povećani sadržaj metabolita žuči, inducirani jetreni citokrom P-4501A, povišena koncentracija DNA adukta u jetri i povećana prevalencija neoplazije (karcinoma) u jetri test organizama (Collier i sur.,

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 mogučnosti 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 µg / L .

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

7. LITERATURA

Akcha, F., Izuel, C., Venier, P., Budzinski, H., Burgeot, T., Narbonne, J.F., 2000. Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in benzo[a]pyrene contaminated mussels, *Mytilus galloprovincialis*. Aquat. Toxicol. 49, 269–287

Angel S.Comesaña, David Posada, Andrés Sanjuan, 1998. *Mytilus galloprovincialis* Lmk. in northern Africa. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 223,271-283

Banni, M., Bouraoui, Z., Ghedira, J., Clerandeau, C., Guerbej, H., Narbonne, J. F., & Boussetta, H., 2008. Acute effects of benzo[a]pyrene on liver phase I and II enzymes, and DNA damage on sea bream Sparus aurata. Fish Physiology and Biochemistry, 35(2), 293–299.

Banni, M., Sforzini, S.,Arlt, M.V., Barranger, A., Dallas L.J., Oliveri, C., Aminot, Y., Pacchioni, B., Millino, C., Lanfranchi, G., Readman, J.W., Moore, M.N., Viarengo, A., Jha, A.N., 2017. Assessing the impact of Benzo[a]pyrene on Marine Mussels: Application of a novel targeted low density microarray complementing classical biomarker responses. PLoS ONE 12(6): e0178460.

Barsotti, G. I C. Meluzzi, 1968. Osservazioni su *Mytilus edulis* L. e *Mytilus galloprovincialis* Lamarck.—Conchiglie. 4,50-58.

Basheer, C., Obbard, J.B., Lee, H.K., 2003. Persistent organic pollutant in Singapore's coastal marine environment: part II, sediments. Water Air Soil Pollut. 148, 315– 325.

Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., 1998. Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments and mussels of the Western Mediterranean Sea. Environ. Toxicol. Chem. 17 (5), 765–776.

Bayne, B.L. i Newell, R.C., 1983. Physiological energetics of marine molluscs. U: The mollusca. Physiology: I. (Saleudin, A.S.M. i Wilbur, K.M. (Ur.). Academic Press, New York, 407-515.

Bihari, N., Fafanđel, M., Hamer, B., Kralj-Bilen, B., 2006. PAH content, toxicity and genotoxicity of coastal marine sediments from the Rovinj area, Northern Adriatic. Croatia. Sci. Total Environ. 366, 602–611.

Brunk, U. T., and Terman, A. 2002. The mitochondrial–lysosomal axis theory of aging: accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. Eur. J. Biochem. 269, 1996–2002.

Brunk, U. T., Jones, C. B., and Sohal, R. S. 1992. A novel hypothesis of lipofuscinogenesis and cellular aging based on interactions between oxidative stress and autophagocytosis. Mutat. Res. 275, 395 403

Cajaraville, M.P., 1991. Effectos histopathologicos y citotoxicos de los hidrocarburos derivados del petroleo, y su cuantificacion en el mejillon *Mytilus galloprovincialis* (Lmk.). Ph.D. thesis, Euskal Herriko Unibersitatea, Unibersidad del pais Vasco.

Cajaraville, M.P., Robledo, Y., Etxeberria, M. i Marigomez, I. 1995. Cellular biomarkers as useful tools in the biological monitoring of environmental pollution: mollusca digestive lysosomes. In: Cell biology in environmental toxicology (M.P. Cajaraville, ed.), pp. 29–55. University of the Basque Country Press Service, Bilbo.

Camus, L., Jones, M. ., Børseth, J. ., Grøsvik, B. ., Regoli, F., & Depledge, M., 2002. Total oxyradical scavenging capacity and cell membrane stability of haemocytes of the Arctic scallop, *Chlamys islandicus*, following benzo(a)pyrene exposure. Marine Environmental Research, 54(3-5), 425–430.

Canesi, L., Fabbri, R., Gallo, G., Vallotto, D., Marcomini, A., i Pojana, G. 2010. Biomarkers in *Mytilus galloprovincialis* exposed to suspensions of selected nanoparticles (Nano carbon black, C60 fullerene, Nano-TiO2, Nano-SiO2). Aquatic Toxicology, 100(2),168–177.

Cardellicchio, N., Buccolieri, A., Giandomenico, S., Lopez, L., Pizzulli, F., Spada, L., 2007. Organic pollutants (PAHs, PCBs) in sediments from the Mar Piccolo in Taranto (Ionian Sea, Southern Italy). Mar. Pollut. Bull. 55, 451–458.

Cho, S., & Hwang, E. S., 2011. Fluorescence-Based Detection and Quantification of Features of Cellular Senescence. Recent Advances in Cytometry, Part B - Advances in Applications, 149–188.

Christensen, M., Andersen, O., and Banta, G. T. 2002. Metabolism of pyrene by the polychaetes *Nereis diversicolor* and *Arenicola marina*. Aquat. Toxicol. 58:15–25.

Collier, T. K., Stein, J. E., Sanborn, H. R., Hom, T., Myers, M. S., and Varanasi, U. 1992a. Field studies of reproductive success and bioindicators of maternal contaminant exposure in English sole (*Parophrys vetulus*). Sci. Total Environ. 116:169–185.

Collier, T. K., Singh, S. V., Awasthi, Y. C., and Varanasi, U. 1992b. Hepatic xenobiotic metabolizing enzymes in two species of benthic fish showing different prevalences of contaminant-associated liver neoplasms. Toxicol. Appl. Pharmacol. 113:319–324.

Collier, T. K., Anulacion, B. F., Stein, J. E., Goksoyr, A., and Varanasi, U. 1995. A field evaluation of cytochrome P4501A as a biomarker of contaminant exposure in three species of flatfish. Environ. Toxicol. Chem. 14:143–152.

Collier, T. K., Johnson, L. L., Stehr, C. M., Myers, M. S., and Stein, J. E. 1998. A comprehensive assessment of the impacts of contaminants on fish from an urban waterway. Mar. Environ. Res. 46:243–247.

Comesana, A., Posada, D., Sanjuan, A., 1997. *Mytilus galloprovincialis* Lmk. in northern Africa. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.223,271-283.

Dimitriadis, V. K., Domouhtsidou, G. P., & Cajaraville, M. P., 2003. Cytochemical and Histochemical Aspects of the Digestive Gland Cells of the Mussel *Mytilus galloprovincialis* (L.) in Relation to Function. Journal of Molecular Histology, 35(5), 501–509.

Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., and Rodriguez, H. 2002. Free radical-induced damage to DNA: Mechanisms and measurement. Free Radical Biol. Med. 32:1102–1115.

Domouhtsidou, G.P., Dimitriadis, V.K., 2001. Lysosomal and lipid alterations in the digestive gland of mussels, *Mytilus galloprovincialis* (L.) as biomarkers of environmental stress. Environ. Pollut. 115, 123–137.

Downs, C.A., Fauth, J.E., Halas, J.C., Dustan, P., Bemiss, J., Woodley, C.M., 2002. Oxidative stress and seasonal coral bleaching. Free Radical Biol. Med. 33, 533–543.

Dučić.I.2017. Raspodjela PAHova u tlu Labinštine onečišćenom višestoljetnim rudarsko – industrijskim aktivnostima (Istarski ugljenokopi Raša). Diplomski rad. Prirodoslovni-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

El Nemr, A., Said, T.O., Khaled, A., El-Sikaily, A., Abd-Allah, A.M.A., 2007. The distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments along the Egyptian Mediterranean coast. Environ. Monit. Assess. 124, 343–359.

Eldred, G. E., and Katz, M. L. 1988. Fluorophores of the human retinal pigment epithelium: separation and spectral characterization. Exp. Eye Res. 47, 71–86.

Eldred, G. E., Miller, G. V., Stark, W. S., and Feeney-Burns, L. 1982. Lipofuscin: resolution of discrepant fluorescence data. Science 216, 757–759

Er-Raioui, H., Bouzid, S., Marhraoui, M., Saliot, A.S., 2009. Hydrocarbon pollution on the Mediterranean coastline of Marocco. Ocean Coastal Manage. 52, 124–129

Evans, G.O., 2009. Animal Clinical Chemistry. CRC Press, Boca Raton FL.

Fattore, E., Benefenati, E., Mariani, G., Cools, E., Vezzoli, G., Fanellli, R., 1997. Analysis of organic pollutants in sediment samples of the Venice lagoon. Italy. Water Air Soil Pollut. 99, 237–244.

Frignani, M., Bellucci, L.G., Favotto, M., Albertazzi, S., 2003. Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments of the Venice lagoon. Hydrobiologia 494, 283–290.

Gavrilović, A., Jug-Dujaković, J., Marinović-Bonačić, A., Conides, A., Bonačić, K., Ljubičić, A. i Van Gorder, S., 2011. The influence of environmental parameters on the growth and meat quality of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* (Mollusca*: Bivalvia*). AACL BIOFLUX (Aquaculture, Aquarium, Conservation and Legislation). Int. J. Bio. Soc. Vol.4.

Gerard, K., Bierne, N., Borsa, P., Chenuil, A., Feral, J.P., 2008. Pleistocene separation of mitochondrial lineages of *Mytilus spp*. mussels from Northern and Southern Hemispheres and strong genetic differentiation among southern populations. Mol. Phylogenet. Evol. 49, 84–91.

Giessing, A. M. B., Mayer, L. M., and Forbes, T. L. 2003. 1-Hydroxypyrene glucuronide as the major aqueous pyrene metabolite in tissue and gut fluid from the marine deposit-feeding polychaete *Nereis diversicolor*. Environ. Toxicol. Chem. 22:1107–1114

Gogou, A., Bouloubassi, I., Stephanou, E.G., 2000. Marine organic geochemistry of the Eastern Mediterranean: 1 aliphatic and polyaromatic hydrocarbons in Cratan Sea surficial sediments. Marine Chemistry 68, 265–282.

Gopalakrishnan, S., Thilagam, H., Huang, W.-B., & Wang, K.-J., 2009. Immunomodulation in the marine gastropod *Haliotis diversicolor* exposed to benzo(a)pyrene. Chemosphere, 75(3), 389–397.

Gosling, E., 1992. The mussel *Mytilus*: Ecology, Physiology, Genetics and Culture. Developments in aquaculture and fisheries science. Vol 25., Elsevier, Amsterdam, 589.

Gozgit, J. M, Nestor, K. M., Fasco, M. J., Pentecost, B. T., and Arcaro, K. F. 2004. Differential action of polycyclic aromatic hydrocarbons on endogenous estrogen-responsive genes and on a transfected estrogen- responsive reporter in MCF-7 cells. Toxicol. Appl. Pharmacol. 196:58–67.

Grant, W.S. i Cherry, M.I., 1985. *Mytilus galloprovincialis* Lmk. in southern Africa. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 90, 179-191.

Gravato, C., & Guilhermino, L., 2009. Effects of Benzo(a)pyrene on Seabass (Dicentrarchus labraxL.): Biomarkers, Growth and Behavior. Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal, 15(1), 121–137.

Griffiths, C.L. i Griffiths, R.J., 1987. Bivalvia. U: Animal Energetics. Vol.2, Bivalvia through Reptilia (Pandian, T.J. i Vernberg, F.J., Ur.). New York, Academic Press, 1-88.

Guengerich, F. P., (ed). 1987. Mammalian cytochromes P-450. Boca Raton, FL: CRC Press.

Guzzella, L., De Paolis, A., 1994. Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments of the Adriatic Sea. Marine Pollut. Bull. 28 (3), 159–165.

Hagger, J.A., Jones, M.B., Lowe, D., Leonard, D.R., Owen, R., Galloway, T.S., 2008. Application of biomarkers for improving risk assessments of chemicals under the Water Framework Directive: a case study. Marine Pollution Bulletin 56, 1111-1118.

Hawkins, W. E., Walker, W. W., Overstreet, R. M., Lytle, T. F., & Lytle, J. S., 1988. Dose-related carcinogenic effects of water-borne benzo[a]pyrene on livers of two small fish species. Ecotoxicology and Environmental Safety, 16(3), 219–231.

Hilbish, T. J., Mullinax, A., Dolven, S. I., Meyer, A., Koehn, R. K., & Rawson, P. D. 2000. Origin of the antitropical distribution pattern in marine mussels (*Mytilus spp*.): routes and timing of transequatorial migration. Marine Biology, 136(1), 69–77.

Holladay, S. D., Smith, S. A., Besteman, E. G., Deyab, A. S. M. I., Gogal, R. M., Hrubec, T., Robertson, J. L., and Ahmed, S. A. 1998. Benzo[a]pyrene-induced hypocellularity of the pronephros in tilapia (Oreochromis niloticus) is accompanied by alterations in stromal and parenchymal cells and by enhanced immune cell apoptosis. Vet. Immunol. Immunopathol. 64:69–82.

Ivoševič, D., 2013. Histološka i morgometrijska analiza probavila dagnje *Mytilus galloprovicialis* (Lamarck 1819) u Malostonskom zaljevu. Diplomski rad. Prirodoslovni-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

Jakovljević, I., i Žužul, S. 2011. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Air. Archives of Industrial Hygiene and Toxicology. 62(4), 357-370

James, M. O., and Boyle, S. M. 1998. Cytochromes P450 in crustaceans. Comp. Biochem. Physiol. 121C:157–172.

Johnson, L. L., Landahl, J. T., Kubin, L. A., Horness, B. A., Myers, M. S., Collier, T. K., and Stein, J. E. 1998. Assessing the effects of anthropogenic stressors on Puget Sound flatfish populations. J. Sea Res. 39:125–137.

Johnson, L. L., Sol, S. Y., Ylitalo, G. M., Hom, T., French, B., Olson, O. P., and Collier, T. K. 1999. Reproductive injury in English sole (*Pleuronectes vetulus*) from the Hylebos Waterway, Commencement Bay, Washington. J. Aquat. Ecosyst. Stress Recov. 6:289–310

Jones, D. S., I. R. Quitmyer, W. S. Arnold i D. C. Marelli, 1990. Annual shell banding, age, and growth rateof hard clams (*Mercenaria spp*.) from Florida. J. Shellfish Res., Voi. 9, pp. 215-225.

Jørgensen CB 1991. Bivalve filter feeding: hydrodynamics, bioenergetics, physiology and ecology. Olsen and Olsen Fredensborg

Juretić.A.A, 2011.Polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediments from the Rijeka Bay area. Northern Adriatic, Croatia. Marine Pollution Bulletin 62, 863–869

Khillare, P.S., Hasan, A., Sarkar, S. 2013. Accumulation and risks of polycyclic aromatic hydrocarbons and trace metal sin tropical urban soils. Environmental Monitoring and Assessment, 186(5), 2907-2923 str.

Koukouzika, N., Raftopoulou, E.K., Dimitriadis, V.K., 2009. Seasonal differences of lysosomal, lipid and lipofuscin parameters in the digestive gland of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Journal of Molluscan Studies. 75 (3), 261-267.

Kovačić, I., 2015. Aktivnost kisele deoksiribonukleaze i histokemijske promjene u lizosomima kao odgovor dagnje *Mytilus galloprovincialis* na čimbenike u okolišu. Doktorski rad. Prirodoslovni-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

Krishnakumar P.K.,Casillas E., and Varesi U., 1994. Effects of environmental contaminants on the health of *Mytilus edulis* from Puget Sound. Washington,USA. I.Cytochemical measures of lysosomal responses in the digestive cells using automatic image analisis. Marine Ecology Progress Series.106, 249-261

Landahl, J. T., Johnson, L. L., Stein, J. E., Collier, T. K., and Varanasi, U. 1997. Approaches for determining effects of pollution on fish populations of Puget Sound. Trans. Am. Fish. Soc. 126:519–535.

Lee, S.Y. i Morton, B.S., 1985. The introduction of the mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* into Hong Kong. Malacol. Rev. 18, 107-109.

Lemaire, P., Lemaire-Gony, S., Berhaut, J., and Lafaurie, M. 1992. The uptake, metabolism, and biological half-life of benzo[a]pyrene administered by force-feeding sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Ecotoxicol. Environ. Safety. 23:244–251.

Lemaire-Gony, S., Lemaire, P., & Pulsford, A. L., 1995. Effects of cadmium and benzo(a)pyrene on the immune system, gill ATPase and EROD activity of European sea bass *Dicentrarchus labrax.*

Livingstone, D. R. 1998. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: Quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. Comp. Biochem. Physiol. 102A:43–49.

Livingstone, D. R. 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. Mar. Pollut. Bull. 42:656–666.

Lowe D.M. , Clarke K.R. , 1989. Contaminant-induced changes in the strukture of the digestice epithelium of *Mytilus edulis*. Aq.Toxicol. 15, 345-358.

Marjorie J. Wonham, 2004. Mini-review: distribution of the mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* (bivalvia: *mytilidae*) and hybrids in thenortheast pacific. Journal of shellfish research, vol. 23, no. 2, 535–543,

Martin-Diaz, L., Franzellitti, S., Buratti, S., Valbonesi, P., Capuzzo, A., i Fabbri, E. 2009. Effects of environmental concentrations of the antiepilectic drug carbamazepine on biomarkers and cAMP-mediated cell signaling in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Aquatic Toxicology, 94(3), 177–185.

Martinez, P., Livingstone, D.R., 1995. Benzo[a]pyrene-dione stimulated oxyradical production by microsomes of digestive gland of the common mussel, *Mytilus edulis* L. Mar. Environ. Res. 39, 185–189.

McDonald, J.H. i Koehn, R.K., 1988. The mussels *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* on the Pacific coast of North America. Mar. Biol., 99, 111-118.

Michel X et al. 1995. Regio-selective metabolism of benzo[a]pyrene by microsomes from 5 vertebrate species. Presented at 15th International Symposium on Polycyclic Aromatic Compounds in Belgirate (Italy), 19-22 September 1995.

Miles, C.J., Delfino, J.J., 1999. Priority pollutant polycyclic aromatic hydrocarbons in Florida sediments. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 63, 224–234.

Moore, M.N., 1988. Cytochemical responses of the lysosomal system and NADPH-ferrihemoprotein reductase in molluscan digestive cells to environmental and experimental exposure to xenobiotics. Marine Ecology Progress Series 46 81-89.

Morgan, E. T., Sewer, M. B., Iber, H., Gonzalez, F. J., Lee, Y.-H., Tukey, R. H., Okino, S., Vu, T., Chen, Y.-H., Sidhu, J. S., and Omiecinski, C. J. 1998. Physiological and pathophysiological regulation of cytochrome P450. Drug Metab. Dispos. 26:1232–1240.

Myers, M. S., Stehr, C. M., Olson, O. P., Johnson, L. L., McCain, S. L., and Varanasi, U. 1994. Relationships between toxicopathic hepatic lesions and exposure to chemical contaminants in English sole (*Pleuronectes vetulus*), starry flounder (*Platichthys stellatus*), and white croaker (*Genyonemus lineatus*) from selected marine sites on the Pacific Coast, USA. Environ. Health. Perspect. 102:200–215.

Myers, M. S., French, B. L., Reichert, W. L., Willis, M. L., Anulacion, B. F., Collier, T. K., and Stein, J. E. 1998a. Reductions in CYP1A expression and hydrophobic DNA adducts in liver neoplasms of English sole (*Pleuronectes vetulus*): Further support for the “resistant hepatocyte” model of hepatocarcinogenesis. Mar. Environ. Res. 46:197–202.

Myers, M. S., Johnson, L. L., Hom, T., Collier, T. K., Stein, J. E., and Varanasi, U. 1998b. Toxicopathic hepatic lesions in subadult English sole (*Pleuronectes vetulus*) from Puget Sound, Washington, USA: Relationships with other biomarkers of contaminant exposure. Mar. Environ. Res. 45:47–67.

Narbonne, J. F., Daubèze, M., Clérandeau, C., Garrigues, P., 1999. Scale of classification based on biochemical markers in mussels: application to pollution monitoring in European coasts. Biomarkers 6, 415–424.

Navas, J. M., and Segner, H. 2000. Antiestrogenicity of β-naphthoflavone and PAHs in cultured rainbow trout hepatocytes: Evidence for a role of the arylhydrocarbon receptor. Aquat. Toxicol. 51:79–92.

Neff, J. M. 2003. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the ocean. In Bioaccumulation in marine organisms.Effect of contaminants from oil well produced water. Amsterdam: Elsevier. pp. 241–318.

Neff, J. M., and Burns, W. A. 1996. Estimation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the water column based on tissue-residues in mussels and salmon: An equilibrium partitioning approach. Environ. Toxicol. Chem. 15:2240–2254

Notar, M., Leskovšek, H., Faganeli, J., 2001. Composition, distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments of the Gulf of Trieste, Northern Adriatic Sea. Mar. Pollut. Bull. 42 (1), 36–44.

Palanikumar, L., Kumaraguru, A. K., Ramakritinan, C. M., & Anand, M., 2012. Biochemical response of anthracene and benzo [a] pyrene in milkfish Chanos chanos. Ecotoxicology and Environmental Safety, 75, 187–197.

Petrović, S., Semenčić, L., Ozretić, B., Ozretić, M., 2004. Seasonal variations of physiological and cellular biomarkers and their use in the biomonitoring of north Adriatic coastal waters (Croatia). Marine Pollution Bulletin 49, 713-720

Phillips D.H.,1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. Mutation Research 443, 139–147

Readman, J.W., Fillmann, G., Tolosa, I., Bartocci, J., Villeneuve, J.-P., Catinni, C., Mee, L.D., 2002. Petroleum and PAH contamination of the Black Sea. Mar. Pollut. Bull. 44, 48–62.

Regoli, F., 1992. Lysosomal responses as a sensitive stress index in biomonitoring heavy metal pollution. Marine Ecology Progress Series 84, 63–69

Regoli, F., Cerrano, C., Chierici, E., Chiantore, M.C., Bavestrello, G., 2004a. Seasonal variability of prooxidant pressure and antioxidant adaptation to symbiosis in the Mediterranean demosponge *Petrosia ficiformis.* Mar. Ecol. Prog. Ser. 275, 129–137.

Regoli, F., Pellegrini, D.,Winston, G.W., Gorbi, S., Giuliani, S., Virno-Lamberti, C., Bompadre, S., 2002b. Application of biomarkers for assessing the biological impact of dredged materials in the Mediterranean: the relationship between antioxidant responses and susceptibility to oxidative stress in the red mullet (*Mullus barbatus*). Mar. Pollut. Bull. 44, 912–922.

Rewitz, K., Kjellerup, C., Jørgensen, A., Petersen, C., and Andersen, O. 2004. Identification of two *Nereis virens* (Annelidae: Polychaeta) cytochrome P450 and induction by xenobiotics. Comp. Biochem. Physiol. 138C:89–96.

Rhodes, S., Farwell, A., Hewitt, L. M., MacKinnon, M., and Dixon, D. G. 2005. The effects of dimethylated and alkylated polycyclic aromatic hydrocarbons on the embryonic development of the Japanese medaka. Ecotoxicol. Environ. Safety. 60:247–258.

Rust, A. J., Burgess, R. M., McElroy, A. E., Cantwell, M. G., and Brownawell, B. J. 2004b. Influence of soot carbon on the bioaccumulation of sediment-bound polycyclic aromatic hydrocarbons by marine benthic invertebrates: an interspecies comparison. Environ. Toxicol. Chem: 2594–2603.

Simpson, C.D., Harrington, C.F., Cullen, W.R., Bright, D.A., Reimer, K.J., 1998. Polycyclic aromatic hydrocarbon contamination in marine sediments near Kitimat, British Columbia. Environ. Sci. Technol. 32, 3266–3272.

Sohal, R. S., and Brunk, U. T. 1989. Lipofuscin as an indicator of oxidative stress and aging. Adv. Exp. Med. Biol. 266, 17–26.

Solé, M., i Livingstone, D. R. 2005. Components of the cytochrome P450-dependent monooxygenase system and “NADPH-independent benzo[a]pyrene hydroxylase” activity in a wide range of marine invertebrate species. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology i Pharmacology, 141(1), 20–31.

Stein, J. E., Collier, T. K., Reichert, W. L., Casillas, E., Hom, T., and Varanasi, U. 1992. Bioindicators of contaminant exposure and sublethal effects: Studies with benthic fish in Puget Sound, Washington. Environ. Toxicol. Chem. 11:701–714.

Strehler, B. L. 1964. On the histochemistry and ultrastructure of age pigment. Adv. Gerontol. Res. 18,343–384.

T. J. Hilbish,A. Mullinax,S. I. Dolven,A. Meyer,R. K. Koehn á P. D. Rawson. 2000. Origin of the antitropical distribution pattern in marine mussels (*Mytilus spp*.): routes and timing of transequatorial migration. Marine Biology 136, 69-77

Totti, C., Cucchiari, E.M., Romagnoli, T., 2002. Intra and interannual variability of phytoplankton in coastal are of *Senigallia* (Northern Adriatic Sea) from 1988 to 2000. Biol. Mar. Medit. 9, 391–399.

Vančik H.,2012.Temelji organske kemije.TIVA Tiskara, Varaždin.

Viarengo A., Canesi L., Pertica M., Poli G., Moore M. N., Orunesu M., 1990, Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lam. Comp. Biochem. Phys. C, 97 (1), 37–42.

Wang, L., Lee, F.S.C., Wang, X., Yin, Y., Li, J., 2007. Chemical characteristics and source implications of petroleum hydrocarbon contaminants in the sediments near major drainage ou along the coastal of Laizhou Bay, Bohai Sea. China. Environ. Monit. Assess. 125, 229–237.

Wessel, N., Rousseau, S., Caisey, X., Quiniou, F., & Akcha, F., 2007. Investigating the relationship between embryotoxic and genotoxic effects of benzo[a]pyrene, 17α-ethinylestradiol and endosulfan on Crassostrea gigas embryos. Aquatic Toxicology, 85(2), 133–142.

Wilkins, N.P., Fujino, K. i Gosling, E.M., 1983. The Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. in Japan. Biol. J. Linn. Soc., 20, 365-374.

Williams, R. T. 1974. Inter-species variations in the metabolism of xenobiotics. Biochem. Soc. Trans. 2:359–377.

Zahn, R. K., Kurelec, B., Zahn-Daimler, G., Müller, W. E. G., Rijavec, M., Batel, R., … Beyer, Ŕ., 1982. The effect of benzo[a]pyrene on sponges as model organisms in marine pollution. Chemico-Biological Interactions, 39(2), 205–220.

Zorita, I., Ortiz-Zarragoitia, M., Soto, M., i Cajaraville, M. P. (2006). Biomarkers in mussels from a copper site gradient (Visnes, Norway): An integrated biochemical, histochemical and histological study. Aquatic Toxicology, 78, S109–S116.

8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli Završni rad

Sveučilišni preddiplomski studij Znanost o moru

Količina lipofuscina i neutralnih masti

U probavnoj žlijezdi dagnje *Mytilus galloprovincialis* izložene benzo(a)pirenu

MAURO MATEŠKOVIĆ

SAŽETAK

Policiklički aromatski ugljikovodici (PAH-ovi), čiji je jedan od glavnih predstavnika benzo(a)piren (BaP) dospijevaju u morski ekosustav i djeluju na organizme koji ga nastanjuju. U ovom radu ispitan je učinak B(a)P-a (koncentracije 0,01, 0,05, 0,1, 1, 10 i 20 µg/L) na mediteransku dagnju Mytilus galloprovincialis nakon 4 dana izlaganja u laboratorijskim uvjetima. Izmjerena je količina lipofuscina i neutralnih masti svjetlosnim mikroskopom u krioprerezima probavne žlijezde dagnje. Količina lipofuscina u probavnoj žlijezdi dagnje postepeno raste pri koncentracijama benzo(a)pirena od 0,01 do 0,1 µg / L B(a)P-a; zatim slijedi stagnacija pri utjecaju od 0,1 do 10 µg / L B(a)P-a, a potom nagli porast količine lipofuscina pri koncentraciji B(a)P-a od 20 µg / L. Količina neutralnih masti u probavnoj žlijezdi dagnje se povećava već pri koncentraciji B(a)P-a od 0,01 µg / L i ostaje konstantno povećana pri ostalim koncentracijama. Količina lipofuscina pokazuje dozni odgovor i veću osjetljivost na djelovanje B(a)P-a od količine neutralnih masti u probavnoj žlijezdi dagnje.

Ključne riječi: benzo(a)piren (BaP), *Mytilus galloprovincialis*, neutralne masti, lipofuscin

Mentor: doc. dr. sc. Ines Kovačić

Ocjenjivači: doc. dr. sc. Ines Kovačić

izv. prof. dr. sc. Maja Fafanđel

doc. dr .sc. Paolo Paliaga

9. BASIC DOCUMENTATION CARD

Juraj Dobrila University of Pula Bachelor thesis

University Undergraduate Study Programme – Marine Sciences

Amount of lipofuscin and neutral lipids in digestive glands of *Mytilus galloprovincialis* exposed to benzo(a)pirene

MAURO MATEŠKOVIĆ

ABSTRACT

One of the main representatives of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) is benzo(a)pyrene (BaP), which reaches the marine ecosystem and affecting the organisms in it. In this study, the effect of B(a)P (0.01, 0.05, 0.1, 1, 10, and 20 µg /L) on the Mediterranean mussel Mytilus galloprovincialis was investigated after 4 days of laboratory exposure. Lipofuscin and neutral lipids were histochemistry measured in cryosections of the mussel digestive gland. Lipofuscin was gradually increased in the digestive gland of mussel exposed to 0.01 and 0.1 µg /L B(a)P, followed by stagnation from 0.1 to 10 µg /L B(a)P, and then a suddenly increased in mussels exposed to 20 µg /L B(a)P. Neutral lipids were increased in digestive gland of mussels exposed to 0.01 µg /L B(a)P and remains constantly increased in mussels exposed to higher B(a)P concentrations. Lipofuscin content in the mussel digestive gland showed a dose response and a higher sensitivity to the effect of B(a)P than the neutral lipids.

Key words: benzo(a)pyrene (BaP), Mytilus galloprovincialis, neutral lipids, lipofuscin

Supervisor: doc. dr. sc. Ines Kovačić

Reviewers: doc. dr. sc. Ines Kovačić

izv. prof. dr. sc. Maja Fafanđel

doc. dr .sc. Paolo Paliaga