

# Utjecaj benzo(a) pirena na aktivnost kisele DNaze u tkivima dagnje *M. galloprovincialis*

---

**Halovanić, Ana**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2020**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:137:301458>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-27**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE JURJA DOBRILE U PULI  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ ZNANOST O MORU

**ANA HALOVANIĆ**

**UTJECAJ BENZO(A)PIRENA NA AKTIVNOST KISELE DNAZE U  
TKIVIMA DAGNJE *Mytilus galloprovincialis***

Završni rad

Pula, 2020.

SVEUČILIŠTE JURJA DOBRILE U PULI  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ ZNANOST O MORU

**ANA HALOVANIĆ**

**UTJECAJ BENZO(A)PIRENA NA AKTIVNOST KISELE DNAZE U  
TKIVIMA DAGNJE *Mytilus galloprovincialis***

Završni rad

JMBAG:0303068240, redoviti student

Studijski smjer: Znanost o moru

Predmet: Biološki učinci zagađivala

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Interdisciplinarno

Znanstvena grana: Znanost o moru

Mentor: doc. dr. sc. Ines Kovačić

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

Pula, 2020.



## IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

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

Student:

---

U Puli, 2020. godine



## IZJAVA

### o korištenju autorskog djela

Ja, Ana Halovanić dajem odobrenje Sveučilištu Jurja Dobrile u Puli, kao nositelju prava iskorištavanja, da moj završni rad pod nazivom "Utjecaj benzo(a)pirena na aktivnost kisele DNaze u tkivima dagnje *Mytilus galloprovincialis*" koristi na način da gore navedeno autorsko djelo, kao cjeloviti tekst trajno objavi u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice Sveučilišta Jurja Dobrile u Puli te kopira u javnu internetsku bazu završnih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice (stavljanje na raspolaganje javnosti), sve u skladu sa Zakonom o autorskom pravu i drugim srodnim pravima i dobrom akademskom praksom, a radi promicanja otvorenoga, slobodnoga pristupa znanstvenim informacijama.

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

U Puli, 2020. godine

Potpis

---

## ZAHVALA

Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Ines Kovačić na pomoći i stručnim savjetima u pisanju završnog rada i izvođenju laboratorijskih vježbi, strpljenju i poticaju koje mi je pružila tokom pisanja i najviše od svega na trudu i vremenu koje je uložila za ispravljanje mojeg rada.

Zahvaljujem komentorici izv. prof. dr.sc. Maji Fafandžel u pomoći pri izradi završnog rada i vremenu koje je posvetila za pregled i ispravljanje rada.

Veliko hvala svim profesorima smjera Znanosti o moru na prenesenom znanju i ljubavi prema kolegijima koje su nam održali.

Na prilici da svoj rad izradim u opremljenom laboratoriju za morsku ekotoksikologiju, zahvaljujem se Centru za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković u Rovinju.

Želim zahvaliti i svojoj obitelji i prijateljima na strpljenju i podršci koju su mi pružili.

# Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. Bioidikatorski organizam</b> .....	1
<b>1.2. Deoksiribonukleaze (DNaze)</b> .....	5
<b>1.5. Benzo(a)piren</b> .....	10
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	13
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	14
<b>3.1. Izlaganje školjkaša</b> .....	14
<b>3.2. Izolacija i priprema tkiva</b> .....	14
<b>3.3. Fluorimetrijsko određivanje aktivnosti kisele DNaze</b> .....	14
<b>3.4. Obrada podataka</b> .....	15
<b>4. REZULTATI</b> .....	16
<b>4.1. Aktivnost kisele DNaze u probavnoj žlijezdi pod utjecajem benzo(a)pirena</b> .....	16
<b>4.2. Aktivnost kisele DNaze u škragama pod utjecajem benzo(a)pirena</b> .....	17
<b>5. RASPRAVA</b> .....	19
<b>6. ZAKLJUČCI</b> .....	22
<b>7. LITERATURA</b> .....	23
<b>8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA</b> .....	35
<b>9. BASIC DOCUMENTATION CARD</b> .....	36

# 1. UVOD

## 1.1. Bioidikatorski organizam

Školjkaši roda *Mytilus* su među najčešćim morskim mekušcima koji grade važan element u ekologiji obalnih voda i ekonomiji, zbog prehrane ali i kao obraštajni organizmi. Oni prilagođavaju svoje funkcije promjenama u okolišu; reagiraju na različita onečišćivala akumulirana iz okolnih voda i služe kao bioindikator kvalitete obalnih voda (Fafandel i sur., 2008). Vrsta *Mytilus galloprovincialis*, mediteranska dagnja, je najrasprostranjeniji školjkaš Jadrana. Distribucija populacija roda *Mytilus* je povezana s rasprostranjivanjem tijekom planktonskog ličinačkog stadija (Ivošević, 2013). *Mytilus galloprovincialis* je autohtona vrsta Mediterana a putem brodova i kulture proširila se i na ostale regije svijeta te se smatra visoko invazivnom vrstom upravo zbog svoje velike brzine širenja i mogućnosti kompeticije nad autohtonim školjkašima. Ovi organizmi žive u kolonijama na čvrstoj kamenoj podlozi mediolitoralne zone do dubine od 40 metara, iako se najčešće nalaze i uzgajaju na dubinama od 1-5 metara.

Mediteranska dagnja pronađena je duž kamenitih obala, u lukama te estuarijima i osim Mediterana, danas je pronalazimo na istočnoj obali Atlantskog oceana- od Irske i Ujedinjenog Kraljevstva do sjeverne Afrike, na obalama Tihog oceana Sjeverne Amerike, u Japanu, Hong Kongu, Južnoj Africi, Čileu i Australiji gdje je njezina prisutnost povezana s utjecajem čovjeka (CABI, 2019) (Slika 1).





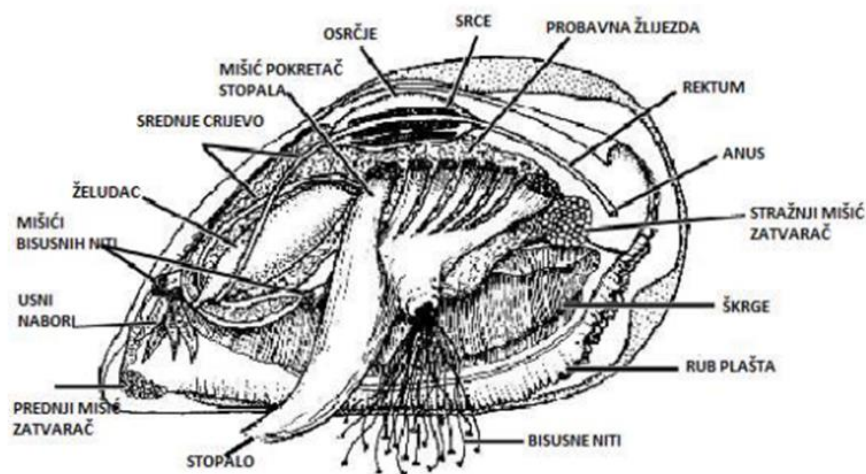
Slika 1. Kartografski prikaz rasprostranjenosti vrste *Mytilus galloprovincialis* (preuzeto s: [https://www.inaturalist.org/observations?place\\_id=any&taxon\\_id=81648](https://www.inaturalist.org/observations?place_id=any&taxon_id=81648)).

Tijelo školjkaša obavijaju lijeva i desna ljuštura crnomodrikaste boje. Anteriorno rub ljuštura završava šiljatim i malo savijenim umbom, dok je s posteriorne strane zaobljena (iako oblik ljuštura varira od regije do regije) (Ronta, 2016). Na zglobnom dijelu (umbo) tijela, obje su ljuštura povezane elastičnim ligamentom koji je pri mišićnoj kontrakciji maksimalno zategnut, čime je ljuštura zatvorena. Opuštanjem mišića ligament se olabavi, što omogućava otvaranje ljuštura. Stopalo je prstasto i sadrži mnogobrojne žlijezde koje izlučuju sluz. Nakon izlaska iz žlijezda, sluz se u vodi skruti u dugačka i žilava vlakna, tzv. bisus, pomoću kojih se školjkaš učvrsti na mjestu (Matoničkin i sur., 1998).

Ispod ljuštura školjkaša nalazi se tkivo plašta koje obavija cijelo tijelo dagnje. Sastoji se od lijevog i desnog nabora koji pokrivajući tijelo svaki sa svoje strane zatvaraju plaštanu šupljinu u kojoj su smještene viscelarna masa i škrge. Uz stražnji mišić zatvarač (aduktor) i mjesto na kome završavaju škrge unutarnje površine dva plaštana nabora se spajaju i na taj način obrazuju inhalantni (ulazni) i ekshalantni (izlazni) otvor plaštane šupljine. Na zglobnom kraju tijela smješten je usni otvor s dva para (desnih i lijevih) usnih palpa, na koji se nastavlja par (lijevih i desnih) rešetkastih škruga. Viscelarna masa (čine ju srce, probavni sustav i gonade) je smještena iznad škruga, između adduktora i zgloba, a obuhvaća: želudac sa probavnom žlijezdom, crijeva, srce i bubrege. Izvodni kanali digestivnog, urinarnog trakta, te gonada otvaraju se u suprabranhijalnoj tj. ekshalantnoj komori (Slika 2).

Probavni sustav školjkaša sastoji se od usta, jednjaka, želuca, probavne žlijezde, crijeva i analnog otvora (Gosling, 1992). Hrana koja je dospjela u usta prolazi kroz kratki jednjak i ulazi u želudac koji je povezan s parnim sustavom tubula (probavne žlijezde) koji ga okružuju. Izvodni kanali ovih žlijezda (lijevi i desni) otvaraju se u želudac, koji je u stvari prošireno srednje crijevo. Želudac se sastoji od prostrane želučane vreće i cjevastog nastavka. Šupljina ovog cjevastog nastavka podijeljena je parnim naborima stjenki u dva kata. Donji kat predstavlja prolaz prema crijevima, dok gornji slijepo završava i bogat je žljezdanim epitelnim stanicama koje luče tzv. kristalni štapić. Veličina štapića ovisi o stadiju hranjenja i u razdoblju kada jedinka ne uzima hranu, prutić postaje veći i prodire sve dublje u želudac. Kada njegov vrh dođe

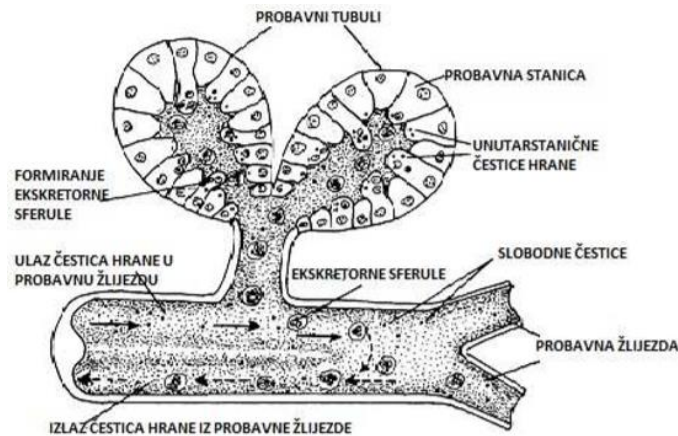
do želučanog štita, pri dolasku hrane u želudac on se polagano otapa i oslobađa enzime. Dio nabora želučanog cjevastog nastavka nastavlja se u želučanu vrećicu i dopire do vrha želučanog izbočenja koji se naziva cekum i predstavlja glavno mjesto sortiranja hrane. Cekum je vrećasto proširenje želuca s brojnim žljebovima koje osim što usmjerava male čestice na unutarstanično probavljanje u probavne tubule, usmjerava i neželjeni sadržaj prema crijevima. Cijela površina želuca pokrivena je cilijarnim traktovima, čija je glavna uloga sortiranje i daljnji transport hranjivih čestica. Vrlo male i djelomično probavljene čestice hrane prenose se u tubule digestivne žlijezde, gdje se u probavnim stanicama vrši intracelularna digestija masti i proteina.



Slika 2. Anatomska građa roda *Mytilus* (preuzeto s <https://pdfs.semanticscholar.org/6696/4a55bb14b4bc2c74ba026dc00c349638377e.pdf>, 2017).

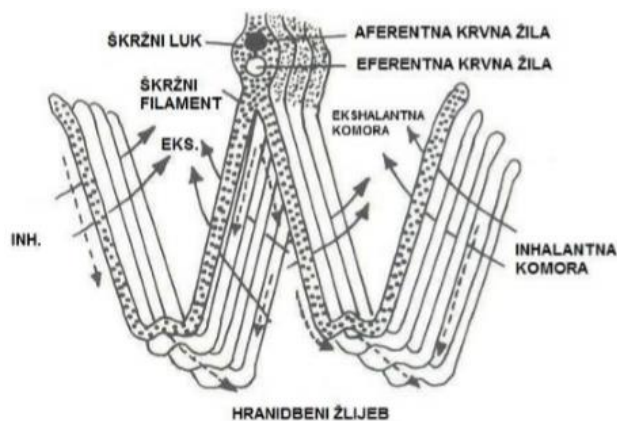
Probavna žlijezda predstavlja glavno mjesto unutarstanične probave. Sastoji se od brojnih slijepih tubula koji sa želucem komuniciraju sustavom kanala (Slika 3). Svaka skupina tubula povezana je s kratkim sekundarnim kanalima, čijim spajanjem nastaju širi, primarni kanali. Primarni kanali se spajaju u lijevi i desni izvodni kanal, koji se potom otvaraju u želudac. Probavni su tubuli sastavljeni od dviju vrsta stanica: probavnih i bazofilnih. Probavne su stanice najzastupljenije u tubularnom epitelu i odgovorne su za unutarstaničnu probavu koja se odvija u vezikulama lizosomalnog sustava koje sadrže hidrolitičke enzime. Značajnu ulogu u unutarstaničnoj probavi hranjivih tvari u kompletnom probavnom sustavu školjkaša imaju hemociti. Hemociti imaju sposobnost fagocitiranja jednostaničnih algi i drugih čestica hrane, nakon čega, uz pomoć vlastitog enzimskog sustava, dolazi do unutarstanične probave

fagocitiranog materijala (Gavrilović, Osnovne morfološke značajke školjkaša, interna skripta). Općenito, probava školjkaša može se podijeliti u dvije faze, a to su izvanstanična probava u želucu i crijevima, te unutarstanična probava u probavnoj žlijezdi i amebocitima (hemocitima) (Younge, 1926; Mathers, 1973; Bavčević, 1990; Langdon i Newell, 1996; Gosling, 2003; Boucaud-Camou i Henry, 2003).



Slika 3. Probavna žlijezda dagnje *Mytilus galloprovincialis* (preuzeto iz Ivošević, 2013).

Škrge školjkašima služe za filtriranje hrane i disanje. Škrge su parni organ sastavljen od niza dugačkih filamenata, koji se nakon spuštanja okreću prema gore, tako da škržno vlakno dobije oblik slova W (Slika 4). Obje škrge (lijeva i desna) su svojim rubnim dijelovima spojene s plaštom, dok su u srednjoj liniji one same međusobno spojene. Na taj način formiraju pregradu kroz plaštanu šupljinu, te se tako jedini prolaz od inhalantne u ekshalantnu komoru vodi kroz prolaze između međusobno povezanih škržnih filamenata. Prekrivene su velikim brojem cilija (trepetiljka), od kojih svaka ima određenu dužinu, smjer udaranja i funkciju. Osim cilija, u prikupljanju i transportu hrane znatnu ulogu ima i sluz (mukus), koju luče mukuzne stanice svakog škržnog vlakanca (Beninger i Dufour, 1996; Beninger i sur. 1997; Dufour i Beninger, 2001). Krajnji rezultat združenog djelovanja cilija je transport za sluz vezanih čestica hrane prema bazi škrge, ili prema njihovim slobodnim rubovima, odakle će se transportnim cilijarnim žljebovima prebaciti do usnih nabora (Jørgensen, 1990; Gosling, 2003).



Slika 4. Škržno vlakno (preuzeto iz Osnovne morfološke značajke školjkaša, Gavrilović).

## 1.2. Deoksiribonukleaze (DNaze)

Lizosomi su organeli unutar stanice koji djeluju kao probavni sustav stanice i služe u razgradnji tvari unesenih izvana te u probavi dotrajalih dijelova same stanice. Oni sadrže oko 50 različitih enzima za razgradnju, koji hidroliziraju proteine, DNA, RNA, polisaharide i lipide (Cooper i Hausman, 2004). U lizosomima se nalaze dva tipa nukleaza koji pokazuju specifičnost prema supstratu, ribonukleaza (RNaza) djeluje na ribonukleinsku kiselinu a deoksiribonukleaza (DNaza) na deoksiribonukleinsku kiselinu.

Deoksiribonukleaze (DNaze) su enzimi koji lome DNA molekule i klasificirani su u različite grupe ovisno o njihovim biokemijskim svojstvima (Laskowski, 1967). Jedinstveno svojstvo DNaza je činjenica da one uspješno hidroliziraju fosfodietersku vezu, najstabilniju kemijsku vezu pronađenu u biološkim molekulama (Baranovskii i sur., 2004). DNaze, kao degradirajući enzimi, imaju važnu ulogu u održavanju fiziološkog sadržaja DNA u tijelu kao i zaštite organizma od utjecaja ksenobiotikana nukleinske kiseline (Fafandžel i sur., 2010). DNaze aktivne pri kiselom pH (optimum djelovanja u rasponu pH 4,5-5,5) nazivaju se kisele DNaze ili DNaze II, dok one aktivne pri neutralnom pH (pH 7) spadaju u obitelj DNaza I. Rana istraživanja pokazala su da je funkcija kisele DNaze potrebna tijekom degradacije DNA unutar fagolizosoma, tijekom infekcije ili tijekom degradacije apoptotičkih stanica fagocitnim stanicama (Evans i Aguilera, 2003). Enzimi obitelji neutralnih DNaza zahtijevaju neutralan pH i prisutnost bivalentnih metala,  $Mg^{2+}$  i  $Ca^{2+}$ , za njihovu hidrolitičku

aktivnost (Fafandjel i sur., 2010). DNaze I, djelujući kao probavni enzimi gastrointestinalnog trakta, pokazuju najveću aktivnost u probavnim žlijezdama (Lacks, 1981). Osim kod sisavaca, danas je njihova prisutnost zabilježena i kod ptica (Nakashima i sur., 1999), gmazova (Takeshita i sur., 2003), vodozemaca (Takeshita i sur., 2001) i riba (Yasuda i sur., 2004). DNaza II je kisela endonukleaza koja je uključena u degradaciju egzogene DNA i važna je za fragmentaciju i degradaciju DNA tijekom stanične smrti (Cheng i sur., 2006). Enzimi kisele DNaze karakterizirani su kiselim pH optimumom i nedostatkom traženog aktivatora (Baranovskii i sur., 2004). DNaza II otkrivena je kasnih 40-tih godina prošlog stoljeća (Catheside i Holmes, 1947) te je prvo izolirana iz lizosoma jetre štakora (Dulaney i Touster, 1972). Kisela DNaza kao fiziološki važan lizosomalni enzim karakterističan za probavne žlijezde i škrge istražuje se u školjkašima (Kovačić i sur., 2015). Pri praćenju sezonske aktivnosti kisele DNaze uočena je najveća aktivnost u probavnoj žlijezdi tijekom ljetnih mjeseci u srpnju, a najmanja u siječnju, dok je kod škrge bilo obrnutno, najveća enzimska aktivnost uočena je u siječnju, a najmanja u srpnju (Kovačić i sur., 2015). Time se može utvrditi da je aktivnost kisele DNaze specifična za pojedino tkivo i ovisi o godišnjem dobu tj. da fiziologija školjkaša može biti pod utjecajem sezonskih promjena okolišnih čimbenika i metaboličke aktivnosti povezane s reproduktivnim ciklusom, dostupnosti hrane, zalihama i iskoristivosti hrane (Kovačić i sur., 2015). Visoko je očuvani enzim, sveprisutan u tkivima te uključen u mnogim staničnim procesima (Fafandjel i sur., 2007). Danas su provedena opsežna istraživanja enzima obitelji DNaze II u sisavcima te ima nekoliko izvještaja o njihovoj prisutnosti u beskralješnjacima (Rasskazov i sur., 1975; Hedgecock i sur., 1983; Øverbø i Myrnes, 2006; Fafandjel i sur., 2008). Zajedničko obilježje kiselih DNaza istraživanih beskralješnjaka je da im je aktivnost inhibirana dvovalentnim kationima, te da razgrađuju nativnu DNA, a ne denaturiranu, kao što je slučaj kod viših organizama (Kovačić, 2015). Kod sisavca predstavljaju i kritičan enzim za njihov razvoj (Krieser i sur., 2002; Kawane i sur., 2001). Tako naprimjer nedostatak kisele DNaze tijekom kasnijih stadija razvoja kod miševa uzrokuje smrtnost (Kawane, 2001; Krieser, 2002). U jednom radu demonstrirano je da nedostatak DNaze II sprječava sigurnu eritropoezu u pratnji sa smrti embrija zbog ozbiljnih anemija, i navadeno je da je DNaza II neophodna za probavu stanične DNA potisnute iz eritroidnih stanica (Kawane i sur., 2001).

### 1.3. Utjecaj zagađivala na aktivnost DNaze

Poznato je da prisutnost prirodnih i antropogenih zagađivala utječe na brzinu različitih enzimskih reakcija u morskom okolišu (Menzorova i Rasskazov, 2009). Metode analize enzimске aktivnosti čine se kao najprikladnije metode za rješavanje problema onečišćenosti složenog morskog sistema (Menzorova i sur., 2014). Istraživanja raznih enzimskih sistema kao kandidata za procjenu onečišćenosti vode već su neko vrijeme postala od interesa za znanstvenike.

Pri mjerenju enzimске aktivnosti kisele DNaze kod morskih organizama izloženih zagađivalima, morski organizmi izražavaju visoku osjetljivost koja daje općeniti uvid u zdravlje školjkaša a time i informacije o njihovom staništu. Nedavna istraživanja deoksiribonukleaze (DNaze) u školjkašima (Menzorova i Raaskazov, 2007; Fafandel i sur., 2008), pužu (Popov i sur., 2003; Popov i sur., 2008) i morskom ježincu (Menzorova i Rasskazov, 2007; Menzorova i Rasskazov, 2009) povezana su sa odgovorom DNaze na prisutnost morskih zagađivala: teških metala, ulja i detergenta (Kovačić i sur., 2017). Tijekom istraživanja uzoraka koji su prikupljeni s onečišćenih područja, u svim uzorcima aktivnost kisele DNaze je bila viša od kontrole (Kovačić i sur., 2017). U jednom istraživanju istražene su promjene u aktivnosti kisele DNaze u probavnoj žlijezdi i hemocitama dagnje *Mytilus galloprovincialis* izložene detergentu kao surfaktantu, benzinu kao mješavini policikličkih aromatskih ugljikovodika i bakru kao teškom metalu i otkrili da je najviša enzimska aktivnost uočena kod dagnji izloženih benzinu te da su dramatične promjene u aktivnosti kisele DNaze uočene u probavnoj žlijezdi izloženoj benzinu i bakrovom sulfatu (Fafandel i sur., 2008). Osim toga dokazano je da su vrijeme izloženosti zagađivalom kao i tip zagađivala specifični za aktivnost kisele DNaze u pojedinom tkivu kao i da se pojedina tkiva razlikuju u njihovoj metaboličkoj i molekularnoj organizaciji (Fafandel i sur., 2008). Tako će npr. probavna žlijezda dagnje pokazati veću osjetljivost na zagađivala od škrga, upravo zbog veće metaboličke aktivnosti a time i većeg broja oštećenja DNA (Dondero i sur., 2011; Kovačić i sur., 2017). Oba istraživana tkiva imaju vodeću ulogu u homeostatskim mehanizmima te reagiraju na uvjete hrane i okoliša (Kovačić i sur., 2015). Osim toga, u radu gdje su istraživali karakterizaciju i sezonsku aktivnost lizosomalne deoksiribonukleaze II iz dagnje *Mytilus galloprovincialis* (Kovačić i sur., 2015), otkrivena je prisutnost dviju aktivnih DNaza od 48 i 37 kDa u probavnoj žlijezdi

te jedna od 48 kDa u škrgama dagnje. Najveće povećanje aktivnosti kisele DNaze zabilježeno je u probavnoj žlijezdi koja se smatra kao najaktivniji metabolički organ za borbu protiv toksičnih spojeva (Dondero i sur., 2011). Također, probavne žlijezde dagnje su prigodne kao indikator osjetljivosti kvalitete okoliša zato što ne prikazuju sezonske varijacije uzrokovane okolišnim čimbenicima kao što su temperatura i salinitet (Kovačić i sur., 2015). Rezultati istraživanja provedenih na spužvi vrste *Tethya aurantium* pokazali su da je aktivnost DNA degradirajućih enzima povezana sa dijelovima spužve i njihovih funkcija, tako će npr. u korteksu spužve, dijelu koji komunicira s okolišem, biti visoka enzimska aktivnost neutralne DNaze, dok će u dijelu endosoma, gdje se odvija unutarstanična probava, biti izraženija aktivnost kisele DNaze (Fafandžel i sur. 2010).

#### 1.4. PAU

Policiklički aromatski ugljikovodici (PAU) su skupina organskih spojeva koji sadrže dva ili više kondenziranih aromatskih prstenova. Zajedno sa teškim metalima, organskim otapalima, anorganskim solima, industrijskom i gradskom kanalizacijom, čine najvažnija antropogena zagađivala u vodenom okolišu (Valavanidis i sur., 2008). Upravo zbog svoje antropogenosti uključeni su u prioritetnu listu zagađivala Europske unije i Agencije za zaštitu okoliša (Environmental Protection Agency, EPA) Sjedinjenih Američkih Država, s obzirom na njihova mutagena i kancerogena svojstva. (Chimezie i sur., 2005; Zhang i sur., 2004). Benzo(a)piren je jedan od najpoznatijih i najviše proučavanih PAU (Jakovljević i Žužul, 2011).

Većina PAU je na sobnoj temperaturi u krutom stanju, imaju niski tlak para i visoke temperature tališta i vrelišta. Izrazito su hidrofobni i hidrofobnost se povećava s porastom broja prstenova u molekuli dok se hlapljivost i topljivost u vodi smanjuju. Osim toga spojevi koji su bolje topljivi u vodi imaju i veću perzistenciju u moru, biološki su dostupniji, što omogućuje lakšu apsorpciju takvih spojeva kroz membrane škrga ili gutanjem hrane (Sinaei i Mashinchian, 2014). Slično tome, otkriveno je da što je niža molekulska masa spoja, to je on abundantniji u morskim organizmima (Baumard, 1998). Viša molekulska masa PAU označava veću rezistenciju na biodegradaciju mikrobima a time i zadržavanje u sedimentu (Dahle i sur., 2003; Geffard i sur. 2004). Školjkaši nastoje akumulirati PAU niže molekulske mase (Storelli i Marcotrigiano 2001; Piccardo i sur., 2001). Akumulacija zagađivala u tkiva

da dagnje također ovisi i o vrsti podloge na kojoj se nalaze. Školjkaši izloženi pjeskovitom sedimentu akumuliraju manje količine zagađivala zbog veličine čestice pijeska i niskog sadržaja organskog ugljika u sedimentu što smanjuje vezanje hidrofobnih zagađivala na čestice sedimenta te čini otopljenu frakciju ugljikovodika glavnim izvorom PAU dok je kod muljevutih sedimenta veličina čestice manja i postotak apsorpcije takvih čestica puno veći (Baumard i sur., 1999). Na sadržaj PAU u školjkašima ovise i godišnja doba te je on puno veći u ožujku u odnosu na listopad i kolovoz što je povezano sa razlikama u brzini filtracije i razinama PAU u vodenom stupcu (Baumard i sur., 1999).

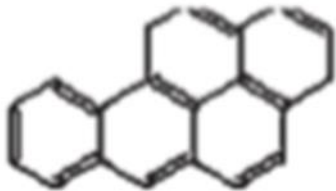
Porijeklo PAU je vezano uz ljudske aktivnosti kao npr. tijekom industrijskih procesa, ispušni plinovi motornih vozila, spaljivanje otpada u nekontroliranim uvjetima, kućna ložišta i drugo te su urbana područja najizloženija njihovom djelovanju. Osim putem čovjeka, PAU u okoliš mogu dospjeti i prirodnim putem kao što su požari i vulkanske erupcije i na kraju putem kiša dospijevaju u rijeke i mora gdje se godinama akumuliraju u sedimentu i organizmima te putem hranidbenog lanca prenose sve do čovjeka. Kod čovjeka u nekim slučajevima mogu dovesti do problema sa zdravljem i/ili genska oštećenja (Samanta i sur., 2002). PAU se u morskom okolišu nastoje apsorbirati na suspendirane čestice i sedimente i postati biodostupni ribama i drugim morskim organizmima putem prehrambenog lanca (Valavanidis i sur., 2008). Razina PAU u sedimentu varira, ovisi o udaljenosti mjesta od područja pod ljudskom aktivnosti i o biodegradaciji tih tvari, proces koji se oslanja na abiotičke i biotičke faktore koji ovise o karakteristikama mjesta (Bihari i sur., 2007). Koncentracije PAU u bioti ovise o blizini izvora zagađenja, njihovoj biodostupnosti, i mogućnosti vrste da biotransformira PAU, i u školjkašima se kretala od 33 do 150ng/g mokre mase (Kilikidis i sur., 1994; Guinan i sur., 2001). Tako je u jednom istraživanju utjecaja benzina kao mješavine policikličkih aromatskih ugljikovodika na tkiva dagnje *Mytilus galloprovincialis* izazvala usporen odgovor enzima zbog metaboličkih biotransformacija lipofilnih sastojka (Fafandeli sur., 2008). Filtratorski organizmi mogu apsorbirati ksenobiotike na dva načina: direktno- apsorpcijom spojeva prisutnih u vodi putem škrga i indirektno- apsorpcijom ksenobiotika apsorbiranih na maloj čestičnoj frakciji putem probavnog sustava (Baumard i sur., 1999). Unutar morskih organizama PAU podliježu biotransformacijama i koncentrirani su u nekoliko tkiva sa vremenom poluraspada od 6 do 9 dana. (Varanasi i sur.,1989). Prisutnost PAU u



tkivu dagnje može utjecati na fiziološko stanje dagnje (Thomas i sur., 1999). Štoviše, PAU mogu potaknuti oksidativni stres i oksidativna oštećenja DNA preko metaboličke aktivacije i stvaranjem reaktivnog kisikovog spoja (ROS) (Ohnishi i Kawanishi, 2002).

### 1.5. Benzo(a)piren

Benzo(a)piren (BaP) spada u skupinu policikličkih aromatskih ugljikovodika (PAU) i sastoji se od pet povezanih prstenova i strukturnog zaljeva (bay region) (EPA, 2017). Postojanje strukturnog zaljeva (bay region) u molekulama PAU s više od četiri prstena osobito je važno za njihove mutagene, odnosno potencijalno kancerogene osobine (Juretić i sur., 1989).



Slika 5. Strukturna formula benzo(a)pirena, C<sub>20</sub>H<sub>12</sub> (preuzeto iz Jakovljević, Žužul, 2011)

Benzo(a)piren je široko rasprostranjeno zagađivalo okoliša, primarno nastao kao rezultat nepotpunog izgaranja (Boström i sur., 2002), sa poznatim toksičnim učinkom na školjkaše roda *Mytilus* (Maria i sur., 2013). Relativno je netopljiv u vodi i ima nisku hlapljivost (EPA, 2017). Ispitivanje metabolizma PAU, u prvom redu BaP-a vrši se u kulturi stanica eksperimentalnih životinja (štakori, miševi), no često se koriste i ribe čiji metabolizam može biti sličan (Abokas i Pelkonen, 1984; Protić- Sabljčić i Kurelec, 1983) ali i različit od onog u sisavaca (Hofe i Puffer, 1986). Kako je za metabolizam PAU nužna indukcija oksidaze miješanih funkcija, odnosno benzo(a)piren monooksigenaza za metabolizam BaP-a, aktivnost ovog enzima može poslužiti kao indikator izloženosti genotoksičnim tvarima (Rijavec i sur., 1981; Kurelec i sur., 1984; Griffin i sur., 1986). Subletalne doze BaP-a su već pronađene u morskom okolišu, posebice nakon slučajnih izljeva nafte (Volodkovich i Belyaeva, 1992). Apsorbira se putem oralnog, inhalantnog ili dermalnog puta. Metabolizam BaP-a javlja se u gotovo svim tkivima, sa visokom metaboličkom aktivnosti u jetri i značajnim

metabolizmom u ulaznim tkivima (pluća, koža, gastrointestinalni trakt) i u reproduktivnim tkivima (EPA, 2017). Raznovrsni biokemijski odgovori su već bili istaknuti u školjkašima roda *Mytilus* kao promjene u enzimskoj aktivnosti povezane s biotransformacijskim procesima (metaboličkoj aktivnosti), oksidativni stres i oštećenja (lipidna peroksidacija), kao i genotoksičnost (Akcha i sur., 2000; Maria i Bebianno, 2011; Banni i sur., 2010). U morskim organizmima BaP inducira ksenobiotički metabolizam u ribama i morskim polihetima (Banni i sur., 2009a; Telli-Karakoç i sur., 2002) uzrokuje razvojne nepravilnosti i genotoksične efekte u embrijima kamenica, anelida i zebrica (Jha i sur., 1996; Wessel i sur., 2007; Sogbanmu i sur., 2016). Metabolizam B(a)P-a je već bio istražen in vitro (Martinez i Livingstone, 1995) i in vivo (Michel i sur., 1995) sugerirajući na produkciju BaP- diola, kinona i fenola (Banni i sur., 2010). Detoksifikacijski enzimi faze 1 kod školjkaša prikazuju aktivaciju BaP-a na proizvode koji se kovalentno vežu za makromolekule stanice (Michel i sur., 1995). Posljednjih godina pozornost je usmjerena na indukciju citokroma P450- ovisne monooksigenaze (faza 1) kao osjetljivog biomarkera kod školjkaša izloženih organskim zagađivalima u morskom okolišu (Stegeman i Hahn, 1994.; Snyder, 2000). Aktivacija izoenzima citokroma P450 (CYP450) može se mjeriti određivanjem aktivnosti BaP hidroksilaze (BPH) koji se često koristi kao biomarker izloženosti školjkaša PAU (Narbonne i sur., 1999; Akcha i sur., 2000; Sole i Livingstone, 2005). U radu u kojem su istraživali utjecaj BaP-a na probavnu žlijezdu i škrge školjkaša nakon 24h izlaganja BaP-u primijetili su značajnu razliku u aktivnosti BPH-a u usporedbi s kontrolom, koja je pokazala rastući trend u probavnoj žlijezdi. To govori o povećanju biotransformacijskih procesa faze 1 a time i povećanje produkcije metabolita faze 1. Maksimalna aktivnost postignuta je nakon 72h izlaganja što potvrđuje da školjkaši mogu bioakumulirati PAU (Banni i sur., 2010). Osim toga, u jednom od radova gdje su proučavali posljedice BaP-a na oštećenja DNA uočili su da su oštećenja bila veća u probavnoj žlijezdi nego u škragama (Banni i sur., 2017) zbog viših koncentracija enzima monooksigenaze potrebnih za transformaciju BaP u njegove reaktivne članove (Jerina i sur., 1991) iako je biakumulacija BaP-a bila viša u škragama (Banni i sur., 2017).

Poznato je da izlaganje zagađivalima, kao što su organski ksenobiotici, utječu na biokemijske i fiziološke procese u morskim organizmima (Banni i sur., 2010). U školjkašima, veliki broj istraživanja opisao je prisutnost i BaP indukciju

metabolizirajućih enzima u probavnoj žlijezdi (Narbonne i sur., 1999; Akcha i sur., 2000; Sole i Livingstone, 2005). Nije pronađena nijedna preporuka za korištenje pročišćenog BaP-a za komercijalnu upotrebu osim u istraživačke svrhe (EPA 2017).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

- 1) Utvrditi utjecaj benzo(a)pirena na aktivnost kisele DNaze u probavnoj žlijezdi dagnje *Mytilus galloprovincialis*
  
- 2) Utvrditi utjecaj benzo(a)pirena na aktivnost kisele DNaze u škragama dagnje *Mytilus galloprovincialis*
  
- 3) Usporediti aktivnosti kisele DNaze u probavnoj žlijezdi i škragama po izlaganju benzo(a)pirenu

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Izlaganje školjkaša**

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

Nakon aklimatizacije, jedinke približno iste veličine su prebačene u bazene ispunjene morskom vodom. Po deset jedinki stavljeno je u kontrolni bazen (bez zagađivala i nosioca zagađivala), bazen u kojem je dodavano otapalo (nosioc zagađivala, DMSO) i šest bazena s različitim koncentracijama benzo(a)pirena (0,01, 0,05, 0,1, 1, 10 i 20 µg/l). Dagnje su izlagane kroz 4 dana. Morska se voda s pripadajućom koncentracijom benzo(a)pirena izmjenjivala svaka 24 h. Nakon 96h od početka eksperimenta, iz školjkaša je izolirano tkivo.

#### **3.2. Izolacija i priprema tkiva**

Tkivo probavne žlijezde i škrگا isječeno je škaricama. Polovica probavne žlijezde i jedan par škrگا smrznuti su u tekućem dušiku te homogenizirani u hladnom lizirajućem puferu (10mM TRIS, 20mM EDTA, 0,5% Triton-X, 2 mM PMSF, pH 8,0; 4 °C) ručnim homogenizatorom u omjeru 1:3. Uzorci su centrifugirani na brzini 10 000 g, pri temperaturi 4 °C u vremenu od 30 minuta. Nakon centrifugiranja proteinski homogenat izdvojen kao supernatant je prebačen u tubicu i alikvotiran. Alikvoti su smrznuti u tekućem dušiku i pohranjeni na -80 °C za daljnje analize. Proteini u homogenatu određivani su metodom po Lowry-ju (1951).

#### **3.3. Fluorimetrijsko određivanje aktivnosti kisele DNaze**

Za mjerenje aktivnosti enzima kisele DNaze u homogenatu tkiva dagnje korištena je fluorimetrijska metoda. Aktivnost DNaza u tkivima određena je u mikrotitarskim pločama korištenjem fluorescentne boje PicoGreen® prema standardnom protokolu za fluorimetrijsko određivanje aktivnosti DNaza (Fafanđel i sur., 2008). U pojedinu jažicu mikrotitarske pločice dodano je 10 µl homogenata tkiva (0,5 µg/µl) i 80 µl

50mM natrij acetatnog pufera. Enzimatska reakcija započela je dodavanjem 10  $\mu$ l otopine dvolančane DNA (Sigma-Aldrich, USA) (0,02  $\mu$ g/ $\mu$ l). Nakon inkubacije od 15 minuta pri 27 °C, u jažice je dodano 100  $\mu$ l PicoGreen® boje, otopljene u TE puferu (10 mM Tris, 1 mM EDTA) u omjeru 1:200.

Određivanje aktivnosti DNaza temelji se na promjeni intenziteta fluorescencije zbog hidrolize DNA djelovanjem DNaza prisutnih u proteinskom ekstraktu i smanjenju udjela kompleksa dDNA - PicoGreen®. Fluorescencija je mjerena u nativnom uzorku ( $F_u$ ), a zatim u uzorku inkubiranom 15 minuta na temperaturi od 95 °C ( $F_o$ ) u termobloku (Thermomixer 5437, Eppendorf). Aktivnost DNaze ( $\Delta F$ ) izračunata je prema izrazu  $\Delta F = F_o - F_u$ . Za mjerenje intenziteta fluorescencije korišten je čitač mikrotitarskih ploča Fluoroscan Ascent microplate reader (Labsystem, Finland) opremljen kombinacijom filtera s ekscitacijom pri valnoj duljini od 485 nm i emisijom pri 520 nm.

### **3.4. Obrada podataka**

Podatci su prikazani grafički kao aritmetička sredina i standardna devijacija korištenjem programa Microsoft Excel 2013. U programu Statistica 9.0. utvrđene su statistički značajne razlike između kontrolnih uzoraka i uzoraka dagnji izloženih različitim koncentracijama benzo(a)pirena. Neparametrijski test Kruskal Wallis korišten je za utvrđivanje razlike među uzorcima, a *post hoch* Mann-Whitney U test za razliku između dva uzorka.

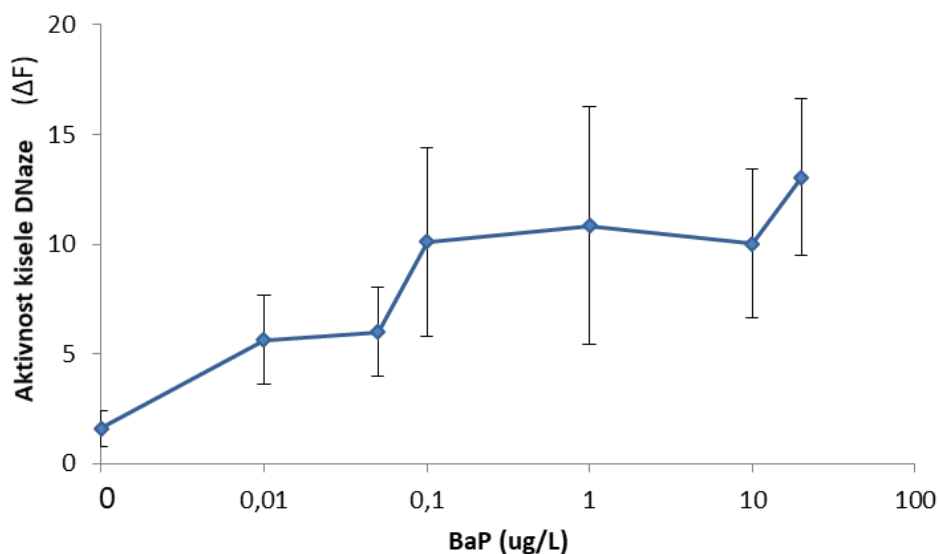
## 4. REZULTATI

Aktivnosti kisele DNaze ( $1,59 \pm 0,82$ ) izmjerene u probavnoj žlijezdi dagnje izložene DMSO-u koji je korišten kao otapalo za benzo(a)piren, uzete su kao kontrolne vrijednosti.

Aktivnosti kisele DNaze izmjerene u škragama dagnje izloženim DMSO-u ( $0,03 \pm 0,02$ ) uzete su kao kontrolne vrijednosti.

### 4.1. Aktivnost kisele DNaze u probavnoj žlijezdi pod utjecajem benzo(a)pirena

Aktivnost kisele DNaze u probavnoj žlijezdi dagnje nakon izlaganja različitim koncentracijama benzo(a)pirena prikazana je na slici 6. Kao što je vidljivo iz grafa s porastom koncentracija benzo(a)pirena aktivnost kisele DNaze se povećavala. Na slici je uočen nagli porast aktivnosti kisele DNaze pri povećanju koncentracije od 0,1  $\mu\text{g/L}$  i iznosi 10. Povećanjem koncentracije zagađivala od 1  $\mu\text{g/L}$  i 10  $\mu\text{g/L}$  BaP-a vidljiva je konstantna aktivnost kisele DNaze. Posljednji porast aktivnosti kisele DNaze događa se pri koncentraciji BaP-a od 20  $\mu\text{g/L}$ . Postoje statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ) u aktivnosti kisele DNaze u kontrolnim uzorcima i uzorcima izloženim različitim koncentracijama benzo(a)pirena (0,01  $\mu\text{g/L}$ , 0,05  $\mu\text{g/L}$ , 0,1  $\mu\text{g/L}$ , 1  $\mu\text{g/L}$ , 10  $\mu\text{g/L}$ , 20  $\mu\text{g/L}$ ), što je vidljivo iz tablice 1.



Slika 6. Aktivnosti kisele DNaze izmjerene u probavnoj žlijezdi dagnje izložene benzo(a)pirenu kroz 96h.

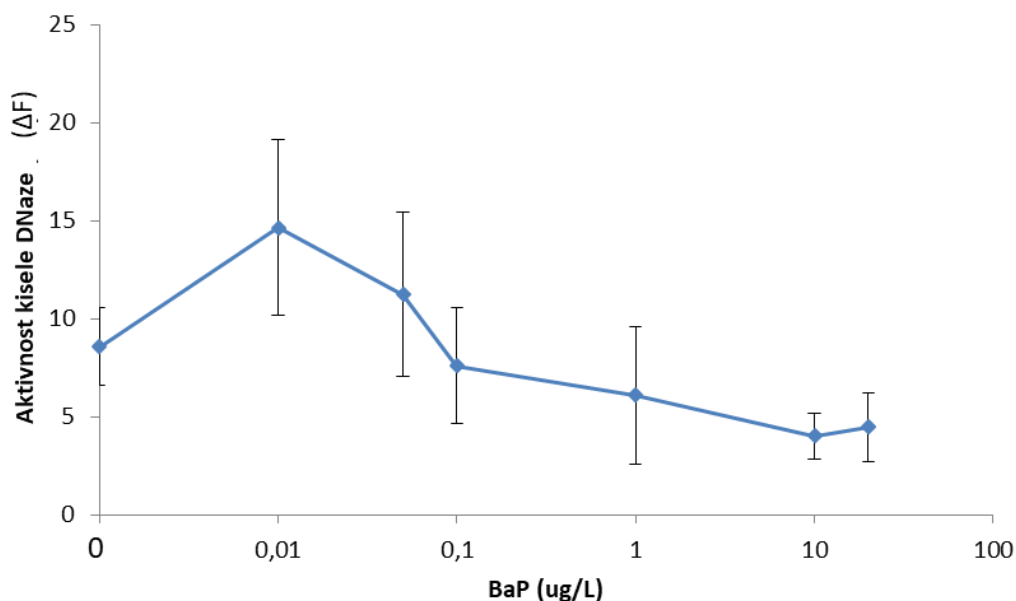
Tablica 1. Testiranje učinka benzo(a)pirena na aktivnost kisele DNaze u probavnoj žlijezdi. Kruskal Wallis test ( $H=44,52$ ,  $df=6$ ,  $p=0,0001$ ) je ukazao značajnu razliku među skupinama, a razlike u pojedinim vrijednostima izračunate su Mann-Whitney testom. U tablici su prikazane p vrijednosti testa. Statistički značajne vrijednosti su podebljane.

BaP $\mu\text{g/L}$	0,01	0,05	0,1	1	10	20
0,01		0,879	<b>0,010</b>	<b>0,010</b>	<b>0,0001</b>	<b>0,0001</b>
0,05			<b>0,012</b>	<b>0,096</b>	<b>0,006</b>	<b>0,0001</b>
0,1				0,879	0,705	<b>0,041</b>
1					1,000	0,365
10						<b>0,001</b>
<u>Kontrola</u>	<b><u>0,0001</u></b>	<b><u>0,0001</u></b>	<b><u>0,0001</u></b>	<b><u>0,0001</u></b>	<b><u>0,0001</u></b>	<b><u>0,0001</u></b>

#### 4.2. Aktivnost kisele DNaze u škragama pod utjecajem benzo(a)pirena

Aktivnost kisele DNaze u škragama dagnje nakon izlaganja različitim koncentracijama benzo(a)pirena prikazana je na slici 7. Iz grafa je vidljivo da se dodatkom najmanje koncentracije BaP-a od 0,01  $\mu\text{g/L}$  aktivnost kisele DNaze naglo povećala sa 7.5 na 15. Nakon toga, dodatkom sve većih koncentracija slijedi pad aktivnosti kisele DNaze. Nagli pad može se uočiti dodatkom BaP od 0,1  $\mu\text{g/L}$ . Pad aktivnosti se nastavlja dodatkom zagađivala od 1  $\mu\text{g/L}$  i 10  $\mu\text{g/L}$  dok se dodatkom zagađivala od 20  $\mu\text{g/L}$  događa blagi porast u aktivnosti kisele DNaze. Postoje statistički značajne razlike ( $p<0,05$ ) u aktivnosti kisele DNaze u kontrolnim dagnjama i dagnjama izloženim različitim koncentracijama benzo(a)pirena (0,01  $\mu\text{g/L}$ , 0,05  $\mu\text{g/L}$ , 0,1  $\mu\text{g/L}$ , 1  $\mu\text{g/L}$ , 10  $\mu\text{g/L}$ , 20  $\mu\text{g/L}$ ), kao što je vidljivo iz tablice 2.





Slika 7. Aktivnost kisele DNaze u škrgama pod utjecajem benzo(a)pirena

Tablica 2. Testiranje učinka benzo(a)pirena na aktivnost kisele DNaze u škrgama. Kruskal Wallis test ( $H=38,59$ ,  $df=6$ ,  $p=0,0001$ ) je ukazao značajnu razliku među skupinama, a razlike u pojedinim vrijednostima izračunate su Mann-Whitney testom. U tablici su prikazane p vrijednosti testa. Statistički značajne vrijednosti su podebljane.

BaP $\mu\text{g/L}$	0,01	0,05	0,1	1	10	20
0,01		0,150	<b>0,001</b>	<b>0,004</b>	<b>0,0001</b>	<b>0,0005</b>
0,05			<b>0,015</b>	0,069	<b>0,0002</b>	<b>0,0008</b>
0,1				0,289	0,449	0,449
1					<b>0,002</b>	<b>0,012</b>
10						<b>0,705</b>
<u>Kontrola</u>	<b><u>0,010</u></b>	<b><u>0,173</u></b>	<b><u>0,096</u></b>	<b><u>0,449</u></b>	<b><u>0,0001</u></b>	<b><u>0,0006</u></b>

## 5. RASPRAVA

Onečišćenje morskih ekosustava danas je sveprisutno te nastaje kombinacijom onečišćivala i otpada, koji većinom dolaze s kopnenih izvora te na kraju dopijevaju u oceane. Zagađenje rezultira štetnim posljedicama na okoliš, zdravlje organizma pa time i na ekonomiju.

U ovom radu istražen je odgovor kisele DNaze na različite koncentracije benzo(a)pirena (BaP) koji spada u skupinu policikličkih aromatskih ugljikovodika (PAU) čiji su izvori povezani s ljudskom aktivnošću, iako mogu u more dospjeti i prirodnim putem kao npr. vulkanskim erupcijama i šumskim požarima. Aktivnost kisele DNaze u probavnoj žlijezdi i škragama školjkaša utvrđena je fluorimetrijskom metodom koristeći osjetljivo, fluorescentno PicoGreen® obojenje koje u kratkom vremenu omogućuje obradu većeg broja uzoraka (Fafandjel i sur., 2008). Izlaganje školjkaša različitim koncentracijama zagađivala izazvala je odgovor u istraživanim tkivima, probavnoj žlijezdi i škragama, na stres te stimulirala aktivnost enzima kisele DNaze kao obranu. Kod kontrolnih vrijednosti škruga i probavne žlijezde zabilježene su statistički značajne razlike koje su posljedica izloženosti DMSO-u. DMSO služi kao organsko otapalo u kojem smo otopili BaP. Čak su i najmanje koncentracije zagađivala učinile promjene u oba izložena tkiva. Povećanje koncentracije zagađivala dovelo je do povećanja aktivnosti kisele DNaze u probavnoj žlijezdi u odnosu na kontrolu. Isti takav odgovor probavne žlijezde unutar kojih je došlo do povećanja aktivnosti kiselih DNaza sa rastom koncentracije zagađivala zabilježen je pod utjecajem okolišnih mješavina zagađivala na aktivnost kisele DNaze u školjkašu *Mytilus galloprovincialis*: ex situ i in situ istraživanje (Kovačić i sur., 2017), kod srednje zagađenog mjesta- luka (Rijeka) i visoko zagađenog mjesta-gradskog otpada (Vranjić). Jedinke u našem istraživanju uzorkovane su iz uzgajališta u Limskom kanalu početkom srpnja kada je aktivnost kisele DNaze u probavnoj žlijezdi najviša (Kovačić i sur., 2017), pa se tada mogu uočiti najviše i najmanje aktivnosti kiselih DNaza tih dvaju tkiva. Veliku enzimsku aktivnost probavne žlijezde tijekom ranog proljeća pa sve do kasnog ljeta može objasniti reproduktivni ciklus dagnje kada su školjkaši uključeni u zadnji stadij gametogeneze i mrijesta (Gabbott, 1983). Osim toga i dostupnost hrane ima bitan utjecaj na enzimsku aktivnost. Kao posljedica visoke dostupnosti hrane, povećana metabolička stopa tijekom ranog proljeća i

krajem ljeta dovodi do viška proizvodnje kisikovih radikala koji bi mogli oštetiti DNA morskih organizama (Breen i Murphy, 1995; Cadet i sur., 1997), a time dovesti i do povećanja fagocitoze i endocitoze čime bi se povećala aktivnost lizosomalnih enzima u probavnoj žlijezdi (Robert i sur., 2011). Za razliku od probavne žlijezde, aktivnost kisele DNaze u škrgama pokazuje najmanju aktivnost u ljetnim mjesecima (Kovačić i sur., 2015). Samo je dodatkom najmanje koncentracije zagađivala od 0,01 µg/L zabilježen porast aktivnosti kisele DNaze. Značajno smanjenje aktivnosti kisele DNaze u škrgama dagnje sa smanjenjem kvalitete vode u skladu je sa radom gdje su mjerili posljedice različitih mješavina zagađivala okoliša na aktivnost kisele DNaze u *Mytilus galloprovincialis* (Kovačić i sur., 2017) te u sustavu ispitivanja DNaza u morskom ježincu (Menzorova i Rasskazov, 2009) i u promatranju zabilježenom za *Crenomytilus grayanus* (Menzorova i Rasskazov, 2007). U ovom istraživanju važno je naglasiti, da bez obzira na primjećen sezonski ciklus odgovora kisele DNaze na uvjete u okolišu, utjecaj zagađivala (BaP-a) na organe ostao je primjećen. To je osobito naglašeno za aktivnost kisele DNaze u probavnoj žlijezdi gdje se aktivnost povećala s dodatkom zagađivala.

Naša istraživanja možemo usporediti s radom (Kovačić i sur., 2017), gdje su dobiveni rezultati pokazali da je aktivnost kisele DNaze u probavnoj žlijezdi i škrgama školjkaša specifična za ta dva tkiva. Naime, aktivnost kisele DNaze u probavnoj žlijezdi korelira s toksičnosti organskih ekstrakata u morskoj vodi dok škrge nisu pokazale korelaciju na toksični potencijal takvih ekstrakta (Kovačić i sur., 2017). U radu Kovačić i Medić, 2016. istražen je utjecaj klorpirifosa kao organofosfatnog pesticida na utjecaj kisele DNaze u probavnoj žlijezdi i škrgama *M. galloprovincialis*. Nakon izlaganja školjkaša najmanjoj koncentraciji klorpirifosa, aktivnost kisele DNaze u probavnoj žlijezdi i škrgama je značajno različita od kontrole, kao što je zabilježeno i u ovom istraživanju. Aktivnost kisele DNaze u probavnoj žlijezdi pokazala je veću osjetljivost na različite koncentracije klorpirifosa nego što je to zabilježeno u škrgama. U ovom istraživanju, pod utjecajem BaP-a aktivnost kisele DNaze pokazala je također veću osjetljivost u probavnoj žlijezdi. Zanimljivo je primjetiti da se s porastom koncentracije klorpirifosa, aktivnost kisele DNaze u probavnoj žlijezdi smanjivala, a u škrgama povećavala (Kovačić i Medić, 2016). Ovo istraživanje je pokazalo da se pod utjecajem B(a)P-a aktivnost kisele DNaze u probavnoj žlijezdi povećava, a u škrgama smanjuje, što je obrnuti učinak. To dokazuje da svako zagađivalo reagira drugačije

na određeno tkivo, te da svako tkivo ima drugačiji odgovor na određeno zagađivalo (Kovačić i Medić, 2016). Takav specifičan odgovor može biti posljedica fiziokemijskih aktivnosti koje su karakteristične za takve organe, bilo s obzirom na aktivaciju ili detoksifikaciju zagađivala ili na popravljavanje različitih tipova DNA lomova (Ali i sur., 2008).

Iz toga proizlazi da jedno zagađivalo ne mora biti glavni čimbenik koji utječe na promjene u aktivnosti enzima kisele DNaze već da i drugi faktori kao temperatura, dostupnost hrane, građa organizma. Štoviše, toksični efekti u tkivima školjkaša ovise ne samo o toksičnim koncentracijama u okolišu nego i o biodostupnosti, bioakumulaciji i metabolizmu (Kovačić i Medić, 2016). Stvaran utjecaj nekog spoja u morskom ekosustavu na prirodnu populaciju dagnji teško je procijeniti, jer je u okolišu prisutan velik broj onečišćivala, koji dolaze u mješavinama te tako utječu na različite stupnjeve biološke organizacije u morskim organizmima, od substanične, preko stanične razine do razine ekosistema (Kovačić, 2015). Važno je pratiti različite promjene na organizam dagnji, od aktivnosti enzima do histokemijskih promjena na organima, kako bi razumijevanje utjecaja onečišćivala na organizam bilo jasnije. Razumijevanje fiziologije školjkaša kao i stanične biologije važno je za biomonitoring i praćenje stanja u okolišu s ciljem otkrivanja promjena u okolišu nastalih onečišćenjem.

## 6. ZAKLJUČCI

1. U ovom istraživanju ustanovljena je tkivna specifičnost u odgovoru aktivnosti kisele DNaze iz škrge i probavne žlijezde dagnje na različite koncentracije benzo(a)pirena s povećanjem ili smanjenjem.
2. Aktivnost kisele DNaze povećava se povećanjem koncentracija zagađivala u probavnoj žlijezdi dagnje.
3. Aktivnost kisele DNaze smanjuje se dodavanjem viših koncentracija BaP-a u škrgamma dagnje.
4. Istraživanja ukazuju da je aktivnost kisele DNaze u probavnoj žlijezdi pogodna za razlikovanje različitih koncentracija zagađivala BaP-a koje mogu biti prisutne u okolišu, te se koristi kao biomarker kontaminiranog područja s PAU.

## 7. LITERATURA

Abokas J.T. i Pekonen O., 1984. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fish liver cytochrome P-450. *Marine Environ. Res.*; 14:59.

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

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

Ali D., Nagpure N.S., Kumar S., Kumar R., Kushwaha B., 2008. Genotoxicity assessment of acute exposure of chlorpyrifos to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Chemosphere.* 71:1823–1831.

Al-Subiai S.N., Arlt V.M., Frickers P.E., Readman J.W., Stolpe B., Lead J.R., Moody A.J., Jha A.N., 2012. Merging nano-genotoxicology with eco-genotoxicology: an integrated approach to determine interactive genotoxic and sub-lethal toxic effects of C(60) fullerenes and fluoranthene in marine mussels, *Mytilus* sp. *Mut Res* 745:92–103.

Banni M., Bouraoui Z., Clerandau C., Narbonne J. F., Boussetta H., 2009a. Mixture toxicity assessment of cadmium and benzo a pyrene in the sea worm *hedistediversicolor*. *Chemosphere* 77 (7), 902–906.

Banni M., Negri A., Dagnino A., Jebali J. Aneur S., Boussetta H., 2010. Acute effects of benzo(a)piren on digestive gland enzymatic biomarkers and DNA damage on mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73; 842-848.

- Banni M., Negri A., Dagnino A., Jebali J., Ameer S., Boussetta H., 2010. Acute effects of benzo[a]pyrene on digestive gland enzymatic biomarkers and DNA damage on mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 842–848.
- Banni M., Negri A., Mignone F., Boussetta H., Viarengo A., Dondero F., 2011. Gene expression rhythms in the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) across an annual cycle. *PLoS ONE* 6(5):e18904.
- Banni M., Sforzini S., Arlt V.M., Barranger A., Dallas L.J., Oliveri C., Pacchioni B., Millino C., Lanfranchi G., Readman J.W., Moore M., Viarengo A., Jha A.N., 2017. Assessing the impact of benzo(a)pyrene on marine mussels: application of a novel targeted low density microarray complementing classical biomarker responses. *PLoS ONE* 12(6): e0178460.
- Baranovskii A.G., Buneva V.N. and Nevinsky G.A., 2004. Human deoxyribonucleases. A Review, *Biochemistry*, vol. 69, pp. 587-601.
- Baumard P., Budzinski H., Garrigues P., Sorbe J.C., Burgeot T., Bellocq J., 1998. Concentration of PAH in various marine organisms in relation to those in sediments to trophic level. *Mar Poll Bull*, 36:951-960.
- Baumard P., Budzinski H., Garrigues P., Dizer H., Hansen P. D., 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments and mussels (*Mytilus edulis*) from the Western Baltic Sea: occurrence, bioavailability and seasonal variations. *Marine Environmental Research* 47, 17-47.
- Bavčević, L., 1990. Fagocitorna aktivnost hemocita kamenice *Ostrea edulis*. Magistarski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- Beninger, P.G. i Dufour, S.C., 1996. Mucocyte distribution and relationship to particle transport on the pseudolamelibranch gill of *Crassostrea virginica* (Bivalvia: Ostreidae). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 137: 133-138.
- Beninger, P.G., Dufour, S.C., Bourque, J., 1997. Particle processing mechanisms of the eulamellibranch bivalves *Spisula solidissima* and *Mya arenaria*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 150: 157-169.

Bihari N., Fafandel M., Piškur V., 2007. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Ecotoxicological Characterization of Seawater, Sediment, and Mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Gulf of Rijeka, the Adriatic Sea, Croatia. Arch. Environ. Contam. Toxicol, 52, 379- 387.

Boström C.E., Gerde P., Hanberg A., Jernström B., Johansson C., Kyrklund T., Rannug A., Törnqvist M., Victorin K., Westerholm R., 2002. Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air [Review]. Environ Health Perspect 110 Suppl 3: 451-488.

Boucaud-Camou E. i Henry M., 2003. The digestive system. U: Atlas d'histologie et de cytologie des mollusques bivalves marins = An atlas of histology and cytology of marine bivalve moluscs. (Grizel, H., Ur.), Ifremer, France, 65-116.

Breen A.P., Murphy J.A., 1995. Reactions of oxyl radicals with DNA. Free Radical Biology & Medicine 18, 1033-1077.

CABI, 2019. *Mytilus galloprovincialis* (Mediterranean mussel). Internet, raspoloživo na <https://www.cabi.org/isc/datasheet/73756> (pristupljeno 28.08.2019.)

Cadet J., Berger M., Douki T., Ravanat J.L., 1997. Oxidative damage to DNA: Formation, measurement, and biological significance, Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology, Volume 131. Springer Berlin Heidelberg, 1-87.

Canesi L., Negri A., Barmo C., Banni M., Gallo G., Viarengo A., Dondero F., 2011. The organophosphate chlorpyrifos interferes with the responses to 17 $\beta$ -estradiol in the digestive gland of the marine mussel, *Mytilus galloprovincialis*. PLoS ONE 6 (5), e19803.

Canty M.N., Hagger J.A., Moore R.T., Cooper L., Galloway T.S., 2007. Sublethal impact of short term exposure to the organophosphate pesticide azamethiphos in the marine mollusc *Mytilus edulis*. Mar Pollut Bull. 54:396–402.

Catcheside, D.G., Holmes, B., 1947. The action of enzymes on chromosomes. Symposia of the Society for Experimental Biology, 225-231.



Cheng Y.C., Hsueh C. C., Lu S.C., Liao T.H., 2006. Identification of three crucial histidine residues (*His*<sup>115</sup>, *His*<sup>132</sup> and *His*<sup>297</sup>) in porcine deoxyribonuclease II. *Biochem. J.*, 398, 177-185.

Chimezie A., Ogbechea A., Palmerb P., Cokera H., 2005. Determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in marine samples of Siokolo Fishing Settlement. *J Chromatogr A*, 1073:323-330.

Cooper G.M., Hausman R.E., 2004. *Stanica: molekularni pristup*, treće izdanje. Zagreb: Medicinska naklada.

Dahle S., Savinov V., Matishov G., Evenset A., Noes K., 2003. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the bottom sediments of the Kara Sea shelf, Gulf of Ob and Yenisei Bay. *Sci Tot Environ* 306:57–71.

Dondero F., Banni M., Negri A., Boatti L., Dagnino A., Viarengo A., 2011. Interactions of a pesticide/ heavy metal mixture in marine bivalves: a transcriptomic assessment. *BMC Genomics*. 12:195–212.

Dufour, S.C. i Beninger, P.G., 2001. A functional interpretation of cilia and mucocyte distributions on the abfrontal surface of bivalve gills. *Mar. Biol.* 138: 295-309.

Dulaney JT i Touster O., 1972. Isolation of deoxyribonuclease II of rat liver lysosomes. *J Biol Chem* 247, 1424-1432.

EPA, 2017. Toxicological Review of Benzo (a) pyrene. CASRN 50-32-8.

Evans C.J., Aguilera R.J., 2003. DNase II: genes, enzymes and function. *Gene* 322:1–15.

Fafandel M., Bihari N., Perić L. and Cenov A., 2008. Effect of marine pollutants on the acid DNase activity in the haemocytes and digestive gland of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.*, vol. 86, pp. 508- 513.

Fafandel M., Bihari N., Smodlaka M., Ravlić S., 2008. Hemocytes/coelomocytes DNA content in five marine invertebrates: Cell cycles and genome sizes. *Biologia* 63, 730-736.

- Fafandel M., Ravlić S., Smodlaka M., Bihari N., 2010. Deoxyribonucleases (DNases) in the Cortex and Endosome from the Marine Sponge *Tethya aurantium*. Russian Journal of Marine Biology. 36, 5; 383-389.
- Gabbott P.A., 1983. Developmental and seasonal metabolic activities in marine molluscs. The mollusca: Their Ecology and Physiology 2, 165-217.
- Geffard G., Budzinski H., Le Menach K., 2004. Chemical and ecotoxicological characterization on the "Erika" petroleum: Bio test applied to petroleum water-accommodated fractions and natural contaminated samples. Aquat Living Resour 17:289– 296.
- Gosling, E., 1992. The mussel *Mytilus*: Ecology, Physiology, Genetics and Culture. Developments in aquaculture and fisheries science, Vol 25., Elsevier, Amsterdam, 589.
- Gosling, E., 2003. Bivalve Molluscs - biology, ecology and culture. Fishing News Books, Blackwell Publishing, Oxford 443.
- Griffin G.D., Egan B.Z., Lee N.E., Burtis C.A., 1986. Induction of mixed- function oxidase activity in mouse lymphoid tissues by polycyclic aromatic hydrocarbons. J Toxicol. Environ. Health; 19:185.
- Guinan J., Charlesworth M., Service M., Oliver T., 2001. Sources and geochemical constraints of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sediments and mussels of two Northern Irish Sea Loughs. Mar Poll Bull 42:1073–1081.
- Hedgecock E.M., Sulston J.E. and Thomson J.N., 1983. Mutations affecting programmed cell deaths in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Science, vol. 220, pp. 1277-1279.
- Hofe E.V., Puffer H.W., 1986. In vitro metabolism and in vivo binding of benzo(a)pyrene in the california killfish (*Fundulus parvipinnis*) and speckled sanddab (*Citharichthys stigmaeus*). Arch. Environ. Contam. Toxicol; 15:251.
- Ivošević D., 2013. Histološka i morfometrijska analiza probavila dagnje *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) u Malostonskom zaljevu. Diplomski rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet.

Jakovljević I., Žužul D., 2011. Policiklički aromatski ugljikovodici u zraku. Arh Hig Rada Toksikol; 62:357-370.

Jerina D.M., Chadha A., Cheh A.M., Schurdak M.E., Wood A.W i sur.,1991. Covalent bonding of bay-region diol epoxides to nucleic acids. AdvExp Med Biol 283:533–53.

Jha A.N., Hutchinson T.H., Mackay J.M., Elliott B.M., Dixon D.R., 1996. Development of an in vivo genotoxicity assay using the marine worm *Platynereis dumerilii* (polychaeta: Nereidae). Mut Res 359 (2), 141–150.

Jørgensen, C.B., 1990. Bivalve Filter Feeding: Hydrodynamics, Bioenergetics, Physiology and Ecology. Olsen & Olsen Ltd., Fredensborg, Denmark.

Kawane, K., Fukuyama, H., Kondoh, G., Takeda, J., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y. and Nagata, S., 2001. Requirement of DNase II for definitive erythropoiesis in the mouse fetal liver. Science 292, 1546–1549.

Kilikidis S., Kamairanos A., Karamanlis X., Gianakou U., 1994. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in the effluents of an urban waste treatment plant and the water, sediment and mussels of the receiver Themairkos Gulf (N. Greece). Fresen Environ Bull 3:95–100.

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

Kovačić I., Fafanđel M., Bihari N., 2015. Lysosomal deoxyribonuclease II from the mussel *Mytilus galloprovincialis*: Characterization and seasonal activity. Marine Biology Research, 11:7, 716-724.

Kovačić I., Fafanđel M., Perić L., Batel I., 2017. Effect of Environmental Pollutant Mixtures on Acid DNase Activity in Mussel *Mytilus galloprovincialis*: Ex Situ and In Situ Study. Bull Environ Contam Toxicol.

- Kovačić I., Medić N., 2016. The effect of chlorpyrifos on protein content and acid DNase activity in the mussel, *Mytilus galloprovincialis*, Marine and Freshwater Behaviour and Physiology, 49:4, 265-275.
- Krieser, R. J., MacLea, K. S., Longnecker, D. S., Fields, J. L., Fiering, S. and Eastman, A., 2002. Deoxyribonuclease II $\alpha$  is required for DNA digestion during the phagocytic phase of apoptosis and its loss causes perinatal lethality. Cell Death Differ. 9, 956–962.
- Kurelec B., Kezić N., Singh H., Zahn R.K., 1984. Mixed function oxidases in fish: their role in adaptation to pollution. Marine Environ. Res.; 14:409.
- Lacks S. A., 1981. Deoxyribonucleases I in mammalian tissues: specificity of inhibition by actin. J. Biol. Chem, vol. 256, pp. 2644- 2648.
- Langdon, C.J., Newell, R.I.E., 1996. Digestion and nutrition in Larvae and adults. U: The Eastern Oyster *Crassostrea virginica*. (Kenedy, V.S., R.I.E. Newell, A.F. Eble, Ur. ). A Maryland Sea Grant Book, College Park, Maryland, 231-269.
- Laskowski Sr., M., 1967. DNases and their use in the studies of primary structure of nucleic acids. Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 29, 165-220.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. The Journal of Biological Chemistry 193, 265-275
- Maria V.L., Bebianno M.J., 2011. Antioxidant and lipid peroxidation responses in *Mytilus galloprovincialis* exposed to mixtures of benzo(a)pyrene and copper. Comp. Biochem. Physiol. C 154 (1), 56–63.
- Maria V.L., Gomes T., Barreira L., Bebianno M.J., 2013. Impact of benzo(a)pyrene, Cu and their mixture on the proteomic response of *Mytilus galloprovincialis*. Aquatic Toxicology 144-145.
- Martinez P.G., Livingstone D.R., 1995. Benzo[a]pyrenedione stimulated oxyradical production by microsomes of digestive gland of the common mussel, *Mytilus edulis* L. Mar. Environ. Res. 39, 185–189.
- Mathers, N.F., 1973. Carbohydrate digestion in *Ostrea edulis*. Proc. Malacol. Soc. London 41, 359-367.

Matoničkin, I., Habdija, I., Primc- Habdija, B., 1998. Beskralješnjaci- biologija nižih avertebrata, III. prerađeno i dopunjeno izdanje. Udžbenici Sveučilišta u Zagrebu, Školska knjiga, Zagreb.

Menzorova N.I. and Rasskazov V.A., 2009. Evaluation of the Ecological State of the Sea of Japan and the Sea of Okhotsk using the DNase Test System. *Oceanology*, vol.49, no. 6, pp. 824-832.

Menzorova N.I., Rasskazov V.A., 2007. Application of different test systems and biochemical indicators for environmental monitoring of the Troitsa Bay, Sea of Japan. *Russ J Mar Biol* 33:118–124.

Menzorova N.I., Seitkalieva A.V., Rasskazov V.A., 2014. Enzymatic methods for the determination of pollution in seawater using salt resistant alkaline phosphatase from eggs of the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *Marine Pollution Bulletin* 79, 188-195.

Michel X.R., Beasse C., Narbonne J.F., 1995. In vivo metabolism of benzo(a)pyrene in the mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 28, 215–222.

Nakashima Y., Yasuda T., Takeshita H., Nakajima T., Hosomi O., Mori S., and Kishi K., 1999. Molecular biochemical and immunological studies of ten pancreatic deoxyribonuclease I. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 31, pp. 1315- 1326.

Narbonne J.F., Daubeze M., Clérandeau C., Garrigues P., 1999. Scale of classification based on biochemical markers in mussels: application to pollution monitoring in European coasts. *Biomarkers* 4, 415–424.

Narbonne J.F., Daubeze M., Clérandeau C., Garrigues P., 1999. Scale of classification based on biochemical markers in mussels: application to pollution monitoring in European coasts. *Biomarkers* 4, 415–424.

Ohnishi S., Kawanishi S., 2002. Double base lesions of DNA by metabolite of carcinogenic benzo(a)pyrene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290, 778-782.

Øverbø K. and Myrnes B., 2006. Deoxyribonuclease II from Icelandic scallop (*Chlamys islandica*): Isolation and partial characterization. *Comp. Biochem. Physiol. B*, vol.143, pp. 315- 318.

Piccardo M.T., Coradeghini R., Valerio F., 2001. Polycyclic aromatic hydrocarbon pollution in native and caged mussels. *Mar Poll Bull* 42:951–956.

Popov A.P., Konichev A.S., Tsvetkov I.L., 2003. Effect of Toxic Industrial Pollutants on the Activity and Isoforms of Acid DNase in the Freshwater Snail *Viviparus viviparus* L. *Appl Biochem Microbiol* 39:454–458.

Popov A.P., Tsvetkov I.L., Konichev A.S., 2008. Separation and characterization of deoxyribonucleases from hepatopancreas of freshwater snail in normality and under in vivo model intoxication. *Biochemistry (Mosc)* 73:937–942.

Protić- Sabljic M., Kurelec B., 1983. High mutagenic potency of several polycyclic aromatic hydrocarbons induced by liver postmitochondrial fractions and xenobiotic treated immature. *Carp. Mutation Res.*; 118:177.

Rasskazov V. A., Pirozhnikova V. V. and Galkin V. V., 1975. Some properties and specificities of deoxyribonucleases from marine invertebrates and fishes. *Comp. Biochem. Physiol. B*, vol. 51, pp. 343- 347.

Rijavec M., Britvić S., Protić M., Kurelec B., 1981. Detection of the presence of xenobiotics in seawater samples from Rijeka bay applying benzo(a)pyrene monooxygenase induction. *Thalassia Jugosl.*; 17:254.

Robert T., Vanoli F., Chiolo I., Shubassi G., Bernstein K.A., Rothstein R., Botrugno O.A., Parazzoli D., Oldani A., Minucci S., Foiani M., 2011. HDACs link the DNA damage response, processing of double-strand breaks and autophagy. *Nature* 471, 74-79.

Ronta T., 2016. Povezanost morfoloških obilježja i okolišem uvjetovanog fitnesa dagnje (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819) Diplomski rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet.

Samanta S.K., Singh O.V., Jain R.K., 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *TRENDS in Biotechnology* vol. 20, no. 6.

Sinaei M., Mashinchian A., 2014. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the coastal sea water, the surface sediment and Mudskipper *Boleophthalmus dussumieri* from coastal areas of the Persian Gulf: source investigation, composition pattern and spatial distribution. *Journal of Environmental Health Science & Engineering*, 12:59

Snyder M.J., 2000. Cytochrome P450 enzymes in aquatic invertebrate: recent advances and future directions. *Aquat. Toxicol.* 48, 529–547.

Sogbanmu T.O., Nagy E., Phillips D.H., Arlt V.M., Otitoloju A.A. i sur.,2016. Lagos lagoon sediment organic extracts and polycyclic aromatic hydrocarbons induce embryotoxic, teratogenic and genotoxic effects in *Danio rerio* (zebrafish) embryos. *Environ SciPollut Res Int.* 23(14):14489–501.

Sole M., Livingstone D.R., 2005. Components of the cytochrome P450-dependent monooxygenase system and FNADPH-independent benzo[a]pyrene hydroxylase activity in a wide range of marine invertebrate species. *Comp. Biochem. Physiol. Part C.* 141, 20–31.

Stegeman, J.J., Hahn, M.E., 1994. Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: current perspectives on forms, functions and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. In: Malins, D.C., Ostrander, G.K. (Eds.), *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*. .CRC/ Lewis Boca Raton, FL, pp. 87–206.

Storelli M.M., Marcotrigiano G.O., 2001. Polycyclic aromatic hydrocarbons in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Ionian Sea, Italy. *J Food Prot* 64:405–409.

Takehita H., Yasuda T., Iida R., Nakaima T., Mori S., Mogi K., Kaneko Y., Kishi K., 2001. Amphibian DNases I are characterised by C- terminal end with a unique, cysteine- rich stretch and by the insertion of a serine residue into the  $Ca^{2+}$  - binding site. *Biochem. J.*, vol. 367, pp. 473- 480.

Takehita H., Yasuda T., Nakaima T., Mogi K., Kaneko Y., Iida R. and Kishi K., 2003. A single amino acid substitution of Leu130Ile in snake DNases I contributes to the acquisition of thermal stability: a clue to the molecular evolutionary mechanism from cold- blooded to worm- blooded vertebrate. *Eur. J. Biochem.*, vol. 270, pp. 307- 314.

- Telli-Karakoç F., Ruddock P.J., Bird D.J., Hewer A., Van Schanke A. i sur., 2002. Correlative changes in metabolism and DNA damage in turbot (*Scophthalmus maximus*) exposed to benzo[a]pyrene. *Mar. Environ. Res.* 54(3–5):511–5.
- Thomas R.E., Harris P.M., Rice S.D., 1999- Survival in air of *Mytilus trossulus* following long-term exposure to spilled Exxon Valdez crude oil in Prince William Sound. *Comp Biochem Physiol* 122C:147–152.
- Valavanidis A., Vlachogianni Th., Triantafillaki S., Dassenakis M., Androutsos F., Scoullou M., 2008. Polycyclic aromatic hydrocarbons in surface seawater and in indigenous mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from coastal areas of the Saronikos Gulf (Greece). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 79, 733-739.
- Varanasi U., Stein J.E., Nishimoto M., 1989. Biotransformation and disposition of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in fish. In: Varanasi U (Ed.), *Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 94-149.
- Volodkovich Y.L., Belyaeva O.L., 1992. Distribution of benzo(a)pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons. Results of the Third Joint US-USSR Bering and Chukchi Seas Expedition (BERPAC), Summer 1988, Ed. by P.A. NAGEL. Washington, DC, US Fish and Wildlife Service, pp. 308–313.
- Wang X., Wang W.X., 2006. Bioaccumulation and transfer of benzo(a)pyrene in a simplified marine food chain. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, vol.312:101-111.
- Wessel N., Rousseau S., Caisey X., Quiniou F., Akcha F., 2007. Investigating the relationship between embryotoxic and genotoxic effects of benzo alpha pyrene, 17 alpha-ethinylestradiol and endosulfan on crassostreagigas embryos. *Aqua Toxicol* 85 (2): 133–142.
- Yasuda T., Takeshita H., Iida R., Ueki M., Nakaima T., Kaneko Y., Mogi K. and Kishi K., 2004. A single amino acid substitution can shift the optimum pH of DNase I for enzyme activity: biochemical and molecular analysis of the piscine DNase I family. *Biochem. Biophys. Acta*, vol. 1672, pp. 174- 183.
- Younge, C.M., 1926. Structure and Physiology of the Organs of Feeding and Digestion in *Ostrea edulis*. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 14: 295- 386.



Zhang Z., Huang J., Yu G, Hong H., 2004. Occurrence of PAHs, PCBs and Organochlorine pesticide sin the Tonghui River of Beijing, China. *Environ Pollut*, 130:349-361.

## 8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli

Završni rad

Sveučilišni preddiplomski studij Znanost o moru

### Utjecaj benzo(a)pirena na aktivnost kisele DNaze u tkivima dagnje *Mytilus galloprovincialis*

ANA HALOVANIĆ

#### SAŽETAK

Benzo(a)piren (BaP) je poznato genotoksično i kancerogeno zagađivalo koje spada u skupinu policikličkih aromatskih ugljikovodika (PAU) koje u morski okoliš može dospjeti prirodnim putem ili djelovanjem čovjeka. Kisele DNaze je lizosomalni enzim koji ima važnu ulogu u zaštiti organizma od zagađivala prisutnih u okolišu. U ovom radu utvrđena je aktivnost kisele DNaze za probavne žlijezde i škrge dagnje *Mytilus galloprovincialis* dodatkom različitih koncentracija (0,01 µg/L, 0,05 µg/L, 0,1 µg/L, 1 µg/L, 10 µg/L, 20 µg/L) BaP-a. Kod kontrolnih vrijednosti u oba istraživana tkiva zabilježene su statistički značajne razlike. U probavnoj žlijezdi uočen je porast aktivnosti kisele DNaze sa povećanjem koncentracije BaP-a, dok je u škragama aktivnost kisele DNaze povećanjem koncentracije BaP-a padala. Iako je vidljiv sezonski odgovor kisele DNaze na uvjete u okolišu, utjecaj zagađivala ostao je primijećen. Probavna žlijezda se smatra kao najaktivniji organ uključen u metabolizam organskih tvari i biotransformacijskih procesa te je ona u ovom radu pokazala veću osjetljivost na BaP.

**Ključne riječi:** benzo(a)piren, policiklički aromatski ugljikovodici, *Mytilus galloprovincialis*, kisele DNaze

**Mentor:** doc. dr. sc. Ines Kovačić

**Ocjenjivači:** doc. dr. sc. Ines Kovačić

izv. prof. dr.sc. Maja Fafandžel

doc. dr. sc. Emina Pustijanac

## 9. BASIC DOCUMENTATION CARD

Juraj Dobrila University od Pula

Bachelor thesis

University Undergraduate Study Programme – Marine Sciences

### **Effect of benzo(a)pyrene on acid DNase activity in mussel *Mytilus galloprovincialis* tissues**

ANA HALOVANIĆ

#### **ABSTRACT**

Benzo(a)pyrene (BaP) is a known genotoxic and carcinogenic agent that belongs to polycyclic aromatic hydrocarbons which can be found in marine environments caused by natural sources or anthropogenic activities. Acid DNase is lysosomal enzyme that plays an important role in the protection of organisms against xenobiotics that occur in the environment. In the present study, acid DNase activity for digestive gland and gills of mussel *Mytilus galloprovincialis* was determined by adding different concentrations (0,01 µg/L, 0,05 µg/L, 0,1 µg/L, 1 µg/L, 10 µg/L, 20 µg/L) of BaP. In both investigated tissues, control groups expressed significant difference. Digestive gland showed an increase of acid DNase activity following exposure of BaP, while acid DNase activity in gills has been decreased. Although the seasonal response by acid DNase activity on environmental conditions is apparent, the impact of pollutants remained noticeable. The higher acid DNase activity was detected in the digestive gland which is considered to be the most active organ involved in metabolism of organic compounds and biotransformation activities.

**Key words:** benzo(a)pyrene, polycyclic aromatic hydrocarbons, *Mytilus galloprovincialis*, acid DNase

**Supervisor:** doc. dr. sc. Ines Kovačić

**Reviewers:** doc. dr. sc. Ines Kovačić

izv. prof. dr.sc. Maja Fafandžel

doc. dr. sc. Emina Pustijanac



