



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Nicol Kolar

**ANALIZA UNUTARSTANIČNE RASPODJELE  
ODABRANIH METALA I METALOIDA  
U JETRIMA POTOČNE PASTRVE (*SALMO TRUTTA*  
LINNAEUS, 1758) IZ RIJEKE KRKE**

Zagreb, 2017.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za biološke učinke metala Zavoda za istraživanje mora i okoliša Instituta Ruđer Bošković pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Renate Matoničkin Kepčija s Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i dr. sc. Zrinke Dragun s Instituta Ruđer Bošković, u sklopu znanstvenog projekta „Akumulacija, unutarstanično mapiranje i učinci metala u tragovima u akvatičkih organizama“ (HrZZ projekt, IP-2014-09-4255, voditelj projekta: dr. sc. Marijana Erk). Rad je predan na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2016./2017.

## SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Onečišćenje prirodnih voda metalima	1
1.2. Odabrani bioindikatorski organizam i ciljni organ	1
1.3. Akumulacija i učinci metala na bioindikatorske organizme	2
1.4. Principi metalomike	3
1.5. Odabrani analitički pristup	3
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	7
3. MATERIJALI I METODE	8
3.1. Područje i razdoblje istraživanja	8
3.2. Uzorkovanje riječne vode	9
3.3. Uzorkovanje pastrva i seciranje ciljnog organa	10
3.4. Homogenizacija i izdvajanje topljivih, citosolskih frakcija iz jetri pastrva	12
3.5. Razgradnja homogenata i citosola jetri	13
3.6. Frakcioniranje citosola jetri pomoću HPLC-a s isključenjem po veličini	13
3.7. Mjerenje koncentracija metala/metaloida u riječnoj vodi, u razgrađenim homogenatima i citosolima te u frakcijama dobivenim razdvajanjem HPLC-om	15
3.8. Prikaz i obrada rezultata	17
4. REZULTATI	18
4.1. Koncentracije otopljenih metala i metaloida u vodi rijeke Krke	18
4.2. Koncentracije metala i metaloida akumuliranih u jetrima odabranih pastrva	18
4.2.1. Ukupne koncentracije metala i metaloida akumuliranih u jetrima odabranih pastrva	18
4.2.2. Citosolske koncentracije metala i metaloida akumuliranih u jetrima odabranih pastrva	20
4.3. Unutarstanična raspodjela metala i metaloida akumuliranih u jetrima odabranih pastrva	21
4.3.1. Raspodjela metala i metaloida između topljive i netopljive frakcije u jetrima pastrva	21

4.3.2. Raspodjela metala i metaloida među citosolskim biomolekulama u jetrima pastrva	23
4.3.2.1. Kobalt	26
4.3.2.2. Bakar	26
4.3.2.3. Željezo	26
4.3.2.4. Mangan	27
4.3.2.5. Molibden	27
4.3.2.6. Selen	28
4.3.2.7. Cink	28
4.3.2.8. Kadmij	29
4.3.2.9. Talij	29
5. RASPRAVA	39
6. ZAKLJUČCI	46
7. ZAHVALE	48
8. LITERATURA	49
9. SAŽETAK	56
10. SUMMARY	57
11. ŽIVOTOPIS	58

## **POPIS KRATICA**

**ALAD** – dehidrataza  $\delta$ -aminolevulinske kiseline

**DNK** – deoksiribonukleinska kiselina

**EROD** – 7-etoksirezorufin-O-deetilaza

**FKI** – Fultonov kondicijski indeks

**g** – gram

**GSH** – glutation

**GSI** – gonadosomatski indeks

**HPLC** – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

**HR ICP-MS** – masena spektroskopija visoke rezolucije s induktivno spregnutom plazmom

**HSI** – hepatosomatski indeks

**ICP-MS** – masena spektroskopija s induktivno spregnutom plazmom

**JNMM** – jako niska molekulska masa

**kDa** – kiloDalton

**L** – litra

**MDA** – malondialdehid

**Milli-Q** – ultračista voda

**MT** – metalotionein

**(Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-ATP-aza** – natrijeva/kalijeva adenzin trifosfataza

**ng** – nanogram

**nm** – nanometar

**NMM** – niska molekulska masa

**SMM** – srednja molekulska masa

**UNEP/GEMS** – od eng. United Nations Environment Program / The Global Environment Monitoring System for Freshwater

**VMM** – visoka molekulska masa

**QC** – kontrola kakvoće (od eng. Quality Control)

**μg** – mikrogram

## **1. UVOD**

### **1.1. Onečišćenje prirodnih voda metalima**

Metali u vodu dospijevaju iz prirodnih izvora, primjerice kemijskim i mehaničkim trošenjem stijena, te iz antropogenih izvora, kao što su, na primjer, industrija (proizvodnja plastičnih i električnih elemenata), rudarenje, promet, poljoprivreda (putem gnojiva), i gradske otpadne vode (Gaillardet i sur., 2004). Koncentracije metala u tragovima u prirodnim vodama mogu varirati od nekoliko nanograma do više mikrograma po litri. Metali se s obzirom na svoju funkciju u živim organizmima mogu podijeliti na esencijalne i neesencijalne. Oni metali koji su potrebni živim organizmima, a dio su enzima ili vitamina, ubrajaju se u esencijalne. To su, na primjer, cink (Zn), bakar (Cu), kobalt (Co), selen (Se) i željezo (Fe), koji su ljudima i životinjama potrebni u malim količinama, dok prekomjernim unosom postaju toksični (Verma i Dwiwedi, 2013). Oni metali i metaloidi, koji nemaju funkciju u živim organizmima toksični su već u vrlo malim količinama, a to su, na primjer, olovo (Pb), arsen (As), živa (Hg), nikal (Ni) i kadmij (Cd) (Verma i Dwiwedi, 2013). Onečišćenje prirodnih voda metalima predstavlja veliki okolišni problem, jer ulaze u prehrambeni lanac, nakupljaju se u živim organizmima te imaju dugo biološko poluvrijeme života (Flora i sur., 2008).

### **1.2. Odabrani bioindikatorski organizam i ciljni organ**

Budući da se često samo kemijskim analizama vode ne može uočiti promjene u okolišu koje mogu biti štetne za vodene organizme (Chovanec i sur., 2003), uobičajena je uporaba bioindikatora. Bioindikator može biti organizam ili dio organizma ili zajednica organizama, a daje informaciju o stupnju zagađenosti ekosustava (Markert i sur., 2003). U vodenim je sustavima česta uporaba riba kao bioindikatora. Jedan od razloga je njihova veličina, kao i veličina njihovih organa, zbog čega je moguće provođenje niza različitih analitičkih i biokemijskih ispitivanja. Osim toga, zbog njihovog dugog životnog vijeka, a time i duge izloženosti onečišćenom okolišu, kod riba su posljedice zagađenja (na primjer, akumulacija zagađivala) izraženije nego kod drugih akvatičkih organizama. Nadalje, ribe su i primarni i sekundarni konzumenti te kod njih postoji i mogućnost trofičkog prijenosa zagađivala u vodenim sustavima. Međutim, ponekad zbog njihove mobilnosti, uporaba riba kao bioindikatorskih organizama može predstavljati značajan problem i izazov, zbog nemogućnosti preciznog definiranja izvora onečišćenja, vremena i trajanja izloženosti (Chovanec i sur., 2003).

U ovome istraživanju, izabrani bioindikatorski organizam bila je potočna pastrva (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758). Potočna pastrva pripada porodici Salmonidae, a široko je rasprostranjena u Hrvatskoj te Bosni i Hercegovini. Prebiva u hladnim, kisikom bogatim planinskim potocima i rijekama. Zbog svoje globalne rasprostranjenosti dobar je bioindikatorski organizam jer pruža mogućnost usporedbe ostvarenih rezultata u raznim krajevima svijeta. Tijelo potočne pastrve je vretenasto, prilagođeno plivanju i u jačim

vodenim strujama. Ovisno o području u kojemu obitava, tijelo joj je više ili manje bočno spljošteno i visoko, s dobro razvijenom repnom perajom. Boja joj varira od zelenkaste do smeđe, što prvenstveno ovisi o sredini u kojoj živi. Na bočnim stranama i na leđima nalaze se pjege (URL 1). Potočna pastrva je predator i hrani se manjim organizmima (Page i Burr, 1991). Razmnožava se u jesen ili zimi jer su tada niže temperature vode (Klements, 2003).

Kao ciljni organ za analizu akumuliranih metala odabrana je jetra, kao glavno mjesto u organizmu za odvijanje metaboličkih procesa i detoksikaciju. Osim toga, jetra je jedan od centara sinteze proteina koji vežu metale te zbog toga sadrži većinu metala u visokim koncentracijama (Roesijadi i Robinson, 1994).

### **1.3. Akumulacija i učinci metala na bioindikatorske organizme**

Postoji više mogućih puteva za unos metala u organizam: filtracijom vode kroz škrge, uzimanjem hrane i vode putem probavila te preko kože (Heath, 1995). Najviše se metala unosi izravno iz vode filtriranjem putem škrge te hranom putem probavila (Chovanec i sur., 2003). Škrge, probavni sustav i jetra obično pokazuju veliko opterećenje toksičnim tvarima već nakon kratkotrajne izloženosti, dok se koncentracije u bubrezima, mišićima i kostima lagano povećavaju nakon vremenskog odmaka (Olson, 1978). Nakon ulaska u organizam, metali se većim dijelom prenose krvlju vezani na proteine (Roesijadi i Robinson, 1994), dok se neki mogu prenositi i vezani na aminokiseline (Fletcher i Fletcher, 1980). Raspodjela po organizmu ovisi o načinu unosa metala u organizam. Metali koji uđu putem škrge mogu se brzo raspodijeliti krvlju kroz cijelo tijelo, a ako je put unosa probavilo, metali moraju prvo proći kroz jetru gdje se dio metabolizira ili ukloni različitim detoksikacijskim mehanizmima (Heath, 1995). Također, različiti metali pokazuju afinitete za akumuliranje u različitim tkivima. Primjerice, kod pastrva izloženih kadmiju u vodi, većina kadmija se akumulirala u škragama, bubrezima i jetri, a gotovo ništa u probavilu (Thomas i sur., 1983). Metali/metaloidi toksične učinke u organizmu mogu izazvati na više načina, na primjer blokiranjem esencijalnih funkcionalnih skupina u biološki važnim molekulama, istiskivanjem esencijalnih metala iz biološki važnih molekula te promjenom aktivne konformacije biološki važnih molekula (Mason i Jenkins, 1995).

Najčešći način praćenja bioakumulacije metala/metaloida u organima bioindikatorskih organizama je određivanje njihovih ukupnih koncentracija u kiselinom razgrađenim tkivima. Međutim, ukoliko želimo odrediti koncentraciju metala/metaloida koja je raspoloživa za metaboličke potrebe organizma, ali jednako tako i za toksične učinke u stanicama, bolji je izbor određivanje koncentracija u topljivoj, odnosno citosolskoj frakciji (Dragun i sur., 2013a). Za procjenu izloženosti, ali i učinaka metala/metaloida, osim mjerenja njihovih koncentracija akumuliranih u organima bioindikatora, korisno je pratiti i vrijednosti biomarkera izloženosti i učinaka, a to su karakteristični biološki pokazatelji pomoću kojih se mogu utvrditi promjene izazvane izloženošću toksičnoj tvari. Obuhvaćaju promjene na razini stanice, fizička oštećenja organizma ili poremećaje fizioloških procesa, ali i promjene na razini populacije (Strimbu i Tavel, 2010). Često primijenjivani biomarkeri, čije se vrijednosti određuju u organima riba tijekom praćenja stanja okoliša,

obuhvaćaju metalotioneine (MT) koji ukazuju na povećanu izloženost metalima (Podrug i Raspor, 2009), malondialdehid (MDA) koji ukazuje na pojavu lipidne peroksidacije uzrokovane oksidativnim stresom (Li i sur., 2015; Valavanidis i sur., 2006), dehidratazu  $\delta$ -amino levulinske kiseline, čija snižena aktivnost ukazuje na povećanu akumulaciju olova u organizmu te 7-etoksirezorufin deetilazu (EROD) čije promjene aktivnosti ukazuju na izloženost organskim zagađivačima (Krča i sur., 2007).

#### 1.4. Principi metalomike

Prvi znakovi oštećenja organizma su vidljivi na staničnoj razini znatno prije vanjskih simptoma zdravstvenog poremećaja. Stoga se odnedavno sve veća pažnja posvećuje izučavanju sudbine metala u živim organizmima, njihove raspodjele unutar tkiva i stanica i njihovih interakcija sa staničnim komponentama. Naglasak je stavljen na otkrivanje i opisivanje procesa u kojima metali sudjeluju, bilo kao funkcionalne komponente ili kao uzročnici toksičnih učinaka, kao i na prepoznavanje specifičnih spojeva na koje se metali vežu. U skladu s time je razvijena nova grana istraživanja metala pod nazivom metalomika, definirana kao "sveobuhvatna analiza sveukupnih oblika metala i metaloida unutar neke stanice ili tkiva" (Szpunar, 2005). Metalomika bi trebala predstavljati znanstveno polje povezano s genomikom i proteomikom, jer sinteze i metaboličke funkcije gena (DNK i RNK) i proteina ne mogu biti izvršene bez sudjelovanja raznih metalnih iona i metaloenzima (Haraguchi, 2004). Metalomika nadalje obuhvaća kvantificiranje željenih metala u biološkim sustavima, istraživanje raspodjele i specijacije metala u živim organizmima te proučavanje reakcija i mehanizama u koje su uključeni metali (Li i sur., 2008).

Analitički pristupi korišteni u metalomici mogu se podijeliti u tri osnovne kategorije: *in vivo*, *in vitro* i *in silico*. U *in vivo* kategoriju ubrajaju se metode kojima se određeni oblik metala detektira, identificira i kvantificira u biološkim uzorcima. Budući da svako uklanjanje analita iz njegove izvorne okoline stvara rizik mijenjanja njegovog oblika, najbolje je koristiti tehnike koje se mogu primijeniti izravno na uzorak. Najprivlačnija tehnika je apsorpcijska spektroskopija X-zrakama, međutim njena je primjena uglavnom ograničena na biljke koje akumuliraju velike količine metala. Metaloproteini koji su prisutni u malim količinama mogu se analizirati povezanim tehnikama koje spajaju kromatografsko ili elektroforetsko razdvajanje visokog razlučivanja s osjetljivim metodama detekcije, poput raznih oblika masene spektrometrije. Za *in vitro* pristup koriste se metode koje se temelje na *in vitro* modificiranju dijela DNK organizma i utvrđivanju utjecaja te modifikacije na metalom. *In silico* pristup označava istraživanje zasnovano na kompjuterskim simulacijama i korištenju baza podataka (Mounicou i sur., 2009).

#### 1.5. Odabrani analitički pristup

U ovome istraživanju odlučili smo se za dva pristupa u izučavanju sudbine metala akumuliranih u stanicama jetri pastrva. Prvi pristup odnosi se na specijaciju metala u stanici primjenom diferencijalnog centrifugiranja. Korištenjem različitih brzina

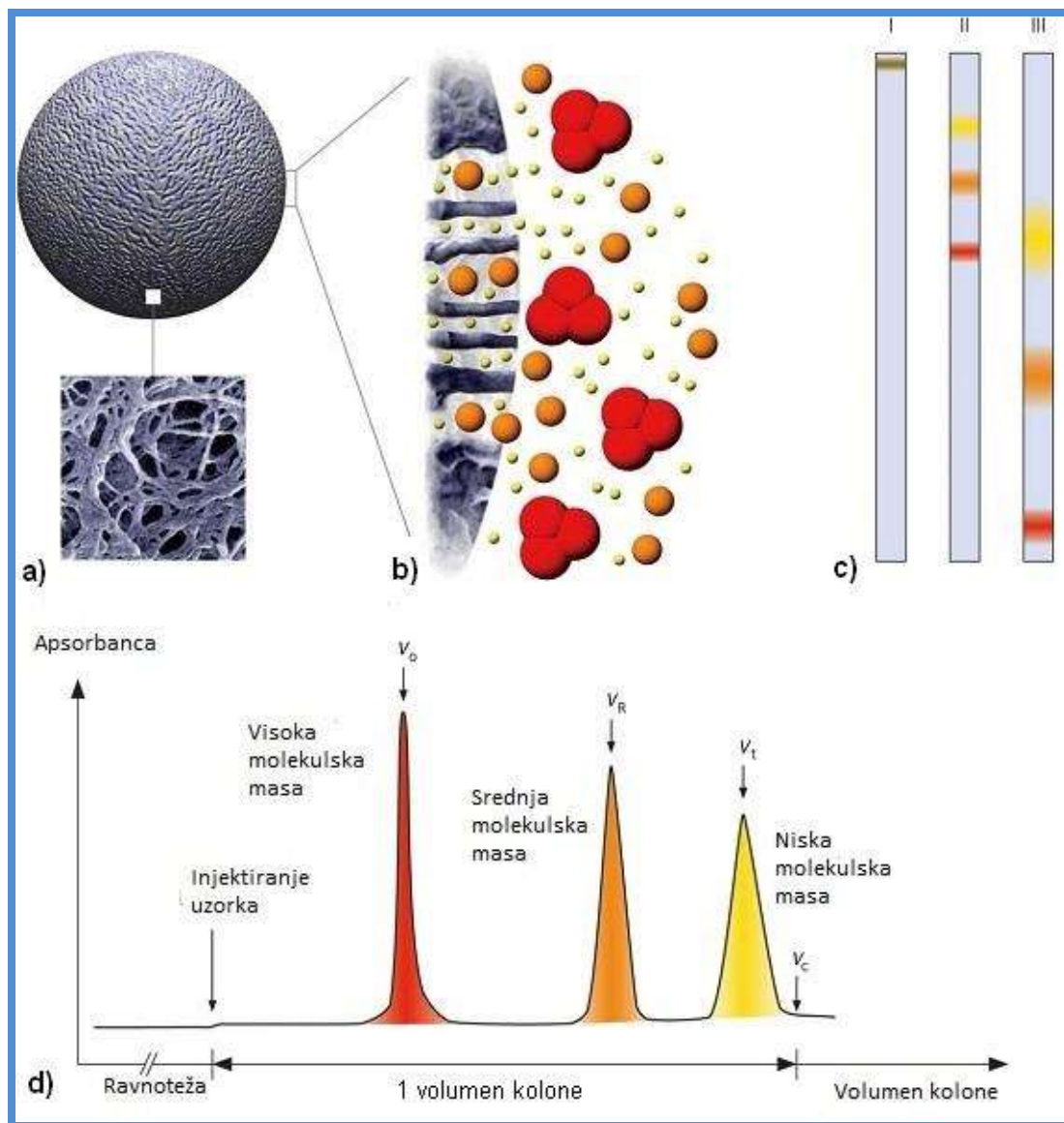


centrifugiranja moguće je odvojiti pojedine stanične frakcije. Početni korak predstavlja homogenizacija tkiva, nakon kojega slijedi niz centrifugiranja, od nižih prema višim brzinama. Primjer diferencijalnog centrifugiranja prema Bonneris i sur. (2005) kao prvi korak uključuje centrifugiranje homogenata na  $800\times g$ , nakon kojega se u talogu dobiva frakcija koja sadrži neraspadnute stanice, dijelove staničnih membrana, jezgre i granule. Dobiveni supernatant na  $800\times g$  se dalje centrifugira na  $10.000\times g$  te se u talogu dobiva mitohondrijska frakcija. Dobiveni supernatant na  $10.000\times g$  se dalje centrifugira na  $100.000\times g$  te se u talogu dobiva frakcija koja sadrži lizosome i mikrosome, dok dobiveni supernatant sadrži citosolske proteine. Dobiveni supernatant na  $100.000\times g$  zagrijava se na temperaturi od  $80^{\circ}\text{C}$ , potom se ohladi i centrifugira na  $50.000\times g$  te se u talogu dobiva frakcija koja sadrži proteine denaturirane na visokoj temperaturi, dok se u tako dobivenom supernatantu nalaze toplinski stabilni proteini (Bonneris i sur., 2005). U ovom je istraživanju korišteno centrifugiranje na  $50.000\times g$ , kojim se u talogu odvaja netopljiva frakcija koja sadrži neraspadnute stanice, dijelove staničnih membrana, jezgre i mitohondrije, dok se u supernatantu dobiva citosolska frakcija koja sadrži razne citosolske biomolekule te lizosome i mikrosome (Dragun i sur., 2013a), na taj način omogućujući analizu raspodjele metala/metaloida između topljive i netopljive frakcije.



**Slika 1.** Instrumentalni sustav primijenjen u analizi unutarstanične raspodjele metala i metaloida u jetrima pastrva: a) HPLC sustav (Perkin Elmer serija 200, SAD) u Laboratoriju za biološke učinke metala Zavoda za istraživanje mora i okoliša Instituta Ruđer Bošković; b) HR ICP-MS Element 2 (Thermo Finnigan, Njemačka), koji je opremljen automatskim uzorkivačem SC-2 DX FAST (Elemental Scientific, SAD), u Laboratoriju za anorgansku geokemiju okoliša i kemosinamiku čestica Zavoda za istraživanje mora i okoliša Instituta Ruđer Bošković (snimila Nicol Kolar).

Drugi se pristup u izučavanju sudbine metala akumuliranih u stanicama jetri pastrva odnosi na izučavanje citosolskih biomolekula koje vežu metale. Najbolja i najčešća kombinacija za analizu raznih spojeva koji vežu metale je povezivanje tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) (slika 1a) s masenim spektrometrom s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS) (slika 1b) (Montes-Bayón i sur., 2003).



**Slika 2.** Prikaz principa kromatografskog razdvajanja uz isključenje po veličini: a) čestice kolone za razdvajanje isključenjem po veličini načinjene su od poroznog materijala; na donjoj slici prikazana je slika matriksa kolone snimljena elektronskim mikroskopom; b) dio čestice kolone prikazan shematski; tijekom razdvajanja, komponente uzorka putuju zajedno s eluensom (mobilnom fazom) kroz kolonu. Velike molekule iz uzorka (crvene) bivaju isključene iz matriksa (ako su veće od granice isključenja matriksa kolone) te se eluiraju u praznom volumenu,  $V_0$ . Molekule srednje veličine (npr. narančaste) ulaze i izlaze kroz pore čestica i tako se duže zadržavaju u koloni. Te molekule stoga zauzimaju veći dio volumena čestica nego veće molekule, pa im je zato potrebno duže vrijeme i veći volumen za eluciju ( $V_R$ ). Vrlo male molekule zauzimaju cjelokupan porni volumen čestica te se eluiraju s ukupnim volumenom kolone,  $V_t$ ; geometrijski volumen kolone,  $V_c$ , nešto je veći od ‘ukupnog volumena’, zahvaljujući volumenu matriksa materijala; c) grafički prikaz razdvajanja: I. uzorak se nanosi na kolonu; II. male molekule (žute) se duže zadržavaju nego najveće molekule (crvene); III. najveće molekule se prve eluiraju s kolone; d) shematski prikaz kromatograma. Slika je preuzeta iz rada Hagela i Haneskoga (2010).

HPLC je svestrana metoda koja obuhvaća mnoštvo tehnika s različitim mehanizmima razdvajanja (na primjer, kromatografiju s isključenjem po veličini, afinitetnu kromatografiju, anionsko-izmjenjivačku kromatografiju, kromatografiju obrnutih faza). S druge strane, ICP-MS je trenutno najosjetljivija i najrobusnija tehnika određivanja metala koja omogućuje multielementnu detekciju i vrlo niske granice detekcije te široki koncentracijski raspon mjerenja (Montes-Bayón i sur., 2003). Kao početni korak u kromatografskom razdvajanju preporuča se i najčešće koristi razdvajanje kromatografijom s isključenjem po veličini, koja citosolske biomolekule razdvaja u frakcije s obzirom na njihovu molekulsku masu (Montes-Bayón i sur., 2003; Michalke i Schramel, 2004). Princip ovoga razdvajanja je propuštanje tekućeg uzorka kroz kolonu koja sadrži porozni materijal (slika 2), pri čemu molekule koje su veće od pora prolaze samo kroz prostor između čestica kolone te ih materijal u koloni ne usporava. Nasuprot tome, molekule manje od pora ulaze u njih, a vjerojatnost ulaska molekule u pore je veća što je molekula manja. Na taj način materijal usporava gibanje manjih molekula kroz kolonu. Stoga iz kolone prve izlaze velike molekule, a potom sve manje (Hagel i Haneskog, 2010). Po završenom kromatografskom razdvajanju u frakcijama koje sadrže biomolekule različitih molekulskih masa koje vežu metale određuju se koncentracije eluiranih metala pomoću ICP-MS-a te se mogu identificirati biomolekule primjenom raznih tehnika masene spektrometrije. Masena spektrometrija s induktivno spregnutom plazmom, koja se koristi za mjerenje koncentracija metala, tehnika je u kojoj se induktivno spregnuta plazma koristi kao ionizacijski izvor, a detekcija se vrši masenom spektrometrijom (Montaser, 1998). Uzorak se u instrument unosi u obliku aerosola koji se uvodi u plazmu te plazma vrši učinkovitu desolvataciju (gubitak vode), vaporizaciju (isplinjavanje), atomizaciju, pobuđivanje i ionizaciju elemenata u uzorku. Ioni nastali u plazmi ulaze u maseni spektrometar i odlaze do analizatora, koji ione razdvaja prema njihovom omjeru  $m/z$  (masa/naboj) te se potom detektiraju u detektoru i prevode u mjerljivi signal (Dautović, 2006).

## 2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Budući da onečišćenje metalima/metaloidima predstavlja sve veći okolišni problem, osobito za vodene ekosustave, značajno je ispitati moguće posljedice takvog onečišćenja na organizme koji prebivaju u vodi. Opći cilj ovoga rada stoga je produbljivanje znanja o unutarstaničnoj sudbini nekoliko odabranih esencijalnih i neesencijalnih metala i metaloida akumuliranih u jetrima potočne pastrve (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758), kao njenom glavnom detoksikacijskom i metaboličkom organu, nakon povećane izloženosti u prirodnom slatkovodnom okolišu.

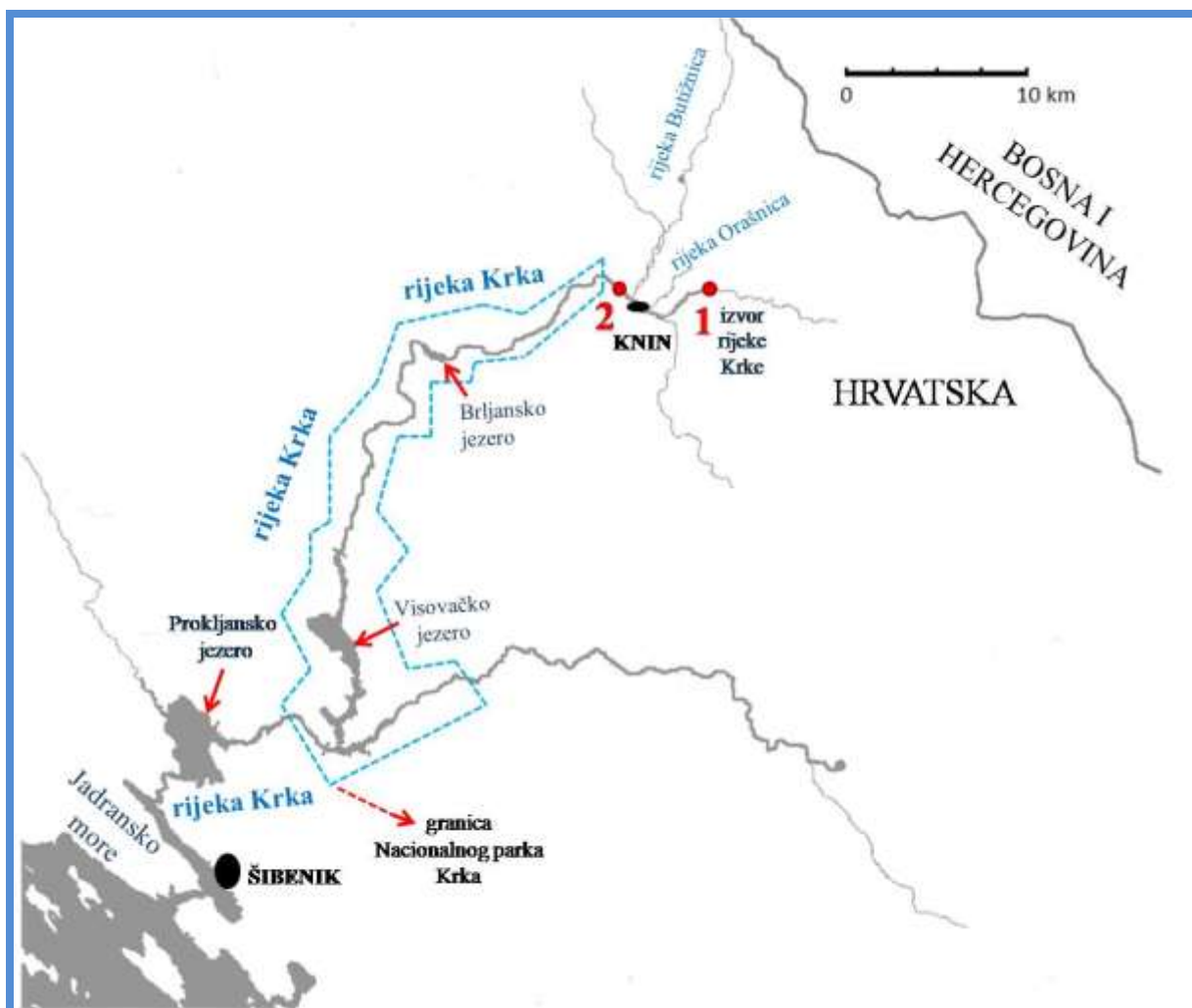
Specifični ciljevi rada su sljedeći:

1. Određivanje koncentracija odabranih metala i metaloida (esencijalni: Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Se, Zn; neesencijalni: Cd, Tl) u vodi rijeke Krke na dvjema postajama uzorkovanja: referentnoj postaji – izvoru rijeke Krke, i onečišćenoj postaji: rijeci Krki nizvodno od Knina.
2. Određivanje ukupnih koncentracija odabranih metala i metaloida (esencijalni: Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Se, Zn; neesencijalni: Cd, Tl) akumuliranih u jetrima potočne pastrve ulovljenima na dvjema postajama: referentnoj postaji – izvoru rijeke Krke, i onečišćenoj postaji: rijeci Krki nizvodno od Knina.
3. Određivanje citosolskih koncentracija odabranih metala i metaloida (esencijalni: Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Se, Zn; neesencijalni: Cd, Tl) akumuliranih u jetrima potočne pastrve ulovljenima na dvjema postajama: referentnoj postaji – izvoru rijeke Krke, i onečišćenoj postaji: rijeci Krki nizvodno od Knina.
4. Utvrđivanje raspodjele odabranih metala i metaloida (esencijalni: Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Se, Zn; neesencijalni: Cd, Tl) između topljive i netopljive frakcije u jetrima potočnih pastrva.
5. Definiranje raspodjela odabranih metala i metaloida (esencijalni: Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Se, Zn; neesencijalni: Cd, Tl) među citosolskim biomolekulama različitih molekularnih masa u jetrima potočnih pastrva te definiranje promjena u raspodjelama koje nastaju uslijed različite akumulacije metala/metaloida u jetrima.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Područje i razdoblje istraživanja

Rijeka Krka je krška hrvatska rijeka na području Šibensko-kninske županije koja utječe u Jadransko more. Izvire podno Topoljskog slapa ili Krčića. Ukupna duljina rijeke iznosi 72,5 km, od čega 49 km čini slatkovodni tok, a 23,5 km bočati (slika 3). Zbog karakteristika područja kojim protječe, voda rijeke Krke prirodno sadrži veoma niske koncentracije elemenata u tragovima i jako je osjetljiva na antropogeni učinak (Cukrov i sur., 2008). Za potrebe ovoga istraživanja prikupljeni su uzorci površinske vode rijeke Krke te su ulovljene pastrve na dva odabrana područja, referentnom i onečišćenom, u listopadu 2015. godine.



**Slika 3.** Karta područja istraživanja s označenim mjestima uzorkovanja (izradila: dr. sc. Vlatka Filipović Marijić).

Kao referentna postaja, bez antropogenog utjecaja, odabran je izvor rijeke Krke (slika 4), a kao onečišćena postaja odabrano je područje nizvodno od grada Knina, dva kilometra uzvodno od granice Nacionalnog parka Krka (slika 5). U području grada Knina postoje dva poznata izvora onečišćenja rijeke Krke. Jedan izvor onečišćenja predstavljaju industrijske otpadne vode tvornice vijaka, a drugi izvor su komunalne otpadne vode grada Knina koje se bez prethodne prikladne obrade ispuštaju u rijeku Krku (Filipović Marijić i sur., 2016).



**Slika 4.** Uzorkovanje pastrva na izvoru rijeke Krke (snimila: dr. sc. Marijana Erk).

### **3.2. Uzorkovanje riječne vode**

Uzorci riječne vode uzimani su u polietilenske boce (0,25-0,50 L) u triplikatu. Prije uzorkovanja boce su oprane dušičnom kiselinom (10%, *p.a.*, Kemika, Hrvatska) i ultračistom vodom (Milli-Q) kako bi se spriječilo onečišćenje prikupljenih uzoraka riječne vode. Sa svrhom odvajanja otopljene od partikularne frakcije metala/metaloida iz riječne vode, uzorci vode su neposredno nakon uzorkovanja profiltrirani kroz filter za špicu načinjen od celuloznog acetata, promjera pora 0,45  $\mu\text{m}$  (Sartorius, Njemačka), a dobiveni filtrati su zakiseljeni dušičnom kiselinom (*Suprapur*, Merck, Njemačka; konačna koncentracija kiseline u uzorku 1,3%) te pohranjeni na +4°C.



**Slika 5.** Uzorkovanje pastrva na rijeci Krki nizvodno od Knina (snimila: dr. sc. Marijana Erk).

### **3.3. Uzorkovanje pastrva i seciranje ciljnog organa**

Odabrani bioindikatorski organizam za ovo istraživanje bila je potočna pastrva (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) (slika 6), koja je široko rasprostranjena riblja vrsta, posebno karakteristična za čiste, krške rijeke te zbog toga predstavlja prikladan organizam za praćenje kakvoće vode u slatkovodnim krškim ekosustavima. Uzorkovanje riba obavljeno je pomoću električne struje, primjenom elektroagregata Hans Grassl, EL63 II GI, 5,0 KW, Honda GX270, 300/600 V max., 27/15A max., a u skladu s hrvatskim standardom HRN EN 14011 (2005) (Dragun i sur., 2013b). Svako daljnje rukovanje ribama provedeno je u skladu s Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (Ministarstvo poljoprivrede, 2013). Tijekom ovoga istraživanja, koje predstavlja dio znanstvenog projekta „Akumulacija, unutarstanično mapiranje i učinci metala u tragovima u akvatičkih organizama“ financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost, a kojemu je opći cilj procjena ekološkog statusa rijeke Krke, ulovljeno je 36 jedinki pastrve, 16 na izvoru, a 20 u rijeci Krki nizvodno od Knina. Do daljnje obrade u laboratoriju ulovljene ribe čuvane su žive u oksigeniranoj riječnoj vodi, uzetoj na mjestu uzorkovanja, u neprozirnom plastičnom spremniku.



**Slika 6.** Odabrani bioindikatorski organizam - potočna pastrva (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) (snimila: dr.sc. Vlatka Filipović Marijić).

Ulovljenim jedinkama prvo su određene osnovne biometrijske karakteristike, ukupna dužina (izražena u centimetrima) i ukupna masa (izražena u gramima). Naknadno su izračunati i kondicijski indeksi. Fultonov kondicijski indeks (FKI) izračunava se kao omjer mase ribe (izražene u gramima) pomnožene sa sto i kuba ukupne dužine ribe (izražene u centimetrima), a izražava se u  $\text{g cm}^{-3}$  (Rätz i Lloret, 2003). FKI predstavlja koristan parametar za usporedbu uvjeta u kojima ribe rastu (Behzadi Mackvandi i sur., 2015), a odražava zalihe energije te daje informaciju o nedavnoj aktivnosti hranjenja (Lambert i Dutil, 1997).

Nakon mjerenja osnovnih biometrijskih karakteristika, ribe su usmrćene. Prije usmrćivanja, omamljene su anestetikom trikain metan sulfonatom (MS 222, Sigma Aldrich, SAD). Nakon usmrćivanja, iz riba su izolirana te izvagana jetra i gonade, a jetra su pohranjena na  $-80^{\circ}\text{C}$  do daljnje obrade i analiza. Na osnovu izmjerenih masa organa izračunati su i organosomatski indeksi. Hepatosomatski indeks (HSI), koji nam govori o statusu zaliha energije kod riba (Behzadi Mackvandi i sur., 2015), izračunava se kao omjer mase jetri (izražene u gramima) pomnožene sa sto i mase ribe (izražene u gramima), a izražava se u postocima. Gonadosomatski indeks (GSI), koji nam govori o reproduktivnom stanju riba, izračunava se kao omjer mase gonada (izražene u gramima) pomnožene sa sto i mase ribe (izražene u gramima) te se izražava u postocima (Šaši, 2004). Spol je određen makroskopskim i mikroskopskim pregledom gonada. Za mikroskopsko određivanje spola, komadić tkiva gonada svake ribe stavljen je na mikroskopsko predmetno stakalce te promatran pod povećanjem 40 i 100 puta uporabom optičkog mikroskopa BH-2 (Olympus, Japan).



Od ukupno 36 ulovljenih jedinki, za izučavanje unutarstanične raspodjele metala u jetrima ciljano je odabrano šest jedinki, po tri sa svake postaje, na način da se koncentracije akumuliranih metala/metaloida u jetrima odabranih jedinki s različitih postaja što je moguće više međusobno razlikuju, kako bi bilo moguće odrediti razlike u unutarstaničnoj raspodjeli metala/metaloida pri različitim razinama njihove akumulacije u jetrima pastrva. Biometrijske karakteristike šest odabranih jedinki pastrve prikazane su u tablici 1.

**Tablica 1.** Biometrijske karakteristike šest jedinki potočne pastrve (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) iz rijeke Krke čija su jetra korištena za analizu unutarstanične raspodjele metala/metaloida. Pastrve su ulovljene na dvije postaje (referentna postaja: izvor rijeke Krke; onečišćena postaja: rijeka Krka nizvodno od Knina) u listopadu 2015. godine.

	Redni broj uzorka	Ukupna dužina / cm	Ukupna masa / g	HSI / %	GSI / %	FCI / g cm <sup>-3</sup>	Spol*
Krka izvor	1.	27,0	201,7	0,89	5,09	1,02	M
	2.	20,0	87,0	1,29	5,82	1,09	M
	3.	26,1	182,1	0,92	4,46	1,02	M
Krka Knin	4.	22,5	114,6	0,81	5,25	1,01	M
	5.	26,4	203,6	0,84	0,02	1,11	M
	6.	27,5	225,0	1,13	4,30	1,08	M

\*M - mužjak

### 3.4. Homogenizacija i izdvajanje topljivih, citosolskih frakcija iz jetri pastrva

Uzorci jetri izrezani su na sitne komadiće u staklenim posudicama te im je u omjeru 1:5 (masa:volumen) dodan ohlađeni homogenizacijski pufer. Kao homogenizacijski pufer korišten je 100 mM Tris-HCl/Base (Sigma, pH 8,1 pri 4°C) kojemu je dodan reducens (1 mM ditiotreitrol, Sigma). Dobivena smjesa homogenizirana je pomoću 10 poteza Potter-Elvehjem homogenizatora (Glas-Col, SAD) na 6.000 okretaja u minuti. Potom je uslijedilo centrifugiranje dobivenog homogenata jetri pastrva u Avanti J-E centrifugi (Beckman Coulter, SAD) na 50.000×g u trajanju dva sata na temperaturi +4°C (Krasnići i sur., 2013). Supernatant (S50) dobiven nakon centrifugiranja predstavlja topljivu, citosolsku frakciju jetri koja sadrži lizosome i mikrosome (Bonneris i sur., 2005). Alikvoti supernatanta (S50) pohranjeni su na -80°C do daljnjeg određivanja koncentracija metala/metaloida u citosolu, kao i analiza njihove raspodjele među citosolskim biomolekulama različitih molekularnih masa pomoću HPLC-a s isključenjem po veličini.

### 3.5. Razgradnja homogenata i citosola jetri

Tijekom postupka homogenizacije jetri pastrva, alikvot svakoga homogenata odvojen je za naknadnu razgradnju. Homogenati jetri razgrađeni su dodatkom smjese za razgradnju (v/v 1:3), koja je sadržavala koncentriranu  $\text{HNO}_3$  (*suprapur*, Carl Roth GmbH + Co. KG, Njemačka) i 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  (*Suprapur*, Merck, Njemačka) u volumnom omjeru 3:1. Razgradnja je provedena u laboratorijskom sušioniku pri  $85^\circ\text{C}$  u trajanju 3,5 h.

Citosoli jetri razgrađeni su u duplikatu dodatkom smjese za razgradnju (v/v 1:1), koja je sadržavala koncentriranu  $\text{HNO}_3$  (*suprapur*, Carl Roth GmbH + Co. KG, Njemačka) i 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  (*Suprapur*, Merck, Njemačka) u volumnom omjeru 3:1. Razgradnja je provedena u laboratorijskom sušioniku pri  $85^\circ\text{C}$  u trajanju 3,5 h.

Otopine dobivene razgradnjom homogenata i citosola jetri razrijeđene su pet puta ultračistom vodom (Milli-Q) prije mjerenja koncentracija metala i metaloida.

### 3.6. Frakcioniranje citosola jetri pomoću HPLC-a s isključenjem po veličini

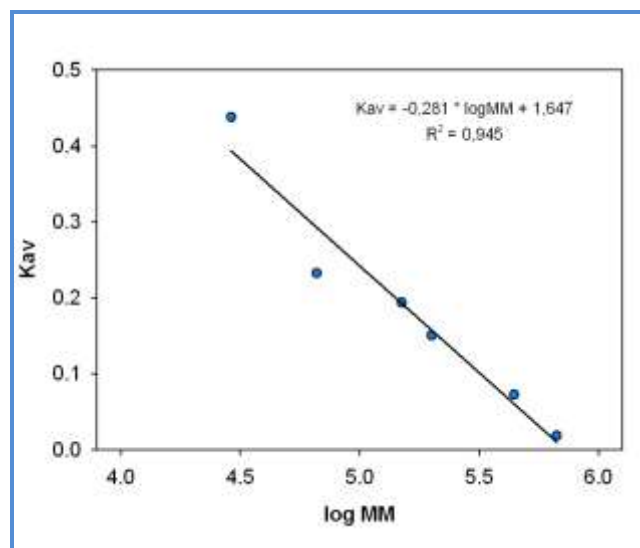
Citosolske, topljive frakcije jetri u sljedećem su koraku razdvojene na frakcije koje sadrže biomolekule različitih molekulskih masa primjenom kolone Tricorn Superdex<sup>TM</sup> 200 10/300 GL (GE Healthcare Biosciences, SAD) i HPLC sustava (Perkin Elmer, serija 200, SAD). HPLC sustav bio je opremljen visokotlačnom pumpom, otplinjačem, termostatiranom komorom za kolone, automatskim dodavačem s hlađenjem i injektorom (volumen petlje 100  $\mu\text{L}$ ) te UV detektorom s nizom dioda (DAD detektor) (Krasnići i sur., 2013, 2014). Optimalno područje razdvajanja biomolekula na koloni Superdex<sup>TM</sup> 200 10/300 GL nalazi se u rasponu molekulskih masa od 10-600 kDa, dok je gornja granica razdvajanja kolone 1.300 kDa. Za određivanje praznog volumena kolone primijenjen je plavi dekstran, definirane molekulske mase 2.000 kDa, kojemu je retencijsko vrijeme u koloni iznosilo 15,5 minuta (tablica 2).

Za kalibraciju kolone primijenjeno je šest standardnih proteina (tiroglobulin, apoferritin,  $\beta$ -amilaza, alkohol dehidrogenaza, albumin, ugljična anhidraza, Sigma, SAD) poznatih molekulskih masa, koje su prikazane u tablici 2. Standardni proteini za kalibraciju otopljeni su u homogenizacijskom puferu (20 mM Tris-HCl/Base, Sigma, SAD, pH 8,1 na  $22^\circ\text{C}$ ) koji je korišten i kao mobilna faza tijekom kromatografskog razdvajanja, uz brzinu protoka  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$  (izokratno eluiranje). Svaki je standardni protein zasebno propušan kroz kolonu, a proteinski kromatogrami su dobiveni primjenom UV detekcije na valnoj duljini 280 nm, na kojoj apsorbiraju aromatske aminokiseline (Stoscheck, 1990). Osim toga, kroz kolonu su propušteni i standardi metalotioneina (MT) (Enzo Metallothionein-1, Enzo Metallothionein-2, Enzo Life Sciences, Švicarska). Kromatogrami metalotioneina dobiveni su primjenom UV detekcije na valnoj duljini 254 nm, koja je svojstvena za apsorpciju veze metala i tiolne skupine (Wang i sur., 2001).

**Tablica 2.** Molekulske mase i retencijska vremena ( $t_e$ ) plavog dekstrana, standardnih proteina korištenih za kalibraciju kromatografske kolone Superdex™ 200 10/300 GL te dviju izoformi metalotioneina.

Standardi	MM/kDa	log MM	$t_e$ /min
Plavi dekstran	2000	3,301	15,5
Tireoglobulin	669	2,825	16,1
Apoferitin	443	2,646	17,8
$\beta$ -amilaza	200	2,301	20,4
Alkohol dehidrogenaza	150	2,176	21,8
Albumin	66	1,820	23,0
Ugljična anhidraza	29	1,462	29,7
Metalotionein 2	6,1	3,785	31,2
Metalotionein 1	6,1	3,785	32,3

Kalibracijski pravac dobiven je na osnovu poznatih molekulskih masa standardnih proteina i njihovih retencijskih vremena. Jednadžba kalibracijskog pravca predstavlja jednadžbu linearne regresije u kojoj je parametar  $K_{av}$  zavisna varijabla, a logaritam molekulske mase proteina nezavisna varijabla (slika 7).



**Slika 7.** Kalibracijski pravac za razdvajanje biomolekula na osnovu molekulske mase primjenom HPLC-a s isključenjem po veličini (kolona Superdex™ 200 10/300 GL).

Parametar Kav izračunava se prema formuli:

$$K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o),$$

gdje

$V_e$  označava elucijski volumen proteina koji se izračunava kao umnožak retencijskog vremena toga proteina i protoka mobilne faze, koji je iznosio  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ ,

$V_o$  označava prazni volumen kolone, koji je iznosio 7,74 mL,

$V_t$  označava ukupni volumen, koji za kolonu Superdex™ 200 10/300 GL iznosi 24 mL.

Uzorci citosola jetri pastrva propuštani su kroz kolonu nanošenjem ukupnog volumena od 200  $\mu\text{L}$  za svaki pojedini uzorak. Razdvojene frakcije skupljane su pomoću automatskog skupljača frakcija (FC 203B, Gilson, SAD) u intervalima od jedne minute počevši od 13., pa sve do 52. minute svakog kromatografskog razdvajanja. Skupljene frakcije zakiseljene su dodatkom  $\text{HNO}_3$  (*Suprapur*, Carl Roth GmbH + Co. KG, Njemačka, konačna koncentracija kiseline 0,16%). Ovako pripremljene frakcije čuvane su na  $+4^\circ\text{C}$  do daljnje analize, u razdoblju ne dužem od 24 h.

### **3.7. Mjerenje koncentracija metala/metaloida u riječnoj vodi, u razgrađenim homogenatima i citosolima te u frakcijama dobivenim razdvajanjem HPLC-om**

Koncentracije osam metala (Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Tl i Zn) i jednog metaloida (Se) izmjerene su pomoću masenog spektrometra visoke rezolucije s induktivno spregnutom plazmom (HR ICP-MS) u uzorcima riječne vode, u razgrađenim homogenatima i citosolima jetri te u jetrenim frakcijama dobivenim razdvajanjem citosola pomoću HPLC-a s isključenjem po veličini. Za mjerenje je korišten HR ICP-MS Element 2 (Thermo Finnigan, Njemačka), koji je opremljen automatskim uzorkivačem SC-2 DX FAST (Elemental Scientific, SAD). Tipični instrumentalni uvjeti i mjerni parametri opisani su u radu Fiket i sur. (2007). Mjerenje koncentracija  $^{82}\text{Se}$ ,  $^{98}\text{Mo}$ ,  $^{111}\text{Cd}$  i  $^{205}\text{Tl}$  provedeno je na niskoj rezoluciji, dok su  $^{55}\text{Mn}$ ,  $^{56}\text{Fe}$ ,  $^{59}\text{Co}$ ,  $^{63}\text{Cu}$  i  $^{66}\text{Zn}$  izmjereni na srednjoj rezoluciji. Vanjska kalibracija mjerenja provedena je primjenom multielementne standardne otopine (Analytika, Češka Republika) iz koje su pripremljeni kalibracijski standardi odgovarajućih koncentracija u 1,3%  $\text{HNO}_3$  (*Suprapur*; Merck, Njemačka). U sve uzorke i standarde dodan je In ( $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ; Fluka, Njemačka) kao interni standard (Fiket i sur., 2007).

Granice detekcije za mjerenje koncentracija metala i metaloida u riječnoj vodi izračunate su kao tri standardne devijacije deset uzastopnih mjerenja metala/metaloida u slijepom uzorku (Milli-Q voda,  $\text{HNO}_3$ ), a iznosile su, u  $\mu\text{g L}^{-1}$ : Cd, 0,002; Co, 0,019; Cu, 0,400; Fe, 0,624; Mn, 0,050; Mo, 0,011; Se, 0,059; Tl, 0,001; Zn, 7,34.

Granice detekcije za mjerenje koncentracija metala i metaloida u citosolu jetri pastrva izračunate su kao tri standardne devijacije deset uzastopnih mjerenja metala/metaloida u slijepom uzorku (100 mM Tris-HCl/Base, 1 mM ditiotritol) razgrađenom prema postupku za razgradnju citosola, a iznosile su, u  $\text{ng g}^{-1}$ : Cd, 0,430; Co, 0,266; Cu, 13,5; Fe, 141; Mn, 0,810; Mo, 0,680; Se, 2,93; Tl, 0,001; Zn, 635. Granice detekcije za mjerenje koncentracija

metala i metaloida u homogenatima bile su dvostruko više, u skladu s primijenjenim postupkom razgradnje homogenata.

Granice detekcije za mjerenje koncentracija metala i metaloida u frakcijama dobivenim razdvajanjem citosola pomoću HPLC-a s isključenjem po veličini iznosile su, u  $\mu\text{g L}^{-1}$ : Cd, 0,005; Co, 0,002, Cu, 0,037; Fe, 0,084; Mn, 0,002; Mo, 0,004; Se, 0,138; Tl, 0,001; i Zn, 2,40 (Krasnići i sur., 2013, 2014).

Za kontrolu kakvoće mjerenja primijenjen je kontrolni uzorak za mjerenje metala u tragovima (QC za metale u tragovima, kataloški broj 8072, serijski broj 146142-146143, UNEP/GEMS, Burlington, Kanada). Kontrola je provedena za sve analizirane metale osim za molibden, za koji nije bio dostupan odgovarajući kontrolni uzorak. Prikazani rezultati odnose se na srednju vrijednost i standardnu devijaciju 11 zasebnih mjerenja, osim u slučaju talija, za koji je provedeno devet mjerenja (tablica 3).

**Tablica 3.** Kontrola kakvoće mjerenja metala HR ICP-MS-om u riječnoj vodi, jetrima pastrve i jetrenim frakcijama dobivenim pomoću HPLC-a s isključenjem po veličini. Za kontrolu je primijenjen uzorak dobiven od organizacije UNEP/GEMS (QC za metale u tragovima, kataloški broj 8072, serijski broj 146142-146143, Burlington, Kanada).

<b>Element</b>	<b>Definirana koncentracija / <math>\mu\text{g L}^{-1}</math></b>	<b>Izmjerena koncentracija / <math>\mu\text{g L}^{-1}</math></b>	<b>Točnost / %</b>
<b>Co</b>	1,16	1,15±0,02	99,2±1,6
<b>Cu</b>	3,63	3,49±0,08	96,2±2,3
<b>Fe</b>	3,13	2,94±0,16	93,9±5,0
<b>Mn</b>	3,07	3,00±0,05	97,9±1,8
<b>Se</b>	0,854	0,854±0,073	100,0±8,6
<b>Zn</b>	2,06	2,09±0,24	101,6±11,7
<b>Cd</b>	0,788	0,772±0,016	98,0±2,0
<b>Tl</b>	2,14	2,10±0,06	98,2±2,9

Rezultati dobiveni mjerenjem u filtriranoj riječnoj vodi predstavljaju koncentracije otopljenih metala/metaloida u vodi, a izraženi su kao  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Rezultati dobiveni mjerenjem u razgrađenim homogenatima predstavljaju ukupne koncentracije metala/metaloida u jetrima pastrva, dok rezultati dobiveni mjerenjem u razgrađenim citosolima predstavljaju

koncentracije metala/metaloida u topljivoj, citosolskoj frakciji jetri. Sve dobivene koncentracije metala/metaloida u jetrima pastrva izražene su kao  $\text{ng g}^{-1}$  ili  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Rezultati dobiveni mjerenjem u frakcijama jetri dobivenima razdvajanjem citosola pomoću HPLC-a s isključenjem po veličini izraženi su kao količine metala/metaloida, u nanogramima, eluirane u određenoj minuti.

### **3.8. Prikaz i obrada rezultata**

Svi izračuni iz prikupljenih broječnih podataka provedeni su u računalnom programu Microsoft Excel 2013. Statističke usporedbe koncentracija metala/metaloida izmjenjenih za dvije postaje provedene su pomoću *t*-testa s razinom značajnosti postavljenom na 95% ( $p < 0,05$ ), u statističkom programu SigmaPlot 11.0 za Windowse. Statistička usporedba provedena je za ukupne i citosolske koncentracije metala/metaloida u jetrima pastrva te za postotnu zastupljenost metala u topljivoj, citosolskoj frakciji jetri. Grafički prikazi profila raspodjele metala/metaloida među biomolekulama različitih molekulskih masa u citosolu jetri pastrva izrađeni su u statističkom programu SigmaPlot 11.0 za Windowse. Proteinski kromatogrami dobiveni snimanjem UV detektorom obrađeni su u softveru Totalchrom, verzija 6.3.1 (Perkin-Elmer, SAD).

## 4. REZULTATI

### 4.1. Koncentracije otopljenih metala i metaloida u vodi rijeke Krke

U tablici 4. prikazane su koncentracije osam otopljenih metala i jednog metaloida u vodi rijeke Krke, koje su izmjerene u listopadu 2015. godine na dvjema odabranim postajama uzorkovanja, na izvoru rijeke Krke kao referentnoj postaji te u rijeci Krki nizvodno od grada Knina kao onečišćenoj postaji.

Usporedba vrijednosti izmjerenih na tim dvjema odabranim postajama ukazala je na usporedive koncentracije otopljenog bakra, selena, kadmija i talija na referentnoj i onečišćenoj postaji. Nasuprot tome, koncentracije kobalta, željeza, mangana, molibdena i cinka bile su umjereno povišene u rijeci Krki nizvodno od Knina u odnosu na izvor.

**Tablica 4.** Koncentracije otopljenih metala/metaloida u vodi rijeke Krke na dvjema postajama uzorkovanja (referentna postaja: izvor rijeke Krke; onečišćena postaja: rijeka Krka nizvodno od Knina) u listopadu 2015. godine (n=3).

Element	Krka izvor / $\mu\text{g L}^{-1}$	Krka Knin / $\mu\text{g L}^{-1}$
Co	<0,020	0,196±0,010
Cu	<0,400	<0,400
Fe	0,910±0,370	4,88±0,372
Mn	0,100±0,008	3,86±0,145
Mo	0,210±0,004	0,410±0,005
Se	0,080±0,022	0,100±0,014
Zn	<7,50	20,41±5,15
Cd	0,010±0,003	0,010±0,004
Tl	0,004±0,000	0,005±0,000

### 4.2. Koncentracije metala i metaloida akumuliranih u jetrima odabranih pastrva

#### 4.2.1. Ukupne koncentracije metala i metaloida akumuliranih u jetrima odabranih pastrva

U tablici 5. prikazane su ukupne koncentracije osam metala i jednog metaloida akumuliranih u jetrima šest odabranih pastrva iz rijeke Krke, uzorkovanih u listopadu 2015. godine na dvjema postajama uzorkovanja. Za analizu su odabrane tri pastrve s izvora rijeke

Krke kao referentne postaje te tri pastrve iz rijeke Krke nizvodno od grada Knina kao onečišćene postaje.

Usporedba vrijednosti izmjerenih u jetrima tih odabranih pastrva s dviju postaja ukazala je na više koncentracije kobalta, bakra, željeza, mangana, molibdena i selena kod jedinki ulovljenih u rijeci Krki nizvodno od Knina u odnosu na jedinke ulovljene na izvoru rijeke Krke. Razlike su bile najizraženije u slučaju kobalta, bakra i željeza, čije su srednje vrijednosti izmjerene na onečišćenoj postaji bile dvostruko više u odnosu na referentnu te u slučaju selena, sa 60% višim vrijednostima na onečišćenoj postaji, dok su razlike u koncentracijama mangana i molibdena između postaja iznosile  $\leq 10\%$ . Razlike u koncentracijama bakra, željeza i selena između dviju odabranih skupina bile su i statistički značajne ( $p < 0,05$ ). Nasuprot tome, ukupne koncentracije kadmija i talija bile su više u jedinkama ulovljenima na izvoru, i to u slučaju kadmija u prosjeku čak 14 puta, a u slučaju talija 2,5 puta u odnosu na onečišćenu postaju. Razlike u koncentracijama kadmija između dviju odabranih skupina bile su i statistički značajne ( $p < 0,05$ ). Ukupne koncentracije cinka u jetrima pastrva bile su usporedive kod odabranih jedinki s obiju postaja.

**Tablica 5.** Ukupne koncentracije metala/metaloida u jetrima šest jedinki potočne pastrve (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) iz rijeke Krke koje su korištene za analizu unutarstanične raspodjele metala. Pastrve su ulovljene na dvjema postajama uzorkovanja (referentna postaja: izvor rijeke Krke; onečišćena postaja: rijeka Krka nizvodno od Knina) u listopadu 2015. godine. Statistička usporedba ukupnih koncentracija metala/metaloida u jetrima odabranih pastrva s dviju postaja provedena je pomoću *t*-testa, a razlike se smatraju statistički značajnima kada je  $p < 0,05$ .

	Krka izvor				Krka Knin				P
	1.	2.	3.	Sve	4.	5.	6.	Sve	
<b>Co / ng g<sup>-1</sup></b>	16,2	19,9	19,6	<b>18,6±2,06</b>	84,1	24,1	22,6	<b>43,6±35,1</b>	0,285
<b>Cu / µg g<sup>-1</sup></b>	53,4	25,3	35,0	<b>37,9±14,3</b>	86,3	81,1	90,1	<b>85,8±4,5</b>	<b>0,005</b>
<b>Fe / µg g<sup>-1</sup></b>	121	51,3	88,9	<b>87,1±34,9</b>	172	183	153	<b>169±15,2</b>	<b>0,020</b>
<b>Mn / ng g<sup>-1</sup></b>	970	1186	1353	<b>1170±192</b>	1966	811	1143	<b>1307±595</b>	0,723
<b>Mo / ng g<sup>-1</sup></b>	182	155	161	<b>166±14,2</b>	267	139	125	<b>177±78,3</b>	0,822
<b>Se / µg g<sup>-1</sup></b>	2,22	1,57	2,25	<b>2,01±0,38</b>	3,68	3,06	3,05	<b>3,26±0,36</b>	<b>0,015</b>
<b>Zn / µg g<sup>-1</sup></b>	21,1	16,8	28,5	<b>22,1±5,92</b>	22,2	24,4	19,7	<b>22,1±2,35</b>	0,993
<b>Cd / ng g<sup>-1</sup></b>	327	124	193	<b>215±103</b>	25,7	9,18	12,1	<b>15,7±8,82</b>	<b>0,029</b>
<b>Tl / ng g<sup>-1</sup></b>	180	560	429	<b>390±193</b>	343	9,10	93,0	<b>148±174</b>	0,183



#### 4.2.2. Citosolske koncentracije metala i metaloida akumuliranih u jetrima odabranih pastrva

U tablici 6. prikazane su koncentracije osam metala i jednog metaloida akumuliranih u topljivim, citosolskim frakcijama jetri šest odabranih pastrva iz rijeke Krke, uzorkovanih u listopadu 2015. godine na dvjema postajama uzorkovanja (tri pastrve s izvora rijeke Krke kao referentne postaje te tri pastrve iz rijeke Krke nizvodno od grada Knina kao onečišćene postaje).

**Tablica 6.** Citosolske koncentracije metala/metaloida u jetrima šest jedinki potočne pastrve (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) iz rijeke Krke koje su korištene za analizu unutarstanične raspodjele metala. Pastrve su ulovljene na dvjema postajama uzorkovanja (referentna postaja: izvor rijeke Krke; onečišćena postaja: rijeka Krka nizvodno od Knina) u listopadu 2015. godine. Statistička usporedba citosolskih koncentracija metala/metaloida u jetrima pastrva s dviju postaja provedena je pomoću *t*-testa, a razlike se smatraju statistički značajnima kada je  $p < 0,05$ .

	Krka izvor				Krka Knin				p
	1.	2.	3.	Sve	4.	5.	6.	Sve	
<b>Co / ng g<sup>-1</sup></b>	14,1	17,7	16,5	<b>16,1±1,83</b>	35,7	19,4	19,2	<b>24,8±9,47</b>	0,195
<b>Cu / µg g<sup>-1</sup></b>	28,2	16,7	23,1	<b>22,7±5,76</b>	46,2	40,8	57,0	<b>48,0±8,25</b>	<b>0,012</b>
<b>Fe / µg g<sup>-1</sup></b>	54,7	44,1	57,0	<b>51,9±6,88</b>	65,7	73,0	92,0	<b>76,9±13,6</b>	<b>0,047</b>
<b>Mn / ng g<sup>-1</sup></b>	694	866	886	<b>815±106</b>	810	466	751	<b>676±184</b>	0,318
<b>Mo / ng g<sup>-1</sup></b>	107	95,2	92,2	<b>98,1±7,82</b>	99,3	74,2	73,7	<b>82,4±14,6</b>	0,176
<b>Se / µg g<sup>-1</sup></b>	1,50	1,42	1,97	<b>1,63±0,30</b>	2,77	1,98	2,25	<b>2,33±0,40</b>	0,071
<b>Zn / µg g<sup>-1</sup></b>	14,3	10,5	18,9	<b>14,6±4,21</b>	14,2	16,6	13,9	<b>14,9±1,48</b>	0,903
<b>Cd / ng g<sup>-1</sup></b>	296	119	181	<b>199±89,8</b>	20,1	8,79	10,9	<b>13,3±6,01</b>	<b>0,023</b>
<b>Tl / ng g<sup>-1</sup></b>	87,5	416	291	<b>265±166</b>	199	4,11	42,4	<b>81,8±103</b>	0,180

Citosolske koncentracije metala/metaloida u jetrima odabranih jedinki potočne pastrve s dviju postaja na rijeci Krki za većinu su analiziranih elemenata pokazivale jednaki obrazac prostornih razlika kao ukupne koncentracije metala/metaloida u jetrima. Citosolske koncentracije kobalta, bakra, željeza i selena u jetrima jedinki s onečišćene postaje bile su više u odnosu na referentnu postaju, i to bakra u prosjeku dvostruko više, a kobalta, željeza i selena 40-50% više. Razlike u koncentracijama bakra i željeza između dviju odabranih skupina bile su i statistički značajne ( $p < 0,05$ ). Nasuprot tome, ukupne koncentracije mangana, molibdena, kadmija i talija bile su više u jedinkama ulovljenima na izvoru, i to u slučaju kadmija u prosjeku čak 15 puta, u slučaju talija 3 puta više, dok su u slučaju mangana i molibdena srednje vrijednosti bile povišene samo 20% u odnosu na onečišćenu

postaju. Razlike u koncentracijama kadmija između dviju odabranih skupina bile su i statistički značajne ( $p < 0,05$ ). Citosolske koncentracije cinka u jetrima pastrva bile su usporedive kod odabranih jedinki s obiju postaja.

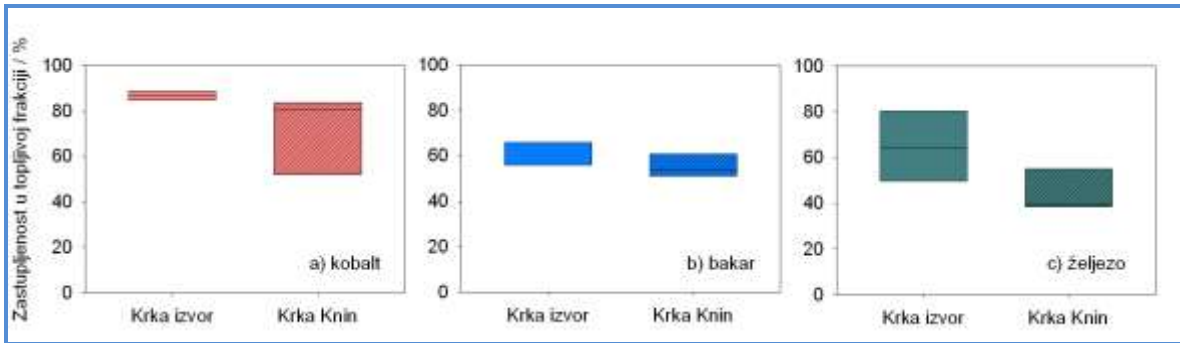
### 4.3. Unutarstanična raspodjela metala i metaloida akumuliranih u jetrima odabranih pastrva

#### 4.3.1. Raspodjela metala i metaloida između topljive i netopljive frakcije u jetrima pastrva

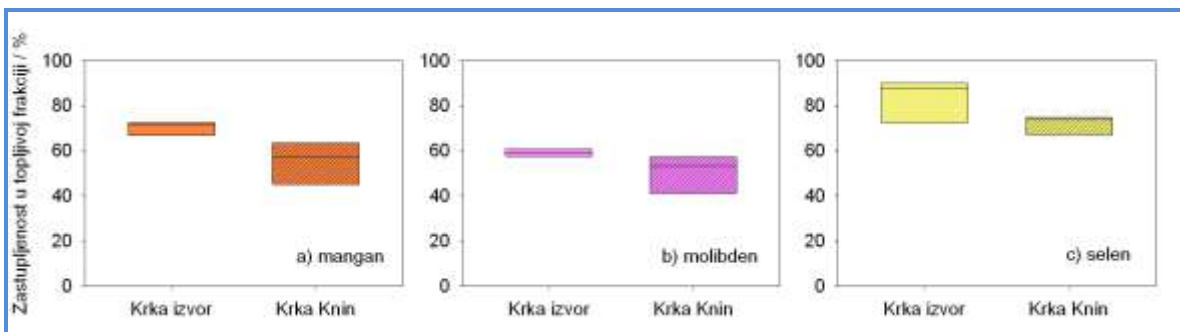
U tablici 7. te na slikama 8.-10. prikazane su postotne zastupljenosti osam metala i jednog metaloida u topljivim, citosolskim frakcijama jetri šest odabranih pastrva iz rijeke Krke, uzorkovanih u listopadu 2015. godine na dvjema postajama uzorkovanja (tri pastrve s izvora rijeke Krke kao referentne postaje te tri pastrve iz rijeke Krke nizvodno od grada Knina kao onečišćene postaje).

**Tablica 7.** Postotna zastupljenost metala/metaloida u topljivim frakcijama jetri šest jedinki potočne pastrve (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) iz rijeke Krke koje su korištene za analizu unutarstanične raspodjele metala. Pastrve su ulovljene na dvjema postajama uzorkovanja (referentna postaja: izvor rijeke Krke; onečišćena postaja: rijeka Krka nizvodno od Knina) u listopadu 2015. godine. Statistička usporedba postotnih zastupljenosti metala/metaloida u topljivim frakcijama jetri pastrva s dvaju područja provedena je pomoću *t*-testa, a razlike se smatraju statistički značajnima kada je  $p < 0,05$ .

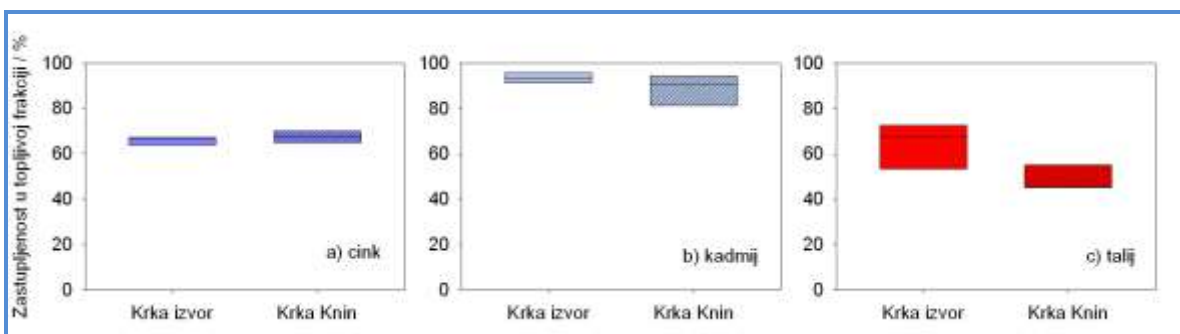
	Krka izvor				Krka Knin				P
	1.	2.	3.	Sve	4.	5.	6.	Sve	
<b>Co / %</b>	87,0	89,3	84,1	<b>86,8±2,6</b>	42,4	80,6	84,7	<b>69,2±23,3</b>	0,265
<b>Cu / %</b>	52,7	66,0	66,0	<b>61,6±7,7</b>	53,6	50,3	63,3	<b>55,7±6,8</b>	0,379
<b>Fe / %</b>	45,1	86,0	64,1	<b>65,1±20,5</b>	38,2	39,9	60,0	<b>46,0±12,1</b>	0,238
<b>Mn / %</b>	71,5	73,0	65,5	<b>70,0±4,0</b>	41,2	57,4	65,7	<b>54,8±12,5</b>	0,114
<b>Mo / %</b>	59,0	61,3	57,3	<b>59,2±2,0</b>	37,1	53,4	58,7	<b>49,7±11,3</b>	0,225
<b>Se / %</b>	67,7	90,8	87,4	<b>82,0±12,5</b>	75,3	64,8	73,9	<b>71,3±5,7</b>	0,250
<b>Zn / %</b>	67,5	62,8	66,5	<b>65,6±2,5</b>	63,8	67,9	70,6	<b>67,4±3,4</b>	0,494
<b>Cd / %</b>	90,3	96,5	93,6	<b>93,5±3,1</b>	78,3	95,8	90,5	<b>88,2±9,0</b>	0,391
<b>Tl / %</b>	48,6	74,2	67,9	<b>63,6±13,3</b>	58,1	45,1	45,6	<b>49,6±7,4</b>	0,188



**Slika 8.** Postotna zastupljenost a) kobalta, b) bakra i c) željeza u topljivim frakcijama jetri pastrva ulovljenih na izvoru rijeke Krke te u rijeci Krki nizvodno od Knina u listopadu 2015. godine. Rezultati su prikazani kvadratnim dijagramima. Granice kvadrata označavaju prvi i treći kvartil, dok linija unutar kvadrata označava vrijednost medijana. Broj uzoraka po kvadratu iznosi tri.



**Slika 9.** Postotna zastupljenost a) mangana, b) molibdena i c) selena u topljivim frakcijama jetri pastrva ulovljenih na izvoru rijeke Krke te u rijeci Krki nizvodno od Knina u listopadu 2015. godine. Rezultati su prikazani kvadratnim dijagramima. Granice kvadrata označavaju prvi i treći kvartil, dok linija unutar kvadrata označava vrijednost medijana. Broj uzoraka po kvadratu iznosi tri.



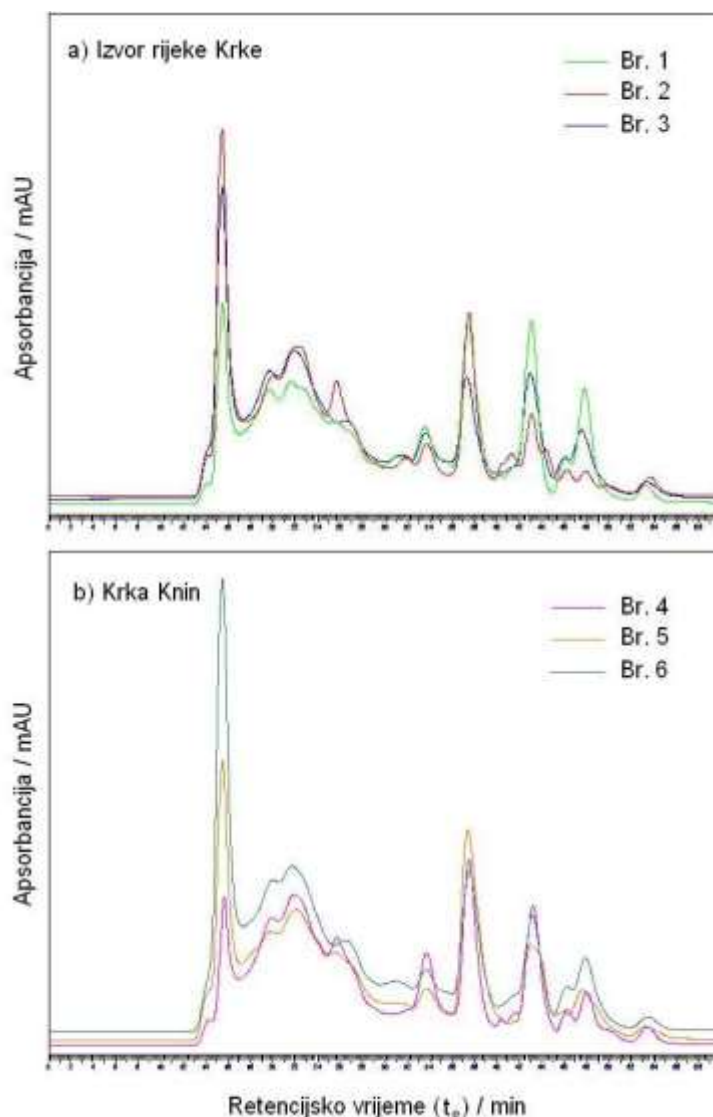
**Slika 10.** Postotna zastupljenost a) cinka, b) kadmija i c) talija u topljivim frakcijama jetri pastrva ulovljenih na izvoru rijeke Krke te u rijeci Krki nizvodno od Knina u listopadu 2015. godine. Rezultati su prikazani kvadratnim dijagramima. Granice kvadrata označavaju prvi i treći kvartil, dok linija unutar kvadrata označava vrijednost medijana. Broj uzoraka po kvadratu iznosi tri.

Postotne zastupljenosti metala/metaloida u topljivim frakcijama jetri šest jedinki potočne pastrve iz rijeke Krke izračunate su kao postotni omjeri citosolskih koncentracija i ukupnih koncentracija metala/metaloida izmjenjenih u jetrima tih pastrva. Po visini prosječne postotne zastupljenosti u topljivoj frakciji jetri pastrva s referentne postaje, analizirane elemente možemo poredati po sljedećem opadajućem redoslijedu: Cd (>90%) > Co, Se (80-90%) > Mn (70-80%) > Cu, Fe, Zn, Tl (60-70%) > Mo (<60%). Po visini prosječne postotne zastupljenosti u topljivoj frakciji jetri pastrva s onečišćene postaje, analizirane elemente možemo poredati po sljedećem opadajućem redoslijedu: Cd (80-90%) > Se (70-80%) > Co, Zn (60-70%) > Cu, Mn (50-60%) > Fe, Mo, Tl (40-50%). Redoslijed elemenata je uglavnom usporediv na obje postaje, ali vrijednosti se međusobno razlikuju. Jedino cink pokazuje usporedivu postotnu zastupljenost na obima postajama, dok svi ostali elementi pokazuju veću postotnu zastupljenost u jetrima jedinki s izvora rijeke Krke. Zanimljivo je, međutim, uočiti da su kobalt, bakar, željezo, mangan, molibden i selen prisutni u nižim ukupnim koncentracijama u jetrima jedinki s izvora Krke te da im stoga zastupljenost u topljivoj frakciji pada s porastom ukupno akumulirane količine metala/metaloida u jetri. Nasuprot tome, kadmij i talij su prisutni u višim ukupnim koncentracijama u jetrima jedinki s izvora Krke te im stoga zastupljenost u topljivoj frakciji raste s porastom ukupno akumulirane količine metala u jetri.

#### *4.3.2. Raspodjela metala i metaloida među citosolskim biomolekulama u jetrima pastrva*

Primjenom HPLC-a s isključenjem po veličini, citosolske, topljive jetrene frakcije šest odabranih jedinki potočne pastrve iz rijeke Krke, uzorkovanih u listopadu 2015. godine na dvjema postajama uzorkovanja (tri pastrve s izvora rijeke Krke kao referentne postaje te tri pastrve iz rijeke Krke nizvodno od grada Knina kao onečišćene postaje), razdijeljene su na frakcije koje sadrže biomolekule različitih molekulskih masa. Frakcije kraćeg retencijskog vremena sadrže biomolekule viših molekulskih masa, dok frakcije dužeg retencijskog vremena sadrže biomolekule nižih molekulskih masa, koje se duže zadržavaju u kromatografskoj koloni. Za potrebe ovoga istraživanja citosolske su biomolekule kategorizirane u četiri skupine prema svojoj molekulskoj masi: 1) VMM ili biomolekule visoke molekulske mase (>100 kDa); 2) SMM ili biomolekule srednje molekulske mase (30-100 kDa); 3) NMM ili biomolekule niske molekulske mase (10-30 kDa); te 4) JNMM ili biomolekule jako niske molekulske mase (<10 kDa).

Tijekom propuštanja citosola jetri svake pojedine pastrve kroz kromatografsku kolonu, snimanjem pomoću UV detektora na 280 nm za svaku je jedinku pastrve dobiven proteinski kromatogram. Na slici 11. prikazani su kromatografski profili raspodjele biomolekula u citosolima jetri svih šest analiziranih pastrva, u obliku promjena apsorbancije (mAU) na 280 nm (os y) s porastom retencijskog vremena (min) (os x). Iz grafičkog prikaza može se uočiti da su kromatografski profili raspodjele citosolskih biomolekula međusobno usporedivi te da se razlikuju jedino po visini pojedinih pikova, što može upućivati na razliku u koncentraciji ukupnih proteina, kao i pojedinih biomolekula u citosolu jetri analiziranih pastrva.



**Slika 11.** Kromatografski profili raspodjele biomolekula u citosolu jetri šest odabranih pastrva dobiveni snimanjem UV detektorom na 280 nm tijekom razdvajanja citosola HPLC-om s isključenjem po veličini na koloni Superdex<sup>TM</sup> 200 10/300 GL: a) pastrve s izvora rijeke Krke; b) pastrve iz rijeke Krka nizvodno od Knina.

U frakcijama dobivenim razdvajanjem pomoću HPLC-a s isključenjem po veličini naknadno su pomoću HR ICP-MS-a izmjerene koncentracije te izračunate količine osam metala i jednog metaloida, kako bi se na osnovi retencijskih vremena frakcija u kojima su metali i metaloid eluirani definirali njihovi profili raspodjele među citosolskim biomolekulama različitih molekulskih masa. Retencijska vremena povezana su s odgovarajućim molekulskim masama biomolekula na osnovu kalibracijskog pravca dobivenog primjenom proteinskih standarda poznatih molekulskih masa.

**Tablica 8.** Retencijska vremena ( $t_e$ ) i molekulske mase biomolekula sadržanih u citosolskim frakcijama jetri pastrva (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) u kojima su eluirani pojedini metali i metaloid nakon razdvajanja HPLC-om s isključenjem po veličini (Superdex 200 10/300 GL kolona). U tablici su prikazani maksimumi pikova pojedinih analiziranih metala/metaloida (odnosno, frakcije s najvišim koncentracijama metala/metaloida), kao i njihove širine.

Element	<sup>a</sup> Pik VMM 1		<sup>a</sup> Pik VMM 2		<sup>b</sup> Pik SMM		<sup>c</sup> Pik NMM		<sup>d</sup> Pik JNMM 1		<sup>d</sup> Pik JNMM 2		
	$t_e$ / min	MM / kDa	$t_e$ / min	MM / kDa	$t_e$ / min	MM / kDa	$t_e$ / min	MM / kDa	$t_e$ / min	MM / kDa	$t_e$ / min	MM / kDa	
Esencijalni elementi	Co	15 (14-17)	818 (1052-494)	22 (18-24)	140 (384-85)	26 (24-28)	51 (85-31)						
	Cu	15 (14-17)	818 (1052-494)					31 (28-34)	15 (31-7)				
	Fe			18 (14-21)	384 (1052-180)	26 (24-28)	51 (85-31)			33 (32-35)	9 (11-5)		
	Mn	16 (14-19)	636 (1052-299)	21 (19-22)	180 (299-140)	24 (23-26)	85 (109-51)	29 (26-31)	24 (51-15)			41 (40-43)	1,2 (1,5-0,7)
	Mo	15 (14-17)	818 (1052-494)	20 (17-23)	232 (494-109)	26 (24-29)	51 (85-24)			35 (33-37)	5 (9-3,2)		
	Se	15 (14-17)	818 (1052-494)	22 (20-24)	140 (232-85)					37 (35-38)	3,2 (5-2,5)	42 (40-44)	0,9 (1,5-0,6)
	Zn	15 (14-17)	818 (1052-494)	23 (17-29)	109 (494-24)			31 (29-33)	15 (24-9)				
Ne-esencijalni elementi	Cd	15 (14-17)	818 (1052-494)					31 (29-34)	15 (24-7)				
	Tl			22 (19-25)	140 (299-66)					34 (32-36)	7 (11-4,1)		

<sup>a</sup>Pik VMM – pik koncentracije metala/metaloida u citosolskoj frakciji s maksimumom u području proteina visoke molekulske mase (>100 kDa)

<sup>b</sup>Pik SMM – pik koncentracije metala/metaloida u citosolskoj frakciji s maksimumom u području proteina srednje molekulske mase (30-100 kDa)

<sup>c</sup>Pik NMM – pik koncentracije metala/metaloida u citosolskoj frakciji s maksimumom u području proteina niske molekulske mase (10-30 kDa)

<sup>d</sup>Pik JNMM – pik koncentracije metala/metaloida u citosolskoj frakciji s maksimumom u području proteina jako niske molekulske mase (<10 kDa)

U tablici 8. dan je pregled retencijskih vremena svih frakcija (pikova) u kojima su eluirani pojedini metali i metaloid, kao i molekulskih masa odgovarajućih citosolskih biomolekula koje su eluirane u tim istim frakcijama. Prvo su prikazani esencijalni elementi (kobalt, bakar, željezo, mangan, molibden, selen i cink), a zatim neesencijalni elementi (kadmij i talij).

#### *4.3.2.1. Kobalt*

Na profilima raspodjele kobalta može se vidjeti da je kobalt eluiran u tri pika (slika 12, tablica 8). Prva dva pika nalaze se u području VMM biomolekula, pri čemu se prvi pik nalazi u rasponu retencijskog vremena od 14. do 17. minute, s maksimumom u 15. minuti te obuhvaća biomolekule molekulskih masa 1.052-494 kDa. Drugi VMM pik nalazi se u rasponu retencijskog vremena od 18. do 24. minute, s maksimumom u 22. minuti te obuhvaća biomolekule molekulskih masa 384-85 kDa. Treći pik nalazi se u području SMM biomolekula, s rasponom retencijskog vremena od 24. do 28. minute i maksimumom u 26. minuti. Njegovo retencijsko vrijeme odgovara biomolekulama molekulskih masa 85-31 kDa.

Od četiri navedena pika, najizraženija je prisutnost kobalta u drugome piku, odnosno u području VMM biomolekula, s maksimumom molekulske mase oko 140 kDa. Usporedbom profila raspodjele kobalta pri nižim i višim citosolskim koncentracijama, vidljivo je da upravo u tom VMM području dolazi do uočljivog porasta pri povećanju akumulacije kobalta u citosolu jetri pastrva.

#### *4.3.2.2. Bakar*

Na profilima raspodjele bakra može se vidjeti da je bakar eluiran u dva pika (slika 13, tablica 8). Prvi pik nalazi se u području VMM biomolekula, u rasponu retencijskog vremena od 14. do 17. minute, s maksimumom u 15. minuti te obuhvaća biomolekule molekulskih masa 1.052-494 kDa. Drugi pik nalazi se u području NMM biomolekula, s rasponom retencijskog vremena od 28. do 34. minute i maksimumom u 31. minuti. Njegovo retencijsko vrijeme odgovara biomolekulama molekulskih masa 31-7 kDa.

Od dva navedena pika, izraženija je prisutnost bakra u drugome piku, odnosno u području NMM biomolekula, s maksimumom molekulske mase oko 15 kDa. Međutim, usporedba profila raspodjele bakra pri nižim i višim citosolskim koncentracijama otkriva da, iako je porast bakra u NMM području uočljiviji, pri povećanju akumulacije bakra u citosolu jetri pastrva dolazi do porasta i u VMM području.

#### *4.3.2.3. Željezo*

Na profilima raspodjele željeza može se vidjeti da je željezo eluirano u tri pika (slika 14, tablica 8). Prvi pik nalazi se u području VMM biomolekula, u rasponu retencijskog

vremena od 14. do 21. minute, s maksimumom u 18. minuti te obuhvaća biomolekule molekularnih masa 1.052-180 kDa. Drugi pik nalazi se u području SMM biomolekula, u rasponu retencijskog vremena od 24. do 28. minute, s maksimumom u 26. minuti te obuhvaća biomolekule molekularnih masa 85-31 kDa. Treći pik nalazi se u području JNMM biomolekula, u rasponu retencijskog vremena od 32. do 35. minute i s maksimumom u 33. minuti. Njegovo retencijsko vrijeme odgovara biomolekulama molekularnih masa 11-5 kDa.

Prisutnost željeza podjednaka je u sva tri navedena pika, pri nižim citosolskim koncentracijama željeza. Međutim, usporedba profila raspodjele željeza pri nižim i višim citosolskim koncentracijama otkriva najizraženiji porast željeza u VMM području, s maksimumom molekularne mase oko 384 kDa, pri povećanju akumulacije željeza u citosolu jetri pastrva.

#### *4.3.2.4. Mangan*

Na profilima raspodjele mangana može se vidjeti da je mangan naizgled eluiran u dva pika, jednom širokom pikom koji obuhvaća biomolekule od visoke do niske molekularne mase te jednom pikom u području JNMM biomolekula (slika 15, tablica 8). Međutim, pažljivijim uvidom, prvi, široki pik može se razdijeliti u četiri pika. Prva dva pika nalaze se u području VMM biomolekula, prvi u rasponu retencijskog vremena od 14. do 19. minute, s maksimumom u 16. minuti, a drugi u rasponu retencijskog vremena od 19. do 22. minute, s maksimumom u 21. minuti. Retencijsko vrijeme prvog pika odgovara biomolekulama molekularnih masa 1052-299 kDa, a drugog pika biomolekulama molekularnih masa 299-140 kDa. Treći pik nalazi se u području SMM biomolekula, u rasponu retencijskog vremena od 23. do 26. minute, s maksimumom u 24. minuti. To retencijsko vrijeme odgovara biomolekulama molekularnih masa 109-51 kDa. Četvrti pik nalazi se u području NMM biomolekula, u rasponu retencijskog vremena od 26. do 31. minute, s maksimumom u 29. minuti. To retencijsko vrijeme odgovara biomolekulama molekularnih masa 51-15 kDa. Peti, JNMM, pik nalazi se u rasponu retencijskog vremena od 40. do 43. minute, s maksimumom u 41. minuti. Tom retencijskom vremenu odgovaraju biomolekule molekularnih masa 1,5-0,7 kDa.

Prisutnost mangana vrlo je izražena, ali i podjednaka u prva četiri pika, u kojima i podjednako raste pri povećanju akumulacije mangana u citosolu jetri pastrva.

#### *4.3.2.5. Molibden*

Na profilima raspodjele molibdena može se vidjeti da je molibden eluiran u četiri pika (slika 16, tablica 8). Prva dva pika nalaze se u području VMM biomolekula, pri čemu se prvi pik nalazi u rasponu retencijskog vremena od 14. do 17. minute, s maksimumom u 15. minuti, a drugi u rasponu retencijskog vremena od 17. do 23. minute, s maksimumom u 20. minuti. Njihova retencijska vremena odgovaraju biomolekulama molekularnih masa 1052-



494 kDa, odnosno 494-109 kDa. Treći pik nalazi se u području SMM biomolekula, u rasponu retencijskog vremena od 24. do 29. minute, s maksimumom u 26. minuti. Njegovo retencijsko vrijeme odgovara biomolekulama molekularnih masa 85-24 kDa. Četvrti pik nalazi se u području JNMM biomolekula, u rasponu retencijskog vremena od 33. do 37. minute, s maksimumom u 35. minuti. Tom retencijskom vremenu odgovaraju biomolekule molekularnih masa 9-3,2 kDa.

Od četiri navedena pika, najizraženija je prisutnost molibdena u drugome piku, odnosno u području VMM biomolekula, s maksimumom molekularne mase oko 230 kDa. Također je izražajan i četvrti pik u području JNMM biomolekula, s maksimumom molekularne mase oko 5 kDa. Usporedbom profila raspodjele molibdena pri nižim i višim citosolskim koncentracijama, vidljivo je da upravo u ta dva pika dolazi do blagog porasta pri povećanju akumulacije molibdena u citosolu jetri pastrva.

#### 4.3.2.6. Selen

Na profilima raspodjele selena može se vidjeti da je selen eluiran u četiri pika (slika 17, tablica 8). Prva dva pika nalaze se u području VMM biomolekula, pri čemu se prvi pik nalazi u rasponu retencijskog vremena od 14. do 17. minute, s maksimumom u 15. minuti, a drugi pik u rasponu retencijskog vremena od 20. do 24. minute, s maksimumom u 22. minuti. Njihova retencijska vremena odgovaraju biomolekulama molekularnih masa 1052-494 kDa te 232-85 kDa. Treći i četvrti pik nalaze se u području JNMM biomolekula. Treći pik nalazi se u području retencijskog vremena od 35. do 38. minute, s maksimumom u 37. minuti, a četvrti pik u rasponu retencijskog vremena od 40. do 44. minute, s maksimumom u 42. minuti. Njihovim retencijskim vremenima odgovaraju biomolekule molekularnih masa 5-2,5 kDa te 1,5-0,6 kDa.

Od četiri navedena pika, najizraženija je prisutnost selena u četvrtom piku, odnosno u području JNMM biomolekula, s maksimumom molekularne mase oko 1 kDa. Usporedbom profila raspodjele selena pri nižim i višim citosolskim koncentracijama, vidljivo je da osim porasta u navedenom četvrtom piku, pri povećanju akumulacije selena u citosolu jetri pastrva dolazi do porasta i u trećem piku, također u JNMM području, s maksimumom molekularne mase oko 3 kDa.

#### 4.3.2.7. Cink

Na profilima raspodjele cinka može se vidjeti da je cink eluiran u tri pika (slika 18, tablica 8). Prva dva pika nalaze se u području VMM biomolekula, pri čemu se prvi pik nalazi u rasponu retencijskog vremena od 14. do 17. minute, s maksimumom u 15. minuti, a drugi pik u rasponu retencijskog vremena od 17. do 29. minute, s maksimumom u 23. minuti. Njihova retencijska vremena odgovaraju biomolekulama molekularnih masa 1052-494 kDa te 494-24 kDa. Treći pik nalazi se u području NMM biomolekula, u rasponu retencijskog

vremena od 29. do 33. minute, s maksimumom u 31. minuti, a odgovara biomolekulama molekularnih masa 24-9 kDa.

Od tri navedena pika, najizraženija je prisutnost cinka u srednjem piku, odnosno u području VMM biomolekula, s maksimumom molekularne mase oko 100 kDa. Usporedbom profila raspodjele cinka pri nižim i višim citosolskim koncentracijama, vidljivo je da upravo u tom području dolazi do porasta pri povećanju akumulacije cinka u citosolu jetri pastrva.

#### *4.3.2.8. Kadmij*

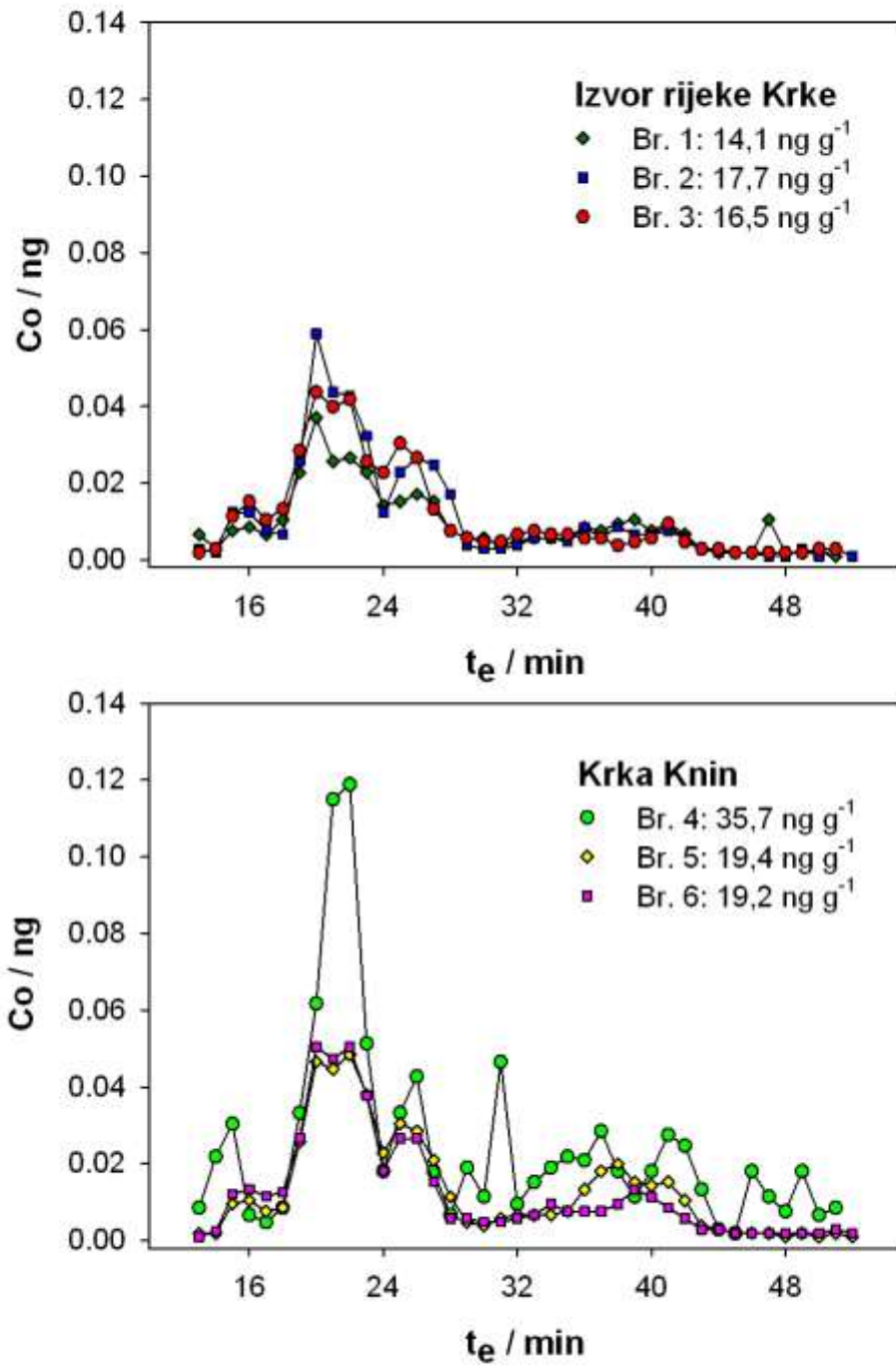
Na profilima raspodjele kadmija može se vidjeti da je kadmij eluiran u dva pika (slika 19, tablica 8). Prvi pik nalazi se u području VMM biomolekula, u rasponu retencijskog vremena od 14. do 17. minute, s maksimumom u 15. minuti. Njegovo retencijsko vrijeme odgovara biomolekulama molekularnih masa 1052-494 kDa. Drugi pik nalazi se u području NMM biomolekula, u rasponu retencijskog vremena od 29. do 34. minute, s maksimumom u 31. minuti. Njegovom retencijskom vremenu odgovaraju biomolekule molekularnih masa 24-7 kDa.

Kod niskih koncentracija akumuliranog kadmija u citosolu jetre, prisutnost kadmija u oba pika je podjednaka. Međutim, usporedbom profila raspodjele kadmija pri nižim i višim citosolskim koncentracijama, vidljiv je izraziti porast kadmija u NMM piku, s maksimumom molekularne mase oko 15 kDa, pri povećanju akumulacije kadmija u citosolu jetri pastrva.

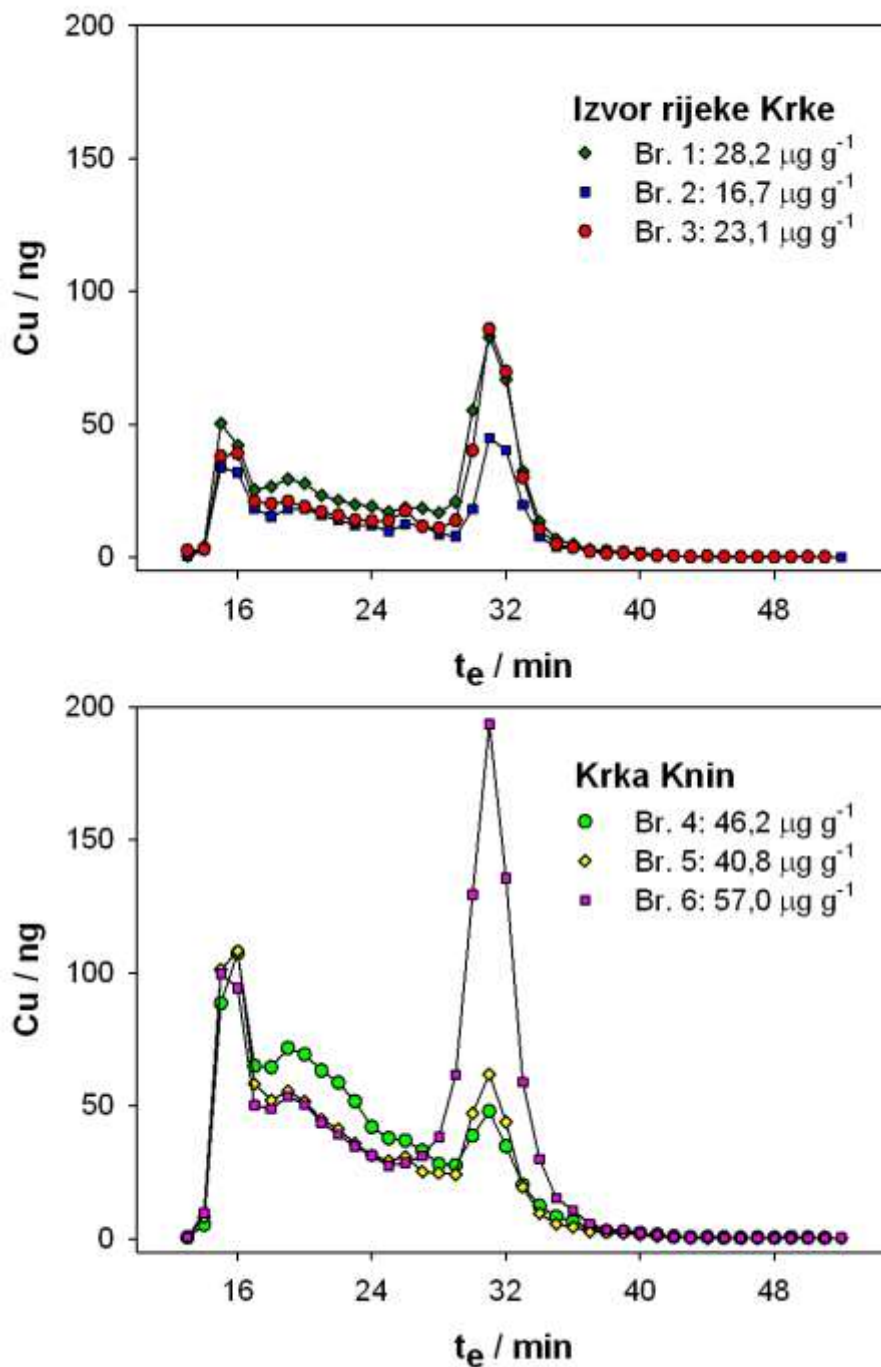
#### *4.3.2.9. Talij*

Na profilima raspodjele talija može se vidjeti da je talij eluiran u dva pika (slika 20, tablica 8). Prvi pik nalazi se u području VMM biomolekula, u rasponu retencijskog vremena od 19. do 25. minute, s maksimumom u 22. minuti. Njegovo retencijsko vrijeme odgovara biomolekulama molekularnih masa 299-66 kDa. Drugi pik nalazi se u području JNMM biomolekula, u rasponu retencijskog vremena od 32. do 36. minute, s maksimumom u 34. minuti. Njegovom retencijskom vremenu odgovaraju biomolekule molekularnih masa 11-4,1 kDa.

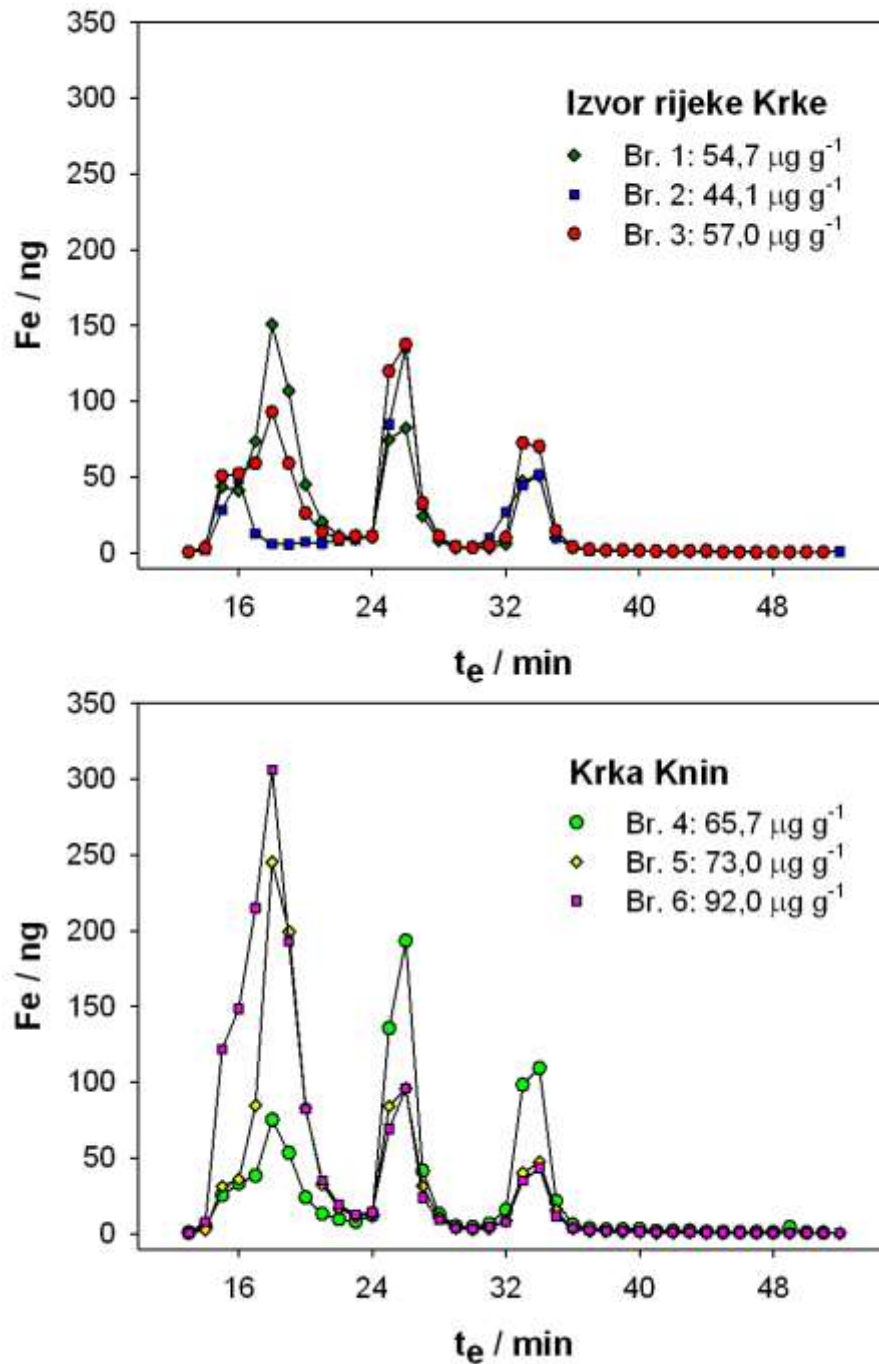
Prisutnost talija puno je izraženija u prvom VMM piku, s maksimumom molekularne mase oko 140 kDa. Zbog tehničkih razloga, za talij su sveukupno definirana samo četiri profila raspodjele. Međutim, usporedba tih profila raspodjele talija pri nižim i višim citosolskim koncentracijama ipak jasno otkriva porast upravo u navedenom VMM području pri povećanju akumulacije talija u citosolu jetri pastrva.



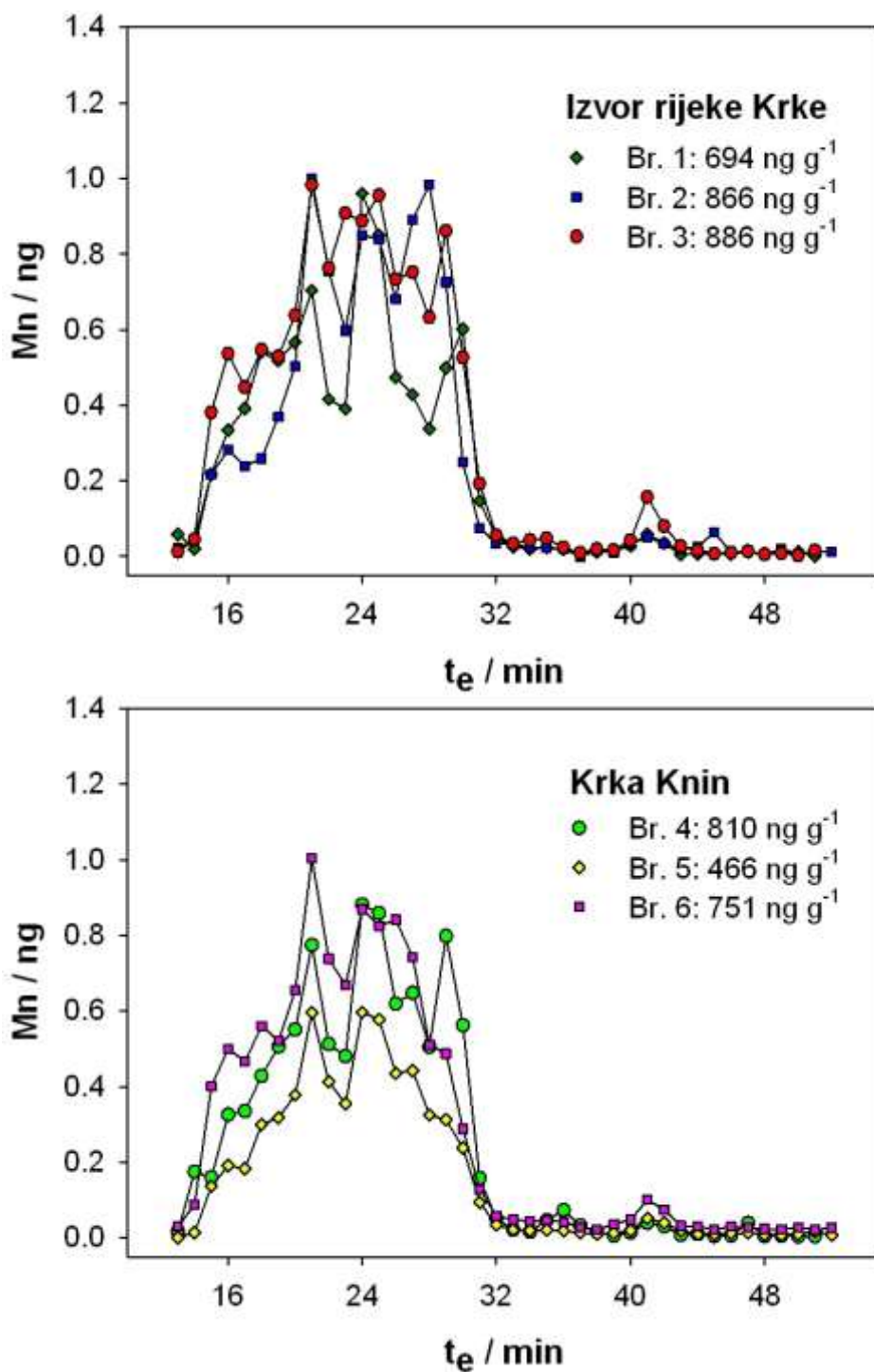
**Slika 12.** Profili raspodjele kobalta među biomolekulama različitih molekularnih masa u citosolu jetri šest pastrva, dobiveni HPLC razdvajanjem na koloni Superdex™ 200 10/300 GL i mjerenjem na HR ICP-MS-u. Rezultati su prikazani kao nanogrami kobalta eluirani u frakcijama odgovarajućeg retencijskog vremena. Na slikama je naznačeno mjesto uzorkovanja pastrva, kao i citosolske koncentracije kobalta (ng g<sup>-1</sup>) u jetrima pojedinih pastrva.



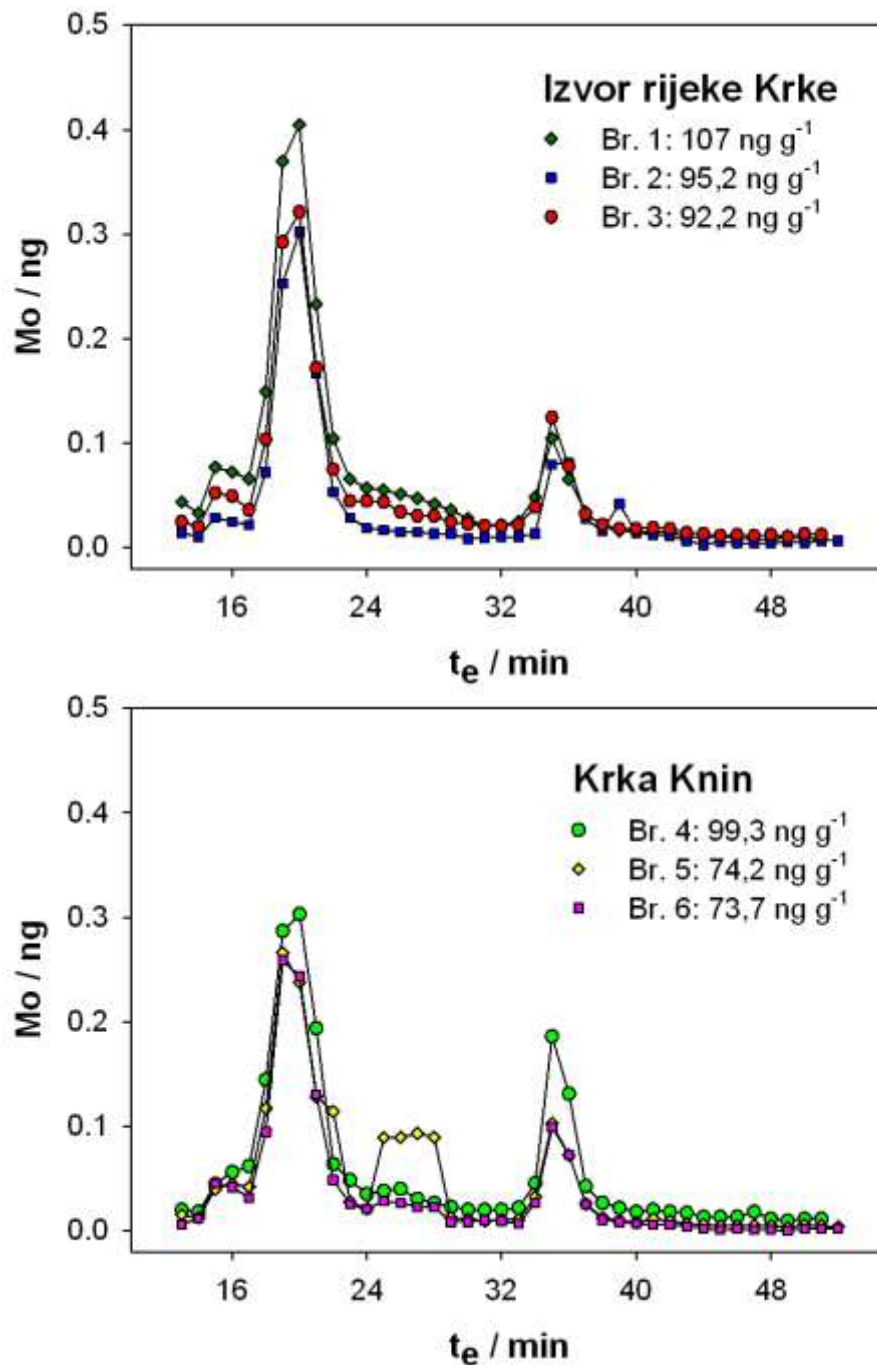
**Slika 13.** Profili raspodjele bakra među biomolekulama različitih molekularnih masa u citosolu jetri šest pastrva, dobiveni HPLC razdvajanjem na koloni Superdex™ 200 10/300 GL i mjerenjem na HR ICP-MS-u. Rezultati su prikazani kao nanogrami bakra eluirani u frakcijama odgovarajućeg retencijskog vremena. Na slikama je naznačeno mjesto uzorkovanja pastrva, kao i citosolske koncentracije bakra ( $\text{ng g}^{-1}$ ) u jetrima pojedinih pastrva.



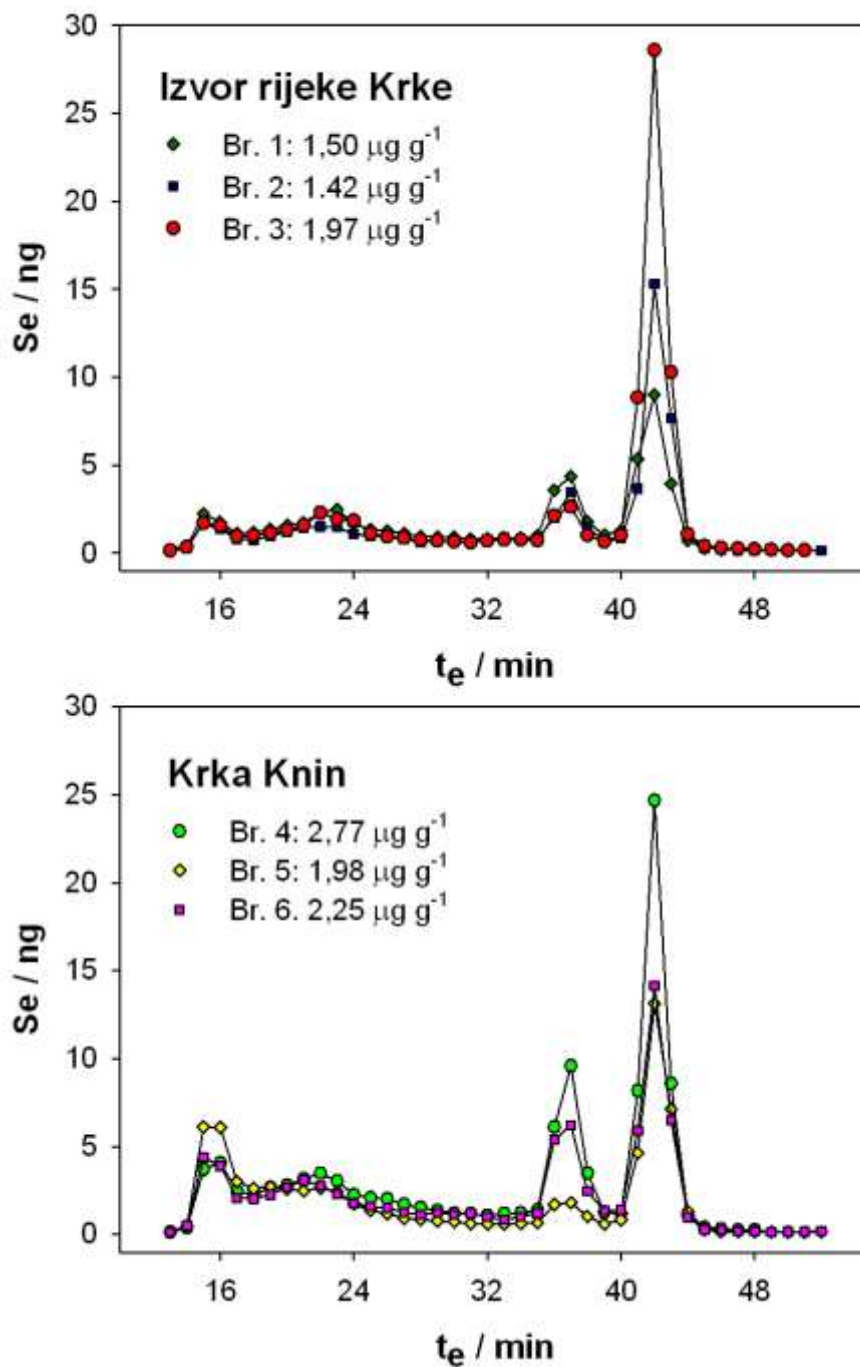
**Slika 14.** Profili raspodjele željeza među biomolekulama različitih molekularnih masa u citosolu jetri šest pastrva, dobiveni HPLC razdvajanjem na koloni Superdex™ 200 10/300 GL i mjerenjem na HR ICP-MS-u. Rezultati su prikazani kao nanogrami željeza eluirani u frakcijama odgovarajućeg retencijskog vremena. Na slikama je naznačeno mjesto uzorkovanja pastrva, kao i citosolske koncentracije željeza ( $\text{ng g}^{-1}$ ) u jetrima pojedinih pastrva.



**Slika 15.** Profili raspodjele mangana među biomolekulama različitih molekularnih masa u citosolu jetri šest pastrva, dobiveni HPLC razdvajanjem na koloni Superdex™ 200 10/300 GL i mjerenjem na HR ICP-MS-u. Rezultati su prikazani kao nanogrami mangana eluirani u frakcijama odgovarajućeg retencijskog vremena. Na slikama je naznačeno mjesto uzorkovanja pastrva, kao i citosolske koncentracije mangana (ng g<sup>-1</sup>) u jetrima pojedinih pastrva.

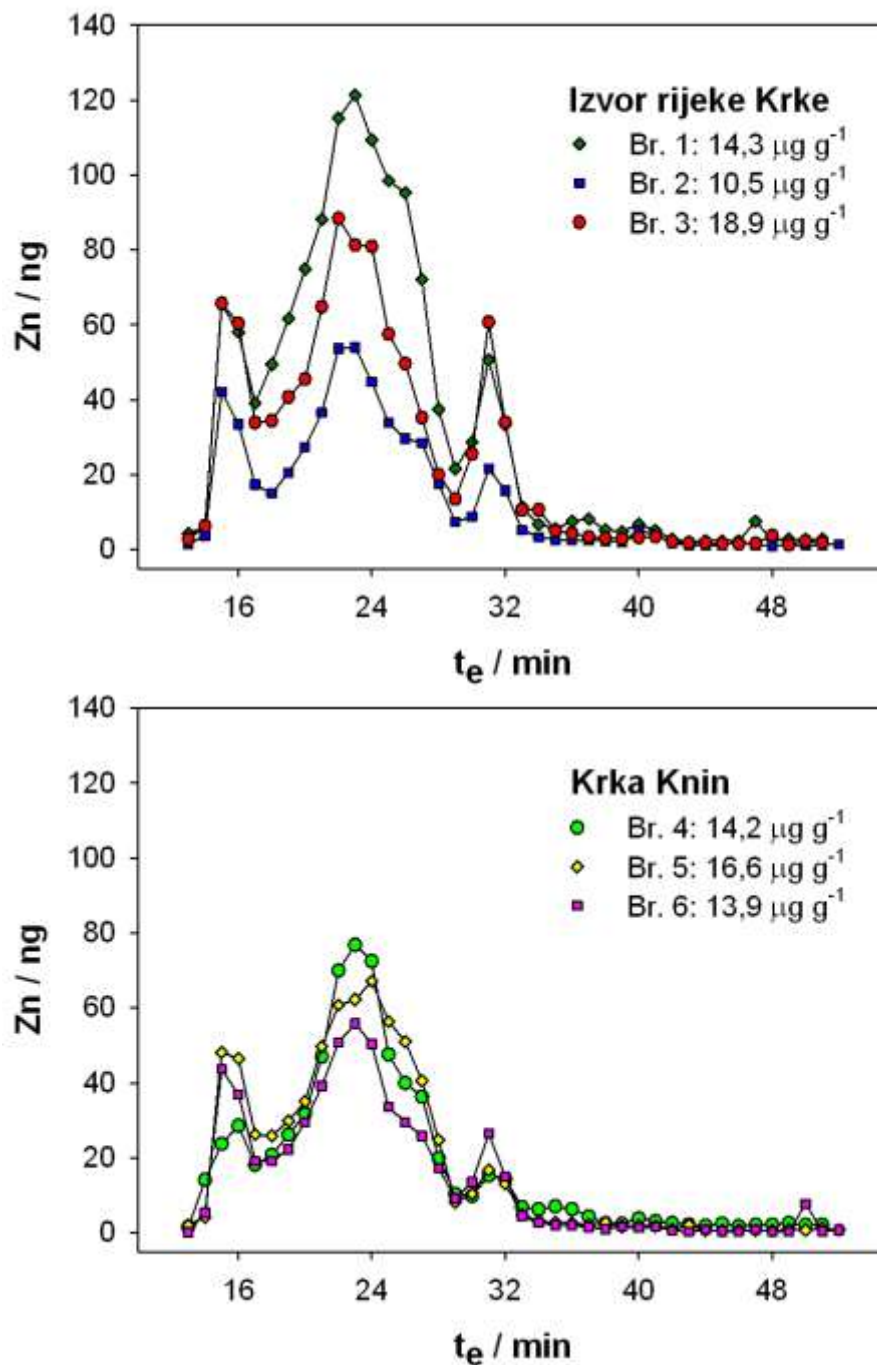


**Slika 16.** Profili raspodjele molibdena među biomolekulama različitih molekularnih masa u citosolu jetri šest pastrva, dobiveni HPLC razdvajanjem na koloni Superdex™ 200 10/300 GL i mjerenjem na HR ICP-MS-u. Rezultati su prikazani kao nanogrami molibdena eluirani u frakcijama odgovarajućeg retencijskog vremena. Na slikama je naznačeno mjesto uzorkovanja pastrva, kao i citosolske koncentracije molibdena (ng g<sup>-1</sup>) u jetrima pojedinih pastrva.

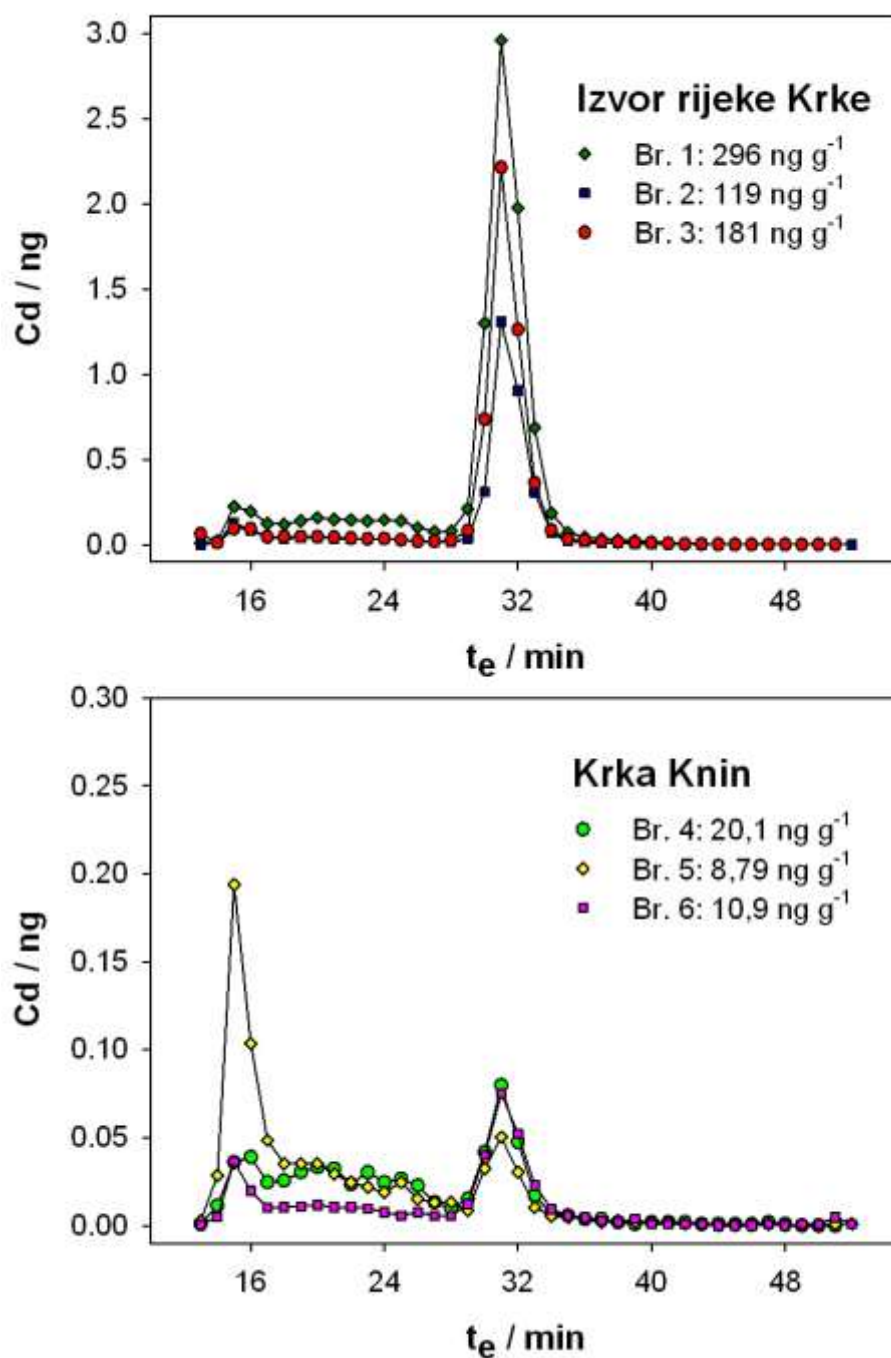


**Slika 17.** Profili raspodjele selena među biomolekulama različitih molekularnih masa u citosolu jetri šest pastrva, dobiveni HPLC razdvajanjem na koloni Superdex™ 200 10/300 GL i mjerenjem na HR ICP-MS-u. Rezultati su prikazani kao nanogrami selena eluirani u frakcijama odgovarajućeg retencijskog vremena. Na slikama je naznačeno mjesto uzorkovanja pastrva, kao i citosolske koncentracije selena ( $\text{ng g}^{-1}$ ) u jetrima pojedinih pastrva.

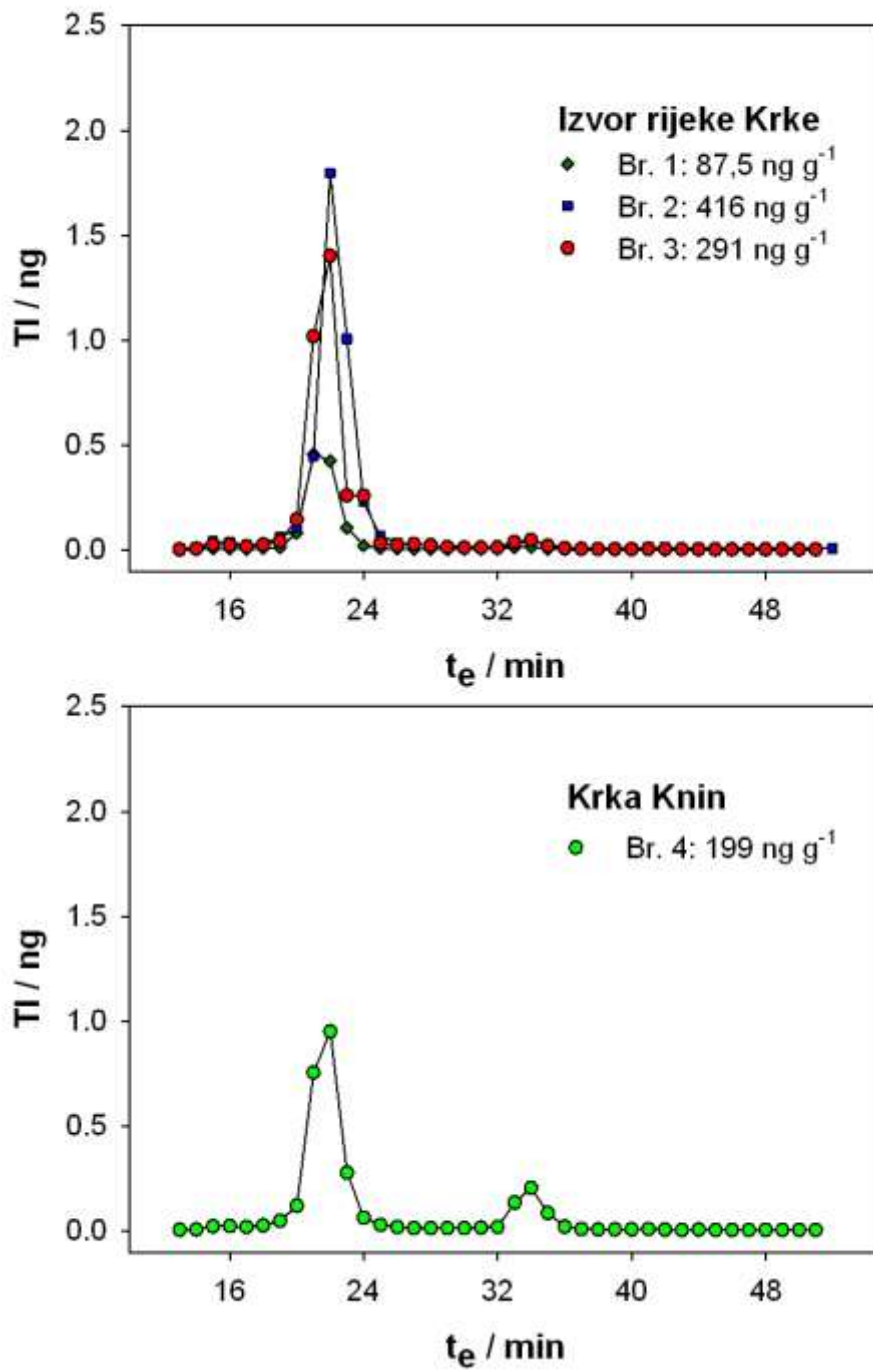




**Slika 18.** Profili raspodjele cinka među biomolekulama različitih molekularnih masa u citosolu jetri šest pastrva, dobiveni HPLC razdvajanjem na koloni Superdex™ 200 10/300 GL i mjerenjem na HR ICP-MS-u. Rezultati su prikazani kao nanogrami cinka eluirani u frakcijama odgovarajućeg retencijskog vremena. Na slikama je naznačeno mjesto uzorkovanja pastrva, kao i citosolske koncentracije cinka ( $\text{ng g}^{-1}$ ) u jetrima pojedinih pastrva.



**Slika 19.** Profili raspodjele kadmija među biomolekulama različitih molekularnih masa u citosolu jetri šest pastrva, dobiveni HPLC razdvajanjem na koloni Superdex™ 200 10/300 GL i mjerenjem na HR ICP-MS-u. Rezultati su prikazani kao nanogrami kadmija eluirani u frakcijama odgovarajućeg retencijskog vremena. Na slikama je naznačeno mjesto uzorkovanja pastrva, kao i citosolske koncentracije kadmija (ng g<sup>-1</sup>) u jetrima pojedinih pastrva.



**Slika 20.** Profili raspodjele talija među biomolekulama različitih molekularnih masa u citosolu jetri šest pastrva, dobiveni HPLC razdvajanjem na koloni Superdex™ 200 10/300 GL i mjerenjem na HR ICP-MS-u. Rezultati su prikazani kao nanogrami talija eluirani u frakcijama odgovarajućeg retencijskog vremena. Na slikama je naznačeno mjesto uzorkovanja pastrva, kao i citosolske koncentracije talija (ng g<sup>-1</sup>) u jetrima pojedinih pastrva.

## 5. RASPRAVA

Metali/metaloidi u prirodnim vodama javljaju se u raznim anorganskim i organskim oblicima. Biološka raspoloživost, a time i toksičnost metala/metaloida u vodenim sustavima ovisi o obliku u kojemu su prisutni u vodi. Osnovna kategorizacija metala u vodi zasniva se na podjeli na otopljenu i partikularnu fazu nakon filtriranja uzoraka vode kroz filter promjera pora 0,45  $\mu\text{m}$ . Frakcija koja prođe kroz filter definirana je kao otopljena, dok je frakcija prikupljena na filteru definirana kao partikularna. Partikularni oblici metala manje su biološki raspoloživi i toksični u odnosu na otopljene oblike, koji obuhvaćaju organski kompleksirane metale i anorganske oblike metala te slobodne metalne ione. Međutim, otopljena frakcija obuhvaća i koloidne oblike metala (<200 nm) koji također mogu proći kroz filter (INAP, 2002). Koncentracije metala i metaloida u vodi rijeke Krke prikazane u ovome radu u tablici 4. predstavljaju njihovu otopljenu frakciju. Rezultati pokazuju da je u otopljenoj frakciji u vodi rijeke Krke u najvišoj koncentraciji bio prisutan cink (do 20,4  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), zatim slijede željezo (0,9-4,9  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), mangan (0,1-3,9  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), molibden (0,2-0,4  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), bakar (do 0,4  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), kobalt (do 0,2  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), selen (0,08-0,10  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) i kadmij (0,01  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), dok je talij bio prisutan u najnižoj koncentraciji (0,004-0,005  $\mu\text{g L}^{-1}$ ).

Upravo je otopljena frakcija metala, kao potencijalno toksičnija, obuhvaćena Europskom direktivom o vodama (EPCEU, 2013). No, ovom direktivom definirane su granične vrijednosti (preporučeni godišnji prosjeci i maksimalno dopuštene koncentracije) za samo nekoliko metala, koji se ubrajaju u prioritetne toksične tvari, a to su kadmij, olovo, nikal i živa, od kojih je u ovome radu analiziran samo kadmij, za koji najstroža preporučena koncentracija u riječnoj vodi iznosi 80  $\text{ng L}^{-1}$  (EPCEU, 2013).

Usporedbom izmjerenih vrijednosti kadmija u vodi rijeke Krke u listopadu 2015. godine s vrijednostima naznačenima u europskoj direktivi, vidljivo je da je koncentracija otopljenog kadmija u rijeci Krki osam puta niža od najstrožeg propisa za godišnji prosjek. Nadalje, dozvoljena koncentracija bakra u riječnoj vodi zasad nije propisana, ali je od strane britanskih znanstvenika preporučeno da se u direktivu uključi koncentracija od 8,2  $\mu\text{g L}^{-1}$  bakra kao prihvatljivi godišnji prosjek (Crane i sur., 2007). U ovome istraživanju u vodi rijeke Krke izmjerena je koncentracija bakra koja je bila niža od granice detekcije, dakle ispod 0,4  $\mu\text{g L}^{-1}$ , što je znatno niže od predložene vrijednosti. Koncentracije ostalih analiziranih metala/metaloida, koje nisu definirane zakonskom regulativom, uspoređene su s prethodno objavljenim podacima za dvije rijeke u Hrvatskoj koje se smatraju umjereno onečišćenima, Savu i Sutlu. Izmjerene koncentracije otopljenog Cu, Fe, Mn i Mo na obje postaje rijeke Krke (tablica 4), referentnoj (izvor rijeke Krke) i onečišćenoj (Krka nizvodno od Knina), bile su niže od koncentracija tih metala izmjerenih čak i na području rijeke Sutle koje se smatra najmanje onečišćenim (Cu: 0,49  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; Fe: 36,7  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; Mn: 17,1  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; Mo: 0,55  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) (Dragun i sur., 2011). Koncentracije Cd, Co i Tl na obje su postaje bile niže od koncentracija tih metala izmjerenih na onečišćenom području rijeke Sutle (Cd: 0,117  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; Co: 0,347  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; Tl: 0,028  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) (Dragun i sur., 2011) te niže ili podjednake koncentracijama izmjerenima u rijeci Savi (Cd: 0,015  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; Co: 0,068  $\mu\text{g L}^{-1}$ ;

Tl:  $0,005 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (Dautović i sur., 2006). Na osnovu provedene usporedbe, uočljivo je da su koncentracije analiziranih otopljenih metala u vodi rijeke Krke vrlo niske te se ova rijeka još uvijek može smatrati prilično čistom. No, unatoč tome, vidljive su razlike u koncentracijama nekih metala (Co, Fe, Mn, Mo, Zn) između izvora, kao referentne postaje, i Krke nizvodno od Knina, kao onečišćene postaje, što ukazuje na posljedice antropogenog utjecaja na ovu rijeku nizvodno od Knina, odnosno utjecaja ispuštanja nepročišćenih otpadnih voda u rijeku Krku (tablica 4).

Iz tog razloga značajno je pratiti i definirati mogući utjecaj toga zasad blagog onečišćenja na organizme koji žive u riječnoj vodi. U ovome je istraživanju kao bioindikatorski organizam za praćenje utjecaja onečišćenja odabrana potočna pastrva (*S. trutta*), dok su kao ciljni organ za analize odabrana jetra, njen glavni metabolički i detoksikacijski organ. Za ostvarivanje ciljeva ovoga rada, dakle analize unutarstaničnih raspodjela metala i metaloida u jetrima pastrva, od ukupnog broja uzorkovanih pastrva odabrane su po tri sa svake postaje, referentne i onečišćene. Odabrane jedinke s obiju postaja bile su usporedivih dužina (izvor: 20-27 cm; Knin: 22,5-27,5 cm) i masa (izvor: 87-202 g; Knin: 115-225 g), i sve su jedinke bile mužjaci. Pri odabiru jedinki pastrva za analizu osnovni je cilj bio postići što je moguće veću razliku u citosolskim koncentracijama metala/metaloida kako bi se u daljnjem istraživanju mogao pratiti utjecaj razlika u akumulaciji metala/metaloida na njihovu unutarstaničnu raspodjelu. U skladu s tim, citosolske koncentracije kobalta, bakra, željeza i selena u jetrima jedinki s onečišćene postaje bile su više u odnosu na referentnu postaju, i to bakra u prosjeku dvostruko više, a kobalta, željeza i selena 40-50% više (tablica 6). Nasuprot tome, citosolske koncentracije kadmija i talija bile su više u jedinkama ulovljenima na izvoru, i to u slučaju kadmija u prosjeku čak 15 puta, a u slučaju talija 3 puta (tablica 6). Razlike u prosječnim koncentracijama mangana i molibdena između postaja bile su vrlo male, dok su u slučaju cinka citosolske koncentracije u jetrima pastrva bile usporedive kod odabranih jedinki s obiju postaja (tablica 6). Ovakav odabir uzoraka omogućio je definiranje osnovne unutarstanične raspodjele za sve analizirane elemente, kao i definiranje promjena u raspodjeli koje nastaju uslijed značajnijih razlika u akumulaciji metala/metaloida, u slučaju kobalta, bakra, željeza, selena, kadmija i talija.

Ukupne koncentracije analiziranih metala i metaloida u jetrima pastrva (tablica 5) pratile su sljedeći redoslijed: Fe ( $51,3-183 \mu\text{g g}^{-1}$ ) > Cu ( $25,3-90,1 \mu\text{g g}^{-1}$ ) > Zn ( $16,8-28,5 \mu\text{g g}^{-1}$ ) > Se ( $1,57-3,68 \mu\text{g g}^{-1}$ ) > Mn ( $811-1966 \text{ng g}^{-1}$ ) > Tl ( $9,10-560 \text{ng g}^{-1}$ ) > Cd ( $9,18-327 \text{ng g}^{-1}$ ) > Mo ( $125-267 \text{ng g}^{-1}$ ) > Co ( $16,2-84,1 \text{ng g}^{-1}$ ). Usporedbom s nekim dosad objavljenim koncentracijama metala u jetrima pastrva, vidljivo je da se vrijednosti dobivene u ovome istraživanju nalaze u usporedivim rasponima. Na primjer, u jetri pastrve *S. trutta macrostigma* (Duméril, 1858) iz potoka Munzur u Turskoj, koncentracija Cd iznosila je  $109 \pm 35,7 \text{ng g}^{-1}$ , a Cu  $18,2 \pm 8,1 \mu\text{g g}^{-1}$  (Can i sur., 2012), dok je u jetri potočne pastrve *S. trutta* u krškom slatkovodnom sustavu Nacionalnog parka Plitvička jezera koncentracija Zn iznosila  $30-60 \mu\text{g g}^{-1}$ , Cd  $100-600 \text{ng g}^{-1}$ , a Cu  $30-90 \mu\text{g g}^{-1}$  (Vukosav i sur., 2014).

Unutarstanična raspodjela metala/metaloida izučavana je na dva načina. Prvo analizom raspodjele metala/metaloida između dviju frakcija – topljive i netopljive, a zatim

izučavanjem njihove raspodjele unutar same topljive frakcije, među biomolekulama različitih molekulskih masa.

Topljiva frakcija, dobivena centrifugiranjem na 50.000×g, sadrži lizosome, mikrosome te toplinski stabilne proteine i proteine koji se zagrijavanjem denaturiraju. Nasuprot tome, netopljiva frakcija, dakle talog dobiven nakon centrifugiranja na 50.000×g, sadrži cijele stanice, jezgre, dijelove staničnih membrana, granule i mitohondrije (Bonneris i sur., 2005). Na osnovi postotne zastupljenosti u topljivoj frakciji jetri pastrva, metale/metaloid možemo podijeliti na one koji su u većoj mjeri prisutni u topljivoj frakciji, i na taj način raspoloživi bilo za metaboličke potrebe ili za toksične učinke u stanici, te na one koji su u većoj mjeri zastupljeni u netopljivoj frakciji, bilo da se radi o njihovoj funkciji u izgradnji dijelova stanice ili o obliku njihove detoksikacije putem granula. U prvu grupu možemo ubrojiti prvenstveno neesencijalni element kadmij, koji je u staničnom citosolu prisutan u vrlo visokom postotku (>80%) (tablica 7). Tu se također mogu ubrojati i esencijalni elementi kobalt, selen, cink, bakar i mangan, koji su u citosolu prisutni u više od 50% (tablica 7). Nasuprot tome, neesencijalni element talij te esencijalni elementi željezo i molibden zastupljeni su u velikom postotku u netopljivoj frakciji, čak do 60% (tablica 7). Istraživanja na jetri grgeča (*Perca flavescens*), na primjer, pokazala su zastupljenost cinka u citosolu koja je iznosila samo 25%, kadmija 40%, a bakra oko 60% (Kraemer i sur., 2005), što je s izuzetkom bakra, znatno niže od vrijednosti utvrđenih u našem istraživanju za jetru pastrve, a mogući je razlog razlika u postupku diferencijalnog centrifugiranja ili stvarna razlika u fiziologiji različitih vrsta riba. Zanimljivo je, međutim, da se postotna zastupljenost pojedinih elemenata u topljivoj frakciji jetre mijenja ovisno o ukupnoj koncentraciji toga elementa akumuliranog u tkivu. Pa tako esencijalnim metalima kobaltu, bakru, željezu, manganu, molibdenu i selenu zastupljenost u topljivoj frakciji pada s porastom ukupno akumulirane količine metala/metaloida u jetri, što upućuje na učinkovito uklanjanje suvišnih metala/metaloida iz metabolički aktivnog bazena i njihovu vjerojatnu uspješnu detoksikaciju. Nasuprot tome, neesencijalnim i potencijalno vrlo toksičnim metalima kadmiju i taliju, zastupljenost u topljivoj frakciji raste s porastom ukupno akumulirane količine tih metala u jetri, što upućuje na njihovo zadržavanje u staničnom citosolu i veću mogućnost toksičnog djelovanja. Poznato je da se kadmij veže na citosolske proteine metalotioneine (Bonneris i sur., 2005), pa njegova visoka zastupljenost u citosolu ne mora isključivati i uspješnu detoksikaciju. No, ista informacija nije poznata za talij te njegova prisutnost u citosolu nakon povećane akumulacije, zajedno s njegovom poznatom izrazitom toksičnošću već u niskim koncentracijama (Jaiswal i sur., 2012), može potencijalno predstavljati opasnost za stanicu. Ova zapažanja svojstvena su izloženosti pastrva metalima u umjereno onečišćenom vodenom okolišu, dok bi se za utvrđivanje promjena pri visokoj izloženosti moralo provesti dodatno istraživanje.

Upravo zbog prisutnosti metala/metaloida u visokom postotku u topljivoj, metabolički raspoloživoj frakciji jetre, i to posebno neesencijalnih i vrlo toksičnih elemenata poput kadmija i talija, potrebno je ispitati za koje se biomolekule ti elementi u citosolu vežu te na taj način procijeniti predstavljaju li tim vezanjem potencijalnu opasnost za pojavu toksičnih učinaka u stanici ili se radi o obliku njihove detoksikacije, ili čak, u slučaju

esencijalnih elemenata, o odrazu njihove funkcije u stanici. Uobičajeni prvi korak u prepoznavanju tih biomolekula predstavlja frakcioniranje citosola primjenom kromatografije s isključenjem po veličini te određivanje koncentracija metala i metaloida eluiranih u frakcijama koje sadrže biomolekule određene molekulske mase (Montes-Bayón i sur., 2003; Michalke i Schramel, 2004). Na taj se način može doći do informacije o veličini biomolekula na koje se pojedini elementi u citosolu vežu, što predstavlja početnu točku u njihovoj identifikaciji. U ovome smo istraživanju definirali raspodjelu među citosolskim biomolekulama, odnosno utvrdili molekulske mase biomolekula na koje se vežu esencijalni elementi kobalt, bakar, željezo, mangan, molibden, selen i cink te neesencijalni elementi kadmij i talij, kao i promjene u njihovoj raspodjeli koje se javljaju pri povišenju njihovih citosolskih koncentracija.

Kobalt je feromagnetični metal čeličnosive boje čija atomska masa iznosi 58,93. Glavna uloga kobalta kao esencijalnog elementa u organizmu riba povezana je s njegovom ulogom u izgradnji kobalamina, odnosno vitamina B12 (Blust, 2012), čija molekulska masa iznosi 1,3 kDa (Kirschbaum, 1981). Međutim, profili raspodjele kobalta među citosolskim biomolekulama u jetrima pastrva ukazali su na najizraženiju prisutnost ovoga metala, kao i njegov porast pri povećanoj akumulaciji, u području biomolekula visoke molekulske mase, s maksimumom oko 140 kDa (slika 12), slično kao u slučaju jetre klena (*Squalius cephalus* Linnaeus, 1758) (Krasnići i sur., 2013). Za razliku od prethodnih opažanja za jetru klena, kod kojega je uočeno i eluiranje kobalta u području biomolekula jako niske molekulske mase, dakle ispod 10 kDa (Krasnići i sur., 2013), kod pastrve jasno eluiranje kobalta u tome području nije uočeno. Budući da molekularni aspekti unosa kobalta, njegova sudbina u stanici i mehanizmi njegove toksičnosti nisu dovoljno istraženi (Blust, 2012), buduća bi istraživanja trebala usmjeriti na identificiranje visokomolekulskih biomolekula koje vežu kobalt.

Bakar je metal crveno-narančaste boje koji provodi toplinu i elektricitet. Njegova atomska masa iznosi 63,55. Kod živih organizama je esencijalan i nalazimo ga u funkciji kofaktora brojnih enzima (Mogobe i sur., 2015). Profili raspodjele bakra među citosolskim biomolekulama u jetrima pastrva ukazali su na najizraženiju prisutnost ovoga metala u području biomolekula niske molekulske mase, s maksimumom oko 15 kDa (slika 13), jednako kao u slučaju jetre klena (Krasnići i sur., 2013). Retencijsko vrijeme NMM pika bakra podudara se s retencijskim vremenom standarda metalotioneina (tablica 2), pa se može pretpostaviti da se u citosolu bakar predominantno veže na metalotionein. Rubnim dijelovima ovoga pika također mogu biti obuhvaćene i druge biomolekule za koje se zna da sadrže bakar, a nalaze se u tom istom području molekulskih masa, poput superoksid dismutaze (32 kDa; Richardson i sur., 1975) i ugljične anhidraze (29 kDa, tablica 2). Međutim, povišenjem citosolskih koncentracija bakra osim porasta u području vjerojatnog metalotioneinskog pika, što je uočeno i u jetri klena (Krasnići i sur., 2013), dolazi i do porasta u području visokomolekulskih biomolekula, u rasponu molekulskih masa od otprilike 500-1.000 kDa. Zanimljivo je da eluiranje bakra u visokomolekulskom području nije uočeno u jetrima klena (Krasnići i sur., 2013).

Željezo je metal koji formira Zemljinu vanjsku i unutarnju jezgru i četvrti je najčešći element u Zemljinoj kori. Njegova atomska masa iznosi 55,85. Esencijalan je živim bićima i ima mnogobrojne uloge u fiziološkim funkcijama živih organizama, a jedna od najvažnijih je u transportu kisika (Mogobe i sur., 2015). Profili raspodjele željeza među citosolskim biomolekulama u jetrima pastrva (slika 14) ukazali su na usporedivu prisutnost željeza u tri područja citosolskih biomolekula, u području visokih molekulskih masa (200-1.000 kDa), u području srednjih molekulskih masa (30-85 kDa) te u području jako niskih molekulskih masa (5-10 kDa). Može se pretpostaviti da prvi pik željeza u području visokih molekulskih masa obuča protein feritin (450 kDa), koji je predominantno prisutan u jetrenom tkivu, a služi za pohranu željeza te održava željezo u topljivom, bioraspoloživom, netoksičnom obliku u citoplazmi (Szpunar i Lobinski, 1999; Martin-Antonio i sur., 2009). Pik željeza u području srednjih molekulskih masa mogao bi biti rezultat vezanja željeza na poznate proteine raznih funkcija, koji sadrže željezo, poput krvnog proteina hemoglobina (65 kDa) i enzima katalaze (60 kDa) (Martin-Antonio i sur., 2009). Kao i u jetrima pastrve, oba navedena pika pronađena su i u jetrima klena, dok je razlika između ovih dviju vrsta u tome što kod klena nije uočeno vezanje željeza na biomolekule jako niskih molekulskih masa, koje je zapaženo u jetrima pastrve (Krasnići i sur., 2013). Međutim, povišenjem citosolskih koncentracija željeza u jetrima pastrve najizraženiji je porast zabilježen u području feritinskog pika, jednako kao i u jetrima klena (Krasnići i sur., 2013), što je u skladu s funkcijom feritina u pohranjivanju željeza u tkivu jetri.

Mangan je metal koji u prirodi nalazimo u obliku minerala u kombinaciji sa željezom. Njegova atomska masa iznosi 54,94. U živim organizmima ima esencijalnu ulogu u aktivnosti raznih enzima (Mogobe i sur., 2015). Profili raspodjele mangana ukazuju na njegovu prisutnost u velikom broju citosolskih biomolekula čije molekulske mase pokrivaju široko područje od 10 do 1.000 kDa (slika 15), a obuhvaćaju i molekulske mase poznatih transportnih proteina, albumina (66 kDa) i transferina (80 kDa, Martin-Antonio i sur., 2009). Albumin sudjeluje u transportu mangana iz crijeva u jetra, dok transferin veže mangan u jetri te u tom obliku predstavlja izvor mangana za prijenos u druga tkiva (Schäfer, 2004). Povišenjem citosolskih koncentracija mangana u jetrima pastrva dolazi do usporedivog porasta u svim područjima eluiranja mangana.

Molibden je metal čija atomska masa iznosi 95,94. On je važan esencijalni mikronutrijent jer čini katalitički centar više od pedeset enzima (Ricketts i sur., 2015). Profili raspodjele molibdena u jetrima pastrva pokazuju da je najveći dio molibdena eluiran u području biomolekula molekulskih masa 100-500 kDa (slika 16), što je u skladu s opažanjima za jetra klena (Krasnići i sur., 2013), gdje je navedeno kako ovaj pik molibdena obuhvaća molekulske mase enzima u kojima je molibden kofaktor, kao što su aldehid oksidaza (130 kDa, Uchida i sur., 2003), sulfat oksidaza (120 kDa, Johnson i Rajagopalan, 1976) te Fe-Mo flavoproteinska ksantin oksidaza (275 kDa, Truglio i sur., 2002). Značajan dio molibdena eluira se i u području biomolekula jako niskih molekulskih masa (3-9 kDa), što je također podudarno s rezultatima dobivenima za jetru klena (Krasnići i sur., 2013). Povišenjem citosolskih koncentracija molibdena u jetrima pastrva dolazi do usporedivog porasta upravo u dva navedena područja eluiranja molibdena.



Selen je metaloid čija atomska masa iznosi 78,96. Rijetko ga nalazimo u elementarnom stanju, češće ga nalazimo u obliku ruda u Zemljinoj kori. Živim organizmima je esencijalan i nalazimo ga kao sastavni dio glutation peroksidaze i vitamina E (Watanabe i sur., 1997). Profili raspodjele selena u jetrima pastrva pokazuju da je najveći dio selena eluiran u području biomolekula jako niskih molekulskih masa, ispod 5 kDa (slika 17). Moguće je pretpostaviti kako se radi o selenospojevima niskih molekulskih masa, koji su učinkoviti u obrani od oksidativnog stresa, poput nedavno identificiranog organskog selenovog spoja u tuni (*Thunnus orientalis*), selenoneina (~0.5 kDa; Yamashita i Yamashita, 2010; Yamashita i sur., 2012), ili selenometionina (~0.2 kDa; Klotz i sur. 2003). Zanimljivo je uočiti razliku između ovdje prikazanih rezultata za jetra pastrva i rezultata ranije objavljenih za jetra klana, u kojima je najveći dio selena bio eluiran u području molekulskih masa od 10 do 400 kDa (Krasnići i sur., 2013). Objavljeni rezultati, prema tome, ukazivali su na vjerojatno vezanje ovoga metaloida na poznate selenoproteine u jetrima klana, kao što su glutation peroksidaza (85 kDa, Shulgin i sur., 2008) i tioredoksin reduktaza (66 kDa, Larsson, 1973), dok u jetrima pastrva nema jasnih naznaka takvoga vezanja. Naprotiv, povišenjem citosolskih koncentracija selena u jetrima pastrva dolazi do porasta isključivo u području biomolekula jako niskih molekulskih masa.

Cink je dvadeset četvrti najzastupljeniji metal u Zemljinoj kori. Njegova atomska masa iznosi 65,38. Cink je esencijalan za žive organizme te ima strukturne i katalitičke uloge u mnogim proteinima i enzimima. Važan je za ekspresiju gena, rast stanica te je dio mnogih metaloenzima (Mogobe i sur., 2015). Profili raspodjele cinka u jetrima pastrva pokazuju da je najveći dio cinka eluiran u području biomolekula molekulskih masa u rasponu od 25-500 kDa (slika 18), što se podudara s rezultatima objavljenima za cink u jetri klana (Krasnići i sur., 2013). U ovome rasponu molekulskih masa obuhvaćeni su poznati proteini koji sadrže cink, poput alkohol dehidrogenaze (150 kDa, tablica 2, Szpunar i Lobinski, 1999). Upravo u ovome području dolazi do porasta eluiranja cinka pri povišenju citosolskih koncentracija cinka u jetrima pastrva. Međutim, cink je također eluiran i u području niskih molekulskih masa, pri čemu se retencijsko vrijeme maksimuma toga pika podudara s retencijskim vremenom metalotioneina (tablica 2). I pojava toga pika usporediva je s jetrom klana (Krasnići i sur., 2013) te u skladu sa značajnom ulogom koju metalotioneini imaju u detoksikaciji toksičnih metala i održavanju homeostaze esencijalnih metala, poput cinka i bakra (Huang i sur., 2004). No, vjerojatni metalotioneinski pik također obuhvaća i retencijsko vrijeme ugljične anhidraze, koja je također cinkov metaloenzim (Szpunar i Lobinski, 1999).

Kadmij je metal plavo-bijele boje, koji nalazimo kao sporedni sastojak u većini ruda cinka i željeza. Njegova atomska masa iznosi 112,41. Kadmijevi spojevi se koriste u bojanju stakla i stabiliziranju plastike, međutim njegova uporaba sve se više smanjuje zbog njegove toksičnosti. Kadmij je nesencijalan element za žive organizme, u kojima je kadmijev ion ( $Cd^{2+}$ ) kompetativni inhibitor kalcijeve ( $Ca^{2+}$ ) pumpe (Verbost i sur., 1989). Profili raspodjele kadmija u jetrima pastrve (slika 19) pokazuju prisutnost kadmija u dva područja molekulskih masa, području visokih molekulskih masa (500-1.000 kDa) i području niskih molekulskih masa (7-24 kDa). No, povišenjem citosolskih koncentracija

kadmija u jetrima pastrva dolazi do izrazitog porasta drugog pika, s maksimumom molekulske mase oko 15 kDa, koji i po retencijskom vremenu i po molekulskoj masi odgovara metalotioneinima (tablica 2). Dobiveni rezultati usporedivi su s rezultatima objavljenima za jetra klana (Krasnići i sur., 2013) te su u skladu s poznatom činjenicom da se detoksikacija kadmija primarno odvija putem glutationa (GSH) i metalotioneina (MT) (McGeer i sur., 2012). U nedavnim je istraživanjima predloženo da, osim GSH i MT, u fiziološkim promjenama vezanima uz zaštitu stanice kod riba izloženih kadmiju značajnu ulogu igra i indukcija proteina toplinskog stresa, HSP70 i HSP90 (Kwong i sur., 2011). No, u našem istraživanju nije bilo naznaka vezanja kadmija na proteine u tom rasponu molekulskih masa.

Talij je metal koji je široko rasprostranjen najviše u obliku minerala. Koristi se za proizvodnju nehrđajućeg čelika i kao katalizator organskih reakcija. Njegova atomska masa iznosi 204,38. Talij je neesencijalni element, toksičan već u vrlo niskim koncentracijama jer ometa biološke procese ovisne o kaliju (Jaiswal i sur., 2012). Poznato je da  $Tl^+$  zamjenjuje fiziološki  $K^+$  u aktivaciji nekoliko enzima, na primjer aldehyd dehidrogenaze (Jaiswal i sur., 2012). Istraživanja su pokazala da  $Tl^+$  može zamijeniti  $K^+$  u aktivaciji  $(Na^++K^+)$ -ATP-aza, acetil fosfataza, *p*-nitrofenilfosfataza i  $K^+$ -fosfataza u mikrosomima (Inturrisi, 1969). Profili raspodjele talija pokazuju najizraženiju prisutnost talija u području biomolekula molekulskih masa od 60 do 300 kDa, s maksimumom oko 140 kDa (slika 20). U tom području dolazi i do proporcionalnog porasta pika talija nakon povišenja citosolskih koncentracija talija u jetrima pastrva. Ovim rasponom su, na primjer, obuhvaćene molekulske mase aldehyd dehidrogenaza (187 kDa, von Tigerstrom and Razzell, 1968) te  $(Na^++K^+)$ -ATP-aza (tetramera čija se molekulska masa ovisno o vrsti nalazi u rasponu 274-280 kDa; Peterson and Hokin, 1981) u čijoj je aktivaciji opisano sudjelovanje talija.

## 6. ZAKLJUČCI

Izučavanjem onečišćenja vode rijeke Krke odabranim metalima (Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Zn, Cd i Tl) i metaloidom (Se) te njihove unutarstanične raspodjele u jetrima potočnih pastrva (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) ulovljenih na dvjema postajama u rijeci Krki, referentnoj postaji na izvoru rijeke Krke i umjereno onečišćenoj postaji nizvodno od grada Knina, došli smo do sljedećih zaključaka:

1. Analiza onečišćenja riječne vode ukazala je na umjereno povišene koncentracije otopljenih metala za nekoliko elemenata (Co, Fe, Mn, Mo i Zn) na onečišćenoj postaji, dok su ostali elementi bili usporedivi na objema postajama. Utvrđene razlike ukazuju na antropogeni utjecaj na rijeku Krku nizvodno od grada Knina, no u odnosu na druge rijeke u Hrvatskoj i na postojeću regulativu još uvijek se radi o vrlo blagom onečišćenju riječne vode.
2. Analiza raspodjele metala/metaloida između topljive citosolske frakcije (koja sadrži citosolske biomolekule, lizosome i mikrosome) i netopljive frakcije jetri pastrva (koja sadrži stanične membrane, granule i mitohondrije) ukazala je na najveću postotnu zastupljenost u citosolu za neesencijalni metal kadmij (>80%), a zatim za esencijalne elemente kobalt, selen, cink, bakar i mangan (50-80%). Nesencijalni element talij te esencijalni elementi željezo i molibden u visokom su postoku zastupljeni u netopljivoj frakciji (čak do 60%). Uočeno je također da se većini esencijalnih elemenata pri povećanoj akumulaciji u jetrima povećava zastupljenost u netopljivoj frakciji kao znak njihove vjerojatne detoksikacije, dok je obrnuto u slučaju neesencijalnih elemenata kadmija i talija, kojima postotak u citosolu raste s povećanjem akumulacije u jetrima.
3. Analiza raspodjele metala i metaloida među citosolskim biomolekulama u jetrima potočne pastrve omogućila je definiranje molekulskih masa biomolekula koje vežu metale Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Zn, Cd i Tl te metaloid Se. Od dobivenih rezultata posebno se može istaknuti:
  - eluiranje bakra, kadmija i cinka u području biomolekula čija molekulska masa i retencijsko vrijeme odgovaraju metalotioneinima,
  - eluiranje željeza u području biomolekula visokih molekulskih masa, koje obuhvaća molekulsku masu i retencijsko vrijeme feritina, proteina koji služi za pohranu željeza,
  - eluiranje kobalta i molibdena u području biomolekula visokih molekulskih masa (>100 kDa) te mangana i cinka u širokom području molekulskih masa od 10 do 1.000 kDa, koje obuhvaća molekulske mase transportnih proteina albumina i transferina te niza enzima u kojima ovi metali sudjeluju kao kofaktori,
  - eluiranje selena u području biomolekula jako niskih molekulskih masa, ispod 5 kDa, koje obuhvaća molekulske mase poznatih selenospojeva, selenoneina i selenometionina, koji sudjeluju u obrani organizma od oksidativnog stresa, te

- eluiranje talija u području biomolekula molekulskih masa od 60 do 300 kDa, koje obuhvaća molekulske mase enzima u čijoj aktivaciji sudjeluje talij, poput aldehid dehidrogenaze i (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-ATP-aze.

Rezultati ostvareni u ovome radu predstavljaju prvi korak prema identifikaciji proteina i drugih biomolekula koje sudjeluju u metabolizmu i detoksikaciji metala i metaloida u jetrima pastrva, pa kao takvi predstavljaju i osnovu za prepoznavanje i razvijanje potencijalnih biomarkera izloženosti i učinaka metala.

## **7. ZAHVALE**

*Zahvaljujem se svojoj komentorici, dr. sc. Zrinki Dragun, na povjerenju, velikom strpljenju, razumijevanju i stručnom vođenju. Nesebično je podijelila svoje znanje i iskustvo sa mnom te unatoč svojim obvezama pronašla vrijeme za pomoć pri izradi ovoga rada. Njena upornost i predanost te stalno poticanje uvelike je doprinijelo realizaciji ovoga rada.*

*Zahvaljujem se svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Renati Matoničkin Kepčija, na savjetovanju i pomoći pri izradi rada.*

*Zahvaljujem se svim zaposlenicima Laboratorija za biološke učinke metala Zavoda za istraživanje mora i okoliša Instituta Ruđer Bošković na razumijevanju i prihvaćanju.*

*Zahvaljujem se dipl. ing. prehrambene tehnologije Nesrete Krasnići na stručnoj pomoći pri korištenju biokemijskih metoda i prenesenom znanju.*

*Zahvaljujem se Hrvatskoj zakladi za znanost koja je omogućila financiranje i provođenje projekta „Akumulacija, unutarstanično mapiranje i učinci metala u tragovima u akvatičkih organizama“, voditeljice dr. sc. Marijane Erk, u okviru kojega je provedeno ovo istraživanje.*

*Zahvaljujem se svojim roditeljima i prijateljima na pruženoj podršci.*

## 8. LITERATURA

- Behzadi Mackvandi, B., Borghei, A.M., Javadi, A., Minaei, S., Almassi, M. (2015) Determination of biometric parameters of fish by image analysis. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences* 6:272-276.
- Blust, R. (2012) Cobalt. U: Wood, C.M., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (urednici) *Fish physiology: Homeostasis and Toxicology of Essential Metals*, vol. 31A. Academic, London, str. 291-326.
- Bonneris, E., Giguère, A., Perceval, O., Buronfosse, T., Masson, S., Hare, L., Campbell, P.G.C. (2005) Sub-cellular partitioning of metals (Cd, Cu, Zn) in gills of a freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*: role of calcium concretions in metal sequestration. *Aquatic Toxicology* 71:319-334.
- Can, E., Yabanli, M., Kehayias, G., Aksu, Ö, Kocabaş, M., Demir, V., Kayim, M., Kutluyer, F., Şeker, S. (2012) Determination of bioaccumulation of heavy metals and selenium in tissues of brown trout *Salmo trutta macrostigma* (Duméril, 1858) from Munzur Stream, Tunceli, Turkey. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 89:1186-1189.
- Chovanec, A., Hofer, R., Schiemer, F. (2003) Fish as bioindicators. U: Markert, B.A., Breure, A.M., Zechmeister, H.G. (urednici), *Bioindicators and Biomonitors: Principles, Concepts and Applications*. Elsevier, str. 639-676.
- Crane, M., Kwok, K.W.H., Wells, C., Whitehouse, P., Lui, G.C.S. (2007) Use of field data to support European Water Framework Directive quality standards for dissolved metals. *Environmental Science and Technology* 41:5014-5021.
- Cukrov, N., Cmik, P., Mlakar, M., Omanović, D. (2008) Spatial distribution of trace metals in the Krka River, Croatia: an example of self-purification. *Chemosphere* 72:1559-1566.
- Dautović, J. (2006) *Određivanje metala u prirodnim vodama uporabom masene spektrometrije visoke rezolucije s induktivno spregnutom plazmom*. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu.
- Dautović, J., Roje, V., Kozar, S., Fiket, Ž., Mikac, N. (2007) Otopljeni tragovi metala u nekim rijekama i jezerima s područja Republike Hrvatske. *Hrvatske vode i Europska Unija – izazovi i mogućnosti*. Zbornik radova 4. hrvatske konferencije o vodama, s međunarodnim sudjelovanjem, Opatija, Hrvatska, str. 115-122.
- Dragun, Z., Fiket, Ž., Vuković, M., Raspor, B. (2013a) Multielement analysis in the fish hepatic cytosol as a screening tool in the monitoring of natural waters. *Environmental Monitoring and Assessment* 185:2603-2614.

- Dragun, Z., Filipović Marijić, V., Kapetanović, D., Valić, D., Vardić Smrzlić, I., Krasnići, N., Strižak, Ž., Kurtović, B., Teskeredžić, E., Raspor, B. (2013b) Assessment of general condition of fish inhabiting a moderately contaminated aquatic environment. *Environment Science and Pollution Research* 20:4954-4968.
- Dragun, Z., Kapetanović, D., Raspor, B., Teskeredžić, E. (2011) Water quality of medium size watercourse under baseflow conditions: The case study of river Sutla in Croatia. *Ambio* 40:391-407.
- European Parliament and the Council of the European Union (EPCEU) (2013) Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. *Official Journal of the European Union* L 226/1
- Fletcher, P.E., Fletcher, G.L. (1980) Zinc and copper – binding proteins in the plasma of winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Canadian Journal of Zoology* 58:609-613.
- Fiket, Ž., Roje, V., Mikac, N., Kniewald, G., (2007) Determination of arsenic and other trace elements in bottled waters by high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry. *Croatia Chemica Acta* 80:91-100.
- Filipović Marijić, V., Kapetanović, D., Dragun, Z., Valić, D., Krasnići, N., Ivanković, D., Vardić Smrzlić, I., Redžović, Z., Grgić, I., Erk, M. (2016) Water quality and metal exposure assessment in the Krka River, karstic phenomenon and a National park in Croatia. Abstract book of the 18<sup>th</sup> International Conference on Heavy metals in the Environment, University of Ghent, Ghent, str. 299-300.
- Fletcher, P.E., Fletcher, G.L. (1980) Zinc and copper – binding proteins in the plasma of winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Canadian Journal of Zoology* 58:609-613.
- Flora, S.J.S., Mittal, M., Mehta, A. (2008) Heavy metal induced oxidative stress and its possible reversal by chelation therapy. *Indian Journal of Medical Research* 128:501-523.
- Gaillardet, J., Viers, J., Dupre, B. (2004) Trace elements in river waters. U: Drever, J.I. (urednik), *Surface and Ground Water, Weathering, and Soils, Treatise on Geochemistry*, vol. 5. Elsevier, Amsterdam, str. 225-272.
- Hagel, L., Haneskog, L. (2010) Size-exclusion chromatography. U: *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley and Sons, Chichester, <http://www.els.net>.
- Haraguchi, H. (2004) Metallomics as integrated biometal science. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 19:5-14.
- Heath, A.G. (1995) *Water pollution and fish physiology*. Lewis Publishers, Boca Raton.

- HRN EN 14011 (2005) Kakvoća vode – Uzorkovanje riba električnom strujom.
- Huang, Z.Y., Shen, J.C., Zhuang, Z.X., Wang, X.R., Lee, F.S.C. (2004) Metallothionein as a biomarker for mercury in tissues of rat fed orally with cinnabar. *Applied Organometallic Chemistry* 18:255-261.
- International Network for acid Prevention (INAP) (2002) Diffusive gradients in thin-films (DGT): A technique for determining bioavailable metal concentrations. <http://www.inap.com.au>.
- Inturissi, C.E. (1969) Thallium activation of K<sup>+</sup>-activated phosphatases from beef brain. *Biochimica et Biophysica Acta* 173:567-569.
- Jaiswal, K., Sharma, D., Krishna, K., Vidua, R., Kumar, A. (2012) Thallium poisoning: analytical aspects with brief overview. *Journal of South India Medicolegal Association* 4:68-75.
- Johnson, J.L., Rajagopalan, K.V. (1976) Purification and properties of sulphite oxidase from human liver. *The Journal of Clinical Investigation* 58:543-550.
- Klementsén, A., Amundsen, P.-A., Dempson, J.B., Jonsson, B., Jonsson, N., O'Connell, M.F., Mortensen, E. (2003) Atlantic salmon *Salmo salar* L., brown trout *Salmo trutta* L. and Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.): a review of aspects of their life histories. *Ecology of Freshwater Fish* 12:1-59.
- Kirschbaum, J. (1981) Cyanocobalamin. U: Florey, K. (urednik) *Analytical profiles of drug substances*, vol. 10. Academic, New York, str 183-288.
- Klementsén, A., Amundsen, P.-A., Dempson, J.B., Jonsson, B., Jonsson, N., O'Connell, M.F., Mortensen, E. (2003) Atlantic salmon *Salmo salar* L., brown trout *Salmo trutta* L. and Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.): a review of aspects of their life histories. *Ecology of Freshwater Fish* 12:1-59.
- Klotz, L.-O., Kröncke, K.-D., Buchczyk, D.P., Sies, H. (2003) Role of copper, zinc, selenium and tellurium in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress. *Journal of Nutrition* 133:1448S-1451S.
- Kraemer, L.D., Campbell, P.G.C., Hare, L. (2005) Dynamics of Cd, Cu and Zn accumulation in organs and sub-cellular fractions in field transplanted juvenile yellow perch (*Perca flavescens*). *Environmental Pollution* 138:324-337.
- Krasnići, N., Dragun, Z., Erk, M., Raspor, B. (2013) Distribution of selected essential (Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Se and Zn) and nonessential (Cd, Pb) trace elements among protein fractions from hepatic cytosol of European chub (*Squalius cephalus* L.). *Environmental Science and Pollution Research* 20:2340-2351.



- Krasnići, N., Dragun, Z., Erk, M., Raspor, B. (2014) Distribution of Co, Cu, Fe, Mn, Se, Zn and Cd among cytosolic proteins of different molecular masses in gills of European chub (*Squalius cephalus* L.). *Environmental Science and Pollution Research* 23:13512-13521.
- Krača, S., Žaja, R., Čalić, V., Terzić, S., Grubešić, S.M., Ahel, M., Smital, T. (2007) Hepatic biomarker response to organic contaminations in feral chub (*Leuciscus cephalus*) – laboratory characterization and field study in Sava River, Croatia. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26:2620-2633.
- Kwong, R.W.M., Andres, J.A., Niyogi, S. (2011) Effects of dietary cadmium exposure on tissue-specific cadmium accumulation, iron status and expression of iron-handling and stress-inducible genes in rainbow trout: influence of elevated dietary iron. *Aquatic Toxicology* 102:1-9.
- Lambert, Y., Dutil, J.-D. (1997) Can simple condition indices be used to monitor and quantify seasonal changes in the energy reserves of Atlantic cod (*Gadus morhua*)? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54:104-112.
- Li, L., Chen, H., Bi, R., Xie, L. (2015) Bioaccumulation, subcellular distribution, and acute effects of chromium in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 34:2611-2617.
- Li, Y.-F., Chen, C., Ying, Q., Yuxi, G., Bai, L., Yuliang, Z., Zhifang C. (2008) Metallomics, elementomics, and analytical techniques. *Pure and Applied Chemistry* 80:2577-2594.
- Larsson, A. (1973) Thioredoxin reductase from rat liver. *European Journal of Biochemistry* 35:346-349.
- Markert, B.A., Breure, A.M., Zechmeister, H.G. (2003) Definitions, strategies and principles for bioindication/biomonitoring of the environment. U: Markert, B.A., Breure, A.M., Zechmeister, H.G. (urednici), *Bioindicators and Biomonitoring: Principles, Concepts and Applications*. Elsevier, str. 3-39.
- Martin-Antonio, B., Jimenez-Cantizano, R.M., Salas-Leiton, E., Infante, C., Manchado, M. (2009) Genomic characterization and gene expression analysis of four hepcidin genes in the redbanded seabream (*Pagrus auriga*). *Fish and Shellfish Immunology* 26:483-491.
- Mason, A.Z., Jenkins, K.D. (1995) Metal detoxification in aquatic organisms. U: Tessier, A., Turner, D.R. (urednici) *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. John Wiley and Sons, Chichester, str. 479-608.

- McGeer, J.C., Niyogi, S., Smith, D.S. (2012) Cadmium. U: Wood, C.M., Farrell, A.P., Braunner, C.J. (urednici), *Fish Physiology: Homeostasis and Toxicology of Essential Metals*, vol. 31B. Elsevier Academic, London, str. 125-184.
- Michalke, B., Schramel, P. (2004) Manganese speciation in human milk using size exclusion chromatography combined with strong anion exchange chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry detection. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 19:121-128.
- Ministarstvo poljoprivrede (2013) Pravilnik o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe. *Narodne novine* 55/2013.
- Mogobe, O., Mosepele, K., Masamba, W.R.L. (2015) Essential mineral content of common fish species in Chanoga, Okavango Delta, Botswana. *African Journal of Food Science* 9:480-486.
- Montaser, A. (1998) *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, John Wiley and Sons, Washington, str. 2-4.
- Montes-Bayón, M., DeNicola, K., Caruso, J.A. (2003) Liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1000:457-476.
- Mounicou, S., Szpunar, J., Lobinski, R. (2009) Metallomics: the concept and methodology. *Chemical Society Reviews* 4:1119-1138.
- Olson, K.R., Squibb, K., Crusin, R.J. (1978) Tissue uptake, cellular distribution and metabolism of  $^{14}\text{CH}_3\text{HgCl}$  and  $\text{CH}_3^{203}\text{HgCl}$  by rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 35:381-390.
- Page, L.M., Burr, B.M. (1991) *A Field Guide to Freshwater Fishes of North America North of Mexico*. Houghton Mifflin Company, Boston, str. 432.
- Peterson, G.L., Hokin, L.E. (1981) Molecular weight and stoichiometry of the sodium- and potassium-activated adenosine triphosphatase subunits. *The Journal of Biological Chemistry* 256:3751-3761.
- Podrug, M., Raspor, B. (2009) Seasonal variation of metal (Zn, Fe, Mn) and metallothionein concentrations in the liver cytosol of the European chub (*Squalius cephalus* L.). *Environmental Monitoring and Assessment* 157:1-4.
- Rätz, H.-J., Lloret J. (2003) Variation in fish condition between Atlantic cod (*Gadus morhua*) stocks, the effect on their productivity and management implications. *Fisheries Research* 60:369-380.
- Richardson, J.S., Thomas, K.A., Rubin, B.H., Richardson, D.C. (1975) Crystal structure of bovine Cu, Zn superoxide dismutase at 3 Å resolution: chain tracing and metal ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 72:1349-1353.

- Ricketts, C.D., Bates, W.R., Reid, S.D. (2015) The effects of acute waterborne exposure to sublethal concentrations of molybdenum on the stress response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. PLOS ONE 10:1-22.
- Roesijadi, G., Robinson, W.E. (1994) Metal regulation in aquatic animals: mechanisms of uptake, accumulation and release. U: Malins, D.C., Ostrander, G.K. (urednici), Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives. CRC, Boca Raton, str. 387-420.
- Şaşı, H. (2004) The reproduction biology of chub (*Leuciscus cephalus* L., 1758.) in Topçam Dam Lake (Aydin, Turkey). Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences 28:693-699.
- Schäfer, U. (2004) Manganese. U: Merian, E., Anke, M., Ihnat, M., Stoeppler, M. (urednici), Elements and Their Compounds in the Environment: Occurrence, Analysis and Biological Relevance, vol. 2., Metals and Their Compounds. Wiley-VCH, Weinheim, str. 901-930.
- Shulgin, K.K., Popova, T.N., Rakhmanova, T.I. (2008) Isolation and purification of glutathione peroxidase. Applied Biochemistry and Microbiology 44:247-250.
- Stoscheck, C.M. (1990) Quantitation of protein. U: Deutscher, M.P. (urednik) Methods in Enzymology, vol. 182. Guide to Protein Purification. Academic Press, New York, str. 50-68.
- Strimbu, K., Tavel, J.A. (2010) What are biomarkers? Current Opinion in HIV and AIDS 5:463-466.
- Szpunar, J. (2005). Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics. Analyst 130:442-465.
- Szpunar, J., Lobinski, R. (1999) Species-selective analysis for metal-biomacromolecular complexes using hyphenated techniques. Pure and Applied Chemistry 71:899-918.
- Thomas, D.G., Cryer, A., Solbe, J.D., Kay, J. (1983) A comparison of the accumulation and protein binding of environmental cadmium in the gills, kidney and liver of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). Comparative Biochemistry and Physiology 76C:241-246.
- Truglio, J.J., Theis, K., Leimkühler, S., Rappa, R., Rajagopalan, K.V., Kisker, C. (2002) Crystal structures of the active and alloxanthine inhibited forms of xanthine dehydrogenase from *Rhodobacter capsulatus*. Structure 10:115-125.
- Uchida, H., Kondo, D., Yamashita, A., Ngaosa, Y., Sakurai, T., Fujii, Y., Fujishiro, K., Aisaka, K., Uwajima, T. (2003) Purification and characterization of an aldehyde oxidase from *Pseudomonas* sp. KY 4690. FEMS Microbiology Letters 229:31-36.

- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M. (2006) Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64:178-179.
- Verma, R., Dwiwedi, P. (2013) Heavy metal water pollution – A case study. *Recent Research in Science and Technology* 5:98-99.
- Verboost, P.M., Van Rooij, J., Flik, G., Lock, R.A.C., Wendelaar Bonga, S.E. (1989) The movement of cadmium through freshwater trout branchial epithelium and its interference with calcium transport. *Journal of Experimental Biology* 145:185-197.
- von Tigerstrom, R.G., Razzell, W.E. (1968) Aldehyde dehydrogenase. II. Physical and molecular properties of the enzyme from *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of Biological Chemistry* 243:6495-6503.
- Vukosav, P., Mlakar, M., Cukrov, N., Kwokal, Ž., Pižeta, I., Pavlus, N., Špoljarić, I., Vurnek, M., Brozinčević, A., Omanović, D. (2014) Heavy metal contents in water, sediment and fish in a karst aquatic ecosystem of the Plitvice Lakes National Park (Croatia). *Environmental Science and Pollution Research* 21:3826-3839.
- Wang, J., Dreessen, D., Wiederin, D.R., Houk, R.S. (2001) Measurement of trace elements in proteins extracted from liver by size exclusion chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry with a magnetic sector mass spectrometer. *Analytical Biochemistry* 288:89-96.
- Watanabe, T., Kiron, V., Satoh, S. (1997) Trace minerals in fish nutrition. *Aquaculture* 151:185-207.
- Yamashita, Y., Yamashita, M. (2010) Identification of a novel selenium containing compound, selenoneine, as the predominant chemical form of organic selenium in the blood of a bluefin tuna. *Journal of Biological Chemistry* 285:18134-18138.
- Yamashita, Y., Yabu, T., Touhata, K., Yamashita, M. (2012) Purification and characterization of glutathione peroxidase 1 in the red muscle of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*. *Fisheries Science* 78:407-413.

#### **Internetski izvori:**

**URL 1** - [http://eol.org/pages/206777/hierarchy\\_entries/60831388/details](http://eol.org/pages/206777/hierarchy_entries/60831388/details)

## 9. SAŽETAK

### **Analiza unutarstanične raspodjele odabranih metala i metaloida u jetrima potočne pastrve (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) iz rijeke Krke**

**Nicol Kolar**

Unutarstanična raspodjela devet metala i metaloida izučavana je na jetrima potočne pastrve (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) iz rijeke Krke, ulovljenih u listopadu 2015. godine na dvjema postajama, izvoru rijeke Krke kao referentnoj postaji, te u rijeci Krki nizvodno od Knina, kao onečišćenoj postaji. Blago povišenje koncentracija nekoliko metala u otopljenom obliku u riječnoj vodi potvrdilo je antropogeni utjecaj na rijeku Krku nizvodno od grada Knina. Cilj istraživanja bio je utvrđivanje raspodjele devet odabranih elemenata između topljive (citosolske) i netopljive jetrene frakcije, što je ostvareno homogenizacijom jetrenog tkiva i centrifugiranjem te određivanjem ukupnih i citosolskih koncentracija metala/metaloida u jetrima. Rezultati istraživanja pokazali su najveću postotnu zastupljenost Cd u topljivoj frakciji jetri (>80%), dok su Co, Se, Zn, Cu i Mn u citosolu prisutni u nešto manjem postotku (50-80%). Metali Tl, Fe i Mo značajno su prisutni u netopljivoj jetrenoj frakciji. Svim esencijalnim elementima, s izuzetkom Zn, pri povećanoj akumulaciji u jetrima povećava se zastupljenost u netopljivoj frakciji kao znak njihove vjerojatne detoksikacije. Obrnuti je slučaj s neesencijalnim elementima Cd i Tl, kojima postotak u citosolu raste s povećanjem akumulacije u jetrima. Drugi je cilj ovoga istraživanja bio opisivanje raspodjele metala/metaloida među citosolskim biomolekulama različitih molekulskih masa, što je ostvareno kromatografskim razdvajanjem jetrenih citosola uz isključenje po veličini te mjerenjem koncentracija metala/metaloida u dobivenim frakcijama koje sadrže biomolekule različitih molekulskih masa pomoću HR ICP-MS-a. Među ostvarenim rezultatima zanimljivo je istaknuti eluiranje Cu, Cd i Zn u području molekulskih masa koje odgovaraju metalotioneinima; porast pika Fe u području feritina, proteina koji sudjeluje u pohrani Fe, kao odgovor na porast akumulacije Fe u jetri; eluiranje Co, Mo, Mn i Zn u širokom području molekulskih masa, što je u skladu s njihovom ulogom kofaktora velikog broja enzima; eluiranje Se u području biomolekula molekulskih masa manjih od 5 kDa, koje se može dovesti u vezu s poznatim selenospojevima, selenoneinom i selenometioninom, koji sudjeluju u obrani organizma od oksidativnog stresa; te eluiranje nesencijalnog i izrazito toksičnog metala Tl u području biomolekula molekulskih masa 60-300 kDa, koje obuhvaća i molekulske mase enzima u čijoj aktivaciji Tl sudjeluje, poput aldehid dehidrogenaze i (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-ATP-aze. Prikazani rezultati prvi su korak prema identifikaciji proteina i drugih biomolekula koje sudjeluju u metabolizmu i detoksikaciji metala i metaloida u jetrima pastrva i koje predstavljaju potencijalne biomarkere izloženosti i učinaka metala.

**Ključne riječi:** potočna pastrva (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758), rijeka Krka, metali, metaloid, citosolske biomolekule, HPLC, ICP-MS

## 10. SUMMARY

### Analysis of intracellular distribution of selected metals/metalloid in the liver of brown trout (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) from the Krka River

Nicol Kolar

Intracellular distribution of nine metals/metalloid was studied in liver of brown trout (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) from the Krka River, sampled in October 2015 at two sites, the Krka River spring as a reference site, and the Krka River downstream from the town Knin, as a contaminated site. Slight concentration increase of several metals in dissolved form in the river water has confirmed anthropogenic influence on the Krka River downstream from the town Knin. The aim of this study was to determine distribution of nine selected elements between soluble (cytosolic) and insoluble hepatic fraction, which was accomplished by hepatic tissue homogenization and subsequent centrifugation and determination of total and cytosolic metal/metalloid concentrations in the liver. The results of this study have shown the highest percentage partition of Cd in soluble hepatic fraction (>80%), whereas the partition of Co, Se, Zn, Cu and Mn in the cytosol was less pronounced (50-80%). Metals Tl, Fe and Mo were highly present in the insoluble hepatic fraction. The presence in the insoluble hepatic fraction of all essential elements, except Zn, increase with increase of their accumulation in the liver, probably as a sign of their detoxification. Opposite scenario was observed for nonessential elements Cd and Tl. Their percentage in cytosol increased following the increase of their accumulation in the liver. The second aim of this study was to describe distribution of metals/metalloid among cytosolic biomolecules of different molecular masses, which was accomplished by chromatographic separation of hepatic cytosols using principle of size exclusion, and subsequent measurement of metal/metalloid concentrations in obtained fractions which contained biomolecules of different molecular masses by use of HR ICP-MS. Some of the most interesting results of this study which could be pointed out were: elution of Cu, Cd and Zn with biomolecules of molecular masses corresponding to metallothioneins; increase of Fe peak at elution time of ferritin, protein which is involved in Fe storage, as a response to accumulation increase of Fe in the liver; elution of Co, Mo, Mn and Zn in broad range of molecular masses, which corresponds well with their role as cofactors to numerous enzymes; elution of Se with the biomolecules of molecular masses lower than 5 kDa, which can be associated to known selenocompounds, selenonein and selenomethionin, which are involved in organism defence from oxidative stress; and elution of nonessential and extremely toxic metal Tl with biomolecules of molecular masses from 60 to 300 kDa, which also include molecular masses of several enzymes in which activation Tl is involved, like aldehyde dehydrogenase and (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-ATP-ase. The presented results are the first step towards the identification of proteins and other biomolecules which are involved in metabolism and detoxification of metals and metalloids in trout liver and which make potential biomarkers of metal exposure and effects.

**Key words:** brown trout (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758), the Krka River, metals, metalloid, cytosolic biomolecules, HPLC, ICP-MS

## 11. ŽIVOTOPIS

Nicol Kolar rođena je 5. rujna 1996. godine u Zagrebu. Završila je osnovnoškolsko obrazovanje u OŠ „Antun Mihanović“ s odličnim uspjehom. Godine 2011. upisala je Prirodoslovnu školu Vladimira Preloga u Zagrebu, smjer prirodoslovna gimnazija.

U prvom i trećem razredu srednje škole sudjelovala je na županijskom natjecanju iz biologije u kategoriji znanja. U trećem razredu srednje škole sudjelovala je i na županijskom natjecanju iz biologije u kategoriji istraživački rad s Irmom Carević te su s radom „Laže li naše tijelo ili ono ostaje iskreno?“ osvojile prvo mjesto u Gradu Zagrebu. U četvrtom razredu srednje škole sudjelovala je na županijskom natjecanju iz kemije.

Godine 2015. upisala je Prirodoslovno-matematički fakultet, smjer molekularna biologija. Trenutno je na drugoj godini preddiplomskog studija molekularne biologije.

Aktivno je sudjelovala u popularizaciji znanosti na radionici „Kukci i paučnjaci“ na 8. „Noći biologije“ te na radionici „Moj mali mikrobní svemir“ na 9. „Noći biologije“.