

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

MARIJA CVITANIĆ

**Indukcija aktivnosti multiksenobiotičke otpornosti nakon izlaganja cinku –
usporedba zavičajne vrste *Anodonta anatina* (Linnaeus, 1758)
i invazivne vrste *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) (Mollusca, Bivalvia)**

Zagreb, 2014.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom dr. sc. Ivane Bošnjak i doc. dr. sc. Jasne Lajtner i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2013./2014.

POPIS KRATICA

| | |
|---------------|---|
| ABC | ATP- vezna kasetta od eng. <i>ATP-binding cassette</i> |
| ADP | adenozin difosfat |
| ATP | adenozin trifosfat od eng. <i>adenosine triphosphate</i> |
| BCRP | eng. <i>breast cancer resistance protein</i> |
| BSA | eng. <i>bovine serum albumine</i> |
| DMSO | dimetilsulfoksid |
| EtOH | etanol |
| FU | eng. <i>fluorescent units</i> |
| IUCN | eng. <i>International Union for Conservation of Nature</i> |
| MDR mehanizam | eng. <i>multidrug resistance mechanism</i> |
| <i>mdr1</i> | gen koji kodira za P-glikoprotein |
| <i>mrp2</i> | gen koji kodira za MRP2 |
| MRP | eng. <i>multidrug resistance-associated protein</i> |
| MXR mehanizam | mehanizam multiksenobiotičke otpornosti od eng. <i>multixenobiotic resistance mechanism</i> |
| NBD | nukleotidno vezna domena od eng. <i>nucleotide binding domain</i> |
| PBS | fosfatni pufer od eng. <i>phosphate buffered saline</i> |
| P-gp | P-glikoprotein |
| RB | rodamin B |
| SD | standardna devijacija |
| TMD | transmembranska domena od eng. <i>transmembrane domain</i> |
| VER | verapamil |

SADRŽAJ RADA

| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Slatkovodni ekosustavi i razlozi njihove ugroženosti | 1 |
| 1.2. Utjecaj invazivnih vrsta na slatkovodne ekosustave | 1 |
| 1.2.1. Zavičajne (autohtone) i strane (alohtone) vrste | 1 |
| 1.2.2. Invazivnost | 2 |
| 1.2.3. Invazivnost slatkovodnih školjkaša | 3 |
| 1.3. Osnovne značajke školjkaša | 4 |
| 1.4. Mehanizam multiksenobiotičke otpornosti vodenih organizama | 4 |
| 1.4.1. Građa ABC transportnih proteina | 5 |
| 1.4.2. Mehanizam transporta ABC transportnog proteina | 7 |
| 1.4.3. ABC transportni proteini uključeni u MXR/MDR mehanizam | 8 |
| 1.4.4. Značaj MXR mehanizma kod vodenih organizama | 9 |
| 2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA | 11 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 12 |
| 3.1. Materijali | 12 |
| 3.1.1. Pokusne životinje | 12 |
| 3.1.2. Kemikalije | 14 |
| 3.1.3. Instrumenti | 15 |
| 3.2. Metode | 15 |
| 3.2.1. Izlaganje životinja cinku | 15 |
| 3.2.2. Izolacija škržnih diskova | 15 |
| 3.2.3. Akumulacija fluorescentnog supstrata u škržnim diskovima | 16 |
| 3.2.4. Mjerenje fluorescencijske (FU) vrijednosti | 17 |
| 3.2.5. Određivanje prosječne koncentracije proteina u škržnom disku | 17 |
| 3.2.6. Test za određivanje vijabilnosti stanica | 18 |
| 3.2.7. Statistička obrada podataka | 19 |
| 4. REZULTATI | 20 |
| 4.1. Ukupna koncentracija proteina u škržnom disku | 20 |
| 4.2. Vijabilnost stanica škrga nakon izlaganja cinku | 20 |
| 4.3. Aktivnost MXR mehanizma u stanicama škržnog epitela izloženih cinku | 21 |
| 4.4. Inhibicija MXR mehanizma | 23 |
| 5. RASPRAVA | 25 |
| 6. ZAKLJUČCI | 30 |
| 7. ZAHVALE | 31 |
| 8. POPIS LITERATURE | 32 |
| 9. SAŽETAK | 39 |
| 10. SUMMARY | 40 |

1. UVOD

1.1. Slatkovodni ekosustavi i razlozi njihove ugroženosti

Čovjekov utjecaj na okoliš uvelike je promijenio izgled i biološka svojstva brojnih staništa, ugrožavajući time brojne biljne i životinjske vrste. Slatkovodni su ekosustavi među najraznolikijim, ali ujedno i najugroženijim ekosustavima na svijetu. Zbog svoje izoliranosti i ograničene veličine, karakterizira ih veliki broj endemičnih vrsta, od kojih su mnoge izrazito osjetljive na promjene u okolišu (Dudgeon i sur., 2006). Zato su vodeni organizmi jako pogođeni drastičnim promjenama koje je uzrokovao čovjek svojim direktnim (npr. onečišćenje tla, vode i zraka razvojem industrije, neodrživo iskorištavanje prirodnih resursa, fragmentacija staništa urbanizacijom i izgradnjom prometnica itd.) ili indirektnim (npr. nenamjerna prijenos stranih vrsta, povećanje koncentracija stakleničkih plinova u atmosferi) djelovanjem. Među brojnim pritiscima koje ljudsko društvo čini na slatkovodne ekosustave upravo su zagađenje, izgradnja brana, crpljenje vode i unos stranih invazivnih vrsta najviše doprinijeli degradaciji slatkovodnih ekosustava diljem svijeta (Dudgeon i sur., 2006; Strayer, 2006).

Jedna od najboljih skupina slatkovodnih organizama za proučavanje negativnih promjena u vodenom okolišu su školjkaši. Razred školjkaša (Bivalvia) zajedno sa još šest razreda pripada koljenu mekušaca (Mollusca). Do danas je opisano 81000 vrsta mekušaca od čega je 6000 slatkovodnih vrsta, puževa i školjkaša (Bouchet, 2007). Školjkaši koriste škrge za filtraciju hranjivih tvari iz vode. Filtracijom vode dolazi i do nakupljanja štetnih tvari u tijelu školjkaša zbog čega su ovi organizmi izvrsni indikatori onečišćenja. Danas u svijetu postoje biomonitoring programi koji upravo koriste školjkaše (i općenito mekušce) kao indikatore kakvoće okoliša, a jedan od najpoznatijih je *Mussel Watch Program* (Goldberg, 1984).

U proteklih nekoliko desetljeća, proučavajući slatkovodne ekosustave, znanstvenici su uočili sve veći broj ugroženih vrsta i nažalost ovaj trend nastavlja rasti. Problemom ugroženih vrsta bavi se Svjetska udruga za zaštitu prirode (IUCN - *International Union for Conservation of Nature*). Prema IUCN-u, osim čovjekovog utjecaja, degradacije staništa i onečišćenja, invazivne strane vrste jedan su od najbitnijih razloga ugroženosti brojnih vrsta.

1.2. Utjecaj invazivnih vrsta na slatkovodne ekosustave

1.2.1. Zavičajne (autohtone) i strane (alohtone) vrste

Prema definiciji zavičajne (autohtone, nativne) vrste su vrste koje se nalaze na području svoje prirodne rasprostranjenosti, dok su strane (alohtone, unesene,) one vrste koje

se ne nalaze na području svoje prirodne rasprostranjenosti, evoluirale su drugdje, a slučajnim djelovanjem ili namjerno prenesene su u novo stanište.

Novo stanište razlikuje se od izvornog te stoga strane vrste posjeduju niz prilagodbi kako bi se adaptirale na novi okoliš (Colautti i sur., 2004; Lockwood i sur., 2005; Meimberg i sur., 2010). Sam proces invazije sastoji se od nekoliko stadija (transport jedinki, unos u novo područje, uspostava populacije, širenje, te izraženi negativni ekološki i ekonomski učinci; Lockwood i sur., 2007). Uvođenje (introdukcija) novih vrsta može biti namjerno ili slučajno. Namjerno se unose neke vrste u svrhu bio-kontrole. Primjer je riba gambuzija (*Gambusia holbrooki*) koja izvorno potječe iz sjevero-istočnog dijela SAD-a, a u Europu je unesena kako bi se iskorijenili komarci kao prijenosnici malarije (Alemadi i sur., 2008). Primjer slučajnog unosa vrste u nepripadajući okoliš je unos morske alge *Caulerpa taxifolia* u Mediteran (Meinesz i sur., 1993).

Kako bi određena strana vrsta postala invazivna, mora uspješno proći kroz sve stadije invazije. Primjerice, unesena vrsta se ne mora održati na tom staništu, odnosno velika je vjerojatnost da će uginuti u novim uvjetima staništa, posebice ako se ne uspije prilagoditi novom okolišu. Također, uspostavljena populacija strane vrste možda se neće moći širiti zbog uvjeta u novom okolišu (npr. iznimno velika gustoća predatora ili jaka interspecijska kompeticija). Stoga, od svih unesenih stranih vrsta izuzetno mali postotak uspijeva prijeći sve barijere različitih stadija invazije i zaista postati invazivno (Williamson, 1996).

1.2.2. Invazivnost

Invazivna strana vrsta je ona čije naseljavanje ili širenje ugrožava biološku raznolikost, ali to je i vrsta koja svojim razmnožavanjem i širenjem uzrokuje ne samo ekološku već i ekonomsku štetu i/ili nepovoljno utječe na zdravlje ljudi (Zakon o zaštiti prirode, NN 70/05, NN 139/08, NN 57/11). Introdukcija invazivnih vrsta u Republici Hrvatskoj regulirana je Zakonom o zaštiti prirode te Pravilnikom o načinu izrade i provođenja studije o procjeni rizika uvođenja, ponovnog uvođenja i uzgoja divljih svojti (NN 35/08), a unos stranih vrsta je zabranjen, osim uz dopuštenje nadležnog Ministarstva.

Invazivne strane vrste, uz izravno uništavanje staništa, danas predstavljaju najvažniji faktor gubitka biološke raznolikosti i degradacije ekoloških sustava diljem svijeta (IUCN, 2012). Iako invazivne vrste mogu donijeti prihode u nekim granama gospodarstva (npr. brzo rastuće vrste drveća za drvnu masu, neke vrste usjeva itd.), istraživanja pokazuju kako troškovi koji nastaju zbog kasnijih potreba uklanjanja, kontrole, upravljanja ili istraživanja invazivnih vrsta značajno nadmašuju prihode (Pimentel i sur., 2001; Keller i sur., 2011). Zbog

izrazitih ekoloških i ekonomskih negativnih utjecaja, kontrola i upravljanje invazivnim stranim vrstama, te predviđanje uspjeha pojedinih invazivnih vrsta, njihovog širenja i mogućih utjecaja, među glavnim su izazovima u području zaštite prirode i biološke raznolikosti.

Negativan ekološki utjecaj invazivnih vrsta na zavičajne vrste odvija se kroz različite mehanizme koji uključuju kompeticiju, predaciju ili hibridizaciju sa zavičajnim vrstama, te prijenos bolesti. Ovakvim utjecajima invazivne strane vrste često uzrokuju smanjenje ili potpuni nestanak populacija autohtonih vrsta koje nemaju razvijen obrambeni sustav za novonastale uvjete (Baiser i Lockwood, 2011). Invazivne strane vrste se u prosjeku brže razmnožavaju, brže rastu, ranije dostižu spolnu zrelost, te pokazuju veću agresivnost i veću toleranciju na različite pritiske u okolišu od zavičajnih vrsta (Crooks i sur., 2011). I dok su neke od ovih pretpostavki dokazane, veća tolerancija invazivnih stranih vrsta na antropogene pritiske u okolišu, poput zagađenja, relativno je slabo istražena (Lee i sur., 2003; Faria i sur., 2010).

1.2.3. Invazivnost slatkovodnih školjkaša

Slatkovodni školjkaši često osvajaju nova područja što je usko vezano uz značajke njihovog životnog ciklusa. Školjkaši iz porodice Unionidae razvijaju se u odrasle jedinke preko ličinke glohidije koja se za daljnji razvoj mora prikvačiti na škrge ili peraje riba. Kako su ribe slobodno plivajući organizmi glohidije se prenesu u nova područja. Nasuprot ovome, predstavnici porodice Dreissenidae imaju slobodno plivajuću veliger ličinku koja im pospješuje rasprostranjivanje vodenim strujama, ali i balastnim vodama. Osim toga, ovi se školjkaši prenose u nova staništa pričvršćeni bisusnim nitima za brodove ili noge ptica (Wright, 2007). Primjer jedne takve invazivne vrste slatkovodnog školjkaša je raznolika trokutnjača, *Dreissena polymorpha* koja se vodenim putevima iz Crnog mora rasprostranila po cijeloj Europi (Lajtner, 2005). Uspješno unesene u novo stanište invazivne vrste školjkaša su u kompeticiji za hranu i prostor s drugim organizmima, a mogu dovesti i do istrebljenja autohtonih vrsta. Jednom kada su ušle u slatkovodni ekosustav strane invazivne vrste školjkaša vrlo je teško iskorijeniti, a i upravljanje njihovim populacijama teže je nego što je to slučaj u kopnenim ekosustavima (Genovesi, 2007). Posebni problemi i velike ekonomske štete nastaju kod vrsta koje se bisusnim nitima pričvršćuju za čvrste podloge jer svojim velikim kolonijama stvaraju probleme na pristaništima, brodovima i branama, a ukoliko se radi o vodopskrbnim cijevima može doći do njihovog potpunog začepljenja (Miller, 1992; Claudi i Mackie, 1994).

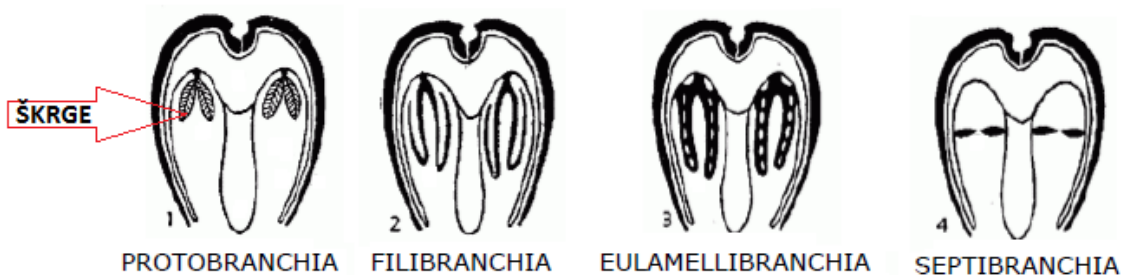
U Hrvatskoj su do sada zabilježene tri invazivne vrste slatkovodnih školjkaša: *D. polymorpha*, *Corbicula fluminea* i *Sinanodonta woodiana*. Vrste *D. polymorpha* i *C. fluminea* prisutne su u rijekama Dunavu, Savi i Dravi, dok je vrsta *S. woodiana*, osim u navedenim

rijekama, prisutna i u velikom broju ribnjaka u Hrvatskoj (Lajtner i sur., 2004; Lajtner, 2005; Hudina i sur., 2010; Lajtner i Crnčan, 2011).

1.3. Osnovne značajke školjkaša

Školjkaši su bilateralno simetrične životinje. Duljina im varira od 2 mm do 1,4 m koliko je duga vrsta *Tridacna gigas*. Nemaju glavu i imaju mekano tijelo obavijeno plaštom i zaštićeno s dvije ljušturre koje čine školjku. Unutar školjke nalazi se tijelo životinje, a većinu tijela čini mesnato stopalo kojeg životinja može izvući iz školjke. Uz pomoć stopala školjkaši se ukopavaju u pijesak ili se pokreću. Školjkaši su svi odreda filtratori. Filtracijom dobivaju svježju vodu s kisikom i čestice hrane. U ovom procesu glavnu ulogu imaju škrge koje su često trepetljikave. Trepetljike stvaraju struju vode i usmjeravaju čestice hrane u usta (Matoničkin i sur., 1998; Habdija i sur., 2011).

Koliko su škrge važna struktura kod školjkaša ukazuje i činjenica da se nekada taksonomski razred školjkaša dijelio na 4 reda s obzirom na građu škrge: Protobranchia, Filibranchia, Eulamellibranchia i Septibranchia. Na Slici 1 uočava se razlika između ta 4 tipa građe škrge.



Slika 1. Tipovi građe škrge. 1) Protobranchia-jednostavne škrge tzv. ktenidije; 2) Filibranchia-škrge u obliku slova W koje nisu srasle s plaštom; 3) Eulamellibranchia-škrge u obliku slova W s poprečnim pregradama, srasle s plaštom; 4) Septibranchia-nemaju škrge već mišićnu pregradu koja kontrakcijom uvlači i izbacuje vodu u okoškržnu šupljinu (preuzeto i prilagođeno iz Matoničkin i sur., 1998).

1.4. Mehanizam multiksenobiotičke otpornosti vodenih organizama

Svaki organizam posjeduje specijalizirane stanične procese detoksikacije i mehanizme koji mu omogućuju zaštitu od mnogobrojnih toksičnih tvari kojima je izložen u okolišu (Goldstone i sur., 2006). U ekotoksikološkom pogledu osobito su važni određeni membranski proteini iz ABC (eng. *ATP-binding cassette*) nadporodice, tzv. ABC transportni proteini, koji imaju mogućnost transporta štetnih tvari iz stanica (organizma). Ti proteini štetne tvari (ksenobiotike) mogu izbacivati u njihovom izvornom obliku, prije samih

metaboličkih procesa detoksikacije, ili su uključeni u reakcije faze III – aktivno izbacivanje metabolita i ubrzavanje njihove eliminacije iz stanice (organizma) (Xu i sur., 2005).

Kod čovjeka značaj ABC transportnih proteina je njihovo uključivanje u mehanizam otpornosti na različite lijekove ili skraćeno MDR mehanizam (eng. *multidrug resistance mechanism*). MDR u biti označava sposobnost tumorskih stanica da postanu otporne prema širokom spektru različitih citostatika koji se daju prilikom kemoterapije (Cole i Deeley, 1998; Litman i sur., 2001).

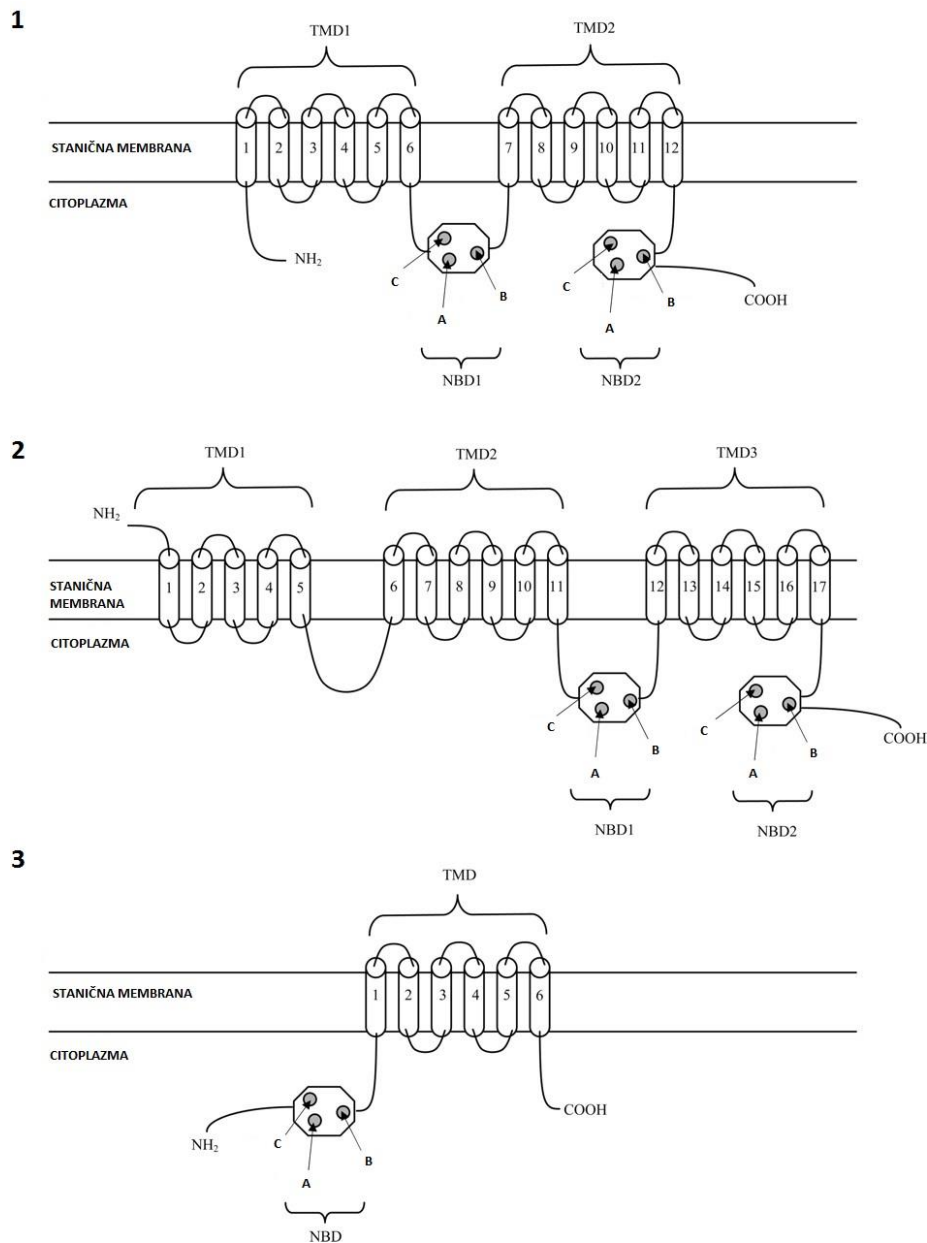
S obzirom na stupanj zagađenja u vodenom okolišu, vodeni organizmi aktiviraju specifičan obrambeni mehanizam nazvan mehanizam multiksenobiotičke otpornosti ili skraćeno MXR mehanizam (eng. *multixenobiotic resistance mechanism*) (Hamdoun i sur., 2004; Sauerborn i sur., 2004; Bošnjak i sur., 2009; Bošnjak i sur., 2013). Za razliku od MDR mehanizma tumorskih stanica, primarna uloga ABC eksportera u vodenim organizmima je obrana od širokog spektra endogenih i egzogenih toksičnih tvari (ksenobiotika) koje su prisutne u vodenom mediju. Endogene su sekrecijske tvari, enzimi, toksični produkti metabolizma, itd., dok su egzogene hranjive tvari iz okoliša i toksini iz okoliša (npr. ksenobiotici - toksične tvari dospjele u okoliš antropogenim djelovanjem) (Bard, 2000; Smital i sur., 2004). ABC transportni proteini uključeni u MXR mehanizam vodenih organizama nazvani su još i MXR transporteri i njihovim radom organizam se čisti, odnosno brani, od štetnih tvari. Vodeću ulogu u uvođenju pojma MXR mehanizma imao je hrvatski znanstvenik Branko Kurelec (Kurelec, 1992). Poseban značaj ABC eksportera je njihova obrambena uloga tijekom ranog embrionalnog razvitka, budući se embriji vodenih organizama razvijaju u izravnom dodiru s vodenim medijem, a samim time su i izravno izloženi utjecaju zagađivala i ksenobiotika (Hamdoun i sur., 2004; Bošnjak i sur., 2009).

1.4.1. Građa ABC transportnih proteina

ABC transportni proteini koji sudjeluju u MXR mehanizmu vodenih organizama, kao i u MDR mehanizmu kod čovjeka pronađeni su u svim vrstama od bakterija do čovjeka (evolucijska povezanost). Koriste energiju ATP-a kako bi obavljali svoj rad – unos (import) različitih tvari u stanicu ili izbacivanje (eksport) različitih tvari iz stanice (Higgins i sur., 1985; Bishop i sur., 1989).

Osnovnu građu ABC transportera čine četiri strukturne domene koje su zajedno povezane u jedinstveni i funkcionalni polipeptid – tzv. potpuni transporteri (eng. *full transporters*). To su dvije transmembranske (TM domene: TMD1 i TMD2) i dvije hidrofилne, ATP-vezne, citoplazmatske domene, tzv. nukleotidno vezne domene (eng. *nucleotide*

binding domain, NBD: NBD1 i NBD2) (Higgins, 1992; Dean i sur., 2001; Jones i George, 2004; Hollenstein i sur., 2007) (Slika 2-1). Nadalje, neki eukariotski potpuni transporteri su građeni od tri TM domene, no dodatna domena nije potrebna za sami mehanizam transporta (Slika 2-2). Osim toga, neki su transporteri građeni od samo jedne TM domene i jedne NBD domene (Slika 2-3) koje se naknadnom dimerizacijom povezuju u funkcionalan transporter – tzv. polustransporter (eng. *half transporters*).

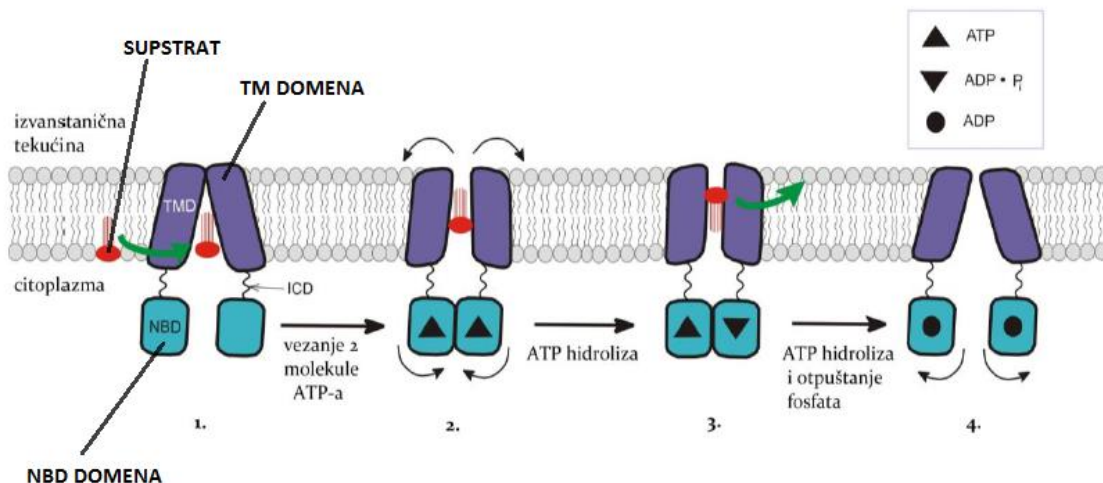


Slika 2. Osnovna struktura ABC transportera. **1.** Potpuni transporter građen od dviju transmembranskih domena (TMD) i dviju nukleotidno-veznih domena (NBD). U domeni NBD uočava se ABC potpis: A=Walker A, B=Walker B, C=motiv C. **2.** Potpuni transporter s tri domene TMD. **3.** Polustransporter kojeg grade samo jedna domena TMD i jedna domena NBD. Slika je preuzeta i prilagođena iz Couture i sur., 2006.

TM domenu čine niz α -zavojnica koje grade transmembranski kanal kroz lipidni dvosloj. Prepoznaju i vežu širok spektar različitih supstrata (Jones i George, 2004; Hollenstein i sur., 2007). NBD domene su visoko konzervirane regije i nalaze se u citoplazmi. Predstavljaju „motor“ koji koristi energiju dobivenu hidrolizom ATP-a kako bi mijenjao konformaciju transportera i time upravljao procesom unosa (importa) ili izbacivanja (eksporta). NBD domena građena je od dviju poddomena: 1) katalitička koja je veća i 2) manja helikazna koja je jedinstvena za ABC proteine. Katalitička poddomena je građena od tzv. Walker A i Walker B motiva. Walker A motiv se još naziva i P-petlja i zadužen je za vezanje nukleotida. Walker B motiv ili Q-petlja je zadužen za hidrolizu ATP-a i interakciju NBD s TM domenama. Helikaznu domenu gradi tzv. C motiv čija je funkcija da stvara kontakt nukleotida s ATP-veznim mjestom (Higgins, 1992; Dean i sur., 2001; Higgins, 2001; Jones i George, 2004; Hollenstein i sur., 2007).

1.4.2. Mehanizam transporta ABC transportnog proteina

Importer i eksporter imaju zajednički transportni mehanizam prijenosa tvari. Na Slici 3 shematski je prikazan mehanizam transporta ABC proteina. Njihov rad (unos/izbacivanje) temelji se na dvije konformacijske promjene tog proteina.



Slika 3. Predloženi mehanizam transporta supstrata putem ABC transportera (izbacivanje ili eksport). **1.** Početno stanje. Transmembranske domene (TMD) imaju takvu konformaciju da je struktura transportera (eksportera) otvorena prema citoplazmi. Supstrat se veže za TMD i uzrokuje vezanje 2 molekule ATP-a za nukleotidne vezne domene (NBD). **2.** Vezanje ATP-a uzrokuje konformacijsku promjenu NBD domena (tzv. zatvorena dimerna konformacija), a samim time i TM domena. **3.** Struktura transportera je sada otvorena prema izvanstaničnom prostoru. Supstrat se otpušta s TM domena. Dolazi do hidrolize ATP-a. **4.** ADP vraća transporter u početno stanje. Slika je preuzeta i prilagođena iz Dong i sur., 2005.

Eksporter u stanju mirovanja imaju strukturu otvorenu prema citoplazmi stanice jer je uloga eksportera supstrat iz citoplazme izbaciti iz stanice. NBD domene u stanju mirovanja

imaju tzv. otvorenu dimernu konformaciju s malim afinitetom za ATP. U ovom početnom stanju TM domene imaju veliki afinitet za vezanje supstrata pa je supstrat privučen i veže se za TM domenu transportera. Vezanjem supstrata za TM domenu raste afinitet NBD domene za ATP. NBD domena veže ATP (dvije su NBD domene pa se na 1 transporter vežu 2 molekule ATP-a). Dolazi do konformacijske promjene: NBD domena prelazi iz otvorene u tzv. zatvorenu dimernu konformaciju te mijenja konformaciju TM domene. Transporter sada ima strukturu otvorenu na suprotnoj strani tj. eksporteru su otvoreni prema izvanstaničnom prostoru. Smanjuje se afinitet TM domena za supstrat i on se otpušta u izvanstanični prostor (eksport). Dolazi do hidrolize ATP-a na NBD domeni (otpušta se fosfat), a ADP vraća transporter u početno stanje. Suprotno od eksportera, u početnom stanju (stanju mirovanja) importer ima konformaciju TM domena takvu da je struktura transportera otvorena prema izvanstaničnom prostoru. Cilj je odgovarajuću tvar (supstrat) iz izvanstaničnog prostora unijeti u stanicu. Tijekom transporta TM domene se otvore prema citoplazmatskoj strani. Opisani mehanizam rada transportera još nije do kraja razriješen (Higgins, 2001; Jones i George, 2004; Pohl i sur., 2005; Doug i sur., 2005; Davidson i sur., 2008; Oldham i sur., 2008).

1.4.3. ABC transportni proteini uključeni u MXR/MDR mehanizam

ABC proteini najbolje su istraženi kod čovjeka. Nefunkcionalnost brojnih ABC transportera kod čovjeka uzrokuje pojavu brojnih bolesti, kao npr. cistična fibroza koju uzrokuje gubitak funkcije ABCC7 proteina (Dean i sur., 2001). Danas je poznato da čovjek ima zastupljene ABC proteine iz 7 različitih potporodica (ABCA – ABCG) od kojih glavnu ulogu u MDR mehanizmu i transportu štetnih tvari (ksenobiotika, tj. citostatika) imaju ABC transporteri iz tri različite potporodice: ABCB (P-glikoprotein), ABCC (MRP proteini) i ABCG (BCRP/ABCG2 protein) (Tablica 1).

Tablica 1. Podjela humanih ABC proteina prema potporodicama i broju članova. Članovi ABCB, ABCC i ABCG (podcrtano u tablici) sudjeluju u izbacivanju ksenobiotika.

| Ime potporodice | Broj članova | Članovi uključeni u transport ksenobiotika |
|-----------------|--------------|--|
| ABCA | 12 | / |
| <u>ABCB</u> | 11 | ABCB1/P-glikoprotein (P-gp) |
| <u>ABCC</u> | 13 | ABCC1-ABCC3/MRP1-MRP3 i ABCC6-ABCC7/MRP6-MRP7 |
| ABCD | 4 | / |
| ABCE | 1 | / |
| ABCF | 3 | / |
| <u>ABCG</u> | 5 | ABCG2/BCRP |

P-glikoprotein (P-gp/ABCB1) je prvi član ABCB potporodice, a ujedno i prvi identificirani eukariotski ATP transportni protein na tumorskim stanicama (Juliano i Ling, 1976). Ima masu od 170 kDa i sadrži 1280 aminokiselina, a prema građi spada u potpune transportere (Slika 2-1). Za taj protein je dokazano da ima mogućnost transporta različitih citostatika iz tumorskih stanica čime su one postale otpornije na liječenje što je nazvano mehanizam otpornosti na razne lijekove (Danø, 1972). P-gp je zaslužan za transport lipofilnih organskih tvari, lipofilnih kationskih tvari, peptida, iona, žučne soli i ksenobiotika (Litman i sur., 2001).

ABCC potporodicu čine tzv. MRP proteini (eng. *multidrug resistance-associated proteins*) (Cole i sur., 1998). Prvi otkriveni MRP protein nazvan je još i MRP1 ili ABCC1 (190 kDa), a prema građi također pripada potpunim transporterima (Slika 2-1). Za razliku od P-gp, MRP transporteri aktivno izbacuju iz stanice organske anione i njihove konjugate, glutation, spojeve konjugirane sulfatom i ksenobiotike (Borst i sur., 2000; Holland i sur., 2003). Uz MRP1/ABCC1 u transport ksenobiotika kod čovjeka uključeni su i MRP2/ABCC2, MRP3/ABCC3, MRP6/ABCC6, te MRP7/ABCC7 (Tablica 1).

BCRP/ABCG2 je zadnji u nizu toksikološki relevantnih ABC proteina eksportera, a otkrili su ga Doyle i sur. 1998. godine u kulturi doksorubicin-otpornih MCF7 tumorskih stanica. Ovaj protein je građen od svega 655 aminokiselina (72 kDa) i pripada polutransporterima (Slika 2-3). Ime BCRP (eng. *breast cancer resistance protein*), nije odgovarajuće s obzirom na ulogu koju obavlja ili distribuciju u tkivima jer se ne nalazi samo u stanicama tkiva raka dojke. Stoga se još naziva i ABCG2 jer pripada ABCG potporodici (Dean i sur., 2001; Leslie i sur., 2005; Natarajan i sur., 2012).

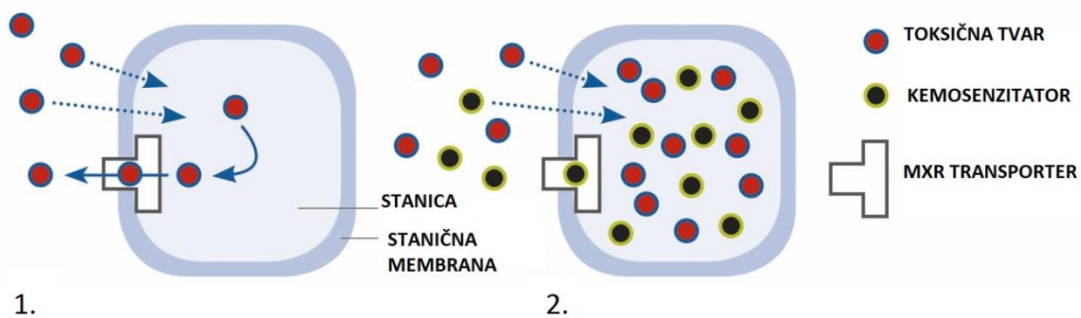
Kako su P-gp, MRP i BCRP proteini bili odgovorni za otpornost tumorskih stanica na lijekove znanstvenici su potražili tvari koje će djelovati inhibirajuće na te proteine tj. onemogućit će njihov rad i time zadržati lijek unutar tumorske stanice. Te tvari koje inhibiraju aktivni transport ABC proteina nazvane su kemosenzitatori jer su omogućile ulaz kemostatika u tumorske stanice. Prva otkrivena takva tvar bila je Verapamil ($C_{27}H_{38}N_2O_4$) koji je inhibirao P-glikoprotein (Tsuruo i sur., 1981). Kasnije je otkriven MK571 ($C_{26}H_{26}ClN_2NaO_3S_2 \cdot XH_2O$) kao inhibitor MRP proteina (Gekeler i sur., 1995; Chan i sur., 2004). Inhibitori se vežu za transporter i time onemogućuju transportnu aktivnost (Slika 4-2).

1.4.4. Značaj MXR mehanizma kod vodenih organizama

Do danas je utvrđeno da preko 40 slatkovodnih i morskih vrsta životinja, uključujući i školjkaše, morske ježince i ribe, eksprimira P-gp, MRP, BCRP i druge još neidentificirane

proteine (Sauerborn i sur., 2004; Hamdoun i sur., 2004; Luckenbach i Epel, 2008; Bošnjak i sur., 2013). Kako je već spomenuto, osnovna uloga MXR transportera u vodenim organizmima je zaštita od toksičnih tvari koje se nalaze u vodenoj sredini gdje ti organizmi žive.

Dosadašnja istraživanja su pokazala da je MXR mehanizam inducibilan (Eufemia i Epel, 2000; Smital i sur., 2003; Epel i sur., 2008). Naime, ukoliko je u vodenom okolišu prisutna visoka koncentracija određenih toksičnih tvari, u organizmu (npr. školjkašu) može doći do pojačane transkripcije i translacije gena koji kodiraju za ABC transportere uključene u MXR mehanizam. Stoga organizam koji se nalazi u onečišćenom okolišu može posjedovati više transportnih proteina od onog organizma koji se nalazi u čistom okolišu. Ovaj potonji ukoliko se prenese u onečišćenije područje ima manje šanse za opstanak jer mu MXR sustav nije dovoljno moćan da se nosi s takvim okolišem. Primjeri tvari za koje je pokazano da mogu inducirati MXR mehanizam kod školjkaša su dizel (Smital i sur., 2003) i neki metali (Archard i sur., 2004). Osim indukcije, toksične tvari u okolišu mogu djelovati na MXR transportere kao supstrati tj. njihovo vezanje za proteine uzrokuje brži rad tih proteina (potiču ih na jače djelovanje) ili kao inhibitori MXR mehanizma djeluju kao kemosenzitizatori jer blokiraju transportnu aktivnost proteina eksportera (Slika 4), što dovodi do akumulacije drugih ksenobiotika u tkivo vodenih organizama (Kurelec, 1997; Epel i sur., 2008).



Slika 4. Shematski prikaz funkcionalnog MXR mehanizma (1) i nefunkcionalnog MXR mehanizma narušenog djelovanjem kemosenzitatora (2). 1. Stanična obrana uspješno radi. MXR transporteri izbacuju štetne tvari iz stanice. 2. Stanična obrana je narušena kemosenzitatorom koji blokira aktivnost MXR transportera. Posljedica je nemogućnost izbacivanja štetnih tvari iz stanice. Slika je preuzeta i prilagođena sa internet stranice: <http://www.ufz.de/index.php?en=17251>.

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

U ovom radu smo usporedili kako dvije odabrane vrste školjkaša, od kojih je jedna autohtona, a druga invazivna, reagiraju na kontaminaciju teškim metalom cinkom ($ZnCl_2$). Upravo zbog širokog spektra tvari koje se izbacuju iz stanice MXR mehanizmom, stanični odgovor na boravak u okolišu onečišćenom cinkom procijenjen je preko aktivnosti MXR mehanizma. Praćena je aktivnost transportnih proteina MXR mehanizma lokaliziranih na škrgama dviju slatkovodnih vrsta školjkaša: autohtone vrste obične bezupke, *Anodonta anatina* (Linnaeus, 1758) i invazivne vrste istočnoazijske bezupke, *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834). Opći cilj rada bio je ustanoviti ima li invazivna vrsta školjkaša bolje razvijeni MXR mehanizam od zavičajne vrste, odnosno je li otpornost na teške metale jedan od čimbenika koji joj omogućuje bolju prilagodbu, opstanak i brže širenje u onečišćenim vodotocima.

Specifični ciljevi rada bili su:

- Utvrditi koncentraciju cinka ($ZnCl_2$) koja uzrokuje smrt stanica škržnog epitela
- Utvrditi da li se na razini aktivnosti MXR mehanizma uočava razlika između dvije vrste
- Utvrditi koji MXR transportni proteini djeluju u obrani od cinka kod ispitivanih vrsta

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Pokusne životinje

Za istraživanje su odabrane dvije vrste slatkovodnih školjkaša:

Obična bezupka, *Anodonta anatina* (Linnaeus, 1758)

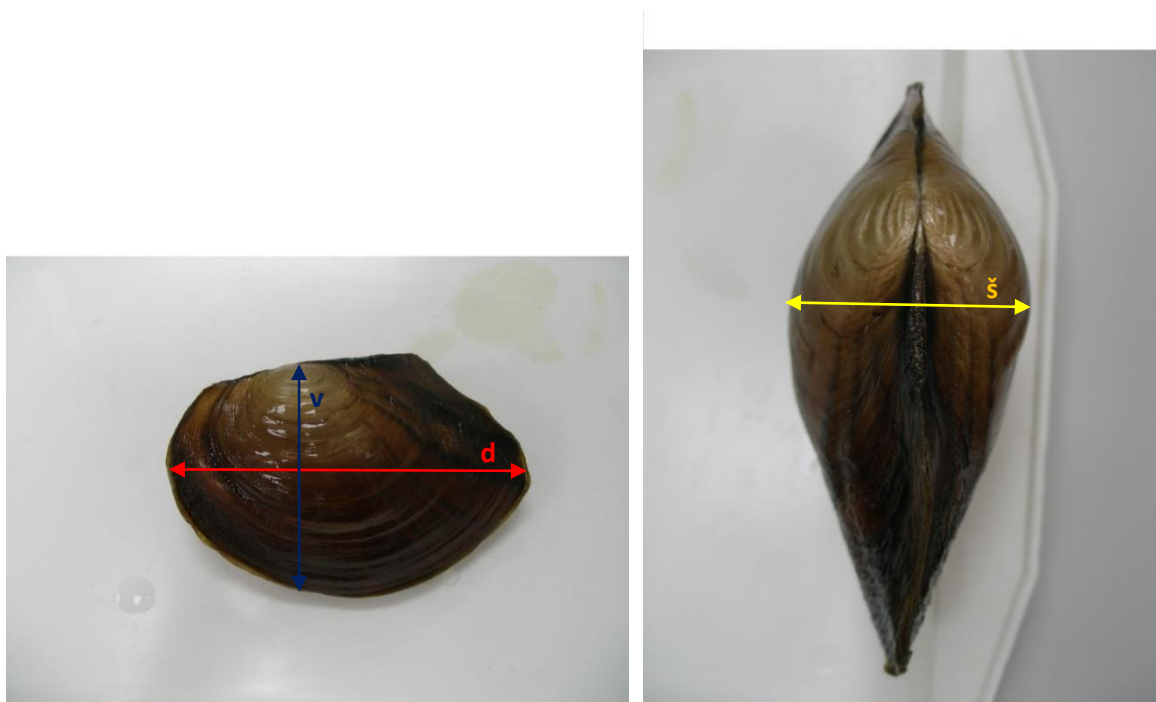
Obitava u Europi i Sjevernoj Aziji, a naseljava mirne vode (riječne uvale i jezera). Ukopava se u mulj i pijesak. Boja školjke varira i uglavnom je žućkasto-zelenkasta, no može biti i potpuno crna i smeđa. Školjka je dosta čvrta i elipsoidnog je oblika (Slika 5). Prosječne dimenzije su: duljina (d) 75 mm, visina (v) 46 mm, širina (š) 26 mm (Killeen i sur., 2004).



Slika 5. Vanjski izgled obične bezupke, *A. anatina* (lijevo: bočni prikaz; desno: prikaz leđne strane školjke). Objašnjenje: **d** - duljina; **v** - visina; **š** - širina.

Istočnoazijska bezupka, *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834)

Nativna je u tropskoj, istočnoj Aziji, prvenstveno rijeke Amur i Yangtze. Proširila se u cijelu Aziju, Europu i Ameriku, a unesena je ribama (ličinka glohidija) i kao hrana. Školjka je smeđa ili crna, u tragovima ima i zelene. Za razliku od vrste *A. anatina* školjka je krhka te je elipsoidnog do sferičnog oblika (Slika 6). Prosječne dimenzije su: duljina (d) 165 mm, visina (v) 115 mm, širina (š) 60 mm (Killeen i sur., 2004).



Slika 6. Vanjski izgled istočnoazijske bezupke, *S. woodiana* (lijevo: bočni prikaz; desno: prikaz ledne strane školjke). Objašnjenje: **d** - duljina; **v** - visina; **š** - širina.

Obje vrste školjkaša prisutne su u Hrvatskoj i skupljene su u rukavcu rijeke Drave kod mjesta Viljevo u istočnoj Slavoniji. Školjkaši su smješteni u dva akvarija dimenzija 70 cm x 40 cm x 30 cm. Temperatura vode iznosila je 18 °C, a prosječne vrijednosti kemijskih pokazatelja vode bile su: pH – 8,02; koncentracija kisika – 7,93 mg/L; zasićenje kisikom – 88,6 %. Za mjerenje je korišten Multi 3420 SET C. Dva puta tjedno školjkaši su hranjeni algom *Chlorella* sp. (tablete, PlanetBIO) tako da je svakoj jedinki dano otprilike 0,5 g tableta smrvljenih u tarioniku. Voda je mijenjana također dva puta tjedno, 2 dana nakon hranjenja. Vrijeme aklimatizacije iznosilo je tri tjedna.

U izradi ovog rada korištene su ukupno 21 jedinka zavičajne vrste školjkaša *A. anatina* i 21 jedinka invazivne vrste *S. woodiana*. Svakoj jedinki u laboratoriju su prvo

izmjerene dimenzije: duljina, širina i visina školjke (Slika 5 i 6). Ciljano su odabrane jedinke približno jednake veličine obje vrste (raspon duljina 100-110 mm). U Tablici 2 dan je prikaz mjerenih parametara duljine i širine ljuštore obje vrste školjkaša (Slika 5 i 6) kao i njihova prosječna masa.

Tablica 2. Morfometrijski parametri istraživanih vrsta školjkaša (srednje vrijednosti \pm SD).

| Morfometrijski parametri | Obična bezupka (<i>A. anatina</i>) | Istočnoazijska bezupka (<i>S. woodiana</i>) |
|----------------------------------|--------------------------------------|---|
| Duljina školjke (Slika 5 i 6; d) | 100 \pm 8 mm | 103 \pm 8 mm |
| Širina školjke (Slika 5 i 6; š) | 33 \pm 4 mm | 37 \pm 5 mm |
| Visina školjke (Slika 5 i 6; v) | 51 \pm 4 mm | 63 \pm 5 mm |

3.1.2. Kemikalije

Sve kemikalije korištene u pokusima navedene su u Tablici 3.

Tablica 3. Popis korištenih kemikalija.

| Ime (kratica) | Kemijska formula ili sastav | Proizvođač |
|---|---|--|
| Bradfordov reagens - reagens za određivanje koncentracije proteina | Sastav: 0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 boja, 8,5 % (w/v) fosfatna kiselina (H ₃ PO ₄), 4,7 % (w/v) etanol | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD (Coomassie Brilliant Blue G-250 boja) Kemika, Zagreb, Croatia (etanol, fosfatna kiselina) |
| Cinkov klorid | ZnCl ₂ | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD |
| Dimetil sulfoksid (DMSO) | C ₂ H ₆ OS | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD |
| Etanol (EtOH) | C ₂ H ₅ OH | Kemika, Zagreb, Croatia |
| MK571 | C ₂₆ H ₂₆ ClN ₂ NaO ₃ S ₂ · XH ₂ O | Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, SAD |
| PBS - fosfatni pufer pH= 7,4 | Sastav: NaCl 8 g; KCl 0,2 g; Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 1,15 g; KH ₂ PO ₄ 0,2 g; dH ₂ O 1000 mL | Sve komponente pufera nabavljene iz Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD |
| Rodamin B (RB) | C ₂₈ H ₃₁ ClN ₂ O ₃ | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD |
| Tripansko modriilo | C ₃₄ H ₂₈ N ₆ O ₁₄ S ₄ | Kemika, Zagreb, Croatia |
| Verapamil (VER) | C ₂₇ H ₃₈ N ₂ O ₄ | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD |

3.1.3. Instrumenti

Svi korišteni instrumenti navedeni su u Tablici 4.

Tablica 4. Popis korištenih instrumenata.

| Ime uređaja | Namjena uređaja u pokusu | Proizvođač |
|--|--|---|
| Tehtnica Centric 200R centrifuga | Razdvajanje tekuće faze od krute | Domel, d.o.o.; Železniki, Slovenija |
| FLUOstar OPTIMA platerreader | Određivanje akumulacije fluorescentnog supstrata unutar tkiva | BMG Labtech GmbH, Offenburg, Njemačka |
| ULTRA-TURRAX T25 homogenizator | Homogenizacija tkiva | IKA-Labortechnik |
| Thermo Scientific NanoDrop 2000c Spectrophotometer | Određivanje koncentracije proteina | Thermo Fisher Scientific; Wilmington, USA |
| Multi 3420 SET C | Mjerenje fizikalno-kemijskih pokazatelja vode | WTW; Weilheim, Njemačka |
| Svjetlosni mikroskop, ukupno povećanje 400x | Određivanje broja živih i mrtvih stanica – test vijabilnosti stanica | Binokularni mikroskop Campus 1000x |

3.2. Metode

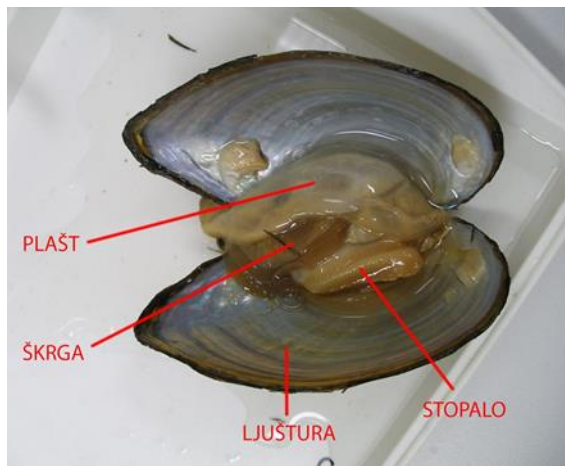
3.2.1. Izlaganje životinja cinku

Odabrano je po šest jedinki svake vrste koje su nakon toga stavljene u dva akvarija dimenzija 40 cm x 25 cm x 20 cm, u 15 L vode (svaka vrsta u zasebnom akvariju). Prilikom odabira pazilo se da jedinke budu podjednake veličine. U akvarije je zatim dodana točno određena količina cinkovog klorida ($ZnCl_2$) kako bi se postigla ciljana koncentracija, a jedinke su držane u akvarijima ukupno 7 dana na 18 °C, uz redovito hranjenje (dva puta tjedno) i svakodnevnu izmjenu vode kako bi koncentracija metala ostala konstantna. Ukupno su provedena četiri odvojena pokusa (četiri pokusna uvjeta) i ciljane koncentracije $ZnCl_2$ bile su: 1) kontrola (0 $\mu g/L$); 2) 100 $\mu g/L$; 3) 500 $\mu g/L$; 4) 2500 $\mu g/L$.

3.2.2. Izolacija škržnih diskova

Školjke su otvorene skalpelom te su pažljivo izvađene škrge (Slika 7). Izolirane škrge premještene su u Petrijevu zdjelicu s PBS-om kako bi se stanice škržnog epitela zaštitile od prebrzog odumiranja. Jedna škrga je ostavljena za izvođenje testa vijabilnosti stanica (više u poglavlju 3.2.6.) dok su iz druge škrge pomoću metalnog bušača (promjer = 5 mm) izrezani škržni diskovi (Slika 8). Iz svake jedinke je izrezano oko 20 škržnih diskova. Diskovi su dobro

isprani u PBS puferu: 5 puta po 15 mL pufera. Ispiranje služi kako sluz ne bi ometala daljnje izvođenje pokusa (npr. penetraciju inhibitora u tkivo škrga).



Slika 7. Prikaz tijela školjkaša nakon otvaranja školjke.



Slika 8. Izrezivanje škržnih diskova.

3.2.3. Akumulacija fluorescentnog supstrata u škržnim diskovima

U pet Petrijevih zdjelica s različitim reakcijskim smjesama dodan je određen broj škržnih diskova kao što je prikazano u Tablici 5. Škržni diskovi izloženi su fluorescentnom supstratu rodaminu B (RB) bez i u prisutnosti MXR inhibitora: P-gp inhibitor Verapamil (VER) ili MRP inhibitoru MK571. Dodatno su škržni diskovi bili izloženi RB i otapalima u kojima su otopljeni inhibitori (DMSO i EtOH) kako bi se isključio negativni utjecaj otapala na škržne stanice a i pazilo se da ukupna koncentracija otapala u reakcijskim smjesama bude vrlo niska (0,2 %). RB je u svim eksperimentima dodan posljednji i to u mraku. Petrijeve zdjelice su stavljene na ručno izrađeni rotirajući aparat na 90 minuta kako bi se tvari u reakcijskoj smjesi ravnomjerno izmiješale. Pokus je izvođen u mraku pri 18 °C. Koncentracija matične otopine rodamina B bila je 1 mM (u dH₂O), verapamila 10 mM (u EtOH), a MK571 20 mM (u DMSO). Koncentracija fluorescentnog supstrata RB u reakcijskim smjesama bila je 1 μM, verapamila 10 μM, a MK571 20 μM.

Tablica 5. Postava pokusa.

| Reakcijski br. | Reakcijska smjesa | Broj škržnih diskova od svake jedinice | Ukupan broj škržnih diskova |
|----------------|--|--|-----------------------------|
| 1. | 15 mL PBS 30 µL DMSO (0,2 %) 15 µL RB (1 µM) | 2 | 12 |
| 2. | 15 mL PBS 15 µL Etanol (0,2 %) 15 µL RB (1 µM) | 2 | 12 |
| 3. | 30 mL PBS 30 µL RB (1 µM) | 4 | 24 |
| 4. | 30 mL PBS 60 µL MK571 (20 µM) 30 µL RB (1 µM) | 4 | 24 |
| 5. | 30 mL PBS 30 µL VER (10 µM) 30 µL RB (1 µM) | 4 | 24 |

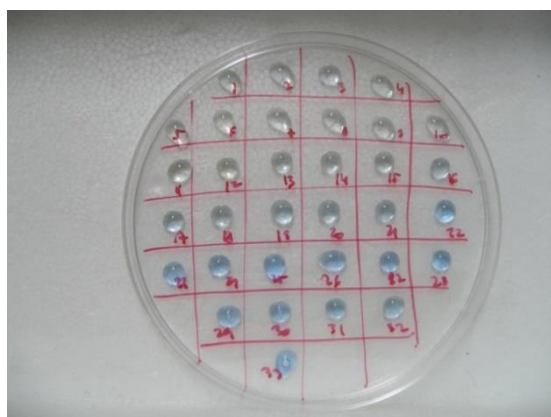
3.2.4. Mjerenje fluorescentnih (FU) vrijednosti

Nakon što je prošlo 90 minuta škržni diskovi su iz svake Petrijeve zdjelice prebačeni u novu Petrijevu zdjelicu sa čistom otopinom PBS-a kako bi se isprao višak RB koji se nalazi na površini škržnog diska. Zatim je svaki škržni disk izvađen, posušen na papiru i stavljen u zasebnu Eppendorf epruvetu („epicu“) napunjenu s 0,5 mL PBS-a. Sadržaj u epicama je nakon toga homogeniziran (oko 10 sekundi) i centrifugiran 5 minuta pri 10 000 x g i 4 °C. Supernatant (100 µL) je u triplikatima raspoređen u crne mikrotitarske pločice s 96 jažica. Fluorescencija je očitana pomoću FLUOstar OPTIMA plate reader uređaja: ekscitacija pri 544 nm, emisija pri 590 nm.

3.2.5. Određivanja prosječne koncentracije proteina u škržnom disku

Za određivanje prosječne koncentracije proteina u škržnom disku korištena je Bradfordova metoda (Bradford, 1976) s određenim modifikacijama. Bradfordova metoda služi za semikvantitativno određivanje koncentracije proteina i temelji se na interakciji boje Coomassie Brilliant Blue G-250 (koja se nalazi u sastavu Bradfordovog reagensa) i proteina. Coomassie Brilliant Blue G-250 je crvenkasto-smeđe boje, a kad se veže za protein mijenja boju u plavu. Što je veća koncentracija proteina u otopini jači je intenzitet plave boje i veća apsorbanacija takve otopine pri valnoj dužini 595 nm.

Uzeta su 24 škržna diska od svake vrste školjkaša i stavljena u 500 μ L PBS-a. Uzorci su sonicirani oko 10 sekundi (ULTRA-TURRAX T25 homogenizator) i centrifugirani 5 minuta pri 10 000 x g i 4 °C. Radna otopina pripravljena je miješanjem otopine za određivanje koncentracije proteina i uzorka u omjeru 4:1 (20 μ L reagensa i 5 μ L uzorka) (Slika 9), a nakon toga inkubirana 10 minuta pri 21 °C. Kao standard su korištene otopine goveđeg serumskog albumina (eng. *bovine serum albumine*, BSA) u koncentracijama 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 i 1 mg/mL (Bio-Rad). Apsorbancija 2 μ L radne otopine pri 595 nm je mjerena na uređaju NanoDrop 2000c. Kao slijepa proba je korišten PBS. Sva mjerenja standarda su rađena u triplikatima, a uzoraka u duplikatima. Ovisnost apsorbancije pri 595 nm o koncentraciji proteina standarda aproksimirana je pravcem, te je iz jednadžbe pravca dobivene pomoću programa Microsoft Office Excel 2007 određena koncentracija proteina u uzorcima.



Slika 9. Radna otopina pripravljena je kao kapljica u kojoj su pomiješani Bradfordov reagens i uzorak u omjeru 4:1 (20 μ L reagensa i 5 μ L uzorka). Svaki uzorak rađen je kao duplikat.

3.2.6. Test za određivanje vijabilnosti stanica

Za određivanje vijabilnosti stanica korištena je otopina tripanskog modrila. Princip ove metode je da boja ulazi u citoplazmu mrtvih stanica koje, za razliku od živih stanica, nemaju funkcionalnu membranu koja bi onemogućila ulaz boje. Na taj način su se pod mikroskopom mogle razlikovati žive, neobojane stanice od mrtvih stanica koje su poprimile plavu boju.

Otopina tripanskog modrila pripravljena je na sljedeći način: (1) 4,25 g NaCl otopljeno je u 100 mL dH₂O; (2) 0,2 g tripanskog modrila otopljeno je u 100 mL dH₂O (0,2 % otopina). Otopine (1) i (2) izmiješane su u omjeru 1:4.

Iz svake jedinke je izolirana škrğa koja je nakon toga prebačena u posudicu s PBS-om (detaljan postupak objašnjen je u poglavlju 3.2.2.). U špricu s iglom navučen je PBS iz posudice i jakim mlazom je isprana škrğa. Na taj su se način u puferu nakupile stanice škržnog epitela koje su se oslobodile iz tkiva pri snažnom mlazu. PBS sa stanicama (2 mL)

prikupljen je u Eppendorf epruvetu te centrifugiran 5 minuta pri 500 x g i 4 °C kako bi se oborile stanice. Iz svake škrge uzeta su po 2 uzorka (duplikati). Višak supernatanta je uklonjen tako da je ostao talog u 0,1 mL PBS-a. Na predmetno stakalce najprije je stavljena kapljica (10 µL) tripanskog modrila, a zatim je u nju dodano 10 µL suspenzije stanica. Tako pripremljen preparat poklopljen je pokrovnicom te je uslijedilo mikroskopiranje (Binokularni mikroskop Campus, ukupno povećanje mikroskopa 400x).

3.2.7. Statistička obrada podataka

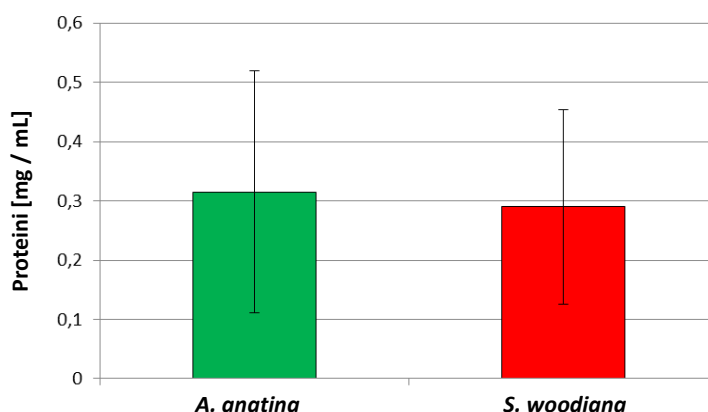
Statističke obrade podataka izvedene su pomoću računalnog programa STATISTICA 7.0. i Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, 2007). Za grafičku i statističku obradu podataka korišteni su programi Statistica 7.0 (Statsoft Inc., 2000) i Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, 2007).

Da bi odabrali prave metode za statističku analizu podataka prvo je ustanovljeno uz pomoć Kolmogorov-Smirnov i Liliefors testa da su podatci normalno distribuirani. Kako je test pokazao normalnu distribuciju podataka, za daljnju analizu korištene su parametrijske metode. Da bi ustanovili koja vrsta je otpornija na stresne uvjete i postoje li razlike u različitim stresnim uvjetima, korištena je parametrijska analiza varijanci s više kategoričkih varijabli (Faktorijalna ANOVA). Kako bi se ustanovilo da li tvari u kojima su otopljeni inhibitori, dimetilsulfoksid (DMSO) i etanol (EtOH) imaju utjecaj na rad membranskih transportera provedena je parametrijska analiza varijanci s jednom kategoričkom varijablom (ANOVA). Post-hoc testom (Tukey post-hoc test za nejednako velike uzorke) ustanovljeno je koji se točno pokusni uvjeti razlikuju unutar i između. Hi-kvadrat testom (χ^2 test) smo odredili postoji li statistički značajna razlika u broju živih i mrtvih stanica između različitih pokusnih uvjeta unutar svake vrste. U svim statističkim testovima korištena je razina značajnosti od 1 %.

4. REZULTATI

4.1. Ukupna koncentracija proteina u škržnom disku

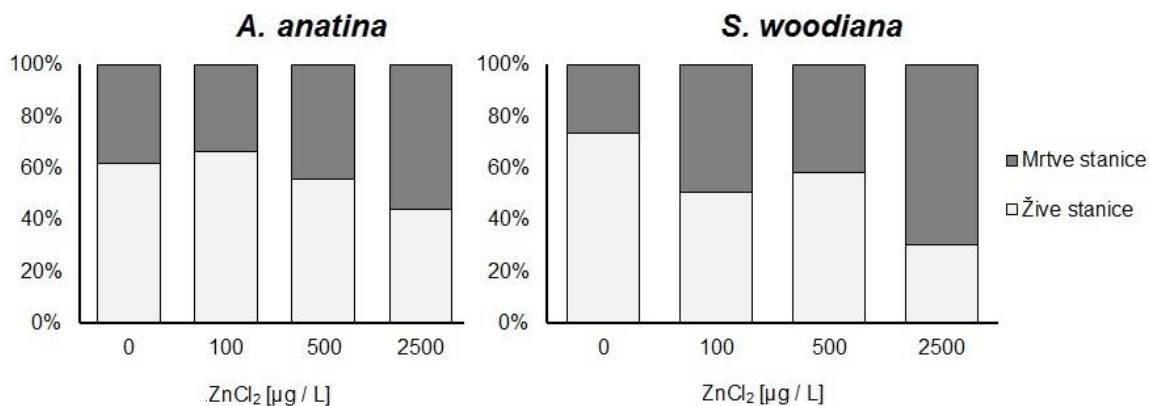
Postupkom opisanim u poglavlju 3.2.6. dobivena je srednja vrijednost ukupne koncentracije proteina u jednom škržnom disku koja iznosi 0,3 mg/mL za obje vrste ispitivanih školjkaša (Slika 10).



Slika 10. Prosječna koncentracija proteina (mg / mL) \pm SD u škržnom disku.

4.2. Vijabilnost stanica škrge nakon izlaganja cinku

Školjkaši (*A. anatina* i *S. woodiana*) bili su izloženi trima različitim koncentracijama cinka (100, 500 i 2500 μ g / L $ZnCl_2$) tijekom sedam dana. Kako bi ustanovili da li je zbog izlaganja cinku došlo do smrti (apoptoze) škržnih stanica proveli smo test vijabilnosti stanica te smo usporedili rezultate za školjkaše izložene cinku sa rezultatima za školjkaše iz kontrolne skupine (Slika 11).



Slika 11. Postotak živih i mrtvih stanica u škržnom epitelu školjkaša.

Rezultati testa vijabilnosti stanica statistički su provjereni Hi-kvadrat (χ^2) testom. Postojala je statistički značajna razlika u broju mrtvih i živih stanica između različitih pokusnih uvjeta unutar svake vrste (Hi-kvadrat test: $\chi^2_{Aa} = 68,83$; $p < 0,001$; $\chi^2_{sw} = 26,66$, $p < 0,001$). Na Slici 11 jasno se uočava da kontrola (bez prisutnosti cinka) ima visoki postotak živih stanica (> 60 %), naročito kod vrste *S. woodiana* gdje je samo 20 % stanica bilo mrtvo. Rezultati pri najnižoj (100 $\mu\text{g/L}$) i srednjoj (500 $\mu\text{g/L}$) koncentraciji cinka pokazuju određeni porast postotka mrtvih stanica ali i dalje je više od 50% živih stanica. Pri najvišoj koncentraciji cinka (2500 $\mu\text{g/L}$) dolazi do značajnog porasta broja mrtvih stanica, odnosno utvrđeno je oko 60 % mrtvih stanica kod vrste *A. anatina* i oko 70 % mrtvih stanica kod vrste *S. woodiana*.

4.3. Aktivnost MXR mehanizma u stanicama škržnog epitela izloženih cinku

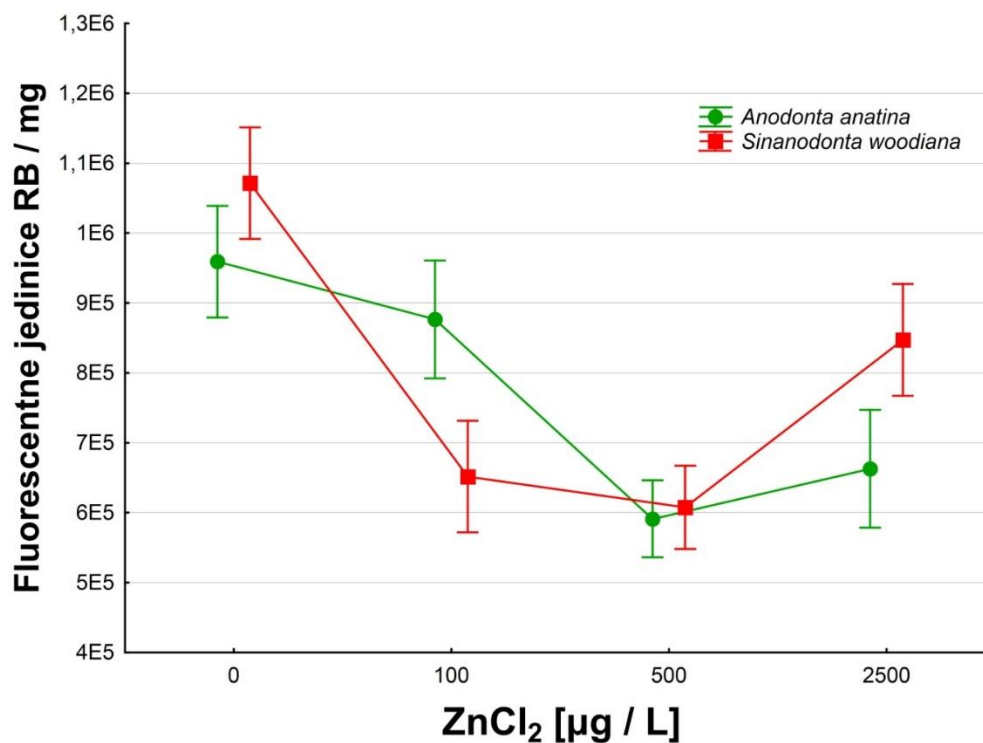
Razina MXR transportne aktivnosti u škržnom tkivu ispitivanih školjkaša izloženih različitim koncentracijama cinka mjerena je preko razine akumulirane fluorescentne boje rodamina B (RB). RB pasivno (difuzijom) ulazi u stanice, a iz njih se izbacuje aktivno, putem MXR transportne aktivnosti (Neyfakh, 1988). Stoga je količina akumuliranog RB u tkivu mjera aktivnosti MXR transportera: viša izmjerena fluorescencija tkiva znači manju aktivnost transportera i obratno.

Mjerena je razina akumuliranog RB u škržnim diskovima uzetim iz kontrolne grupe školjkaša (jedinke koje nisu izložene cinku), kao i iz grupa školjkaša koji su bili izlagani trima različitim koncentracijama cinka (100, 500 i 2500 $\mu\text{g/L ZnCl}_2$) tijekom sedam dana. Izolirani škržni diskovi su izloženi 1 μM RB kroz 90 minuta (reakcijska smjesa 3, poglavlje 3.2.3) i nakon toga je određena vrijednost fluorescencije za obje ispitivane vrste, *A. anatina* i *S. woodiana*. Fluorescencija je izražena za 1 mg ukupnih proteina, koristeći vrijednost prosječne koncentracije proteina u škržnom disku (vidi poglavlje 4.1). Rezultati ovog pokusa prikazani su na Slici 12.

Kod kontrole (bez cinka) izmjerene su visoke fluorescentne vrijednosti akumuliranog RB kod obje vrste školjkaša. Post-hoc testom (Tukey post-hoc test za nejednako velike uzorke) pokazano je kako postoji statistički značajna razlika u količini fluorescencije RB između pojedinih pokusnih uvjeta (Faktorijalna ANOVA: $F(3,89) = 47,27$, $p < 0,01$), ali ne i između vrsta ($F(1,89) = 0,67$, $p = 0,42$). Detaljni rezultati Post-hoc analize prikazani su u Tablici 6.

U grupi školjkaša koji su bili izloženi najnižoj (100 $\mu\text{g/L}$) koncentraciji cinka izmjerene su značajno niže vrijednosti akumuliranog RB u odnosu na kontrolu za vrstu *S. woodiana* (1,7 puta). Međutim, kod vrste *A. anatina* izložene najnižoj koncentraciji cinka nije utvrđena

značajna razlika u akumulaciji RB u odnosu na kontrolu. Nakon izlaganja srednjoj koncentraciji cinka (500 $\mu\text{g/L}$) izmjerene su značajno niže vrijednosti akumuliranog RB u odnosu na kontrolu: 1,6 puta za vrstu *A. anatina* i 1,8 puta za vrstu *S. woodiana*. U grupi školjkaša koje su bile izložene najvišoj koncentraciji cinka (2500 $\mu\text{g/L ZnCl}_2$) vidljiv je porast fluorescentnih vrijednosti akumuliranog RB kod obje vrste u odnosu na vrijednosti dobivene nakon izlaganja srednjoj koncentraciji cinka. Iz Slike 12 vidljivo je da je taj porast značajniji kod vrste *S. woodiana* nego kod vrste *A. anatina*.



Slika 12. Ukupna akumulacija RB u škržnom tkivu po masi škržnih proteina (fluorescentne jedinice RB/mg) u kontroli (0 ZnCl_2) i grupama školjkaša koji su bili izlagani trima različitim koncentracijama cinka (100, 500 i 2500 $\mu\text{g/L ZnCl}_2$).

Post-hoc testom (Tukey post-hoc test za nejednako velike uzorke) utvrđeno je kako pri koncentraciji 100 $\mu\text{g/L}$ postoji statistički značajna razlika između vrsta u istom pokusnom uvjetu, pri čemu je količina fluorescencije RB kod *S. woodiana* statistički značajno niža (Slika 12; Tablica 6). Detaljni rezultati Post-hoc analize prikazani su u Tablici 6.

Tablica 6. Rezultati Tukey post-hoc testa za nejednolike uzorke.

Statistički značajne razlike između pojedinih pokusnih uvjeta i vrsta označene su podebljano i crvenom bojom. Aa označava zavičajnu vrstu *A. anatina*, a Sw invazivnu vrstu *S. woodiana*.

| Vrsta | Pokusni uvjet (ZnCl ₂ [µg / L]) | Aa | | | | Sw | | | |
|-------|--|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | | 0 | 100 | 500 | 2500 | 0 | 100 | 500 | 2500 |
| Aa | 0 | | 0,8641 | 0,0001 | 0,0002 | 0,5032 | 0,0001 | 0,0001 | 0,5091 |
| Aa | 100 | 0,8641 | | 0,0003 | 0,0132 | 0,0330 | 0,0073 | 0,0006 | 0,9998 |
| Aa | 500 | 0,0001 | 0,0001 | | 0,9307 | 0,0001 | 0,9623 | 0,9999 | 0,0006 |
| Aa | 2500 | 0,0002 | 0,0132 | 0,9307 | | 0,0001 | 1,000 | 0,9833 | 0,0538 |
| Sw | 0 | 0,5032 | 0,0330 | 0,0001 | 0,0001 | | 0,0001 | 0,0001 | 0,0039 |
| Sw | 100 | 0,0001 | 0,0073 | 0,9623 | 1,000 | 0,0001 | | 0,9941 | 0,0193 |
| Sw | 500 | 0,0001 | 0,0006 | 0,9999 | 0,9833 | 0,0006 | 0,9941 | | 0,0001 |
| Sw | 2500 | 0,5091 | 0,9997 | 0,0006 | 0,0538 | 0,0039 | 0,0193 | 0,0016 | |

4.4. Inhibicija MXR mehanizma

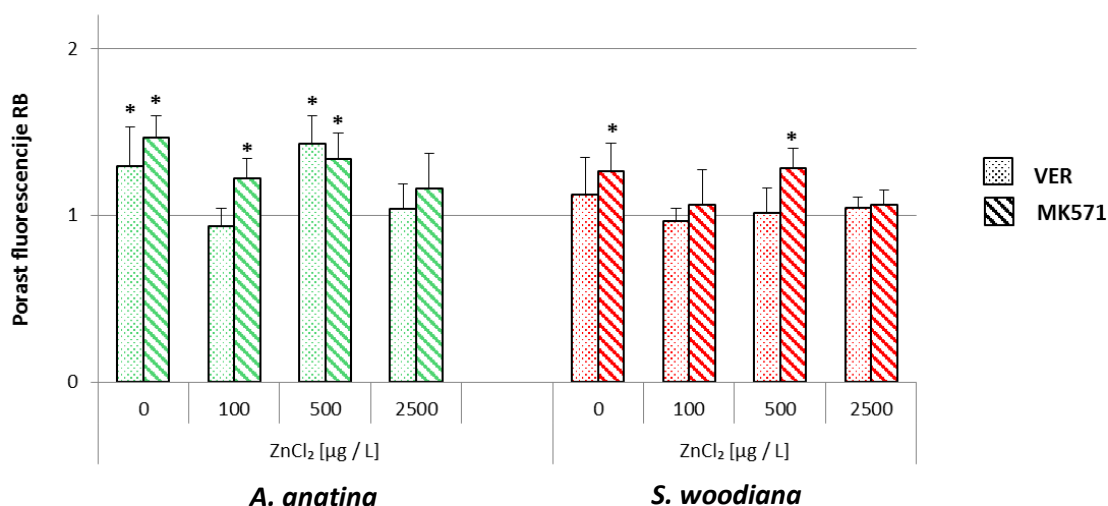
Škržni diskovi uzeti su iz kontrolne grupe (jedinke koje nisu izložene cinku), kao i iz grupa koje su bile izlagane različitim koncentracijama cinka (100, 500 i 2500 µg/L ZnCl₂) tijekom sedam dana te izloženi fluorescentnom supstratu RB (1 µM) uz prisutnost specifičnih MXR inhibitora: MK571 (20 µM) je MRP inhibitor, a VER (10 µM) je P-gp inhibitor (vidi poglavlje 3.2.3). Mjerenje je napravljeno za obje ispitivane vrste, *A. anatina* i *S. woodiana* te su fluorescencije izmjerene nakon izlaganja RB i inhibitoru (poglavlje 3.2.3., reakcijske smjese 4 i 5) uspoređene s fluorescencijama izmjerenim u kontrolnim reakcijama (poglavlje 3.2.3., reakcijske smjese 1 i 2). Rezultati su prikazani na Slici 13.

Dobiveni rezultati za kontrolne skupine (bez cinka) pokazuju da kod vrste *A. anatina* oba inhibitora, i VER i MK571, uzrokuju značajan porast akumulacije RB fluorescencije (oko 1,2 puta) u škržnim stanicama u odnosu na kontrolu ($p \ll 0,01$; One-way ANOVA test). To ukazuje na aktivnost oba tipa MXR transportera – i P-gp i MRP, u škržnom tkivu vrste *A. anatina*. U usporedbi s tim, kod vrste *S. woodiana* u kontrolnoj grupi (bez cinka) uočava se porast akumulacije RB fluorescencije u odnosu na kontrolu samo nakon izlaganja MK571 inhibitoru (oko 1,3 puta; $p \ll 0,01$; One-way ANOVA test). Ovaj rezultat ukazuje na dominantnu prisutnost MRP transportera u škržnim stanicama ove vrste.

Nadalje, iz Slike 13 vidi se da je u škržnim diskovima vrste *A. anatina* izložene najnižoj (100 µg/L) koncentraciji cinka došlo do značajnog porasta akumulacije RB fluorescencije u prisutnosti MRP inhibitora (~ 1,2 puta; $p \ll 0,01$; One-way ANOVA test), dok u škržnim diskovima grupe sa srednjom (500 µg/L) koncentracijom cinka u prisutnosti oba

inhibitora, i VER i MK571 (~ 1,5 puta; $p < 0,01$; One-way ANOVA test). Ovi rezultati ukazuju na prisutnost aktivnosti oba tipa MXR transportera – i P-gp i MRP, u škržnom tkivu jedinki vrste *A. anatina* koje su bile izložene cinku. No, u škržnim diskovima grupe izložene najvišoj (2500 $\mu\text{g/L}$) koncentraciji cinka nije zabilježen značajni porast akumulacije RB fluorescencije u prisutnosti MXR inhibitora (Slika 13). U usporedbi s tim, kod vrste *S. woodiana* u škržnim diskovima izloženim cinku izmjeren je značajan porast akumulacije RB (~ 1,3 puta; $p < 0,01$; One-way ANOVA test) samo pri 500 $\mu\text{g/L}$ cinka i u prisutnosti MRP inhibitora (MK571) (Slika 13). Ostali tretmani se nisu značajno razlikovali od kontrole bez inhibitora.

Iz ovih rezultata zaključujemo da kod vrste *S. woodiana* prevladava MRP tip transportera nad P-gp tipom, za razliku od vrste *A. anatina* gdje su podjednako prisutna oba tipa transportera. Pri najmanjoj i najvišoj (100 i 2500 $\mu\text{g/L}$) koncentraciji cinka nije zabilježen nikakav značajni porast akumulacije RB fluorescencije u prisutnosti MXR inhibitora (Slika 13).



Slika 13 Aktivnost MXR mehanizma u uvjetima različitih koncentracija cinka i u prisutnosti MRP (20 μM MK571) i P-gp (10 μM VER) inhibitora. Stupci prikazuju razinu porasta akumulacije supstrata (1 μM RB) u odnosu na kontrolne vrijednosti (srednja vrijednost \pm SD). (*) - statistički značajan porast u odnosu na kontrolu.

5. RASPRAVA

Temelje mehanizma multiksenobiotičke rezistentnosti (MXR mehanizam) u znanost je uveo hrvatski znanstvenik i akademik Branko Kurelec 1992. godine (Kurelec, 1992). MXR mehanizam služi u obrani vodenih organizama/stanica od štetnih tvari koje se nađu u okolišu. Danas se rade mnogobrojna istraživanja MXR mehanizma na raznim skupinama organizama, a naročito se koriste vodeni test organizmi (npr. školjkaši, morski ježinci) zbog svoje izloženosti različitim otopljenim tvarima iz okoliša u kojem borave (Della Torre i sur., 2013; Bošnjak i sur., 2013). Vodeni su ekosustavi najizloženiji raznim antropogenim štetnim tvarima pa stoga aktivnost MXR mehanizma omogućuje preživljavanje u takvim uvjetima. Glavni izvršitelji MXR mehanizma su ABC transportni proteini i to određeni članovi iz triju potporodica: ABCB (ABCB1/P-gp; P-glikoprotein), ABCC (ABCC1-3/MRP1-3; eng. *multidrug resistance-associated protein*) i ABCG (ABCG2/BCRP; eng. *breast cancer resistance protein*) (Cole i Deeley, 1998; Leslie i sur., 2005). Glavna osobina ABC transportnih proteina jest nespecifičnost za supstrat što znači da mogu izbacivati široki spektar endogenih i egzogenih tvari, uključujući i one antropogenog podrijetla, iz stanice ili organizma (Bard, 2000; Smital i sur., 2004).

U ovom radu odabrane su dvije vrste slatkovodnih školjkaša kao test organizmi: zavičajna *Anodonta anatina* i invazivna *Sinanodonta woodiana* (Slike 5 i 6). Glavni cilj bio je utvrditi razinu aktivnosti MXR mehanizma u škržnom tkivu, uz hipotezu da je vrsta *S. woodiana* kao invazivna otpornija na potencijalno zagađenje iz okoliša zbog brže aktivacije MXR transportera. Škržno tkivo je zbog filtracije vode primarno tkivo obrane od različitih prirodnih i antropogenih toksičnih tvari (npr. pesticida) kod školjkaša i poznato je da je u tom tkivu prisutna visoka razina MXR transportne aktivnosti (Smital i sur., 2004; Stevenson i sur. 2006; Luckenbach i Epel 2008).

Istraživani školjkaši, *A. anatina* i *S. woodiana*, izloženi su teškom metalu cinku (u obliku $ZnCl_2$) tijekom sedam dana. Poznato je da se cink bioakumulira u različitim tkivima školjkaša, uključujući i škrge, kao i u tkivima drugih vodenih organizama (Sakellari i sur., 2013). U europskim slatkim vodama koncentracija otopljenog cinka se kreće od 1 do 40 $\mu g/L$, a istraživanja su pokazala da ne postoji jasan odnos između koncentracije otopljenog cinka u vodi i toksičnosti prema vodenim organizmima (Bodar i sur., 2005). Koncentracije cinka korištene u ovom radu odabrane su na temelju rezultata iz literature. Naime, jedinke školjkaša *Corbicula fluminea* izložene su koncentraciji cinka od 500 $\mu g/L$ i nakon tri dana došlo je do značajnog porasta količine P-gp-a, odnosno do indukcije MXR mehanizma (Achard i sur., 2004). Na temelju toga smo se odlučili za slijedeće koncentracije cinka: 1) 100 $\mu g/L$, kao 5 puta niža od one korištene u prethodno spomenutom radu, a ujedno i koncentracija cinka najbliža okolišnim koncentracijama (Achard i sur., 2004; Bodar i sur.,

2005); 2) 500 µg/L kao koncentracija za koju je utvrđeno da inducira aktivaciju MXR transportera; i 3) 2500 µg/L kao 5 puta viša koncentracija. Razina MXR transportne aktivnosti u škržnom tkivu ispitivanih školjkaša izloženih različitim koncentracijama cinka mjerena je preko razine akumulacije fluorescentne boje rodamina B (RB). RB je specifičan test supstrat i indikator aktivnosti MXR transportne aktivnosti (Neyfakh, 1988): niska akumulacija RB govori o visokoj razini MXR transportne aktivnosti i obrnuto (Smital i Kurelec, 1998). Test izlaganja supstratu RB rađen je na škržnim diskovima, prema prethodno opisanoj i često korištenoj metodi (Luckenbach i Epel, 2005, 2008).

Iz literature je poznato da cink, kao i drugi teški metali, može uzrokovati smrt (apoptozu) stanica škržnog epitela. Hietanen i sur. (1988) u svom radu na morskom školjkašu *Mytilus edulis* uočili su da izlaganje tkiva tog školjkaša cinku uzrokuje propadanje mukoznih stanica i hemocita iz škrge. Mrtve stanice imaju nefunkcionalan MXR mehanizam te nakupljaju u sebi fluorescentnu tvar RB. Kako su i srednja i najveća koncentracija cinka znatno više od okolišnih koncentracija (1 to 40 µg/L; Bodar i sur., 2005) proveli smo test vijabilnosti stanica kako bi ustanovili da li je izlaganjem školjkaša visokim koncentracijama cinka došlo do smrti stanica škržnog epitela koje iz toga razloga više nemaju aktivan MXR mehanizam (Slika 11). Važno je napomenuti da određeni broj škržnih stanica umire i samim postupkom provođenja testa vijabilnosti koji je opisan u poglavlju 3.2.6. Ipak iz dobivenih rezultata jasno je utvrđeno da je najveća ispitivana koncentracija cinka (2500 µg/L ZnCl₂) uzrokovala značajan porast broja mrtvih stanica u usporedbi s kontrolnom skupinom kod obje vrste školjkaša, *A. anatina* i *S. woodiana*, proučavanih u ovom radu. Ovaj rezultat je i bio očekivan s obzirom da su školjkaši bili izloženi oko 60 puta većoj koncentraciji cinka od onih zabilježenih u okolišu. Bitno je razlikovati nakupljanje fluorescentnog supstrata RB zbog oslabljenog rada ABC proteina nasuprot potpuno nefunkcionalnog MXR mehanizma kod mrtvih stanica.

Poznato je da je MXR mehanizam inducibilan. Ako se neki organizam nalazi u zagađenijem okolišu njegov MXR mehanizam je više eksprimiran nego kod onog organizma koji obitava u čistoj okolini (Eufemia i Epel, 2000; Smital i sur., 2003; Epel i sur., 2008). Nasuprot tome, u prisutnosti tvari koje djeluju kao inhibitori ABC transportnih proteina dolazi do nefunkcionalnosti MXR mehanizma što uzrokuje nakupljanje toksičnih tvari unutar organizma ili stanice (Kurelec, 1997; Epel i sur., 2008). U testu aktivnosti MXR mehanizma preko RB kao supstrata koji smo primijenili u ovom radu, indukcija MXR mehanizma dovest će do smanjenja akumulacije fluorescencije u tkivu (eksporterer pojačano izbacuju RB iz stanice). Suprotno, inhibicija MXR mehanizma uzrokovat će povećanje akumulacije fluorescencije u odnosu na kontrolu (eksporterer slabije izbacuju RB iz stanice).

U sljedećoj etapi našeg istraživanja promatrali smo aktivnost MXR mehanizma u škržnom tkivu grupa školjkaša koje su bile izložene različitim koncentracijama cinka (100, 500 i 2500 $\mu\text{g/L ZnCl}_2$) kroz sedam dana. Zanimalo nas je da li je nakon tog sedmodnevnog izlaganja stresu došlo do indukcije MXR transportne aktivnosti mjerene preko razine akumulacije fluorescentnog supstrata RB u škržnim diskovima u odnosu na kontrolu (Slika 12). Za razliku od testa vijabilnosti u ovim rezultatima postoje odstupanja u odgovorima između dvije ispitivane vrste. Iz rezultata se vidi da kod vrste *A. anatina* indukcija MXR transportne aktivnosti je zabilježena tek pri srednjoj koncentraciji cinka (500 $\mu\text{g/L ZnCl}_2$), dok je kod invazivne vrste *S. woodiana* ta indukcija zabilježena već pri najnižoj koncentraciji cinka (100 $\mu\text{g/L ZnCl}_2$). Upravo je pri toj koncentraciji zabilježena i jedina statistički značajna razlika u količini fluorescencije RB između vrsta. Kod najviše koncentracije cinka (2500 $\mu\text{g/L ZnCl}_2$) izmjeren je porast razine akumulacije fluorescentnog supstrata RB u škržnim diskovima obje ispitivane vrste školjkaša. Ovaj rezultat je u skladu sa rezultatima mjerenja vijabilnosti stanica (Slika 11), odnosno zabilježeni porast izmjerene razine fluorescencije RB odgovara povećanom broju mrtvih stanica u škržnim diskovima kao posljedica izloženosti visokim koncentracijama cinka.

Nadalje, u ovom istraživanju je pokazano da nema značajne razlike u bazalnoj aktivnosti MXR mehanizma u škrgama dvaju ispitivanih srodnih vrsta školjkaša, barem kad je u pitanju RB kao supstrat (Slika 12, bez cinka). U drugim studijama utvrđene su razlike između različitih vrsta vodenih beskralješnjaka u akumulaciji MXR supstrata. Smital i sur. (2000) istraživali su MXR mehanizam kod nekoliko vrsta morskih (*Mytilus galloprovincialis*, *Monodonta turbinata*, *Patella lusitanica*) i slatkovodnih mekušaca (*Dreissena polymorpha*, *Viviparus viviparus*, *Anodonta cygnea*). Tim radom pokazano je da u vodenih organizama postoji određena razina aktivnosti MXR transportera specifična za određenu vrstu.

Franco i sur. (2006) istraživali su utjecaj cinka na stanice škrge kod školjkaša *Perna perna*. Kao i u ovom radu koristio se fluorescentni supstrat rodamin B (RB). Životinje su bile izložene koncentracijama od 1363, 4089 i 13630 $\mu\text{g/L ZnCl}_2$ kroz 2 dana. Pri 4089 $\mu\text{g/L}$ cinka došlo je do smanjenja akumulacije RB u stanicama škrge ukazujući da je došlo do indukcije MXR mehanizma. Naši rezultati su pokazali da je kod invazivne vrste *S. woodiana* aktivacija MXR transportne aktivnosti zabilježena pri puno nižoj koncentraciji cinka (100 $\mu\text{g/L ZnCl}_2$; Slika 12). Međutim, u usporedbi sa spomenutim istraživanjem naše vrijeme tretmana je bilo puno duže (7 naspram 2 dana). Najzanimljiviji rezultat dobiven je kod vrste *A. anatina* gdje je smanjenje akumulacije RB u stanicama škrge, ukazujući da je došlo do indukcije MXR mehanizma, zabilježeno tek pri izlaganju srednjoj koncentraciji ispitivanog cinka (500 $\mu\text{g/L ZnCl}_2$; Slika 12). Ovaj rezultat pokazuje da zavičajna vrsta *A. anatina* ima sporiji mehanizam aktivacije MXR transportne aktivnosti u odnosu na invazivnu vrstu *S. woodiana*. Ova razlika

bi mogla dati prednost invazivnoj vrsti u zagađenim staništima i olakšati njezino invazivno širenje.

Kako bi se dodatno razjasnila ova razlika, u planu je i određivanje razine akumulacije cinka u tkivu tretiranih jedinki. Nedavno su pokazane razlike u akumulaciji teških metala između različitih vrsta školjkaša (Faria i sur., 2010; Sakellari i sur., 2013). Rezultati istraživanja u Španjolskoj na invazivnim vrstama školjkaša *Dreissena polymorpha* i *Corbicula fluminea* te zavičajnoj vrsti *Psilunio littoralis* utvrdila su da su invazivne vrste akumulirale manje žive od zavičajne vrste (Faria i sur., 2010). Stoga njihov rezultat moguće ukazuje na bolju aktivnost MXR mehanizma u transportu žive kod invazivnih vrsta, što je potvrđeno i u drugim istraživanjima (Bošnjak i sur., 2009; Bošnjak i sur., 2011). Ipak, Faria i sur. (2010) su primarno mjerili odgovor školjkaša na antioksidativni i oksidativni stres uzrokovan živom mjereći aktivnost određenih enzima: glutation S transferaze, proteina metalotioneina, lomova DNA molekula i razinu lipidne peroksidacije. Zanimljivo, rezultati tih mjerenja ukazuju da nativna vrsta ima bolju aktivnost svih mjerenih enzima i time Faria i sur. (2010) zaključuju da su nativne vrste otpornije na zagađenje u odnosu na invazivne. U svakom slučaju, da bi smo potvrdili ili opovrgnuli njihove zaključke potrebna su dodatna istraživanja na ovdje ispitivanim vrstama školjkaša, *A. anatina* i *S. woodiana*.

Kako je već prije spomenuto, osim tvari koje su supstrat ovim transporterima postoje i tvari koje djeluju inhibitorno na ABC transportere i tako onemogućavaju rad MXR mehanizma. U ovom radu korištene su dvije inhibitorne tvari; verapamil (VER) koji inhibira P-gp (Tsuruo i sur., 1981) i MK571 koji inhibira MRP proteine (Gekeler i sur., 1995; Chan i sur., 2004). I P-gp i MRP sudjeluju u MXR mehanizmu školjkaša (Luckenbach i Epel, 2005; Della Torre i sur., 2013). Nakon sedmodnevnog izlaganja različitim koncentracijama cinka, škržni diskovi odabranih vrsta školjkaša izloženi su tijekom 90 min fluorescentnom supstratu RB u prisutnosti odgovarajućeg inhibitora (VER ili MK571) (poglavlje 3.2.3, reakcijske smjese 4 i 5). Rezultati inhibicije MXR transportera prikazani su na Slici 13. Inhibicija aktivnosti određenog transportera vidljiva je kao porast u razini izmjerene fluorescencije RB u odnosu na odgovarajuću kontrolu (poglavlje 3.2.3, reakcijske smjese 1 i 2).

Rezultati inhibicije kod zavičajne vrste *A. anatina* upućuju na aktivne i P-gp i MRP transportere u škržnom tkivu. Prisutnost oba tipa transportera dokazana je i u kontroli (bez cinka i u grupama koje su bile izložene cinku (100 i 500 µg/L; Slika 13). Zanimljivo, rezultati inhibicije kod invazivne vrste, *S. woodiana*, pokazuju značajnu inhibiciju samo MRP transportera, i to kod kontrole i u grupi izloženoj cinku u koncentraciji od 500 µg/L (Slika 13). Pri koncentraciji cinka od 2500 µg/L zbog smrti stanica (Slika 11) ponovo ne možemo protumačiti inhibiciju niti jednog tipa transportera kod obje vrste školjkaša.

Za MRP transportere se zna da su uključeni u transport teških metala, primjerice žive (Bošnjak i sur. 2009). Međutim, u ovdje opisanim pokusima s inhibitorima i RB kao supstratom nismo utvrdili da nakon izlaganja cinku dolazi do indukcije drugačijih ABC transportera nego u kontroli. Stoga, iako smo pokazali indukciju MXR mehanizma nismo utvrdili koji točno tip transportera je uključen u sam eksport cinka. Kako bi se to utvrdilo potrebna su dodatna ispitivanja u kojima bi se koristili drugi supstrati i inhibitori ABC transportera. Također, trebala bi se provesti istraživanja na molekularnoj razini gdje bi se dokazao porast ekspresije određenog tipa ABC transportera. Moguće je i da su u transport cinka uključene i neke druge transportne pumpe, kao na primjer prije navedeni BCRP protein, koji inače sudjeluje u eksportu otrova i ksenobiotika. Hoechst 33342 je fluorescentni supstrat ovog proteina te može igrati istu ulogu kao i RB u daljnjim istraživanjima MXR mehanizma (Natarajan i sur., 2012).

6. ZAKLJUČCI

Ovim istraživanjem usporedili smo aktivnost MXR mehanizma u škržnom tkivu nakon izlaganja cinku ($ZnCl_2$) kod dvije vrste slatkovodnih školjkaša - zavičajne vrste obične bezupke, *Anodonta anatina* i invazivne vrste istočnoazijske bezupke, *Sinanodonta woodiana*. Na temelju rezultata doneseni su slijedeći zaključci:

- Od tri ispitivane koncentracije cinka najviša (2500 $\mu g/L$) se ispostavila najtoksičnija za obje vrste i dovela je do smrti (apoptoze) dijela stanica škrge.
- Naši rezultati upućuju da invazivna vrsta *S. woodiana* aktivira MXR transportne pumpe već pri najnižoj koncentraciji cinka (100 $\mu g/L$ $ZnCl_2$), dok se takva aktivacija kod native vrste *A. anatina* zamjećuje tek pri 500 $\mu g/L$ $ZnCl_2$. Stoga po prvi puta ukazujemo na mogućnost da invazivna vrsta ima mogućnost brže aktivacije MXR transportnog mehanizma u odnosu na zavičajnu vrstu što bi joj moglo dati prednost u zagađenim staništima i olakšati joj invazivno širenje.
- Rezultati inhibicije upućuju da su u škragama zavičajne vrste *A. anatina* aktivni i P-gp i MRP transporteri, dok je kod invazivne vrste *S. woodiana* dominantan MRP tip transportera.

7. ZAHVALE

Zahvaljujem se svojoj komentorici doc. dr. sc. Jasni Lajtner što me je uvela u ovaj rad. Hvala joj na svom vremenu koje je posvetila mom obrazovanju i na svim pruženim prilikama.

Veliko hvala mojoj mentorici dr. sc. Ivani Bošnjak koja mi je omogućila rad na ovom eksperimentu. Hvala na ukazanom povjerenju i na stručnom vodstvu prilikom izrade ovog rada. Hvala joj što me uvela u zanimljivo područje istraživanja MXR mehanizma čime mi je proširila znanstvene interese.

Hvala dr. sc. Ani Bielen na ugodnoj i optimističnoj atmosferi koju je stvarala tijekom izrade ovog rada. Hvala na svim savjetima i na poticanju da budem što bolja i uspješnija u daljnjem radu.

Najljepša hvala dr. sc. Sandri Hudina na neizmjernej pomoći prilikom statističke obrade podataka i tijekom izvršavanja pokusa.

8. LITERATURA

- Achard, M., Baudrimont, M., Boudou, A., Bourdineaud, J. P. (2004) Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR) in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* after heavy metals exposure. *Aquatic Toxicology* 67: 347-357
- Alemadi, S. D., Jenkins, D. G. (2008) Behavioral constraints for the spread of the eastern mosquitofish, *Gambusia halbrooki* (Poeciliidae). *Biological Invasions* 10: 59-66
- Baiser, B., Lockwood, J. L. (2011) The relationship between functional and taxonomic homogenization. *Global Ecology and Biogeography* 20: 134-144
- Bard, S. M. (2000) Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology* 48: 357-389
- Bishop, L., Agbayani, R. Jr, Ambudkar, S. V., Maloney, P. C., Ames, G. F. (1989) Reconstitution of a bacterial periplasmic permease in proteoliposomes and demonstration of ATP hydrolysis concomitant with transport. *Proceedings of the National Academy Science USA* 86: 6953-6957
- Bodar, C. W. M., Pronk, M. E. J., Sijm D. T. H. M. (2005) The European Union risk assessment on zinc and zinc compounds: the process and the facts. *Integrated environmental assessment and management* 1 (4): 301-319
- Borst, P., Evers, R., Kool, M., Wijnholds, J. (2000) A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *Journal of the National Cancer Institute* 92: 1295-1302
- Bošnjak, I., Uhlinger, K. R., Heim, W., Smital, T., Franekić Čolić J., Coale, K., Hamdoun, A. (2009) Multidrug efflux transporters limit accumulation of inorganic, but not organic, mercury in sea urchin embryos. *Environmental Science & Technology* 43: 8374-8380
- Bošnjak, I., Šegvić, T., Smital, T., Franekić, J., Mladineo, I. (2011) Sea urchin embryotoxicity test for environmental contaminants – Potential Role of the MRP Proteins. *Water, Air, & Soil Pollution* 217: 627-636
- Bošnjak, I., Zaja, R., Klobučar, R. S., Šver, L., Franekić, J., Smital, T. (2013) Identification of ABC transporter genes in gonad tissue of two Mediterranean sea urchin species: black, *Arbacia lixula* L., and rocky, *Paracentrotus lividus* L. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 91 (4): 415-419

- Bouchet, P. (2007): Inventorying the molluscan fauna of the world: How far to go? U: Jordaens, K., van Houtte, N., van Goethem, J., Backeljau, T. (ur.). Abstracts of the World Congress of Malacology, Antwerp, Belgium.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteindye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254
- Chan, L. M., lowes, S., Hirst, B. H. (2004) The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 21: 25-51
- Claudi, R., Mackie, G. L. (1994) Practical manual for zebra mussel monitoring and control. Lewis Publishers, Boca Raton, 227 str.
- Colautti, R. I., Ricciardi, A., Grigorovich, I. A., MacIsaac, H. J. (2004) Is invasion success explained by the enemy release hypothesis? *Ecology Letters* 7: 721-733
- Cole, S. P.C., Deeley, R. G. (1998) Multidrug resistance mediated by the ATP-binding cassette transporter protein MRP. *Bioessays* 20: 931-940
- Couture, L., Nash, J. A., Turgeon, J. (2006) The ATP Binding Cassette transporters and their implication in drug disposition: A Special Look at the Heart. *Pharmacological Reviews* 58: 244-258
- Crooks J. A., Chang A. L., Ruiz G. M. (2011) Aquatic pollution increases the relative success of invasive species. *Biological Invasions* 13: 165-176
- Danø, K. (1972) Cross resistance between vinca alkaloids and anthracyclines in Ehrlich ascites tumor *in vivo*. *Cancer Chemotherapy Reports* 56: 701-708
- Davidson, A. L., Dassa, E., Orelle, C., Chen, J. (2008) Structure, function, and evolution of bacterial ATP binding cassette systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 72: 317-364
- Dean, M., Hamon, Y., Chimini, G. (2001) The human ATP binding cassette (ABC) transporter superfamily. *The Journal of Lipid Research* 42: 1007-1017
- Della Torre, C., Bocci, E., Ettore Focardi, S., Corsi, I. (2013) Differential ABCB and ABCC gene expression and efflux activities in gills and hemocytes of *Mytilus galloprovincialis* and their involvement in cadmium response. *Marine Environmental Research* 93: 56-63
- Dietz, H., Edwards, P. J. (2006) Recognition that causal processes change during plant invasion helps explain conflicts in evidence. *Ecology* 87 (6): 1359-1367

- Dong, J., Yang, G., McHaourab, H. S. (2005) Structural basis of energy transduction in the transport cycle of MsbA. *Science* 308: 1023-1028
- Dudgeon, D., Arthington, A. H., Gessner, M. O., Kawabata, Z. I., Knowler, D. J., Lévêque, C., Naiman, R. J., PrieurRichard, A. H., Soto, D., Stiassny, M. L. J., Sullivan, C. A. (2006) Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews* 81: 163-182
- Epel, D., Luckenbach, T., Stevenson, C. N., MacManus Spencer, L. A., Hamdoun, A. M. Smital, T. (2008) Efflux transporters: newly appreciated roles in protection against pollutants. *Environmental Science and Technology* 42: 3914-3920
- Faria M., López M. A., Díez S., Barata C. (2010) Are native naiads more tolerant to pollution than exotic freshwater bivalve species? An hypothesis tested using physiological responses of three species transplanted to mercury contaminated sites in the Ebro River (NE, Spain). *Chemosphere* 81: 1218-1226
- Gekeler, V., Ise, W., Sanders, K.H., Ulrich, W. R., Beck, J. (1995) The Leukotriene LTD4 receptor antagonist MK571 specifically modulates MRP associated multidrug resistance. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 8: 345-352
- Genovesi, P. (2007) Towards a European strategy to halt biological invasions in inland waters. U: Gerhardi, F. (ur.): *Biological invaders in inland waters: Profiles, distribution, and threats*. Springer Netherlands, str. 627-637
- Goldberg, E. D. (1984) The mussel watch concept. *Environmental Monitoring and Assessment* 7: 91-103
- Goldstone, J., Hamdoun, A., Cole, B. J., Howard-Ashby, M., Nebert, D.W., Scally, M., Dean, M., Epel, D., Hahna, M. E., Stegeman, J. J. (2006) The chemical defensome: Environmental sensing and response genes in the *Strongylocentrotus purpuratus* genome. *Developmental Biology* 300 (1): 366-384
- 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, str. 264-267.
- Hamdoun, A. M., Cherr, G. N., Roepke, T. A., Epel, D. (2004) Activation of multidrug efflux transporter activity at fertilization in sea urchin embryos (*Strongylocentrotus purpuratus*). *Developmental Biology* 276: 452-462.
- Hietanen, B., Sunila, I., Kristoffersson, R. (1988) Toxic effects of zinc on the common mussel *Mytilus edulis* L. (Bivalvia) in brackish water. 1. Physiological and histopathological studies. *Annales Zoologici Fennici*, 25 (4): 341-347

- Higgins, C. F., Hiles, I. D., Whalley, K., Jamieson, D. J. (1985) Nucleotide binding by membrane components of bacterial periplasmic binding proteindependent transport systems. *The EMBO Journal* 4: 1033-1039
- Higgins, C.F. (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annual Review of Cell Biology* 8: 67-113
- Holland, B. I., Cole, S. P. C., Kucher, K., Higgins, C. F. (ur.) (2003) ABC proteins: from bacteria to man. *Academic Press*, London, 647 str.
- Hollenstein, K., Dawson, R. J. P., Locher, K. P. (2007) Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Current Opinions in Structural Biology* 17: 412-418
- Hudina, S., Lucić, A., Lajtner, J., Žganec, K., Gottstein, S. (2010) Invazivne vrste beskralješnjaka u vodotocima Hrvatske. *Hrvatske vode* 17 (69/70): 281-285
- IUCN (2012), The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. <<http://www.iucnredlist.org>> Pristupljeno 2. travnja 2014. godine
- Eufemia, N. A., Epel, D. (2000) Induction of the multixenobiotic defense mechanism (MXR), P-glycoprotein, in the mussel *Mytilus californianus* as a general cellular response to environmental stresses. *Aquatic Toxicology* 49 (1): 89-100
- Franco, J. L., Trivella, B. B. D., Trevisan, R., Dinslaken, D. F., Marques, M. R. F., Bainy, A. C. D., Dafre, A. L. (2006) Antioxidant status and stress proteins in the gills of the brown mussel *Perna perna* exposed to zinc. *Chemicobiological Interactions* 160 (3): 232-240
- Jones, P. M., George A. M. (2004) The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. *Cellular and Molecular Life Sciences* 61: 682-699
- Juliano, R. L., Ling, V. (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta* 455: 152-162
- Keller, R. P., Geist, J., Jeschke, J. M., Kühn, I. (2011) Invasive species in Europe: ecology, status, and policy. *Environmental Sciences Europe* 23 (1): 1-17
- Killeen, I., Aldridge, D., Oliver, G. (2004) Freshwater Bivalves of Britain and Ireland. FSC, AIDGAP Occasional Publication 82, 114 str.
- Kurelec, B. (1992) The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms. *Critical Reviews in Toxicology* 22: 23-43
- Kurelec, B. (1997) A new type of hazardous chemical: the chemosensitizers of multixenobiotic resistance. *Environmental Health Perspectives* 105 (4): 855-860

- Lajtner, J., Marušić, Z., Klobučar, G. I. V., Maguire, I., Erben, R. (2004) Comparative shell morphology of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha* in the Drava river (Croatia). *Biologia* 59: 595-600
- Lajtner, J. (2005) Reproductivni ciklus vrste *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) u rijeci Dravi. Doktorska disertacija. Sveučilište u Zagrebu, 134 str.
- Lajtner, J., Crnčan, P. (2011) Distribution of the invasive bivalve *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) in Croatia. *Aquatic Invasions* 6 suppl.1: S119-S124
- Lee, C. E., Remfert J. L., Gelembiuk, G. W. (2003) Evolution of physiological tolerance and performance during freshwater invasions. *Integrative and Comparative Biology* 43: 439-449
- Leslie, E. M., Deeley, R. G., Cole, S. P. (2005) Multidrug resistance proteins: role of P glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology and Applied Pharmacology* 204 (3): 216-237
- Litman, T., Druley, T. E., Stein, W. D., Bates, S. E. (2001) From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance system, their properties and clinical significance. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58: 931-959
- Lockwood, J. L., Cassey, P., Blackburn, T. (2005) The role of propagule pressure in explaining species invasions. *Trends in Ecology and Evolution*, 20: 223-228
- Luckenbach, T., Epel, D. (2005) Nitromusk and polycyclic musk compounds as longterm inhibitors of cellular xenobiotic defense systems mediated by multidrug transporters. *Environmental Health Perspectives*, 113 (1): 17-24
- Luckenbach, T., Epel, D. (2008) ABCB and ABCC type transporters confer multixenobiotic resistance and form an environment tissue barrier in bivalve gills. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 294 (6): R1919-R1929
- Matoničkin, I., Habdija, I., Primc Habdija, B. (1998) Beskralješnjaci, biologija nižih avvertebrata. Školska knjiga, Zagreb, str. 599-602.
- Meimberg, H., Milan, N. F., Karatassiou, M., Espeland, E. K., McKay, J. K., Rice, K. J. (2010) Patterns of introduction and adaptation during the invasion of *Aegilops triuncialis* (Poaceae) into Californian serpentine soils. *Molecular Ecology* 19: 5308-5319
- Meinesz, A., de Vaugelas, J., Hesse, B., Mari, X. (1993) Spread of the introduced tropical green alga *Caulerpa taxifolia* in northern Mediterranean waters. *Journal of Applied Phycology* 5: 141-147

- Miller, S. S. (1992): The pesky zebra mussel. *Environmental Science and Technology* 26: 2334-2336
- Natarajan, K., Xie, Y., Baer, M. R., Ross, D. D. (2012) Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance. *Biochemical Pharmacology* 83 (8): 1084-1103
- Neyfakh, A. A. (1988) Use of fluorescent dyes as molecular probes for the study of multidrug resistance. *Experimental Cell Research* 174 (1): 168-176
- Oldham, M. L., Davidson, A. L., Chen, J. (2008) Structural insights into ABC transporter mechanism. *Current Opinion in Structural Biology* 18: 726-733
- Pimentel, D., McNair, S., Janecka, J., Wightman, J., Simmonds, C., O'Connell, C., Wong, E., Russel, L., Zern, J., Aquino, T., Tsomondo, T. (2001) Economic and environmental threats of alien plant, animal, and microbe invasions. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 84: 1-20
- Pohl, A., Devaux, P. F., Herrmann, A. (2005) Function of prokaryotic and eukaryotic ABC proteins in lipid transport. *Biochimica et Biophysica Acta* 1733: 29-52
- Pravilnik o načinu izrade i provođenju studije o procjeni rizika uvođenja, ponovnog uvođenja i uzgoja divljih svojti. *Narodne novine* 35/2008
- Sakellari, A., Karavoltsos, S., Theodorou, D., Dassenakis, M., Scoullou, M. (2013) Bioaccumulation of metals (Cd, Cu, Zn) by the marine bivalves *M. galloprovincialis*, *P. radiata*, *V. verrucosa* and *C. chione* in Mediterranean coastal microenvironments: association with metal bioavailability. *Environmental Monitoring and Assessment* 185 (4): 3383-3395
- Sauerborn, R., Polančec, D. S., Zaja, R., Smital, T. (2004) Identification of the multidrug resistance associated protein (mrp) related gene in red mullet (*Mullus barbatus*). *Marine Environmental Research*, 58: 199-204
- Smital, T., Kurelec, B. (1998) The activity of multixenobiotic resistance mechanism determined by rhodamine Befflux method as a biomarker of exposure. *Marine Environmental Research* 46 (1): 443-447
- Smital, T., Luckenbach, T., Sauerborn, R., Hamdoun, A. M., Vega, R. L., Epel, D. (2004) Emerging contaminants pesticides, PPCPs, microbial degradation products and natural substances as inhibitors of multixenobiotic defense in aquatic organisms. *Mutation Research* 552: 101-117

- Smital, T., Sauerborn, R., Hackenberger, B. K. (2003) Inducibility of the P-glycoprotein transport activity in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* and the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. *Aquatic Toxicology* 65 (4): 443-65
- Smital, T., Sauerborn, R., Pivčević, B., Krča, S., Kurelec, B. (2000) Interspecies differences in Pglycoprotein mediated activity of multixenobiotic resistance mechanism in several marine and freshwater invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 126 (2): 175-186
- Stevenson, C. N., MacManus Spencer, L. A., Luckenbach, T., Luthy, R. G., Epel, D. (2006) New perspectives on perfluorochemical ecotoxicology: inhibition and induction of an efflux transporter in the marine mussel, *Mytilus californianus*. *Environmental Science and Technology*, 40 (17): 5580-5585
- Strayer, D. (2006) Challenges for freshwater invertebrate conservation. *Journal of the North American Benthological Society* 25: 271-185
- Tsuruo, T., Iida, H., Tsukagoshi, S., Sakurai, Y. (1981) Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Research* 41: 1967-1972
- Williamson, M. (1996) Biological invasions. Chapman & Hall, London, UK, 244 str.
- Wright, D. (2007) Logistics of shipboard and dockside testing of ballast water treatment systems in the United States, U: Gerhardt, F. (ur.) Biological invaders in inland waters: Profiles, distribution, and threats. Springer Netherlands, 657-668.
- Xu, C., Li, C. Y. T., Kong, A. N. T. (2005) Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Archives of Pharmacal Research* 28: 249.268
- Zakon o zaštiti prirode. *Narodne novine* 70/2005
- Zakon o izmjenama i dopunama zakona o zaštiti prirode. *Narodne novine* 139/2008
- Zakon o izmjenama i dopunama zakona o zaštiti prirode. *Narodne novine* 57/2011
- Korištene internet stranice:
- <http://www.animalbase.org/> Pristupljeno 3. travnja, 2014. godine
- <http://www.ufz.de/index.php?en=17251> Pristupljeno 5. travnja, 2014. godine

9. SAŽETAK

Indukcija aktivnosti multiksenobiotičke otpornosti nakon izlaganja cinku – usporedba zavičajne vrste *Anodonta anatina* (Linnaeus, 1758) i invazivne vrste *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) (Mollusca, Bivalvia)

Marija Cvitanić

Širenje invazivnih vrsta predstavlja ozbiljnu prijetnju jer mogu svojim širenjem, zauzimanjem životnog prostora i crpljenjem hranjivih tvari uzrokovati izumiranje zavičajnih vrsta. Pretpostavlja se da invazivne vrste imaju aktivnije mehanizme detoksikacije u svojim tkivima što im omogućuje robusnost i otpornost na toksične tvari iz okoliša. U ovom istraživanju ispitivana je razina aktivnosti mehanizma multiksenobiotičke otpornosti (MXR mehanizam) u škržnom tkivu dvije vrste školjkaša: zavičajnoj običnoj bezupki (*Anodonta anatina*) i invazivnoj istočnoazijskoj bezupki (*Sinanodonta woodiana*). MXR mehanizam je aktivan zahvaljujući membranskim transportnim pumpama, prvenstveno P-glikoproteinu (P-gp) i MRP-ovima (eng. *multidrug resistance protein*). Obje ispitivane vrste školjkaša izložene različitim koncentracijama cinka (100, 500 i 2500 µg/L ZnCl₂) kroz 7 dana. Nakon toga je indirektno određena razina aktivnosti MXR mehanizma preko razine akumulacije fluorescentnog supstrata rodamina B (1 µM RB) u škržnim diskovima. Također, korišteni su specifični inhibitori MXR transporta (10 µM VER i 20 µM MK571) kako bi se odredilo koji tip MXR transportera je aktivan u škragama. Dobiveni rezultati testa vijabilnosti stanica ukazuju da najveća koncentracija cinka (2500 µg/L ZnCl₂) uzrokuje smrt (apoptozu) škržnih stanica u obje ispitivane vrste školjkaša. Nadalje, naši rezultati jasno pokazuju indukciju MXR transportnog mehanizma u škržnom tkivu invazivne vrste (*S. woodiana*) nakon izlaganja školjkaša najnižoj koncentraciji cinka (100 µg/L ZnCl₂), dok je kod zavičajne vrste (*A. anatina*) isti rezultat zabilježen tek nakon izlaganja srednjoj koncentraciji cinka (500 µg/L ZnCl₂). Ovi rezultati upućuju da invazivna vrsta puno uspješnije i brže aktivira svoje MXR transportere u odnosu na zavičajnu vrstu. Rezultati inhibicije su pokazali da su kod zavičajne vrste (*A. anatina*) u škragama aktivni i P-gp i MRP transporteri, a kod invazivne vrste (*S. woodiana*) samo MRP tip transportera. Zaključno, ovo istraživanje naglašava važnost daljnjeg istraživanja problematike MXR mehanizma kod invazivnih vrsta školjkaša jer bi rezultati mogli dodatno razjasniti na koji način su te vrste robusnije i otpornije čak i u zagađenim vodotocima.

Ključne riječi: *Anodonta anatina*; *Sinanodonta woodiana*; cink; MXR mehanizam; škrge

10. SUMMARY

Induction of multixenobiotic resistance after exposure to zinc – comparison of native species *Anodonta anatina* (Linnaeus, 1758) and invasive species *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) (Mollusca, Bivalvia)

Marija Cvitanić

The spread of invasive species represent a serious threat as they can expand, occupy living space and deplete nutrients causing the extinction of native species. It is assumed that invasive species have more active detoxification mechanisms in their tissues, which allows them robustness and resistance to toxic substances from the environment. In this research, the level of activity of multixenobiotic resistance mechanism (MXR mechanism) was studied in the gill tissue of two bivalve molluscs: native, the duck mussel (*Anodonta anatina*) and invasive, the Chinese pond mussel (*Sinanodonta woodiana*). MXR mechanism is active due to membrane transport pumps, primarily P-glycoprotein (P-gp) and multidrug resistance proteins (MRP). Both studied species of mussels were exposed to different concentrations of zinc (100, 500 and 2500 µg/L ZnCl₂) for seven days. Subsequently, the activity level of MXR was determined by measuring the accumulation level of the fluorescent substrate rhodamine B (RB 1 µM) in gill discs. Also, specific inhibitors of MXR transport (10 µM VER and 20 µM MK571) were used to determine which type of MXR transporter is active in gill tissue. The results of the cell viability test indicate that the maximum concentration of zinc (2500 mg/L ZnCl₂) causes apoptosis of gill cells in both study groups of mussels. Furthermore, our results clearly show the induction of MXR transport mechanism in the gill tissue of invasive species (*S. woodiana*) after exposure to lowest concentration of zinc (100 mg/L ZnCl₂), while the native species (*A. anatina*) the same result was not observed until the exposure to higher concentration of zinc (500 mg/L ZnCl₂). These result indicate that invasive species has more successful and faster activation of MXR transporters in compare to native species. The results of inhibition showed that in the native species (*A. anatina*) the P-gp and MRP transporters are active in gills, while the invasive species (*S. woodiana*) use only MRP type of transporters. In conclusion, this study highlights the importance of further research of MXR mechanism in invasive species of mussels because results could further clarify the robustness of these species even in polluted streams.

Key words: *Anodonta anatina*; *Sinanodonta woodiana*; zinc; MXR mechanism; gills