



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Zoran Kiralj

**Bioakumulacija metala, biomarkerski
odgovori i biomolekule koje vežu metale u
probavnoj žlijezdi školjkaša *Unio crassus* kao
pokazatelji onečišćenja slatkovodnih
ekosustava**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2025



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Zoran Kiralj

**Bioakumulacija metala, biomarkerski
odgovori i biomolekule koje vežu metale u
probavnoj žlijezdi školjkaša *Unio crassus* kao
pokazatelji onečišćenja slatkovodnih
ekosustava**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

dr. sc. Dušica Ivanković, viša znanstvena suradnica

dr. sc. Saša Kazazić, viši znanstveni suradnik

Zagreb, 2025



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Zoran Kiralj

**Metal bioaccumulation, biomarker responses
and metal-binding biomolecules in the
digestive gland of the mussel *Unio crassus*
as indicators of freshwater ecosystem
contamination**

DOCTORAL DISSERTATION

Mentors:

Dušica Ivanković, PhD, Senior Scientific Associate
Saša Kazazić, PhD, Senior Scientific Associate

Zagreb, 2025

Ovaj je doktorski rad izrađen u Laboratoriju za biološke učinke metala Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu pod vodstvom dr. sc. Dušice Ivanković i dr. sc. Saše Kazazića, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Rad je financiran u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost „Biomolekule koje vežu metale i zdravstveni poremećaji kod slatkovodnih organizama izloženih industrijskom otpadu“ (IP-2019-04-2636) koji je vodila dr. sc. Zrinka Dragun.

INFORMACIJE O MENTORU

Dr. sc. Dušica Ivanković, diplomirala je na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu (doktor veterinarske medicine), a magistrirala (magistar prirodnih znanosti, znanstveno polje biologija) i doktorirala na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od 1996. godine zaposlena je u Laboratoriju za biološke učinke metala Zavoda za istraživanje mora i okoliša Instituta Ruđer Bošković, gdje danas radi kao viša znanstvena suradnica u istom laboratoriju. U svojoj je znanstvenoj karijeri pohađala brojna usavršavanja, član je više znanstveno-stručnih društava, uspješno je vodila veći broj diplomskih radova te je dobitnica više nagrada (godišnje nagrade IRB-a, nagrada za citiranost). Suvoditelj je učeničkog rada nagrađenog zlatnom medaljom na 19. međunarodnoj konferenciji mladih znanstvenika u Amsterdamu 2012. godine. Trenutno je u izradi doktorski rad jednoga doktoranda, za koji je potvrđena kao voditelj. Sudjelovala je na većem broju nacionalnih i međunarodnih znanstveno-istraživačkih i stručnih projekata. Objavila je kao autor/koautor 55 znanstvenih radova u časopisima indeksiranim u WoSCC bazi, te 10 priloga u časopisima i 91 sažetak u zbornicima međunarodnih i domaćih znanstvenih i stručnih skupova. Recenzent je za brojne ugledne međunarodne znanstvene časopise, urednik je specijalnog izdanja časopisa Fishes (Q1) te je recenzirala jedan sveučilišni udžbenik. Sudjelovala je na nizu znanstvenih konferencija te u raznovrsnim aktivnostima namijenjenim popularizaciji znanosti.

Njezina znanstvena djelatnost usmjerena je na procjenu onečišćenja vodenih sustava metalima, izučavanje izloženosti i praćenje učinaka metala na morske, estuarne i slatkovodne organizme te istraživanje unutarstanične sudbine metala i staničnog metaloma školjkaša, s posebnim naglaskom na prepoznavanje promjena u unutarstaničnoj specijaciji metala kod povećane okolišne izloženosti.

INFORMACIJE O MENTORU

Dr. sc. Saša Kazazić (<https://www.irb.hr/Ljudi/Sasa-Kazazic>) doktorirao je 2003. godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, smjer kemija, s disertacijom „Nastanak jednostruko nabijenih kompleksa metala u plinskoj fazi“. Poslijedoktorsko usavršavanje proveo je u grupi prof. Alana G. M

arshalla na National High Magnetic Field Laboratory, Tallahassee, SAD (2004.–2006.), gdje je stekao dragocjeno iskustvo u razvoju i primjeni tehnike izmjene vodik/deuterij (HDX-MS) u strukturnoj analizi proteina. Po povratku u Hrvatsku nastavio je rad na Institutu Ruđer Bošković, gdje je postupno napredovao kroz znanstvena zvanja te od 2018. djeluje kao viši znanstveni suradnik i voditelj Laboratorija za masenu spektrometriju i funkcionalnu proteomiku pri Zavodu za fizičku kemiju. Njegova istraživanja usmjerena su na razvoj i primjenu metoda masene spektrometrije u proučavanju proteinskih interakcija i konformacijske dinamike proteina. Autor je dvaju američkih patenata u području razvoja algoritama i računalnih aplikacija za obradu eksperimentalnih podataka dobivenih spektrometrijom masa visokog razlučivanja. Vodio je EU projekt RAPTOVAX (2019.–2022.) usmjeren na razvoj bioloških platformi za nova cjepiva, a sudjelovao je i u više domaćih i međunarodnih projekata (FIAcS, PSPE, InnoMol, NanoRec). Objavio je više od 40 znanstvenih radova u međunarodnim časopisima, među kojima u mSystems, Frontiers in Immunology, Journal of Biomolecular Structure and Dynamics i Enzyme and Microbial Technology. Održao je niz pozvanih predavanja na međunarodnim znanstvenim skupovima te sudjeluje kao recenzent u uglednim časopisima. Tijekom dosadašnjeg rada intenzivno je surađivao s istraživačima u inozemnim istraživačkim centrima, uključujući National High Magnetic Field Laboratory (SAD), University of Texas Medical Branch (Galveston, SAD), Polish Academy of Sciences (Varšava, Poljska), Proteome Center Laboratory, University of Tübingen (Njemačka), te brojnim u domaćim institucijama. Suradnje s farmaceutskom industrijom uključuju i partnerstva s GlaxoSmithKline Hrvatska. Aktivno sudjeluje u doktorskoj nastavi na Sveučilištu u Zagrebu i Sveučilištu u Splitu (predavač iz područja masene spektrometrije, moderne molekulske spektroskopije i spektroskopskih metoda analize). Član je Hrvatskog kemijskog društva i Američkog društva za spektrometriju masa.

Bioakumulacija metala, biomarkerski odgovori i biomolekule koje vežu metale u probavnoj žlijezdi školjkaša *Unio crassus* kao pokazatelji onečišćenja slatkovodnih ekosustava

Zoran Kiralj

Institut Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, 10 000 Zagreb, Hrvatska

U ovom istraživanju ispitan je utjecaj povijesnog industrijskog onečišćenja metal(oid)ima na kakvoću vode, sedimenta te bioakumulaciju metal(oid)a i razine biomarkera u slatkovodnom školjkašu *Unio crassus* u krškoj rijeci Mrežnici. Povišene koncentracije Ag, Cs, Fe, Pb, Se, Sn i Zn u vodi i sedimentu odrazile su se na značajniju bioakumulaciju u probavnoj žlijezdi školjkaša na povijesno onečišćenoj postaji. Povećane aktivnosti katalaze i glutation-S-transferaze, uz više razine malondialdehida te sniženje glutationa jasno ukazuju na prisutnost oksidativnog stresa i staničnih oštećenja u školjkašima na onečišćenoj postaji. Primjenom različitih kromatografskih tehnika i tehnike spektrometrije masa omogućena je identifikaciju potencijalnih citosolskih biomolekula uključenih u vezanje metala, pri čemu rezultati upućuju na moguću ulogu feritina u regulaciji Fe, različitih metalotioneinskih izoformi u vezanju Cu, Zn i Cd te superoksidne dismutaze i ugljične anhidraze u vezanju Cu i Zn. Cjelokupno istraživanje naglašava složenost mehanizama akumulacije i detoksikacije metal(oid)a u školjkašima te ističe nužnost dugoročnog praćenja ovakvih ekosustava.

(222 stranica, 38 slika, 26 tablica, 369 literaturnih navoda, jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: onečišćenje metalima, slatkovodni školjkaši, bioakumulacija, biomarkeri, citosolske biomolekule, tekućinska kromatografija, spektrometrija masa

Mentori: dr.sc. Dušica Ivanković, viša znanstvena suradnica; dr.sc. Saša Kazazić, viši znanstveni suradnik

Ocjenjivači: prof. dr. sc. Jasna Lajtner; nasl. doc. dr. sc. Željka Fiket; viša znanstvena suradnica; dr. sc. Zorana Kljaković Gašpić, znanstvena savjetnica u trajnom zvanju

University of Zagreb

Doctoral thesis

Faculty of Science

Department of Biology

Metal bioaccumulation, biomarker responses and metal-binding biomolecules in the digestive gland of the mussel *Unio crassus* as indicators of freshwater ecosystem contamination

Zoran Kiralj

Institut Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, 10 000 Zagreb, Hrvatska

This study investigated the impact of historical industrial metal(loid) pollution on water and sediment quality, as well as on metal(loid) bioaccumulation and biomarker responses in the freshwater mussel *Unio crassus* in the karstic Mrežnica River. Elevated concentrations of Ag, Cs, Fe, Pb, Se, Sn and Zn in water and sediment were reflected in a higher bioaccumulation in the mussel digestive gland at the historically contaminated site. Increased activities of catalase and glutathione-S-transferase, together with higher levels of malondialdehyde and depleted glutathione, clearly indicate the presence of oxidative stress and cellular damage in mussels from the contaminated site. The application of various chromatographic techniques and mass spectrometry enabled the identification of potential cytosolic biomolecules involved in metal binding, with results suggesting a possible role of ferritin in Fe regulation, different metallothionein isoforms in Cu, Zn and Cd binding, and superoxide dismutase and carbonic anhydrase in Cu and Zn binding. Overall, the study highlights the complexity of metal(loid) accumulation and detoxification mechanisms in mussels and emphasizes the need for long-term monitoring of such ecosystems.

(222 pages, 38 figures, 26 tables, 369 references, original in Croatian)

Keywords: metal contamination, freshwater mussels, bioaccumulation, biomarkers, cytosolic biomolecules, liquid chromatography, mass spectrometry

Supervisors: Dušica Ivanković, PhD, Senior Scientific Associate; Saša Kazazić, PhD, Senior Scientific Associate

Reviewers: Full Prof. Jasna Lajtner, PhD; Asst. Prof. Željka Fiket, PhD, Senior Scientific Associate; Zorana Kljaković Gašpić, PhD, Permanent Scientific Advisor

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Ciljevi i svrha istraživanja.....	3
1.2. Hipoteze istraživanja.....	4
2. LITERATURNI PREGLED	5
2.1. Distribucija i sudbina metala u vodenim ekosustavima.....	5
2.2. Krška rijeka Mrežnica	7
2.3. Akumulacija i sudbina metal(oid)a u vodenim organizmima	9
2.4. Bioindikatorski organizam	11
2.4.1. Obična lisanka.....	13
2.4.2. Probavna žlijezda kao ciljni organ	16
2.5. Biomarkeri.....	17
2.5.1. Biomarkeri izloženosti metalima – metalotioneini (MT).....	19
2.5.2. Biomarker općeg stresa – ukupni proteini (TP).....	20
2.5.3. Biomarker antioksidacijskog kapaciteta – katalaza (CAT), ukupni glutathion (GSH) i glutathion-S-transferaza (GST).....	21
2.5.4. Biomarker oksidacijskog stresa – malondialdehid (MDA)	24
2.5.5. Biomarker izloženosti organskim onečišćivačima i metalima – acetilkolinesteraza (AChE)	25
2.6. Metalomika.....	26
2.6.1. Vezani sustav tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) i spektrometrije masa s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS)	28
2.6.1.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s isključenjem po veličini (SE-HPLC).....	29
2.6.1.2. Ionsko izmjenjivačke kromatografije	30
2.6.2. Analiza biomolekula koje vežu metal(oid)e primjenom tehnika spektrometrije masa	31
2.6.2.1. Matricom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom (MALDI)	32
2.6.3. Dosadašnja istraživanja	33
3. MATERIJALI I METODE	36
3.1. Područje i vrijeme istraživanja	36
3.2. Prikupljanje i obrada uzoraka	37
3.2.1. Uzorkovanje vode i priprema uzoraka za analizu	37
3.2.2. Uzorkovanje sedimenta	38
3.2.3. Uzorkovanje školjkaša	38
3.2.4. Homogenizacija probavnih žlijezdi školjkaša za analizu sadržaja metal(oid)a.....	38
3.2.5. Razgradnja homogenata i citosola probavne žlijezde	39
3.3. Mjerenje metal(oid)a u površinskoj vodi, sedimentu i probavnoj žlijezdi školjkaša	39

3.4. Određivanje koncentracije staničnih biomarkera	43
3.4.1. Obrada probavne žlijezde	43
3.4.2. Mjerenje MT	44
3.4.3. Analiza TP	45
3.4.4. Analiza CAT	45
3.4.5. Analiza GSH	46
3.4.6. Analiza GST	46
3.4.7. Analiza MDA.....	47
3.4.8. Analiza AChE	47
3.5. Analiza raspodjele metala među citosolskim biomolekulama iz probavne žlijezde školjkaša pomoću HPLC-ICP-MS	48
3.5.1. Izrada baždarnе krivulje za SE ₂₀₀ kromatografsku kolonu.....	51
3.6. Analiza odabranih citosolskih biomolekula iz probavne žlijezde školjkaša pomoću dvodimenzionalnog HPLC razdvajanja i tehnika spektrometrije masa.....	52
3.6.1. Dvodimenzionalno AEX–SE ₂₀₀ –HPLC razdvajanje.....	52
3.6.1.1. Prva dimenzija – razdvajanje citosolskih molekula prema negativnom naboju pomoću AEX-HPLC-a.....	52
3.6.1.2. Druga dimenzija – razdvajanje odabranih AEX–frakcija po veličini pomoću SE ₂₀₀ –HPLC-a	53
3.6.2. Dvodimenzionalno SE ₇₅ –AEX-HPLC razdvajanje	53
3.6.2.1. Prva dimenzija – razdvajanje molekula po veličini pomoću SE ₇₅ –HPLC-a ...	53
3.6.2.2. Druga dimenzija –razdvajanje odabranih SE ₇₅ –frakcija prema naboju pomoću AEX–HPLC-a.....	54
3.6.3. MALDI-TOF MS analiza odabranih frakcija dobivenih razdvajanjem citosola pomoću dvodimenzionalnog HPLC-a	54
3.7. Analiza podataka	55
4. REZULTATI.....	56
4.1. Koncentracije metal(oid)a u vodi i sedimentu.....	56
4.1.1. Koncentracije otopljenih metal(oid)a u vodi	56
4.1.2. Koncentracije partikulatnih metal(oid)a u vodi	59
4.1.3. Koncentracije metal(oid)a u sedimentu.....	62
4.2. Biometrijski pokazatelji i koncentracije bioakumuliranih metal(oid)a u probavnoj žlijezdi školjkaša	63
4.2.1. Biometrija školjkaša.....	63
4.2.2. Koncentracije metal(oid)a u probavnoj žlijezdi.....	65
4.2.2.1. Ukupne koncentracije elemenata	65
4.2.2.2. Citosolske koncentracije elemenata	71
4.2.2.3. Korelacijska analiza.....	76
4.3. Biomarkerski odgovori	79

4.3.1. Koncentracije metalotioneina	79
4.3.2. Koncentracije ukupnih proteina u citosolskoj frakciji probavne žlijezde	80
4.3.3. Aktivnost katalaze	80
4.3.4. Koncentracije ukupnog glutaciona	81
4.3.5. Aktivnost glutathion S transferaze	82
4.3.6. Koncentracije malondialdehida	83
4.3.7. Aktivnost acetilkolinesteraze	84
4.4. Raspodjela odabranih metal(oid)a između citosolskih biomolekula primjenom HPLC–ICP–MS–a	85
4.4.1. Raspodjela odabranih metal(oid)a između citosolskih biomolekula različite molekulske mase primjenom SE ₂₀₀ –HPLC–ICP–MS–a	85
4.4.1.1. SE ₂₀₀ –HPLC–ICP–MS profili elemenata koji su predominantno vezani za VMM biomolekule – Fe i Mo	87
4.4.1.2. SE ₂₀₀ –HPLC–ICP–MS profili elemenata koji su podjednako vezani za VMM i SMM biomolekule – Co, Mn, Zn, Bi i Tl	89
4.4.1.3. SE ₂₀₀ –HPLC–ICP–MS profili elemenata koji su predominantno vezani za NMM biomolekule – Cu, Ag, Cd i Pb	93
4.4.1.4. SE ₂₀₀ –HPLC–ICP–MS profili elemenata koji su predominantno vezani za VNMM biomolekule – Se i As	97
4.4.2. Raspodjela odabranih metal(oid)a između citosolskih biomolekula različitog ukupnog naboja primjenom ionsko–izmijenjivačkih kromatografskih tehnika (IEX) u kombinaciji s ICP–MS–om	99
4.4.2.1. AEX–ICP–MS profili metal(oid)a vezanih samo za AEX–kolonu – Mo, Bi i Pb	101
4.4.2.2. HPLC–ICP–MS profili metala vezani za AEX i CEX–kolonu te udjelom metala vezanog za AEX kolonu 95 – 99% – Fe, Zn, Ag i Cd	104
4.4.2.3. HPLC–ICP–MS profili metala vezani za AEX i CEX–kolonu te udjelom metala vezanog za AEX kolonu 60 – 95% – Co, Mn, Se i As	107
4.4.2.4. HPLC–ICP–MS profili metala vezani za AEX i CEX–kolonu te udjelom metala vezanog za AEX kolonu < 60 % – Cu, Cs i Tl	111
4.5. Analiza odabranih citosolskih biomolekula u probavnoj žlijezdi školjkaša primjenom dvodimenzionalne tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) i tehnike spektrometrije masa MALDI–TOF MS	114
4.5.1. Analiza citosolskih biomolekula koje vežu Fe	114
4.5.1.1. SE ₂₀₀ početni profil Fe	114
4.5.1.2. Prvi korak razdvajanja citosolskih Fe–MBB-a: AEX profil Fe	116
4.5.1.2. Drugi korak razdvajanja: SE ₂₀₀ –HPLC–ICP–MS analiza skupljenih AEX Fe–MBB frakcija	117
4.5.1.3. MALDI–TOF MS karakterizacija SE–AEX–Fe–MBB frakcija	118
4.5.2. Analiza MT i drugih citosolskih biomolekule koje vežu Zn, Cu, Cd, Ag i Pb	118

4.5.2.1. Prvi korak razdvajanja: SE ₇₅ –HPLC–ICP–MS analiza biomolekula koje vežu Zn, Cu, Cd, Ag i Pb.....	119
4.5.2.2. Drugi korak razdvajanja: AEX–HPLC–ICP–MS analiza skupljenih SE ₇₅ –MT–metal frakcija	121
4.5.2.3. MALDI–TOF MS karakterizacija AEX–SE ₇₅ –MT–metal frakcija	122
5. RASPRAVA	125
5.1. Karakterizacija onečišćenja rijeke Mrežnice na istraživanom području	125
5.1.1. Koncentracije metal(oid)a u otopljenoj frakciji vode rijeke Mrežnice	126
5.1.2. Koncentracije metal(oid)a u partikulatnoj frakciji vode rijeke Mrežnice	128
5.1.3. Koncentracije metal(oid)a u sedimentu rijeke Mrežnice	129
5.2. Akumulacija metal(oid)a u probavnoj žlijezdi školjkaša	131
5.2.1. Prostorna varijabilnost i odnos s koncentracijama metal(oid)a u okolišu	131
5.2.2. Sezonske razlike u ukupnim koncentracijama metal(oid)a	135
5.2.3. Koncentracije metal(oid)a u topljivoj, citosolskoj frakciji, tkiva probavne žlijezde: procjena zastupljenosti u ukupnom tkivnom metalu	136
5.2. Biomarkerski odgovori	138
5.2.1. Promjene biomarkera izloženosti metalima (MT) i općeg stresa (TP)	139
5.2.2. Promjene biomarkera antioksidacijskog kapaciteta (katalaza, CAT; glutation, GSH), detoksikacije ksenobiotika (glutathion–S–transferaza, GST) i oksidativnog oštećenja (malondialdehid, MDA).....	141
5.2.2.1. Aktivnost CAT: biomarker antioksidacijskog kapaciteta.....	142
5.2.2.2. Koncentracija GSH: biomarker antioksidacijskog kapaciteta	142
5.2.2.3. Aktivnost GST: biomarker detoksikacije ksenobiotika	143
5.2.2.4. Koncentracija MDA: biomarker oksidativnog oštećenja	143
5.2.3. Promjene biomarkera neurotoksičnosti (AChE)	144
5.2.4. Sezona kao zajednički čimbenik koji utječe na odgovore biomarkera	145
5.3. Karakterizacija citosolskih biomolekula koje vežu metal(oid)e (MBB) u probavnoj žlijezdi školjkaša <i>U. crassus</i>	147
5.3.1. Inicijalna karakterizacija i obrasci vezanja za citosolske MBB-e pri različitim razinama izloženosti/bioakumulacije.....	147
5.3.2. Karakterizacija temeljena na ukupnom naboju, odnosno na kiselim/bazičnim svojstvima biomolekula koje vežu metal(oid)e	155
5.4. Karakterizacija feritina: izoferitini i identifikacija feritinskih podjedinica MALDI–TOF MS-om	164
5.5. Karakterizacija MT izoformi i ostalih MBB koji vežu Cu i Zn: dvodimenzionalno razdvajanje i identifikacija pomoću MALDI-TOF MS-a	167
6. ZAKLJUČCI	170
7. LITERATURA	173
8. PRILOZI	207
9. ŽIVOTOPIS	219

1. UVOD

Onečišćenje vodenih ekosustava postaje sve ozbiljniji globalni problem, a metali zauzimaju ključno mjesto kao dugotrajni i toksični onečišćivači. Industrijske aktivnosti, rudarenje, poljoprivreda, komunalni otpad i promet glavni su izvori onečišćenja metalima u vodenim ekosustavima (Dragun i sur., 2022a; Gupta i Singh, 2011). Jednom uneseni u vodeni okoliš, metali se ne razgrađuju već samo mijenjaju kemijski oblik, zbog čega ostaju prisutni u sustavu, taložeći se u sedimentu ili akumulirajući u živim organizmima, često uzrokujući negativne ekološke posljedice (Namieśnik i Rabajczyk, 2010). Dinamika različitih oblika metala u vodenom okolišu je kompleksna, a sami čimbenici koji utječu na njihovu bioraspoloživost uključuju biologiju organizma (efikasnost asimilacije metala, strategije hranjenja, veličinu, dob i reproduktivni stadij), geokemiju metala (raspodjelu u vodi, sedimentima i suspendiranoj tvari te specijaciju metala) te fizikalno–kemijske uvjete poput temperature, saliniteta, pH, ionske snage, koncentracije otopljenog organskog ugljika i ukupnih suspendiranih tvari. Svi ti uvjeti značajno utječu na njihovu toksičnost (Chiarelli i Rocherri, 2014). Dakako, neki metali poput cinka, bakra i željeza, u organizmima obavljaju ključne biološke funkcije kao sastavni dijelovi enzimskih sustava, tzv. metaloproteina, uključujući prijenos elektrona, vezanje i transport kisika i sintezu važnih spojeva. Ipak, prekomjerne koncentracije ovih esencijalnih metala, kao i prisutnost neesencijalnih metala poput kadmija i olova, mogu poremetiti homeostazu i dovesti do toksičnih učinaka (Bibi i sur., 2023). Mehanizmi toksičnosti metala često uključuju njihovo vezanje na fiziološki važne biomolekule u stanicama, što može dovesti do njihove inaktivacije i oštećenja funkcionalnih sustava organizma (Zhou i sur., 2022). Zbog toga se u ekotoksikološkim istraživanjima često koriste bioindikatorski organizmi kako bi se procijenila razina metalnog onečišćenja i utvrdili učinci na vodene ekosustave.

Slatkovodni školjkaši pokazali su se korisnim bioindikatorima zbog nekoliko karakteristika: sesilnog načina života, dugog životnog vijeka i sposobnosti filtriranja velike količine vode, što ih čini idealnim pokazateljima onečišćenja vode i sedimenta metal(oid)ima kroz dulje vremensko razdoblje (Naimo, 1995). Dodatno, zbog specifične sposobnosti akumuliranja metala u puno višim koncentracijama u odnosu na one prisutne u okolišu, slatkovodni školjkaši se koriste u mnogim programima biomonitoringa (Khoma, 2019; Yoloğlu i sur., 2018). Posebno se ističe probavna žlijezda kao ključni organ za procjenu kvalitete okoliša, s obzirom na njenu važnu ulogu u detoksikaciji i skladištenju metala (Faggio i sur., 2018; Gupta i Singh, 2011). Zbog osjetljivosti probavne žlijezde na dugotrajnu izloženost onečišćenju, praćenje koncentracija metala u ovom organu pokazalo se učinkovitijim nego praćenje u cijelom

organizmu (Ivanković i sur., 2005; Regoli i sur., 1994). Međutim, dosadašnja istraživanja bioakumulacije metala u probavnoj žlijezdi školjkaša iz porodice Unionidae obuhvatila su samo ukupne koncentracije ograničenog broja elemenata (Falfushynska i sur., 2013, 2014; Khoma, 2019).

Nadalje, topljiva citosolska frakcija tkiva probavne žlijezde, koja sadrži različite metaloproteine i kompartmentalne vezikule, smatra se metabolički dostupnom i potencijalno toksičnom frakcijom metal(oid)a u tkivu (Amiard i sur., 2006; Naimo, 1995). Koncentracije metala u citosolu često su bolji pokazatelji stvarnog onečišćenja vode od ukupnih koncentracija metala (Langston i sur., 1998), iako metali u otopljenoj frakciji ponekad čine samo manji dio ukupnog postotka metala u tkivu. Samim time, analiza koncentracija metal(oid)a u ovoj frakciji može pružiti značajne informacije o potencijalnoj toksičnosti metala i biti važan dodatak analizi ukupnih koncentracija metala u tkivu.

Međutim, samo mjerenje koncentracija metala u organima školjkaša ne daje informacije o njihovim mogućim negativnim učincima na subcelularnoj razini, niti o zdravstvenom stanju organizma. Analizom različitih molekularnih i biokemijskih biomarkera uključenih u važne stanične procese, poput detoksikacije ili antioksidativne obrane, mogu se otkriti najraniji poremećaji u homeostazi izazvani izloženosti metalima (Regoli i sur., 2014). Multibiomarkerski pristup omogućuje precizniju procjenu bioloških odgovora organizama na onečišćenje i može služiti kao rani pokazatelj antropogenog utjecaja na organizme (Mijošek i sur., 2019). Iako je ovaj pristup opisan u znanstvenoj literaturi za neke slatkovodne školjkaše (Falfushynska i sur., 2009; Khoma, 2019; Yologlu i sur., 2018), podatci o vrsti *Unio crassus* Philipson, 1788 vrlo su oskudni.

Nadalje, razumijevanje ponašanja metala unutar stanice ključno je za toksikološke procjene, a razvoj područja metalomike omogućava dublje proučavanje bioloških procesa povezanih s metalima, uključujući vrste metalnih spojeva koji nastaju unutar stanica i tkiva (Haraguchi, 2004). U metalomičkim analizama, tehnike tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC), povezane sa spektrometrijom masa s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS), često se koriste kao prvi korak u analizi metalomike (Montes-Bayón i sur., 2003). Kromatografska tehnika s isključenjem po veličini (SE, engl. *Size Exclusion*, razdvajanje temeljeno na razlikama u molekulskim masama) primarna je tehnika koja se koristi za razdvajanje proteina na temelju molekulske mase, a omogućuje korištenje različitih eluenata te očuvanje biološke aktivnosti proteina čime se omogućava njihovo daljnje izučavanje (Szpunar

i Lobinski, 2002). Daljnja razdvajanja proteina najčešće uključuju ionsko–izmjenjivačke kromatografske tehnike (anionsku (AEX) i kationsku (CEX) ionsku izmjenu). Razdvajanje se temelji na stvaranju ionskih veza između nabijenih biomolekula i suprotno nabijenih skupina ionskog nosača u koloni (Jain i Jain, 2023). Kombinacija ovih HPLC tehnika s ICP–MS–om omogućuje dobivanje informacija o raspodjeli velikog broja metala među biomolekulama različitih masa i naboja (Dragun i sur., 2022b; Krasnići i sur., 2013; Krasnići i sur., 2019). U konačnici, karakterizacija i identifikacija biomolekula moguća je primjenom dodatnih metoda spektrometrije masa (na primjer, spektrometrija masa s analizatorom masa s vremenom leta (TOF MS) uz matricom potpomognutu desorpciju i ionizaciju laserskim zračenjem (MALDI)) (Krasnići i sur., 2019).

Povezivanje višedimenzionalnog pristupa razdvajanju biomolekula s naprednim tehnikama spektrometrije masa pokazalo se korisnim za identifikaciju biomolekula koje vežu metale u različitim organizmima (Dragun i sur., 2022b; Krasnići i sur., 2013; Krasnići i sur., 2019), što omogućava dublje razumijevanje njihovih funkcija i potencijalno toksičnih učinaka. Opsežna istraživanja molekula koje vežu metale relativno su rijetka na školjkašima (Ferrarello i sur., 2000; Hauser-Davis i sur., 2021; Stržak i sur., 2014), dok za vrstu *U. crassus* dosad nisu opisana u literaturi.

1.1. Ciljevi i svrha istraživanja

Osnovni cilj ovog istraživanja bio je razjasniti utjecaj povijesnog industrijskog onečišćenja na kakvoću vode, sedimenta te bioakumulaciju metal(oid)a i razine biomarkera u slatkovodnom školjkašu *U. crassus* Philipsson, 1788 u krškoj rijeci Mrežnici. Poseban naglasak stavljen je na razumijevanje unutarstanične sudbine metala te njihove raspodjele među različitim citosolskim biomolekulama u probavnoj žlijezdi. Istraživanje se odvijalo na području s niskom razinom antropogenih aktivnosti te području pod utjecajem povijesnog onečišćenja iz raznih industrija.

Ciljevi ovog istraživanja ostvareni su kroz sljedeće aktivnosti:

- određivanje koncentracija metal(oid)a u otopljenoj i partikulatnoj frakciji u vodi, sedimentu te ukupne i citosolske razine akumulacije metal(oid)a u probavnoj žlijezdi slatkovodnog školjkaša s referentne i onečišćene postaje korištenjem ICP-MS tehnike visoke razlučivosti (HR ICP-MS);

- primjena multibiomarkerskog pristupa, korištenjem probavne žlijezde školjkaša kao bioindikatorskog organa, koji je uključivao biomarkere izloženosti metalima (metalotioneini, MT), biomarkere općeg stresa (ukupni protein, TP), antioksidacijskog kapaciteta (katalaza, CAT; glutation, GSH; glutation-S-transferaza, GST), oksidacijskog stresa (malondialdehid, MDA) te biomarkere izloženosti organskim onečišćivalima (acetilkolinesteraza, AChE);
- definiranje raspodjela odabranih elemenata među citosolskim biomolekulama upotrebom kromatografskih tehnika s isključenjem po veličini i ionskom naboju (pozitivnom/negativnom) u probavnoj žlijezdi *U. crassus* te definiranje promjena u raspodjelama koje nastaju uslijed različite izloženosti metalima u riječnoj vodi primjenom vezanog sustava HPLC-ICP-MS;
- primjena dvodimenzionalnog razdvajanja citosolskih biomolekula koje vežu metale (SE, AEX) sa svrhom dodatnog pročišćavanja proteina od interesa u probavnoj žlijezdi *U. crassus* te konačna karakterizacija i identifikacija odabranih citosolskih biomolekula koje vežu metale primjenom tehnike spektrometrije masa (MALDI-TOF MS).

1.2. Hipoteze istraživanja

U skladu s ciljevima istraživanja, postavljene su sljedeće hipoteze istraživanja:

H1. Povijesno onečišćenje ostavlja dugotrajne posljedice u slatkovodnim ekosustavima.

H2. Probavna žlijezda školjkaša *U. crassus* prikladna je za otkrivanje povijesnog onečišćenja metalima.

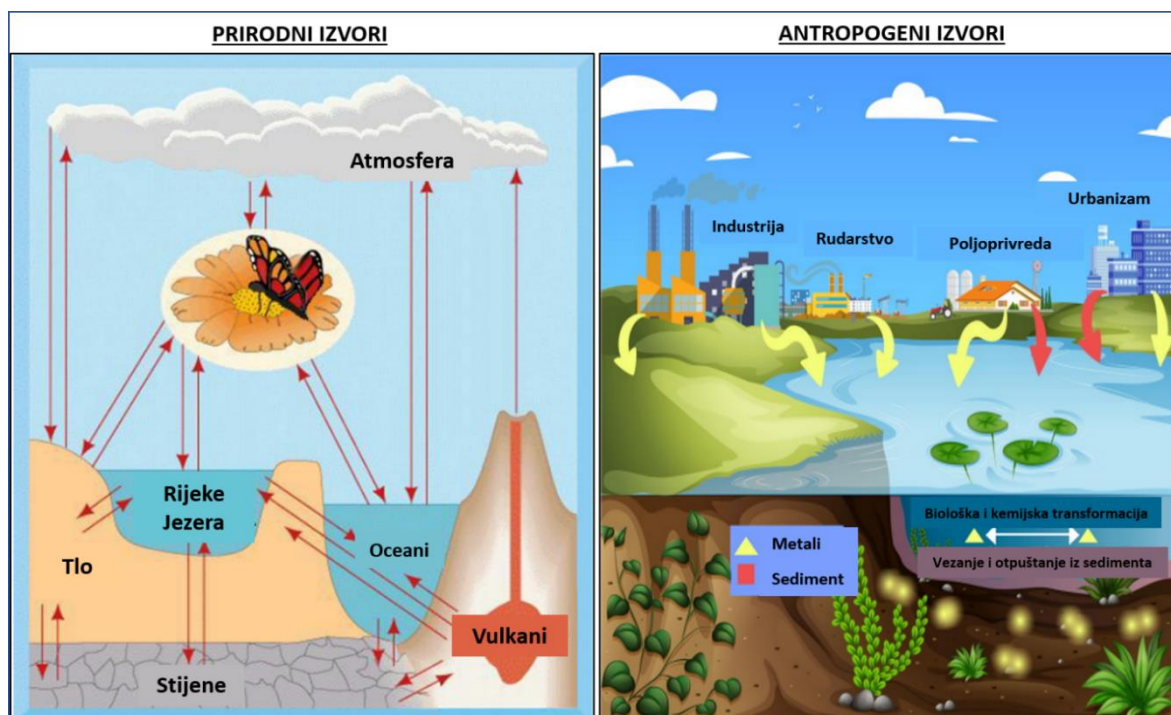
H3. Biomarkeri, bioakumulacija i unutarstanična raspodjela metala u probavnoj žlijezdi *U. crassus* odražavaju izloženost metalima.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Distribucija i sudbina metala u vodenim ekosustavima

Metali i metaloidi postali su značajan globalni problem u vodenim ekosustavima zbog ubrzane industrijalizacije, urbanizacije i sve veće primjene kemikalija u industriji. Iako prirodno ulaze u okoliš putem erozije tla, vulkanskih erupcija i biogenih procesa, najveći doprinos njihovoj prisutnosti u vodenom ekosustavu dolazi od antropogenih aktivnosti poput rudarenja, primjene gnojiva, herbicida i pesticida, kao i navodnjavanja poljoprivrednih površina industrijskim otpadnim vodama (Slika 1.; Aziz i sur., 2023).

Za razliku od organskih onečišćivala, metali nisu biorazgradivi te se nakon unošenja u vodeni ekosustav, tamo i zadržavaju, raspodjeljuju kroz stupac vode i akumuliraju u sedimentu i živim organizmima (Cukrov i sur., 2011). Neki metal(oid)i su esencijalni nutrijenti u tragovima, potrebni za različite biokemijske i fiziološke funkcije, a organizmi ih akumuliraju putem zraka, vode i hrane. Međutim, povišene razine ovih esencijalnih, kao i neesencijalnih elemenata poput As, Cd i Pb mogu biti izuzetno štetne za žive organizme (Bibi i sur., 2023).



Slika 1. Izvori metal(oid)a u vodenom ekosustavu. Preuzeto i uređeno iz Moses i Pidwirny (2011) i Mitra i sur. (2022).

Toksičnost metala uvelike ovisi o kemijskom obliku u kojem su prisutni u vodi: slobodni ioni (najtoksičniji oblik za žive organizme), jednostavni anorganski i organski spojevi, te oblici

adsorbirani na čvrstim i koloidnim česticama (Manahan, 2003). U kojem obliku će metal biti prisutan, ovisi o pH te prisutnosti brojnih liganada poput hidroksida, karbonata, klorida i huminske kiseline (Namiesnik i Rabajczyk, 2010). Metali se tradicionalno razvrstavaju u dvije frakcije: otopljenu frakciju koja prolazi kroz filter s veličinom pora od 0,45 μm , i partikulatnu frakciju koja se zadržava na filteru (tj. $> 0,45 \mu\text{m}$). Poznato je da Cu i Pb imaju visok afinitet prema partikulatnoj frakciji, pa ih je moguće ukloniti fizičkom separacijom (Choubert i sur., 2011). Suprotno tome, Ni i Zn dominiraju u otopljenoj frakciji, koja se obično sastoji od slobodnih metalnih iona te kompleksiranih metala i koloidnih suspenzija (Schijf i Zoll, 2011).

Koloidne čestice obično se ne talože u riječnim sustavima. Međutim, kada dosegnu odgovarajuću veličinu, i kada vodeni tok ima odgovarajući intenzitet te su prisutni određeni spojevi poput klorida i sulfata, takve čestice mogu formirati veće nakupine koje se potom talože u sedimentima (Hurley i sur., 2017). Sedimenti tako služe kao rezervoar ali i sekundarni izvor metal(oid)a. Adsorpcija, desorpcija i posljedične koncentracije metal(oid)a u sedimentima pod utjecajem su mnogih fizikalno-kemijskih faktora poput temperature, hidrodinamičkih i redoks uvjeta, sadržaja organskog materijala i veličine čestica (Zhao i sur., 2014). Važan faktor za biodostupnost metala u sedimentima je pH. Snižanjem pH povećava se kompeticija između metalnih i vodikovih iona za vezna mjesta u sedimentima, što može rezultirati otapanjem metalnih kompleksa i oslobađanjem slobodnih metalnih iona u vodeni stupac (Nowrouzi i sur., 2014). Samim time, povišene koncentracije specifično neesencijalnih elemenata u riječnim sedimentima mogu predstavljati ekološki rizik za bentičke organizme (Decena i sur., 2018).

Izuzetno je važno imati na umu da se metali uneseni u vodeni sustav prije većeg broja godina, iz tzv. povijesnih industrijskih izvora onečišćenja, i danas mogu detektirati u njegovim različitim sastavnicama. Stoga je ključno utvrditi opseg kontaminacije koju su pretrpjeli vodeni ekosustavi, posebice sedimenti riječnih korita (Hurley i sur., 2017). Isti autori istaknuli su da mnoga slivna područja slatkovodnih rijeka pokazuju visoke koncentracije metal(oid)a, iako nisu pod utjecajem intenzivnog urbanog ili industrijskog razvoja. Ovu pojavu su pripisali ispuštanjima s bivših industrijskih postaja ili remobilizaciji povijesno onečišćenih poplavnih područja i tala.

Upravo je zato od ključne važnosti sustavno pratiti koncentracije metal(oid)a u područjima koja su u prošlosti bila pod teretom onečišćenja kroz duže vremensko razdoblje. Od jednakog je značaja pratiti te koncentracije u različitim komponentama vodenog okoliša – od vode i sedimenta do bioakumulacije u organizmima – kako bi se dobile precizne informacije o

bioraspoloživim koncentracijama metala, a time i o njihovim potencijalnim toksičnim učincima s mogućim dalekosežnim posljedicama, uključujući rizik za ljude putem lanca ishrane. Kao primjer povijesno onečišćenog slatkovodnog sustava bit će prikazana krška rijeka Mrežnica u Hrvatskoj.

2.2. Krška rijeka Mrežnica

Krška područja obiluju prirodnim resursima te donose brojne vrijednosti i koristi, od opskrbe slatkom vodom za ljudsku potrošnju, očuvanja bioraznolikosti površinskih i podzemnih staništa, do krajolika s visokim rekreacijskim i kulturnim značajem te tala koja čine osnovu za poljoprivrednu proizvodnju (Bonacci i sur., 2009). Krški krajolici, vodonosnici i špilje pružaju staništa rijetkim i endemskim vrstama koje su ponekad ograničene na vrlo mala područja, zbog čega su osobito osjetljive na vanjske utjecaje (Furey i sur., 2010). Krš obuhvaća ne samo površinske oblike već i podzemlje, a pukotinsko protjecanje voda i podzemne šupljine su temeljne specifičnosti krša (Roglić, 2004).

Prema Aureli (2010), podzemne vode u krškim područjima predstavljaju najvažniji i najsigurniji izvor pitke vode. S obzirom da raznoliki krški oblici prekrivaju više od polovice Hrvatske, većina stanovnika opskrbljuje se vodom upravo iz krških vodonosnika (Matas, 2009). No unatoč toj ključnoj ulozi, krški vodonosnici izloženi su različitim onečišćivalima na koje su izrazito osjetljivi zbog svoje kompleksne hidrogeološke strukture (Bakalowicz, 2005).

Rijeka Mrežnica je krška rijeka crnomorskog sliva koja je sastavni dio ekološke mjere Europske unije NATURA 2000, koja obuhvaća ekološki najznačajnija područja (Čerkez, 2021). Teče sjevernim dijelom dinarskog prostora Hrvatske, u zoni tzv. plitkog krša koju obilježavaju mnogi ponori, krška vrela i kanjoni. Mrežnica izvire oko 10 kilometara zapadno od grada Slunja te se ulijeva u Koranu u blizini grada Karlovca, koja se potom nakon samo nekoliko kilometara, ulijeva u Kupu (Slika 2, Maradin 2007).



Slika 2. Poriječje Mrežnice. Slika preuzeta iz Maradin (2007).

Industrijska proizvodnja, posebno u tekstilnom sektoru, ostavila je dubok trag na okolišu rijeke Mrežnice (Slika 3). Povijesni primjer je nekadašnja Pamučna industrija Duga Resa, koja je svojim radom, unatoč postojanju dozvola, zagađivala rijeku od 1884. do početka 2000-ih. Ispuštanje štetnih tvari poput ugljene troske i pepela direktno u rijeku, utjecali su na povećano odstupanje velikog broja parametara od dopuštenih vrijednosti (pH, kemijska potrošnja kisika, ukupne otopljene krutine, itd.) (Frančišković-Bilinski, 2008). Istraživanje Frančišković-Bilinski i sur. (2017) također ukazuje na dugotrajne posljedice industrijske aktivnosti na sedimente rijeke Mrežnice. Visoka magnetska susceptibilnost sedimenata u blizini izvora onečišćenja ukazuje na antropogeno podrijetlo, primarno industrijski otpad. Nadalje, industrijska zona Karlovca izgrađena je s obje strane Mrežnice, blizu njezina ušća u rijeku Koranu, a neka industrijska postrojenja datiraju još iz 1930-ih. Iako su prije otprilike deset godina mnogi od tih pogona priključeni na postrojenje za pročišćavanje otpadnih voda koje svoje ispuštanje usmjerava u rijeku Kupu, mogućnost povijesnog onečišćenja i dalje postoji (Dragun i sur., 2022a). Svi ovi dugogodišnji povijesni događaji i danas predstavljaju značajnu prijetnju za biološku raznolikost i kvalitetu vode rijeke Mrežnice koja je vrijedna pažnje i detaljnog istraživanja.



Slika 3. Bijela mrlja na rijeci Mrežnici. Slika preuzeta iz Izvor 1 (2012).

2.3. Akumulacija i sudbina metal(oid)a u vodenim organizmima

Vodeni ekosustavi prirodno su izloženi raznim metal(oid)ima čiji su kemijski oblici i koncentracije pod utjecajem prirodnih geokemijskih procesa i antropogenih aktivnosti. Ti metal(oid)i uključuju i esencijalne elemente potrebne za održavanje bioloških procesa i neesencijalne elemente bez poznate biološke funkcije. Brzina apsorpcije metal(oid)a kod vodenih organizama uvelike ovisi o unesenoj količini te o broju prisutnih metal(oid)a u hrani ili plijenu koji su konzumirani (Sharma i sur., 2024). Bioakumulacija je proces koji opisuje povećanje koncentracije ksenobiotika u organizmima tijekom vremena u odnosu na one prisutne u okolišu. Metal(oid)i se obično bioakumuliraju ako njihova količina unesena putem vode i kontaminirane hrane premašuje količinu potrebnu za metaboličke procese i onu koju može obraditi obrambeni sustav organizma (Jeong i sur., 2023).

Općenito, stanični unos metal(oid)a odvija se ili membranskim transportom (npr. kroz kanale i transportere) ili endocitozom, i to putem procesa fagocitoze ili pinocitoze. Otopljeni metal(oid)i se mogu unijeti iz okoliša preko izloženih površina tijela, kao što su škrge, dok se partikulatni metali najčešće unose putem prehrane. Sam unos se razlikuje između kralježnjaka i beskralježnjaka. Beskralježnjaci imaju sposobnost za izvanstaničnu i unutarstaničnu probavu, dok se kralježnjaci primarno oslanjaju na izvanstaničnu probavu (DeForest i Meyer, 2015). Nakon endocitoze, metali vezani za čestice mogu se razgraditi, a metal preraspodijeliti na druge

unutarstanične ligande. Kod kralježnjaka, metalni kompleksi moraju se razgraditi na jednostavnije strukture u crijevnom lumenu prije nego što se mogu apsorbirati putem različitih membranski ovisnih transportera (Wang, 2013).

Daljnja sudbina metal(oid)a ovisi o specifičnoj fiziologiji organizma, odnosno o tome hoće li se metal koristiti za esencijalnu metaboličku funkciju, izlučiti, pohraniti u tijelu ili će se vezati za "pogrešne" biomolekule i time izazvati toksični učinak (Rainbow, 2002). Budući da se većina unesenih metal(oid)a veže za različite stanične ligande, posebno je važna topljiva citosolska frakcija tkiva. Ona sadrži različite metaloproteine i vezikule te se smatra metabolički dostupnom, a time i potencijalno toksičnom frakcijom metal(oid)a (Amiard i sur., 2006; Naimo, 1995). Sukladno tome, analiza koncentracija metal(oid)a u citosolskoj frakciji tkiva može pružiti značajne informacije o potencijalnoj toksičnosti metala te poslužiti kao važna dopuna analizi ukupnog sadržaja metala u tkivu. Nadalje, unos esencijalnih metala, poput Ca, Cu, Fe i Zn, često uključuje specifične puteve i ključan je za ispunjavanje metaboličkih potreba. Na primjer, kalcijevi kanali i specifični membranski nosači za Cu i Fe važni su za unos ovih elemenata u vodenim organizmima (Wright, 1995). Neesencijalni elementi, ili toksični metali, poput Cd i Hg, nemaju specifične mehanizme za unos i vjeruje se da koriste postojeće puteve za esencijalne elemente. Kadmij, primjerice, može proći kroz membrane u ionskom obliku te je dokazano da se unosi kroz Ca kanale u stanice hipofize i hepatocita sisavaca, kao i kroz škrge riba i mekušaca (Choong i sur., 2014). Bitno je napomenuti da većina metal(oid)a pokazuje afinitet vezanja prema sumporu i dušiku. Budući da su proteini građeni od aminokiselina, od kojih mnoge sadrže sumpor i/ili dušik, unutar stanica postoji obilje potencijalnih mjesta za vezivanje metal(oid)a. Ta činjenica čini sve metal(oid)e potencijalno toksičnima, jer se mogu vezati za razne proteine ili druge molekule, ometajući njihovu normalnu metaboličku funkciju (Permyakov, 2021). Ulaskom u organizam, metal(oid) postaje "metabolički dostupan" sve dok ga organizam ne izluči ili dok se ne veže za biomolekulu visokog afiniteta, iz koje je malo vjerojatno da će se osloboditi. Na taj način metal(oid) postaje detoksificiran, pri čemu detoksifikacija često uključuje vezivanje za proteine poput metalotioneina (MT) ili za netopive granule (Mason i Jenkins, 1995). No, unutarstanična prisutnost viška metala u nedetoksificiranom obliku može uzrokovati mnoge štetne učinke, uključujući povećanu proizvodnju reaktivnih kisikovih vrsta (ROS), koje predstavljaju značajnu prijetnju staničnom integritetu uzrokujući oštećenja proteina, DNA i polinezasićenih masnih kiselina u staničnim membranama organizama (Ercal i sur., 2001; Leonard i sur., 2004). Stoga je integrirani pristup koji uključuje praćenje akumulacije metala, analizu biomarkerskih odgovora te proučavanje

unutarstanične sudbine metala, ključan za razumijevanje potencijalno štetnih učinaka metal(oid)a na različite vodene organizme.

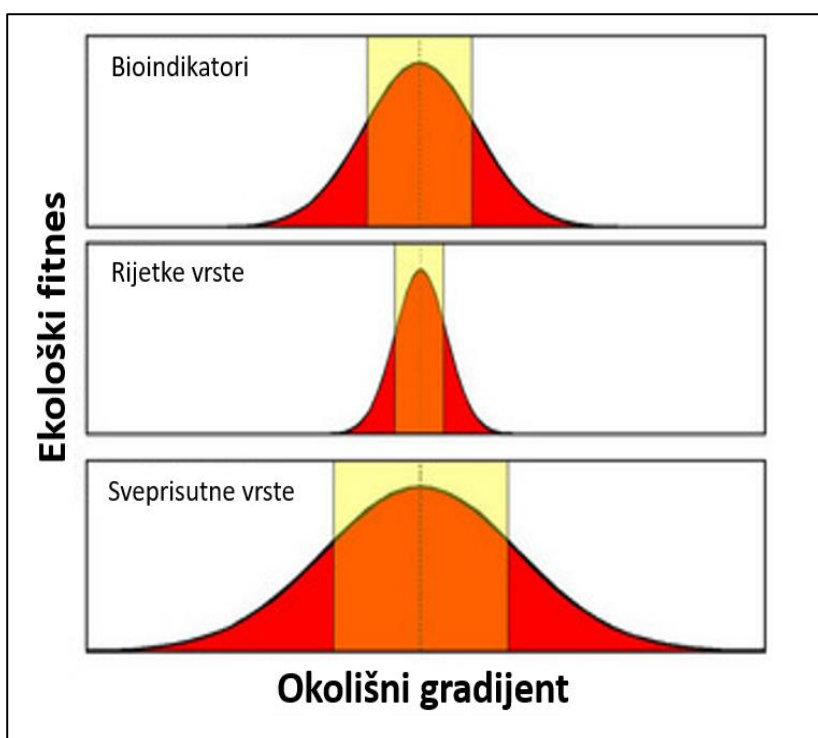
2.4. Bioindikatorski organizam

Bioindikatori uključuju biološke procese, vrste ili zajednice koje se koriste za procjenu kvalitete okoliša i njegovih promjena tijekom vremena, a odabir i upotreba odgovarajućih bioindikatorskih organizama omogućuje uspostavljanje jasne veze između koncentracija onečišćivala prisutnih u okolišu i njihovih fizioloških učinaka na organizme, kao i procjenu rizika koji onečišćivala mogu predstavljati za cjelokupni ekosustav (Bellinger i Sigee, 2010). Promjene u okolišu mogu se pripisati antropogenim aktivnostima (npr. industrijsko onečišćenje, urbanizam) ili prirodnim stresorima (npr. suša, kasni proljetni mraz), no sama se istraživanja bioindikatora primarno fokusiraju na antropogene stresore. Široka primjena i razvoj bioindikatora započeli su 1960-ih godina. Tijekom vremena, proširen je njihov raspon kako bi se olakšalo proučavanje svih vrsta okoliša (vodenih i kopnenih) koristeći sve glavne taksonomske skupine (Holt i Miller, 2011).

Međutim, nisu svi biološki procesi, vrste ili zajednice uspješni bioindikatori. Fizički, kemijski i biološki faktori (npr. supstrat, svjetlost, temperatura, kompeticija) variraju među okolišima. Populacije razvijaju strategije za maksimiziranje rasta i reprodukcije unutar specifičnog raspona okolišnih čimbenika tijekom vremena. Izvan optimalnih okolišnih uvjeta ili tolerancijskog raspona pojedinca, njegova fiziologija i/ili ponašanje mogu biti negativno pogođeni, smanjujući njegovu ukupnu sposobnost preživljavanja. Smanjena sposobnost može posljedično poremetiti dinamiku populacije i izmijeniti zajednicu u cjelini (Carignan i Villard, 2002).

Učinkoviti bioindikatori su vrste koje imaju umjerenu toleranciju prema okolišnim varijacijama. Rijetke vrste s uskim tolerancijama često su preosjetljive na promjene ili previše rijetke da bi odražavale opći biotski odgovor. Isto tako, sveprisutne vrste sa širokim tolerancijama manje su osjetljive na promjene koje bi mogle poremetiti ostatak zajednice (Slika 4; Holt i Miller, 2011). Općenito, pri odabiru bioindikatorskog organizma važno je da organizam bude: taksonomski lako prepoznatljiv i dobro poznat, ima široku rasprostranjenost i visoku brojnost, jednostavan za prikupljanje, sjedilačkog načina života te dugog životnog ciklusa (Bellinger i Sigee, 2010).

Najčešće skupine organizama koje se u slatkovodnim ekosustavima koriste kao bioindikatori uključuju makrofite, plankton, ribe, vodozemce i bentičke makrobeskralježnjake. Bentički makrobeskralježnjaci su organizmi koji žive na dnu vodenih ekosustava, vidljivi su golim okom i zadržavaju se na situ veličine oka 0,5 mm. Zajednica bentičkih organizama obično se sastoji od tulara, vodencvjetova, vretenaca, obalčara, račića, grinja, puževa, školjkaša, pijavica te brojnih drugih organizama (Parmar i sur., 2016). Široko su rasprostranjeni i nalaze se u velikim rijekama, malim potocima, ribnjacima, močvarama i jezerima, te žive na različitim podlogama, uključujući mulj, pijesak, šljunak, oblutke, stijene ili kamenje (Mir i sur., 2021).



Slika 4. Usporedba okolišnih tolerancija između bioindikatora, rijetkih i sveprisutnih vrsta. Crvena područja predstavljaju dijelove okolišnog gradijenta (npr. dostupnost svjetlosti, razine dušika) gdje pojedinac, vrsta ili zajednica pokazuje prilagodljivost ili brojnost veću od nule. Isprekidana linija označava najbolju izvedbu vrste duž određenog okolišnog gradijenta, dok žuti okviri obuhvaćaju optimalni raspon ili toleranciju. Preuzeto i uređeno iz Holt i Miller (2011).

Bentički makrobeskralježnjaci prisutni su tijekom cijele godine, s većom prevalencijom ljeti, dok se zimi mnoge vrste skrivaju duboko u sedimentu ili ostaju neaktivne na stijenama. Za razliku od riba i ostalih kralježnjaka, slabo su pokretni i ne mogu izbjeći utjecaj zagađivača koji narušavaju kvalitetu vode. Njihova raznolikost i sastav zajednica koriste se za procjenu zdravlja vodenih ekosustava, a imaju i dugu povijest korištenja u biomonitoring programima (Gupta i Singh, 2011).

Među bentičkim makrobeskralježnjacima najčešće se kao bioindikatori koriste školjkaši. Oni su sposobni koncentrirati razne onečišćivače (npr. metale, pesticide) iz okolne vode i sedimenta u svojim mekim tkivima zahvaljujući procesu bioakumulacije. Metali se mogu tijekom rasta inkorporirati i u ljuštire ili se pasivno adsorbirati na njihove površine iz izvanplastane tekućine i vodenog stupca (Zuykov i sur., 2013). Zbog filtratorskog načina prehrane, školjkaši su vrlo učinkoviti bioakumulatori planktona, sestona i otopljenih tvari. Time su istodobno izloženi otopljenim metalima, metalima vezanima na čestice u suspenziji ili taloženima u sedimentu (Naimo, 1995). Metali se akumuliraju u različitim dijelovima tijela školjkaša, pri čemu koncentracije variraju ovisno o vrsti metala i organa. Koncentracije metala u slatkovodnim školjkašima općenito su najveće u škragama i plaštu (Li i sur., 2021). Međutim, akumulacija u drugim organima čini se specifičnom za pojedine metale. Na primjer, koncentracije Cd najviše su u probavnoj žlijezdi i škragama, dok su najniže u ljušturi i mišićima (Naimo, 1995; Sokolova i sur., 2005). Ipak, visoke koncentracije metala u vodi ne znače nužno visoku akumulaciju u školjkašima. Ako su metali prisutni u vodi u visokim koncentracijama, ali nisu bioraspoloživi, neće imati utjecaja na fiziologiju ili funkciju organa školjkaša (Katsallah i sur., 2013). Iako školjkaši mogu akumulirati vrlo visoke koncentracije metal(oid)a, razmjerne onima u okolišu, opseg njihove bioakumulacije dodatno ovisi o nizu bioloških faktora, uključujući starost, masu, genotip, fenotip, brzinu rasta, prehranu, spol i reproduktivno stanje organizma. Bioakumulacija metal(oid)a može značajno varirati između različitih vrsta školjkaša. Za detritivorne vrste pretpostavlja se da će unos i akumulacija metala biti u korelaciji s njihovim koncentracijama u sedimentu, dok će kod filtratora akumulacija biti povezana s koncentracijama metala u vodi (Gupta i Singh, 2011).

2.4.1. Obična lisanka

Obična lisanka (*U. crassus*) (Slika 5), pripadnica porodice lisanki (Unionidae), slatkovodna je vrsta školjkaša koja je široko rasprostranjena od Atlantskog oceana na zapadu (izuzev britanskog arhipelaga te Apeninskog i Pirinejskog poluotoka) do europskog dijela Rusije na istoku te od zemalja Skandinavije na sjeveru do Male Azije na jugoistoku (Slika 6) (Lopes-Lima i sur. 2016). Na području Hrvatske, vrsta je rasprostranjena u rijekama i potocima unutar kontinentalne biogeografske regije. Zabilježena je u rijekama Dravi, Savi i Dunavu te njihovim brojnim pritocima (Dobra, Korana, Kupa, Mrežnica, Glina, Lonja, Orljava, Ilova, Sutla, Bednja i dr.) (Lajtner i sur., 2010; Lopes-Lima i sur., 2016).

Klasifikacija vrste *U. crassus* (<https://www.molluscabase.org/>):

Carstvo: Animalia

Koljeno: Mollusca

Razred: Bivalvia Linnaeus, 1758

Red: Unionida Gray, 1854

Nadporodica: Unionoidea Rafinesque, 1820

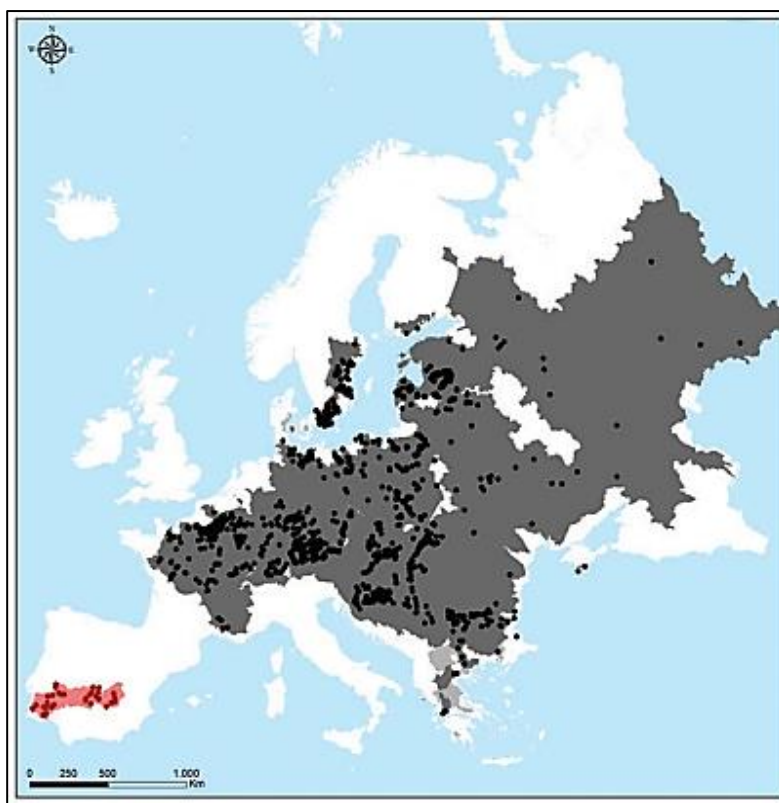
Porodica: Unionidae Rafinesque, 1820

Rod: *Unio* Philipsson, 1788

Vrsta: *U. crassus* Philipsson, 1788



Slika 5. Prikaz obične lisanke *Unio crassus* Philipsson, 1788. Autor fotografije: dr. sc. Dušica Ivanković



Slika 6. Rasprostranjenost vrste *Unio crassus* Philipsson, 1788 (siva boja) (Preuzeto iz Lopes-Lima i sur., 2016).

Školjkaši iz porodice Unionidae zauzimaju važnu poziciju u mreži biotičkih interakcija među organizmima, budući da su domaćini mnogim vrstama parazita različitih taksona (Pavluchenko i Yermoshyna, 2017) te su životni ciklusi mnogih drugih vrsta organizama usko povezani sa ovim školjkašima (Brian i Aldridge, 2019). Štoviše, kako bi se metamorfozirale, glohidije školjkaša moraju privremeno parazitirati ribe, izazivajući imunološke reakcije i patološka stanja u domaćinima. Kao ličinke, školjkaši migriraju sa svojim domaćinima, ponekad prelazeći velike udaljenosti, te se tako šire u nova područja (Modesto i sur., 2018).

Među 16 europskih vrsta školjkaša iz reda Unionida, četrnaest je klasificirano kao gotovo ugrožene, ugrožene ili kritično ugrožene prema IUCN Crvenoj listi (IUCN, 2024). Jedna od ugroženih vrsta je i *U. crassus*, koja pokazuje jasne znakove opadanja populacije, što je posebno izraženo u industrijaliziranim područjima, gdje može doći do smanjenja čak do 90 % broja jedinki (Soroka i sur., 2021). Jedan od uzroka pada populacije je promjena u ihtiofauni, čime se smanjio broj potencijalnih domaćina za koje se glohidija može uhvatiti i u konačnici metamorfozirati. Također, uvođenje bizamskog štakora (*Ondatra zibenthicus*) u Europu je imalo negativni utjecaj na populaciju *U. crassus*. Iako je primarno herbivor, *O. zibenthicus* se

također hrani školjkašima (Zahner-Meike i Hanson, 2001). Ipak, zasigurno najznačajniji uzročnici ugroženosti ove i drugih vrsta porodice Unionidae su industrijski razvoj, kanaliziranje/uređenje korita rijeka te porast onečišćenja vodenih ekosustava (Soroka i sur., 2021). Upravo zbog njihove osjetljivosti na različite promjene u okolišu, uključivanje školjkaša u biomonitoring programe te u ekološka, genetska i toksikološka istraživanja u potpunosti je opravdano i od iznimnog je značaja za njihovo očuvanje i zaštitu cjelokupnog ekosustava.

2.4.2. Probavna žlijezda kao ciljni organ

Probavna žlijezda školjkaša, zbog svoje jedinstvene uloge u metabolizmu i detoksikaciji, sve se češće koristi kao biomarker za procjenu utjecaja onečišćenja na vodeni okoliš (Balbi i sur., 2017; Pagano i sur., 2017; Vidal-Liñán i sur., 2018). Ovo tkivo sadrži brojne epitelne tubule, uglavnom građene od bazofilnih i probavnih stanica. Bazofilne stanice posjeduju dobro razvijen hrapavi endoplazmatski retikulum i mnogobrojne sekretorne granule, što im omogućuje važnu ulogu u proizvodnji i sekreciji probavnih enzima. S druge strane, probavne stanice sadrže dobro razvijen endocitni lizosomalni vakuolarni sustav, uključujući heterofagosome, heterolizosome i rezidualna tijela, što im omogućuje obavljanje procesa unutarstanične probave (Dimitriadis i sur., 2004). Osim toga, lizosomi probavnih stanica nisu odgovorni samo za unutarstaničnu probavu hranjivih tvari i antioksidativnu obranu, već se smatraju i glavnim organelama za sekvestraciju i detoksikaciju toksičnih metala i organskih onečišćivala. Upravo zato se njihovo proučavanje predlaže kao potencijalni „alat ranog upozorenja“ štetnih bioloških učinaka uzrokovanih ksenobioticima (Pagano i sur., 2017).

Konkretno, od 1970-ih probavna žlijezda školjkaša sustavno se koristi za određivanje indeksa stresa i različite kemijske analize u biomonitoring programima na Mediteranu zaljevima Thermaikos i Strymonikos (Grčka) (Koukouzika i Dimitriadis, 2005), na marokanskoj obali (El Haimeur i sur., 2017), baskijskoj obali (Španjolska) (Marigómez i sur., 2013), zapadnoj obali Alžira (Benali i sur., 2017), kao i na sardinskoj i drugim talijanskim obalama (Capolupo i sur., 2017). Također je predložena kao značajno tkivo za ispitivanje metaboličkih učinaka endokrinih disruptora u terenskim i laboratorijskim istraživanjima (Balbi i sur., 2017). Nadalje, budući da se određeni ksenobiotici, poput teških metala, organofosfatnih pesticida i policikličkih aromatskih ugljikovodika, preferencijalno nakupljaju upravo u ovom tkivu (Beyer i sur., 2017; Perić i sur., 2017; Vidal-Liñán i sur., 2018), probavna žlijezda školjkaša smatra se prikladnim tkivom za procjenu biomarkera (Ivanković i sur., 2005) te se uobičajeno koristi za

procjenu prepatoloških promjena kod školjkaša izloženih različitim stresorima (Martins i sur., 2012).

2.5. Biomarkeri

Postoji nekoliko definicija za pojam "biomarker (BM)". Prema Jeddi i sur. (2021), BM-i su "biološki odgovori koji se mogu povezati s izloženošću ili toksičnim učinkom neke kemijske tvari ili više njih iz okoliša". Ova definicija je vrlo široka jer se "biološki odgovori" mogu odnositi na odgovore na bilo kojoj hijerarhijskoj razini, od molekularnih procesa do ekosustava. S druge strane, postoje specifičnije definicije, poput one Mayera i sur. (1992), koja navodi da su BM-i "mjerljivi biokemijski, fiziološki ili histološki parametri koji se u ovisnosti o dozi ili vremenu odnose na stupanj disfunkcije uzrokovane onečišćivalima".

Oni se koriste u biološkom monitoringu za procjenu specifičnih izloženosti i predviđanje rizika od štetnih učinaka na zdravlje, kako na individualnoj, tako i na populacijskoj razini (Jeddi i sur., 2021). Definirano je nekoliko kategorija BM-a s obzirom na primjenu; pritom jedan BM može ispunjavati više kriterija za različite namjene. Tradicionalna i opće prihvaćena klasifikacija koju primjenjuju u suvremenim programima biološkog monitoringa dijeli BM-e u tri glavne kategorije: BM-i izloženosti, BM-i osjetljivosti i BM-i učinka (Hambach i sur., 2013).

BM-i izloženosti se mogu definirati kao egzogena tvar ili njen metabolit, ili proizvod interakcije između ksenobiotičkog agensa i neke ciljne molekule ili stanice, koji se mjeri u određenom dijelu organizma (Steckling i sur., 2018). Njihove su glavne prednosti što mogu odražavati bioraspoloživost, pružiti integriranu mjeru unosa kemijskih tvari, te su osobito značajni u slučaju agensa koji pokazuju velike razlike u apsorpciji ovisno o putu izloženosti (Ladeira i Viegas, 2016).

BM-i osjetljivosti odražavaju intrinzične karakteristike organizma koje ga čine više ili manje osjetljivim na štetne učinke izloženosti određenom kemijskom, fizikalnom ili biološkom agensu (Ladeira i Viegas, 2016). Rezultati pojedinih studija ukazuju na to da i naslijeđena i stečena genetska osjetljivost, epigenetske modifikacije, kao i promjene u fiziološkim strukturama i funkcijama uzrokovane starenjem, patološkim stanjima i čimbenicima životnog stila, mogu dovesti do različitih fenotipskih izraza kao posljedica izloženosti ksenobioticima (Iavicoli i sur., 2016).

BM-i učinka definiraju se kao mjerljive biokemijske, strukturne, funkcionalne ili bilo kakve druge promjene u organizmu koje se, ovisno o njihovoj veličini, mogu povezati s utvrđenim ili potencijalnim oštećenjima (Ladeira i Viegas, 2016). Takve promjene mogu nastati kao rezultat interakcija organizma s različitim okolišnim čimbenicima (uključujući kemijske, fizičke i biološke agense), na razini cijelog organizma, funkcije organa, tkiva stanica te subcelularnoj razini (Brucker i sur., 2020). BM-i oksidativnog stresa (OS) predstavljaju jedinstvenu podklasu biomarkera učinka koja se dosljedno primjenjuje u studijama vodenih ekosustava (Amiard i sur., 2006; Mijošek i sur., 2019). OS je sastavni dio procesa starenja i javlja se u svim živim organizmima kada ROS uzrokuju oštećenja stanica i tkiva (Kelly i sur., 1998). Opće je prihvaćeno da izloženost širokom rasponu okolišnih kemikalija, uključujući pesticide i metale, povećava razinu OS-a u vodenim organizmima (Amiard i sur., 2006; Dragun i sur., 2010; Ivanković i sur., 2005; Mijošek i sur., 2019). Vodeni organizmi raspolažu širokim rasponom antioksidativnih enzima koji čine prvu liniju obrane, uključujući enzimatske komponente (npr. superoksidna dismutaza (SOD), CAT) i male molekule antioksidansa (npr. GSH, poliamini). Budući da se snaga antioksidativne obrane može kvantitativno mijenjati uslijed izloženosti zagađivalima, ovi su parametri široko prihvaćeni i primjenjivani kao BM-i u istraživanjima na različitim organizmima vodenog ekosustava (Banni i sur., 2005; Farombi i sur., 2007; Mijošek i sur., 2019).

No, sama interpretacija BM-a je izazovna. Na primjer, odnosi između opterećenja akumuliranih onečišćivala u tkivima i razine biomarkera mogu biti pod utjecajem dobi, spola i reproduktivnog statusa (Regoli i sur., 2014). Također, neki BM-i specifični za određena onečišćivala mogu reagirati i na druge stresore. Na primjer, MT-i u oštrigama pokazuju odgovor i na određene nemetalne stresore, uključujući stres uslijed rukovanja, anoksije i izloženosti antibakterijskim spojevima (Amiard i sur., 2006). Nadalje, organizmi mogu doživjeti fiziološke prilagodbe na vanjske stresore, a da pritom i dalje održavaju normalnu staničnu funkciju. Ove promjene predstavljaju kompenzacijske mehanizme koji mogu prikriti toksične učinke (Steckling i sur., 2018).

Upravo zato je pristup koji uključuje mjerenje različitih BM-a na više funkcionalnih razina, ključan za sveobuhvatnije razumijevanje i procjene stresora koji utječu na fitnes vrste (BM-i izloženosti), kao i potencijalne promjene u staničnoj funkciji i ukupnom fitnesu (BM-i učinka). Ovakav višestruki pristup povećava pouzdanost i točnost studija BM-a, što vodi do robusnijih zaključaka o utjecaju onečišćenja na okoliš.

2.5.1. Biomarkeri izloženosti metalima – metalotioneini (MT)

MT-i su termostabilni neenzimatski proteini male molekularne mase, s visokim sadržajem cisteina i bez aromatskih aminokiselina. Tiolne skupine cisteinskih ostataka omogućuju im vezanje specifičnih metala. Prvi MT otkriven je u korteksu bubrega konja (Margoshes i Vallee, 1957), a potom su zabilježeni kod mnogih kralježnjaka, uključujući brojne vrste riba (Roeva i sur., 1999), i kod vodenih beskrležnjaka (Roesijadi i Fowler, 1991), prvenstveno mekušaca (Langston i sur., 1998) i rakova (Roesijadi, 1992).

Kako su primijetili Templeton i Cherian (1991), ponašanje MT-a određeno je kemijom tiolne skupine, što omogućuje vezanje metala sa stehiometrijskim svojstvima sličnim onima za Cu ili Zn. Ti proteini obično nisu zasićeni jednim metalom, već sadrže više atoma Cu, Zn, Cd, Hg ili Ag, ako su prisutni (Amiard i Cosson, 1997). Identificirane su različite izoforme MT-a, a polimorfizam se pokazao posebno važnim kod beskrležnjaka u usporedbi sa sisavcima. Također su uočene i varijacije molekularne mase, što sugerira prisutnost monomernih i dimernih oblika (Erk i sur., 2002; Langston i sur., 1998). MT-i su podijeljeni u tri klase (Fowler i sur., 1987). Klasa I obuhvaća sve proteinske MT-e s rasporedom cisteina sličnim onome u sisavaca. U ovu klasu pripadaju neki MT-i mekušaca i rakova, kao što su oni identificirani u školjkašima (Mackay i sur., 1990), rakovima i jastozima (Brouwer i sur., 1989). Klasa II uključuje proteinske MT-e koji nemaju sličnosti s MT-ima sisavaca, dok Klasa III obuhvaća neproteinske MT-e, poznate i kao fitokelatini. Binz i Kägi (1999) predložili su novu klasifikaciju MT-a utemeljenu na filogenetskim obilježjima. Klase I i II podijeljenje su u 15 obitelji, a prema ovoj klasifikaciji MT-i mekušaca pripadaju obitelji 2. Zbog visoke konzervativnosti i sveprisutnosti, smatra se da MT-i imaju ključne uloge u vitalnim procesima. Mason i Jenkins (1995) predložili su dvije funkcije MT-a: (1) predstavljaju rezervoar Cu i Zn dostupnih za sintezu metaloenzima, čime se održava homeostaza putem mnogih staničnih procesa (Liu i sur., 2022); te (2) smanjuju nespecifično vezanje neesencijalnih metala u stanicama i time ograničavaju njihov toksični potencijal (Roesijadi, 1992). Smatra se da MT-i kontroliraju homeostazu esencijalnih metala poput Cu i Zn, dok u slučaju ulaska toksičnih metala (Cd, Ag) u stanicu igraju važnu ulogu u njihovoj detoksikaciji. Dodatno im se pripisuju i druge uloge, uključujući zaštitu od ionizirajućeg zračenja (Widyarini i sur., 2006) te širu antioksidativnu obranu (Bensellam i sur., 2021). Posljedično, organizmi prethodno izloženi metalu poput Cd bolje podnose OS zahvaljujući indukciji MT-a, za koje se pretpostavlja da neutraliziraju učinke hidroksilnih ($\bullet\text{OH}$) i superoksidnih ($\text{O}_2^{\bullet-}$) radikala (Liu i sur., 2022).

Indukcija MT-a predstavlja biokemijski odgovor na visoku dostupnost metala u okolišu, što je karakteristika tipična za BM-e prema definiciji Mayera i sur. (1992). Međutim, odabir najprikladnije indikatorske vrste i najrelevantnijeg organa za određivanje MT-a, kao i granice interpretacije dobivenih podataka i dalje su predmet rasprave. Od sedamdesetih godina prošlog stoljeća školjkaši se koriste u biomonitoring programima "Mussel Watch" (N.A.S., 1980). Karakteristike koje su ih učinile najboljim izborom u ovim programima ujedno su i ključne karakteristike za odabir indikatorskih vrsta za procjenu kvalitete okoliša pomoću BM-a. Tkiva koja su izravno uključena u unos, skladištenje i izlučivanje metala imaju visok kapacitet za sintezu MT-a. Općenito, najviše koncentracije MT-a u školjkaša zabilježene su u probavnoj žlijezdi, dok su razine u škragama i drugim tkivima niže (Raspor i Pavičić, 1999).

No, interpretacija podataka o MT-ima otežana je varijabilnošću rezultata dobivenih istom metodom ili različitim metodologijama koje se koriste za izolaciju i kvantifikaciju MT-a (Amiard i sur., 2006). Trenutačno dostupne metode za detekciju MT-a u mekušcima temelje se na određivanju razina sulfhidrilnih skupina, kao što su diferencijalna pulsna polarografija i spektrofotometrijska metoda s Ellmanovim reagensom (Bebiano i Langston 1989, Viarengo i sur. 1997). Prema dosadašnjim iskustvima, to su najperspektivnije tehnike za rutinsku procjenu koncentracije MT-a u uzorcima školjkaša (Ivanković i sur. 2005).

2.5.2. Biomarker općeg stresa – ukupni proteini (TP)

Sve stanice i organizmi održavaju homeostazu metala unutar fizioloških ili subtoksičnih razina te koriste različite mehanizme detoksikacije. Toksičnost metala ovisi o njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima i afinitetu za određene ligande (Tamás i Martinoia, 2005). "Meki" prijelazni metali, poput Cd i Hg, preferiraju sumpor kao ligand, dok "tvrđi" metali, poput Cr i Mn, te metaloidi As, Se i Sb, preferiraju kisik u višim oksidacijskim stanjima, a sumpor u nižim. Co, Cu, Fe, Ni, Pb i Zn mogu koristiti kisik, sumpor ili dušik kao ligande (Fraústo da Silva i sur., 2001).

Na staničnoj razini, metal(oid)i: (1) generiraju ROS-e i izazivaju OS; (2) uzrokuju oštećenje DNA ili ometaju mehanizme popravka DNA; (3) ometaju funkciju membrana i asimilaciju hranjivih tvari; i (4) narušavaju funkciju i aktivnost proteina. Na molekularnoj razini, metal(oid)i ciljaju proteine, uzrokujući vezivanje na slobodne tiolne skupine, zamjenu esencijalnih iona u metaloproteinima ili oksidaciju bočnih lanaca aminokiselina. Također,

metali narušavaju savijanje denaturiranih ili novoformiranih proteina, uzrokujući njihovu agregaciju, što može ozbiljno narušiti staničnu homeostazu (Lemire i sur., 2013; Tamás i Martinoia, 2005).

Budući da proteini sudjeluju u gotovo svim biološkim procesima, njihova pravilna 3D struktura ključna je za njihovu funkcionalnost. Krivo savijeni proteini su citotoksični zbog sklonosti agregaciji i nespecifičnom vezivanju s ostalim staničnim komponentama (Hartl i sur., 2011). Očuvanje strukture i funkcije proteina osiguravaju molekularni šaperoni, koji pomažu pravilnom savijanju proteina, te putevi degradacije proteina poput proteasoma i autofagije. Disfunkcija ovih sustava može dovesti do bolesti ili stanične smrti (Tyedmers i sur., 2010).

Upravo zato se koncentracija TP-a često koristi kao nespecifičan biomarker općeg stresa organizma. Promjene u sintezi proteina, bilo da je riječ o povećanju ili smanjenju, često su odraz poremećaja u fiziološkim procesima organizma. Takvi poremećaji mogu biti posljedica različitih čimbenika, uključujući izloženost štetnim tvarima iz okoliša. Mjerenje TP-a u stanicama može poslužiti kao indikator izloženosti organizma različitim stresorima, poput teških metala. Međutim, treba imati na umu da na koncentraciju TP-a utječu brojni čimbenici, uključujući genetske predispozicije, dob organizma, prehrana i uvjeti okoliša (Mijošek i sur., 2019), pa interpretacija rezultata zahtijeva oprezno razmatranje svih relevantnih čimbenika. Stoga je, iako mjerenje TP-a može biti korisno u procjeni općeg stanja organizma, za precizniju interpretaciju potrebno kombinirati ovaj parametar s drugim biokemijskim i molekularnim analizama.

2.5.3. Biomarkeri antioksidacijskog kapaciteta – katalaza (CAT), ukupni glutation (GSH) i glutation-S-transferaza (GST)

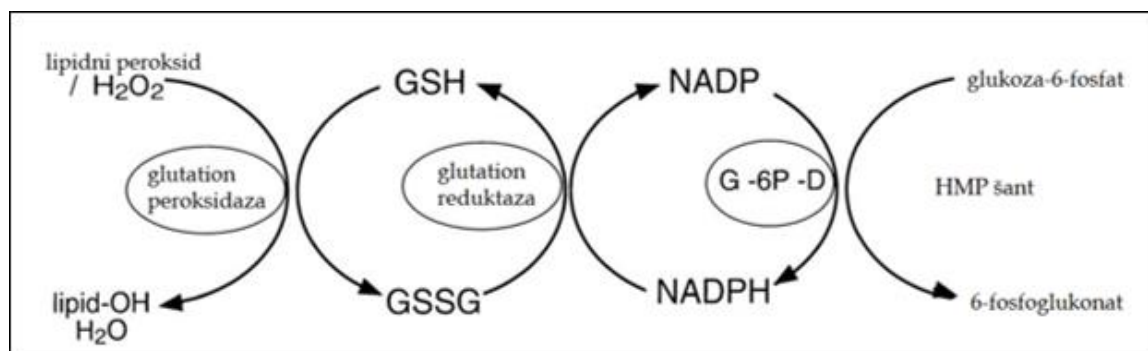
OS neizbježan je aspekt aerobnog života, a nastaje zbog neravnoteže između stvaranja ROS-a i antioksidativnih obrambenih mehanizama u organizmima (Nishida, 2011). ROS se induciraju tvarima poput prijelaznih metalnih iona, pesticida i naftnih zagađivala (Lushchak, 2011). Uloga metala u oksidativnim oštećenjima je složena. Općenito, metali stvaraju slobodne radikale na dva načina: redoks aktivni metali (npr. Cr, Cu, Fe, V) generiraju ROS putem redoks ciklusa, dok metali bez redoks potencijala (npr. Cd, Hg, Ni, Pb) inhibiraju antioksidativnu obranu vežući se na proteine i enzime uključene u nju (Stohs i Bagchi, 1995). Treći ključni mehanizam je Fentonova reakcija, u kojoj Fe(II) reagira s H₂O₂ stvarajući hidroksilne radikale. Osim željeza, u ovakvim reakcijama mogu sudjelovati i drugi metali poput Cr, Cu, i V (Valko i sur., 2005).

Stanična antioksidativna obrana sastoji se od međusobno ovisnih enzimatskih i neenzimatskih sustava, čija uravnoteženost ima veću zaštitnu ulogu nego pojedinačne komponente (Galaris i Evangelou, 2002). Neki od tih komponenata su superoksidna dismutaza, CAT, askorbat peroksidaza, GSH i fenolni spojevi (Ahmad i sur., 2010). Uobičajeno je da svaki stanični odjeljak sadrži više enzimatskih aktivnosti koje većinom djeluju sinergijski, pružajući uzajamnu podršku u neutralizaciji ROS-a (Krishnamurthy i Wadhwani, 2012).

CAT igra ključnu ulogu u zaštiti stanica od oksidativnog oštećenja uzrokovanog vodikovim peroksidom (H_2O_2), koji je toksičan zbog svoje uključenosti u mnoge biološke procese poput apoptoze, signalizacije i proliferacije. Osim primarne funkcije razgradnje H_2O_2 na kisik i vodu, CAT sudjeluje i u drugim biokemijskim procesima poput aktivacije toksičnih i antitumorskih spojeva, oksidacije dušikovog oksida u nitrit te oksidacije acetaldehida (Glorieux i Calderon, 2017). CAT je gotovo univerzalna među aerobnim organizmima. Svaka molekula CAT ima četiri polipeptidna lanca, svaki sa više od 500 aminokiselina, i unutar svakog lanca nalazi se porfirinska hem-skupina, slično hemoglobinu, citokromima i klorofilima. Najveće koncentracije ovog enzima pronađene su u specijaliziranim staničnim odjeljcima poput peroksisoma jetre i bubrega. Mitohondriji, kloroplasti i endoplazmatski retikulum sadrže malo ili nimalo CAT, pa H_2O_2 mora difundirati do peroksisoma kako bi bio neutraliziran (Halliwell i Gutteridge, 2007). Zbog svoje osjetljivosti na različite stresne uvjete, CAT se često koristi kao biomarker u ekotoksikološkim istraživanjima. Primjerice, kod slatkovodnih školjaka promjene u aktivnosti CAT mogu ukazati na izloženost teškim metalima (Borković i sur., 2011; Potet i sur., 2016), a njena se aktivnost može mjeriti različitim spektrofotometrijskim metodama (Marrocco i sur., 2017).

GSH je tripeptid (γ -glutamilcisteinilglicin) koji se nalazi u gotovo svim staničnim odjeljcima, poput citosola, kloroplasta, endoplazmatskog retikuluma, vakuola i mitohondrija (Trnka i sur., 2020). Kemijska reaktivnost tiolne skupine GSH čini ga posebno prikladnim za širok spektar biokemijskih funkcija u svim organizmima. Nukleofilna priroda tiolne skupine važna je u formiranju merkaptidnih veza s metalima i za reakciju s odabranim elektrofilima (Halliwell i Gutteridge, 2007). Primarno se nalazi u reduciranom obliku (GSH), a kao antioksidans funkcionira na nekoliko načina. U ciklusu askorbat-glutation, GSH se koristi za redukciju dehidroaskorbata, a sam se oksidira u GSSG (oksidirani GSH). Regeneracija iz GSSG u GSH katalizira se glutathion reduktazom, a NADPH se koristi kao redukcijski potencijal (Slika 7). Centralni nukleofilni cisteinski ostatak odgovoran je za visoki redukcijski potencijal GSH. On

uklanja toksični H_2O_2 i neenzimski reagira s drugim ROS-ima: singletnim kisikom, superoksidnim radikalima i hidroksilnim radikalima (Trnka i sur., 2020).

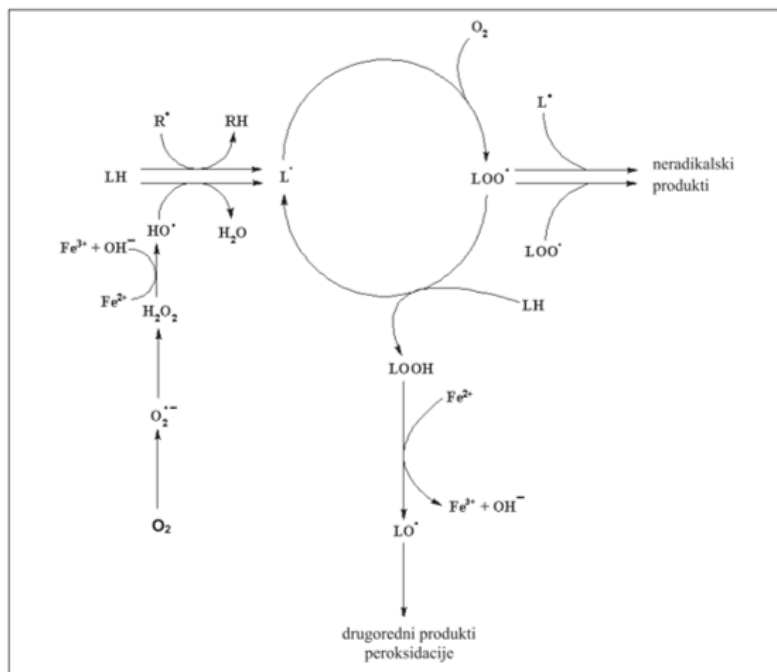


Slika 7. Redoks ciklus glutationa (Preuzeto iz Ajduković, 2017)

Gotovo svi metali snažno se vežu na tiolne skupine cisteinskih aminokiselina, čime slobodni cistein postaje učinkoviti kelator metalnih iona. Međutim, kada je vezan na redoks-aktivni metal, cistein se brzo oksidira, a reducirani metal može pokrenuti Fentonovu reakciju i formirati visoko toksične hidroksilne radikale (Ahmad i sur., 2010). Stoga je održavanje niske razine slobodnog cisteina potrebno za zaštitu stanica od metalnih oksidansa. Oksidacija tiolnih skupina prijelaznim metalima se sprječava blokiranjem cisteinske amino skupine putem konjugacije s glutamatom i glicinom. Ova reakcija uzrokuje formiranje GSH bez pokretanja Fentonove reakcije (Fahey i Sundquist, 1991). GSH štiti potencijalno osjetljive cisteinom-bogate proteine od vezanja slobodnih metalnih iona i time utječe na očuvanje njihove funkcije. Nakon formiranja netoksičnih kompleksa s metalima, GSH olakšava njihovo izlučivanje iz osjetljivih mjesta u stanicama (Foyer i Noctor, 2011). Nekoliko studija na slatkovodnim školjkašima jasno je pokazalo kako različiti metali uzrokuju indukciju GSH koji samim time može poslužiti kao dobar BM u ovim organizmima (Cossu i sur., 2000; Machado i sur., 2014).

Međutim, osim metala, i drugi ksenobiotici, poput herbicida, se također vežu na GSH. Enzim koji katalizira ove konjugacije je GST (Jozefczak i sur., 2012). Citosolske GST predstavljaju najveću obitelj takvih transferaza i imaju aktivnosti koje su jedinstvene za ovu skupinu enzima. Kataliziraju tiolizaciju 4-nitrofenil acetata; reduciraju trinitroglicerol, dehidroaskorbinsku kiselinu i monometilarsonsku kiselinu; te kataliziraju izomerizaciju maleilacetoacetata i 5- β -ketosteroidea (Hayes i sur., 2005). Konačni produkti konjugacije su manje toksični i topljiviji u vodi, čime se olakšava njihova ekskrecija (Hyne i Maher, 2003). Ovi enzimi postoje u višestrukim oblicima, a povišene aktivnosti povezane su s otpornošću na sve glavne klase

insekticida (Enayati i sur., 2005). Također, razne studije na slatkovodnim školjkašima ukazuju na to da je indukcija GST očuvan odgovor stanica na OS izazvan ne samo organskim onečišćivalima, nego i metalima (Cossu i sur., 2000; Doyen i sur., 2015; Perendija i sur., 2007).



Slika 8. Mehanizam lipidne peroksidacije (Preuzeto iz Štefan i sur., 2007)

2.5.4. Biomarker oksidacijskog stresa – malondialdehid (MDA)

Smanjena aktivnost antioksidativnih enzima dovodi do nakupljanja ROS-a, što uzrokuje oksidativno oštećenje lipida, proteina i DNA (Halliwell i Gutteridge, 2007). Primarno, slobodni radikali napadaju lipide koji sadrže ugljik–ugljik dvostruke veze. Ovaj proces poznat je kao lipidna peroksidacija (LPO) te se sastoji od tri koraka: inicijacije, propagacije i terminacije (Yin i sur., 2011). U fazi inicijacije, prooksidanti poput hidroksilnog radikala vežu vodik, tvoreći ugljik–centrirani lipidni radikal ($L\cdot$). U fazi propagacije, $L\cdot$ brzo reagira s kisikom tvoreći lipidni peroksilni radikal ($LOO\cdot$) koji reagira s vodikom iz druge lipidne molekule, generirajući novi $L\cdot$ (koji nastavlja lančanu reakciju) i lipidni hidroperoksid ($LOOH$). U reakciji terminacije, antioksidansi poput vitamina E doniraju atom vodika vrsti $LOO\cdot$ čime nastaje odgovarajući radikal vitamina E koji reagira s drugim $LOO\cdot$ tvoreći neradikalne produkte (Slika 8). Sama LPO ili reakcija kisika s polinezasićenim masnim kiselinama rezultira pojavom različitih karbonilnih spojeva (Ayala i sur., 2014).

Najrašireniji produkt LPO je malondialdehid (MDA), koji se dugi niz godina široko koristi kao praktični biomarker za LPO zbog svoje jednostavne reakcije s tiobarbiturnom kiselinom (TBA)

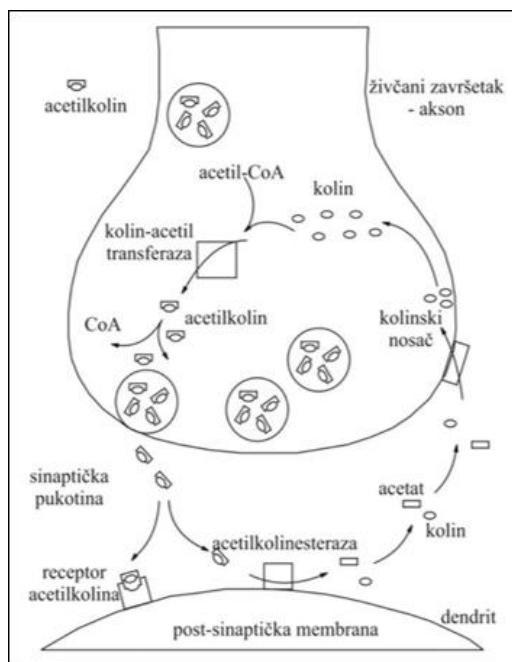
(Esterbauer i Cheeseman, 1990). TBA test temelji se na reaktivnosti TBA s MDA kako bi se dobio intenzivno obojeni ružičasti adukt. Ovaj test se isprva koristio za procjenu autooksidativne degradacije masti i ulja (Sinnhuber i sur., 1958). Mnogi autori su u eksperimentalnim i terenskim studijama zabilježili povećanje sadržaja MDA kod slatkovodnih školjkaša poput vrste *Unio tumidus*, *Anodonta cygnea* i *Dreissena polymorpha* izloženih različitim koncentracijama i trajanju utjecaja teških metala (Hg, Fe, Cd) i organskih onečišćivala (Doyotte i sur., 1997; Cossu i sur., 2000; Falfushynska i sur., 2010a, 2010b; de Lafontaine i sur., 2000; Faria i sur., 2009).

2.5.5. Biomarker izloženosti organskim onečišćivalima i metalima – acetilkolinesteraza (AChE)

Acetilkolinesteraza (AChE) enzim je iz obitelji kolinesteraza (ChE), karboksil–ester hidrolaza specijaliziranih za razgradnju estera kolina. Uz AChE, koja katalizira hidrolizu neurotransmitera acetilkolina, klasa ChE uključuje i pseudokolinesterazu ili butirilkolinesterazu (BChE), koja koristi butirilkolin kao supstrat (Lionetto i sur., 2013). AChE se uglavnom nalazi na neuromišićnim spojevima i u kolinergičkim sinapsama u središnjem živčanom sustavu. Ovdje AChE hidrolizira acetilkolin u kolin i acetat nakon aktivacije acetilkolinskih receptora na postsinaptičkoj membrani. Aktivnost AChE služi za prekid sinaptičke transmisije, sprječavajući kontinuirano podraživanje živčanih završetaka. Stoga je neophodna za normalno funkcioniranje središnjeg i perifernog živčanog sustava (Daniels, 2007). Aktivno mjesto AChE uključuje dva podmjesta: anionsko mjesto i estersko. Anionsko mjesto je mjesto vezanja pozitivnog kvaternarnog amin acetilkolina, dok se na esterskom mjestu odvija hidroliza acetilkolina na acetat i kolin. Hidroliza karboksilnog estera dovodi do stvaranja acil–enzima i slobodnog kolina. Zatim se acil–enzim podvrgava nukleofilnom napadu molekule vode, oslobađajući octenu kiselinu i regenerirajući slobodni enzim (Slika 9, Taylor i Radić, 1994).

Organofosfatni i karbaminski pesticidi poznati su kao specifični inhibitori katalitičke aktivnosti AChE. Oni se vežu na estersko mjesto AChE mehanizmima fosforilacije ili dekarbamilacije te tako inaktiviraju enzim. Budući da je AChE molekularna meta ovih organskih spojeva, mjerenje njezine aktivnosti prepoznato je kao vrijedan dijagnostički alat u okolišnim istraživanjima (Lionetto i sur., 2013). No, brojna istraživanja pokazuju da inhibiciju AChE mogu izazvati i druge kemijske tvari, poput teških metala, drugih pesticida, policikličkih aromatskih

ugljikovodika, deterdženata te komponenti kompleksnih smjesa zagađivala, i to u različitim organizama (Jebali i sur., 2006; Lionetto i sur., 2004).



Slika 9. Ciklus acetilkolina (Preuzeto iz Zenčić, 2017)

Iako su neke studije pokazale da metalni ioni poput Cd^{2+} , Cu^{2+} i Pb^{2+} mogu inhibirati aktivnost AChE u različitim organima školjkaša (Kopecka-Pilarczyk, 2010; Regoli i Principato, 1995), rezultati drugih istraživanja nisu potvrdili ovaj učinak (Pempkowiak i sur., 2006). Ova nekonzistentnost u rezultatima upućuje na potrebu za opreznijim tumačenjem AChE kao BM izloženosti metalima. Korištenje AChE kao BM stoga bi trebalo biti popraćeno dodatnim analizama i usporedbama s drugim BM-ima kako bi se dobila pouzdanija procjena utjecaja metal(oid)a na organizam školjkaša.

2.6. Metalomika

Metal(oid)i su nezamjenjivi za funkcioniranje živih organizama, obavljajući niz funkcija kao što su kataliza biokemijskih reakcija, održavanje strukture biomolekula i prijenos signala unutar stanice (Fraústo da Silva i Williams, 2001). Međudjelovanje metal(oid)a u biološkim sustavima je kompleksno, pri čemu njihovi učinci mogu biti međusobno pojačani (sinergistički) ili suprotstavljeni (antagonistički). Sustavno razumijevanje uloga svih metal(oid)a u biološkim sustavima naziva se "metalomika" (Haraguchi, 2004).

Izraz "metalom" prvi je put upotrijebio Williams (2001), opisujući ga kao distribuciju elemenata ili sadržaj slobodnih elemenata u staničnoj strukturi, stanici ili organizmu. Godine 2010. Međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju (IUPAC) definirala je metalomiku kao istraživačko područje usmjereno na sustavno proučavanje interakcija i funkcionalnih poveznica metaloma s genima, proteinima, metabolitima i drugim biomolekulama unutar organizama (Lobinski i sur., 2010). Cilj metalomike jest pružiti globalno razumijevanje unosa, transporta, uloge i izlučivanja metala u biološkim sustavima, s potencijalom predviđanja tih procesa *in silico* uz pomoć bioinformatike (Li i sur., 2021). Kao peti stup temeljnih bioloških disciplina, uz genomiku, proteomiku, lipidomiku i glikomiku, metalomika za cilj ima razumjeti biološke sustave i životne procese na atomskoj i molekularnoj razini. To uključuje detaljno proučavanje metaloproteina i određivanje kemijskih oblika (specijacija) metala u biološkim sustavima (Zhou i sur., 2022).

Na unutarstaničnoj razini, koncentracija i distribucija metala među različitim staničnim odjeljcima, kao i njihovo vezanje za metaloproteine, pažljivo se kontroliraju. U tom procesu sudjeluju različiti šaperoni koji usmjeravaju metale kroz citoplazmu prema njihovim staničnim ciljevima, gdje ostvaruju svoju funkciju (Naimo, 1995). U tom je kontekstu potrebno razumjeti mehanizme putem kojih se metal prenosi, skladišti ili uključuje u druge biomolekule. Osim toga, treba uzeti u obzir da se ove interakcije ne smiju promatrati izolirano, već treba razmotriti i prostorno, vremensko i fiziološko okruženje, kako bi se dublje shvatila njihova uloga i potencijalne posljedice po zdravlje organizma (Zhou i sur., 2022).

S obzirom na važnost i kompleksnost metal(oid)a u biološkim procesima, sve više se primjenjuju kombinirane multidimenzionalne analitičke metode koje omogućuju stvarniji uvid u ponašanje biomolekula koje vežu metal(oid)e u živim organizmima. Te su metode temeljene na upotrebi masene spektrometrije s induktivno spregnutom plazmom (ICP–MS), obično u kombinaciji s tekućinskom i/ili plinskom kromatografijom (Li i sur., 2021). Takav pristup pogodan je za proučavanje promjena svih metal(oid)nih vrsta prisutnih u stanicama, staničnim tekućinama ili tkivima, uz istovremeno razmatranje njihovog identiteta, količine i lokalizacije u živim organizmima kao posljedice okolišnih faktora (Zhou i sur., 2022).

2.6.1. Vezani sustav tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) i spektrometrije masa s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS)

HPLC–ICP–MS je vjerojatno najčešće korištena tehnika u analizi specijacije metal(oid)a u organizmima. Svoju popularnost duguje sposobnosti istovremene analize velikog broja elemenata te jednostavnom povezivanju sustava za separaciju i detekciju (Ponce de León i sur., 2002).

ICP–MS omogućava detekciju većine elemenata pri vrlo niski koncentracijama, često ispod razine dijelova na milijardu (ppb), s širokim dinamičkim rasponom i izvrsnom masenom razlučivošću (Delafori i sur., 2016). To je posebno važno u specijacijskim analizama, jer tragovi elemenata u stvarnim uzorcima mogu biti prisutni u različitim ionskim oblicima, pa detektor u određenom vremenskom periodu može zabilježiti samo dio njihove ukupne koncentracije (Lobiński i Szpunar, 1999). Dodatne prednosti ICP–MS–a uključuju izvrsnu preciznost i točnost, kao i širok linearni dinamički opseg za standardnu kalibracijsku krivulju (Delafori i sur., 2016). Rutinski dostižan dinamički opseg od šest redova veličine omogućuje detekciju i makroelemenata i elemenata u tragovima bez dodatnih razrjeđivanja uzorka ili prekoncentriranja. Među ograničenjima ove tehnike ističu se poliatomske smetnje i učinci matrice, koji su posebno izraženi pri analizi bioloških uzoraka poput krvi, seruma ili urina. Međutim, primjena kromatografskih kolona omogućuje razdvajanje analita prema njihovim svojstvima te značajno smanjuje broj ometajućih iona (Beauchemin, 2006). Uzorak, obično unesen u ICP–MS u tekućem obliku, pumpa se u sustav za unos uzorka, koji se sastoji od raspršivača i komore za raspršivanje. Stvara se aerosol koji potom dopijeva do mjesta stvaranja plazme, tzv. „baklje“. Plazma (visoko ionizirani plin) sadrži različite zone zagrijavanja gdje se uzorak uzastopno suši, isparava, atomizira i ionizira. Tijekom ovog vremena, uzorak se pretvara iz tekućeg aerosola u čvrste čestice, a zatim u plin. Takozvana analitička zona plazme, na otprilike 6000 – 7000 K, sadrži pobuđene atome i monoatomske pozitivno nabijene ione, koji predstavljaju elementarnu kompoziciju uzorka. Zahvaljujući visoko učinkovitoj ekstrakciji iona, njihovu transportu kroz maseni spektrometar i konačnoj detekciji, ICP–MS je vrhunska tehnika za analizu metal(oid)a u različitim tipovima uzoraka (Rodriguez-Gonzalez i sur., 2005).

Iako se ICP–MS može smatrati čistim elementarnim detektorom, molekularna specifičnost može se postići njegovim povezivanjem s tehnikama razdvajanja poput kromatografije i elektroforeze. Primjena HPLC–ICP–MS–a, napredne, spregnute tehnike, u metalomičkim analizama ne bi bila moguća bez kompatibilnosti između protoka mobilne faze kroz kromatografsku kolonu i tekućeg protoka u raspršivaču. Raspršivači normalnog protoka i

mikroraspršivači dostupni su za rukovanje različitim kromatografskim protocima od 0,1 mL min⁻¹ za male HPLC kolone do čak 1,5 mL min⁻¹ za konvencionalne kolone normalnog promjera (Delafiori i sur., 2016). Također, upotreba kolona malog promjera zajedno s raspršivačem malog protoka može poboljšati osjetljivost i smanjiti disperziju analita čime se postiže veća učinkovitost unosa uzorka te manje opterećenje sustava otapalom. To je važno jer analiza specijacije metal(oid)a često zahtijeva složene mobilne faze koje mogu uzrokovati značajno smanjenje stabilnosti i učinkovitosti ionizacije ICP izvora u relativno kratkim vremenskim periodima. Širok raspon HPLC kolona koji su kompatibilni s ICP–MS-om uvelike olakšava odabir odgovarajućih uvjeta za razdvajanje biomolekula koje vežu metal(oid)e od interesa (Zhou i sur., 2022). Pojedinačne i/ili višestruke kromatografske tehnike razdvajanja mogu se primijeniti za pročišćavanje proteina kako bi se karakterizirao određeni kompleks metal–protein. Najjednostavnija strategija, kao prvi korak za otkrivanje prisutnosti metal(oid)a u rasponu molekulske mase, jest upotreba SE kromatografije (Lobiński i Szpunar, 1999).

2.6.1.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s isključenjem po veličini (SE–HPLC)

SE–HPLC je proces razdvajanja kontroliran entropijom, u kojem se molekule u otopini razdvajaju na temelju razlika u molekularnoj veličini. Ovu vrstu razdvajanja prvi su prepoznali Lathe i Ruthen (1956) tijekom razdvajanja peptida, proteina, oligosaharida i polisaharida koristeći vodenu mobilnu fazu i granule škroba. Utvrdili su da zadržavanje bioloških polimera proizlazi iz njihovog različitog prodiranja u granule škroba. Veće molekule eluirale su prve jer nisu mogle prodrijeti duboko u granule. Kasnije je Pharmacia razvila Sephadex, medij s kontroliranom poroznošću za separaciju biopolimera (Barth i Saunders, 2012).

SE–HPLC također omogućuje izradu kalibracijske krivulje na temelju poznatih analita, kojom se može procijeniti molekulska masa (MM) nepoznatog analita. Tipične kalibracijske krivulje temelje se na proteinima ili polimerima poznatih MM. Graf logaritma MM u odnosu na vrijeme eluiranja obično daje polinom trećeg reda, s linearnim područjem koje pruža najveću rezoluciju i točnost MM (Hong i sur., 2012). Najveći proteini, koji su isključeni iz pora, eluiraju prvi, dok manji proteini izlaze kasnije, redoslijedom smanjenja veličine. Budući da proteini mogu imati različite oblike (npr. globularni, štapčasti ili fleksibilni lanci), njihovi Stokesovi radijusi ne koreliraju uvijek točno s MM. Budući da se razdvajanje temelji na hidrodinamičkom volumenu, ne–globularni proteini eluiraju prije globularnih proteina ekvivalentne MM (de la Calle Guntiñas i sur., 2002).

U istraživanjima biomolekula koje vežu metal(oid)e, od ključne je važnosti očuvanje njihove native strukture i funkcije. Zbog svoje blage prirode, SE se često smatra metodom izbora za razdvajanje ovih biomolekula. Ova tehnika razdvaja proteine na temelju njihove veličine, pri čemu ne dolazi do interakcija koje bi mogle denaturirati protein ili uzrokovati disocijaciju metalnog iona (Szpunar, 2000). Dakako, za optimalno razdvajanje analita potrebno je pažljivo odabrati mobilnu fazu. Njen pH bi trebao biti što bliži izoelektričnoj točki proteina kako bi se minimizirale konformacijske promjene uzrokovane promjenama u naboju. S obzirom na osjetljivost metal–protein interakcija na promjene pH, za biomolekule koje vežu metal(oid)e se često koriste blago alkalni eluenti koji stabiliziraju metal–protein kompleks (Kastner, 2000).

Brojna istraživanja u kojima je korištena SE tehnika razdvajanja u kombinaciji s ICP–MS–om otkrila su prisutnost citosolskih proteina širokog raspona molekulskih masa (10 – 600 kDa) koji vežu različite metal(oid)e u različitim organima školjkaša (Hauser-Davis i sur., 2021; He i sur., 2013; Strižak i sur., 2014). No, za detaljniju karakterizaciju i identifikaciju biomolekula koje vežu metal(oid)e, separacija u prvoj dimenziji pomoću SE–a obično se nadopunjuje drugom, neovisnom separacijskom metodom. Tako je, primjerice, kombinacija SE i anionsko–izmjenjivačke kromatografije (AEX) uspješno korištena u studijama kompleksa metala s proteinima sličnim MT u raznim vrstama školjkaša (Ferrarello i sur., 2002; Erk i sur., 2002; Mackay i sur., 1993).

2.6.1.2. Ionsko izmjenjivačke kromatografije

Ionsko–izmjenjivačka kromatografija je široko korištena tehnika za analitička i preparativna razdvajanja proteina (Ferrarello i sur., 2002; Kastner, 2000). Samo razdvajanje se temelji na razlikama u električnom naboju proteina, koje ovise o njihovim kiselo–baznim svojstvima. Ta svojstva su uglavnom određena brojem i vrstom ionizirajućih bočnih lanaca polipeptida. Tako proteini s većim udjelom baznih aminokiselina (lizin, arginin) imaju višu izoelektričnu točku ($>7,0$), dok proteini s velikim udjelom kiselih aminokiselina (asparaginska i glutaminska kiselina) imaju nižu vrijednost. Većina globularnih proteina ima izoelektrične točke u rasponu pH 4,5–6,5 (de la Calle Guntiñas i sur., 2002).

Od svih dijelova ionsko–izmjenjivačke kromatografije, stacionarna faza je vjerojatno najvažnija. Uobičajene funkcionalne skupine korištene na stacionarnoj fazi kolone su alkilirane amino–skupine za anionizatore i karboksilne, sulfo– i fosfo–skupine za kationizatore. Bazičnost

amino-skupina ovisi o vrsti i broju supstituenata: dietilaminoetil i dimetilaminoetil su slabi anioninski izmjenjivači, dok su trimetilaminoetil i trimetilaminometil jaki anionski izmjenjivači. Uz funkcionalne skupine, od velike važnosti je i materijal od kojega je građena stacionarna faza, budući da interakcije s proteinima mogu rezultirati nespecifičnim vezivanjem. Celuloza je najtradicionalniji materijal, ali također se koriste dekstran, agaroza, silicij i polimerni materijali (Kastner, 2000).

Nadalje bočni lanci nekih aminokiselina nisu jedine nabijene skupine koje mogu postojati u proteinu. Fosforilne i sialilne skupine, prisutne u post-translacijski modificiranim proteinima, također su nabijene i utječu na ponašanje zadržavanja proteina. Ova činjenica čini ionsku izmjenu pogodnom tehnikom za razdvajanje različitih izoformi istog proteina, kao što su transferin i hemoglobin (Bautista i sur., 2021; de la Calle Guntiñas i sur., 2004). Elucija proteina s ionsko-izmjenjivačke kolone može se postići postupnim povećanjem ionske jakosti mobilne faze, promjenom pH ili kombinacijom oba pristupa. Izbor pufera je ključan za održavanje stabilnosti proteina i osiguranje selektivnog vezivanja (Kastner, 2000).

Dakle, ionsko-izmjenjivačka kromatografija temelji se na interakcijama kationa analita u mobilnoj fazi s negativno nabijenim funkcionalnim skupinama stacionarne faze (kationska izmjena) ili aniona analita s pozitivno nabijenim funkcionalnim skupinama (anionska izmjena). I kationski i anionski izmjenjivači široko se koriste kod školjaka za razdvajanje biomolekula koje vežu metal(oid)e. Među najzanimljivijim proteinima ističu se MT-i (Ferrarello i sur., 2002; Ivanković i sur., 2005; Samuel i sur., 2021), ali i drugi proteini poput GST (Fitzpatrick i Sheehan, 1993), selenoproteina (Yamashita i sur., 2012) i brojnih drugih.

2.6.2. Analiza biomolekula koje vežu metal(oid)e primjenom tehnika spektrometrije masa

Spektrometrija masa (MS) analitička je tehnika koja omogućuje identifikaciju i kvantifikaciju analita u uzorku na temelju njihovog omjera mase i naboja (m/z) u plinskoj fazi unutar vakuumskog sustava.

Početkom 1980-ih godina postignut je značajan napredak u analizi bioloških makromolekula uvođenjem tehnika ionizacije koje su omogućile detekciju teško hlapivih, polarnih biomolekula i biopolimera, poput bombardiranja brzim atomima (FAB) i plazma desorpcije (PD). Ove su metode otvorile put razvoju još naprednijih tehnika ionizacije, među kojima se ističu ionizacija elektroraspršivanjem (ESI, engl. *Electrospray Ionization*) i matricom potpomognuta ionizacija

laserskom desorpcijom (MALDI, engl. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*). Uvođenjem ovih metoda omogućena je detaljna analiza složenih bioloških molekula, uključujući proteine, peptide, glikolipide, glikoproteine i oligonukleotide (Yates i sur., 2009). Danas se MS tehnike široko primjenjuju za identifikaciju, kvantifikaciju i karakterizaciju proteina, uključujući određivanje njihovih sekvenci, lokalizacije i vremenske ekspresije. Masena spektrometrija omogućuje precizno određivanje omjera masa/naboja peptida te dekodiranje aminokiselinskih sekvenci proteina uz pomoć naprednih bioinformatičkih alata. Time se, osim identifikacije proteina, omogućuje i detekcija posttranslacijskih modifikacija, koje imaju ključnu ulogu u regulaciji njihove biološke funkcije. Osim toga, MS tehnike koriste se i za analizu trodimenzionalnih struktura proteina te njihovih međumolekulskih interakcija, što je od presudne važnosti za razumijevanje molekularnih mehanizama i bioloških procesa u kojima sudjeluju.

Za razliku od klasičnih metoda, poput SDS–PAGE, dvodimenzionalne gel elektroforeze i Western blottinga, masena spektrometrija značajno ubrzava proces identifikacije i kvantifikacije proteina, uz istodobno veću osjetljivost, točnost i razinu detaljnosti dobivenih podataka. Analiza proteina spektrometrijom masa može se provoditi na dva načina: analizom intaktnog proteina ili analizom peptida nastalih proteolitičkom razgradnjom proteina prije same MS analize. Molekulska masa intaktnog proteina može se precizno odrediti tehnikama ESI–MS ili MALDI–MS (Aebersold i Goodlett, 2001; Wysocki i sur., 2005).

2.6.2.1. Matricom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom (MALDI)

Temelj svake spektrometrije masa počiva na procesu prevođenja molekula analita u plinsku fazu. Međutim, za analizu termolabilnih i teško hlapivih biomolekula taj je proces dugo vremena predstavljao nepremostiv izazov. Značajan napredak u razvoju ionizacijskih metoda postignut je uvođenjem MALDI tehnike, kojom je omogućena analiza bioloških makromolekula. Ključni iskorak u razvoju ove metode bilo je uvođenje matrice, čime je postignuto učinkovito rješavanje problema fragmentacije analita tijekom ionizacije (Karas i sur., 1987). Tijekom MALDI ionizacije matrica apsorbira energiju laserskog impulsa i prenosi je na kokristalizirani analit. Posljedično brzo zagrijavanje dovodi do desorpcije matrice i stvaranja iona analita $[M+H]^+$ u plinskoj fazi. Za postizanje odgovarajućeg omjera signala i šuma tijekom MALDI ionizacije obično se za desorpciju primjenjuje nekoliko stotina laserskih pulseva (Yates i sur., 2009). Ioni nastali MALDI ionizacijom u većini su slučajeva jednostruko nabijeni, što ovu tehniku čini osobito prikladnom za analizu proteina visoke molekulske mase.

Unatoč brojnim prednostima, MALDI metoda ima i određena ograničenja, uključujući relativno nisku reproducibilnost između pojedinačnih laserskih impulsa te osjetljivost na uvjete i postupke pripreme uzorka (Silvertrand i sur., 2008).

Od različitih vrsta masenih analizatora, u kombinaciji s MALDI ionskim izvorom najčešće se primjenjuje TOF analizator (engl. *Time of Flight*), zbog svojeg pulsnog načina rada, robusnosti, jednostavnosti i visoke osjetljivosti pri detekciji širokog raspona molekulskih masa. MALDI maseni spektar ujedno je jednostavan za interpretaciju jer sadrži pretežito jednostruko nabijene ione, a dodatno je i relativno otporan na smetnje koje potječu od matrica korištenih u analizi (Aebersold i Goodlett, 2001). Za detekciju razdvojenih iona analita najčešće se koristi sekundarni elektronski multiplikator, sastavljen od mikroploča koje pojačavaju učinak iona stvaranjem sekundarnih elektrona, čime se signal pretvara u električni impuls. Dobiveni se napon vodi do analogno–digitalnog pretvarača, a rezultirajući se podaci računalno obrađuju. Omjeri masa/naboj (m/z) izračunavaju se na temelju vremena potrebnog ionima da prijeđu putanju kroz letnu cijev od izvora do detektora. Detektirani su ioni najčešće jednostruko nabijeni $[M+H]^+$, a rezultati se prikazuju u obliku masenog spektra, pri čemu horizontalna os predstavlja m/z vrijednosti, a vertikalna relativnu abundanciju iona (Greco i sur., 2018).

MALDI–TOF spektrometar omogućuje strukturnu analizu proteina na dva komplementarna načina: izravno, analizom nativno svinutih proteina i njihovih izoformi (top–down pristup), te neizravno, analizom peptidnih smjesa nastalih proteolitičkom razgradnjom proteina (bottom–up pristup). Ovi pristupi omogućuju detaljnu identifikaciju i karakterizaciju aminokiselinskog slijeda peptida i proteina (Chait, 2006)

2.6.3. Dosadašnja istraživanja

Slatkovodni ekosustavi pod stalnim su pritiskom različitih izvora onečišćenja metalima – urbanizacije, industrijalizacije te drugih antropogenih aktivnosti koje doprinose zagađenju vode i sedimenta te u konačnici i smanjenju biološke raznolikosti (Dudgeon i sur., 2006). Izuzetno je važno imati na umu kako se određena zagađivala, poput metala, koja su u vodeni sustav unesena prije većeg broja godina, iz tzv. povijesnih industrijskih izvora onečišćenja, i dalje mogu detektirati u njegovim različitim sastavnicama i u suvremenom razdoblju (Dragun i sur., 2022a; Hurley i sur., 2017). Upravo su istraživanja Frančišković–Bilinski i sur. (2008, 2017) na rijeci Mrežnici pokazala kako se posljedice dugotrajnog ispuštanja industrijskog otpada u prošlosti odrazilo na smanjenu kvalitetu vode i sedimenta u sadašnjosti. Slabo je istraženo kako ovakav tip onečišćenja može imati na organizme u rijeci Mrežnici. Mandić (2021) je iznijela

rezultate o povećanoj akumulaciji određenih esencijalnih i neesencijalnih metal(oid)a u probavnim žlijezdama dviju vrsta školjkaša (*Unio pictorum* i *Anodonta anatina*) na rijeci Mrežnici. Ova studija, kao i druge na školjkašima iz porodice Unionidae uključuje podatke o ograničenom broju elemenata, i primarno se usredotočuju na njihove ukupne koncentracije (Falfushynska i sur., 2014; Khoma, 2019). Dok ukupne koncentracije metala u tkivu daju opću sliku o izloženosti organizma, analiza koncentracije metal(oid)a u vodotopljivoj citosolskoj frakciji može pružiti značajne informacije o potencijalnoj toksičnosti metala te poslužiti kao važna nadopuna analize ukupnih koncentracija metala u tkivu. Ova frakcija često bolje odražava stupanj onečišćenja (Langston i sur., 1998), iako metal(oid)i u njoj ponekad čine samo manji dio ukupnog postotka metala u tkivu.

S druge strane, upotreba BM-a značajno doprinosi procjeni učinaka bioakumuliranih metal(oid)a u izučavanom organizmu, čak i pri niskim i umjerenim razinama izloženosti (Mijošek i sur., 2019). BM-i koji se uobičajeno prate uključuju biomarkere općeg stresa (TP), antioksidativne obrane (CAT, GSH, GST), oksidativnog stresa (MDA) te izloženosti metalima (MT) i pesticidima (AChE) (Mijošek i sur., 2019). Prethodna istraživanja o utjecaju okolišnih stresora na *U. crassus* vrlo su oskudna. Prema dostupnim podacima, do danas su provedena samo tri laboratorijska istraživanja: jedno je proučavalo promjene u ponašanju jedinki ove vrste izloženih visoko volatilnim organskim otapalima (Sárkány–Kiss i sur., 2012), drugo je mjerilo četiri imunološka/biokemijska parametra u probavnoj žlijezdi usljed izloženosti Zn/Cu piritionima (Třešňáková i sur., 2020), a treće je pratilo broj hemocita, histološke promjene i pet BM-a oksidacijskog stresa nakon izlaganja nanočesticama CeO₂ (Türkmen i sur., 2024). Slična istraživanja na drugim vrstama slatkovodnih školjkaša također su se u najvećoj mjeri fokusirala na ograničen broj biomarkera, kako u laboratorijskim tako i u okolišnim studijama (Khudhur i Shekha, 2019; Köprücü i sur., 2010; Paçal i sur., 2022).

Konačno razumijevanje intracelularne sudbine metala od velike je važnosti za procjenu njihovog biološkog djelovanja. Primjenom naprednih tehnika iz područja metalomike, poput spregnutog sustava HPLC–ICP–MS, može se dobiti detaljan uvid u distribuciju i vezanje metal(oid)a za biomolekule u različitim tkivima organizama. Primjerice, Strizak i sur. (2014) su opisali distribuciju nekoliko metal(oid)a (As, Cu, Cd, Zn, Pb) među citosolskim biomolekulama različitih veličina u probavnoj žlijezdi Mediteranske dagnje *Mytilus galloprovincialis*. Slično istraživanje provela je Mandić (2021) u probavnim žlijezdama dviju vrsta školjkaša (*U. pictorum* i *A. anatina*). Ipak, upotreba višedimenzionalnog kromatografskog pristupa u kombinaciji s tehnikama masene spektrometrije za proučavanje biomolekula koje

vežu metal(oid)e u školjkašima još je rijetka, a za vrstu *U. crassus* takva studija dosad nije opisana u literaturi. Dosadašnja istraživanja uglavnom su se usmjeravala na ograničeni broj metala i proteina koji vežu metale, poput vezanja Cd, Cu i Zn za metalotioneine (npr. Falfushynska i sur., 2009) te na interakcije As i Se s biomolekulama vrlo male molekulske mase (< 10 kDa) (Hauser-Davis i sur., 2021; Lavradas i sur., 2016).

Slatkovodni školjkaši (Unionida: Unionidae) predstavljaju jednu od najvažnijih i najrasprostranjenijih skupina vodenih organizama, naseljavajući širok raspon staništa diljem svijeta. Oni igraju ključnu ulogu u funkcioniranju slatkovodnih ekosustava jer doprinose stabilizaciji sedimenta, kruženju hranjivih tvari i pročišćavanju vode, što pozitivno utječe na očuvanje bioraznolikosti u slatkovodnim ekosustavima (Howard i Cuffey, 2006). Budući da populacije ovih školjakaša bilježe značajan pad uslijed antropogenih pritisaka, osobito kemijskog onečišćenja, od izuzetne je važnosti detaljnije proučiti molekularne mehanizme toksičnosti metala u ovim organizmima. Takva saznanja pridonijet će razvoju učinkovitih strategija za njihovo očuvanje i održivom upravljanju slatkovodnim ekosustavima.

3. MATERIJALI I METODE

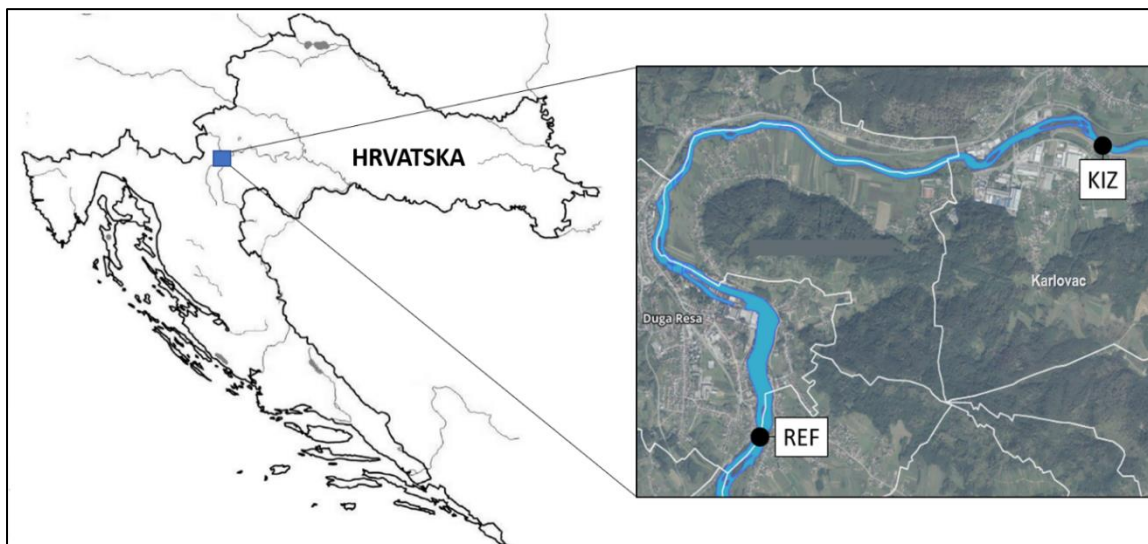
3.1. Područje i vrijeme istraživanja

Rijeka Mrežnica, krška rijeka koja izvire zapadno od Slunja i ulijeva se u Koranu kod Karlovca, proteže se u dužini od 64 km, a njezino porječje obuhvaća površinu od 1076 km². Mrežnica je prepoznatljiva po slikovitim kanjonima, sedrenim barijerama i ujezerenim dijelovima, zbog čega se ističe kao jedan od značajnijih krških vodotoka. (Čerkez, 2021). Uslijed kompleksnog sustava podzemne cirkulacije karakterističnog za krš, teško je predvidjeti sve posljedice koje antropogeni utjecaj može imati na njezinu hidrologiju i ekološku stabilnost. Mrežnica je zasad zaštićena jedino kao dio europske ekološke mreže NATURA 2000, unatoč krajobraznim i prirodnim vrijednostima (Maradin, 2007).

U svom gornjem toku, Mrežnica je tipična krška rijeka, dok nizvodno ulazi u nizinsko područje, postajući šira i plića. Upravo taj donji dio bio je tijekom dugog razdoblja izložen intenzivnom industrijskom zagađenju (Dragun i sur., 2022a). U okviru projekta „Biomolekule koje vežu metale i zdravstveni poremećaji kod slatkovodnih organizama izloženih industrijskom otpadu (METABIOM)“, koji je financirala Hrvatska zaklada za znanost, provedeno je uzorkovanje vode, sedimenta i školjkaša na dvije postaje na rijeci Mrežnici. Preliminarno uzorkovanje za analizu otopljenih metal(oid)a u vodi te bioakumulaciju metal(oid)a u probavnim žlijezdama školjkaša obavljeno je u srpnju 2020. godine. Dodatna uzorkovanja za ove analize te za analizu biomarkera obavljena su u lipnju i listopadu 2021. godine. Uzorkovanja za analizu partikulatnih metal(oid)a u vodi te sedimenta obavljena su u travnju i rujnu 2021. godine.

Prva postaja, udaljena približno 2 km uzvodno od Duge Rese, smatra se referentnom ili najmanje zagađenom točkom (REF postaja; N 45° 26' 28,40", E 15° 30' 15,39") (Slika 10). Iako se u blizini te postaje nalazi obrađeno poljoprivredno zemljište, ocijenjena je kao područje s minimalnim antropogenim utjecajem. Druga postaja, udaljena oko 2,5 km nizvodno od Duge Rese, nalazi se unutar industrijske zone Mala Švarča u Karlovcu (KIZ postaja; N 45° 27' 49,05", E 15° 32' 30,09") (Slika 10), gdje su tijekom više od sedam desetljeća bile aktivne brojne tvornice, neke još od početka 20. stoljeća. Određeni broj tih pogona je prije više od deset godina priključen na uređaj za pročišćavanje otpadnih voda grada Karlovca, čime se pročišćene otpadne vode sada ispuštaju u rijeku Kupu, nizvodno od grada. Međutim, nekoliko manjih industrijskih postrojenja i dalje ispušta otpadne vode u rijeku Mrežnicu, uključujući toplanu, autopraonicu, bolnicu te pogone za proizvodnju dizelskih motora, kalupa i pumpi, kliznih ležajeva, tekstila te medicinskih potrepština (Dragun i sur., 2022a).

Dugotrajna prisutnost mnogih industrijskih pogona na relativno malom području sugerira da je rijeka, s umjerenim kapacitetom razrjeđivanja, izložena značajnom antropogenom opterećenju, što predstavlja ozbiljan rizik za njezinu ekološku stabilnost i biološku raznolikost.



Slika 10. Područje istraživanja s označenim mjestima uzorkovanja na rijeci Mrežnici u Hrvatskoj (REF – referentna postaja uzvodno od grada Duge Rese; KIZ – industrijska zona Mala Švarča grada Karlovac). Karte preuzete i uređene s Izvor 2.

3.2. Prikupljanje i obrada uzoraka

3.2.1. Uzorkovanje vode i priprema uzoraka za analizu

Površinska voda prikupljena je u triplikatu u plastičnim polietilenskim bocama (0,25 – 0,50 L). Prije korištenja, boce su oprane otopinom 10 %-tne dušične kiseline (HNO_3 , v/v 10 %, *p.a.*, Kemika, Hrvatska) te isprane Milli-Q vodom. Na mjestu prikupljanja površinske vode, uzorci su filtrirani pomoću šprice s filterom promjera pora 0,45 μm (FilterBio® CA, Labex Ltd., Njemačka) te zakiseljeni s HNO_3 (v/v 2 %, Normatom®, 67 – 69 %; VWR Chemicals, SAD) kako bi se dobio samo otopljeni dio metal(oid)a. Zakiseljeni uzorci pohranjeni su u hladnjaku na 4 °C do daljnje analize.

Za analizu sadržaja metal(oid)a u partikulatnom obliku, voda je prikupljena u dvije plastične boce od 1,5 L po postaji te po dolasku u laboratorij filtrirana kroz filter pora 0.45 μm (Sartorius, Njemačka). Filtri su zatim osušeni na temperaturi od 60 °C, izvagani i pohranjeni za daljnju analizu metal(oid)a. Za analizu partikulatnih metal(oid)a, uzorci sakupljeni na filtrima razgrađeni su u 3 mL HNO_3 (TraceSELECT™, ≥ 69 %, Fluka, Njemačka) pomoću mikrovalne

pećnice (Multiwave ECO, Anton Paar, Austrija). Dobivene otopine prenesene su u odmjerne tikvice ($V = 50 \text{ mL}$) i dopunjene Milli-Q vodom do oznake.

3.2.2. Uzorkovanje sedimenta

Uzorci sedimenta (gornjih 10 cm) prikupljeni su u triplicatu pomoću lopatice s bočnih dijelova riječnog korita. U laboratoriju su osušeni na zraku, homogenizirani uz pomoć agatnog mlina i pohranjeni do daljnje analize metal(oid)a. Prije analize, poduzorci sedimenta (0,05 g) razgrađeni su u mikrovalnoj pećnici koristeći dvostupanjski postupak koji uključuje razgradnju s mješavinom 4 mL HNO_3 , 1 mL klorovodične kiseline (HCl) i 1 mL fluorovodične kiseline (HF), nakon čega je dodano 6 mL borne kiseline (H_3BO_3).

3.2.3. Uzorkovanje školjkaša

Za ovo je istraživanje odabran slatkovodni školjkaš *U. crassus*. S obzirom na status vrste kao strogo zaštićene, prikupljanje uzoraka provedeno je uz dozvolu Ministarstva zaštite okoliša i prirode (Klasa: UP/I-612-07/20-48/107; Urbroj: 517-05-1-1-20-4). Na svakoj istraživanoj lokaciji i u svakoj sezoni, autonomnim ronjenjem prikupljeno je po 30 jedinki. Prikupljeni školjkaši premješteni su u laboratorij u prijenosnim hladnjacima, gdje su prošli 24-satnu purifikaciju u plastičnim posudama s aeriranom dekloriranom vodom. Nakon toga, probavne žlijezde su izdvojene iz jedinki, izmjerena im je masa te su pohranjene na $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ do trenutka analize. Prije sekcije izmjereni su sljedeći biometrijski parametri: duljina (cm), širina (cm) i visina (cm) ljuštura, masa otvorenog ocijeđenog školjkaša (g) te masa ljuštura (g). Iz izmjerenih pokazatelja određeni su masa mokrog mesa (g) i volumen školjkaša (duljina ljuštura $\times$ širina ljuštura $\times$ visina ljuštura) (cm^3) koji su potom korišteni za izračun indeksa kondicije školjkaša (IK): $\text{IK (\%)} = (\text{masa mesa (g)} / \text{volumen ljuštura (cm}^3\text{)}) \times 100$.

3.2.4. Homogenizacija probavnih žlijezdi školjkaša za analizu sadržaja metal(oid)a

Kako bi se osigurala dovoljna količina tkiva za analizu, stvoreni su kompozitni uzorci sastavljeni od probavnih žlijezdi četiri do pet jedinki. Tkivo je prvo usitnjeno škarama, a zatim je dodan svježe pripremljeni hladni homogenizacijski pufer [20 mM Tris-HCl pufer (Sigma, SAD, pH 8,6 pri $4 \text{ }^\circ\text{C}$) s dodatkom 0,01 % β -merkaptopropanola (Sigma, SAD) i proteaznih

inhibitora (0,006 mM leupeptina i 0,5 mM fenilmetilsulfonil fluorida (PMSF), oboje Sigma, SAD)] u omjeru 1 : 4 (pufer : tkivo). Broj kompozitnih uzoraka koji se koristio za analizu metal(oid)a u probavnoj žlijezdi školjkaša bio je za obje postaje u srpnju 10, u listopadu 6, a za lipanj je bio 7 za REF postaju i 10 za KIZ postaju.

Nakon dodavanja pufera, tkivo probavne žlijezde homogenizirano je pomoću homogenizatora s teflonskim batićem (Potter-Everhjem GLAS-COL, SAD). Tijekom homogenizacije, svi uzorci, pufer i pribor bili su držani na ledu kako bi se očuvala stabilnost uzorka. Nakon homogenizacije, 300 µL homogenata alikvotirano je u epruvete za razgradnju i pohranjeno na 4 °C za analizu ukupnog sadržaja metala.

Preostali homogenat zatim je centrifugiran u Avanti J-E centrifugi (Beckman Coulter, SAD) pri $50000 \times g$ tijekom 120 minuta. Dobiveni supernatant (S50) pažljivo je izdvojen Pasteurovom pipetom, pazeći da se ne zahvati masni sloj i talog, te je prebačen u novu ohlađenu epruvetu. Za određivanje metala u citosolu, 300 µL S50 je alikvotirano i pohranjeno u epruvete za daljnju razgradnju i analizu sadržaja citosolskih metal(oid)a.

3.2.5. Razgradnja homogenata i citosola probavne žlijezde

Prije analize sadržaja metala, uzorci homogenata i citosola probavnih žlijezda prošli su proces razgradnje pomoću oksidacijske smjese. Za razgradnju homogenata korištena je oksidacijska smjesa dušične kiseline (HNO₃, Rotipuran Supra 69 %, Carl Roth GmbH + Co. KG, Njemačka) i vodikovog peroksida (H₂O₂, Suprapur, Merck, Njemačka) u omjeru 3:1 (v/v). Nakon razgradnje u sušioniku, pri temperaturi od 85 °C tijekom 3,5 sata, uzorci su ostavljeni da se ohlade preko noći u digestoru.

Citosolska frakcija je razgrađena u duplikatima koristeći istu oksidacijsku smjesu, ali u omjeru 1:1 (v/v). Razgradnja je provedena pod istim uvjetima kao kod homogenata, nakon čega su i ovi uzorci ostavljeni da se preko noći ohlade u digestoru.

3.3. Mjerenje metal(oid)a u površinskoj vodi, sedimentu i probavnoj žlijezdi školjkaša

Otopljeni elementi u tragovima u zakiseljenim uzorcima površinske vode analizirani su izravno, bez prethodne obrade, dok su za mjerenje makroelemenata uzorci vode prethodno razrijeđeni s Milli-Q vodom u omjeru 1:10. Za analizu partikulatnih metal(oid)a u vodi, razgrađeni uzorci

(Poglavlje 3.2.1.) analizirani su izravno, bez daljnjeg razrjeđivanja. Za analizu metal(oid)a u sedimentima, pripremljeni uzorci (Poglavlje 3.2.2.) su razrijeđeni 10 puta s Milli-Q vodom i zakiseljeni s HNO_3 (2 % v/v; 65%, suprapur, Fluka, Steinheim, Švicarska).

U analizu je uključeno dvadeset i sedam metal(oid)a, a za analizu je korišten HR ICP–MS (Element 2, Thermo Finnigan, Njemačka), opremljen automatskim sustavom za injektiranje SC–2 DX FAST (Elemental Scientific, SAD), Twister komorom za raspršivanje i SeaSpray raspršivačem. Mjerenja su provedena u tri rezolucije: niskoj rezoluciji za ^{82}Se , ^{85}Rb , ^{98}Mo , ^{109}Ag , ^{111}Cd , ^{121}Sb , ^{133}Cs , ^{205}Tl , ^{208}Pb , ^{209}Bi i ^{238}U ; srednjoj rezoluciji za ^{23}Na , ^{24}Mg , ^{27}Al , ^{42}Ca , ^{51}V , ^{52}Cr , ^{55}Mn , ^{56}Fe , ^{59}Co , ^{60}Ni , ^{63}Cu , ^{66}Zn , ^{86}Sr i ^{138}Ba ; te visokoj rezoluciji za ^{39}K i ^{75}As .

Za kvantifikaciju je korištena vanjska kalibracija, pripremom odgovarajućih standarda iz multielementne standardne otopine (Analytika, Češka Republika) u 2 % (v/v) HNO_3 (Normatom® 67 – 69 %, VWR Chemicals, UK), uz dodatak Cs (Fluka, Njemačka), Rb, U (Sigma–Aldrich, SAD) i Sb (Analytika, Češka Republika). Za makroelemente i Ag korištene su zasebne vanjske kalibracije (Fluka, Njemačka). Prije mjerenja, In ($1 \mu\text{g L}^{-1}$; Fluka, Njemačka) je dodan svim uzorcima i kalibracijskim standardima kao interni standard. Sva mjerenja provedena su u duplikatima.

Točnost i preciznost mjerenja na HR ICP–MS provjerena je korištenjem kontrolnih uzoraka QC trace metals (UNEP/GEMS, Burlington, Kanada, kataloški broj 8072, serijski broj 146142–146143). Dobiveni rezultati uspoređeni su s certificiranim vrijednostima, uz zadovoljavajuću podudarnost (Prilog 1). Analitička kontrola kvalitete sedimenta provedena je istodobnom analizom proceduralnih slijepih proba i certificiranih referentnih materijala tla NCS DC 773902 (GBW 7410) i riječnog sedimenta NCS DC 73309 (GBW 07311), pri čemu su rezultati imali zadovoljavajuću podudarnost te su iznosili od 90% do 102%. Granice detekcije (GD) za sve elemente izračunate su kao tri standardne devijacije deset uzastopnih mjerenja metal(oid)a u slijepoj probi. Potonje se razlikovalo ovisno o tipu matrice pripremljenih uzoraka: a) ultračista voda (Milli Q) uz dodatak HNO_3 (v/v 2 %) za analizu metal(oid)a u otopljenoj frakciji; b) 3 mL HNO_3 podvrgnuto razgradnji na isti način kao i uzorci partikulatne frakcije (Tablica 1); c) ista smjesa kiselina korištena za sedimente (Poglavlje 3.2.2.) podvrgnuto razgradnji na isti način kao i uzorci sedimenta te d) pufer za homogenizaciju opisan u poglavlju 3.2.3. podvrgnut istom postupku razgradnje kao i homogenati i citosoli probavnih žlijezda za analizu metal(oid)a u homogenatima i citosolima (Tablica 2).

Tablica 1. Granice detekcije (GD) za mjerenje metal(oid)a u otopljenoj frakciji vode (OV; $\mu\text{g L}^{-1}$) te partikulatnoj frakciji vode (PV) i sedimentu (mg kg^{-1}).

	GD	
	OV	PV/sediment
Ca	132	30
K	28,7	25
Mg	40,8	20
Na	22,8	45
Ag	0,001	0,03
Al	0,556	25
As	0,014	0,30
Ba	0,012	0,30
Bi	0,001	0,03
Cd	0,002	0,03
Co	0,001	0,04
Cr	0,002	0,40
Cs	0,001	0,06
Cu	0,053	0,30
Fe	0,073	10
Mn	0,013	0,45
Mo	0,005	0,15
Ni	0,006	0,60
Pb	0,060	0,45
Rb ¹	0,001	0,15
Sb	0,001	0,15
Se	0,026	-
Sr	0,317	0,60
Tl	0,001	0,04
U	0,001	0,03
V	0,001	0,03
Zn	0,519	1,5

Tablica 2. Granice detekcije (GD) za mjerenje ukupnih (UK) i citosolskih (C) koncentracija metal(oid)a u probavnoj žlijezdi *Unio crassus*. Rezultati su izraženi u $\mu\text{g g}^{-1}$ za makroelemente (Ca, K, Mg, Na) i u ng g^{-1} za elemente u tragovima.

	GD	
	UK	C
Ca	2,39	1,53
K	14,34	0,536
Mg	3,74	0,564
Na	13,04	0,320
Ag	0,132	0,106
Al	158	122
As	1,33	0,988
Ba	4,00	0,014
Bi	0,292	0,394
Cd	0,212	0,106
Co	0,276	0,310
Cr	1,10	2,36
Cs	0,001	0,001
Cu	45,0	6,00
Fe	80,0	101
Mn	4,00	12,0
Mo	0,583	0,348
Ni	4,20	2,50
Pb	5,04	5,54
Rb	0,405	0,362
Sb	0,802	0,221
Se	2,26	2,41
Sr	4,00	3,00
Tl	0,001	0,001
U	0,210	0,063
V	0,581	0,168
Zn	195	389

3.4. Određivanje koncentracije staničnih biomarkera

3.4.1. Obrada probavne žlijezde

Za analizu koncentracija različitih biomarkera korištene su probavne žlijezde školjkaša *U. crassus* prikupljene u dvije sezone: kasno proljeće (lipanj 2021.) i ranu jesen (listopad 2021.). Kompozitni uzorci, sastavljeni od probavnih žlijezda četiri do pet jedinki, pripremljeni su kako bi se osigurala dovoljna količina tkiva za analizu. Broj kompozitnih uzoraka koji se koristio za analizu svih biomarkera bio je za REF_{lipanj} – 7, KIZ_{lipanj} – 10, REF_{listopad} – 6; i KIZ_{listopad} – 6.

Za određivanje koncentracija MT i TP, probavne žlijezde su usitnjene, a potom im je dodan ohlađeni pufer za homogenizaciju opisan u poglavlju 3.2.3., uz dodatak 0,5 M saharoze (Sigma Aldrich, SAD) u omjeru masa : volumen = 1 : 4. Nakon toga, suspenzija je homogenizirana prema postupku navedenom u poglavlju 3.2.3., a zatim centrifugirana pri $50\,000 \times g$, 120 minuta na $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Avanti J-E centrifuga; Beckman Coulter, SAD). Dobiveni supernatant (S50) korišten je za analizu MT i TP.

Za određivanje koncentracije GSH, dio tkiva probavne žlijezde homogeniziran je u ohlađenoj 5 %-tnoj sulfosalicilnoj kiselini (SSA) (Kemika, Hrvatska) u omjeru masa : volumen = 1 : 5, a zatim centrifugiran pri $10\,000 \times g$, 10 minuta na $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Biofuge Fresco, Heraeus, Njemačka). Dobiveni supernatant (S10–SSA) upotrijebljen je za analizu GSH.

Drugi dio tkiva probavne žlijezde, namijenjen analizama CAT, GST, MDA i AChE, homogeniziran je u ohlađenom 50 mM kalij-fosfatnom puferu (KFP) (Kemika, Hrvatska; pH 8,1 pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) u omjeru masa : volumen = 1 : 5. Nakon homogenizacije, uzorci su podvrgnuti različitim postupcima centrifugiranja (Avanti J-E centrifuga): prvo pri $3000 \times g$, 10 minuta na $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$, čime je dobiven supernatant (S3–KFP) za analizu MDA, te zatim pri $10\,000 \times g$, 30 minuta na $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$, čime je dobiven supernatant (S10–KFP) za analize aktivnosti CAT, GST i AChE. Svi supernatanti za mjerenja biomarkera pohranjeni su na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do trenutka analize.

Analize biomarkera provedene su spektrofotometrijski, korištenjem mikrotitracijskog spektrofotometra Infinite M200 (Tecan, Švicarska). Specifične apsorbancije pri kojima su određivani pojedini biomarkeri opisane su u narednim poglavljima.

3.4.2. Mjerenje MT

Za određivanje koncentracije MT-a korištena je modificirana metoda Viarenga i sur. (1997), kako su je opisali Bourdineaud i sur. (2021). Supernatant S50 (250 μ L) služio je kao početni uzorak za izdvajanje MT-a putem diferencijalnog frakcijskog taloženja, koristeći mješavinu etanola i kloroforma (CARLO ERBA Reagents, Italija, i Fischer Chemical, UK). Cjelokupni postupak taloženja proveden je na ledu, a kako bi se spriječila denaturacija proteina, otapala i pufer za ispiranje prethodno su ohlađeni na -20°C .

Prvi korak uključivao je uklanjanje proteina molekulske mase iznad 20 kDa. U Eppendorf epruvetu (1,5 mL) dodano je 250 μ L supernatanta S50, 262 μ L hladnog apsolutnog etanola (-20°C) i 20 μ L hladnog kloroforma (-20°C). Uzorci su kratko miješani na vrtložnoj miješalici MS1 (Ika-Works, Njemačka), zatim centrifugirani (Biofuge Fresco; Kendro Laboratory Products, SAD) 6 minuta pri $12\,000 \times g$ na 2°C . Dobiveni supernatant (S12) prenesen je u ohlađene Eppendorf epruvete (2 mL).

U drugom koraku provodilo se taloženje MT–bogate frakcije. U svaku epruvetu sa supernatantom S12 dodano je 1,35 mL hladnog apsolutnog etanola (-20°C), što čini trostruki volumen supernatanta S12. Uzorci su promućkani na vrtložnoj miješalici, ostavljeni na -20°C jedan sat, a zatim centrifugirani pri $12\,000 \times g$ i 2°C tijekom 6 minuta. Supernatant je uklonjen, a epruvete ocijeđene na filter papiru.

Treći korak uključivao je ispiranje taloga otopinom koja sadrži etanol, kloroform i 20 mM Tris/HCl pufer (volumni omjer 87 : 1 : 12) čime su uklonjene preostale nečistoće niskomolekulskih tiola. Uzorci su centrifugirani pri $12\,000 \times g$ na 2°C tijekom 6 minuta, a talozi su sušeni u struji dušika radi uklanjanja alkohola. Nakon sušenja, talozi s MT otopljeni su u 35 μ L 0,25 M NaCl (Merck, Njemačka) i 35 μ L 4 mM EDTA/1 M HCl (Merck, Njemačka).

Zatim je uzorcima dodano 1055 μ L 5,5–ditio–bis–2–nitrobenzojeve kiseline (DTNB) (Sigma Aldrich, SAD), otopljene u 0,2 M kalij-fosfatnom puferu/2 M NaCl (Kemika, Hrvatska, i Merck, Njemačka), pH 8. Uzorci su centrifugirani pri $12\,000 \times g$ na 20°C tijekom 3 minute, a supernatant prenesen u čiste epruvete. Iz svakog uzorka otpipetirano je 200 μ L na mikroploču u triplicatu, te je apsorbancija izmjerena na 412 nm. Za kalibraciju je korišten reducirani GSH kao referentni standard (2,5 – 25 μ g GSH). Sadržaj MT-a izražen je prema ukupnoj razini proteina (μ g MT mg^{-1} proteina), a metoda analize ukupnih proteina opisana je u sljedećem poglavlju.

3.4.3. Analiza TP

Kvantifikacija TP-a provedena je prema Bradford (1976) metodi, prilagođenoj za mikroploče. Ova metoda se temelji na reakciji proteina s Coomassie brilliant blue G-250 (CBB; Serva, Feinbiochemia, Njemačka), pri kojoj se anionska boja veže na NH_3 skupine proteina. Vezanje CBB-a uzrokuje promjenu boje reagensa te pojavu apsorpcijskog maksimuma na 595 nm.

Priprema CBB reagensa:

1. Otopina A: 100 mg CBB-a dodano je u 50 mL etanola (95 %; CARLO ERBA Reagents, Italija), uz miješanje dok se sav CBB ne otopi.
2. Otopina B: 100 mL fosforne kiseline (H_3PO_4 ; 85 % p.a., Kemika, Hrvatska) razrijeđeno je s 500 mL redestilirane vode.
3. Pomiješane su otopine A i B u tamnoj boci te je dodana redestilirana voda do ukupnog volumena od 1 L. Otopina je ostavljena preko noći na $+4^\circ\text{C}$, zatim profiltrirana i pohranjena u tamnoj boci na $+4^\circ\text{C}$ do analize.

Prije analize, CBB reagens zagrijan je na sobnu temperaturu. Za mjerenje je u 10 μL razrijeđenog uzorka S50 (20 puta u 20 mM Tris/HCl puferu) dodano 300 μL CBB reagensa. Nakon inkubacije od 10 minuta, apsorbancija je izmjerena na 595 nm. Kalibracijska krivulja izrađena je korištenjem albumina goveđeg seruma (BSA, engl. *Bovine Serum Albumin*) (Serva, Njemačka) u koncentracijskom rasponu od 0,0625 do 0,500 mg mL^{-1} BSA kao referentnog standarda.

3.4.4. Analiza CAT

Aktivnost CAT mjerena je praćenjem smanjenja apsorbancije na 240 nm, koristeći molarni ekstinkcijski koeficijent od $43,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Aebi, 1984). Mjerenje je provedeno u UV-prozirnim mikropločama, a korištena je mikrometoda prema Li i Schellhornu (2007) uz prilagodbe.

Pripremljen je KFP (50 mM, pH 7,0; Kemika, Hrvatska) te otopina H_2O_2 (Suprapur®, Merck, Njemačka) konačne koncentracije 10,34 mM, dobivena razrijeđenjem 30 %-tnog H_2O_2 . U 10 μL uzorka (S10-KFP) prethodno razrijeđenog 15 puta u 50 mM KFP (pH 7,0) dodano je 290 μL otopine H_2O_2 . Apsorbancija je mjerena svakih 10 sekundi tijekom jedne minute na 25°C . Aktivnost katalaze izražena je kao količina razgrađenog H_2O_2 u μmol po minuti po mg

proteina ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteina). Koncentracije proteina u frakcijama S10-KFP određene su prema metodi opisanoj u poglavlju 3.4.3.

3.4.5. Analiza GSH

Ukupni GSH određen je prema metodi Tietzea (1969), prilagođenoj za mikroploču prema Rahmanu i sur. (2006). Metoda se temelji na reciklirajućem spektrofotometrijskom testu koji koristi reakciju GSH s DTNB-om, stvarajući žuto obojenu 5-tio-2-nitrobenzojevu kiselinu (TNB) čiji je intenzitet proporcionalan koncentraciji GSH u uzorku.

Sve otopine pripremljene su u 100 mM KFP s dodatkom 1 mM EDTA dinatrijeve soli, pH 7,5. Na mikroploču je u triplicatu nanoseno 20 μL uzorka (S10-SSA razrijeđen pet puta u Milli-Q vodi). Dodano je 150 μL otopine koja sadrži DTNB (0,108 mM) i glutation-reduktazu (0,171 U mL^{-1}). Nakon miješanja, mikroploča je ostavljena 5 minuta u mraku. Potom je dodano 50 μL otopine NADPH (0,192 mM), a apsorbancija je mjerena na 412 nm svakih 60 sekundi tijekom 5 minuta na 25 °C. Reducirani glutation (GSH; 3,125 – 12,5 nM mL^{-1}), korišten kao referentni standard, pripremljen je u 1 % SSA. Rezultati su izraženi kao nmol GSH po gramu mase mokrog tkiva (nmol g^{-1} tkiva).

3.4.6. Analiza GST

Za analizu aktivnosti GST, primijenjena je modificirana metoda prema Habigu i sur. (1974), prilagođena za upotrebu u mikropločama.

Uzorci (S10–KFP) su razrijeđeni pet puta u 0,1 M natrij-fosfatnom puferu (pH 6,5). Na mikroploču je nanoseno 5 μL razrijeđenog uzorka u triplicatu te je dodano 10 μL 20 mM GSH otopine (ko-supstrat, konačna koncentracija 1 mM). Potom je ispipetirano 185 μL otopine 1 mM 1–kloro–2,4–dinitrobenzena (CDNB) kao supstrata za GST. Apsorbancija je mjerena na 340 nm, 25 °C, u intervalima od 15 sekundi tijekom 3 minute. Enzimska aktivnost izražena je u μmol razgrađenog CDBN po minuti po mg proteina ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteina), a za izračun je korišten apsorpcijski koeficijent od 9,6 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Za određivanje koncentracije proteina u S10-KFP frakcijama korištena je metoda iz poglavlja 3.4.3.

3.4.7. Analiza MDA

Za određivanje koncentracije MDA korišten je spektrofotometrijski postupak prema Botsoglou i sur. (1994), s modifikacijama opisanim u Mijošek i sur. (2019).

U 250 μL uzorka (S3-KFP) dodano je 500 μL otopine 1 %-tnog butiliranog hidroksitoluena (BHT) u etanolu i 10 %-tne trikloroetene kiseline (TCA) u Milli-Q vodi (BHT : TCA = 1 : 100). Uzorci su pomiješani na vrtložnoj miješalici i stavljeni 15 minuta na led. Slijedilo je centrifugiranje pri $4000 \times g$, 15 minuta na 4°C . Supernatant ($\sim 750 \mu\text{L}$) je prenesen u epruvete, te je dodano 500 μL TBA otopine (TBA u Milli-Q vodi). Epruvete su grijane u grijaćem bloku (Dri Block Heater, Techne (Cambridge), Ltd. UK) 30 minuta na 100°C , stvarajući ružičasti fluorescentni produkt. Nakon hlađenja na ledu, 200 μL uzorka je preneseno u triplicatu na mikroploču. Apsorbancija je mjerena pri valnoj duljini od 535 nm. Kalibracijska krivulja je uspostavljena korištenjem MDA standarda (0,9 – 15 μM) u puferu za homogenizaciju (poglavlje 3.4.1.). Osnovna otopina standarda (3,035 mM MDA) pripremljena je iz 1,1,3,3-tetraetoksipropana (Sigma-Aldrich, SAD), preteče MDA, koji zagrijavanjem u kiselim uvjetima (0,01 N HCl) hidrolizom prelazi u MDA. Slijepa proba (pufer za homogenizaciju; poglavlje 3.4.1.) i standardi podvrgnuti su istom tretmanu kao i uzorci. Rezultati su izraženi u nmol MDA po gramu mase mokrog tkiva (nmol g^{-1} tkiva).

3.4.8. Analiza AChE

Za analizu aktivnosti AChE korišten je spektrofotometrijski postupak prema Ellman i sur. (1961), prilagođen za mikroploče.

U 5 μL uzorka (S10-KFP) dodano je 250 μL 0,1 M KFP (pH 7,4 pri 25°C) koji sadrži 0,1 mM DTNB (Sigma Aldrich, SAD). Reakcijska smjesa je inkubirana 15 minuta u mraku. Aktivnost enzima je pokrenuta dodatkom 25 μL 10 mM acetiltiokolin-jodida (konačna koncentracija: 0,877 mM; Sigma Aldrich, SAD). Porast apsorbancije na 412 nm praćen je tijekom 3 minute u intervalima od 15 sekundi. Enzimska aktivnost izražena je u nmol acetiltiokolina hidroliziranog po minuti po mg proteina ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteina). Za proračun je korišten apsorpcijski koeficijent od $13,6 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Proteini su kvantificirani metodom opisanom u poglavlju 3.4.3.

3.5. Analiza raspodjele metala među citosolskim biomolekulama iz probavne žlijezde školjkaša pomoću HPLC-ICP-MS

Za analizu raspodjele metala među citosolskim molekulama korišten je vezani sustav visokodjelotvorne tekućinske kromatografije i spektrometra masa s induktivno spregnutom plazmom (HPLC-ICP-MS, HPLC, Agilent 1260 Infinity II; ICP-MS, Agilent 7900; Agilent Technologies, SAD).

Korišteni HPLC sustav opremljen je s kvaterarnom visokotlačnom pumpom, otplinjačem, pećnicom kolone s izmjenjivačem topline, termostatiranim automatskim dodavačem uzoraka s injektorom, UV/VIS detektorom s diodnim nizom (DAD detektor) te sakupljačem frakcija (Agilent InfinityLab LC Series 1260 Infinity II Bio-inert Fraction Collector). Korišteni HPLC sustav je bioinertan, odnosno cijeli put protoka ne uključuje čelik i druge legure koje sadrže metale poput željeza, nikla, kobalta, kroma, molibdena ili bakra, koji mogu ometati analizu bioloških uzoraka. Tijekom kromatografskog razlučivanja, uzorci su bili na temperaturi od 4 °C, temperatura u pećnici kolone bila je postavljena na 22 °C te su se pratile valne duljine na 254 nm i 280 nm pomoću DAD detektora. Računalo s programskim paketom OpenLab CDS verzijom 2.7. (Agilent Technologies, SAD) je prikupljalo podatke i upravljalo HPLC sustavom.

Kromatografske tehnike koje su korištene za razdvajanje citosolskih biomolekula su: SE kromatografija kojom je izučavana raspodjela odabranih metal(oid)a između citosolskih biomolekula različite molekulske mase te ionsko-izmjenjivačke tehnike (AEX i CEX) kojima je izučavana raspodjela između citosolskih biomolekula različitog negativnog odnosno pozitivnog naboja u probavnoj žlijezdi školjkaša *U. crassus*.

Alikvoti S50 pohranjeni na -80 °C su prije analize centrifugirani 10 minuta na 11 000 x g na 4 °C. Volumen injektiranja uzorka za sve kromatografske tehnike je bio 100 µL, a dodatne informacije o kolonama i mobilnim fazama te protokolima razdvajanja za korištene kromatografske tehnike (SE₂₀₀-HPLC, AEX-HPLC i CEX-HPLC) dane su u Tablici 3.

Analizirano je četrnaest metal(oid)a korištenjem ICP-MS sustava s opremom za uvođenje uzoraka koji se sastoji od SeaSpray raspršivača (Glass expansion, Australia) i kvarcne komore za raspršivanje (Meinhard, Njemačka). Plin koji se koristio za generaciju plazme za ionizaciju uzorka od interesa je bio argon. Također se koristio helij za uklanjanje specija koje se mogu stvoriti nakon ionizacije uzorka (npr. ClO, NaAr, ArCl) te interferirati s analizom metal(oid)a poput ⁵¹V, ⁶³Cu i ⁷⁵As. Dodatne informacije o postavkama ICP-MS sustava prikazane su u Tablici 4. Za analizu podataka i upravljanje vezanim sustavom HPLC-ICP-MS-a korišteno je

računalo s programskim paketom MassHunter Workstation 4.2. (Agilent Technologies, SAD). Vremena integracije za svaki element prikazana su u Tablici 5.

Tablica 3. Kolone, mobilne faze i protokoli razdvajanja za kromatografske tehnike korištene za razdvajanje citosolskih biomolekula koje vežu metale iz probavne žlijezde slatkovodnog školjkaša *U. crassus*: razdvajanje po veličini – SE₂₀₀–HPLC, razdvajanje po negativnom naboju – AEX–HPLC i razdvajanje po pozitivnom naboju – CEX–HPLC.

	SE ₂₀₀ –HPLC	AEX–HPLC	CEX–HPLC
Kolona	Superdex® 200 Increase 10/300 GL (Cytiva, SAD) područje razlučivanja od 10 – 600 kDa	MonoQ™ 5/50 GL (GE Healthcare BioSciences, SAD)	MonoS™ 5/50 GL (GE Healthcare BioSciences, SAD)
Mobilna faza	20 mM Tris-HCl/Base (Sigma Aldrich, SAD; pH 8,1, 22 °C)	<u>A</u> : 4 mM Tris–HCl/Base (Sigma Aldrich, SAD; pH 7,4; 22 °C) <u>B</u> : 10 mM Tris–HCl/Base (Sigma Aldrich, SAD) + 500 mM amonij acetat (NH ₄ OAc; Merck KgaA, Njemačka) (pH 7,4; 22 °C)	<u>A</u> : 15 mM fosfatni pufer (Sigma Aldrich, SAD; pH 7,4; 22 °C) <u>B</u> : 15 mM fosfatni pufer (Sigma Aldrich, SAD) + 500 mM amonij acetat (NH ₄ OAc; Merck KgaA, Njemačka) (pH 7,4; 22 °C)
Protok / mL min⁻¹	0,5	1,0	
Metoda razdvajanja	Izokratna analiza: mobilna faza 100 %, 60 min	1. korak: mobilna faza A 100%, 5 min 2. korak: linearni gradijent 0–100% mobilna faza B, 20 min 3. korak: mobilna faza B 100%, 5 min	

Tablica 4. Postavke i karakteristike Agilent 7900 (Agilent Technologies, SAD).

Postavka	Vrijednost
RF snaga / W	1550
Protok argona / L min ⁻¹	1,07
Protok helija / mL min ⁻¹	1,07
Brzina peristaltičke pumpe / rps	0,5
Baklja	kvarc
Konusi	nikal
Tip akvizicije	<i>time resolved analysis</i>

Tablica 5. Mase analiziranih metal(oid)a i vremena integracije (s)

Element	Masa	Vrijeme integracije / s
Mn	55	0,200
Fe	56	0,200
Co	59	0,200
Cu	63	0,200
Zn	66	0,200
As	75	0,300
Se	82	0,300
Mo	98	0,200
Ag	109	0,200
Cd	111	0,200
Cs	133	0,200
Tl	205	0,200
Pb	208	0,200
Bi	209	0,200

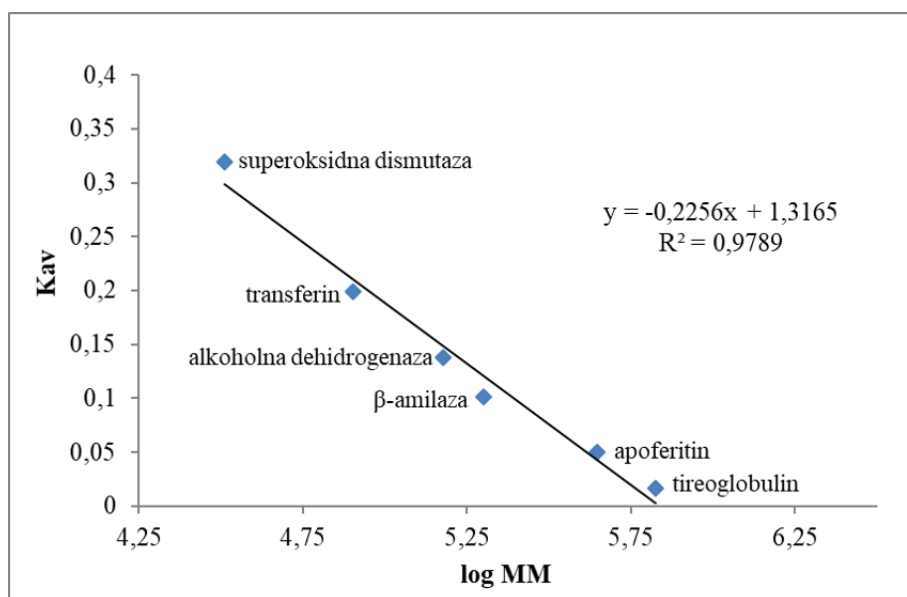
3.5.1. Izrada baždarne krivulje za SE₂₀₀ kromatografsku kolonu

Za kalibraciju Superdex® 200 Increase 10/300 GL (Cytiva, SAD), šest proteinskih standarda (tireoglobulin, apoferitin, β-amilaza, alkoholna dehidrogenaza, transferin i superoksidna dismutaza; Sigma, SAD) propušteno je kroz kolonu pod istim uvjetima kao i uzorci. Također su dodatno pušteni standardi MT-a (metalotioneinske izoforme MT1 i MT2; Enzo Life Sciences, SAD) kao dobro poznatog proteina za vezanje metala i detoksikaciju (Amiard, 2006; Tablica 6). Vremena eluiranja svih proteinskih standarda određena su prema položaju maksimuma apsorbancije na 280 nm (Tablica 6). Baždarna krivulja zajedno s jednadžbom pravca prikazani su na Slici 11. Prazni volumen kolone Superdex® 200 Increase određen je pomoću plavog dekstrana (definirana molekulska masa (MM): 2000 kDa; Sigma, SAD) koji je eluirao na koloni pri 16,26 minuta. Kav vrijednost izračunata je prema formuli: $Kav = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$, gdje V_e predstavlja volumen elucije pika, V_0 prazni volumen i V_t ukupni volumen kolone.

Tablica 6. Izvor, vremena eluiranja (t_e), molekulske mase (MM) i koncentracije (mg mL^{-1}) šest

Proteinski standard	Izvor	t_e / min	MM / kDa	Koncentracija / mg mL^{-1}
Tireoglobulin	Štitnjača goveda	16,79	669	5,0
Apoferitin	Slezena konja	17,84	443	3,0
β-amilaza	Krumpir	19,49	200	4,0
Alkoholna dehidrogenaza	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20,65	150	5,0
Transferin	Čovjek	22,57	80	1,0
Superoksidna dismutaza	Goveđi eritrociti	26,38	32	5,0
MT1	Jetra zeca	30,32	6,145	0,5
MT2	Jetra zeca	29,47	6,145	0,5

proteinskih standarda korištenih za kalibraciju kolone (Superdex® 200 Increase 10/300 GL, Cytiva) te metaloteinskih (MT) izoformi MT1 i MT2.



Slika 11. Baždarna krivulja za kolonu Superdex® 200 Increase 10/300 GL (Cytiva, SAD). Prikaz linearne ovisnosti Kav vrijednosti i logaritma molekulske mase proteinskih standarda, te jednažbe pravca zajedno s koeficijentom determinacije (R^2).

3.6. Analiza odabranih citosolskih biomolekula iz probavne žlijezde školjkaša pomoću dvodimenzionalnog HPLC razdvajanja i tehnika spektrometrije masa

U radu su korištena dva sustava dvodimenzionalnog HPLC razdvajanja citosolskih biomolekula koje vežu metale. Prvi je sustav korišten za analizu citosolskih biomolekula koje vežu Fe, a uključivao je razdvajanje biomolekula po negativnom naboju (AEX) u prvom koraku te razdvajanje po veličini (SE₂₀₀) odabranih AEX-frakcija u drugom koraku – dvodimenzionalni AEX–SE₂₀₀–HPLC sustav. Drugi se sustav koristio za analizu MT i drugih citosolskih biomolekula koje vežu Zn, Cu, Cd, Ag i Pb, a uključivao je razdvajanje biomolekula po veličini (SE₇₅) u prvom koraku te razdvajanje po negativnom naboju (AEX) odabranih SE-frakcija u drugom koraku – dvodimenzionalni SE₇₅-AEX-HPLC sustav.

3.6.1. Dvodimenzionalno AEX–SE₂₀₀–HPLC razdvajanje

3.6.1.1. Prva dimenzija – razdvajanje citosolskih molekula prema negativnom naboju pomoću AEX-HPLC-a

Za razdvajanje citosolskih molekula po negativnom naboju i dobivanje početnih profila metal(oid)a vezanih za citosolske biomolekule različitog negativnog naboja koristio se isti

vezani sustav HPLC–ICP–MS opisan u poglavlju 3.5. te kolona MonoQ™ 5/50 GL (GE Healthcare BioSciences, SAD). Prije analize, alikvoti S50 su centrifugirani 10 minuta na 11 000 x g na 4 °C. Na kolonu je aplicirano 100 µL S50 uzorka, a sam protokol razdvajanja opisan je u Tablici 3.

Na osnovi početnih profila metal(oid)a identificirane su AEX frakcije koje će u idućem koraku biti razdvojene na temelju molekulskih masa primjenom SE₂₀₀–HPLC-a. Frakcije od interesa su skupljene u plastične epruvete u intervalima od 30 sekundi pomoću sakupljača frakcija. Skupljene frakcije su prenesene u konične plastične epruvete, stavljene na led te je dodan DTT (konačna koncentracija 1 mM; Honeywell Fluka, Njemačka). Daljnji korak je bilo ukoncentriravanje frakcija na volumen od ~120 µL pomoću Amicon Ultra filtera (granična vrijednost filtracije od 3 kDa; 0,5 mL; Merck, Millipore, Irska).

3.6.1.2. Druga dimenzija – razdvajanje odabranih AEX–frakcija po veličini pomoću SE₂₀₀–HPLC-a

Prije analize, skupljene AEX–frakcije su centrifugirane 10 minuta na 11 000 x g na 4 °C. 100 µL ukoncentriranih AEX–frakcija je aplicirano na SE₂₀₀ kolonu za provedbu razdvajanja biomolekula na temelju molekulskih masa. Za dobivanje SE₂₀₀–profila metal(oid)a koristio se isti vezani sustav HPLC–ICP–MS opisan u poglavlju 3.5. te SE₂₀₀ kolona (Superdex® 200 Increase 10/300 GL (Cytiva, SAD)), dok je za skupljanje SE₂₀₀ frakcija od interesa korišten odvojeno SE₂₀₀–HPLC sustav i automatski sakupljač frakcija. Protokol razdvajanja je opisan u Tablici 3, a odabrane SE₂₀₀–AEX frakcije su skupljene u plastične epruvete u intervalima od 1 minute. Način daljnje obrade frakcija i konačno ukoncentriravanje na volumen od 50 µL je opisan u prethodnom poglavlju (3.6.1.1.).

3.6.2. Dvodimenzionalno SE₇₅–AEX–HPLC razdvajanje

3.6.2.1. Prva dimenzija – razdvajanje molekula po veličini pomoću SE₇₅–HPLC-a

Za razdvajanje citosolskih molekula po veličini i dobivanje početnih profila metal(oid)a vezanih za citosolske biomolekule različitih molekulskih masa koristio se isti vezani sustav HPLC–ICP–MS opisan u poglavlju 3.5. te kolona Superdex 75 (GE Healthcare Bio Sciences AB, Švedska). Prije analize, alikvoti S50 su centrifugirani 10 minuta na 11 000 x g na 4 °C. Na kolonu je aplicirano 100 µL S50 uzorka, a sam protokol razdvajanja bio je identičan kao za

SE₂₀₀ (Tablica 3). Za kalibraciju kolone koristili su se sljedeći proteinski standardi: BSA (66 kDa; t_e = 17,2 min), ovalbumin (43 kDa; t_e = 21,8 min), superoksidna dismutaza (32.5 kDa; t_e = 19,9 min), ugljična anhidraza (29 kDa; t_e = 21,3 min) i vitamin B12 (1.35 kDa; t_e = 36,1 min). Jednadžba pravca je sljedeća: $y = -0,3566x + 1,748$ ($y = K_{av}$; $x = \log MM$).

Na osnovi početnih profila metal(oid)a identificirane su SE₇₅ frakcije koje će u idućem koraku biti razdvojene na temelju negativnog naboja primjenom AEX–HPLC-a. Frakcije od interesa su skupljene u plastične epruvete u intervalima od 1 minute pomoću sakupljača frakcija. Način daljnje obrade frakcija i konačno ukoncentriravanje na volumen od 120 μ L je opisan u poglavlju 3.6.1.1..

3.6.2.2. Druga dimenzija –razdvajanje odabranih SE₇₅–frakcija prema naboju pomoću AEX–HPLC-a

Prije analize, skupljene SE₇₅–frakcije su centrifugirane 10 minuta na 11 000 x g na 4 °C. 100 μ L ukoncentriranih SE₇₅–frakcija je aplicirano na AEX kolonu za provedbu razdvajanja biomolekula na temelju negativnog naboja. Za dobivanje AEX-profila metal(oid)a koristio se isti vezani sustav HPLC–ICP–MS opisan u poglavlju 3.5. te AEX kolona MonoQ™ 5/50 GL (GE Healthcare BioSciences, SAD), dok je za skupljanje AEX frakcija od interesa korišten odvojeno AEX-HPLC sustav i automatski sakupljač frakcija. Korišteni puferi bili su A: 4 mM Tris–HCl/Base (Sigma Aldrich, SAD; pH 7,4; 22 °C) i B: 10 mM Tris–HCl/Base (Sigma Aldrich, SAD) + 500 mM amonij acetat (NH₄OAc; Merck KGaA, Njemačka) (pH 7,4; 22 °C), a protokol razdvajanja sljedeći: 1. korak: mobilna faza A 100%, 5 min; 2. korak: linearni gradijent 0 – 50% mobilna faza B, 25 min; 3. korak: mobilna faza B 100%, 5 min. Odabrane AEX–SE₇₅ frakcije su skupljene u plastične epruvete u intervalima od 30 sekundi. Način daljnje obrade frakcija i konačno ukoncentriravanje na volumen od 50 μ L je opisan u poglavlju 3.6.1.1..

3.6.3. MALDI-TOF MS analiza odabranih frakcija dobivenih razdvajanjem citosola pomoću dvodimenzionalnog HPLC-a

Za MALDI-TOF MS analizu korišten je Bruker Microflex LT spektrometar masa, opremljen Bruker flexControl v 3.4 i flexAnalysis v 3.4 programom (Bruker Daltonics, Njemačka). Volumeni od 1 μ L ukoncentriranih AEX–SE₇₅ i SE₂₀₀–AEX uzoraka nanješeni su u dva replikata na MALDI-pločicu (Bruker Daltonik, Njemačka) i ostavljeni da se osuše na zraku pri

sobnoj temperaturi. Nakon toga, 1 μL HCCA matriksa, koji sadrži α -cijano-4-hidroksicimetnu kiselinu (10 mg mL^{-1} ; Bruker Daltonik, Njemačka) u 50 %-tnom acetonitrilu (Optima® LC/MS razreda, Thermo Fisher Scientific, UK) i 2,5 %-tnoj trifluorooctenokiselini (Sigma Aldrich, SAD), dodan je na uzorak i ostavljen da se osuši na zraku pri sobnoj temperaturi.

Spektar masa sniman je ručno. Ioni su snimljeni u pozitivnom linearnom modu (raspon masa 5-100 kDa), a pozitivni ioni su izdvojeni pri naponu ubrzanja od 20 kV. Spektri su rezultat prosjeka pojedinačnih spektara dobivenih iz 1000 laserskih pulseva.

3.7. Analiza podataka

Osnovni izračuni napravljeni su u programu Microsoft Office Excel 2011. Grafovi su izrađeni u Microsoft Office Excel 2011 i SigmaPlot 11.0 za Windows. SigmaPlot 11.0 i Statistica 12.5 za Windows korišteni su za statističke analize. Razina značajnosti postavljena je na 95 % ($p < 0,05$) za sve primijenjene testove.

Usporedbe koncentracija metal(oid)a u otopljenoj i partikulatnoj frakciji vode, u sedimentu, ukupnih i citosolskih koncentracija metala(oid)a te promjene u aktivnosti/koncentracijama biomarkera u probavnoj žlijezdi vrste *U. crassus* na dvjema postajama unutar svake sezone provedene su Mann–Whitney U testom. Isti test korišten je i za usporedbu koncentracija metal(oid)a u partikulatnoj frakciji, sedimentu te biomarkerskih aktivnosti/koncentracija između sezona na svakoj postaji. Kruskal-Wallis ANOVA i Dunnov post hoc test korišten je za usporedbu koncentracija metal(oid)a u otopljenoj frakciji vode, ukupnih i citosolskih koncentracija metal(oid)a te biometrijskih pokazatelja između sezona na svakoj postaji.

Spearmanova korelacijska analiza korištena je za određivanje stupnja povezanosti koncentracija elemenata u probavnoj žlijezdi i njihovih koncentracija u vodi/sedimentu. Pearsonova korelacijska analiza korištena je za izračun koeficijenata korelacije između razina MT-a i određenih metala.

Kromatografski profili su rađeni u programu SigmaPlot 11.0 za Windows. Pearsonova korelacijska analiza korištena je za određivanje stupnja povezanosti maksimalnog intenziteta pika (cps) i citosolskih koncentracija u probavnoj žlijezdi.

MALDI-TOF MS spektari obrađeni su u flexAnalysis v 3.4 programu (Bruker Daltonics, Njemačka).

4. REZULTATI

4.1. Koncentracije metal(oid)a u vodi i sedimentu

4.1.1. Koncentracije otopljenih metal(oid)a u vodi

U Tablici 7 prikazane su koncentracije otopljenih elementa u tragovima i makroelementa u uzorcima riječne vode, koji su prikupljeni u srpnju 2020., lipnju i listopadu 2021. godine na dvije postaje (referentna postaja – REF; industrijska zona grada Karlovca – KIZ) na rijeci Mrežnici.

Na obje postaje i u svim sezonama koncentracije Ag i Pb su uvijek bile ispod granice detekcije (LOD) (Tablica 7). Na postaji REF, ispod LOD bile su koncentracije Al (lipanj), Bi i Ni (listopad) te Zn (obje sezone). Na postaji KIZ, koncentracije Bi su bile ispod LOD u svim sezonama, dok su Cu, Ni i Zn bili ispod LOD u listopadu (Tablica 7).

Koncentracije analiziranih elemenata u tragovima slijedile ovaj raspored: Sr (74,6 – 103 $\mu\text{g L}^{-1}$) > Fe (4,68 – 16,2 $\mu\text{g L}^{-1}$) > Ba (5,70 – 6,97 $\mu\text{g L}^{-1}$) > Mn (0,785 – 3,42 $\mu\text{g L}^{-1}$) > Al (GD – 2,86 $\mu\text{g L}^{-1}$) > Mo (0,417 – 0,978 $\mu\text{g L}^{-1}$) > Zn (GD – 0,876 $\mu\text{g L}^{-1}$) > U (0,487 – 0,662 $\mu\text{g L}^{-1}$) > V (0,419 – 0,490 $\mu\text{g L}^{-1}$) > Rb (0,262 – 0,443 $\mu\text{g L}^{-1}$) > Se (0,076 – 0,350 $\mu\text{g L}^{-1}$) > As (0,159 – 0,336 $\mu\text{g L}^{-1}$) > Cu (GD – 0,182 $\mu\text{g L}^{-1}$) > Cr (0,030 – 0,179 $\mu\text{g L}^{-1}$) > Ni (GD – 0,067 $\mu\text{g L}^{-1}$) > Co (0,025 – 0,041 $\mu\text{g L}^{-1}$) > Sb (0,027 – 0,036 $\mu\text{g L}^{-1}$) > Cd (0,002 – 0,026 $\mu\text{g L}^{-1}$) > Sn (GD – 0,015 $\mu\text{g L}^{-1}$) > Tl (0,004 – 0,006 $\mu\text{g L}^{-1}$) > Cs (0,001 – 0,003 $\mu\text{g L}^{-1}$) > Bi (GD – 0,001 $\mu\text{g L}^{-1}$) > Ag, Pb (<GD) (Tablica 7).

Tablica 7. Koncentracije otopljenih metal(oid)a u vodi na dvjema postajama (referentna postaja – REF; industrijska zona grada Karlovca – KIZ) u tri sezone (srpanj 2020., lipanj i listopad 2021. godine) na rijeci Mrežnici. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija ($n = 3$) te su izraženi u $\mu\text{g L}^{-1}$ za elemente u tragovima, dok su za makroelemente (Ca, K, Mg, Na) koncentracije izražene u mg L^{-1} .

	Sezona	Postaja	
		REF	KIZ
Ag	Srpanj 2020.	< 0,001	< 0,001
	Lipanj 2021.	< 0,001	< 0,001
	Listopad 2021.	< 0,001	< 0,001
Al	Srpanj 2020.	$0,781 \pm 0,1^{\text{A}}$	$1,82 \pm 0,35$
	Lipanj 2021.	< 0,556 ^B	$1,81 \pm 0,32$
	Listopad 2021.	$0,634 \pm 0,067^{\text{AB}}$	$2,86 \pm 1,9$
As	Srpanj 2020.	$0,266 \pm 0,034$	$0,336 \pm 0,03$
	Lipanj 2021.	$0,162 \pm 0,004$	$0,159 \pm 0,01$
	Listopad 2021.	$0,285 \pm 0,015$	$0,310 \pm 0,034$
Ba	Srpanj 2020.	$5,70 \pm 0,19^{\text{A}}$	$6,29 \pm 0,12$
	Lipanj 2021.	$6,71 \pm 0,22^{\text{B}}$	$6,97 \pm 0,06$
	Listopad 2021.	$6,46 \pm 0,1^{\text{AB}}$	$6,88 \pm 0,02$
Bi	Srpanj 2020.	$0,001 \pm 0,000$	< 0,001
	Lipanj 2021.	$0,001 \pm 0,000$	< 0,001
	Listopad 2021.	< 0,001	< 0,001
Cd	Srpanj 2020.	$0,005 \pm 0,001$	$0,008 \pm 0,004$
	Lipanj 2021.	$0,010 \pm 0,001$	$0,009 \pm 0,001$
	Listopad 2021.	$0,006 \pm 0,002$	$0,002 \pm 0,000$
Co	Srpanj 2020.	$0,041 \pm 0,01^{\text{A}}$	$0,028 \pm 0,002$
	Lipanj 2021.	$0,030 \pm 0,001^{\text{AB}}$	$0,028 \pm 0,001$
	Listopad 2021.	$0,025 \pm 0,000^{\text{B}}$	$0,025 \pm 0,000$
Cr	Srpanj 2020.	$0,080 \pm 0,006^{\text{AB}}$	$0,053 \pm 0,012$
	Lipanj 2021.	$0,143 \pm 0,003^{\text{A}}$	$0,179 \pm 0,044$
	Listopad 2021.	$0,030 \pm 0,004^{\text{B}}$	$0,049 \pm 0,01$
Cs	Srpanj 2020.	$0,001 \pm 0,000$	$0,005 \pm 0,000^{\text{a}}$
	Lipanj 2021.	$0,001 \pm 0,000$	$0,002 \pm 0,000^{\text{b}}$
	Listopad 2021.	$0,001 \pm 0,000$	$0,003 \pm 0,000^{\text{ab}}$
Cu	Srpanj 2020.	< 0,053 ^A	$0,054 \pm 0,002$
	Lipanj 2021.	$0,144 \pm 0,065^{\text{B}}$	$0,182 \pm 0,05$
	Listopad 2021.	$0,071 \pm 0,031^{\text{AB}}$	< 0,053

^{A,B} statistički značajne razlike između sezona na REF postaji prema Kruskal-Wallis ANOVA i Dunnov post hoc test ($p < 0,05$)

^{a,b} statistički značajne razlike između sezona na KIZ postaji prema Kruskal-Wallis ANOVA i Dunnov post hoc test ($p < 0,05$)

Tablica 7. – nastavak

	Sezona	Postaja	
		REF	KIZ
Fe	Srpanj 2020.	$12,6 \pm 0,4^A$	$16,2 \pm 0,7^a$
	Lipanj 2021.	$4,68 \pm 0,64^B$	$6,21 \pm 0,15^b$
	Listopad 2021.	$7,49 \pm 0,26^{AB}$	$9,68 \pm 0,66^{ab}$
Mn	Srpanj 2020.	$2,40 \pm 0,01^A$	$3,42 \pm 0,08^a$
	Lipanj 2021.	$2,29 \pm 0,04^{AB}$	$1,66 \pm 0,08^{ab}$
	Listopad 2021.	$1,01 \pm 0,02^B$	$1,43 \pm 0,02^b$
Mo	Srpanj 2020.	$0,641 \pm 0,012^{AB}$	$0,640 \pm 0,016^{ab}$
	Lipanj 2021.	$0,438 \pm 0,002^A$	$0,417 \pm 0,007^a$
	Listopad 2021.	$0,978 \pm 0,008^B$	$0,921 \pm 0,002^b$
Ni	Srpanj 2020.	$0,088 \pm 0,04$	$0,053 \pm 0,006^a$
	Lipanj 2021.	$0,067 \pm 0,006$	$0,067 \pm 0,008^a$
	Listopad 2021.	$< 0,006$	$< 0,006^b$
Pb	Srpanj 2020.	$< 0,060$	$< 0,060$
	Lipanj 2021.	$< 0,060$	$< 0,060$
	Listopad 2021.	$< 0,060$	$< 0,060$
Rb	Srpanj 2020.	$0,335 \pm 0,014^{AB}$	$0,407 \pm 0,008^{ab}$
	Lipanj 2021.	$0,262 \pm 0,003^A$	$0,298 \pm 0,004^a$
	Listopad 2021.	$0,411 \pm 0,002^B$	$0,443 \pm 0,002^b$
Sb	Srpanj 2020.	$0,033 \pm 0,001$	$0,034 \pm 0,001$
	Lipanj 2021.	$0,027 \pm 0,001$	$0,030 \pm 0,001$
	Listopad 2021.	$0,032 \pm 0,002$	$0,036 \pm 0,001$
Se	Srpanj 2020.	$0,223 \pm 0,029$	$0,350 \pm 0,046^a$
	Lipanj 2021.	$0,105 \pm 0,011$	$0,098 \pm 0,003^{ab}$
	Listopad 2021.	$0,101 \pm 0,023$	$0,076 \pm 0,004^b$
Sr	Srpanj 2020.	$81,4 \pm 2,0$	$78,5 \pm 0,4^{ab}$
	Lipanj 2021.	$79,3 \pm 0,2$	$74,6 \pm 1,6^a$
	Listopad 2021.	$103 \pm 0,9$	$97,4 \pm 0,2^b$
Tl	Srpanj 2020.	$0,006 \pm 0,001$	$0,005 \pm 0,000$
	Lipanj 2021.	$0,004 \pm 0,000$	$0,004 \pm 0,000$
	Listopad 2021.	$0,006 \pm 0,000$	$0,005 \pm 0,000$

^{A,B} statistički značajne razlike između sezona na REF postaji prema Kruskal-Wallis ANOVA i Dunnov post hoc test ($p < 0,05$)

^{a,b} statistički značajne razlike između sezona na KIZ postaji prema Kruskal-Wallis ANOVA i Dunnov post hoc test ($p < 0,05$)

Tablica 7. – nastavak

	Sezona	Postaja	
		REF	KIZ
U	Srpanj 2020.	0,481 ± 0,03	0,525 ± 0,003 ^{ab}
	Lipanj 2021.	0,487 ± 0,006	0,490 ± 0,007 ^a
	Listopad 2021.	0,662 ± 0,005	0,654 ± 0,004 ^b
V	Srpanj 2020.	0,410 ± 0,01	0,455 ± 0,008
	Lipanj 2021.	0,425 ± 0,005	0,454 ± 0,003
	Listopad 2021.	0,419 ± 0,009	0,483 ± 0,007
Zn	Srpanj 2020.	< 0,519	< 0,519
	Lipanj 2021.	< 0,519	0,640 ± 0,2
	Listopad 2021.	< 0,519	< 0,519
Ca	Srpanj 2020.	44,7 ± 0,4	41,7 ± 2,2 ^a
	Lipanj 2021.	57,9 ± 0,5	56,1 ± 0,6 ^b
	Listopad 2021.	56,9 ± 3,6	48,3 ± 4,2 ^{ab}
K	Srpanj 2020.	0,314 ± 0,014 ^A	0,361 ± 0,030
	Lipanj 2021.	0,333 ± 0,009 ^{AB}	0,347 ± 0,006
	Listopad 2021.	0,494 ± 0,020 ^B	0,481 ± 0,044
Mg	Srpanj 2020.	10,9 ± 0,4 ^{AB}	10,8 ± 0,5 ^{ab}
	Lipanj 2021.	9,24 ± 0,02 ^A	9,19 ± 0,03 ^b
	Listopad 2021.	16,1 ± 1,0 ^B	14,2 ± 1,3 ^a
Na	Srpanj 2020.	1,05 ± 0,02 ^A	1,24 ± 0,12
	Lipanj 2021.	1,09 ± 0,01 ^{AB}	1,32 ± 0,03
	Listopad 2021.	1,20 ± 0,08 ^B	1,38 ± 0,13

^{A,B} statistički značajne razlike između sezona na REF postaji prema Kruskal-Wallis ANOVA i Dunnov post hoc test ($p < 0,05$)

^{ab} statistički značajne razlike između sezona na KIZ postaji prema Kruskal-Wallis ANOVA i Dunnov post hoc test ($p < 0,05$)

4.1.2. Koncentracije partikulatnih metal(oid)a u vodi

U Tablici 8 prikazane su koncentracije 22 elementa u tragovima i 4 makroelementa u partikulatnoj frakciji uzoraka riječne vode uzorkovanih u travnju i rujnu 2021. godine na dvije postaje (REF i KIZ) na rijeci Mrežnici.

Os svih analiziranih elemenata, jedino su koncentracije Cu u travnju na postaji KIZ bile ispod LOD (Tablica 8).

Koncentracije analiziranih makroelemenata su bile u sljedećem nizu: Ca (70,4 – 122 mg g⁻¹) > Mg (3,05 – 4,80 mg g⁻¹) > K (2,98 – 4,30 mg g⁻¹) > Na (0,437 – 1,07 mg g⁻¹) (Tablica 8), dok su koncentracije analiziranih elemenata u tragovima slijedile ovaj raspored: Al (13,1 – 32,6 mg g⁻¹) > Fe (18,0 – 24,8 mg g⁻¹) > Mn (0,389 – 2,56 mg g⁻¹) > Zn (68,4 – 262 µg g⁻¹) > Ba (59,3 – 80,8 µg g⁻¹) > Sr (35,0 – 78,9 µg g⁻¹) > V (40,3 – 73,8 µg g⁻¹) > Ni (10,7 – 46,0 µg g⁻¹) > Cr (20,6 – 40,8 µg g⁻¹) > Rb (11,4 – 24,3 µg g⁻¹) > Pb (3,49 – 19,2 µg g⁻¹) > As (4,14 – 9,57 µg g⁻¹) > Cu (GD – 8,20 µg g⁻¹) > Co (4,85 – 6,64 µg g⁻¹) > Cs (1,44 – 3,36 µg g⁻¹) > Sn (0,785 – 2,49 µg g⁻¹) > Se (0,648 – 1,47 µg g⁻¹) >

Mo (0,907 – 1,22 $\mu\text{g g}^{-1}$) > Ag (0,165 – 1,04 $\mu\text{g g}^{-1}$) > U (0,614 – 0,903 $\mu\text{g g}^{-1}$) > Tl (0,241 – 0,507 $\mu\text{g g}^{-1}$) > Bi (0,144 – 0,314 $\mu\text{g g}^{-1}$) > Cd (0,241 – 0,278 $\mu\text{g g}^{-1}$) (Tablica 8).

Tablica 8. Koncentracije partikulatnih metal(oid)a u vodi ($\mu\text{g g}^{-1}$ za elemente u tragovima, mg g^{-1} za makroelemente, Al, Fe i Mn) izmjerene na dvije postaje (referentna postaja – REF; industrijska zona grada Karlovca – KIZ) u dvije sezone (travanj i rujan 2021. godine) na rijeci Mrežnici (n = 1).

	Sezona	Postaja	
		REF	KIZ
Ag	Travanj 2021.	0,313	1,04
	Rujan 2021.	0,165	0,240
Al	Travanj 2021.	28,7	32,6
	Rujan 2021.	17,5	13,1
As	Travanj 2021.	8,04	9,57
	Rujan 2021.	4,14	6,03
Ba	Travanj 2021.	80,8	68,7
	Rujan 2021.	59,3	66,0
Bi	Travanj 2021.	0,314	0,310
	Rujan 2021.	0,144	0,154
Cd	Travanj 2021.	0,278	0,241
	Rujan 2021.	0,262	0,272
Co	Travanj 2021.	4,85	5,89
	Rujan 2021.	6,64	5,07
Cr	Travanj 2021.	35,3	40,8
	Rujan 2021.	23,2	20,6
Cs	Travanj 2021.	2,91	3,36
	Rujan 2021.	1,79	1,44
Cu	Travanj 2021.	8,20	6,92
	Rujan 2021.	3,91	< 0,053
Fe	Travanj 2021.	20,4	24,8
	Rujan 2021.	18,4	18,0
Mn	Travanj 2021.	0,389	0,556
	Rujan 2021.	2,56	2,47
Mo	Travanj 2021.	1,04	1,22
	Rujan 2021.	0,907	1,08
Ni	Travanj 2021.	30,9	46,0
	Rujan 2021.	11,5	10,7

Tablica 8. – nastavak

	Sezona	Postaja	
		REF	KIZ
Pb	Travanj 2021.	12,8	19,1
	Rujan 2021.	3,49	19,2
Rb	Travanj 2021.	21,4	24,3
	Rujan 2021.	15,1	11,4
*Se	Travanj 2021.	0,648	1,47
	Rujan 2021.	–	–
Sr	Travanj 2021.	35,0	50,3
	Rujan 2021.	67,5	78,9
Tl	Travanj 2021.	0,464	0,507
	Rujan 2021.	0,302	0,241
U	Travanj 2021.	0,720	0,903
	Rujan 2021.	0,614	0,886
V	Travanj 2021.	62,1	73,8
	Rujan 2021.	44,6	40,3
*Zn	Travanj 2021.	68,4	262
	Rujan 2021.	–	–
Ca	Travanj 2021.	82,7	122
	Rujan 2021.	71,8	70,4
K	Travanj 2021.	3,23	4,30
	Rujan 2021.	3,00	2,98
Mg	Travanj 2021.	3,05	3,94
	Rujan 2021.	4,43	4,80
Na	Travanj 2021.	0,501	0,849
	Rujan 2021.	0,437	1,07

* Koncentracije Se i Zn u rujnu 2021. nisu dostupne zbog slučajne kontaminacije uzorka.

4.1.3. Koncentracije metal(oid)a u sedimentu

U Tablici 9 prikazane su koncentracije 21 elemenata u tragovima i 4 makroelementa u uzorcima sedimenta uzorkovanih u travnju i rujnu 2021. godine na dvije postaje (REF i KIZ) na rijeci Mrežnici.

Koncentracije analiziranih elemenata su bile u sljedećem rasponu: 0.1 – 0.5 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Bi, Tl); 0.5 – 1.0 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Cd, Sb); 1.0 – 5.0 $\mu\text{g g}^{-1}$ (As, Cs, Mo, U); 5.0 – 10.0 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Co); 10.0 – 50.0 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Cu, Ni, Pb, Rb, V); 50.0 – 100 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Cr, Zn); 100 – 200 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Ba, Sr); 200 – 500 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Mn); 1.0 – 5.0 mg g^{-1} (K, Na); 5.0 – 50.0 mg g^{-1} (Al, Fe, Mg); and > 150.0 mg g^{-1} (Ca).

Tablica 9. Koncentracije metal(oid)a u sedimentu ($\mu\text{g g}^{-1}$ za elemente u tragovima, mg g^{-1} za makroelemente, Al, Fe i Mn) izmjerene na dvije postaje (referentna postaja – REF; industrijska zona grada Karlovca – KIZ) u dvije sezone (travanj i rujn 2021. godine) na rijeci Mrežnici (n = 3).

	Sezona	Postaja	
		REF	KIZ
Al	Travanj 2021	20.9 ± 9.5	32.3 ± 8.6
	Rujan 2021	19.0 ± 2.2	26.3 ± 2.5
As	Travanj 2021	4.73 ± 1.38	6.41 ± 0.94
	Rujan 2021	3.41 ± 0.47	7.24 ± 0.67
Ba	Travanj 2021	102 ± 43	161 ± 48
	Rujan 2021	82.2 ± 9.3	148 ± 5
Bi	Travanj 2021	0.330 ± 0.112	0.416 ± 0.152
	Rujan 2021	0.254 ± 0.030	0.405 ± 0.052
Cd	Travanj 2021	0.509 ± 0.067	0.537 ± 0.021
	Rujan 2021	0.516 ± 0.047	0.582 ± 0.058
Co	Travanj 2021	6.23 ± 2.00	10.0 ± 2.5
	Rujan 2021	5.27 ± 0.66	10.1 ± 0.3
Cr	Travanj 2021	52.6 ± 17.5	81.0 ± 13.9
	Rujan 2021	37.9 ± 5.4	84.4 ± 3.1
Cs	Travanj 2021	2.02 ± 0.85	4.13 ± 0.94
	Rujan 2021	1.87 ± 0.19	5.04 ± 0.41
Cu	Travanj 2021	19.4 ± 6.0	31.7 ± 8.9
	Rujan 2021	15.3 ± 2.5	38.9 ± 1.8
Fe	Travanj 2021	11.7 ± 3.7	21.9 ± 5.4
	Rujan 2021	9.69 ± 1.24	21.1 ± 1.7
Mn	Travanj 2021	318 ± 14	437 ± 61
	Rujan 2021	220 ± 24	395 ± 20
Mo	Travanj 2021	0.935 ± 0.207	2.46 ± 0.39
	Rujan 2021	0.976 ± 0.117	2.63 ± 0.18

Tablica 9. – nastavak.

	Sezona	Postaja	
		REF	KIZ
Ni	Travanj 2021	25.8 ± 6.6	48.8 ± 5.8
	Rujan 2021	23.6 ± 3.0	54.2 ± 8.3
Pb	Travanj 2021	13.3 ± 6.0	26.9 ± 21.8
	Rujan 2021	9.95 ± 0.86	20.6 ± 1.7
Rb	Travanj 2021	28.0 ± 12.7	38.8 ± 11.7
	Rujan 2021	25.4 ± 2.7	45.2 ± 5.2
Sb	Travanj 2021	0.537 ± 0.229	0.799 ± 0.337
	Rujan 2021	0.434 ± 0.062	4.19 ± 5.66
Sr	Travanj 2021	93.9 ± 9.0	140 ± 15
	Rujan 2021	81.2 ± 9.4	115 ± 12
Tl	Travanj 2021	0.356 ± 0.097	0.398 ± 0.053
	Rujan 2021	0.348 ± 0.035	0.538 ± 0.070
U	Travanj 2021	1.18 ± 0.48	3.75 ± 0.76
	Rujan 2021	1.08 ± 0.12	3.94 ± 0.37
V	Travanj 2021	38.6 ± 15.4	63.0 ± 11.1
	Rujan 2021	36.6 ± 4.8	71.1 ± 6.5
Zn	Travanj 2021	49.1 ± 19.9	93.2 ± 30.2
	Rujan 2021	36.1 ± 2.1	68.2 ± 1.1
Ca	Travanj 2021	288 ± 65	253 ± 53
	Rujan 2021	279 ± 33	188 ± 10
K	Travanj 2021	3.65 ± 1.88	5.14 ± 1.89
	Rujan 2021	3.14 ± 0.37	6.06 ± 0.65
Mg	Travanj 2021	5.44 ± 1.36	9.51 ± 2.26
	Rujan 2021	5.08 ± 0.47	7.21 ± 0.78
Na	Travanj 2021	1.15 ± 0.62	2.00 ± 0.91
	Rujan 2021	0.887 ± 0.123	1.86 ± 0.05

4.2. Biometrijski pokazatelji i koncentracije bioakumuliranih metal(oid)a u probavnoj žlijezdi školjkaša

4.2.1. Biometrija školjkaša

Srednje vrijednosti i rasponi osnovnih biometrijskih pokazatelja i indeksa kondicije uzorkovanih školjkaša prikazani su u Tablici 10.

Primjenom Mann–Whitney U testa pokazana je statistički značajna razlika između postaja za duljinu školjke, masu školjkaša i masu probavne žlijezde. Školjkaši s KIZ postaje imali su približno 30% veću duljinu školjke u svim sezonama u usporedbi s onima s REF postaje. Mase

školjkaša i probavne žlijezde bile su do 2 puta veće na KIZ postaji nego na REF postaji. Sezonske razlike su bile uglavnom vidljive na KIZ postaji. Duljina školjke te masa školjkaša bile su najveće na KIZ postaji u listopadu u usporedbi sa srpnjom i lipnjom. Masa probavne žlijezde bila je približno 30% veća na KIZ postaji u lipnju u usporedbi s druge dvije sezone.

Tablica 10. Morfološki pokazatelji i indeks kondicije školjkaša *U. crassus* uzorkovanih na dvjema postajama (referentna postaja – REF; industrijska zona grada Karlovca – KIZ) u tri sezone (srpanj 2020., lipanj i listopad 2021.) na rijeci Mrežnici. Prikazane su srednje vrijednosti $\pm$ standardna devijacija ($n = 30$) i rasponi od minimuma do maksimuma (u zagradi).

	Sezona	Postaja	
		REF	KIZ
Duljina školjke / cm	Srpanj 2020.*	4,99 $\pm$ 0,25 ^A (4,50 – 5,60)	5,70 $\pm$ 0,25 ^a (5,20 – 6,10)
	Lipanj 2021.*	4,67 $\pm$ 0,36 ^B (3,80 – 5,50)	5,90 $\pm$ 0,28 ^b (5,00 – 6,40)
	Listopad 2021.*	4,61 $\pm$ 0,37 ^B (3,84 – 5,53)	6,17 $\pm$ 0,35 ^b (5,58 – 6,85)
Masa školjkaša / g	Srpanj 2020.*	13,4 $\pm$ 1,7 (3,84 – 5,53)	20,6 $\pm$ 2,9 ^a (14,6 – 26,5)
	Lipanj 2021.*	12,5 $\pm$ 2,7 (9,66 – 17,5)	24,3 $\pm$ 3,6 ^b (16,3 – 31,8)
	Listopad 2021.*	12,2 $\pm$ 2,74 (7,89 – 18,6)	25,4 $\pm$ 4,13 ^b (18,6 – 35,2)
Masa probavne žlijezde / g	Srpanj 2020.*	0,260 $\pm$ 0,070 ^A (0,140 – 0,430)	0,350 $\pm$ 0,070 ^a (0,190 – 0,490)
	Lipanj 2021.*	0,208 $\pm$ 0,063 ^B (0,100 – 0,400)	0,406 $\pm$ 0,088 ^b (0,220 – 0,570)
	Listopad 2021.*	0,191 $\pm$ 0,094 ^B (0,050 – 0,500)	0,308 $\pm$ 0,098 ^a (0,140 – 0,520)
Indeks kondicije / %	Srpanj 2020.*	20,6 $\pm$ 2,4 ^A (16,5 – 25,8)	23,5 $\pm$ 3,6 ^a (17,5 – 35,0)
	Lipanj 2021.	26,0 $\pm$ 6,0 ^B (21,0 – 36,4)	28,0 $\pm$ 3,0 ^b (20,0 – 35,0)
	Listopad 2021.	19,9 $\pm$ 3,0 ^A (14,0 – 26,0)	20,0 $\pm$ 3,0 ^c (15,0 – 26,4)

* statistički značajne razlike između postaja unutar svake sezone prema Mann–Whitney U test ($p < 0.05$)

^{A,B} statistički značajne razlike između sezona na REF postaji prema Kruskal-Wallis ANOVA i Dunnov post hoc test ($p < 0.05$)

^{a,b} statistički značajne razlike između sezona na KIZ postaji prema Kruskal-Wallis ANOVA i Dunnov post hoc test ($p < 0.05$)

4.2.2. Koncentracije metal(oid)a u probavnoj žlijezdi

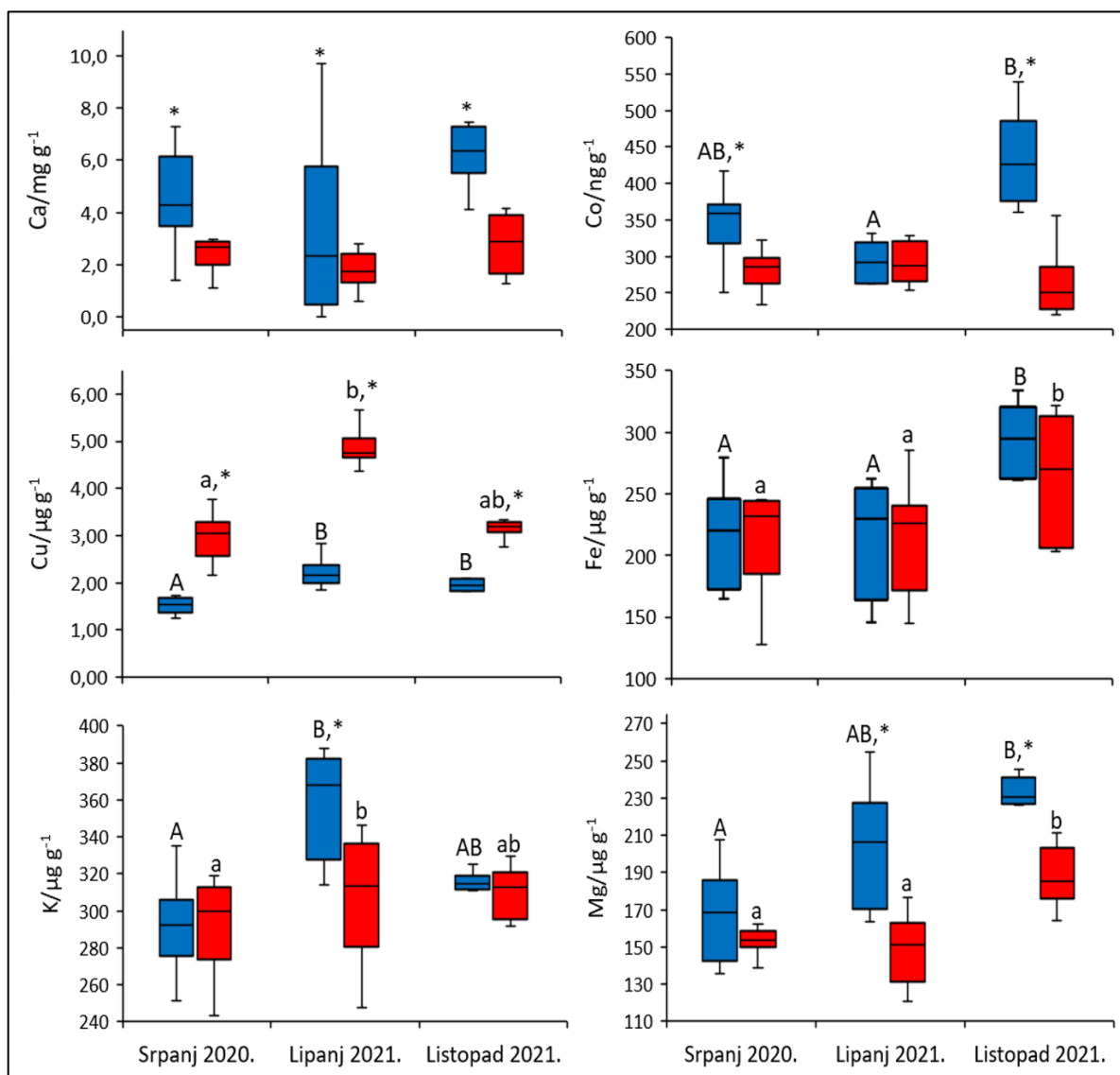
4.2.2.1. Ukupne koncentracije elemenata

4.2.2.1.1. Ukupne koncentracije esencijalnih elemenata

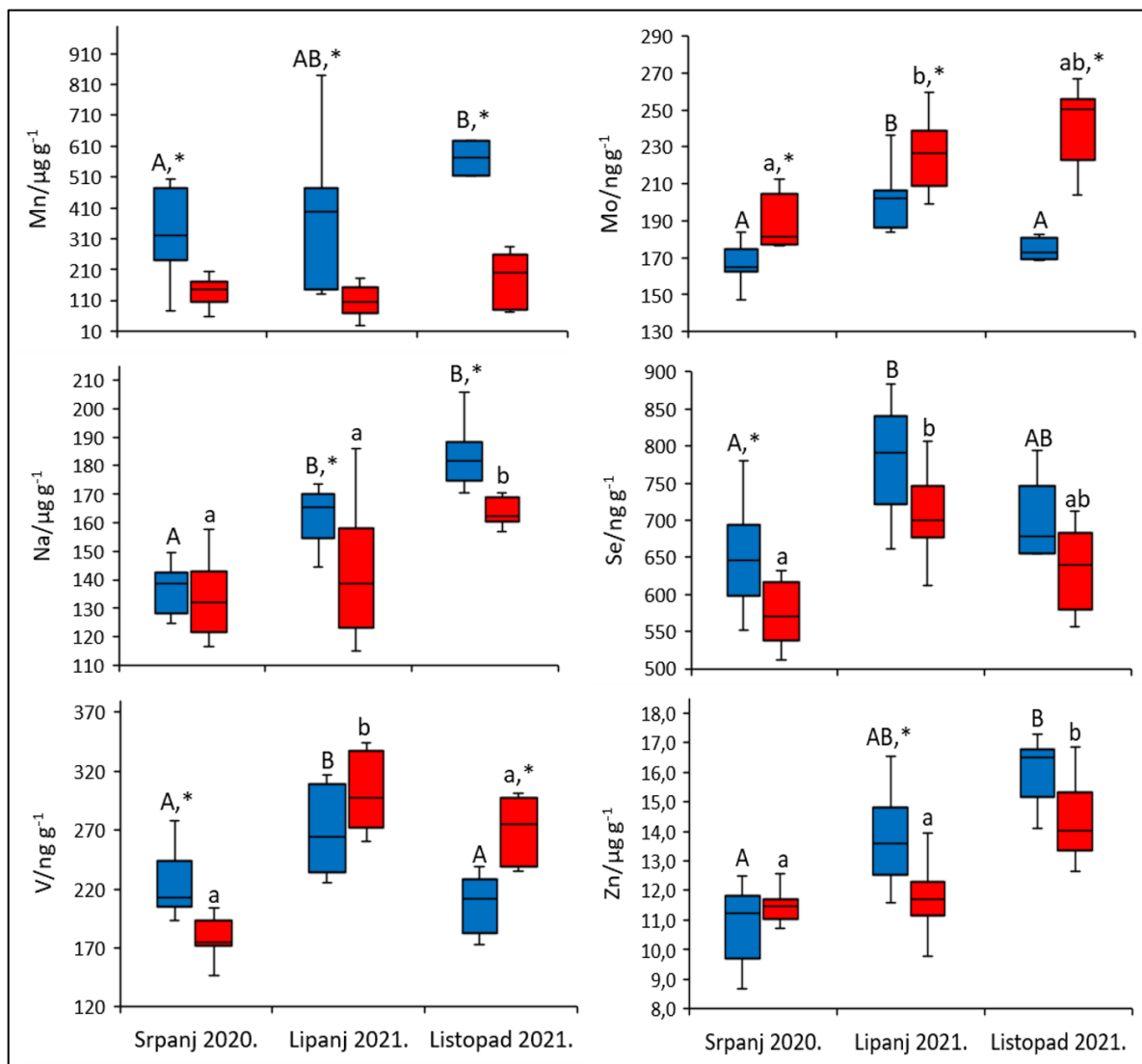
Na Slikama 12 i 13 prikazane su ukupne koncentracije 12 esencijalnih elemenata u probavnoj žlijezdi uzorkovanih školjakaša te su izmjerene unutar sljedećeg raspona: $5 \text{ mg g}^{-1} > \text{Ca} > 1 \text{ mg g}^{-1} > \text{Fe, K, Mg, Mn, Na} > 100 \text{ } \mu\text{g g}^{-1} > \text{Zn, Cu} > 1 \text{ } \mu\text{g g}^{-1} > \text{Co, Mo, Se, V} > 0,030 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$. Usporedive koncentracije između postaja u svim sezonama zabilježene su za Fe, K, Se i V (Slike 12 i 13). Statistički značajno veće ukupne koncentracije na postaji REF utvrđene su za Ca i Mn u svim sezonama, za Mg i Na u lipnju i listopadu, za K i Zn u lipnju te za Co u listopadu u odnosu na postaju KIZ (Slike 12 i 13). Koncentracije Ca i Mn bile su povećane do 4 puta na REF postaji u odnosu na KIZ.

S druge strane, statistički značajno veće ukupne koncentracije na postaji KIZ zabilježene su za Cu i Mo u sve tri sezone te za V u listopadu u usporedbi s postajom REF (Slike 12 i 13). Koncentracije ovih elemenata su bile do 2 puta veće na KIZ postaji u usporedbi s REF.

Usporedba sezonskih varijacija unutar svake postaje pokazala je da su koncentracije Ca bile stabilne u sve tri sezone (Slike 12 i 13). Statistički značajno veće ukupne koncentracije u lipnju zabilježene su za K, Mo i V (do 30%) na postaji REF te za Cu (50 %) na postaji KIZ (Slike 12 i 13). Suprotno tome, u listopadu su veće koncentracije utvrđene za Co i Fe (do 50 %) na REF postaji te za Mg, Na i Zn (do 30 %) na KIZ postaji (Slike 12 i 13).



Slika 12. Ukupne koncentracije (ng g^{-1} ili $\mu\text{g g}^{-1}$ vlažne mase tkiva) šest esencijalnih elemenata (Ca, Co, Cu, Fe, K i Mg) u probavnoj žlijezdi školjkaša vrste *U. crassus* uzorkovanih na dvije lokacije (referentna postaja – REF (svijetlo plava boja); industrijska zona grada Karlovca – KIZ (crvena boja)) u tri sezone (srpanj 2020., lipanj i listopad 2021. godine) na rijeci Mrežnici. Statistički značajne razlike između lokacija unutar svake sezone označene su zvjezdicom (*) (Mann–Whitney U test, $p < 0,05$). Statistički značajne razlike između sezona unutar svake lokacije (Kruskal–Wallis ANOVA i Dunnov post hoc test, $p < 0,05$) označene su različitim slovima (A, B za postaju REF; a, b za postaju KIZ).



Slika 13. Ukupne koncentracije (ng g^{-1} ili $\mu\text{g g}^{-1}$ vlažne mase tkiva) šest esencijalnih elemenata (Mn, Mo, Na, Se, V i Zn) u probavnoj žlijezdi školjkaša vrste *U. crassus* uzorkovanih na dvije lokacije (referentna postaja – REF (svijetlo plava boja); industrijska zona grada Karlovca – KIZ (crvena boja)) u tri sezone (srpanj 2020., lipanj i listopad 2021. godine) na rijeci Mrežnici. Statistički značajne razlike između postaja unutar svake sezone označene su zvjezdicom (*) (Mann–Whitney U test, $p < 0,05$). Statistički značajne razlike između sezona unutar svake postaje (Kruskal-Wallis ANOVA i Dunnov post hoc test, $p < 0,05$) označene su različitim slovima (A, B za postaju REF; a, b za postaju KIZ).

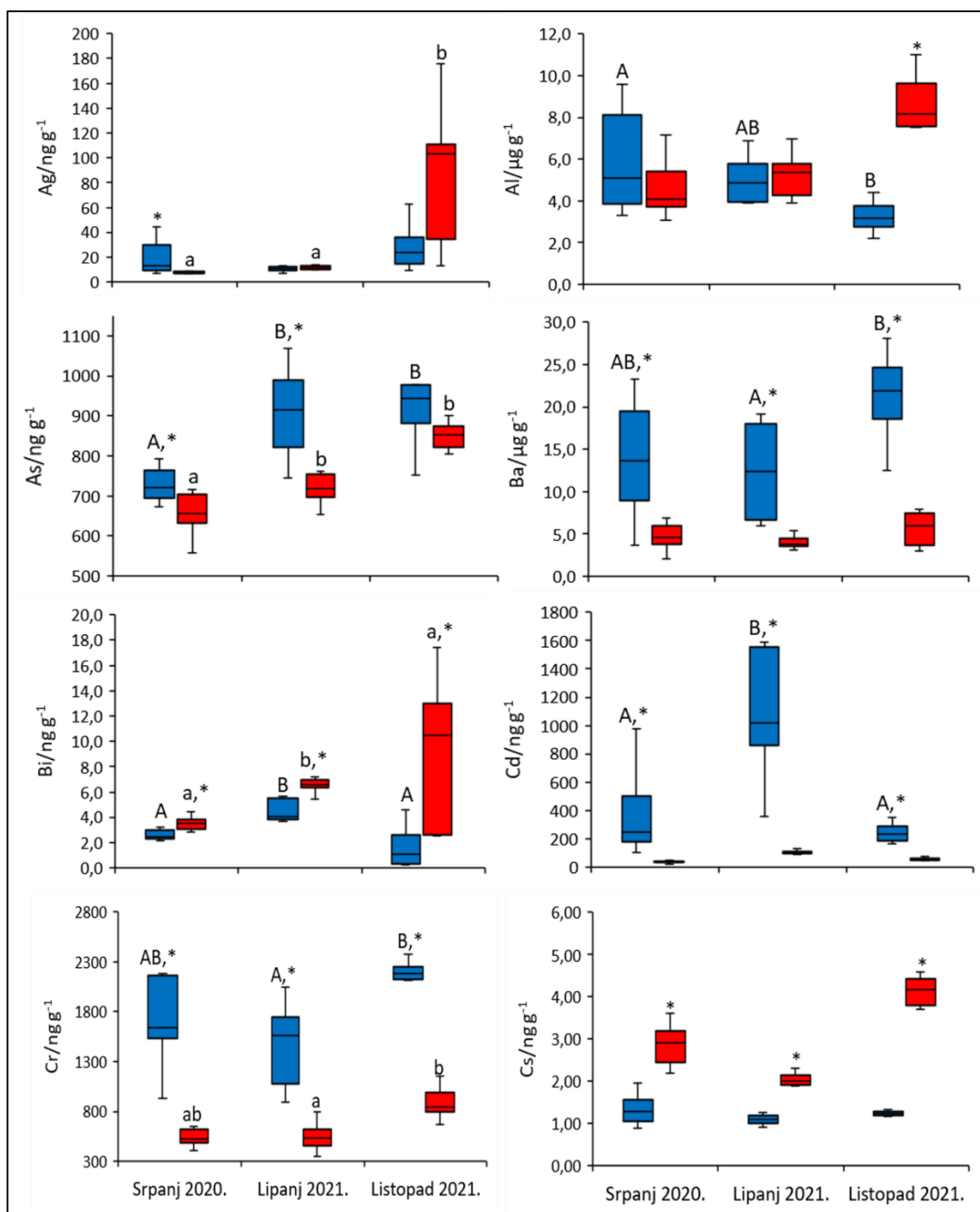
4.2.2.1.2. Ukupne koncentracije neesencijalnih elemenata

Kako je prikazano na Slikama 14 i 15, ukupne koncentracije 15 neesencijalnih elemenata u probavnoj žlijezdi uzorkovanih školjakaš kretale su se u sljedećem rasponu: $15 \mu\text{g g}^{-1} > \text{Al, Ba, Cr, Sr} > 1,5 \mu\text{g g}^{-1} > \text{As, Cd}_{\text{REF}}, \text{Ni, Pb}_{\text{KIZ}}, \text{Rb} > 0,100 \mu\text{g g}^{-1} > \text{Ag, Cd}_{\text{KIZ}}, \text{Pb}_{\text{REF}}, \text{U} > 0,010 \mu\text{g g}^{-1} > \text{Bi, Cs, Sb, Tl} > 0,001 \mu\text{g g}^{-1}$.

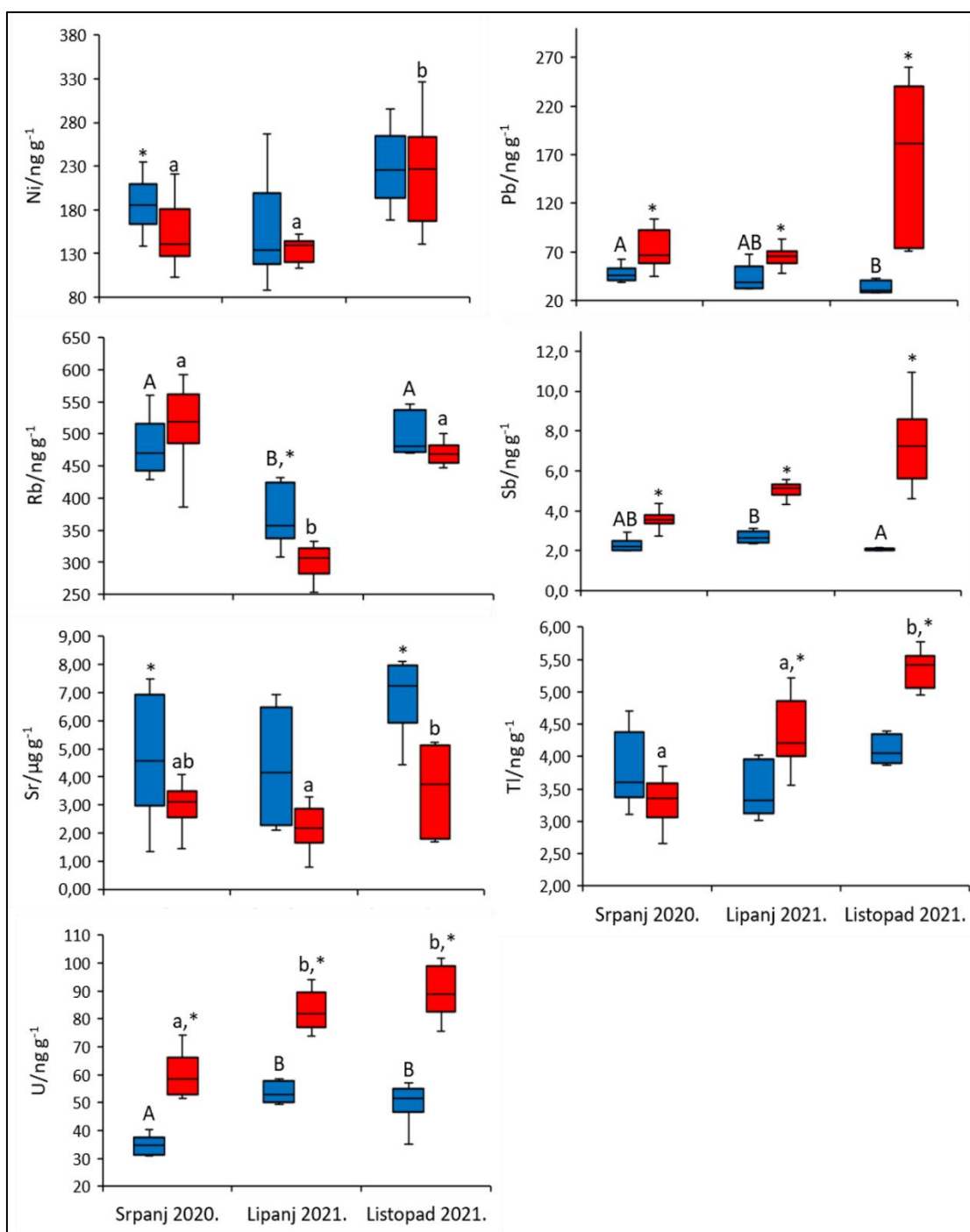
Usporedive koncentracije između postaja u svim sezonama zabilježene su za Ag, Al, Ni i Rb (Slike 14 i 15). Statistički značajno veće ukupne koncentracije na postaji REF utvrđene su za Ba, Cd i Cr u sve tri sezone; za As u srpnju i lipnju, Rb u lipnju te za Sr u srpnju i listopadu u odnosu na postaju KIZ (Slike 14 i 15). Vrijednosti za Ba i Sr bile su višestruko (do 4 puta) povećane na REF postaji u usporedbi s postajom KIZ. Koncentracije Cd bile su do 11 puta veće na REF postaji u usporedbi s postajom KIZ.

S druge strane, statistički značajno veće ukupne koncentracije na postaji KIZ zabilježene su za Bi, Cs, Pb, Sb, i U u sve tri sezone te za Al u listopadu u usporedbi s postajom REF (Slike 14 i 15). U listopadu su koncentracije za Al, Bi, Pb i Sb bile do 6 puta veće na REF u odnosu na KIZ postaju.

Usporedba sezonskih varijacija unutar svake postaje pokazala je da su samo koncentracije Cs bile stabilne u svim sezonama (Slika 14). Statistički značajno veće ukupne koncentracije u srpnju zabilježene su za Al na REF postaji. U lipnju su vrijednosti za Al, Bi i Cd bile do 5 puta veće na postaji REF te za Cd (86 %) na postaji KIZ (Slike 14 i 15). Suprotno tome, u listopadu su veće koncentracije utvrđene za Ba, Cr, Rb i Sr (do 80 %) na REF postaji te za Ag, Al, Cr, Cs, Ni, Pb, Rb i Sb (do 8 puta) na KIZ postaji (Slike 14 i 15).



Slika 14. Ukupne koncentracije (ng g⁻¹ ili µg g⁻¹ vlažne mase tkiva) osam neesencijalnih elemenata (Ag, Al, As, Ba, Bi, Cd, Cr i Cs) u probavnoj žlijezdi školjkaša vrste *U. crassus* uzorkovanih na dvije lokacije (referentna postaja – REF (svijetlo plava boja); industrijska zona grada Karlovca – KIZ (crvena boja)) u tri sezone (srpanj 2020., lipanj i listopad 2021. godine) na rijeci Mrežnici. Statistički značajne razlike između postaja unutar svake sezone označene su zvjezdicom (*) (Mann–Whitney U test, $p < 0,05$). Statistički značajne razlike između sezona unutar svake postaje (Kruskal–Wallis ANOVA i Dunnov post hoc test, $p < 0,05$) označene su različitim slovima (A, B za postaju REF; a, b za postaju KIZ).



Slika 15. Ukupne koncentracije (ng g^{-1} ili $\mu\text{g g}^{-1}$ vlažne mase tkiva) sedam neesencijalnih elemenata (Ni, Pb, Rb, Sb, Sr, Tl i U) u probavnoj žlijezdi školjkaša vrste *U. crassus* uzorkovanih na dvije lokacije (referentna postaja – REF (svijetlo plava boja); industrijska zona grada Karlovca – KIZ (crvena boja)) u tri sezone (srpanj 2020., lipanj i listopad 2021. godine) na rijeci Mrežnici. Statistički značajne razlike između postaja unutar svake sezone označene su zvjezdicom (*) (Mann–Whitney U test, $p < 0,05$). Statistički značajne razlike između sezona unutar svake postaje (Kruskal–Wallis ANOVA i Dunnov post hoc test, $p < 0,05$) označene su različitim slovima (A, B za postaju REF; a, b za postaju KIZ).

4.2.2.2. Citosolske koncentracije elemenata

4.2.2.2.1. Citosolske koncentracije esencijalnih elemenata

U Tablici 11 prikazane su citosolske koncentracije 12 esencijalnih elemenata te su izmjerene u sljedećem rasponu: K ($287 - 334 \mu\text{g g}^{-1}$) > Na ($140 - 174 \mu\text{g g}^{-1}$) > Ca ($82,9 - 140 \mu\text{g g}^{-1}$) > Mg ($58,1 - 72,9 \mu\text{g g}^{-1}$) > Fe ($8,64 - 17,3 \mu\text{g g}^{-1}$) > Zn ($6,73 - 8,75 \mu\text{g g}^{-1}$) > Mn ($1,52 - 4,13 \mu\text{g g}^{-1}$) > Cu ($0,840 - 3,67 \mu\text{g g}^{-1}$) > Se ($0,530 - 0,672 \mu\text{g g}^{-1}$) > Co ($0,105 - 0,178 \mu\text{g g}^{-1}$) > V ($0,102 - 0,166 \mu\text{g g}^{-1}$) > Mo ($0,099 - 0,143 \mu\text{g g}^{-1}$).

U većini slučajeva, usporedive koncentracije između postaja zabilježene su za K Mg, Mo, Se i Zn (Tablica 11). Statistički značajno veće citosolske koncentracije na postaji REF utvrđene su za Mn u svim sezonama (Tablica 11).

S druge strane, statistički značajno veće citosolske koncentracije na postaji KIZ zabilježene su za Co, Cu i Fe u svim sezonama (Tablica 11) te su bile do 3 puta povećane ovisno o sezoni uzorkovanja.

Statistički značajno veće citosolske koncentracije u lipnju zabilježene su za Co, Cu, Se i V na obje postaje. Vrijednosti za navedene elemente bile su do 45 % povećane na REF postaji te do 80 % povećane na KIZ postaji u usporedbi s izmjerenim koncentracijama u listopadu (Tablica 11). Vrijednosti Mn u listopadu bile su do 50 % veće na obje postaje u usporedbi s koncentracijama u srpnju i lipnju.

Nadalje, u Tablici 11 također su prikazani postotci prisutnosti svakog pojedinog elementa u topljivoj frakciji probavne žlijezde *U. crassus*. Na REF postaji, udjeli elemenata u citosolu smanjivali su se sljedećim rasporedom: Na, K, Se ($80 - 100 \%$) > Mo, Cu, Zn, V ($50 - 79 \%$) > Co, Mg ($20 - 49 \%$) > Fe, Ca, Mn > 0.7% ; dok su se udjeli na KIZ postaji smanjivali na sljedeći način: Na, K, Se ($80 - 100 \%$) > Cu, Mo, Zn, Co, V ($50 - 79\%$) > Mg ($40 - 49\%$) > Fe, Ca, Mn > 1% (Tablica 11).

Tablica 11. Citosolske koncentracije (izražene na mokru masu tkiva; srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija; $\mu\text{g g}^{-1}$) esencijalnih elemenata u probavnoj žlijezdi školjkaša *U. crassus* uzorkovanih na dvije postaje (referentna postaja – REF; industrijska zona grada Karlovca – KIZ) u tri sezone (srpanj 2020., lipanj i listopad 2021. godine) na rijeci Mrežnici. Također je prikazan udio ukupnog metal(oid)a (%) prisutnog u citosolskoj frakciji probavne žlijezde.

		REF		KIZ	
		Citosolske koncentracije metal(oid)a	% od ukupnog metala	Citosolske koncentracije metal(oid)a	% od ukupnog metala
Ca	Srpanj 2020*	140 $\pm$ 0,020 ^a	3,56 $\pm$ 1,42	110 $\pm$ 0,020	4,50 $\pm$ 1,47
	Lipanj 2021*	80,0 $\pm$ 0,010 ^b	3,26 $\pm$ 1,43	110 $\pm$ 0,020	5,45 $\pm$ 2,07
	Listopad 2021*	130 $\pm$ 0,010 ^a	2,25 $\pm$ 0,320	100 $\pm$ 0,010	4,39 $\pm$ 1,85
Co	Srpanj 2020*	0,118 $\pm$ 0,009 ^a	34,6 $\pm$ 5,31	0,168 $\pm$ 0,002 ^a	59,2 $\pm$ 7,70
	Lipanj 2021*	0,122 $\pm$ 0,001 ^a	39,7 $\pm$ 8,12	0,177 $\pm$ 0,001 ^a	61,3 $\pm$ 5,54
	Listopad 2021*	0,105 $\pm$ 0,040 ^b	24,7 $\pm$ 3,68	0,140 $\pm$ 0,002 ^b	53,8 $\pm$ 8,39
Cu	Srpanj 2020*	0,840 $\pm$ 0,080 ^a	56,0 $\pm$ 7,11	2,24 $\pm$ 0,480 ^a	75,3 $\pm$ 4,88
	Lipanj 2021*	1,41 $\pm$ 0,210 ^b	65,4 $\pm$ 9,46	3,67 $\pm$ 0,570 ^b	76,0 $\pm$ 6,05
	Listopad 2021*	0,990 $\pm$ 0,130 ^{ab}	49,1 $\pm$ 7,58	2,02 $\pm$ 0,250 ^a	64,0 $\pm$ 4,99
Fe	Srpanj 2020*	8,64 $\pm$ 1,80	4,24 $\pm$ 1,61	12,3 $\pm$ 2,03 ^a	5,98 $\pm$ 2,09
	Lipanj 2021*	8,93 $\pm$ 1,82	4,04 $\pm$ 1,52	16,8 $\pm$ 2,93 ^b	7,96 $\pm$ 1,48
	Listopad 2021*	9,26 $\pm$ 0,870	3,17 $\pm$ 0,43	17,3 $\pm$ 0,970 ^b	6,79 $\pm$ 1,37
K	Srpanj 2020	290 $\pm$ 19,1	100,3 $\pm$ 7,44	286 $\pm$ 19,1 ^a	98,1 $\pm$ 6,72
	Lipanj 2021	293 $\pm$ 28,0	92,0 $\pm$ 9,51	334 $\pm$ 36,6 ^b	98,5 $\pm$ 5,01
	Listopad 2021	287 $\pm$ 12,3	90,9 $\pm$ 3,18	298 $\pm$ 15,5 ^{ab}	96,2 $\pm$ 2,98
Mg	Srpanj 2020	58,1 $\pm$ 4,16	35,9 $\pm$ 7,10	60,5 $\pm$ 2,99 ^a	38,9 $\pm$ 2,73
	Lipanj 2021	61,8 $\pm$ 5,45	30,1 $\pm$ 9,40	61,4 $\pm$ 7,02 ^a	42,9 $\pm$ 6,96
	Listopad 2021*	63,4 $\pm$ 2,27	28,1 $\pm$ 2,45	72,9 $\pm$ 4,08 ^b	39,2 $\pm$ 5,97
Mn	Srpanj 2020*	3,09 $\pm$ 0,450 ^{ab}	1,23 $\pm$ 0,710	1,67 $\pm$ 0,230 ^{ab}	1,31 $\pm$ 0,39
	Lipanj 2021*	2,76 $\pm$ 0,420 ^a	2,14 $\pm$ 1,22	1,52 $\pm$ 0,310 ^a	3,19 $\pm$ 1,80
	Listopad 2021*	4,13 $\pm$ 0,850 ^b	0,770 $\pm$ 0,140	1,99 $\pm$ 0,390 ^b	1,35 $\pm$ 0,63

* statistički značajne razlike između postaja unutar svake sezone prema Mann–Whitney U test ($p < 0,05$)

^{A,B} statistički značajne razlike između sezona na REF postaji prema Kruskal-Wallis ANOVA i Dunnov post hoc test ($p < 0,05$)

^{a,b} statistički značajne razlike između sezona na KIZ postaji prema Kruskal-Wallis ANOVA i Dunnov post hoc test ($p < 0,05$)

Tablica 11. – nastavak.

		REF		KIZ	
		Citosolske koncentracije metal(oid)a	% od ukupnog metala	Citosolske koncentracije metal(oid)a	% od ukupnog metala
Mo	Srpanj 2020*	0,120 ± 0,002 ^{ab}	72,0 ± 7,27	0,137 ± 0,001	73,2 ± 3,70
	Lipanj 2021	0,131 ± 0,002 ^a	67,4 ± 6,92	0,140 ± 0,001	62,4 ± 3,71
	Listopad 2021	0,099 ± 0,001 ^b	58,2 ± 5,09	0,143 ± 0,001	59,3 ± 1,92
Na	Srpanj 2020*	155 ± 7,82 ^a	113 ± 7,90	140 ± 9,82 ^a	105 ± 5,92
	Lipanj 2021*	165 ± 19,9 ^{ab}	101 ± 11,6	161 ± 16,7 ^b	113 ± 5,53
	Listopad 2021	174 ± 11,7 ^b	95,2 ± 2,91	164 ± 4,77 ^b	100 ± 2,93
Se	Srpanj 2020*	0,605 ± 0,005 ^{ab}	93,6 ± 9,12	0,533 ± 0,004 ^a	93,3 ± 3,63
	Lipanj 2021	0,672 ± 0,008 ^a	88,3 ± 7,62	0,623 ± 0,006 ^b	88,2 ± 4,38
	Listopad 2021	0,530 ± 0,003 ^b	76,1 ± 5,05	0,562 ± 0,001 ^{ab}	89,2 ± 7,89
V	Srpanj 2020	0,120 ± 0,002 ^{ab}	53,9 ± 5,79	0,113 ± 0,001 ^a	62,2 ± 4,14
	Lipanj 2021*	0,129 ± 0,008 ^a	53,4 ± 6,82	0,166 ± 0,001 ^b	55,0 ± 3,63
	Listopad 2021*	0,102 ± 0,002 ^b	49,0 ± 5,51	0,140 ± 0,002 ^{ab}	52,0 ± 4,25
Zn	Srpanj 2020	6,73 ± 0,320 ^a	62,6 ± 8,17	7,11 ± 0,490 ^a	62,1 ± 6,18
	Lipanj 2021	7,66 ± 0,450 ^b	56,5 ± 9,02	7,30 ± 0,400 ^a	62,9 ± 5,34
	Listopad 2021	7,71 ± 0,710 ^b	48,2 ± 2,21	8,75 ± 0,590 ^b	61,4 ± 9,34

* statistički značajne razlike između postaja unutar svake sezone prema Mann–Whitney U test ($p < 0,05$)

^{A,B} statistički značajne razlike između sezona na REF postaji prema Kruskal-Wallis ANOVA i Dunnov post hoc test ($p < 0,05$)

^{a,b} statistički značajne razlike između sezona na KIZ postaji prema Kruskal-Wallis ANOVA i Dunnov post hoc test ($p < 0,05$)

4.2.2.2.2. Citosolske koncentracije neesencijalnih elemenata

Citosolske koncentracije 15 neesencijalnih elemenata prikazane su u Tablici 12 te su se kretale u sljedećem rasporedu: Cd ($0,037 - 1,15 \mu\text{g g}^{-1}$) > Al ($0,196 - 0,874 \mu\text{g g}^{-1}$) > Ba ($0,138 - 0,492 \mu\text{g g}^{-1}$) > As ($0,276 - 0,457 \mu\text{g g}^{-1}$) > Rb ($0,252 - 0,450 \mu\text{g g}^{-1}$) > Cr ($0,038 - 0,109 \mu\text{g g}^{-1}$) > Sr ($0,083 - 0,108 \mu\text{g g}^{-1}$) > Ni ($0,028 - 0,093 \mu\text{g g}^{-1}$) > Pb ($0,019 - 0,066 \mu\text{g g}^{-1}$) > U ($0,018 - 0,044 \mu\text{g g}^{-1}$) > Ag ($0,004 - 0,012 \mu\text{g g}^{-1}$) > Bi ($0,002 - 0,004 \mu\text{g g}^{-1}$) > Cs ($0,001 - 0,003 \mu\text{g g}^{-1}$) > Sb, Tl ($0,001 - 0,002 \mu\text{g g}^{-1}$).

Samo je Sr imao usporedive koncentracije između postaja u sve tri sezone (Tablica 12). Statistički značajno veće citosolske koncentracije na postaji REF utvrđene su za Ba i Cd u sve tri sezone (Tablica 12). Vrijednosti Ba bile su do 43% veće na REF postaji. Koncentracije Cd na postaji REF bile su do 12 puta veće u usporedbi s KIZ.

S druge strane, statistički značajno veće citosolske koncentracije na postaji KIZ zabilježene su za svih 11 ostalih neesencijalnih elemenata (Tablica 12). Od značajnijih razlika, vrijedi napomenuti Cs, Sb i U koji su imali do 3 puta veće vrijednosti na KIZ u srpnju, Al, Cs i Sb koji su imali oko 2 puta veće vrijednosti na KIZ u lipnju te Ag, Al, Cr, Cs, Ni, Pb, Sb i U koji su imali do 4 puta veće zabilježene koncentracije na KIZ u listopadu u usporedbi s REF.

Sezonskih razlika unutar postaja nije bilo jedino za Sr na obje postaje, za Sb na KIZ postaji te za Tl na REF postaji (Tablica 12). Za sve ostale elemente su uočene sezonske razlike unutar postaja (Tablica 12). Najveće razlike unutar REF postaja izmjerene su za Cd koji je imao 5 puta veće koncentracije na REF u lipnju u odnosu na srpanj i listopad. Uz Cd, vrijednosti za Ba i Al na KIZ postaji su bile do 2 puta veće u lipnju u usporedbi s ostale dvije sezone. No, većina neesencijalnih elemenata (Ag, Cs, Pb, Rb, Sr, Tl) je imala povećane koncentracije (do 2 puta) na KIZ postaji u listopadu u usporedbi sa srpnjom i lipnjom.

Nadalje, na REF postaji, udjeli elemenata u citosolu su se smanjivali sljedećim rasporedom: Bi, Cd, Rb (80 – 100 %) > Pb, Cs (50 – 79 %) > U, Sb, Tl, As (40 – 49 %) > Ag, Ni, Al, Cr, Ba, Sr > 0.7 %; dok su se postotci na KIZ postaji smanjivali na sljedeći način: (100 %) > Sb, Cd, Rb (80 – 99 %) > Cs, Pb, Bi, As, U (50 – 79 %) > Ni, Tl, Ag (40 – 49 %) > Cr, Al, Ba, Sr > 1 % (Tablica 12).

Tablica 12. Citosolske koncentracije (izražene na mokru masu tkiva; srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija; $\mu\text{g g}^{-1}$ za sve elemente osim Ag, Cs, Sb i Tl čije su koncentracije izražene u ng g^{-1}) neesencijalnih elemenata i udio ukupnog metal(oid)a (%) prisutnog u citosolnoj frakciji probavne žlijezde školjkaša *U. crassus* uzorkovanih na dvije postaje (referentna postaja – REF; industrijska zona grada Karlovca – KIZ) u tri sezone (srpanj 2020., lipanj i listopad 2021. godine) na rijeci Mrežnici.

		REF		KIZ	
		Citosolske koncentracije metal(oid)a	% od ukupnog metala	Citosolske koncentracije metal(oid)a	% od ukupnog metala
Ag	Srpanj 2020	4,40 $\pm$ 0,840 ^{ab}	32,6 $\pm$ 17,8	4,12 $\pm$ 0,530 ^a	52,7 $\pm$ 15,7
	Lipanj 2021*	3,81 $\pm$ 0,550 ^a	35,8 $\pm$ 7,25	5,47 $\pm$ 0,790 ^b	47,9 $\pm$ 90,4
	Listopad 2021*	5,22 $\pm$ 1,130 ^b	25,6 $\pm$ 15,6	11,7 $\pm$ 5,470 ^b	22,3 $\pm$ 15,7
Al	Srpanj 2020*	0,490 $\pm$ 0,08 ^a	9,40 $\pm$ 4,56	0,670 $\pm$ 0,060 ^a	15,7 $\pm$ 3,61
	Lipanj 2021*	0,390 $\pm$ 0,07 ^{ab}	8,28 $\pm$ 2,24	0,870 $\pm$ 0,090 ^b	17,1 $\pm$ 4,15
	Listopad 2021*	0,200 $\pm$ 0,04 ^b	6,16 $\pm$ 1,18	0,620 $\pm$ 0,040 ^a	7,27 $\pm$ 1,08
As	Srpanj 2020*	0,276 $\pm$ 0,032 ^a	38,5 $\pm$ 2,40	0,363 $\pm$ 0,041 ^a	55,4 $\pm$ 2,43
	Lipanj 2021	0,442 $\pm$ 0,054 ^b	49,5 $\pm$ 6,93	0,456 $\pm$ 0,030 ^b	62,1 $\pm$ 5,34
	Listopad 2021*	0,315 $\pm$ 0,015 ^{ab}	33,7 $\pm$ 5,03	0,462 $\pm$ 0,033 ^b	54,4 $\pm$ 4,50
Ba	Srpanj 2020*	0,460 $\pm$ 0,040 ^a	4,36 $\pm$ 3,21	0,340 $\pm$ 0,070 ^a	8,64 $\pm$ 6,46
	Lipanj 2021*	0,490 $\pm$ 0,050 ^a	4,51 $\pm$ 2,69	0,370 $\pm$ 0,030 ^a	12,2 $\pm$ 6,30
	Listopad 2021*	0,200 $\pm$ 0,030 ^b	0,980 $\pm$ 0,380	0,140 $\pm$ 0,010 ^b	2,83 $\pm$ 1,21
Bi	Srpanj 2020*	2,04 $\pm$ 0,310 ^a	80,0 $\pm$ 9,83	2,46 $\pm$ 0,380 ^a	70,4 $\pm$ 4,59
	Lipanj 2021*	2,55 $\pm$ 0,340 ^b	59,5 $\pm$ 13,2	3,89 $\pm$ 0,340 ^b	55,1 $\pm$ 13,1
	Listopad 2021*	2,37 $\pm$ 0,570 ^{ab}	411 $\pm$ 337	3,79 $\pm$ 0,780 ^b	60,9 $\pm$ 41,2
Cd	Srpanj 2020*	0,431 $\pm$ 0,319 ^a	117 $\pm$ 9,58	0,036 $\pm$ 0,009 ^a	101 $\pm$ 5,61
	Lipanj 2021*	1,14 $\pm$ 0,280 ^b	94,6 $\pm$ 3,42	0,096 $\pm$ 0,012 ^b	90,4 $\pm$ 4,72
	Listopad 2021*	0,222 $\pm$ 0,047 ^a	93,0 $\pm$ 7,83	0,049 $\pm$ 0,007 ^{ab}	88,2 $\pm$ 7,33
Cr	Srpanj 2020	0,055 $\pm$ 0,006 ^a	3,47 $\pm$ 1,28	0,064 $\pm$ 0,006 ^a	11,8 $\pm$ 3,44
	Lipanj 2021*	0,083 $\pm$ 0,009 ^b	5,88 $\pm$ 3,03	0,097 $\pm$ 0,006 ^b	18,7 $\pm$ 4,23
	Listopad 2021*	0,037 $\pm$ 0,002 ^a	1,81 $\pm$ 0,320	0,108 $\pm$ 0,051 ^{ab}	12,1 $\pm$ 5,86
Cs	Srpanj 2020*	0,840 $\pm$ 0,150 ^{ab}	64,0 $\pm$ 12,5	2,39 $\pm$ 0,320 ^a	83,7 $\pm$ 6,12
	Lipanj 2021*	0,670 $\pm$ 0,110 ^a	60,4 $\pm$ 15,8	1,54 $\pm$ 0,210 ^b	76,8 $\pm$ 6,20
	Listopad 2021*	0,860 $\pm$ 0,060 ^b	70,0 $\pm$ 6,93	2,95 $\pm$ 0,300 ^a	71,2 $\pm$ 6,28
Ni	Srpanj 2020*	0,072 $\pm$ 0,019 ^a	39,5 $\pm$ 11,0	0,092 $\pm$ 0,016 ^a	62,5 $\pm$ 9,15
	Lipanj 2021*	0,047 $\pm$ 0,007 ^b	32,7 $\pm$ 10,0	0,072 $\pm$ 0,005 ^b	54,2 $\pm$ 4,40
	Listopad 2021*	0,027 $\pm$ 0,005 ^b	12,4 $\pm$ 3,03	0,060 $\pm$ 0,005 ^b	28,4 $\pm$ 6,35
Pb	Srpanj 2020*	0,039 $\pm$ 0,006 ^a	84,7 $\pm$ 8,28	0,053 $\pm$ 0,015	74,2 $\pm$ 10,3
	Lipanj 2021*	0,031 $\pm$ 0,006 ^{ab}	73,5 $\pm$ 10,8	0,048 $\pm$ 0,008	73,7 $\pm$ 5,21
	Listopad 2021*	0,018 $\pm$ 0,001 ^b	56,3 $\pm$ 8,11	0,066 $\pm$ 0,018	45,3 $\pm$ 14,2
Rb	Srpanj 2020	0,440 $\pm$ 0,020 ^a	93,4 $\pm$ 6,80	0,450 $\pm$ 0,050 ^a	88,5 $\pm$ 3,21
	Lipanj 2021*	0,310 $\pm$ 0,030 ^b	88,8 $\pm$ 9,95	0,250 $\pm$ 0,020 ^b	83,4 $\pm$ 5,50
	Listopad 2021	0,410 $\pm$ 0,020 ^{ab}	83,6 $\pm$ 5,39	0,410 $\pm$ 0,020 ^a	87,4 $\pm$ 7,14

* statistički značajne razlike između postaja unutar svake sezone prema Mann–Whitney U test ($p < 0,05$)

^{A,B} statistički značajne razlike između sezona na REF postaji prema Kruskal–Wallis ANOVA i Dunnov post hoc test ($p < 0,05$)

^{a,b} statistički značajne razlike između sezona na KIZ postaji prema Kruskal–Wallis ANOVA i Dunnov post hoc test ($p < 0,05$)

Tablica 12. – nastavak.

		REF		KIZ	
		Citosolske koncentracije metal(oid)a	% od ukupnog metala	Citosolske koncentracije metal(oid)a	% od ukupnog metala
Sb	Srpanj 2020*	1,35 ± 0,360 ^a	58,4 ± 10,0	2,47 ± 0,41	69,1 ± 5,57
	Lipanj 2021*	1,06 ± 0,100 ^{ab}	34,5 ± 14,1	2,41 ± 0,14	47,6 ± 2,33
	Listopad 2021*	0,770 ± 0,080 ^b	36,8 ± 4,67	2,27 ± 0,17	32,7 ± 7,17
Sr	Srpanj 2020	0,110 ± 0,010	2,73 ± 1,45	0,100 ± 0,020	3,57 ± 1,52
	Lipanj 2021	0,100 ± 0,020	2,38 ± 1,14	0,080 ± 0,010	4,40 ± 2,03
	Listopad 2021	0,110 ± 0,010	1,62 ± 0,32	0,110 ± 0,010	3,53 ± 1,50
Tl	Srpanj 2020	1,65 ± 0,310	43,7 ± 5,62	1,63±0,260 ^a	49,0 ± 4,32
	Lipanj 2021*	1,42 ± 0,280	41,2 ± 5,44	1,96±0,240 ^{ab}	45,2 ± 2,46
	Listopad 2021*	1,52 ± 0,120	36,9 ± 2,02	2,33±0,190 ^b	43,6 ± 4,80
U	Srpanj 2020*	0,018 ± 0,002 ^a	53,22±5,24	0,038 ± 0,004	64,8 ± 4,59
	Lipanj 2021*	0,024 ± 0,003 ^b	46,93±5,65	0,043 ± 0,003	52,7 ± 2,13
	Listopad 2021*	0,017 ± 0,002 ^a	35,03±2,76	0,041 ± 0,002	46,2 ± 5,62

* statistički značajne razlike između postaja unutar svake sezone prema Mann–Whitneyev U test ($p < 0,05$)

^{A,B} statistički značajne razlike između sezona na REF postaji prema Kruskal-Wallis ANOVA i Dunnov post hoc test ($p < 0,05$)

^{a,b} statistički značajne razlike između sezona na KIZ postaji prema Kruskal-Wallis ANOVA i Dunnov post hoc test ($p < 0,05$)

4.2.2.3. Korelacijska analiza

Budući da su školjkaši izloženi različitim metal(oid)ima prisutnim u otopljenom i partikulatnom obliku u vodi, te u sedimentu, proveli smo Spearmanovu korelacijsku analizu kako bismo utvrdili postoji li povezanost između bioakumulirane količine metal(oid)a u probavnoj žlijezdi *U. crassus* i njihovih koncentracija u svakom od gore navedenih riječnih odjeljaka (Tablica 13). Podaci o koncentracijama meta(loid)a u vodi nalaze se u Tablicama 7 i 8, a koncentracije u sedimentu u Tablici 9. Za koncentracije elemenata u sedimentu iz 2020. godine, podaci su preuzeti iz istraživanja Čerkez (2021).

Analiza je pokazala relativno visoku povezanost između ukupne bioakumulacije elemenata u probavnoj žlijezdi *U. crassus* i njihovih koncentracija u okolišu. Tako je 17 od 27 analiziranih elemenata u probavnoj žlijezdi pokazalo pozitivnu korelaciju s koncentracijama meta(loid)a u jednom ili više proučavanih riječnih odjeljaka (Tablica 13). Šest bioakumuliranih elemenata (Cs, Sr, Al, Rb, Ca i Mg) pokazalo je umjerene ($r = 0,5 - 0,7$) do jake ($r > 0,8$) pozitivne korelacije s njihovim koncentracijama u otopljenoj frakciji vode. Tri bioakumulirana elementa (Mo, Pb i U) pokazala su jaku korelaciju ($r = 0,8 - 1$) s njihovim koncentracijama u partikulatnoj frakciji površinske vode, a još pet bioakumuliranih elemenata (Cd, Co, Cu, Mn i V) pokazalo je nisku do umjerenu korelaciju ($r = 0,4 - 0,5$) s tom frakcijom vode. Veći broj bioakumuliranih

elemenata (devet) pokazao je jaku pozitivnu korelaciju s njihovim koncentracijama u sedimentu: Cu, Sb i U ($r > 0,8$); Bi, Cs, Pb i Tl ($r = 0,7 - 0,8$); te Ca i Mo ($r = 0,5 - 0,6$).

S druge strane, citosolske koncentracije 25 elemenata u probavnoj žlijezdi *U. crassus* pokazale su pozitivnu korelaciju s koncentracijama meta(loid)a u jednom ili više proučavanih riječnih odjeljaka (Tablica 13). Umjerena ($r = 0,5 - 0,7$) do jaka ($r > 0,8$) pozitivna korelacija citosolskih koncentracija s njihovim koncentracijama u otopljenoj frakciji vode uočena je za 10 metal(oid)a (Al, Cd, Cr, Cs, Cu, Ni, Rb, Sr, V i Mg). Pet bioakumuliranih elemenata (Ba, Mo, Pb, U i K) pokazali su jaku korelaciju ($r = 0,8 - 1$) s koncentracijama u partikulatnoj frakciji vode, a veći broj bioakumuliranih elemenata (12) pokazao je jaku pozitivnu povezanost s njihovim koncentracijama u sedimentima: Bi, Co, Cs i Fe ($r > 0,8$); As, Cr, Cu, Tl i U ($r = 0,7 - 0,8$); i Al, Mo i K ($r = 0,5 - 0,6$) (Tablica 13).

Tablica 13. Koeficijenti korelacije (r; Spearmanova korelacijska analiza) između ukupnih/citosolskih koncentracija elemenata u probavnoj žlijezdi *U. crassus* i koncentracije elemenata u otopljenoj frakciji vode (OV) / partikulatnoj frakciji vode (PV) / sedimentu (n = 6 za elemente u OV i sedimentu; n = 4 za elemente u PV). Podebljani brojevi prikazuju statistički značajnu pozitivnu korelaciju (p < 0,05).

	Koeficijent korelacije (r)	
	Ukupna koncentracija elemenata naspram	Citosolska koncentracija elemenata naspram
	OV/ PV / sediment	
Al	0,62 / -0,39 / -0,12	0,67 / 0,43 / 0,58
Ag	- / -0,45 / -	- / -0,23 / -
As	-0,21 / -0,79 / -0,35	-0,44 / 0,76 / 0,71
Ba	-0,41 / -0,31 / -0,81	-0,36 / 0,86 / -0,34
Bi	-0,54 / 0,07 / 0,70	-0,30 / 0,14 / 0,81
Cd	0,49 / 0,59 / -0,05	0,48 / 0,59 / 0,00
Co	0,07 / 0,85 / -0,70	-0,24 / -0,16 / 0,80
Cr	-0,36 / -0,45 / -0,80	0,48 / 0,24 / 0,79
Cs	0,70 / -0,52 / 0,83	0,81 / -0,49 / 0,89
Cu	0,61 / 0,29 / 0,76	0,60 / 0,37 / 0,70
Fe	-0,15 / -0,74 / -0,15	-0,03 / 0,33 / 0,84
Mn	-0,42 / 0,35 / -0,93	-0,44 / 0,46 / -0,88
Mo	-0,11 / 0,78 / 0,44	-0,46 / 0,85 / 0,63
Ni	-0,75 / -0,99 / -0,22	0,52 / 0,63 / 0,41
Pb	- / 0,67 / -	- / 0,90 / -
Rb	0,77 / -0,92 / -0,37	0,70 / -0,95 / -0,46
Sb	0,41 / - / 0,89	0,36 / - / 0,41
Se	-0,70 / - / -	-0,35 / - / -
Sr	0,66 / 0,21 / -0,67	0,68 / 0,61 / -0,43
Tl	0,04 / -0,66 / 0,82	-0,14 / -0,40 / 0,71
U	0,31 / 0,95 / 0,42	-0,03 / 1,00 / 0,73
V	0,34 / 0,67 / 0,03	0,51 / 0,65 / 0,30
Zn	-0,33 / - / -0,24	-0,17 / - / 0,22
Ca	0,36 / -0,65 / 0,49	-0,16 / 0,03 / 0,47
K	0,01 / -0,26 / 0,24	-0,21 / 0,96 / 0,51
Na	0,09 / -0,52 / -0,13	0,05 / -0,67 / -0,16
Mg	0,67 / 0,06 / -0,26	0,55 / 0,73 / 0,42

Nedostajuće r-vrijednosti: koncentracije elemenata bile su ispod granice detekcije ili nisu mjerene.

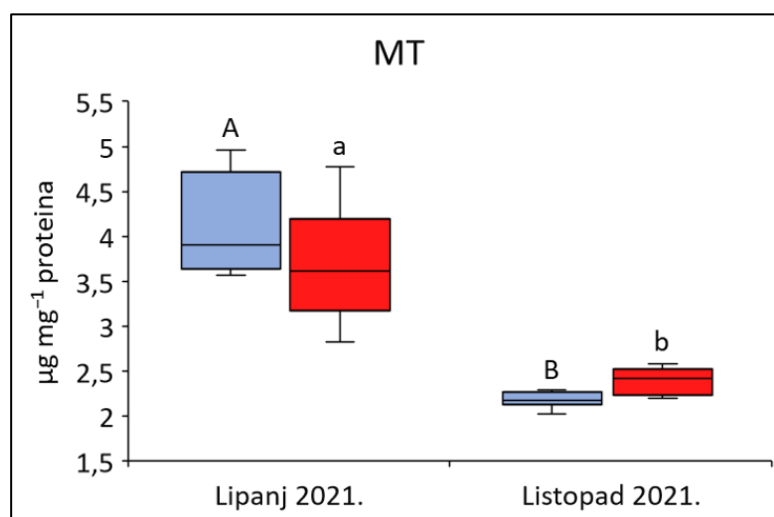
4.3. Biomarkerski odgovori

4.3.1. Koncentracije metalotioneina

Na Slici 16 prikazane su koncentracije metalotioneina (MT) u citosolnoj frakciji probavne žlijezde školjkaša *U. crassus*, izražene u odnosu na citosolske proteine ($\mu\text{g mg}^{-1}$ proteina).

U lipnju su prosječne koncentracije MT iznosile $4,38 \pm 1,06 \mu\text{g mg}^{-1}$ proteina na REF lokaciji i $3,69 \pm 0,63 \mu\text{g mg}^{-1}$ proteina na KIZ lokaciji, dok su u listopadu iznosile $2,25 \pm 0,25 \mu\text{g mg}^{-1}$ proteina na REF lokaciji i $2,39 \pm 0,15 \mu\text{g mg}^{-1}$ proteina na KIZ lokaciji (Slika 16).

Prema Mann–Whitney U testu utvrđeno je da nije bilo statistički značajnih razlika u sadržaju MT između lokacija unutar iste sezone. Međutim, sezonske varijacije bile su izražene: koncentracije MT u lipnju bile su 95 % (REF) i 55 % (KIZ) veće u usporedbi s vrijednostima izmjerenima u listopadu (Slika 16).



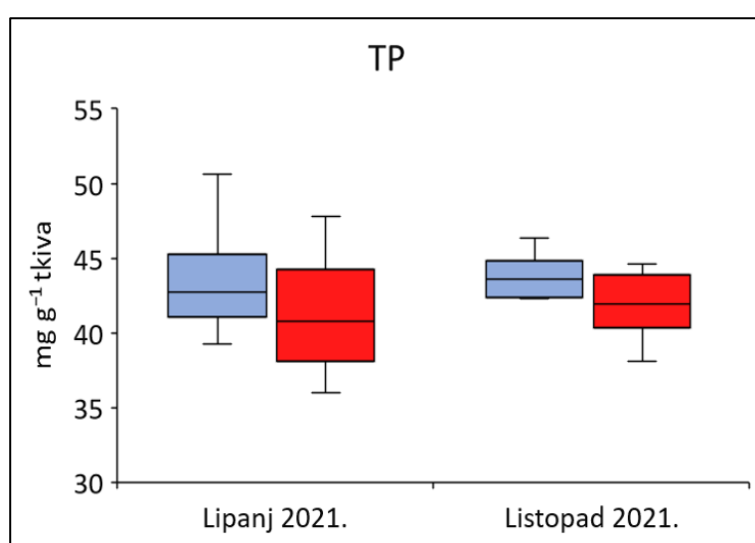
Slika 16. Koncentracije metalotioneina (MT) (izražene u odnosu na citosolske proteine; $\mu\text{g g}^{-1}$ proteina) u probavnoj žlijezdi školjkaša vrste *U. crassus* uzorkovanih na dvije postaje (referentna postaja – REF (svijetlo plava boja); industrijska zona grada Karlovca – KIZ (crvena boja)) u dvije sezone (lipanj i listopad 2021. godine) na rijeci Mrežnici. Statistički značajne razlike između postaja unutar svake sezone označene su zvjezdicom (*) (Mann–Whitneyev U test, $p < 0,05$). Statistički značajne razlike između sezona unutar svake postaje (Mann–Whitneyev U test, $p < 0,05$) označene su različitim slovima (A, B za postaju REF; a, b za postaju KIZ).

4.3.2. Koncentracije ukupnih proteina u citosolskoj frakciji probavne žlijezde

Koncentracije ukupnih citosolskih proteina (TP) (izražene po mokroj masi tkiva; mg g^{-1} tkiva) u probavnoj žlijezdi školjkaša *U. crassus* prikazane su na Slici 17.

Prosječne koncentracije TP iznosile su $43,6 \pm 3,96 \text{ mg g}^{-1}$ tkiva na REF postaji i $41,2 \pm 3,81 \text{ mg g}^{-1}$ tkiva na KIZ postaji u lipnju te $42,6 \pm 3,97 \text{ mg g}^{-1}$ tkiva na REF postaji i $41,8 \pm 2,26 \text{ mg g}^{-1}$ tkiva na KIZ postaji u listopadu (Slika 17).

Iako nisu utvrđene statistički značajne prostorne niti sezonske razlike u koncentracijama TP, prosječne koncentracije TP bile su uvijek nešto niže na KIZ postaji (~5%) u usporedbi s REF.



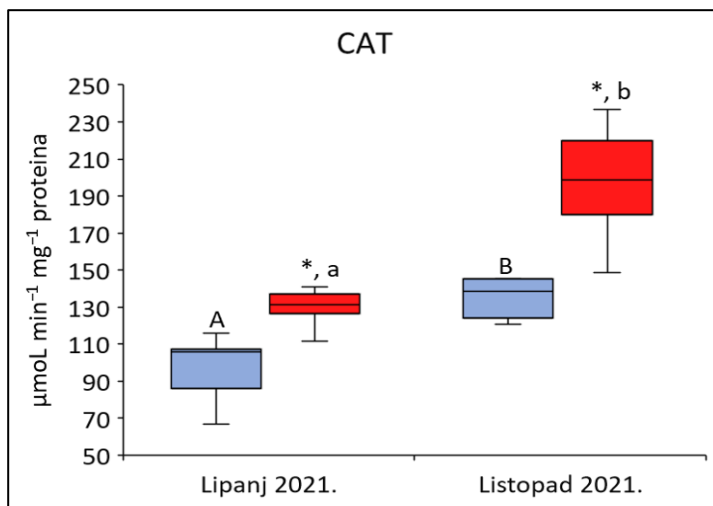
Slika 17. Koncentracije ukupnih citosolskih proteina (TP) (izražene po mokroj masi tkiva; mg g^{-1} tkiva) u probavnoj žlijezdi školjkaša vrste *U. crassus* uzorkovanih na dvije postaje (referentna postaja – REF (svijetlo plava boja); industrijska zona grada Karlovca – KIZ (crvena boja)) u dvije sezone (lipanj i listopad 2021. godine) na rijeci Mrežnici.

4.3.3. Aktivnost katalaze

Na Slici 18 prikazani su rezultati mjerenja aktivnosti katalaze (CAT) u probavnoj žlijezdi školjkaša *U. crassus*, izražene kao μmol razgrađenog H_2O_2 po minuti po mg proteina ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteina).

Prosječne aktivnosti CAT iznosile su $96,5 \pm 17,5 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteina na REF postaji i $131 \pm 8,71 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteina na KIZ postaji u lipnju te $141 \pm 23,7 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteina na REF postaji i $198 \pm 29,3 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteina na KIZ postaji u listopadu (Slika 18).

Statistički značajne razlike između postaja zabilježene su u obje sezone, s povećanom enzimatskom aktivnošću u probavnim žlijezdama školjkaša s KIZ lokacije. Vrijednosti na KIZ lokaciji bile su u prosjeku 35 – 39 % više u obje sezone u usporedbi s REF lokacijom. Sezonske varijacije su pokazale veću aktivnost CAT na obje lokacije u listopadu (46 – 51 %) u usporedbi s lipnjem.

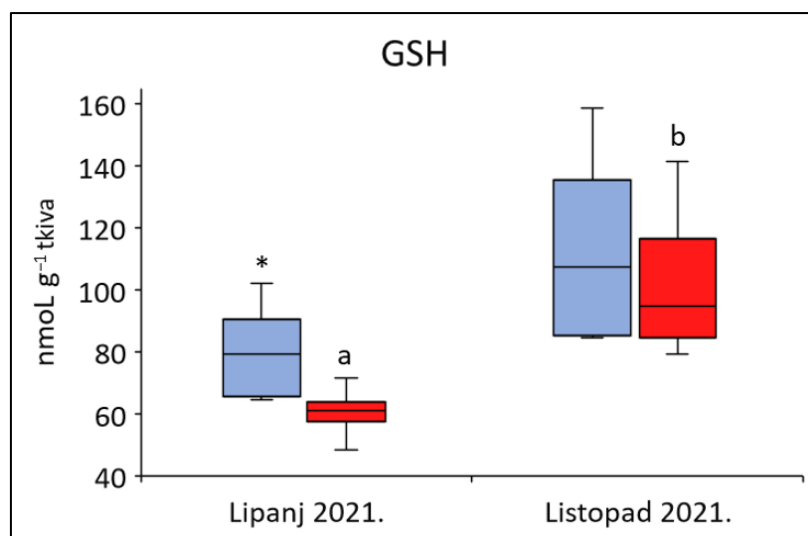


Slika 18. Aktivnost katalaze (CAT) (izražena u μmol razgrađenog H_2O_2 po minuti po mg proteina) u probavnoj žlijezdi školjkaša vrste *U. crassus* uzorkovanih na dvije postaje (referentna postaja – REF (svijetlo plava boja); industrijska zona grada Karlovca – KIZ (crvena boja)) u dvije sezone (lipanj i listopad 2021. godine) na rijeci Mrežnici. Statistički značajne razlike između postaja unutar svake sezone označene su zvjezdicom (*) (Mann–Whitneyev U test, $p < 0,05$). Statistički značajne razlike između sezona unutar svake postaje (Mann–Whitneyev U test, $p < 0,05$) označene su različitim slovima (A, B za postaju REF; a, b za postaju KIZ).

4.3.4. Koncentracije ukupnog glutathiona

Koncentracije ukupnog glutathiona (GSH) (izražene po mokroj masi tkiva; nmol g^{-1} tkiva) u probavnoj žlijezdi *U. crassus* prikazane su na Slici 19.

Prosječne koncentracije GSH iznosile su $79.8 \pm 14.3 \text{ nmol g}^{-1}$ tkiva na REF postaji i $60.2 \pm 6.66 \text{ nmol g}^{-1}$ na postaji KIZ u lipnju te $112 \pm 28.7 \text{ nmol g}^{-1}$ na postaji REF i $103 \pm 24.4 \text{ nmol g}^{-1}$ na KIZ postaji u listopadu (Slika 19). Koncentracije GSH bile su uglavnom niže na lokaciji KIZ u odnosu na REF, posebice u lipnju (30 %), kada je razlika bila statistički značajna. Slično kao kod aktivnosti CAT, na obje lokacije u listopadu zabilježene su više koncentracije GSH (40 – 70 %) u usporedbi s lipnjem.



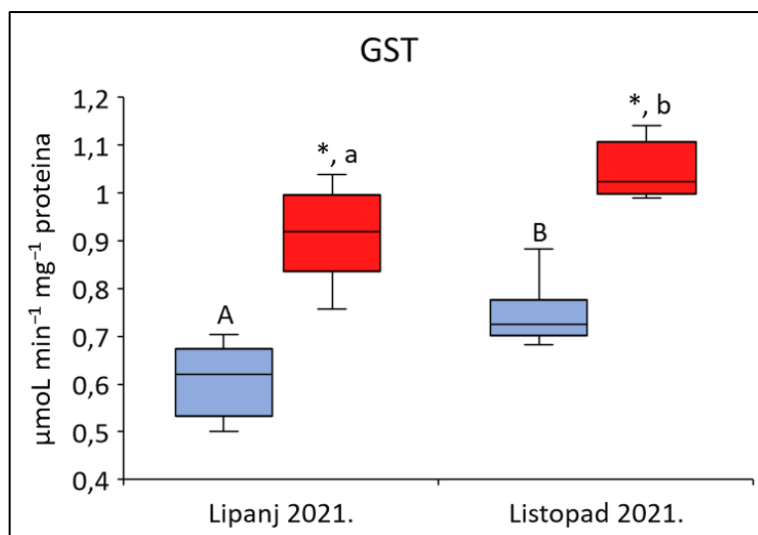
Slika 19. Koncentracije ukupnog glutationa (GSH) (izražene u nmol po g mokre mase tkiva) u probavnoj žlijezdi školjkaša vrste *U. crassus* uzorkovanih na dvije postaje (referentna postaja – REF (svijetlo plava boja); industrijska zona grada Karlovca – KIZ (crvena boja)) u dvije sezone (lipanj i listopad 2021. godine) na rijeci Mrežnici. Statistički značajne razlike između postaja unutar svake sezone označene su zvjezdicom (*) (Mann–Whitneyev U test, $p < 0,05$). Statistički značajne razlike između sezona unutar svake postaje (Mann–Whitneyev U test, $p < 0,05$) označene su različitim slovima (A, B za postaju REF; a, b za postaju KIZ).

4.3.5. Aktivnost glutation S transferaze

Na Slici 20 prikazani su rezultati mjerenja aktivnosti glutation S transferaze (GST) u probavnoj žlijezdi školjkaša *U. crassus*, izražene u $\mu\text{mol po minuti po mg proteina}$.

Prosječne aktivnosti GST iznosile su $0,605 \pm 0,080 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteina na REF postaji i $0,911 \pm 0,090 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ na KIZ postaji u lipnju te $0,750 \pm 0,070 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteina na REF postaji i $1,05 \pm 0,05 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ na KIZ postaji u listopadu (Slika 20).

Prostorni i sezonski obrasci aktivnosti GST bili su slični onima utvrđenima za aktivnost CAT. Aktivnosti GST bile su u prosjeku 39 – 50 % više na KIZ lokaciji u odnosu na REF u obje sezone (Slika 20). Također, u listopadu su na obje lokacije zabilježene statistički značajno više vrijednosti (15 – 24 %) u usporedbi s lipnjem.

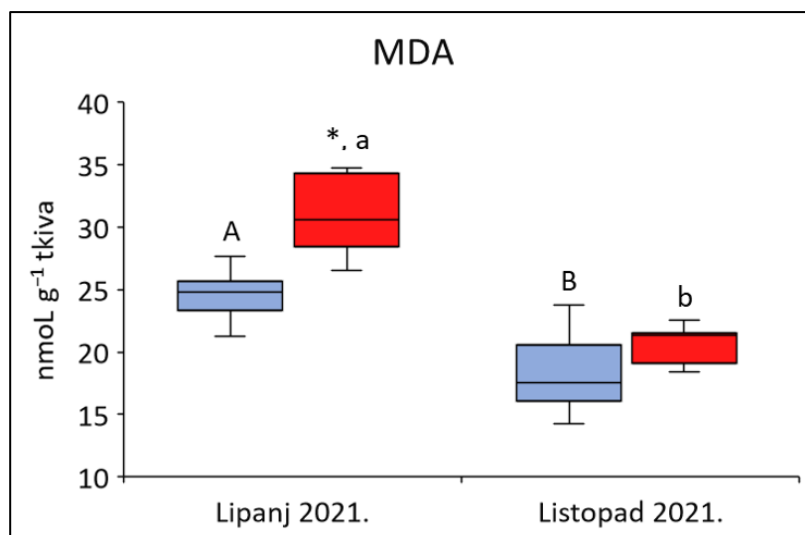


Slika 20. Aktivnost glutation S transferaze (GST) (izražene u $\mu\text{mol po minuti po mg proteina}$) u probavnoj žlijezdi školjkaša vrste *U. crassus* uzorkovanih na dvije postaje (referentna postaja – REF (svijetlo plava boja); industrijska zona grada Karlovca – KIZ (crvena boja)) u dvije sezone (lipanj i listopad 2021. godine) na rijeci Mrežnici. Statistički značajne razlike između postaja unutar svake sezone označene su zvjezdicom (*) (Mann–Whitneyev U test, $p < 0,05$). Statistički značajne razlike između sezona unutar svake postaje (Mann–Whitneyev U test, $p < 0,05$) označene su različitim slovima (A, B za postaju REF; a, b za postaju KIZ).

4.3.6. Koncentracije malondialdehida

Koncentracije malondialdehida (MDA) u probavnoj žlijezdi *U. crassus*, izražene u $\text{nmol po g mokre mase tkiva}$, prikazane su na Slici 21. Prosječne koncentracije MDA iznosile su $24,5 \pm 2,1 \text{ nmol g}^{-1}$ tkiva na REF lokaciji i $31,7 \pm 5,1 \text{ nmol g}^{-1}$ na lokaciji KIZ u lipnju te $18,4 \pm 3,6 \text{ nmol g}^{-1}$ na lokaciji REF i $19,9 \pm 3,2 \text{ nmol g}^{-1}$ na KIZ lokaciji u listopadu (Slika 21).

Razlika između postaja bila je statistički značajna u lipnju, pri čemu su prosječne vrijednosti na KIZ postaji bile približno 23% veće u usporedbi s REF lokacijom (Slika 21). Sezonske razlike bile su statistički značajne na obje postaje, pri čemu su koncentracije MDA bile veće u lipnju za 33% na REF postaji i 60% na KIZ postaji u usporedbi s listopadom (Slika 21).



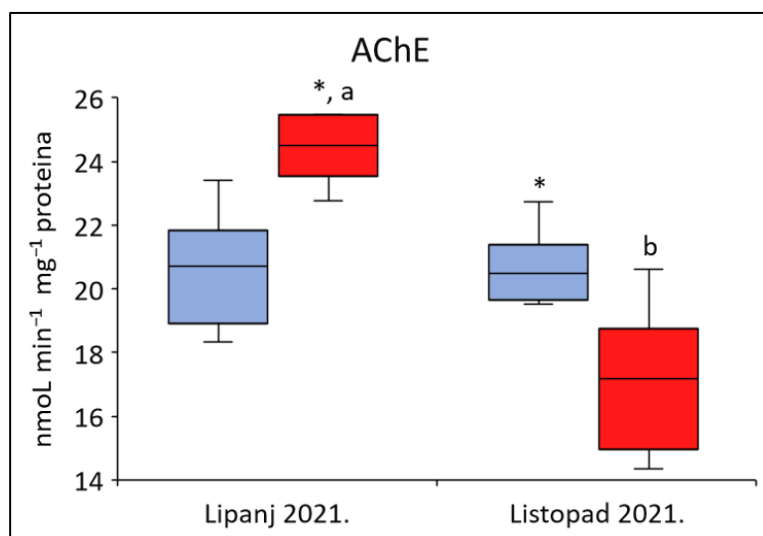
Slika 21. Koncentracija malondialdehida (MDA) (izražene u nmol po g mokre mase tkiva) u probavnoj žlijezdi školjkaša vrste *U. crassus* uzorkovanih na dvije postaje (referentna postaja – REF (svijetlo plava boja); industrijska zona grada Karlovca – KIZ (crvena boja)) u dvije sezone (lipanj i listopad 2021. godine) na rijeci Mrežnici. Statistički značajne razlike između postaja unutar svake sezone označene su zvjezdicom (*) (Mann–Whitneyev U test, $p < 0,05$). Statistički značajne razlike između sezona unutar svake postaje (Mann–Whitneyev U test, $p < 0,05$) označene su različitim slovima (A, B za postaju REF; a, b za postaju KIZ).

4.3.7. Aktivnost acetilkolinesteraze

Na Slici 22 prikazani su rezultati mjerenja aktivnosti acetilkolinesteraze (AChE) u probavnoj žlijezdi školjkaša *U. crassus*, izražene u nmol razgrađenog acetiltiokolina po minuti po mg proteina.

Prosječne aktivnosti AChE su bile $20,6 \pm 2,0$ nmol min⁻¹ mg⁻¹ proteina na REF postaji i $27,3 \pm 6,7$ nmol min⁻¹ mg⁻¹ proteina na postaji KIZ u lipnju; te $20,2 \pm 2,1$ nmol min⁻¹ mg⁻¹ proteina na postaji REF i $17,1 \pm 2,5$ nmol min⁻¹ mg⁻¹ proteina na KIZ postaji u listopadu.

Statistički značajne razlike između postaja bile su vidljive u obje sezone. U lipnju su vrijednosti bile više na KIZ lokaciji (~33 %) u usporedbi s REF, dok su u listopadu bile više na REF lokaciji (18 %) u usporedbi s KIZ lokacijom. Razlika između sezona unutar iste postaje bila je statistički značajna samo na lokaciji KIZ, gdje je aktivnost AChE u lipnju bila u prosjeku ~60 % viša nego u listopadu (Slika 22).



Slika 22. Aktivnost acetilkolinesteraze (AChE) (izražene u nmol razgrađenog acetiltiokolina po minuti po mg proteina) u probavnoj žlijezdi školjkaša vrste *U. crassus* uzorkovanih na dvije postaje (referentna postaja – REF (svijetlo plava boja); industrijska zona grada Karlovca – KIZ (crvena boja)) u dvije sezone (lipanj i listopad 2021. godine) na rijeci Mrežnici. Statistički značajne razlike između postaja unutar svake sezone označene su zvjezdicom (*) (Mann–Whitneyev U test, $p < 0,05$). Statistički značajne razlike između sezona unutar svake postaje (Mann–Whitneyev U test, $p < 0,05$) označene su različitim slovima (A, B za postaju REF; a, b za postaju KIZ).

4.4. Raspodjela odabranih metal(oid)a između citosolskih biomolekula primjenom HPLC–ICP–MS–a

4.4.1. Raspodjela odabranih metal(oid)a između citosolskih biomolekula različite molekulske mase primjenom SE₂₀₀–HPLC–ICP–MS–a

Za proučavanje raspodjele (ne)esencijalnih metal(oid)a između citosolskih biomolekula različite molekulske mase primjenom SE₂₀₀–HPLC–ICP–MS–a, odabrana su po tri uzorka na svakoj od istraživanih postaja (referentna postaja – REF; industrijska zona grada Karlovca – KIZ). Citosolske koncentracije 13 analiziranih elemenata u probavnim žlijezdama odabranih uzoraka prikazane su u Tablici 14.

Tablica 14. Citosolske koncentracije (ne)esencijalnih elemenata (izražene u $\mu\text{g g}^{-1}$ i ng g^{-1} mokre mase) u probavnoj žlijezdi školjkaša *U. crassus* odabranih za kromatografsko razdvajanje biomolekula koje vežu metal(oid)e primjenom SE_{200} –HPLC–ICP–MS–a. Školjkaši su uzorkovani na dvjema postajama: referentna postaja – REF; KIZ – industrijska zona Karlovca.

		REF–1	REF–2	REF–3	KIZ–1	KIZ–2	KIZ–3
ESENCIJALNI	Co / ng g^{-1}	119	104	111	157	146	165
	Cu / $\mu\text{g g}^{-1}$	0,760	1,00	0,840	3,35	2,03	2,47
	Fe / $\mu\text{g g}^{-1}$	6,78	10,1	8,65	23,4	16,6	15,6
	Mn / $\mu\text{g g}^{-1}$	3,24	3,52	3,38	2,25	1,61	2,10
	Mo / ng g^{-1}	116	102	124	266	144	138
	Se / ng g^{-1}	557	511	606	600	565	604
	Zn / $\mu\text{g g}^{-1}$	7,00	7,59	6,80	7,17	9,64	7,59
NEESENCIJALNI	Ag / ng g^{-1}	3,30	4,65	4,18	5,05	17,4	3,88
	As / ng g^{-1}	274	310	275	465	480	372
	Bi / ng g^{-1}	1,98	2,06	2,55	3,96	3,75	2,70
	Cd / ng g^{-1}	787	180	255	97,9	47,3	53,2
	Pb / ng g^{-1}	31,5	19,4	46,0	48,7	80,0	73,6
	Tl / ng g^{-1}	1,30	1,54	1,75	1,88	2,52	1,68

Za većinu proučavanih elemenata, uzorci s REF postaje imali su općenito niže citosolske koncentracije u usporedbi s uzorcima s KIZ postaje, s razlikama u rasponu od od 1,3 puta za Tl do 3,3 puta za Cu. Iznimke su bili Cd i Mn, s višim koncentracijama u uzorcima s REF postaje (u prosjeku, Cd $\sim 6,2$ puta; Mn $\sim 1,7$ puta), te Zn i Se, čije su koncentracije bile slične na obje postaje. Ove prostorne razlike reprezentativne su za cijeli skup podataka o ukupno bioakumuliranim i citosolskim koncentracijama elemenata u probavnoj žlijezdi školjkaša *U. crassus* prikupljenih tijekom uzorkovanja 2021. godine, što je detaljno prikazano u Poglavlju 4.2.2.

Primarna karakterizacija citosolskih biomolekula koje vežu odabrane elemente u probavnoj žlijezdi školjkaša *U. crassus* temeljena je na njihovim molekulskim masama (MM). Citosolske biomolekule razdvojene su po veličini primjenom kromatografske tehnike isključenja molekula po veličini, uz korištenje Superdex® 200 Increase 10/300 GL (Cytiva, SAD) kolone, a detekcija elemenata vezanih za biomolekule različitih molekulskih masa provedena je pomoću ICP–MS–a povezanog direktno s HPLC–om (vezani sustav SE_{200} –HPLC–ICP–MS). Na SE_{200} –HPLC–ICP–MS kromatografskim profilima razlučenih citosola, prema molekulskim masama maksimuma metala mogu se ugrubo definirati četiri kategorije biomolekula koji vežu metale:

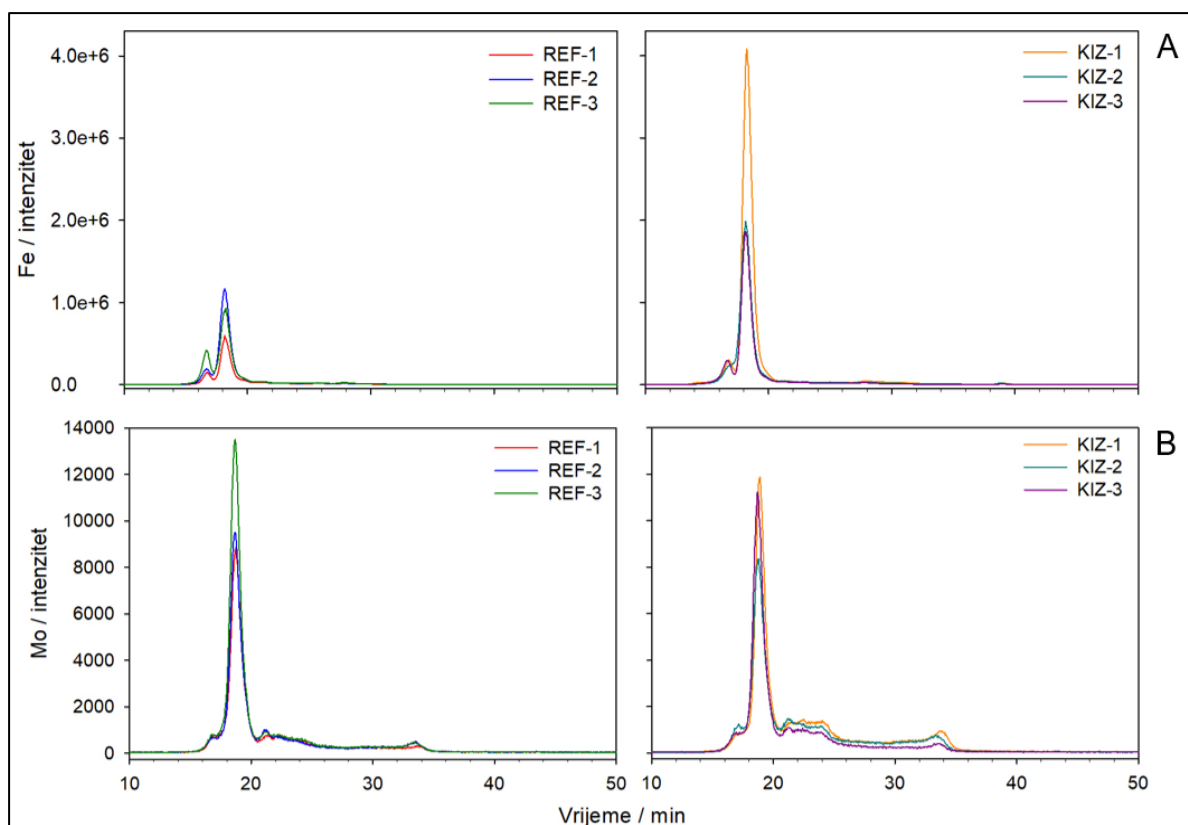
kategorija biomolekula velike molekulske mase (VMM, obuhvaća elucijsko područje s maksimumima metala u regiji proteina MM > 100 kDa i elucijskim vremenom (t_e) 13 – 22 min), kategorija biomolekula srednje molekulske mase (SMM, obuhvaća elucijsko područje s maksimumima metala u regiji proteina MM od 30 do 100 kDa i t_e 22 – 26 min), kategorija biomolekula niske molekulske mase (NMM, obuhvaća elucijsko područje s maksimumima metala u regiji proteina MM od 10 do 30 kDa i t_e 26 – 30 min) i kategorija biomolekula vrlo niske molekulske mase (VNMM, obuhvaća elucijsko područje s maksimumima metala u regiji proteina MM < 10 kDa i t_e 30 – 50 min). Iako raspon razlučivanja kolone obuhvaća mase od 10 do 600 kDa, izračunali smo i mase iznad i ispod ovog raspona, pri čemu smo bili svjesni ograničenja tih rezultata.

4.4.1.1. SE₂₀₀–HPLC–ICP–MS profili elemenata koji su predominantno vezani za VMM biomolekule – Fe i Mo

U ovom istraživanju dva esencijalna elementa, Fe (~84 – 91 %) i Mo (~58 – 72 %; Tablica 15), bila su pretežno vezana za VMM biomolekule. Eluiranje Fe zabilježeno je u tri VMM pika (Tablica 15). Najizraženiji pik na oba lokaliteta bio je Fe–HMM–2 (MM ~355 – 380 kDa), pri čemu je visina pika na postaji KIZ bila višestruko veća nego na REF postaji (Slika 23A), što je u skladu s mnogo većim citosolskim koncentracijama Fe na KIZ postaji (Tablica 15). Osim toga, vrijeme elucije (t_e) ovog pika (t_e = 18,1 – 18,3 min) dobro se podudaralo s vremenom elucije standarda apoferitina (t_e = 17,8 min; Tablica 15). Za Mo su pronađena tri VMM pika (Tablica 15). Najizraženiji pik na obje postaje bio je Mo–HMM–2 (MM ~290 – 315 kDa) (Slika 23B, Tablica 15).

Osim za VMM biomolekule, također su uočeni manji udjeli vezanja Fe i Mo za biomolekule nižih molekulskih masa (Tablica 15). Željezo je eluiralo u NMM području (~15,5 – 17,5 kDa). Oba elementa također su eluirala u SMM (Fe: ~30 – 40 kDa; Mo: ~90 – 100 kDa; Tablica 15) i VNMM području (Fe: ~0,425 – 0,490 kDa; Mo: ~2,40 – 2,85 kDa; Tablica 15).

S porastom koncentracija Fe zabilježeno je povećano eluiranje Fe u Fe–VMM–2 (~350 – 380 kDa; r = 0,97), Fe–VMM–3 (~135 – 145 kDa; r = 0,88), Fe–NMM–1 (~15,5 – 17,5 kDa; r = 0,87) i Fe–VNMM–1 (~0,425 – 0,490 kDa; r = 0,84), što je potvrđeno statistički značajnim pozitivnim korelacijama između intenziteta maksimuma pikova i citosolskih koncentracija Fe (Tablica 15). Povećano eluiranje Mo, u skladu s porastom citosolskih koncentracija Mo, zabilježeno je u pikovima Mo–SMM–1 (~90 – 100 kDa; r = 0,99) i Mo–VNMM–1 (~2,40 – 2,85 kDa; r = 0,82) (Tablica 15).



Slika 23. Kromatografski profili raspodjele željeza (A) i molibdena (B) vezanih za citosolske biomolekule probavne žlijezde različitih molekulskih masa, razdvojenih primjenom vezanog sustava SE₂₀₀–HPLC–ICP–MS sa Superdex® 200 Increase 10/300 GL (Cytiva, SAD) kolonom, u odabranim uzorcima školjkaša *U. crassus* s dviju postaja na rijeci Mrežnici: REF – referentna postaja; KIZ – industrijska zona Karlovca. Rezultati su prikazani za tri uzorka po lokaciji uzorkovanja kao intenziteti elemenata (y-os) u odnosu na vrijeme elucije (min; x-os).

Tablica 15. Raspodjela esencijalnih elemenata Fe i Mo među biomolekulama različitih molekulskih masa u citosolu probavne žlijezde školjkaša *Unio crassus*, dobivena pomoću vezanog sustava SE₂₀₀–HPLC–ICP–MS. Tablica prikazuje pregled glavnih pikova vezanih metala (vrijeme elucije (t_e) maksimuma pika s pripadajućim molekulskim masama). Također su prikazani udjeli metala (%) unutar svakog područja molekulske mase (MM) te koeficijenti korelacije (r) između intenziteta metala u maksimumima pikova (maks. cps) i njihovih citosolskih koncentracija (c_c) ($n = 6$). Dominantni pikovi za svaki metal i značajne korelacije ($p < 0,05$) označeni su podebljano.

	MM područje	Pik	Maksimum pika (t_e / min)	MM (~kDa)	Udio metala u MM području (%)	r [maks. cps; c_c]
Fe	VMM	VMM–1	16,6 – 16,8	560 – 615	83,8 – 91,4	0,27
		VMM–2	18,1 – 18,3	355 – 380		0,97
		VMM–3	21,1 – 21,3	135 – 145		0,88
	SMM	SMM–1	25,0 – 25,9	30,0 – 40,0	2,5 – 6,5	0,79
	NMM	NMM–1	27,7 – 28,0	15,5 – 17,5	2,8 – 5,3	0,87
	VNMM	VNMM–1	38,8 – 39,2	0,425 – 0,490	2,7 – 3,9	0,84
Mo	VMM	VMM–1	16,8 – 17,2	505 – 580	58,3 – 72,2	0,02
		VMM–2	18,7 – 18,9	290 – 315		0,30
		VMM–3	21,1 – 21,5	125 – 145		0,59
	SMM	SMM–1	22,3 – 22,5	90,0 – 100	9,5 – 16,3	0,99
	VNMM	VNMM–1	33,3 – 33,8	2,40 – 2,85	9,5 – 14,9	0,82

VMM – visoka molekulska masa

SMM – srednja molekulska masa

NMM – niska molekulska masa

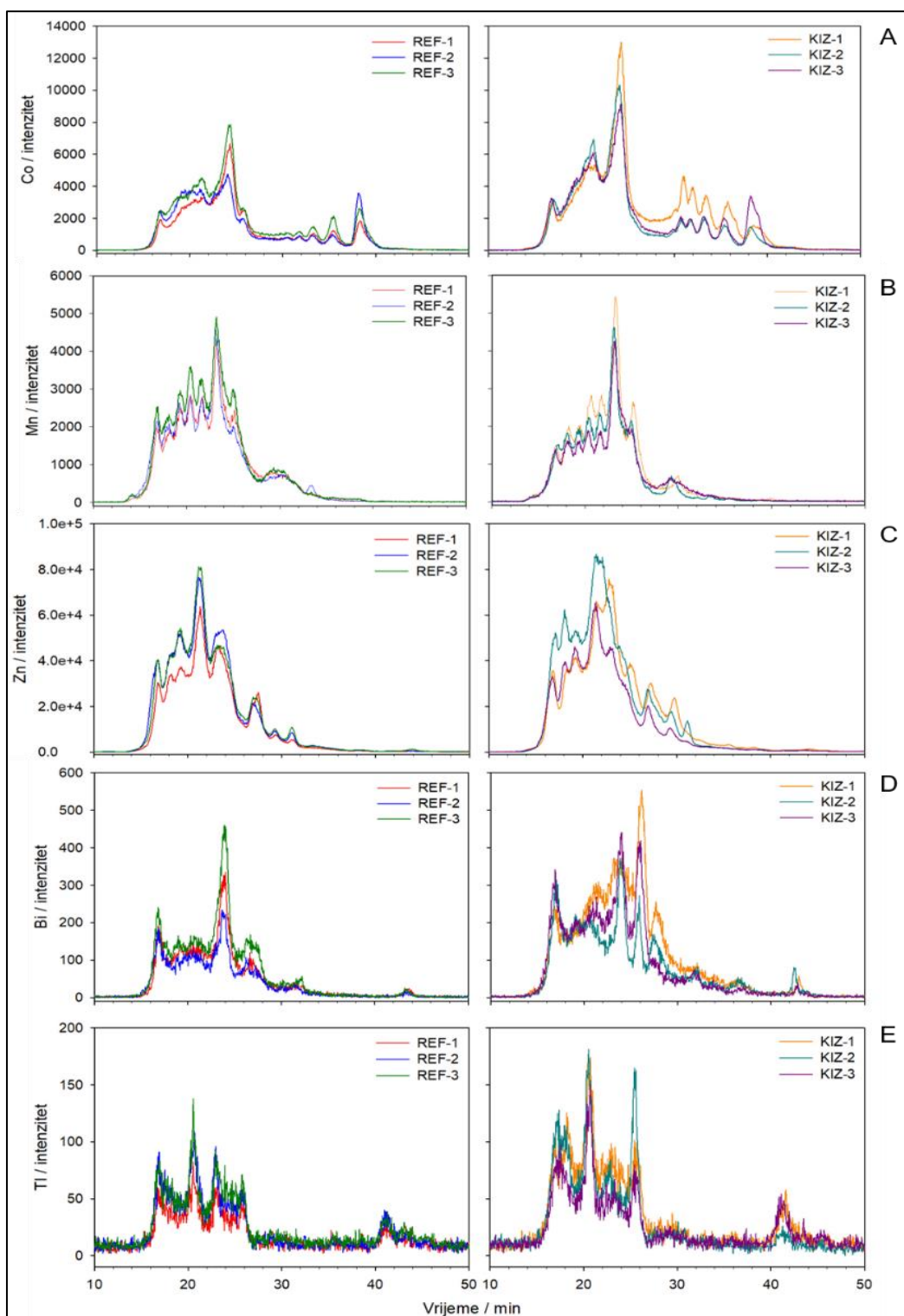
VNMM – vrlo niska molekulska masa

4.4.1.2. SE₂₀₀–HPLC–ICP–MS profili elemenata koji su podjednako vezani za VMM i SMM biomolekule – Co, Mn, Zn, Bi i Tl

Elementi koji su usporedivo eluirali u VMM i SMM području bili su esencijalni elementi Co (VMM: 27 – 40 %; SMM: 29 – 37 %), Mn (VMM: 41 – 47 %; SMM: 34 – 42 %) i Zn (VMM: 41 – 55 %; SMM: 27 – 34 %), te neesencijalni elementi Bi (VMM: 32 – 44 %; SMM: 27 – 37 %) i Tl (VMM: 33 – 50 %; SMM: 16 – 25 %) (Tablica 16; Slika 24).

Iako su se svi navedeni elementi vezali za široki raspon biomolekula molekulskih masa i eluirali unutar brojnih slabo razlučenih pikova, neki od tih pikova bili su izraženiji od drugih. Tako su Zn i Tl pretežno eluirali unutar VMM pika koji odgovara MM od ~120 – 175 kDa (Tablica 16; Slike 24C i 24E). Za preostala tri elementa, tj. Co, Mn i Bi, najdominantniji pikovi su zabilježeni u SMM području. Mangan i Bi (Slike 24B i 24D) pretežno su eluirali unutar SMM pika koji odgovara MM ~55 – 75 kDa (Tablica 16) i koji se preklapa s vremenom elucije proteinskog standarda transferina (Tablica 16). Najizraženiji pik za Co bio je SMM–1

(~50 – 55 kDa) (Slika 24A; Tablica 16), s vremenom eluiranja koje se podudara s proteinskim standardom albuminom (Tablica 16). Značajni udjeli Mn, Zn i Bi (Slike 25B–D) dodatno su eluirali u NMM području. Značajniji pik Bi odgovarao je MM ~25 – 30 kDa uz dodatni pik s MM od ~15 – 17,5 kDa. Cink je također eluirao unutar pika koji se djelomično preklapao s pikom Bi- (~17,5 – 22 kDa) i u dodatnom piku koji se preklapao s Mn (~8 – 11 kDa) (Tablica 16). Nadalje, Co, Zn, Bi i Tl (Slike 24A, 24C–E) eluirali su i u VNMM području. Konačno, većina pikova povezanih s ova tri esencijalna elementa bila je općenito izraženija u uzorcima s višim citosolskim koncentracijama elemenata, a povećanje intenziteta nekih od tih pikova značajno je koreliralo s citosolskim koncentracijama metala (npr. Mn, VMM-1 (~520 – 580 kDa; $r = 0,88$), VMM-3 (~240 – 270 kDa; $r = 0,88$); Zn, VMM-2 (~355 – 380 kDa; $r = 0,91$), VMM-3 (~320 – 330 kDa; $r = 0,99$), Tablica 16). Slično je vidljivo i za neesencijalne elemente Bi i Tl, i to za sljedeće pikove: Bi-VMM-2 (~120 – 170 kDa; $r = 0,81$), Tl-VMM-1 (~440 – 560 kDa; $r = 0,91$), Tl-VMM-2 (~160 – 175 kDa; $r = 0,86$) i Tl-SMM-2 (~30 – 35 kDa; $r = 0,98$) (Tablica 16).



Slika 24. Kromatografski profili raspodjele kobalta (A), mangana (B), cinka (C), bizmuta (D) i talija (E) vezanih za citosolske biomolekule probavne žlijezde različitih molekulskih masa, razdvojenih primjenom vezanog sustava SE₂₀₀–HPLC–ICP–MS sa Superdex® 200 Increase 10/300 GL (Cytiva, SAD) kolonom, u odabranim uzorcima školjkaša *U. crassus* s dviju postaja na rijeci Mrežnici: REF – referentna postaja; KIZ – industrijska zona Karlovca. Rezultati su prikazani za tri uzorka po lokaciji uzorkovanja kao intenziteti elemenata (y-os) u odnosu na vrijeme elucije (min; x-os).

Tablica 16. Raspodjela esencijalnih elemenata Co, Mn i Zn te neesencijalnih elemenata Bi i Tl među biomolekulama različitih molekulskih masa u citosolu probavne žlijezde školjakaš *Unio crassus*, dobivena pomoću vezanog sustava SE₂₀₀–HPLC–ICP–MS. Tablica prikazuje pregled glavnih pikova vezanih metala (vrijeme elucije (t_e) maksimuma pika s pripadajućim molekulskim masama). Također su prikazani udjeli metala (%) unutar svakog područja molekulske mase (MM) te koeficijenti korelacije (r) između intenziteta metala u maksimumima pikova (maks. cps) i njihovih citosolskih koncentracija (c_c) (n = 6). Dominantni pikovi za svaki metal i značajne korelacije ($p < 0,05$) označeni su podebljano.

	MM područje	Pik	Maksimum pika (t_e / min)	MM (~kDa)	Udio metala u MM području (%)	r [maks. cps; c_c]
Co	VMM	VMM–1	16,8 – 17,1	520 – 580	26,7 – 40,2	0,81
		VMM–2	20,3 – 20,8	160 – 190		0,79
		VMM–3	21,1 – 21,4	130 – 145		0,81
	SMM	SMM–1	24,1 – 24,3	50,0 – 55,0	29,2 – 36,7	0,81
		SMM–2	25,7 – 25,9	30,0 – 35,0		0,75
	VNMM	VNMM–1	30,3 – 30,8	6,00 – 7,50	19,4 – 29,3	0,74
		VNMM–2	31,7 – 32,0	4,35 – 4,80		0,74
		VNMM–3	33,2 – 33,4	2,80 – 3,00		0,80
		VNMM–4	35,4 – 35,8	1,25 – 1,50		0,62
		VNMM–5	38,1 – 38,5	0,530 – 0,650		–0,26
Mn	VMM	VMM–1	16,8 – 17,2	520 – 580	41,4 – 46,8	0,88
		VMM–2	18,1 – 18,3	355 – 380		0,68
		VMM–3	19,2 – 19,5	240 – 270		0,88
		VMM–4	20,4 – 20,7	160 – 190		0,73
		VMM–5	21,6 – 21,8	115 – 123		0,70
	SMM	SMM–1	23,2 – 23,3	70,0 – 75,0	33,7 – 41,6	–0,06
		SMM–2	25,0 – 25,1	40,0 – 40,2		0,35
	NMM	NMM–1	29,1 – 30,1	8,00 – 11,0	7,0 – 12,2	0,78
Zn	VMM	VMM–1	16,8 – 17,1	520 – 580	41,0 – 55,1	0,81
		VMM–2	18,1 – 18,3	355 – 380		0,91
		VMM–3	18,5 – 18,6	320 – 330		0,99
		VMM–4	19,1 – 19,3	255 – 275		0,42
		VMM–5	21,3 – 21,6	120 – 135		0,61
	SMM	SMM–1	22,8 – 23,8	60,0 – 85,0	27,0 – 34,1	0,03
	NMM	NMM–1	26,9 – 27,5	17,5 – 22,0	9,6 – 15,4	0,16
		NMM–2	29,2 – 29,8	8,00 – 11,0		0,33
	VNMM	VNMM–1	31,0 – 31,3	5,50 – 6,00	5,0 – 8,4	0,62
		VNMM–2	33,3	3,00		–
		VNMM–3	35,5 – 36,5	1,00 – 1,50		–
		VNMM–4	38,1 – 39,0	0,450 – 0,600		0,04
		VNMM–5	43,8 – 44,1	0,080 – 0,100		–0,39

VMM – visoka molekulska masa

SMM – srednja molekulska masa

NMM – niska molekulska masa

VNMM – vrlo niska molekulska masa

Tablica 16. – nastavak.

	MM područje	Pik	Maksimum pika (t _e / min)	MM (~kDa)	Udio metala u MM području (%)	r [maks. cps; c _c]
Bi	VMM	VMM-1	16,8 – 17,1	520 – 580	32,0 – 43,5	0,54
		VMM-2	20,6 – 21,6	120 – 170		0,81
	SMM	SMM-1	23,2 – 24,0	55,0 – 75,0	26,9 – 36,7	0,30
	NMM	NMM-1	26,0 – 26,7	25,0 – 30,0	12,7 – 21,5	0,77
		NMM-2	27,4 – 27,7	15,0 – 17,5		0,84
	VNMM	VNMM-1	31,3 – 32,2	4,00 – 5,50	8,5 – 15,9	0,95
		VNMM-2	36,5 – 37,2	0,800 – 1,00		0,90
		VNMM-3	42,9 – 43,5	0,100 – 0,130		0,90
Tl	VMM	VMM-1	16,9 – 17,6	440 – 560	33,4 – 50,2	0,91
		VMM-2	20,5 – 20,7	160 – 175		0,86
	SMM	SMM-1	22,9 – 23,3	70,0 – 80,0	16,4 – 25,4	0,35
		SMM-2	25,5 – 25,9	30,0 – 35,0		0,98
	VNMM	VNMM-1	41,0 – 41,6	0,200 – 0,240	17,5 – 31,2	-0,28

VMM – visoka molekulska masa

SMM – srednja molekulska masa

NMM – niska molekulska masa

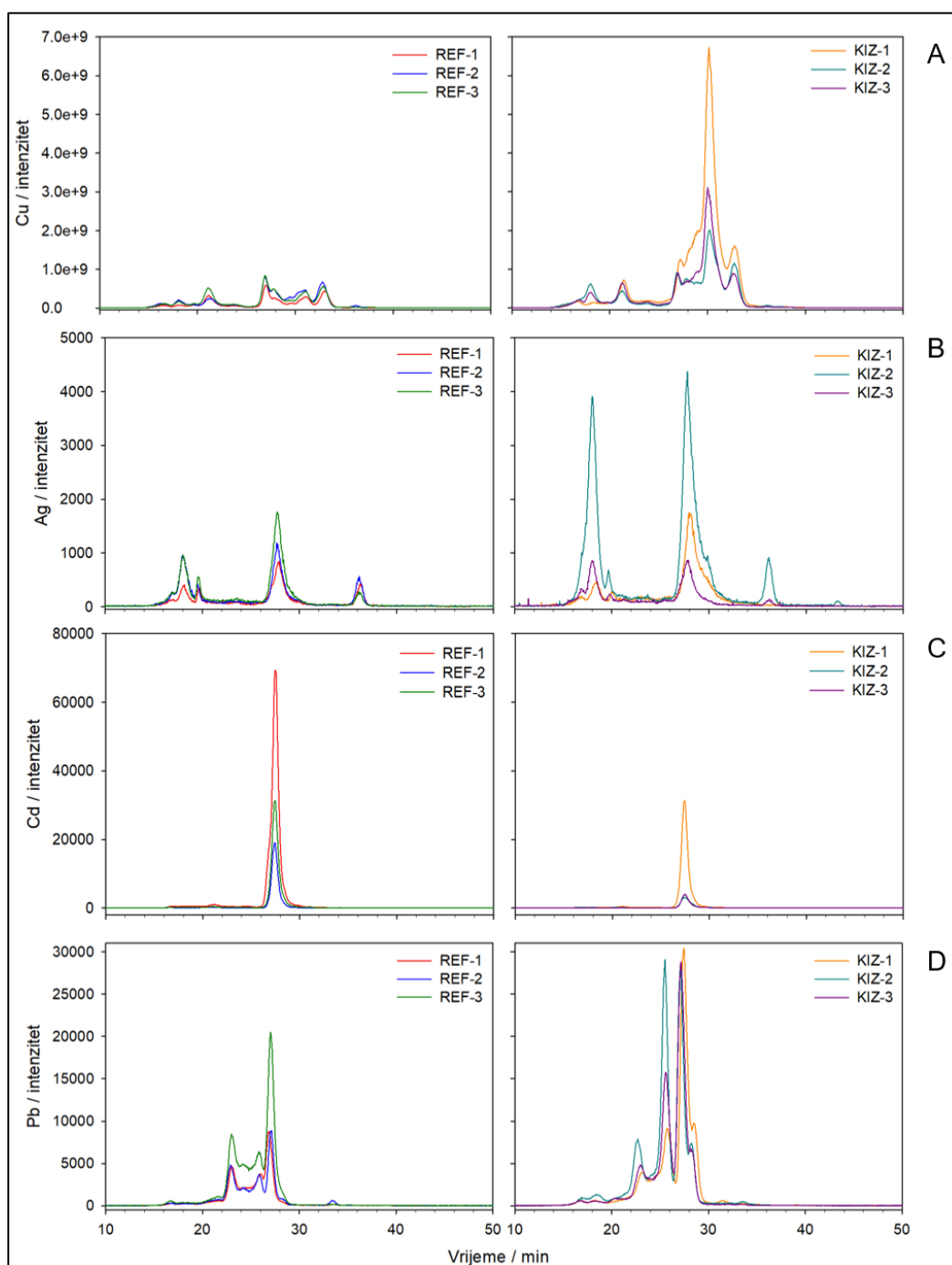
VNMM – vrlo niska molekulska masa

4.4.1.3. *SE₂₀₀-HPLC-ICP-MS profili elemenata koji su predominantno vezani za NMM biomolekule – Cu, Ag, Cd i Pb*

Bakar, kao esencijalni element, te tri neesencijalna elementa (Ag, Cd i Pb) pretežno su eluirali u NMM području, pri čemu je Cd gotovo isključivo vezan za NMM biomolekule (Cu: 32 – 38%; Ag: 33 – 50 %; Cd: 74 – 91 %; Pb: 38 – 64 %) (Slika 25). Standardi MT1 i MT2 također su eluirali u ovom području (Tablica 6). Bakar je pretežno eluirao unutar NMM pika koji odgovara MM od ~7,5 – 10 kDa, ali i unutar dva dodatna NMM pika (MM ~16 – 17,5 i ~20 – 25 kDa). S druge strane, Ag i gotovo sav Cd, pretežno su se vezali za NMM pikove u rasponu MM ~16 – 19 kDa (Tablica 17; Slike 25B–C), također preklapajući se sa Cu–NMM-2 pikom. Olovo se donekle razlikuje od preostalih elemenata, pretežno eluirajući unutar NMM pika s maksimumima koji odgovaraju MM~17,5 – 22 kDa (Tablica 17; Slika 25D).

Značajni udjeli Cu i Ag također su eluirali unutar VMM i VNMM područja, a Pb unutar SMM područja, dok su dodatna eluiranja Cd bila zanemariva (Tablica 17). Za sva četiri elementa, povećani intenzitet većine uočenih pikova odražavali su povećane citosolske koncentracije, što je potvrđeno statistički značajnim pozitivnim korelacijama intenziteta pikova s citosolskim koncentracijama elemenata (Tablica 17). Kod Cu, kao esencijalnog elementa, statistički značajne pozitivne korelacije između maksimuma pikova i citosolskih koncentracija Cu uočene

su za: VMM-2 ($r = 0,88$), VMM-3 ($r = 0,83$), SMM-1 ($r = 0,96$), NMM-1 ($r = 0,89$), NMM-3 ($r = 0,97$) i VNMM-2 ($r = 0,94$) (Tablica 17). Statistički značajne pozitivne korelacije između maksimuma pikova i citosolskih koncentracija neesencijalnih elemenata Ag, Cd i Pb bile su vidljive za: Ag-VMM-2 ($r = 0,98$), Ag-NMM-1 ($r = 0,97$), Ag-VNMM-2 ($r = 0,98$), Cd-VMM-1 ($r = 0,99$), Cd-VMM-2 ($r = 0,99$), Cd-SMM-2 ($r = 0,99$), Cd-NMM-1 ($r = 0,98$), Pb-VMM-1 ($r = 0,88$), Pb-VMM-2 ($r = 0,82$), Pb-SMM-3 ($r = 0,90$) i Pb-NMM-1 ($r = 0,85$) (Tablica 17).



Slika 25. Kromatografski profili raspodjele bakra (A), srebra (B), kadmija (C) i olova (D) vezanih za citosolske biomolekule probavne žlijezde različitih molekulskih masa, razdvojenih primjenom vezanog sustava SE₂₀₀–HPLC–ICP–MS sa Superdex® 200 Increase 10/300 GL (Cytiva, SAD) kolonom, u odabranim uzorcima školjkaša *U. crassus* s dviju postaja na rijeci Mrežnici: REF – referentna postaja; KIZ – industrijska zona Karlovca. Rezultati su prikazani za tri uzorka po lokaciji uzorkovanja kao intenziteti elemenata (y–os) u odnosu na vrijeme elucije (min; x–os).

Tablica 17. Raspodjela esencijalnog elementa Cu te neesencijalnih elemenata Ag, Cd i Pb među biomolekulama različitih molekulskih masa u citosolu probavne žlijezde školjkaša *U. crassus*, dobivena pomoću vezanog sustava SE₂₀₀–HPLC–ICP–MS. Tablica prikazuje pregled glavnih pikova vezanih metala (vrijeme elucije (t_e) maksimuma pika s pripadajućim molekulskim masama). Također su prikazani udjeli metala (%) unutar svakog područja molekulske mase (MM) te koeficijenti korelacije (r) između intenziteta metala u maksimumima pikova (maks. cps) i njihovih citosolskih koncentracija (c_c) ($n = 6$). Dominantni pikovi za svaki metal i značajne korelacije ($p < 0,05$) označeni su podebljano.

	MM područje	Pik	Maksimum pika (t_e / min)	MM (~kDa)	Udio metala u MM području (%)	r [maks. cps; c_c]
Cu	VMM	VMM–1	18,0 – 18,4	340 – 390	7,9 – 25,9	0,30
		VMM–2	19,6 – 19,8	220 – 235		0,88
		VMM–3	21,0 – 21,4	130 – 150		0,82
	SMM	SMM–1	23,6 – 23,9	55,0 – 65,0	4,1 – 7,0	0,96
	NMM	NMM–1	26,8 – 27,2	20,0 – 25,0	31,8 – 38,0	0,89
		NMM–2	27,7 – 27,9	16,0 – 17,5		0,90
		NMM–3	29,4 – 30,3	7,50 – 10,0		0,97
	VNMM	VNMM–1	31,0	6,00	32,0 – 49,7	–
		VNMM–2	32,6 – 32,9	3,25 – 3,60		0,94
		VNMM–3	36,1 – 36,3	1,00 – 1,20		0,30
		VNMM–4	37,5 – 38,1	0,600 – 0,740		0,67
Ag	VMM	VMM–1	16,8 – 17,0	520 – 580	20,9 – 39,0	0,17
		VMM–2	17,9 – 18,5	330 – 405		0,98
		VMM–3	19,6 – 20,0	205 – 235		0,68
	SMM	SMM–1	23,0 – 23,8	60,0 – 80,0	3,8 – 9,6	0,76
	NMM	NMM–1	27,7 – 28,0	16,0 – 17,5	32,5 – 50,0	0,97
	VNMM	VNMM–1	36,1 – 36,3	1,00 – 1,20	11,4 – 22,4	0,74
	VNMM	VNMM–2	43,2 – 43,6	0,100 – 0,110		0,98

VMM – visoka molekulska masa

SMM – srednja molekulska masa

NMM – niska molekulska masa

VNMM – vrlo niska molekulska masa

Tablica 17. – nastavak.

	MM područje	Pik	Maksimum pika (t _e / min)	MM (~kDa)	Udio metala u MM području (%)	r [maks. cps; c _c]
Cd	VMM	VMM–1	16,4 – 16,9	550 – 650	4,2 – 16,9	0,99
		VMM–2	21,1 – 21,2	140 – 145		0,99
	SMM	SMM–1	22,4 – 22,8	80,0 – 95,0	2,2 – 5,6	–
		SMM–2	24,2 – 24,5	50,0 – 55,0		0,99
	NMM	NMM–1	27,4 – 27,8	16,0 – 19,0	74,0 – 90,6	0,98
	VNMM	VNMM–1	31,0 – 31,9	4,50 – 6,00	1,5 – 9,5	0,71
		VNMM–2	33,9 – 34,6	1,90 – 2,50		0,67
Pb	VMM	VMM–1	16,7 – 17,0	550 – 655	5,9 – 10,5	0,88
		VMM–2	18,2 – 18,4	345 – 370		0,82
		VMM–3	21,5 – 21,8	115 – 130		0,71
	SMM	SMM–1	22,8 – 23,1	75,0 – 85,0	26,4 – 47,4	0,37
		SMM–2	24,1 – 24,2	50,0 – 55,0		–
		SMM–3	25,6 – 25,9	30,0 – 35,0		0,90
	NMM	NMM–1	26,9 – 27,5	17,5 – 22,0	38,2 – 63,5	0,85
	VNMM	VNMM–1	33,4 – 33,7	2,50 – 2,80	1,9 – 5,3	–0,22
		VNMM–2	38,6 – 39,0	0,450 – 0,520		0,22

VMM – visoka molekulska masa

SMM – srednja molekulska masa

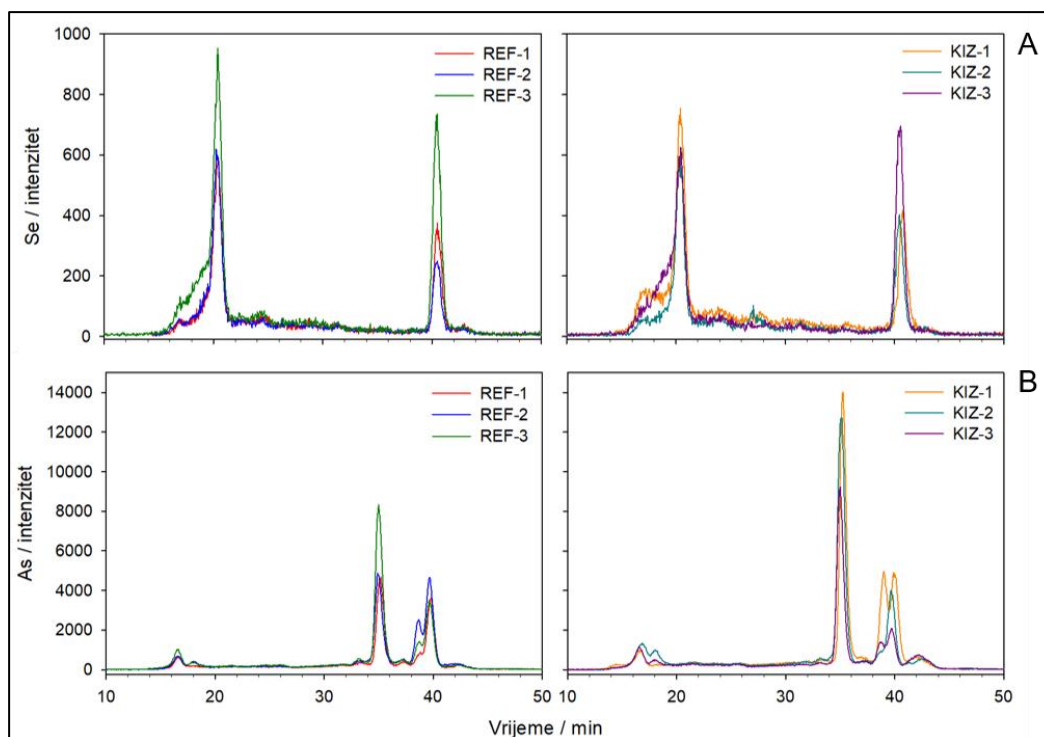
NMM – niska molekulska masa

VNMM – vrlo niska molekulska masa

4.4.1.4. *SE₂₀₀–HPLC–ICP–MS profili elemenata koji su predominantno vezani za VNMM biomolekule – Se i As*

Iako je velik dio Se eluirao unutar VMM područja (do 48 %), predstavljen je zajedno s As zbog njihove zajedničke sklonosti vezanju na VNMM biomolekule (Se: do 36 %; As: do 81 %) (Tablica 18). Glavno eluiranje Se zabilježeno je u VNMM piku koji odgovara MM 250 – 300 Da (Slika 26A, Tablica 18), dok je unutar istog područja pronađen još jedan vrlo nizak pik koji odgovara MM 130 – 140 Da (Slika 26A, Tablica 18). Arsen je pokazao više VNMM pikova, a najdominantniji je odgovarao području od 1,5 – 1,7 kDa (Slika 26B, Tablica 18).

Kao što je ranije spomenuto, značajan dio Se eluirao je i u VMM području (400 – 560 kDa i 175 – 190 kDa), dok je manji pik uočen u SMM području pri 45 – 60 kDa (Slika 26A; Tablica 18). Arsen je također eluirao u manjoj mjeri (10 – 16%) u VMM regiji gdje je bio prisutan u dva pika pri 560 – 615 kDa i 355 – 420 kDa (Tablica 18). Statistički značajno povećanje intenziteta pikova s porastom citosolske koncentracije Se i As zabilježen je za Se–VNMM–1 (r = 0,84) i As–VNMM–2 (r = 0,90) pikove (Tablica 18).



Slika 26. Kromatografski profili raspodjele selena (A) i arsena (B) vezanih za citosolske biomolekule probavne žlijezde različitih molekulskih masa, razdvojenih primjenom vezanog sustava SE₂₀₀–HPLC–ICP–MS sa Superdex® 200 Increase 10/300 GL (Cytiva, SAD) kolonom, u odabranim uzorcima školjkaša *U. crassus* s dviju postaja na rijeci Mrežnici: REF – referentna postaja; KIZ – industrijska zona Karlovca. Rezultati su prikazani za tri uzorka po lokaciji uzorkovanja kao intenziteti elemenata (y-os) u odnosu na vrijeme elucije (min; x-os).

Tablica 18. Raspodjela esencijalnog elementa Se te neesencijalnog elementa As među biomolekulama različitih molekulskih masa u citosolu probavne žlijezde školjkaša *U. crassus*, dobivena pomoću vezanog sustava SE₂₀₀–HPLC–ICP–MS. Tablica prikazuje pregled glavnih pikova vezanih metala (vrijeme elucije (t_e) maksimuma pika s pripadajućim molekulskim masama). Također su prikazani udjeli metala (%) unutar svakog područja molekulske mase (MM) te koeficijenti korelacije (r) između intenziteta metala u maksimumima pikova (maks. cps) i njihovih citosolskih koncentracija (c_c) ($n = 6$). Dominantni pikovi za svaki metal i značajne korelacije ($p < 0,05$) označeni su podebljano.

	MM područje	Pik	Maksimum pika (t_e / min)	MM (~kDa)	Udio metala u MM području (%)	r [maks. cps; c_c]
Se	VMM	VMM–1	16,9 – 17,9	400 – 560	45,2 – 48,3	0,84
		VMM–2	20,3 – 20,5	175 – 190		0,57
	SMM	SMM–1	24,0 – 24,6	45,0 – 60,0	8,0 – 11,0	0,73
	VNMM	VNMM–1	40,4 – 40,8	0,250 – 0,300	28,3 – 36,1	0,84
		VNMM–2	42,8 – 42,9	0,130 – 0,140		0,64
As	VMM	VMM–1	16,6 – 16,9	560 – 615	10,0 – 15,8	0,74
		VMM–2	17,8 – 18,3	355 – 420		0,59
	VNMM	VNMM–1	33,0 – 33,3	2,85 – 3,15	74,1 – 81,0	0,49
		VNMM–2	35,0 – 35,3	1,50 – 1,65		0,90
		VNMM–3	37,3 – 37,4	0,760 – 0,790		0,16
		VNMM–4	38,7 – 39,0	0,450 – 0,500		0,41
		VNMM–5	39,6 – 40,0	0,330 – 0,380		0,26
		VNMM–6	42,0 – 42,5	0,150 – 0,175		0,77

VMM – visoka molekulska masa

SMM – srednja molekulska masa

NMM – niska molekulska masa

VNMM – vrlo niska molekulska masa

4.4.2. Raspodjela odabranih metal(oid)a između citosolskih biomolekula različitog ukupnog naboja primjenom ionsko–izmijenjivačkih kromatografskih tehnika (IEX) u kombinaciji s ICP–MS–om

Razlučivanje citosolskih biomolekula koje vežu metal(oid)e (MBB) na temelju ukupnog naboja provelo se u neutralnim fiziološkim uvjetima (pH 7.4) kako bi se održali uvjeti slični onima u stanicama/tkivu probavne žlijezde, primjenom IEX–ICP–MS–a. Pod navedenim uvjetima, MBB–i kiselog karaktera ($pI < 7$) su razdvojeni pomoću anionsko–izmijenjivačke kolone (AEX), dok su MBB–i bazičnog karaktera ($pI > 8$) razdvojeni pomoću kationsko–izmijenjivačke kolone (CEX). Osam proteinskih standarda pušteno je na IEX kolone, a njihova vremena elucije zajedno s odgovarajućim pI vrijednostima prikazana u Tablici 19. Citosolske koncentracije metal(oid)a u probavnim žlijezdama odabranih uzoraka prikazane su u Tablici 20.

Tablica 19 Izvor, molekulske mase (MM), koncentracije (mg mL⁻¹), vremena eluiranja (t_e) i vrijednosti izoelektrične točke (pI) osam proteinskih standarda puštenih na AEX ili CEX kolonu.

Proteinski standard	Izvor	MM / kDa	Koncentracija / mg mL ⁻¹	Kolona	t _e / min	pI
Transferin	Ljudski	80	1,0	AEX	12,17	5,8
Alkoholna dehidrogenaza	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	150	5,0	AEX	11,42	5,3
Superoksidna dismutaza	Goveđi eritrociti	32,5	5,0	AEX	9,69	4,95
MT-2	Jetra zeca	6,145	0,5	AEX	9,64	4,5
MT-1	Jetra zeca	6,145	0,5	AEX	8,35	3,9
Ugljična anhidraza	Goveđi eritrociti	29	3,0	AEX	8,19	4,9
Citokrom C	Goveđe srce	12,384	5,0	CEX	19,28	9,6
Lizozim	Bjelanjak kokošnjeg jaja	14,3	1,0	CEX	24,12	11,1

Tablica 20. Citosolske koncentracije (ne)esencijalnih elemenata (izražene u µg g⁻¹ i ng g⁻¹ mokre mase) u probavnoj žlijezdi školjkaša *U. crassus* odabranih za kromatografsko razdvajanje biomolekula koje vežu metal(oid)e primjenom AEX– i CEX–ICP–MS.

		UC-1	UC-2	UC-3
ESENCIJALNI	Co / ng g ⁻¹	170	181	103
	Cu / µg g ⁻¹	3,08	3,99	1,65
	Fe / µg g ⁻¹	17,5	16,5	11,3
	Mn / µg g ⁻¹	1,72	1,54	2,90
	Mo / ng g ⁻¹	136	150	94,2
	Se / ng g ⁻¹	584	676	676
	Zn / µg g ⁻¹	7,09	7,85	7,94
NEESENCIJALNI	Ag / ng g ⁻¹	5,36	5,97	5,91
	As / ng g ⁻¹	442	463	470
	Bi / ng g ⁻¹	3,79	4,30	2,78
	Cd / ng g ⁻¹	87,3	94,0	1251
	Cs / ng g ⁻¹	1,45	1,65	0,618
	Pb / ng g ⁻¹	43,9	43,7	17,6
	Tl / ng g ⁻¹	1,77	2,17	1,49

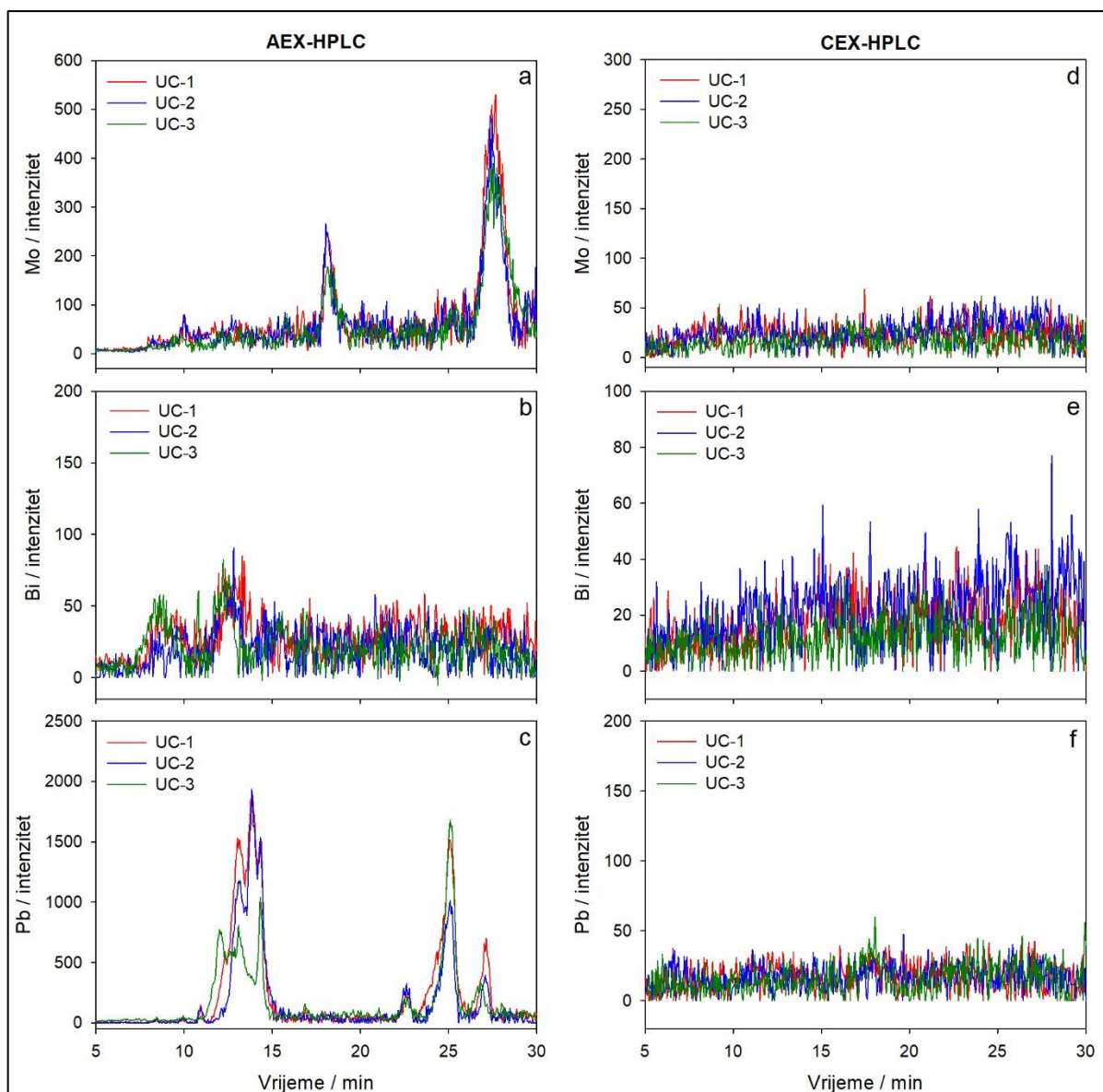
AEX– i CEX–HPLC–ICP–MS kromatografski profili raspodjele odabranih esencijalnih (Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Se i Zn) i neesencijalnih elemenata (Ag, As, Bi, Cd, Cs, Pb i Tl) vezanih za citosolske biomolekule probavne žlijezde različitih ukupnih naboja, odnosno različite kisele/bazične prirode, u odabranim uzorcima školjkaša *U. crassus* iz rijeke Mrežnice prikazani su na slikama 27–30, dok su u Tablicama 21 – 24 za svaki metal na obje korištene kolone (AEX i CEX kolona) prikazani udjeli (%) koji su eluirali u praznom, tzv. *void* volumenu (udio metala koji se nije vezao za kolonu) te udjeli vezani za kolonu, kao i pregled glavnih pikova vezanih metala. U tablicama su također navedeni Pearsonovi korelacijski koeficijenti (r) između maksimuma intenziteta pika (cps) i citosolskih koncentracija metala. S obzirom na udio metala vezanog za AEX– odnosno CEX–kolonu, analizirane metal(oid)e možemo svrstati u sljedeće skupine:

1. Metali karakterizirani vezanjem samo na AEX kolonu: Mo, Bi i Pb
2. Metali karakterizirani vezanjem na AEX i CEX kolonu te udjelom metala vezanog za AEX kolonu 95 – 99 %: Fe, Zn, Ag i Cd
3. Metal(oid)i karakterizirani vezanjem na AEX i CEX kolonu te udjelom metala vezanog za AEX kolonu 60 – 95 %: Co, Mn, Se i As
4. Metali karakterizirani vezanjem na AEX i CEX kolonu te udjelom metala vezanog za AEX–kolonu < 60 %: Cu, Cs i Tl

4.4.2.1. AEX–ICP–MS profili metal(oid)a vezanih samo za AEX–kolonu – Mo, Bi i Pb

Gotovo sve Mo–, Bi– i Pb–MBB bile su vezane na AEX koloni (95 – 99 %; Tablica 21). S druge strane, za sva tri elementa, nijedan pik nije uočen na CEX koloni, što je prikazano na Slikama 27d–f.

Za esencijalni element Mo, tri jasna pika u svim uzorcima uočena su otprilike na početku, sredini i kraju elucijskog gradijenta (Slika 27a). Najistaknutiji pik bio je AEX–Mo3 s vremenom elucije (t_e) 26,4 – 28,6 min. Jake pozitivne korelacije između intenziteta maksimuma (cps) i citosolskih koncentracija metala utvrđene su za sva tri AEX–Mo pika ($r = 0,99 – 1,00$). Za Bi su uočena dva jasna pika od kojih je pik s većim intenzitetom bio AEX–Bi2 s elucijskim maksimumom od 13,3 min (Slika 27b). Ukupno je uočeno osam AEX–Pb pikova koji su eluirali u početnom (10 – 15 min) i krajnjem (22 – 27 min) dijelu gradijenta. Najistaknutiji su bili AEX–Pb4 ($t_e = 13,9$ min) i AEX–Pb7 ($t_e = 25,1$ min) (Slika 27c). Jake pozitivne korelacije ($r = 0,84 – 0,95$) utvrđene su za AEX–Pb5 i AEX–Pb6 pikove (Tablica 21).



Slika 27. Kromatografski profili raspodjele molibdena, bizmuta i olova vezanih za citosolske biomolekule probavne žlijezde različitog negativnog naboja, razdvojenih AEX–HPLC–ICP–MS–om s MonoQ™ 5/50 GL (GE Healthcare BioSciences, SAD) kolonom (a–c), te različitog pozitivnog naboja, razdvojenih CEX–HPLC–ICP–MS–om s MonoS™ 5/50 GL (GE Healthcare BioSciences, SAD) kolonom (d–f). Rezultati su prikazani kao intenziteti elemenata (y–os) u odnosu na vrijeme elucije (min; x–os).

Tablica 21. Raspodjela esencijalnog elementa Mo i neesencijalnih elemenata Bi i Pb među citosolskim biomolekulama kisele i bazične prirode u probavnoj žlijezdi *U. crassus* iz rijeke Mrežnice, provedena pomoću vezanog sustava AEX– i CEX–HPLC–ICP–MS. Za svaki metal na svakoj koloni prikazani su udjeli (%) koji su eluirali u praznom, tzv. *void* volumenu te udjeli vezani za kolonu, kao i pregled glavnih pikova vezanih metala. Također je naveden Pearsonov korelacijski koeficijent (*r*) između maksimuma intenziteta pika (cps) i citosolskih koncentracija metala (*c_c*) (*n* = 3).

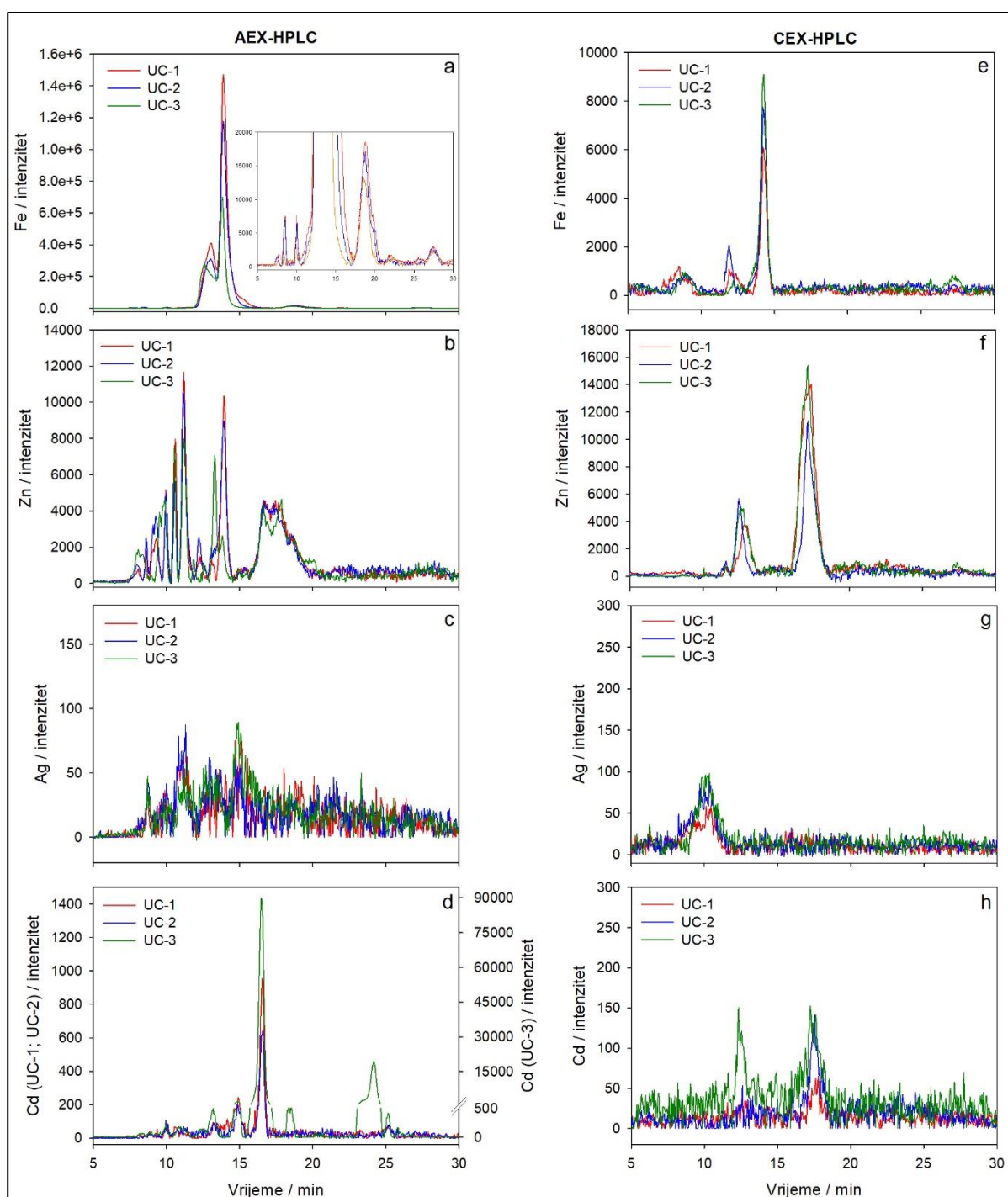
	AEX			CEX		
	Maksimum pika (raspon pika) / min	Udio / %	r [maks cps; <i>c_c</i>]	Maksimum pika (raspon pika) / min	Udio / %	r [maks cps; <i>c_c</i>]
Mo_{void}	0,05 – 4,95	0,38 – 0,63		0,05 – 4,95	90,9 – 93,6	
Mo_{vezani}	5,01 – 30,05	99,4 – 99,6		5,01 – 30,05	6,40 – 9,03	
Mo1	9,96 (9,37 – 10,8)		0,99			
Mo2	8,0 (17,7 – 18,8)		0,99			
Mo3	27,4 (26,4 – 28,6)		1,00			
Bi_{void}	0,05 – 4,95	3,37 – 5,45		0,05 – 4,95	68,8 – 70,2	
Bi_{vezani}	5,01 – 30,05	94,6 – 96,6		5,01 – 30,05	29,8 – 31,2	
Bi1	8,62 (7,32 – 10,1)		–0,99			
Bi2	13,3 (10,4 – 13,4)		0,12			
Pb_{void}	0,05 – 4,95	1,32 – 2,70		0,05 – 4,95	94,5 – 96,4	
Pb_{vezani}	5,01 – 30,05	97,3 – 98,7		5,01 – 30,05	3,6 – 5,5	
Pb1	10,9 (10,7 – 11,1)					
Pb2	12,0 (11,0 – 12,4)					
Pb3	13,0 (11,5 – 13,5)					
Pb4	13,9 (13,5 – 14,2)					
Pb5	14,3 (14,2 – 15,2)		0,95			
Pb6	22,6 (22,0 – 23,0)		0,84			
Pb7	25,1 (23,2 – 26,2)		–1,00			
Pb8	27,1 (25,7 – 27,7)		–1,00			

4.4.2.2. HPLC–ICP–MS profili metala vezani za AEX i CEX–kolonu te udjelom metala vezanog za AEX kolonu 95 – 99% – Fe, Zn, Ag i Cd

Gotovo sve Fe–, Zn–, Ag– i Cd–MBB eluirale su na AEX koloni (> 95 %). Manji udio (3 – 15 %) Fe–, Ag– i Cd–MBB te oko 38% Zn–MBB bilo je vezano na CEX koloni (Tablica 22). Devet pikova uočeno je za Fe (Tablica 22). Tri istaknuta pika bila su AEX–Fe4 ($t_e = 13,1$ min), AEX–Fe5 ($t_e = 13,9$ min) i AEX–Fe6 ($t_e = 18,8$ min), a najistaknutiji među njima je AEX–Fe5 (Slika 28a). Statistički značajna pozitivna korelacija ($r = 1,00$) utvrđena je za AEX–Fe2. (Tablica 22). Na CEX koloni uočena su tri CEX–Fe pika od kojih je najistaknutiji bio CEX–Fe3 (Slika 28e). Dobre pozitivne korelacije ($r = 0,60 - 0,67$) utvrđene su za CEX–Fe1 i CEX–Fe2.

Za esencijalni element Zn uočeno je ukupno 18 AEX pikova te je većina (AEX–Zn1 – AEX–Zn14) eluirala u prvoj polovici (5–15 min) elucijskog gradijenta (Slika 28b). Pik sa zabilježenim najvećim maksimalnim intenzitetom bio je na 11,1 min (AEX–Zn7; Slika 28b). Jaka, ali ne i značajna, pozitivna korelacija ($r = 0,99$) između maksimuma intenziteta pika i citosolskih koncentracija Zn utvrđena je za AEX–Zn16 (Tablica 22). Nakon CEX–HPLC razdvajanja, ukupno su uočena 3 pika za Zn, a najistaknutiji bio je CEX–Zn3 ($t_e = 17,0$ min; Slika 28f). Dobre pozitivne korelacije ($r = 0,54 - 0,58$) maksimalnog intenziteta s citosolskim koncentracijama metala utvrđene su za CEX–Zn2 i CEX–Zn3.

U AEX kromatografskim profilima Ag uočeno je pet pikova koji su eluirali u prvoj polovici gradijenta (8 – 16 min; Tablica 22). Pikovi s usporedivim maksimalnim intenzitetima bili su AEX–Ag3 i AEX–Ag5 s vremenima elucije 11,3 i 15,1 min (Slika 28c). Uočen je samo jedan CEX–Ag pik s vremenom elucije na 10,4 min (Slika 28g) za kojeg je utvrđena jaka pozitivna korelacija ($r = 0,99$) maksimalnog intenziteta s citosolskim koncentracijama Ag (Tablica 22). Za neesencijalni element Cd uočeno je ukupno osam pikova koji su eluirali u cijelom gradijentu (10 – 25 min; Tablica 22). Najistaknutiji pik bio je AEX–Cd–5 s vremenom elucije 16,6 min (Slika 28d). Statistički značajna pozitivna korelacija maksimalnog intenziteta s citosolskim koncentracijama metala ($r = 1,00$; Tablica 22) utvrđena je za AEX–Cd3, AEX–Cd4, AEX–Cd5 i AEXCd8. Uočena su dva CEX–Cd pika od kojih je istaknutiji bio CEX–Cd2 (Slika 28h). Dobra pozitivna korelacija maksimalnog intenziteta s citosolskim koncentracijama metala utvrđena je za CEX–Cd2 ($r = 0,60$; Tablica 22).



Slika 28. Kromatografski profili raspodjele željeza, cinka, srebra i kadmija vezanih za citosolske biomolekule probavne žlijezde različitog negativnog naboja, razdvojenih AEX-HPLC-ICP-MS-om s MonoQ™ 5/50 GL (GE Healthcare BioSciences, SAD) kolonom (a-d), te različitog pozitivnog naboja, razdvojenih CEX-HPLC-ICP-MS-om s MonoS™ 5/50 GL (GE Healthcare BioSciences, SAD) kolonom (e-h). Rezultati su prikazani kao intenziteti elemenata (y-os) u odnosu na vrijeme elucije (min; x-os).

Tablica 22. Raspodjela esencijalnih elemenata Fe i Zn i neesencijalnih elemenata Ag i Cd među citosolskim biomolekulama kisele i bazične prirode u probavnoj žlijezdi *U. crassus* iz rijeke Mrežnice, provedena pomoću vezanog sustava AEX– i CEX–HPLC–ICP–MS. Za svaki metal na svakoj koloni prikazani su udjeli (%) koji su eluirali u praznom, tzv. *void* volumenu te udjeli vezani za kolonu, kao i pregled glavnih pikova vezanih metala. Također je naveden Pearsonov korelacijski koeficijent (*r*) između maksimuma intenziteta pika (cps) i citosolskih koncentracija metala (*c_c*) (*n* = 3).

	AEX			CEX		
	Maksimum pika (raspon pika) / min	Udio / %	<i>r</i> [maks cps; <i>c_c</i>]	Maksimum pika (raspon pika) / min	Udio / %	<i>r</i> [maks cps; <i>c_c</i>]
Fe_{void}	0,05 – 4,95	1,33 – 2,19		0,05 – 4,95	92,0 – 96,6	
Fe_{vezani}	5,01 – 30,05	97,7 – 98,8		5,01 – 30,05	3,40 – 7,99	
Fe1	7,54 (7,16 – 7,70)		-1,00	8,88 (7,87 – 9,85)		0,60
Fe2	8,51 (8,07 – 8,94)		1,00	11,9 (11,4 – 12,4)		0,67
Fe3	10,0 (9,69 – 10,5)		0,99	14,2 (13,1 – 15,0)		-0,89
Fe4	13,1 (12,1 – 13,5)		0,78			
Fe5	13,9 (13,5 – 15,8)		0,98			
Fe6	18,8 (17,4 – 19,4)		0,99			
Fe7	19,4 (19,3 – 20,7)		0,90			
Fe8	21,8 (21,3 – 22,7)		0,32			
Fe9	27,4 (26,4 – 28,9)		0,88			
Zn_{void}	0,05 – 4,95	4,04 – 4,75		0,05 – 4,95	62,8 – 68,7	
Zn_{vezani}	5,01 – 30,05	95,3 – 96,0		5,01 – 30,05	31,3 – 37,2	
Zn1	8,23 (7,92 – 8,40)		0,37	11,5 (11,4 – 11,9)		0,19
Zn2	8,62 (8,50 – 8,78)		–	12,8 (11,9 – 14,1)		0,54
Zn3	9,10 (8,83 – 9,15)		–	17,0 (14,1 – 18,7)		0,58
Zn4	9,26 (9,15 – 9,69)		0,30			
Zn5	10,0 (9,75 – 10,2)		0,29			
Zn6	10,6 (10,3 – 10,8)		-0,72			
Zn7	11,1 (10,8 – 11,9)		-0,95			
Zn8	12,0 (11,9 – 12,1)		–			
Zn9	12,3 (12,0 – 12,4)		–			
Zn10	12,6 (12,2 – 12,8)		–			
Zn11	13,1 (12,8 – 13,3)		0,47			
Zn12	13,9 (13,3 – 14,5)		-0,01			
Zn13	15,0 (14,8 – 15,1)		0,34			
Zn14	15,3 (15,2 – 15,7)		–			
Zn18	24,2 (19,9 – 25,5)		–			

Tablica 22. – nastavak.

	AEX			CEX		
	Maksimum pika (raspon pika) / min	Udio / %	r [maks cps; c _c]	Maksimum pika (raspon pika) / min	Udio / %	r [maks cps; c _c]
Zn15	16,7 (15,7 – 17,3)		0,35			
Zn16	17,3 (17,0 – 18,2)		0,99			
Zn17	18,5 (18,2 – 19,7)		0,46			
Ag_{void}	0,05 – 4,95	1,53 – 2,48		0,05 – 4,95	84,7 – 89,7	
Ag_{vezani}:	5,01 – 30,05:	97,5 – 98,5		5,01 – 30,05:	10,3 – 15,3	
Ag1	8,72 (8,29 – 9,15)		0,96	10,4 (7,75–11,6)		0,99
Ag2	9,91 (9,69 – 10,3)		–0,01			
Ag3	11,3 (10,4 – 11,8)		0,38			
Ag4	13,8 (12,2 – 14,4)		–0,98			
Ag5	15,1 (14,1 – 16,0)		–0,22			
Cd_{void}	0,05 – 4,95	0,55 – 1,39		0,05 – 4,95	87,7 – 96,5	
Cd_{vezani}:	5,01 – 30,05	98,6 – 99,5		5,01 – 30,05:	3,46 – 12,3	
Cd1	10,0 (9,64 – 10,29)		–	12,3 (11,9–14,2)		–
Cd2	11,0 (10,3 – 11,1)		–	17,8 (16,5–18,7)		0,60
Cd3	13,2 (12,8 – 13,6)		1,00			
Cd4	14,9 (13,6 – 15,7)		1,00			
Cd5	16,6 (15,7 – 17,1)		1,00			
Cd6	23,2 (23,0 – 23,4)		–			
Cd7	24,2 (23,4 – 24,6)		–			
Cd8	25,3 (23,4 – 25,6)		1,00			

4.4.2.3. HPLC–ICP–MS profili metala vezani za AEX i CEX–kolonu te udjelom metala vezanog za AEX kolonu 60 – 95% – Co, Mn, Se i As

MBB koje vežu Co, Mn, Se i As bile su uglavnom vezane za AEX kolonu (85 – 91 %). S druge strane, dio Co–, Se– i As–MBB (5 – 19 %) te oko 80 % Mn–MBB vezale su se na CEX koloni (Tablica 23).

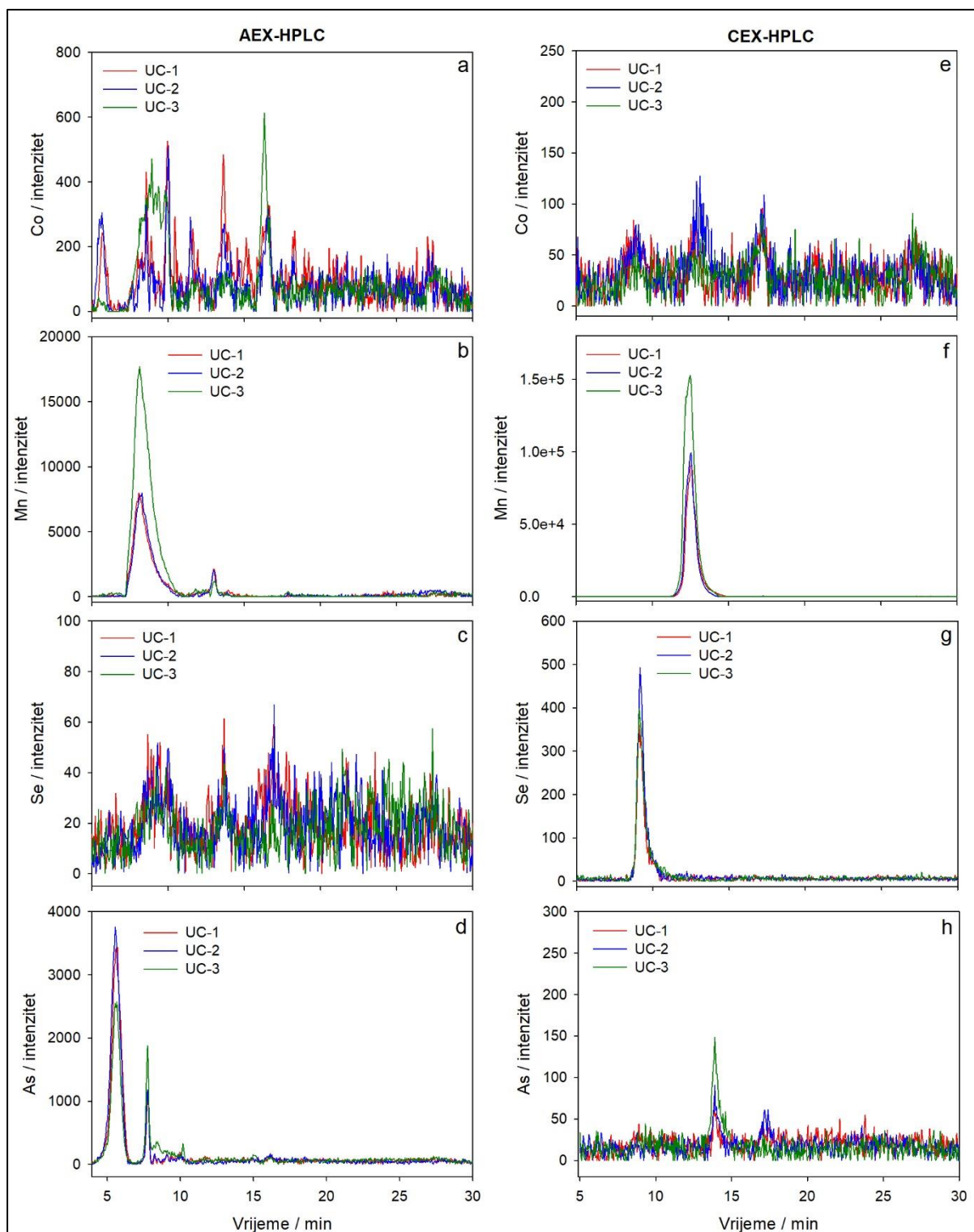
U kromatografskim profilima za Co uočeno je deset pikova koji su većinom eluirali u početnom dijelu gradijenta (5 – 15 min; Slika 29a). Najistaknutiji pik bio je AEX–Co8 (t_e = 16,6 min, Slika 29a). Statistički značajna korelacija bila je utvrđena za AEX–Co5 s vremenom elucije 11,5 min (r = 0,99; Tablica 23). U CEX kromatografskim profilima Co uočena su četiri pika u svim uzorcima (Slika 29e). Najistaknutiji pik bio je CEX–Co2 (t_e = 13,1 min; Slika 29e). Jake

pozitivne korelacije ($r = 0,80 - 0,95$) utvrđene za CEX–Co1, CEX–Co2 i CEX–Co3 (Tablica 23).

Za esencijalni element Mn uočena su dva jasna AEX pika u svim uzorcima s vremenima elucije na 8,13 i 13,1 min (Slika 29b). Pik s najvećim zabilježenim intenzitetom bio je AEX–Mn1 za kojeg je utvrđena jaka pozitivna korelacija između intenziteta pika i citosolskih koncentracija Mn ($r = 0,97$; Tablica 23). Na CEX–koloni uočen je jedan jasan pik na 12,5 min (Slika 29f) za kojeg je također utvrđena vrlo jaka pozitivna korelacija ($r = 0,97$).

Tri AEX–pika generalno sličnih intenziteta uočena su za Se (Slika 29c). Jaka pozitivna korelacija između maksimalnog intenziteta i citosolskih koncentracija metala utvrđena je za AEX–Se2 ($r = 0,94$). Jedan jasan CEX–Se pik uočen je na 9,15 min (Slika 29g).

Za neesencijalni element As uočeno je šest AEX–pikova koji su eluirali u prvoj polovici gradijenta (5–15 min; Slika 29d). Najistaknutiji pik bio je AEX–As1 ($t_e = 5,71$ min, Slika 29d). Jaka pozitivne korelacije ($r = 0,84$) utvrđena je za AEX–As3 (Tablica 23). Na CEX kromatografskim profilima As, uočena su dva jasna pika od kojih je CEX–As1 bio istaknutiji ($t_e = 13,9$ min; Slika 29h), te je za njega utvrđena i jaka pozitivna korelacija s citosolskom koncentracijom elementa ($r = 0,81$; Tablica 23).



Slika 29. Kromatografski profili raspodjele kobalta, mangana, selen i arsena vezanih za citosolske biomolekule probavne žlijezde različitog negativnog naboja, razdvojenih AEX–HPLC–ICP–MS–om s MonoQ™ 5/50 GL (GE Healthcare BioSciences, SAD) kolonom (a–d), te različitog pozitivnog naboja, razdvojenih CEX–HPLC–ICP–MS–om s MonoS™ 5/50 GL (GE Healthcare BioSciences, SAD) kolonom (e–h). Rezultati su prikazani kao intenziteti elemenata (y–os) u odnosu na vrijeme elucije (min; x–os).

Tablica 23. Raspodjela esencijalnih elemenata Co, Mn i Se i neesencijalnog elementa As među citosolskim biomolekulama kisele i bazične prirode u probavnoj žlijezdi *U. crassus* iz rijeke Mrežnice, provedena pomoću vezanog sustava AEX– i CEX–HPLC–ICP–MS. Za svaki element na svakoj koloni prikazani su udjeli (%) koji su eluirali u praznom, tzv. *void* volumenu te udjeli vezani za kolonu, kao i pregled glavnih pikova vezanih elemenata. Također je naveden Pearsonov korelacijski koeficijent (*r*) između maksimuma intenziteta pika (cps) i citosolskih koncentracija elemenata (*c_c*) (*n* = 3).

	AEX			CEX		
	Maksimum pika (raspon pika) / min	Udio / %	<i>r</i> [maks cps; <i>c_c</i>]	Maksimum pika (raspon pika) / min	Udio / %	<i>r</i> [maks cps; <i>c_c</i>]
Co_{void}	0,05 – 4,95	8,46 – 15,0		0,05 – 4,95	89,4 – 93,9	
Co_{vezani}:	5,01 – 30,05:	84,9 – 91,3		5,01 – 30,05:	6,03 – 10,5	
Co1	5,65 (5,17 – 6,03)		0,99	9,10 (7,70 – 9,85)		0,95
Co2	8,56 (7,97 – 8,78)		–0,82	13,1 (12,1 – 14,3)		0,80
Co3	10,0 (9,75 – 10,3)		0,98	17,3 (16,1 – 17,7)		0,85
Co4	10,4 (10,3 – 10,6)		0,02	27,1 (26,5 – 27,8)		–0,99
Co5	11,5 (11,3 – 12,5)		0,99			
Co6	13,7 (13,1 – 14,3)		0,72			
Co7	15,1 (14,4 – 15,7)		0,59			
Co8	16,6 (15,8 – 16,9)		–0,99			
Co9	18,3 (17,8 – 18,6)		–			
Co10	27,1 (26,8 – 27,4)		0,70			
Mn_{void}	0,05 – 4,95	20,9–21,9		0,05 – 4,95	16,9 – 23,1	
Mn_{vezani}:	5,01 – 30,05:	78,0–79,0		5,01 – 30,05:	76,8 – 83,0	
Mn1	8,13 (7,16 – 10,9)		0,97	12,5 (11,4 – 14,1)		0,97
Mn2	13,1 (12,8 – 13,4)		–0,96			
Se_{void}	0,05 – 4,95	20,9 – 23,7		0,05 – 4,95	81,3 – 86,8	
Se_{vezani}:	5,01 – 30,05:	76,2 – 79,0		5,01 – 30,05:	13,1 – 18,7	
Se1	9,31 (7,92 – 10,7)		–0,70	9,15 (8,56 – 10,6)		0,46
Se2	13,7 (13,0 – 13,9)		0,94			
Se3	16,9 (16,4 – 17,7)		–			
As_{void}	0,05 – 4,95	37,0 – 38,1		0,05 – 4,95	89,2 – 94,6	
As_{vezani}:	5,01 – 30,05:	61,8 – 62,9		5,01 – 30,05:	5,4 – 10,7	
As1	5,71 (4,03 – 6,95)		–0,49	13,9 (13,1 – 15,2)		0,81
As2	7,76 (7,27 – 8,07)		0,74	17,4 (16,5 – 18,0)		–
As3	8,24 (8,13 – 8,62)		0,84			
As4	9,04 (8,88 – 9,21)		0,70			
As5	10,0 (9,21 – 10,23)		0,53			
As6	15,0 (14,4 – 15,3)		–			

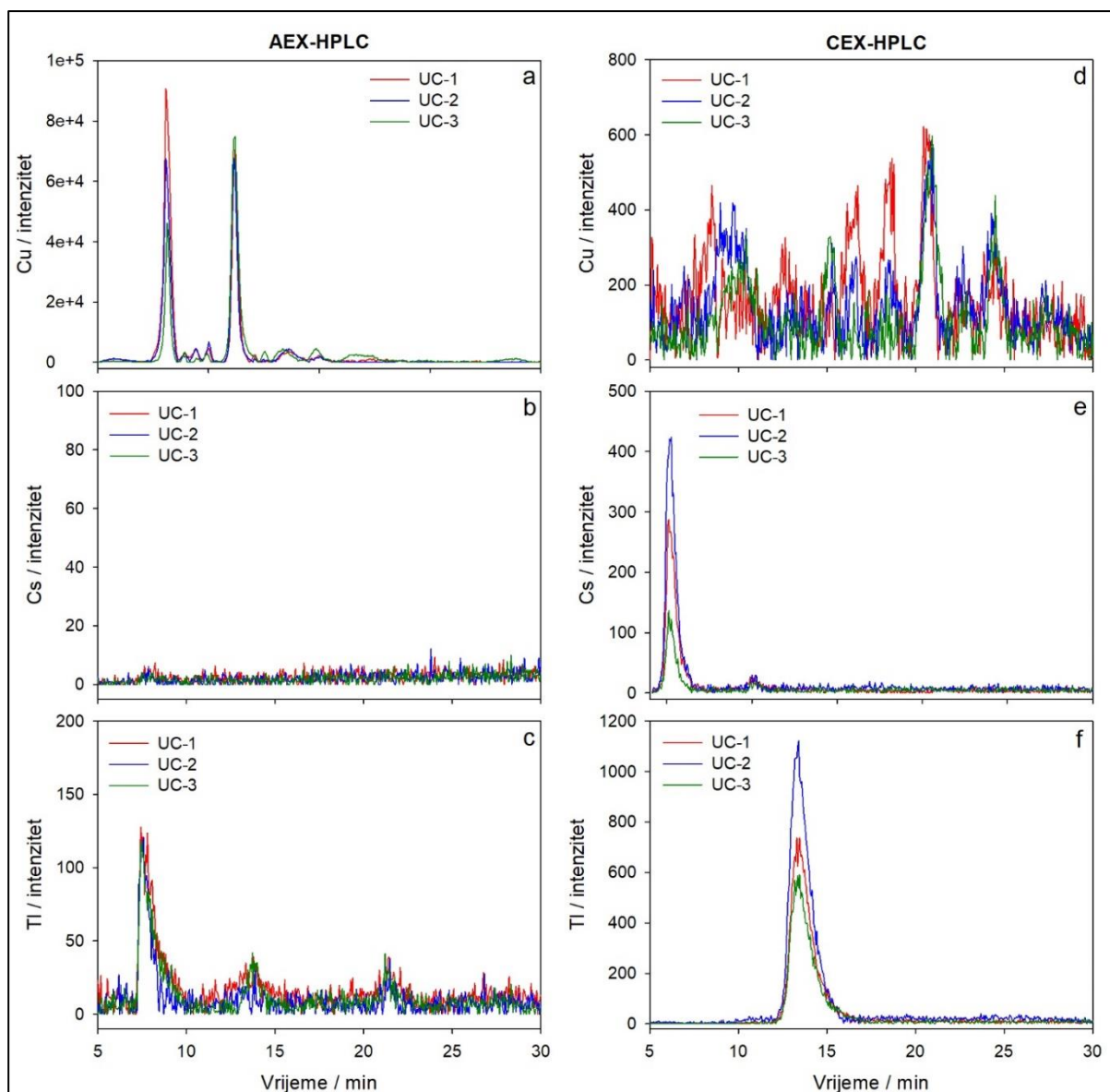
4.4.2.4. HPLC–ICP–MS profili metala vezani za AEX i CEX–kolonu te udjelom metala vezanog za AEX kolonu < 60 % – Cu, Cs i Tl

MBB koje vežu Cu i Tl bile su vezane na AEX koloni u udjelu od 38 – 60% (Tablica 24). Cs–MBB nisu eluirale na AEX koloni (Slika 30b). Većina Cu–MBB eluirale su u praznom volumenu (tzv. *void*) CEX kolone (94 – 98%) dok je manji dio bio vezan (1,8 – 5,7%). S druge strane, Cs– i Tl–MBB većinom su bile vezane za CEX kolonu (57 – 90%; Tablica 24).

Većina AEX–Cu pikova eluirala je u ranijem dijelu gradijenta (5 – 15 min; Slika 30a). Dva pika (AEX–Cu11 i AEX–Cu12), koja su eluirala poslije 15. min, uočena su samo u uzorku AEX–UC3 (Slika 30a). Najistaknutiji pikovi bili su AEX–Cu1 ($t_e = 8,08$ min) i AEX–Cu6 ($t_e = 11,2$ min). Jake pozitivne korelacije ($r > 0,94$) utvrđene su za AEX–Cu3 i AEX–Cu4. Bez obzira na manji postotak vezanja za CEX kolonu, uočeno je ukupno osam CEX–Cu pikova. Gotovo svi pikovi eluirali su u drugoj polovici elucijskog gradijenta (poslije 15. min), a najistaknutiji pik bio je CEX–Cu6 s vremenom elucije od 21 min (Slika 30d). Vrlo jake pozitivne korelacije ($r \geq 0,91$) utvrđene su za CEX–Cu7 i CEX–Cu8 (Tablica 24).

Cs–MBB bile su vezane samo na CEX koloni, gdje su uočena dva jasna pika od kojih je istaknutiji bio CEX–Cs1 pik s maksimumom na 5,12 min (Slika 30e). Vrlo jake pozitivne korelacije ($r \geq 0,95$) između maksimalnog intenziteta i citosolskih koncentracija metala utvrđene su za CEX–Cs1 i CEX–Cs2 (Tablica 24).

Za neesencijalni element Tl, ukupno su uočena tri AEX pika koji su eluirali u cijelom elucijskom gradijentu (7 – 22 min) (Slika 30c). Najistaknutiji pik bio je AEX–Tl1 ($t_e = 7,59$ min; Slika 30c) za koji je utvrđena vrlo jaka pozitivna korelacija s citosolskim metalom ($r = 0,99$; Tablica 24). Na CEX koloni detektiran je samo jedan jasan CEX–pik Tl pri 13,5 min (Slika 30f).



Slika 30. Kromatografski profili raspodjele bakra, cezija i talijsa vezanih za citosolske biomolekule probavne žlijezde različitog negativnog naboja, razdvojenih AEX–HPLC–ICP–MS–om s MonoQ™ 5/50 GL (GE Healthcare BioSciences, SAD) kolonom (a-c), te različitog različitog pozitivnog naboja, razdvojenih CEX–HPLC–ICP–MS–om s MonoS™ 5/50 GL (GE Healthcare BioSciences, SAD) kolonom (d-f). Rezultati su prikazani kao intenziteti elemenata (y–os) u odnosu na vrijeme elucije (min; x–os).

Tablica 24. Raspodjela esencijalnog elementa Cu i neesencijalnih elemenata Cs i Tl među citosolskim biomolekulama kisele i bazične prirode u probavnoj žlijezdi *U. crassus* iz rijeke Mrežnice, provedena pomoću vezanog sustava AEX– i CEX–HPLC–ICP–MS. Za svaki metal na svakoj koloni prikazani su udjeli (%) koji su eluirali u praznom, tzv. *void* volumenu te udjeli vezani za kolonu, kao i pregled glavnih pikova vezanih metala. Također je naveden Pearsonov korelacijski koeficijent (*r*) između maksimuma intenziteta pika (cps) i citosolskih koncentracija metala (*c_c*) (*n* = 3).

	AEX			CEX		
	Maksimum pika (raspon pika) / min	Udio / %	<i>r</i> [maks cps; <i>c_c</i>]	Maksimum pika (raspon pika) / min	Udio / %	<i>r</i> [maks cps; <i>c_c</i>]
Cu_{void}	0,05 – 4,95 (0,92)	40,1 – 62,0		0,05 – 4,95	94,2 – 98,2	
Cu_{vezani}:	5,01 – 30,05:	37,9 – 59,9		5,01 – 30,05:	1,80 – 5,71	
Cu1	8,08 (7,49 – 8,62)		0,59	9,70 (8,02 – 11,0)	9,24 – 21,1	0,75
Cu2	8,94 (8,80 – 9,05)		–0,86	15,3 (14,8 – 15,5)	7,72	–
Cu3	9,42 (9,21 – 9,58)		0,94	16,6 (16,0 – 17,0)	3,02 – 8,1	–
Cu4	10,0 (9,80 – 10,2)		0,99	18,5 (17,8 – 19,3)	4,57 – 11,4	–
Cu5	10,5 (10,4 – 10,6)		–	20,9 (19,8 – 21,8)	6,28 – 10,8	–
Cu6	11,2 (10,8 – 11,7)		–1,00	22,7 (21,9 – 23,5)	12,2 – 19,5	–0,20
Cu7	12,1 (12,0 – 12,2)		–	24,3 (23,5 – 25,4)	3,34 – 6,92	0,91
Cu8	12,5 (12,4 – 12,7)		–	27,4 (26,7 – 28,7)	4,34 – 10,8	0,98
Cu9	13,6 (13,2 – 14,1)		–			
Cu10	15,1 (15,0 – 15,2)		–0,15			
Cu11	16,7 (15,8 – 17,9)		–			
Cu12	23,9 (23,0 – 24,4)		–			
Cs_{void}	0,05 – 4,95	64,8 – 82,5		0,05 – 4,95	10,4 – 12,2	
Cs_{svezani}:	5,01 – 30,05	17,4 – 35,2		5,01 – 30,05:	87,7 – 89,5	
Cs1				5,12 (4,41 – 7,27)	43,2 – 64,5	0,95
Cs2				10,2 (9,26 – 11,0)	2,84 – 6,72	0,99
Tl_{void}	0,05 – 4,95	48,2 – 53,8		0,05–4,95	31,0 – 42,8	
Tl_{vezani}:	5,01 – 30,05:	46,1 – 51,7		5,01–30,05:	57,1 – 68,9	
Tl1	7,59 (7,11 – 10,0)		0,99	13,5 (11,9– 16,9)	81,7 – 87,9	1,00
Tl2	13,9 (11,4 – 15,2)		–0,82			
Tl3	21,5 (20,4 – 23,2)		0,79			

4.5. Analiza odabranih citosolskih biomolekula u probavnoj žlijezdi školjkaša primjenom dvodimenzionalne tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) i tehnike spektrometrije masa MALDI–TOF MS

4.5.1. Analiza citosolskih biomolekula koje vežu Fe

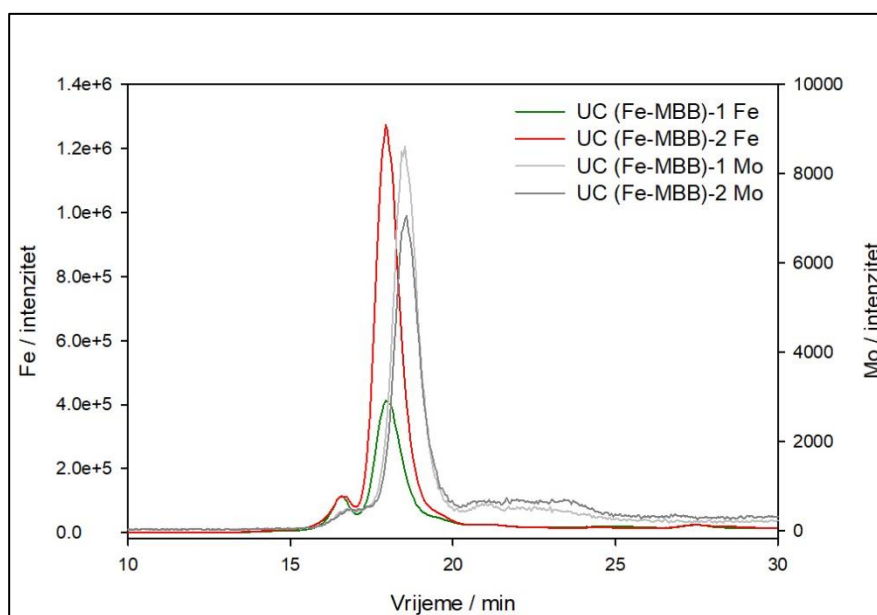
Za analizu citosolskih biomolekula koje vežu Fe (Fe–MBB) odabrani su uzorci školjkaša s nižom i višom citosolskom koncentracijom Fe, te su njihove koncentracije zajedno s koncentracijama još 13 elemenata prikazane u Tablici 25.

4.5.1.1. SE₂₀₀ početni profil Fe

Na Slici 31 prikazani su SE₂₀₀ profili Fe u odabranim uzorcima za razdvajanje Fe–MBB-a (tzv. SE₂₀₀ početni profil Fe). Raspodjela Fe među biomolekulama različitih masa dobivena primjenom vezanog sustava SE₂₀₀–HPLC–ICP–MS–a detaljno je opisana u Poglavlju 4.4.1.1.. Usporednom analizom raspodjele Fe među citosolskim biomolekulama različitih molekulskih masa s raspodjelom Mo (detaljan opis raspodjele dan je u Poglavlju 4.4.1.1.), uočeno je da glavni pikovi Fe i Mo eluiraju relativno blizu jedan drugoga (Slika 31) te da se djelomično preklapaju. Zbog činjenice da se primjenom SE kromatografske tehnike nije moglo u dovoljnoj mjeri razdvojiti Fe–MBB od Mo–MBB biomolekula, za prvi korak razdvajanja Fe–MBB–a odlučilo se primijeniti anionsko–izmjenjivačku kromatografsku tehniku koja je opisana u sljedećem poglavlju.

Tablica 25. Citosolske koncentracije Fe i još 13 elemenata u odabranim uzorcima za razdvajanje biomolekula koje vežu Fe (Fe–MBB).

	UC(Fe–MBB)–1	UC(Fe–MBB)–2
Fe / $\mu\text{g g}^{-1}$	6,66	16,5
Ag / ng g^{-1}	3,69	5,97
As / ng g^{-1}	427	462
Bi / ng g^{-1}	2,19	4,30
Cd / ng g^{-1}	362	94,0
Co / ng g^{-1}	124	180
Cu / $\mu\text{g g}^{-1}$	1,58	3,99
Cs / ng g^{-1}	0,680	1,65
Mn / $\mu\text{g g}^{-1}$	2,4	1,54
Mo / ng g^{-1}	128	150
Pb / ng g^{-1}	24,4	44,0
Se / ng g^{-1}	719	676
Tl / ng g^{-1}	1,45	2,17
Zn / $\mu\text{g g}^{-1}$	7,38	7,85

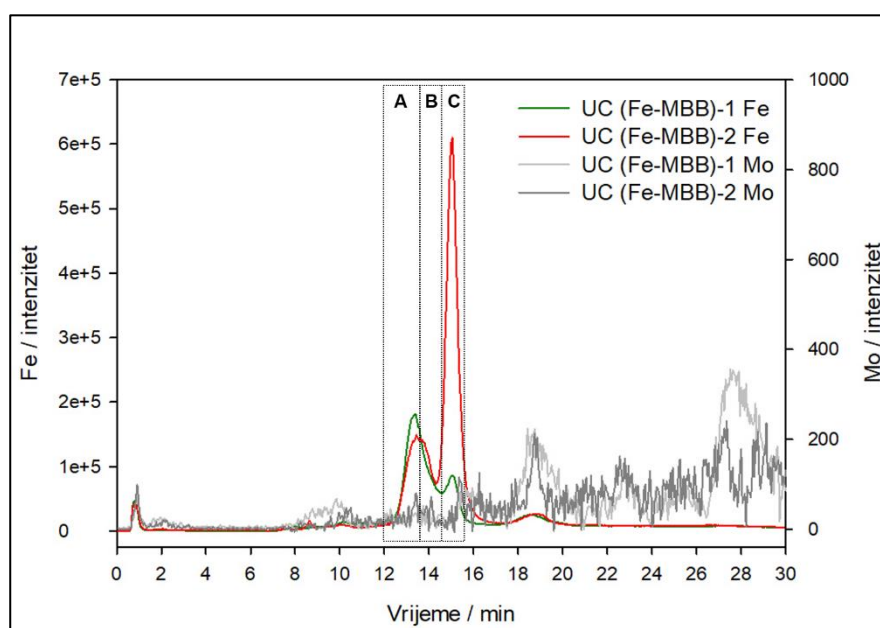


Slika 31. Kromatografski profili raspodjele Fe i Mo vezanih za citosolske biomolekule probavne žlijezde različitih molekulskih masa, razdvojeni SE200–HPLC–ICP–MS metodom koristeći Superdex® 200 Increase 10/300 GL (Cytiva, SAD) kolonu. Citosolske koncentracije Fe i Mo u analiziranim uzorcima prikazane su u Tablici 25.

4.5.1.2. Prvi korak razdvajanja citosolskih Fe–MBB-a: AEX profil Fe

Na Slici 32 prikazani su AEX profili Fe u odabranim uzorcima za razdvajanje Fe–MBB-a. Raspodjela Fe među biomolekulama različitog negativnog naboja detaljno je opisana u Poglavlju 4.4.2.2.. Korištenje AEX kromatografije za prvi korak razdvajanja pokazalo se učinkovitijom tehnikom razdvajanja u usporedbi sa SE–om, jer su biomolekule koje vežu Fe i Mo različito negativno nabijene, što je rezultiralo većim razmacima između pikova (Slika 32). Time je skupljanje frakcija citosolskih Fe–MBB-a postalo jednostavnije i preciznije, budući da je smanjena mogućnost kontaminacije i preklapanja s drugim biomolekulama.

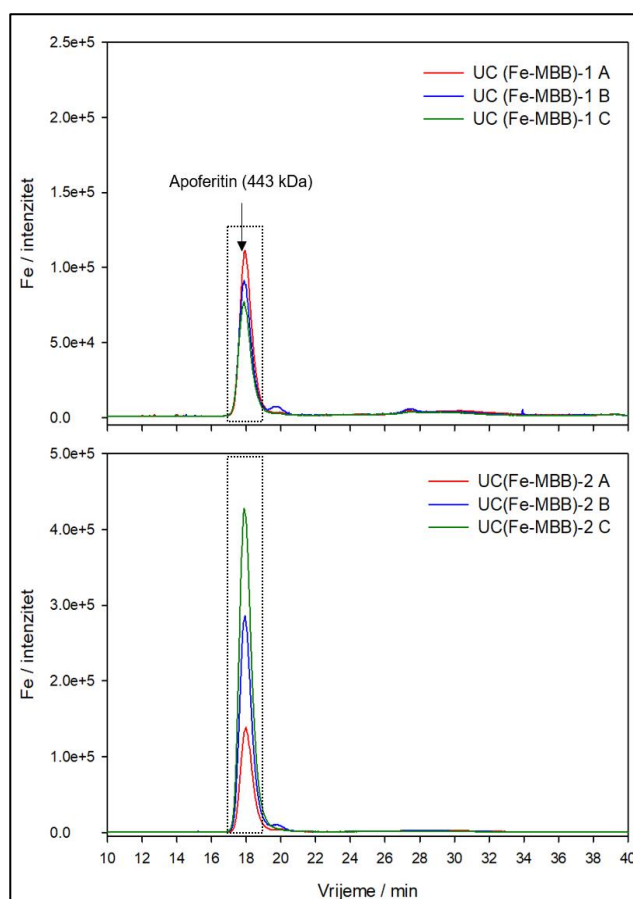
AEX kromatografijom jasno su uočljivi pikovi Fe–MBB na 13,3 min i 15,0 min (Slika 32). Za daljnju analizu ovih biomolekula pomoću druge kromatografske tehnike (SE), skupljene su tri frakcije koje su označene na Slici 32.



Slika 32. Kromatografski profili Fe i Mo vezanih za citosolske biomolekule probavne žlijezde različitih negativnih naboja, razdvojeni AEX–HPLC–ICP–MS metodom koristeći MonoQ 5/50 GL (GE Healthcare BioSciences, SAD) kolonu. Pravokutnim oblicima i slovima označene su frakcije koje su skupljene pomoću AEX–HPLC sustava za njihovu daljnju analizu na SE₂₀₀–HPLC–ICP–MS–u. Vremenski intervali skupljenih frakcija su sljedeći: A): 12,0 – 13,5 min; B): 13,5 – 14,5 min; C): 14,5 – 15,5 min.

4.5.1.2. Drugi korak razdvajanja: SE_{200} -HPLC-ICP-MS analiza skupljenih AEX Fe-MBB frakcija

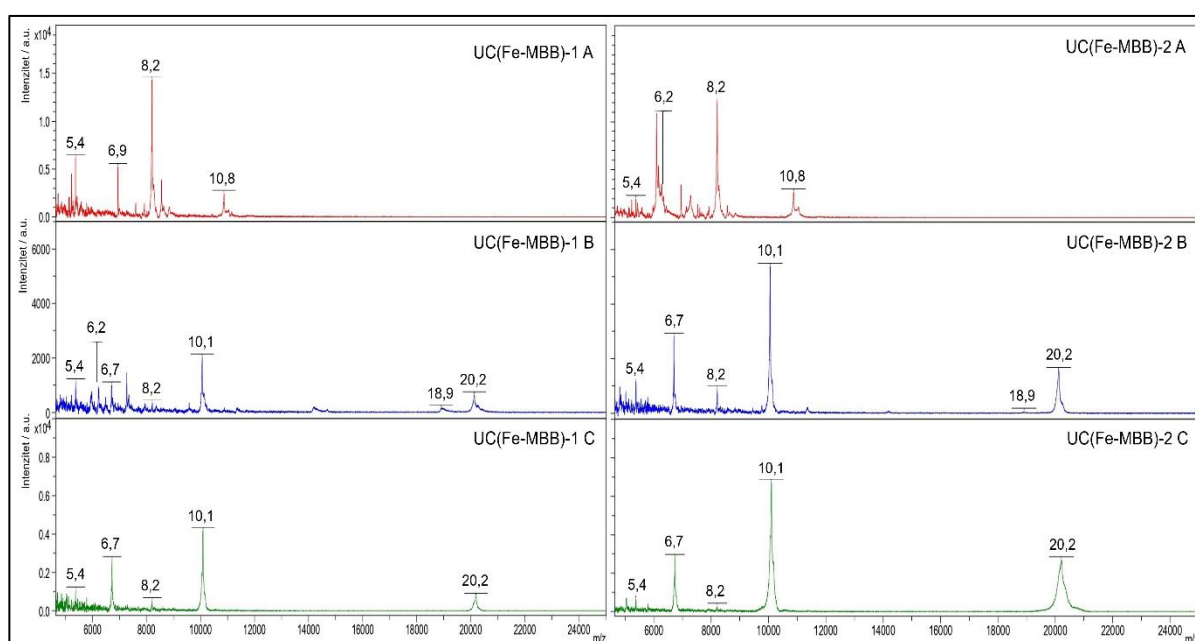
Razdvajanje skupljenih AEX Fe-MBB frakcija pomoću SE_{200} -HPLC-ICP-MS-a pokazalo je jasan pik na 17,9 min u svim frakcijama (Slika 33). Maksimalni intenzitet pika je uočljiv u A frakciji za uzorak UC(Fe-MBB)-1 (uzorak s manjom koncentracijom citosolskog Fe), dok je za uzorak UC(Fe-MBB)-2 (uzorak s većom koncentracijom citosolskog Fe) maksimalni intenzitet pika bio u frakciji C (Tablica 25; Slika 33). Pikovi su eluirali u VMM regiji te odgovaraju molekulskoj masi od ~400 kDa. Vrijeme elucije pika odgovaralo je eluciji proteinskog standarda apoferitina molekulske mase 443 kDa (17,8 min). Za daljnju analizu pomoću MALDI-TOF MS-a, pik na 17,9 min je skupljen pomoću SE_{200} -HPLC-a (Slika 33).



Slika 33. Kromatografski profili Fe vezanih za citosolske biomolekule probavne žlijezde različite molekulske mase u trima odabranim frakcijama skupljenim pomoću AEX-HPLC-a (AEX Fe-MBB frakcije A – C). Strjelicom je prikazano vrijeme elucije proteinskog standarda apoferitina (17,8 min). Pravokutnim oblicima označene su frakcije koje su skupljene pomoću SE_{200} -HPLC sustava za njihovu daljnju analizu MALDI-TOF MS metodom u vremenskom intervalu od 17,0 – 19,0 min.

4.5.1.3. MALDI-TOF MS karakterizacija SE-AEX-Fe-MBB frakcija

MALDI-TOF MS analiza skupljenih SE₂₀₀-AEX-Fe-MBB frakcija opisanih u prethodnom poglavlju (4.5.1.2.) otkrila je m/z pikove na 5,4 i 8,2 kDa u gotovo svim skupljenim frakcijama za oba uzorka (Slika 34), s najvećim intenzitetom pika na 8,2 kDa u frakciji A. U frakciji A obaju analiziranih uzoraka uočena je i prisutnost pika na 10,8 kDa, dok je pik na 6,2 kDa bio prisutan samo u uzorku s većom koncentracijom citosolskog Fe. Pikovi 5,4 kDa i 6,2 kDa dobiveni su također u masenim spektrima feritinskog proteinskog standarda (Prilog 2). Dodatno, u frakcijama B i C uočeni su pikovi na 6,7, 10,1 i 20,2 kDa, a u frakciji B uočen je i jedan manji pik na 18,9 kDa (Slika 34).



Slika 34. Spektar masa dobiven MALDI-TOF MS analizom za skupljene SE₂₀₀-AEX-Fe-MBB frakcije (A-C; frakcije opisane u poglavlju 4.5.1.2.) uzoraka školjkaša UC(Fe-MBB)-1 i UC(Fe-MBB)-2. Rezultati su prikazani kao intenzitet (y-os) naspram m/z vrijednosti (x-os). Maksimumi važnih pikova označeni su unutar slike (m/z).

4.5.2. Analiza MT i drugih citosolskih biomolekule koje vežu Zn, Cu, Cd, Ag i Pb

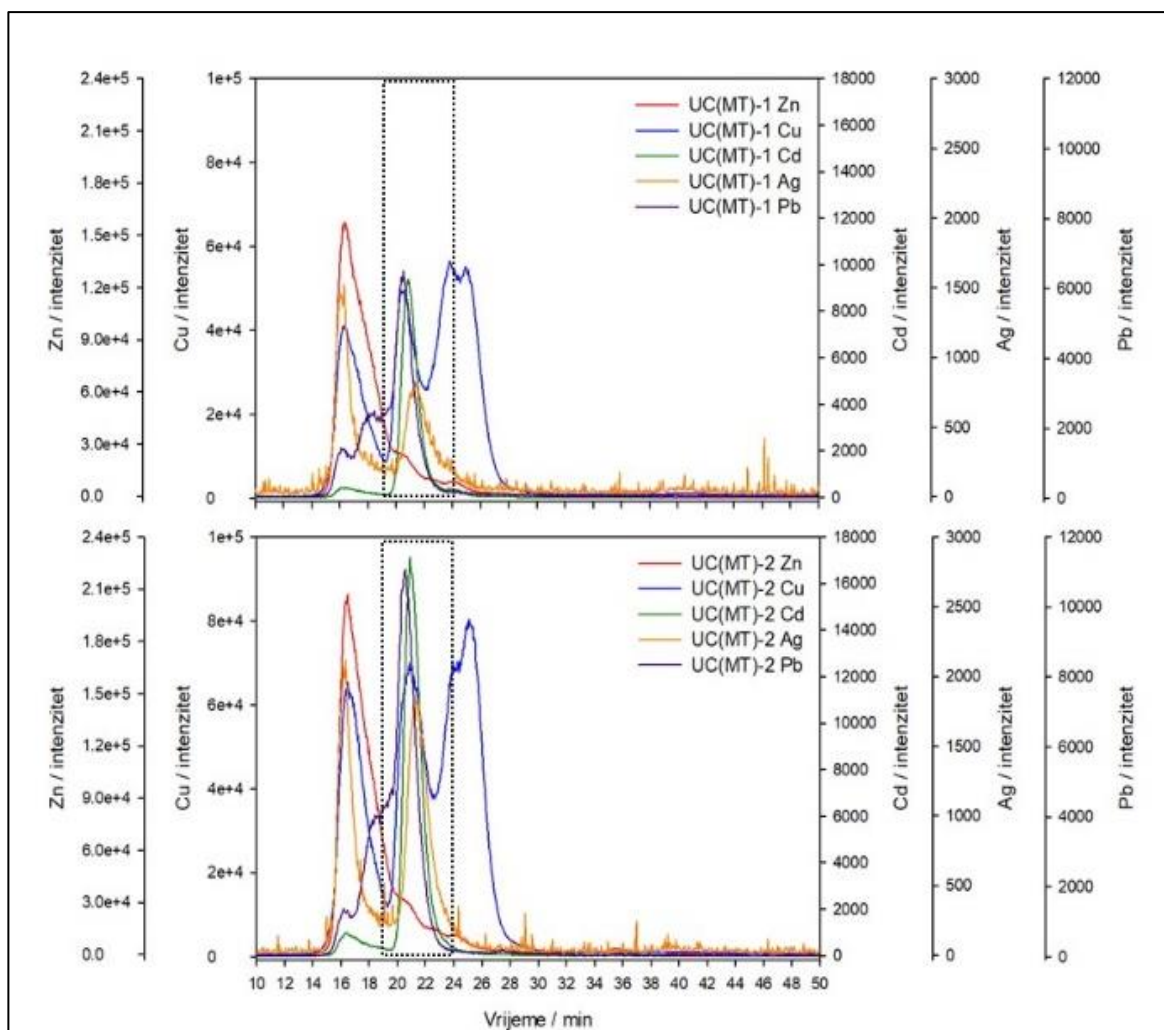
Za analizu MT i drugih citosolskih biomolekula koje vežu Zn, Cu, Cd, Ag i Pb odabrana su dva uzorka školjkaša s REF postaje jer su sadržavali veće koncentracije Cd, dobro poznatog pobuđivača sinteze MT-a. Uzorci su označeni kao UC(MT)-1 i UC(MT)-2. Podatci o citosolskim koncentracijama Cd i ostalih četiriju analiziranih elementa u odabranim uzorcima prikazani su u Tablici 26.

4.5.2.1. Prvi korak razdvajanja: SE₇₅–HPLC–ICP–MS analiza biomolekula koje vežu Zn, Cu, Cd, Ag i Pb

SE₇₅–HPLC–ICP–MS analiza otkrila je jedan preklapajući pik za sve gore navedene elemente s maksimumom elucije u 21. minuti, što odgovara molekulskoj masi od 27,5 kDa (Slika 35). Vrijeme elucije gotovo odgovara vremenima elucije proteinskih standarda ugljične anhidraze (29 kDa) i superoksid dismutaze (32,5 kDa), te vjerojatno dimernog oblika MT (~29 kDa; prividna molekulska masa MT1 standarda na temelju vremena elucije (23,9 min) i kalibracije je ~14,6 kDa) (Poglavlje 3.6.2.1.). Osim spomenutog pika s maksimumom elucije u 21. minuti, pronađeni su još jedan manji pik za Zn te jedan preklapajući pik za Cu i Zn, elemente za koje je poznato da se vežu na MT, a čije se vrijeme elucije prilično dobro podudaralo s vremenima elucije monomernih oblika MT2 (22,8 min) i MT1 standarda (23,9 min) (Slika 35). Frakcije unutar elucijskog područja ovih triju pikova skupljene su pomoću SE₇₅–HPLC–a (19,0 – 24,0 min) (SE₇₅–MT–metal frakcija) te dalje analizirane pomoću AEX–HPLC–ICP–MS–a.

Tablica 26. Citosolske koncentracije esencijalnih (Zn i Cu; koncentracije izražene u $\mu\text{g g}^{-1}$) i neesencijalnih elemenata (Cd, Ag i Pb; koncentracije izražene u ng g^{-1}) u uzorcima probavne žlijezde školjkaša *U. crassus* odabranih za proučavanje metalotioneina (MT) i drugih citosolskih biomolekula koje vežu Zn, Cu, Cd, Ag i Pb.

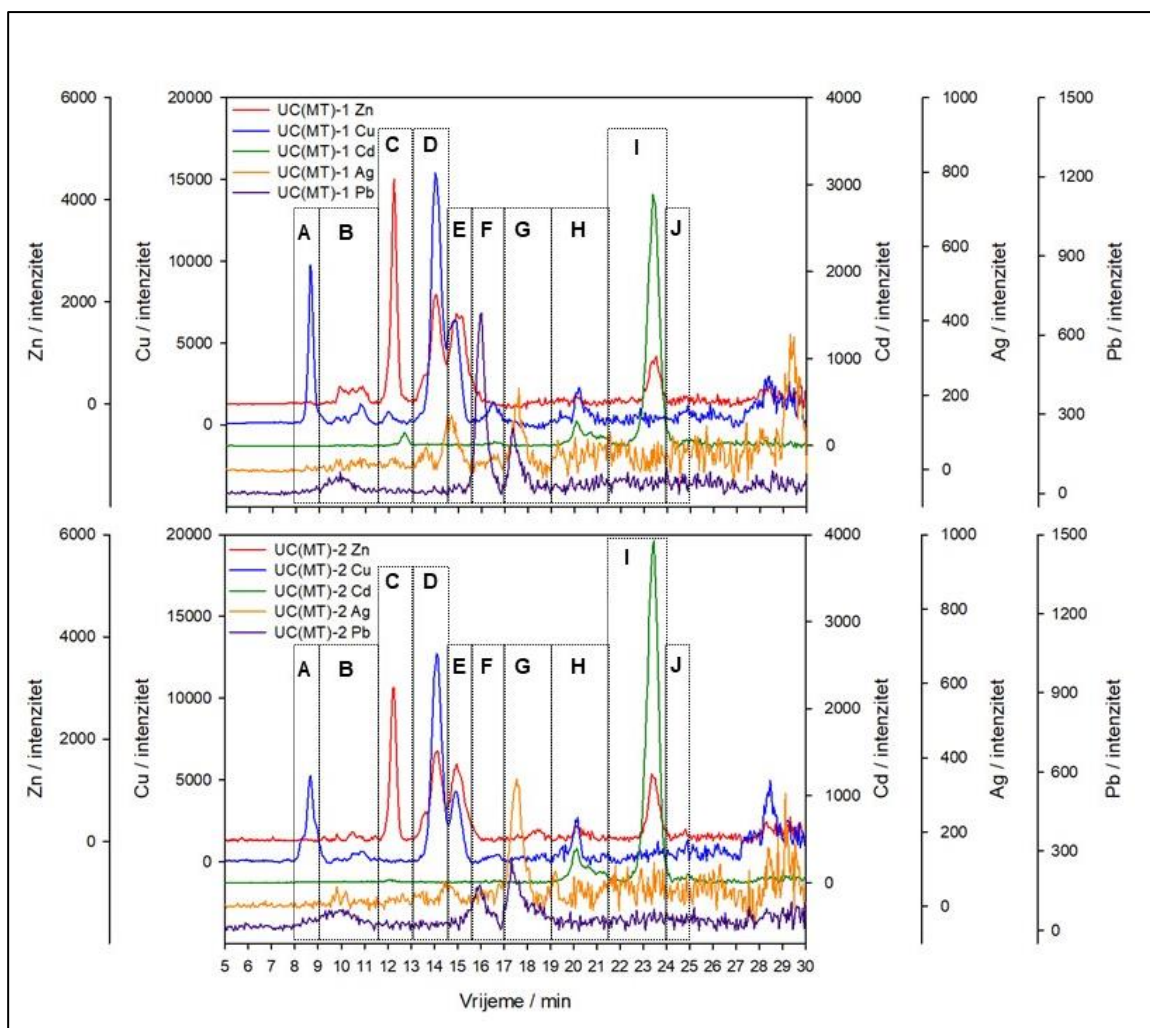
	UC(MT)–1	UC(MT)–2
Zn / $\mu\text{g g}^{-1}$	8,19	6,43
Cu / $\mu\text{g g}^{-1}$	1,10	0,970
Cd / ng g^{-1}	8,19	6,43
Ag / ng g^{-1}	5,06	5,00
Pb / ng g^{-1}	19,4	30,8



Slika 35. Kromatografski profili raspodjele cinka, bakra, kadmija, srebra i olova vezanih za citosolske biomolekule probavne žlijezde različite molekulske mase, razdvojeni SE₇₅–HPLC–ICP–MS-om sa Superdex 75 (GE Healthcare Bio Sciences AB, Švedska) kolonom. Pravokutnim oblicima su označene frakcije koje su skupljene pomoću SE–HPLC sustava za njihovu daljnju analizu u vremenskom intervalu od 19,0 – 24,0 min.

4.5.2.2. Drugi korak razdvajanja: AEX–HPLC–ICP–MS analiza skupljenih SE₇₅–MT–metal frakcija

Razdvajanje skupljenih SE₇₅–MT–metal frakcija pomoću AEX–HPLC–ICP–MSa pokazalo je višestruke, ponekad preklapajuće pikove za svaki od pet analiziranih metala. Razdvajanje se odvijalo primjenom linearnog gradijenta amonij acetata (5 – 25 min; 0 – 250 mM amonij acetat). Dobiveni AEX–profili podijeljeni su u deset frakcija (A – J), koje odgovaraju pikovima jednog ili više analiziranih metala (Slika 36). Frakcije su skupljene pomoću AEX–HPLC sustava u sljedećim vremenskim intervalima: A) 8,0 – 9,0 min; B) 9,0 – 11,5 min; C) 11,5 – 13,0 min; D) 13,0 – 14,5 min; E) 14,5 – 15,5 min; F) 15,5 – 17,0 min; G) 17,0 – 19,0 min; H) 19,0 – 21,5 min; I) 21,5 – 24,0 min; J) 24,0 – 25,0 min, i dalje analizirane MALDI–TOF MS metodom.



Slika 36. Kromatografski profili raspodjele Zn, Cu, Cd, Ag i Pb vezanih za citosolske biomolekule probavne žlijezde različitih negativnih naboja, razdvojeni AEX-HPLC-ICP-MS metodom koristeći MonoQ 5/50 GL (GE Healthcare BioSciences, SAD) kolonu. Pravokutnim oblicima i slovima označene su frakcije koje su skupljene pomoću AEX-HPLC sustava za njihovu daljnju analizu MALDI-TOF MS metodom. Vremenski intervali skupljenih frakcija su sljedeći: A): 8,0 – 9,0 min; B): 9,0 – 11,5 min; C): 11,5 – 13,0 min; D): 13,0 – 14,5 min; E) 14,5 – 15,5 min; F) 15,5 – 17,0 min; G) 17,0 – 19,0 min; H) 19,0 – 21,5 min; I) 21,5 – 24,0 min; J) 24,0 – 25,0 min.

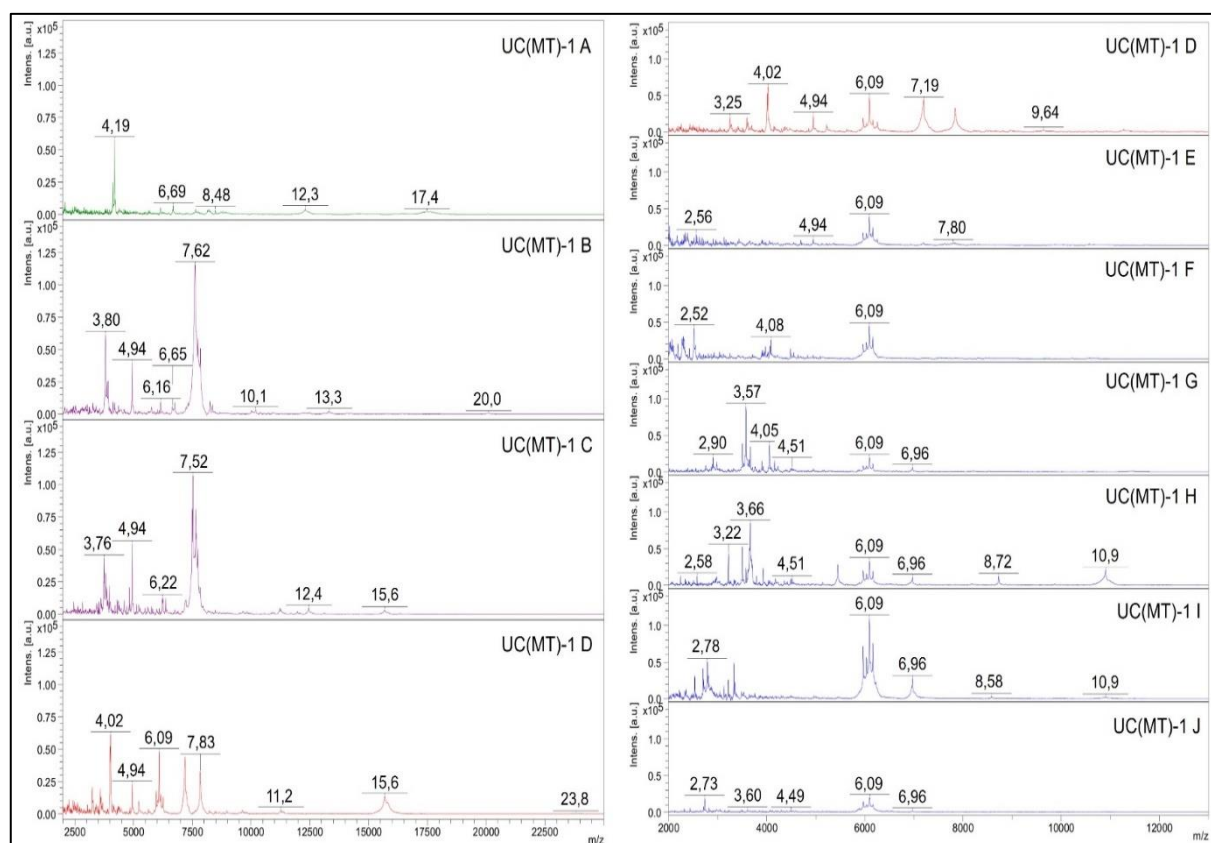
4.5.2.3. MALDI-TOF MS karakterizacija AEX-SE₇₅-MT-metal frakcija

Za svaki analizirani uzorak prikazani su m/z pikovi prikupljeni pomoću MALDI-TOF MS analize u pojedinoj AEX-SE₇₅-MT-metal frakciji (Slike 37 i 38), opisanima u prethodnom poglavlju (4.5.2.2.). MALDI-TOF MS m/z pikovi koji ukazuju na prisutnost MT izoformi (6,09 – 6,69 kDa; 12,3 – 12,4 kDa) zabilježeni su u svih deset AEX-frakcija (A – J; Slike 37 i 38).

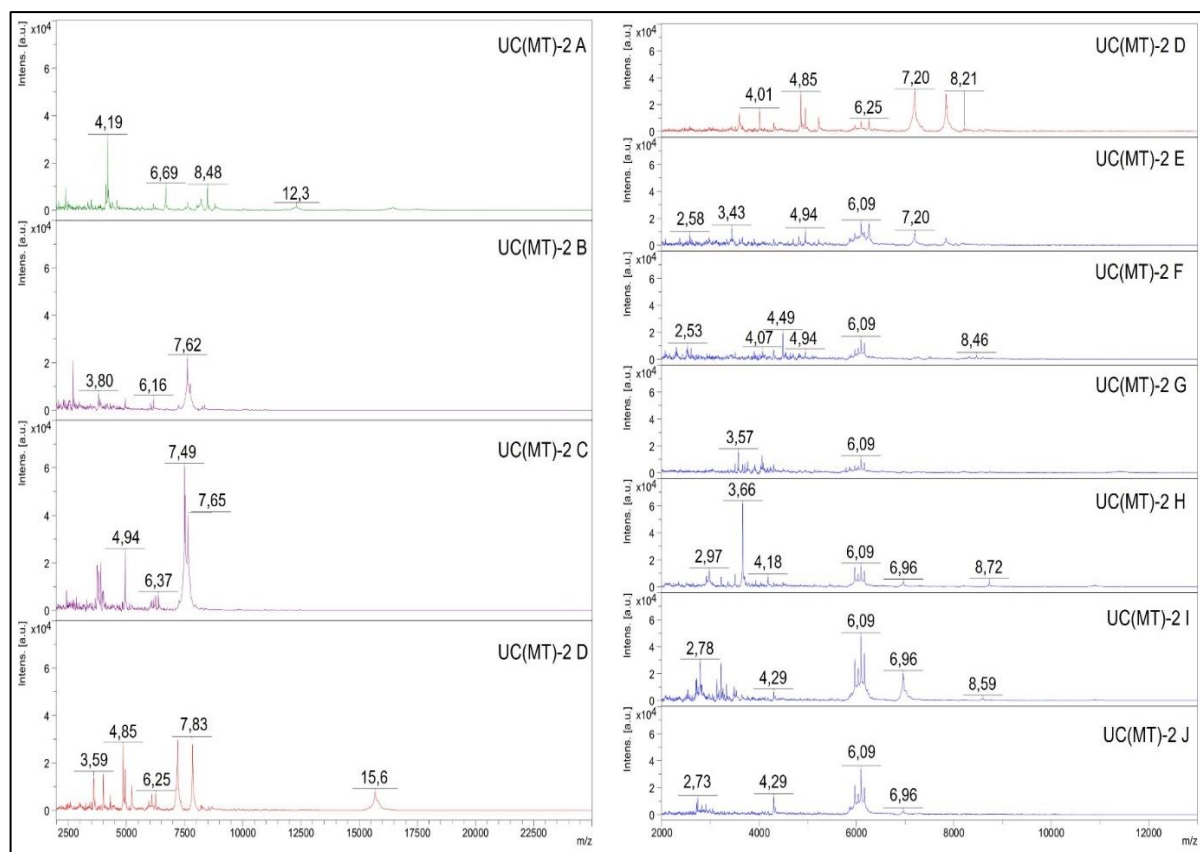
Standardi MT izoformi 1 i 2 također su obrađeni pomoću MALDI–TOF–MS te su uočeni pikovi na 6,1 i 6,2 kDa (Prilog 3).

MALDI–TOF MS spektri prve tri, više bazične, frakcije (A – C), sadržavale su male pikove na 6,2 kDa i 12,3 – 12,5 kDa, što vjerojatno ukazuje na monomerni i dimerni oblik MT–izoforme koji odgovara MT1 proteinskom standardu. Pik na 6,1 kDa, koji odgovara MT2 proteinskom standardu, bio je prisutan od četvrte frakcije pa nadalje (D – J), dok je dodatni pik na 6,9 kDa bio prisutan u posljednje tri AEX–frakcije (H – J) (Slike 37 i 38).

Prema MALDI–TOF MS analizama, bazičnije AEX–frakcije (B – D), karakterizirane eluiranjem Zn i Cu, dodatno su sadržavale dominantne m/z pikove na 3,8 – 4,0 kDa te 7,6 – 7,8 kDa. Oni vjerojatno odgovaraju četverostruko i dvostruko nabijenim SOD podjedinicama, dok manji pik na 15,7 kDa (frakcija D) vjerojatno ukazuje na intaktnu SOD podjedinicu. Sličan spektar dobiven je za SOD proteinski standard (Prilog 4). Nadalje, u D frakciji zabilježen je MALDI–TOF MS pik na 7,2 kDa (Slike 37 i 38), koji bi mogao odgovarati četverostruko nabijenoj ugljičnoj anhidrazi (CA; Prilog 4).



Slika 37. Spektar masa dobiven MALDI–TOF MS analizom za skupljene AEX–SE₇₅–MT–metal frakcije (A–J; frakcije opisane u poglavlju 4.5.2.2.) uzorka školjkaša UC(MT)–1. Rezultati su prikazani kao intenzitet (y–os) naspram m/z vrijednosti (x–os). Maximumi važnih pikova označeni su unutar slike (m/z).



Slika 38. Spektar masa dobiven MALDI–TOF MS analizom za skupljene AEX–SE₇₅–MT–metal frakcije (A–J; frakcije opisane u poglavlju 4.5.2.2.) uzorka školjkaša UC(MT)–2. Rezultati su prikazani kao intenzitet (y–os) naspram m/z vrijednosti (x–os). Maksimumi važnih pikova označeni su unutar slike (m/z).

5. RASPRAVA

5.1. Karakterizacija onečišćenja rijeke Mrežnice na istraživanom području

U posljednje vrijeme, onečišćenje vodenih ekosustava metal(oid)ima prepoznato je kao jedan od ključnih globalnih ekoloških problema. Metal(oid)i su prisutni u njima kao posljedica prirodnih procesa (npr. erozija stijena, ispiranje tla) i ljudskih aktivnosti, poput rudarenja, upotrebe gnojiva i pesticida te ispuštanja industrijskog i komunalnog otpada (Dragun i sur., 2022a; Gupta i Singh, 2011).

Kako bi se smanjili rizici povezani s onečišćenjem metal(oid)ima, diljem svijeta provode se različite mjere kontrole izvora onečišćenja. Tijekom devedesetih godina prošlog stoljeća, Europska unija donijela je propise koji obvezuju na prikupljanje i pročišćavanje komunalnih otpadnih voda, te je zabranila njihovo ispuštanje u površinske vode (CEC, 1991). Dodatno, uspostavljena je Okvirna direktiva o vodama, s ciljem postizanja dobrog ekološkog stanja svih površinskih i podzemnih voda u državama članicama. Ova direktiva također teži postupnom smanjenju unosa opasnih i prioritetnih tvari u vodene sustave, uključujući teške metale, pesticide i druge industrijske kemikalije (EPCEU, 2013).

Nadalje, posebnu pozornost potrebno je usmjeriti na činjenicu da se određene tvari iz povijesnih izvora onečišćenja i danas mogu pronaći u okolišu. Stoga je ključno utvrditi razmjere takvog onečišćenja koji su se zadržali u vodenim ekosustavima (Hurley i sur., 2017). Ovakav primjer povijesno onečišćenog vodenog ekosustava mogla bi biti rijeka Mrežnica, koja je tijekom proteklog stoljeća bila izložena onečišćenjima iz mnogih industrijskih postrojenja (Dragun i sur., 2022a). Inače, rijeka Mrežnica važan je vodotok ne samo za Hrvatsku, već i za Europu jer je obuhvaćena ekološkom mrežom Europske unije NATURA 2000, koja štiti najvrjednija područja za očuvanje biološke raznolikosti i prirodnih staništa. Unatoč ekološkoj važnosti, Mrežnica je bila pod značajnim industrijskim pritiscima. Industrijska zona grada Karlovca razvijena je na obje obale rijeke, u blizini njezina ušća u rijeku Koranu, a pojedini industrijski pogoni na tom području djeluju još od 1930–ih godina. Iako je tijekom posljednjeg desetljeća velik broj tih postrojenja priključen na uređaj za pročišćavanje otpadnih voda, čiji se ispust usmjerava u rijeku Kupu, mogućnost povijesnog onečišćenja Mrežnice i dalje postoji, što naglašava potrebu za provedbom detaljnih istraživanja kako bi se utvrdio opseg i karakter tog potencijalnog onečišćenja (Dragun i sur., 2022a).

5.1.1. Koncentracije metal(oid)a u otopljenoj frakciji vode rijeke Mrežnice

Otopljena frakcija metal(oid)a u vodi obuhvaća slobodne ione metala, labilne anorganske i organske komplekse, kao i inertne organske metalne komplekse visoke molekulske mase te koloide. Biološki odgovor vrlo je često proporcionalan koncentracijama labilnih metala, zbog čega se te koncentracije najčešće smatraju biološki dostupnim koncentracijama metal(oid)a (Balistrieri i sur., 2007).

Među analiziranim otopljenim metal(oid)ima, sedam je regulirano u Uredbi o standardu kakvoće voda (NN 20/2023), a to su As, Cu, Cd, Cr, Ni, Pb i Zn. Prema europskoj Direktivi (EPCEU, 2013) regulirana su samo tri elementa (Cd, Ni, Pb), pri čemu su Cd i njegovi spojevi su identificirani kao prioritetne opasne tvari. Granične vrijednosti kategorija ekološkog stanja za ove elemente odnose se na njihove koncentracije u otopljenoj fazi, a preporučene godišnje koncentracije ($\mu\text{g L}^{-1}$) iznose: As 7,5; $\text{Cu} \leq 1,1$; $\text{Cd} \leq 0,08$; Cr 9; Ni 4; Pb 1,2; $\text{Zn} \leq 7,8$. Budući da su i najviše koncentracije svih elemenata izmjerene tijekom ovog istraživanja bile mnogo niže od preporučenih vrijednosti (Cu (6 puta), Cd (3 puta), Cr (50 puta), Ni (60 puta), Pb (>20 puta), i Zn (9 puta)), procijenili smo da u ispitivanom razdoblju nije postojao značajan rizik za vodeni okoliš te da su okolišni uvjeti bili u granicama prihvatljivog ekološkog statusa.

Nadalje, koncentracije otopljenih metal(oid)a u površinskoj vodi rijeke Mrežnice usporedili smo sa srednjom vrijednošću zabilježenih koncentracija metal(oid)a u svjetskim rijekama (Gaillardet i sur., 2003), s nekoliko drugih, neonečišćenih i onečišćenih krških rijeka u Hrvatskoj (Dautović i sur., 2014; Dautović, 2006; Fiket i sur., 2018; Maldini i sur., 2023; Mijošek i sur., 2023) te krškom rijekom Sidi koja je pod utjecajem povijesnog onečišćenja iz napuštenih rudnika (Liao i sur., 2022) (Prilog 5).

Koncentracije većine elemenata u Mrežnici, kako na referentnoj (REF) tako i na onečišćenoj (KIZ) postaji, bile su znatno niže (2 – 57 puta) od prosječnih vrijednosti za svjetske rijeke (Gaillardet i sur., 2003). Posebno se ističe Ni, čija je koncentracija bila za čak dva reda veličine niža od globalnog prosjeka (Gaillardet i sur., 2003). Koncentracije Zn bile su u istom rasponu kao i prosjek svjetskih rijeka, dok su Mo, Sr i U predstavljali iznimku s vrijednostima i do 2 puta većima od globalnog prosjeka.

Nadalje, koncentracije većine elemenata na REF lokaciji rijeke Mrežnice usporedive su s vrijednostima utvrđenima za hrvatske krške rijeke bez značajnijeg antropogenog utjecaja,

uključujući Cetinu (Maldini i sur., 2023), Koranu (Dautović i sur., 2014), Unu (Dautović, 2006), Krku (Mijošek i sur., 2023) i Zrmanju (Fiket i sur., 2018). Ipak, bilo je određenih iznimki: koncentracije Co bile su do pet puta veće u Mrežnici u odnosu na Zrmanju, Koranu i Unu, dok su vrijednosti Fe na REF postaji bile i do 16 puta veće u usporedbi s neonečišćenim postajama na Korani i Uni. Također, elementi poput Mn, Mo, Sr i Tl pokazali su veće koncentracije u rijeci Mrežnici u odnosu na Koranu.

Usporedba rezultata za onečišćenu lokaciju KIZ na rijeci Mrežnici s postajama na rijeci Krki pod utjecajem industrijskih i komunalnih otpadnih voda (Mijošek i sur., 2023) ukazuje na općenito niže koncentracije elemenata u Mrežnici. Na Krki su zabilježene višestruko veće koncentracije elemenata poput Ba, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Se, Sr, Zn, kao i makroelemenata Ca, K i Na. Više koncentracije većine ovih elemenata u Krki (izuzev Ba, Na i Sr) dijelom proizlaze iz prirodnih geološko-litogenih razlika između obalnog područja (Krka) i središnje Hrvatske (Mrežnica) (Halamić i sur., 2012), ali dijelom odražavaju i izraženiji antropogeni utjecaj aktivne tvornice vijaka u Kninu (Mijošek i sur., 2023).

Koncentracije metal(oid)a u Mrežnici uspoređene su i s onima u povijesno onečišćenoj rijeci Sidi u jugozapadnoj Kini (Liao i sur., 2022). Iako je rijeka Mrežnica u prošlosti bila pod značajnim utjecajem industrije, posebice izravnog ispuštanja ugljene troske i pepela iz tvornice pamuka, te činjenici da se na njezinim obalama i danas nalazi više industrijskih postrojenja koja su sve do unazad deset godina imala neregulirane ispuste otpadnih voda (Frančišković–Bilinski, 2008), koncentracije elemenata u vodi Mrežnice znatno su niže u usporedbi s rijekom Sidi. Ova razlika može se objasniti znatno manjim intenzitetom i drugačijom vrstom industrijskih aktivnosti na obalama Mrežnice. Rijeka Sidi protječe nizvodno od rudnika olova i cinka Laochang, a područje je kontinuirano izloženo izravnom utjecaju rudarskog jalovišta i otpadnih voda još od 1950–ih godina, što je rezultiralo daleko većim i trajnijim opterećenjem metalima (Liao i sur., 2022).

No, unatoč relativno niskom onečišćenju vode, određene prostorne razlike bile su uočljive na Mrežnici. Na REF postaji, Cd je bio prisutan u većim koncentracijama u odnosu na KIZ postaju, vjerojatno kao rezultat ili prirodnog sastava sedimenta ili poljoprivrednih praksi u blizini tog dijela rijeke. Suprotno tome, općenito veće koncentracije Al, Cs, Fe, Na i V pronađene su na KIZ postaji u usporedbi s REF, što bi moglo upućivati na moguće ostatke industrijskog onečišćenja na ovom području (Dragun i sur., 2022a).

5.1.2. Koncentracije metal(oid)a u partikulatnoj frakciji vode rijeke Mrežnice

Povezanost onečišćujućih tvari (hranjivih tvari, teških metala i organskih spojeva) s koloidnim i suspendiranim česticama ima ključnu ulogu u određivanju njihovog transporta, sudbine, biogeokemije, bioraspoloživosti i toksičnosti u prirodnim vodama (Ran i sur., 2000). Rezultati analize metal(oid)a u partikulatnoj frakciji, tj. metal(oid)a vezanih za suspendiranu tvar, u vodi rijeke Mrežnice otkrili su općenito veće koncentracije partikulatnih metal(oid)a na povijesno onečišćenoj KIZ lokaciji u usporedbi s REF lokacijom. Najizraženije razlike uočene su za Ag (do 3 puta), Pb (do 5,5 puta), Se (do 2 puta), Sn (do 3 puta), Zn (do 3,8 puta) i Na (do 2,4 puta). S obzirom na ulogu sedimenta kao rezervoara metal(oid)a u vodenim ekosustavima (Zhao i sur., 2014), različiti okolišni uvjeti i fizikalno-kemijski čimbenici mogu potaknuti njihovu resuspenziju i ponovnu mobilizaciju u vodenom stupcu. Ovaj bi proces mogao djelomično objasniti povećane koncentracije metal(oid)a u vodi zabilježene na KIZ postaji, koja je kroz povijest bila pod pritiskom brojnih izvora onečišćenja (Dragun i sur., 2022a).

Usporedba koncentracija metal(oid)a u partikulatnoj frakciji rijeke Mrežnice sa srednjim vrijednostima svjetskih rijeka (Viers i sur., 2009) pokazala je višestruko niže koncentracije u rijeci Mrežnici za većinu proučavanih elemenata (As, Ba, Bi, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Mo, Pb, Rb, Sn, Sr, U, V). Daljnje usporedbe maksimalnih koncentracija metal(oid)a u partikulatnoj frakciji rijeke Mrežnice sa rijekama Gediz, Beiyun, Sava i Dunav (Kucuksezgin i sur., 2008; Li i sur., 2022; Vidmar i sur., 2017; Yiğiterhan i Murray, 2008) dodatno potvrđuju da su koncentracije većine elemenata u rijeci Mrežnici relativno niske, što je u skladu s karakteristikama krških rijeka koje se odlikuju malim količinama suspendirane tvari (Ivanić i sur., 2020; Lučić i sur., 2021).

Ipak, izuzetak su predstavljali Al, Fe i Mn, čije su koncentracije u partikulatnoj frakciji bile i do 5 puta više od onih u gore spomenutim rijekama. Jedino je partikulatni Zn u rijeci Dunav dosegao 7 puta višu koncentraciju u odnosu na rijeku Mrežnicu (Yiğiterhan i Murray, 2008). Prema Vidmar i sur. (2017), visoke pH vrijednosti vode (8,03 – 8,30) mogu uzrokovati taloženje metala u obliku hidroksida ili koprecipitaciju s ostalim česticama, čime se povećava njihov udio u partikulatnoj frakciji. S obzirom na to da se pH vrijednost vode rijeke Mrežnice kretala od 8,05 do 8,38 (Dragun i sur., 2022a), sličan mehanizam vjerojatno pridonosi opaženim koncentracijama Al, Fe i Mn.

Nadalje, koncentracije partikulatnog As, Cr, Pb i Zn u Mrežnici bile su 2 do 10 puta veće u usporedbi sa Savom (Vidmar i sur., 2017). Više razine ovih elemenata mogu se dovesti u vezu

s industrijskim djelatnostima, ponajprije s tekstilnom industrijom, u kojoj su soli Pb i Zn tradicionalno korištene u postupcima omekšavanja i bojenja tkanina, dok je Cr služio kao fiksator boje (Hurley i sur., 2017).

Zaključno, iako se stvarne koncentracije metal(oid)a vezanih za partikulatnu tvar u rijeci Mrežnici mogu smatrati umjerenima, dobiveni rezultati ipak ukazuju na kontinuirano povišene vrijednosti nekoliko elemenata (Ag, Pb, Sn, Mn, Na) u partikulatnoj frakciji na KIZ lokaciji. Takav obrazac upućuje na prisutnost određenog stupnja rezidualnog, povijesnog onečišćenja u dijelu rijeke koji protječe kroz industrijsko područje Karlovca, koje se održalo unatoč činjenici da mnogi industrijski pogoni u tom području već više od desetljeća ne ispuštaju otpadne vode u rijeku Mrežnicu.

5.1.3. Koncentracije metal(oid)a u sedimentu rijeke Mrežnice

Sedimenti su glavni spremnici metal(oid)a u vodenim ekosustavima (Fiket i sur., 2019), te je stoga važno provesti analize onečišćenja metal(oid)ima u sedimentima rijeke Mrežnice.

Dobiveni rezultati potvrdili su da su koncentracije svih elemenata bile blago do znatno više na postaji KIZ nego na REF postaji; neke su čak bile do 20 puta više na KIZ-u u usporedbi s REF lokacijom (npr. Al, Cr, Cs, Mo, Ni, Sb, Sn, i U). Brojni elementi mogli bi biti povezani s industrijskim djelatnostima, uključujući i uporabu u tekstilnoj proizvodnji. Soli Pb i Zn, primjerice, povijesno su se primjenjivale u proizvodnji tekstila, za omekšavanje tkanine i bojenje (Choudhury, 2006; Hurley i sur., 2017). Bakar i Cr mogli bi se povezati s tekstilnom industrijom kao sastavnice efluenata od bojenja i izbjeljivanja, pri čemu je Cu posebno vezan uz plave i zelene boje (Suteja i sur., 2020).

Iznimke od ovog trenda povišenih koncentracija metal(oid)a na povijesno onečišćenoj postaji bili su Ca i Cd, čije su koncentracije na REF postaji bile blago više nego na KIZ postaji. Rijeka Mrežnica je karbonatna rijeka bogata sedrom koja na čistim postajama ima relativno visoke koncentracije Ca u sedimentu; suprotno tome, niže razine Ca zabilježene su na onečišćenoj postaji gdje je sediment pomiješan s većom količinom troske (Frančišković-Bilinski i sur., 2017).

Ovi rezultati uspoređeni su s postojećim kriterijima kvalitete sedimenta za šest elemenata (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb i Zn), koje su saželi Frančišković-Bilinski i sur. (2017), što je dovelo do zaključka da su određeni elementi prisutni u sedimentima rijeke Mrežnice u većim koncentracijama od graničnih vrijednosti. Koncentracije Cd i Pb u sedimentima rijeke Mrežnice u ovom istraživanju nisu premašile vrijednosti za najniže toksične učinke prema kanadskim

propisima (Cd: St. Lawrence R., $0,9 \mu\text{g g}^{-1}$; Pb: British Columbia, $31 \mu\text{g g}^{-1}$; Quéméraires et al., 1996). Međutim, koncentracije Cr uvijek su bile više od vrijednosti za najniže toksične učinke (British Columbia, $26 \mu\text{g g}^{-1}$) na postaji KIZ, a ponekad čak i na REF postaji; na KIZ postaji čak su se približile vrijednosti za značajne toksične učinke ($26 \mu\text{g g}^{-1}$). Koncentracije Cu na REF postaji uvijek su bile niže od granice za neonečišćene sedimente (SAD; $25 \mu\text{g g}^{-1}$; Frančišković-Bilinski i sur., 2017), ali su na KIZ postaji premašivale vrijednost za umjereno onečišćene sedimente (SAD; $37,5 \mu\text{g g}^{-1}$). Koncentracije Ni na REF postaji uvijek su bile ispod kanadske granice za najniže toksične učinke (St. Lawrence R.; $35 \mu\text{g g}^{-1}$), ali su je uvijek premašivale na KIZ postaji.

Rezultati ovog istraživanja dodatno su uspoređeni s vrijednostima za sedimente čistih jezera u Poljskoj koje su naveli Szymanowska i sur. (1999; u $\mu\text{g g}^{-1}$: Co, 2,3–4,2; Cr, 1,1–1,9; Cu, 2–3; Fe, 3,0 – 9,9; Ni, 1,6 – 2,9; Pb, 9,7 – 13). S iznimkom Zn, sve su vrijednosti u ovom istraživanju bile znatno više od koncentracija prijavljenih za čiste slatkovodne ekosustave. Nadalje, ove smo rezultate usporedili s neonečišćenim i onečišćenim dijelovima rijeke Ilove u Hrvatskoj (Mijošek i sur., 2020), pri čemu je uočeno da su mnogi elementi bili niži u sedimentima rijeke Mrežnice nego u neonečišćenim sedimentima rijeke Ilove. Samo nekoliko ih je bilo ili usporedivo ili znatno više u odnosu na koncentracije zabilježene u onečišćenim sedimentima rijeke Ilove; naime, Cu, Cr, Mo, Ni, Sr i U na postaji KIZ, što je općenito odgovaralo metalima koji su premašili gore navedene kriterije kvalitete sedimenta (Frančišković-Bilinski i sur., 2017). Stoga, iako su otopljene koncentracije u rijeci Mrežnici upućivale na relativno čistu riječnu vodu, sedimenti ukazuju na određeni stupanj kontaminacije.

Slično ovom istraživanju, Hurley i sur. (2017) izvijestili su kako visoke koncentracije metala u riječnim sedimentima na području povijesne industrijske kontaminacije u regiji Manchestera u Ujedinjenom Kraljevstvu nisu bile popraćene visokim razinama otopljenih metala, koje su čak bile ispod granica postavljenih od strane britanske agencije za okoliš. Ovakav izostanak značajne povezanosti između otopljenih koncentracija metala i koncentracija u sedimentima upućuje na to da trenutni unos onečišćujućih tvari ne predstavlja dominantan utjecaj na kontaminaciju sedimenta. Iako su koncentracije metal(oid)a u sedimentima regije Manchestera, koje su prijavili Hurley i sur. (2017), bile znatno više nego one zabilježene u rijeci Mrežnici, isti se princip može primijeniti. Stoga se može pretpostaviti da KIZ postaja i dalje pokazuje određeni stupanj povijesnog onečišćenja sedimenta makro- i mikroelementima.

5.2. Akumulacija metal(oid)a u probavnoj žlijezdi školjkaša

Jedan od glavnih ciljeva ovog rada bio je istražiti utjecaj povijesnog industrijskog onečišćenja rijeke Mrežnice na bioakumulaciju metala(oida) slatkovodnom školjkašu *U. crassus* kao bioindikatorskom organizmu, odnosno u njegovoj probavnoj žlijezdi, kao ciljnom bioindikatorskom organu. Izbor školjkaša kao bioindikatorskog organizma za praćenje povijesnog onečišćenja logičan je izbor za ovu vrstu istraživanja, budući da različita onečišćivala koja potječu iz povijesnih izvora, uključujući metale, uglavnom ostaju vezana za čestice sedimenta u riječnom ekosustavu, pa su time osobito dostupna bentoskim organizmima, uključujući školjkaše, koji zbog svog filtracijskog načina prehrane mogu akumulirati ne samo otopljene metale već i one vezane za čestice (Naimo, 1995).

5.2.1. Prostorna varijabilnost i odnos s koncentracijama metal(oid)a u okolišu

Usporedba ukupnih koncentracija (ne)esencijalnih elemenata u probavnoj žlijezdi vrste *U. crassus* s dviju postaja na rijeci Mrežnici otkrila je tri prostorna obrasca: neki elementi imali su usporedive koncentracije na obje postaje; neki elementi imali su više koncentracije na KIZ postaji; neki elementi imali su više koncentracije na REF postaji.

Među elementima koji nisu pokazali značajnu prostornu varijabilnost, odnosno koji su imali usporedive koncentracije na obje istraživane postaje, bili su esencijalni elementi Fe, K, Se i V te neesencijalni elementi Ag, Al, Ni i Rb. Ovakav prostorni obrazac mogao bi se djelomično objasniti činjenicom da koncentracije elemenata u otopljenoj i partikulatnoj frakciji vode rijeke Mrežnice nisu značajno varirale između postaja. No, unatoč tome što razlike nisu bile statistički značajne, Fe je bilo prisutno u većim koncentracijama u otopljenoj frakciji, a gotovo svi ostali navedeni elementi su bili povišeni u sedimentu na KIZ u odnosu na REF postaju. Ovi rezultati upućuju na to kako je fiziološka regulacija gore navedenih esencijalnih i neesencijalnih elemenata bila prilično učinkovita kod vrste školjkaša *U. crassus*. Takva sposobnost održavanja stabilnih unutarnjih koncentracija usprkos varijacijama u okolišu u skladu je s poznatim mehanizmima detoksikacije i homeostatske regulacije u školjkaša, koji uključuju enzimske procese, različite metaloproteine i biomolekule koji vežu metale (npr. metalotioneine), te aktivne ionske pumpe na membranama stanica (Thorsen i sur., 2006).

Nadalje, ukupne koncentracije osam elemenata, uključujući dva esencijalna (Cu i Mo) i šest neesencijalnih elemenata (Bi, Cs, Pb, Sb, Tl i U), bile su statistički značajno više u probavnoj žlijezdi školjkaša *U. crassus* prikupljenih na KIZ postaji, tj. na postaji pod utjecajem povijesnog onečišćenja. Vrijednosti za esencijalne elemente Cu i Mo bile su do dva puta više, dok su vrijednosti neesencijalnih Bi, Cs, Pb, Sb, Tl i U bile čak do šest puta više na postaji KIZ u

usporedbi s REF. Povećana bioakumulacija tih elemenata u probavnoj žlijezdi općenito je odgovarala njihovim većim koncentracijama u sedimentu, a u nekim slučajevima i u vodi rijeke Mrežnice na KIZ postaji. Iako mnogi industrijski pogoni (npr. bivša tekstilna industrija u Dugoj Resi) već više od deset godina ne ispuštaju otpadne vode u rijeku Mrežnicu, povišene koncentracije različitih elemenata, uključujući gore navedene, kontinuirano se bilježe u vodi i/ili sedimentu na istraživanom području (Dragun i sur., 2022a; Frančišković-Bilinski, 2008; Frančišković-Bilinski i sur., 2017). Među elementima koji su imali veće koncentracije na KIZ postaji, najveće razlike u ukupnim koncentracijama u probavnoj žlijezdi školjkaša *U. crassus* između postaja zabilježene su za Bi, čija je upotreba značajno porasla u raznim područjima, osobito u medicini (Das i sur., 2006). Bolnice i medicinska industrija ispuštale su svoje otpadne vode u rijeku Mrežnicu kroz duži vremenski period na KIZ postaji (Dragun i sur., 2022a), što bi moglo objasniti gotovo šest puta veće ukupne koncentracije Bi u probavnoj žlijezdi školjkaša *U. crassus* prikupljenih na KIZ postaji u listopadu 2021. godine. Ovi rezultati potvrđuju kako nakon prestanka ili smanjenja aktivnosti industrijskih pogona koje su onečišćivali rijeku, može doći do povećanog nakupljanja neesencijalnih elemenata, poput Bi, Cs, Pb, Sb, Tl i U u probavnoj žlijezdi školjkaša *U. crassus*. S obzirom na činjenicu da su ti elementi potencijalno toksični, njihova povećana akumulacija mogla bi imati štetne posljedice za ovu vrstu školjkaša, ali i ukazivati na potencijalnu prijetnju drugim vodenim organizmima. U skladu s time, gotovo dvostruko veće koncentracije Cu i Mo sugeriraju kako se koncentracije ovih esencijalnih elemenata u probavnoj žlijezdi *U. crassus* reguliraju samo djelomično. Unatoč njihovim važnim ulogama kao kofaktora brojnih enzima (npr. Cu u citokrom oksidazi, superoksid dismutazi itd.), poznato je da i esencijalni elementi mogu postati toksični ukoliko su prisutni u većim koncentracijama (npr. Cu putem stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta) (Gomes i sur., 2011). Sklonost bioakumulaciji Cu i njegov potencijal za toksičnost potvrđeni su u laboratorijskom istraživanju na stanicama probavne žlijezde školjkaša *U. tumidus*, gdje je utvrđeno kako pri određenoj koncentraciji Cu, dolazi do smanjenja antioksidacijskog kapaciteta te indukcije apoptoze i nekroze stanica (Labieniec i Gabryelak, 2007). Toksični učinci Cu dodatno su zabilježeni kod slatkovodnih školjkaša *A. anatina* i *A. cygnea* izloženih povišenim okolišnim i laboratorijskim koncentracijama Cu (Falfushynska i sur., 2013; Huebner i Pynnonen, 1992). Stalna izloženost metalnim onečišćivalima zasigurno opterećuje obrambene sustave školjkaša, što može imati štetan učinak na organizam, čak i tijekom ličinačkog stadija života, s posljedičnim negativnim učinkom na čitavu populaciju školjkaša (Naimo, 1995).

S druge strane, šest esencijalnih (Ca, Co, Mg, Mn, Na, Se) te pet neesencijalnih elemenata (As, Ba, Cd, Cr i Sr) općenito su imali veće ukupne koncentracije u probavnoj žlijezdi školjkaša *U.*

crassus prikupljenih na REF postaji. Međutim, razlike su bile statistički značajne samo za Ba, Ca, Cr i Mn u sve tri sezone uzorkovanja te su, ovisno o sezoni i elementu, bile do četiri puta više. U svom gornjem toku, koji obuhvaća i REF postaju iz ovog istraživanja, rijeka Mrežnica primarno je građena od karbonatnih stijena, što može objasniti relativno visoke koncentracije Ca u sedimentu na relativno čistim postajama (Dragun i sur., 2022a), kao i višu razinu bioakumulacije u probavnoj žlijezdi školjkaša *U. crassus* na toj postaji. Povećana bioakumulacija većine preostalih elemenata (Ba, Mn i Sr) na REF postaji ne može se povezati s onečišćenjem sedimenta (Dragun i sur., 2022a), već se vjerojatno može objasniti tzv. hipotezom mimikrije kalcija (engl. *calcium mimic hypothesis*). Prema toj hipotezi, školjkaši koakumuliraju određene elemente u tragovima, poput Ba, Mg, Mn i Sr, zbog njihove kemijske sličnosti s Ca, neovisno o fiziološkim potrebama organizma i/ili izloženosti iz okoliša (Beone i sur., 2003; Markich i Jeffree, 1994). Međutim, najznačajnije razlike između postaja zabilježene su za Cd. Ovi su rezultati u skladu s povremeno većim koncentracijama Cd u sedimentu rijeke Mrežnice na REF postaji u usporedbi s lokacijom KIZ. Povećane koncentracije Cd također su zabilježene u nekoliko krških područja u središnjoj i istočnoj Francuskoj (Rambeau i sur., 2010) te u jugozapadnoj Kini (Zhan i sur., 2021), neovisno o izvorima onečišćenja što je povezano uz trošenje karbonata Jurske starosti (Mikac i sur., 2011). Upravo bi ova činjenica mogla objasniti veće koncentracije Cd u sedimentu, a posljedično i u školjkašima na REF postaji u rijeci Mrežnici.

S obzirom da su školjkaši organizmi koji se hrane filtriranjem, izloženi su i onečišćivačima u otopljenoj frakciji vode, kao i onima vezanima za suspendirane čestice ili taložene u sedimentu (Naimo, 1995), proveli smo Spearmanovu korelacijsku analizu kako bismo utvrdili postoji li povezanost između bioakumulirane količine elemenata u probavnoj žlijezdi *U. crassus* i koncentracija tih elemenata u pojedinim okolišnim komponentama. Cilj nam je bio identificirati koja komponenta rijeke potencijalno najviše doprinosi bioakumulaciji određenih elemenata u probavnoj žlijezdi školjkaša *U. crassus*. Rezultati analize pokazali su relativno visok stupanj povezanosti između bioakumulacije elemenata u probavnoj žlijezdi školjkaša i njihovih koncentracija u okolišu. Naime, 17 od 27 analiziranih elemenata u probavnoj žlijezdi pokazalo je pozitivnu korelaciju s koncentracijama metala(oid)a u jednoj ili više proučavanih riječnih komponenti. Najviše elemenata pokazalo je pozitivnu korelaciju sa partikulatnom frakcijom i sedimentima, što ukazuje kako upravo izloženost metal(oid)ima iz sedimenta, uključujući i resuspenziju čestica ima najveći utjecaj na njihovu bioakumulaciju u probavnoj žlijezdi školjkaša.

Kako bismo ove rezultate stavili u širi kontekst, uspoređene su ukupne koncentracije metal(oid)a u probavnoj žlijezdi školjkaša *U. crassus* s dostupnim podacima o koncentracijama metal(oid)a u probavnoj žlijezdi slatkovodnih školjkaša iz ekosustava diljem svijeta, izloženih različitim vrstama i razinama onečišćenja. Budući da do sada ne postoje podaci o bioakumulaciji metal(oid)a za *U. crassus*, ovi rezultati predstavljaju prvo takvo istraživanje za ovu vrstu. Stoga je provedena usporedba s drugim vrstama iz iste porodice, Unionidae (Prilog 6).

Literatura najčešće sadrži podatke o akumulaciji Cd, Cu i Zn u probavnoj žlijezdi slatkovodnih školjkaša, jer je većina istraživanja bila usmjerena na MT – protein male molekulske mase koji sudjeluju u homeostazi i detoksikaciji spomenutih elemenata (Amiard i sur., 2006). Stoga je važno naglasiti kako ovo istraživanje po prvi put pruža podatke o znatno većem broju elemenata nego što je trenutačno dostupno u literaturi za bilo kojeg predstavnika porodice Unionidae.

Jedino istraživanje koje je uključivalo nešto širi spektar od osam elemenata – As, Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb i Zn – provedeno je na vrsti *U. mancus*, uzorkovanoj iz jezera Atatürk (Turska), na postajama koje su bile pod utjecajem poljoprivrednih, komunalnih i industrijskih otpadnih voda (Yoloğlu i sur., 2018). Ukupne koncentracije nekoliko elemenata (As, Ni, Pb i Zn) u probavnoj žlijezdi školjkaša *U. crassus* bile su usporedive ili čak niže u odnosu na one zabilježene kod vrste *U. mancus*, neovisno o vrsti onečišćenja. S druge strane, preostala četiri elementa imala su više koncentracije u *U. crassus* u usporedbi s *U. mancus*. Konkretno, koncentracije Cd, Cr, Cu i Fe bile su do 20 puta više u *U. crassus* u usporedbi s *U. mancus* na obje istraživane postaje (REF i KIZ), što upućuje na višu izloženost tim elementima u rijeci Mrežnici, neovisno o postaji.

Nadalje, koncentracije Cd zabilježene na KIZ postaji u probavnoj žlijezdi *U. crassus* bile su niže u usporedbi s literaturnim podacima za slatkovodne školjkaše iz porodice Unionidae (Prilog 6). S druge strane, koncentracije Cd u probavnoj žlijezdi *U. crassus* na REF postaji bile su općenito više nego kod školjkaša s postaja pod utjecajem poljoprivredne aktivnosti, konkretno više nego kod vrste *U. tumidus* iz rijeka Seret i Zhvanchyk (Ukrajina; Khoma, 2019) te *A. cygnea* iz rijeke Dnjestar (Ukrajina; Falfushynska i sur., 2009). Međutim, one su bile nešto niže u usporedbi s vrstom *A. anatina* iz istog riječnog sliva (Dnjestar), za koju su Falfushynska i suradnici (2014) izvijestili o dvostruko većim koncentracijama Cd čak i na šumskom lokalitetu koji je označen kao referentna postaja.

U usporedbi s ostalim vrstama školjkaša uzorkovanih na postajama izloženim različitim vrstama onečišćenja, koncentracije Cu i Zn u *U. crassus* bile su niže, i to do redom 15, odnosno 13 puta. Jedina iznimka bila je gotovo dvostruko veća koncentracija Cu u *U. crassus* na KIZ

postoji u odnosu na *U. tumidus* (Ukrajina; Khoma, 2019). Potrebno je naglasiti kako se bioakumulacija pojedinih elemenata može razlikovati i među blisko srodnim vrstama školjkaša, tj. vrstama unutar iste porodice, što ovisi o brzini rasta, prehranbenim navikama i drugim biološkim čimbenicima svojstvenim pojedinoj vrsti (Pourang i sur., 2010). Stoga se uočene razlike u bioakumuliranim razinama metal(oid)a između vrste *U. crassus* i ostalih vrsta školjkaša iz porodice Unionidae mogu smatrati posljedicom kombiniranog učinka izloženosti metal(oid)ima i biološke raznolikosti, što dodatno naglašava važnost određivanja referentnih vrijednosti za svaku bioindikatorsku vrstu.

Ipak, na temelju dobivenih podataka i usporedbi s prethodno objavljenim istraživanjima o prisutnosti metal(oid)a u probavnoj žlijezdi slatkovodnih školjkaša, može se zaključiti da je kronična izloženost određenim metalnim onečišćivačima na istraživanim postajama u rijeci Mrežnici dovela do povećane bioakumulacije u probavnoj žlijezdi *U. crassus*, koja posljedično može imati negativan utjecaj na slatkovodni ekosustav.

5.2.2. Sezonske razlike u ukupnim koncentracijama metal(oid)a

Različiti biotski i abiotski čimbenici (reproduktivni ciklus, metabolizam, temperatura okoliša, količina otopljenog kisika u vodi itd.) mogu utjecati na fiziološke potrebe i dostupnost metala u okolišu, što može dovesti do sezonskih razlika u koncentracijama metala u organizmima školjkaša neovisno o stupnju onečišćenja vodenog sustava (Erk i sur., 2018; Ravera i sur., 2007; Regoli i Orlando, 1994). Rezultati ovog istraživanja, temeljeni na podacima o ukupnim koncentracijama metala prikupljenih tijekom tri sezone uzorkovanja ukazuju na izraženu sezonalnost ukupnih koncentracija metala(loida) u probavnoj žlijezdi školjkaša *U. crassus*.

Općenito, veće koncentracije elemenata zabilježene su tijekom jeseni u usporedbi s proljećem i ljetom. Ovi rezultati su u skladu s istraživanjem Ravera i sur. (2007), koji su također zabilježili sličan sezonski obrazac akumulacije metala u ljušturama i cijelom tkivu kod dvije populacije vrste *U. pictorum mancus*. Objašnjenje za općenito veću bioakumulaciju elemenata tijekom jeseni moglo bi se pronaći u reproduktivnom ciklusu i/ili obrascima hranjenja (Almeshal i sur., 2022). Reproductivna sezona školjkaša iz roda *Unio* relativno je kratka, traje od travnja do sredine kolovoza, kada se glohidije ispuštaju odmah nakon sazrijevanja (Hochwald, 2001). Studije na morskim školjkašima, *M. edulis* (Regoli i Orlando, 1994) i *M. galloprovincialis* (Raspor i sur., 2004), pokazale su pad koncentracija metala u probavnoj žlijezdi tijekom gametogeneze. Vjerojatni uzrok toga je invazija gonadalnog tkiva u probavnu žlijezdu tijekom sezone razmnožavanja. Stoga razvoj gonada biološki razrjeđuje ukupne koncentracije

(ne)esencijalnih elemenata tijekom toplijih godišnjih doba, čak i u onečišćenim područjima (Ivanković i sur., 2005). Ove sezonske varijacije u ukupnim koncentracijama metala trebalo bi uzeti u obzir prilikom procjene stupnja onečišćenja ispitivanog područja. Nažalost, promjene u ukupnim koncentracijama (ne)esencijalnih elemenata tijekom sezone mriješćenja nije lako predvidjeti jer se mriješćenje kod vrste *U. crassus* odvija neusklađeno i više puta tijekom reproduktivne sezone (Hochwald, 2001). Osim toga, tijekom reproduktivne sezone dolazi do degeneracije strukture probavnih tubula i povećane autofagije (Regoli i Orlando, 1994). Sve to može značajno utjecati na ukupne koncentracije metala(loida) u probavnoj žlijezdi vrste *U. crassus*.

Osim bioloških čimbenika, i sezonske promjene u dostupnosti hranjivih tvari mogu utjecati na koncentracije elemenata. Niže razine hranjivih tvari u jesenskom razdoblju u rijeci Mrežnici (Dragun i sur., 2022a) također mogu utjecati na sastav probavne žlijezde. Naime, niža opskrba hranom vjerojatno potiče mobilizaciju energetske rezervi pohranjenih u probavnoj žlijezdi, koje se onda koriste se za metaboličke potrebe organizma (Saout i sur., 1999). Stoga, čak i ako je sadržaj (ne)esencijalnih elemenata nepromijenjen, veće oslobađanje energije iz probavne žlijezde (Paulet i sur., 2006; Ravera i sur., 2007) može rezultirati prividnim povećanjem ukupne koncentracije elemenata.

Na temelju dobivenih podataka i informacija o sezonskim varijacijama kod drugih vrsta školjkaša može se zaključiti da za ispravnu interpretaciju analitičkih vrijednosti treba uzeti u obzir kombinirani učinak fizičkog okoliša i biološkog stanja organizma. Međutim, iako su sezonske varijacije u akumulaciji za većinu metal(oida) bile jasno izražene, one nisu prikrile jasno uočene razlike u akumulaciji metal(oida) između dviju lokacija uzorkovanja.

5.2.3. Koncentracije metal(oid)a u topljivoj, citosolskoj frakciji, tkiva probavne žlijezde: procjena zastupljenosti u ukupnom tkivnom metalu

Campbell i suradnici (2005) uočili su postupno povećanje koncentracija metala u topljivoj frakciji tkiva slatkovodnih školjkaša s porastom razine metala u okolišu. U skladu s time, u ovom je istraživanju procijenjen udio svakog pojedinog elementa u topljivoj frakciji tkiva probavne žlijezde vrste *U. crassus*, na temelju omjera između citosolskih i ukupnih koncentracija metal(oid)a, zasebno za lokacije REF i KIZ.

Slično opažanjima Campbella i suradnika (2005), i u ovom istraživanju osam neesencijalnih elemenata (Ag, Al, As, Cr, Cs, Ni, Sb i U) bilo zastupljenije u topljivoj frakciji probavne žlijezde školjkaša s većim opterećenjem metal(oid)ima, odnosno kod jedinki s KIZ lokacije.

Visoka zastupljenost metal(oid)a u topljivoj frakciji tkiva može predstavljati potencijal za toksične učinke, jer su ti elementi dostupniji za sudjelovanje u raznim metaboličkim reakcijama..

U ovom istraživanju, Cd je bio gotovo potpuno prisutan u topljivoj, citosolskoj frakciji probavne žlijezde ($\geq 93\%$) vrste *U. crassus* na obje postaje – REF i KIZ. Kadmij je poznat kao snažan induktor sinteze MT, proteina važnih za regulaciju i detoksikaciju nekoliko (ne)esencijalnih elemenata (Amiard i sur., 2006), što u određenoj mjeri smanjuje mogućnost toksičnosti Cd povezanu s njegovom visokom prisutnošću u citosolu tkiva. Brojna istraživanja (Falfushynska i sur., 2009, 2013, 2014; Khoma, 2019) na slatkovodnim školjkašima pokazala su pozitivnu korelaciju između koncentracija Cd i MT u probavnoj žlijezdi. Ipak, iako se određena tolerancija na toksičnost metala povezuje s indukcijom MT (Amiard i sur., 2006), Campbell i suradnici (2005) izvijestili su da kod školjkaša iz porodice Unionidae ne postoji granična koncentracija ispod koje je Cd u potpunosti detoksificiran kod školjkaša iz porodice Unionidae. Odnosno, za određeni dio Cd očekuje se vezanje na druge citosolske komponente osim MT-a. Budući da se Cd natječe za vezna mjesta na važnim citosolskim biomolekulama s nekoliko esencijalnih elemenata (npr. Ca, Cu, Zn), pretjerana akumulacija ovog neesencijalnog elementa može izazvati fiziološke poremećaje i smanjiti brzinu filtracije kod slatkovodnih školjkaša (Das i Jana, 1999).

Osim Cd, četiri esencijalna elementa (K, Na, Rb i Se) također su bila gotovo u potpunosti prisutni u topljivoj, citosolskoj frakciji probavne žlijezde ($\geq 86\%$). Ovo se, s druge strane, može povezati s njihovim funkcijama unutar stanica. Na primjer, Na i K sudjeluju u neurotransmisiji i ionskoj regulaciji, kao i u aktivnosti Na/K⁺ ionskih pumpi, koje su važne za izmjenu tvari, uključujući akumulaciju ili odbacivanje određenih onečišćivala (da Silva i Williams, 2001). Poremećaj razine Na⁺ i K⁺ može uzrokovati povišena koncentracija Pb (Mosher i sur., 2012), što je razlog zašto se relativno visoka prisutnost Pb u citosolskim frakcijama probavne žlijezde vrste *U. crassus* (do 85 %) s porastom bioakumulacije može smatrati potencijalnim rizikom za zdravstveno stanje školjkaša.

Suprotno prethodno spomenutim elementima, nekoliko je metala bilo prisutno u citosolu probavne žlijezde *U. crassus* u vrlo malim postocima. Udio Ca, kao esencijalnog elementa, u citosolskoj frakciji bio je niži od 5 %, što je u skladu s njegovom dominantnom funkcijom u formiranju ljuštire školjkaša (Mosher i sur., 2012). Sličan obrazac zabilježen je i za dva esencijalna elementa (Fe i Mn) te za četiri neesencijalna elementa (Al, Ba, Cr i Sr) (< 5% u citosolu), koji su bili gotovo u potpunosti prisutni u netopljivoj frakciji probavne žlijezde *U. crassus*. Nadalje, pozitivna korelacija između koncentracija Ca u tkivu i razine elemenata

zemnoalkalijskih metala (npr. Ba, Sr) ranije je zabilježena kod dviju vrsta slatkovodnih školjkaša, što ukazuje na to da se ovi metali metabolički reguliraju na sličan način kao Ca (Jeffree i sur., 1993).

Također, u probavnoj žlijezdi školjkaša identificirane su različite vrste inkluzija i lizosomalnih granula. Jedna od inkluzija je Ca/Mg karbonatna inkluzija, za koju se smatra da je odgovorna za metabolizam Ca i vezanje brojnih prijelaznih metala, čime se organizam štiti od toksičnosti metala (Langston i sur., 1998). Iako školjkaši imaju mehanizme zaštite od toksičnosti metala, izloženost prekomjernim koncentracijama metala može dovesti do vezanja metala za funkcionalno važne i osjetljive molekule (enzime, DNA i RNA), što može potencijalno poremetiti njihove funkcije.

Ovi rezultati pokazuju da se pri povišenom okolišnom onečišćenju metal(oid)ima povećava udio neesencijalnih elemenata u topljivoj, citosolskoj frakciji, što može predstavljati problem. Stoga visoka prisutnost neesencijalnih elemenata poput Ag, Cd, Pb, Sb i U u topljivim frakcijama može negativno utjecati na fiziologiju školjkaša i potencijalno poremetiti stanične obrambene mehanizme i homeostazu.

5.2. Biomarkerski odgovori

Kako bismo procijenili biološke odgovore i otkrili potencijalne štetne učinke onečišćujućih tvari na slatkovodnog školjkaša *U. crassus* koji se nalazi u dijelu rijeke Mrežnice povijesno izloženom različitim zagađivalima iz različitih antropogenih izvora, ponajprije industrijskih, primijenili smo tzv. *multiple biomarker* pristup. Ovaj pristup uključivao je analizu grupe subcelularnih molekularnih/biokemijskih biomarkera koji mogu ukazivati na najranije poremećaje stanične homeostaze. Prema našim saznanjima, ovdje prikazani rezultati predstavljaju prve podatke o koncentracijama/aktivnostima sedam biomarkera u probavnoj žlijezdi vrste *U. crassus* izloženoj onečišćenju u stvarnim uvjetima okoliša, kao i prve podatke uopće za MT, AChE i CAT u ovoj vrsti. Jedini ranije dostupni podaci za preostala četiri biomarkera (MDA, GSH, GST i TP) u probavnoj žlijezdi *U. crassus* odnose se na laboratorijske eksperimente u kojima su školjkaši bili izloženi Zn/Cu piritionu (MDA, GSH i TP; Třešňáková i sur., 2020) ili nano-CeO₂ (GSH, GST, TP; Türkmen i sur., 2024).

5.2.1. Promjene biomarkera izloženosti metalima (MT) i općeg stresa (TP)

Slično ovim rezultatima, nedostatak razlike u koncentracijama MT-a između postaja s različitim razinama onečišćenja zabilježen je i u probavnoj žlijezdi školjkaša *A. anatina* (Falfushynska i sur., 2014). Unatoč činjenici da se indukcija MT-a smatra biomarkerom izloženosti metalima (Amiard i sur., 2006), brojna istraživanja MT-a u školjkašima koji se nalaze na kronično onečišćenim područjima pokazala su kako njihove koncentracije ne odgovaraju povišenim razinama metala u okolišu (Ivanković i sur., 2005).

No, iako statistički značajne razlike u koncentracijama MT-a između postaja nisu utvrđene, u lipnju 2021. koncentracije MT-a u probavnoj žlijezdi *U. crassus* na REF postaji bile su približno 15 % veće nego na KIZ postaji, istodobno s približno deset puta višim koncentracijama bioakumuliranog Cd u citosolu probavne žlijezde istih školjkaša. Nekoliko je istraživanja pokazalo kako je Cd dobar induktor sinteze MT-a u različitim vrstama školjkaša, uključujući i slatkovodne vrste (Falfushynska i sur., 2014; Ivanković i sur., 2010), a rezultati ovog istraživanja također sugeriraju da određene razine Cd mogu predstavljati potencijalni okidač za sintezu MT-a u probavnoj žlijezdi vrste *U. crassus*.

Međutim, izostanak značajnih razlika u koncentracijama MT-a između postaja mogao bi biti posljedica povećane bioakumulacije nekoliko drugih poznatih ili potencijalnih induktora MT-a zabilježenih u citosolu probavne žlijezde istih školjkaša na KIZ postaji tijekom proljeća (Bi, Pb, Cu). Njihova povećana bioakumulacija mogla je uzrokovati i određeno povećanje MT-a na toj postaji, čime se razlika između postaja ublažila. Za razliku od Cd, potencijal nekih od tih elemenata da induciraju sintezu MT-a i dalje je upitan, kao npr. za Pb (Amiard i sur., 2006), iako je za neke (npr. Ag, Cu) dokazano da se vežu za MT-e (Dragun i sur., 2024). Bez obzira na to, Cu, čije su razine u školjkašima s KIZ postaje bile povišene u oba uzorkovanja (otprilike dvostruko više), pokazao se kao slab induktor sinteze MT-a u mnogim vrstama školjkaša, bilo pri visokoj kratkotrajnoj izloženosti (Ivanković i sur., 2010) ili umjerenoj dugotrajnoj izloženosti (Lecoeur i sur., 2004). Ovi rezultati stoga također podupiru pretpostavku o vjerojatno manjem potencijalu Cu za indukciju sinteze MT-a u usporedbi s Cd, barem pri razinama Cu izmjeranima u ovom istraživanju.

Tijekom jeseni sadržaj MT-a bio je blago povećan ($p > 0,05$) u probavnoj žlijezdi školjkaša s KIZ postaje, što se dogodilo istodobno sa smanjenjem bioakumulacije Cd u istim školjkašima s REF postaje u odnosu na proljeće (razlika između postaja se višestruko smanjila), te s povećanjem bioakumulacije Ag, Bi i Pb u školjkašima na KIZ postaji. Ublažavanje razlike u

razini MT-a između dviju postaja, pa čak i promjena smjera te razlike, mogle bi se stoga barem djelomično pripisati promjeni dinamike bioakumulacije metala.

S druge strane, metali vjerojatno nisu jedini pokretači sinteze MT-a, već na njihovu indukciju mogu utjecati i drugi, nemetalni onečišćivači. Budući da je onečišćenje na KIZ postaji, ne samo metalima već i raznim organskim tvarima, bilo izraženije u usporedbi s REF lokacijom (Dragun i sur., 2022a; Stipaničev i sur., 2023; Prilog 7), te s obzirom na činjenicu da organski tvari mogu djelovati kao induktori sinteze MT-a u školjkašima (Viarengo i sur., 1999), blago povećan sadržaj MT-a u probavnoj žlijezdi školjkaša s KIZ postaje u jesenskom razdoblju mogao je, barem djelomično, biti posljedica dodatnog utjecaja organskih tvari s prooksidativnim djelovanjem na toj postaji.

Općenito, proteini odgovaraju na promjene u okolišu i stres omogućujući odvijanje metaboličkih procesa i biokemijskih reakcija, čime ublažavaju negativne učinke (Mijošek i sur., 2019). U ovom istraživanju, iako nisu utvrđene statistički značajne razlike u sadržaju TP-a između REF i KIZ postaje ni u jednom razdoblju, prosječne koncentracije TP-a uvijek su bile blago niže na KIZ postaji. Visoki stres uzrokovan onečišćenjem može potisnuti sintezu proteina, narušavajući normalni metabolizam (Mijošek i sur., 2019).

U povijesno onečišćenom dijelu rijeke Mrežnice, stres od onečišćenja mogao je, između ostalog, biti uzrokovan povećanom akumulacijom nekoliko neesencijalnih elemenata u probavnoj žlijezdi *U. crassus* u oba razdoblja uzorkovanja (Ag, Bi, Cu, Cs, Pb, Sb, Tl, U). Iako su neki metali važni za različite biokemijske i fiziološke procese u organizmu, svi oni — a osobito neesencijalni — mogu izazvati štetne učinke ako su prisutni u određenim koncentracijama (Falfushynska i sur., 2014; Mijošek i sur., 2019; Yoloğlu i sur., 2018).

Nadalje, probavna žlijezda ima ključnu ulogu u metabolizmu i detoksikaciji metal(oid)a, što rezultira povećanom potrebom za proteinima kako bi se zadovoljile energetske potrebe. Ova potreba za proteinima i posljedično njihova povećana razgradnja može poslužiti kao vrijedan pokazatelj razine toksičnih učinaka (Radwan i sur., 2018). Međutim, povećana izloženost organskim tvarima (pesticidima i lijekovima), koji su u godini uzorkovanja školjkaša detektirani u većim koncentracijama na KIZ postaji u usporedbi s REF (Dragun i sur., 2022a; Stipaničev i sur., 2023), također je mogla pridonijeti općem stresu ispitanih školjkaša.

5.2.2. Promjene biomarkera antioksidacijskog kapaciteta (katalaza, CAT; glutation, GSH), detoksikacije ksenobiotika (glutation-S-transferaza, GST) i oksidativnog oštećenja (malondialdehid, MDA)

Stvaranje ROS-a sastavni je dio staničnog metabolizma, zbog čega su potrebni mehanizmi antioksidacijske obrane kako bi se ublažili njihovi štetni učinci (Leonard i sur., 2004). Međutim, različiti (ne)esencijalni elementi i organski onečišćivači također mogu djelovati kao prooksidansi u organizmu školjkaša (Paçal i sur., 2022). Sukladno tome, i anorganske i organske tvari mogu prodrijeti kroz lipidnu membranu stanice, poremetiti strukturu fosfolipida i promijeniti fluidnost membrane, što posljedično povećava LPO i dovodi do povećane koncentracije MDA.

U sedimentima rijeke Mrežnice na KIZ lokaciji u oba su godišnja doba pronađene veće koncentracije mnogih metala u odnosu na REF lokaciju (npr. Cr, Cs, Cu, Fe, Pb, Rb, U i V). U vodi su farmaceutici detektirani u obje sezone (ukupne koncentracije prikazane su u Prilogu 7), pri čemu su spojevi poput desvenlafaksina (94 ng L^{-1}), ibuprofena (109 ng L^{-1}), paracetamola (34 ng L^{-1}), amfetamina (5 ng L^{-1}) i kofeina (100 ng L^{-1}) u proljeće pronađeni isključivo na KIZ lokaciji. Pesticidi su, za razliku od farmaceutika, uglavnom bili prisutni u vodi u oba razdoblja uzorkovanja. Primjerice, koncentracije nikotina iznosile su od 198 (proljeće) do 347 ng L^{-1} (jesen) na REF lokaciji te od 309 ng L^{-1} (proljeće) do 578 ng L^{-1} (jesen) na KIZ lokaciji. Terbutrin je, naprotiv, detektiran samo na KIZ lokaciji u proljeće (104 ng L^{-1}) (Dragun i sur., 2022a; Stipaničev i sur., 2023). Kombinacija svih ovih faktora (povišenih koncentracija metala, farmaceutika i pesticida) vjerojatno je doprinijela povećanom stvaranju ROS-a, što je dodatno pogoršalo stanje oksidacijskog stresa (OS) u ispitivanim školjkašima.

Razlika između lokacija u onečišćenju vode farmaceuticima bila je osobito izražena u proljeće, s ukupnom koncentracijom lijekova 40 puta većom na KIZ lokaciji (Stipaničev i sur., 2023). Nadalje, kao što je već prethodno prikazano, povećana bioakumulacija mnogih od ispitivanih metala (Ag, Al, Bi, Cs, Cu, Mo, Pb, Sb, V, Tl i U) zabilježena je u probavnoj žlijezdi istih jedinki školjkaša vrste *U. crassus* na KIZ lokaciji u oba razdoblja, a ti metali uključuju i one s visokim oksidacijskim potencijalom, poput Cu, Pb i V (Leonard i sur., 2004).

Zbog svega navedenog, za procjenu mogućih učinaka kombiniranog izlaganja anorganskim i organskim tvarima na antioksidacijsku obranu i oksidativna oštećenja u divljim školjkašima vrste *U. crassus* s dviju lokacija na rijeci Mrežnici. primijenjena su četiri biomarkera oksidacijskog stresa (CAT, GSH, GST, MDA).

5.2.2.1. Aktivnost CAT: biomarker antioksidacijskog kapaciteta

U ovom istraživanju, statistički značajne prostorne razlike zabilježene su u oba razdoblja, s povećanom enzimskom aktivnošću u probavnoj žlijezdi školjkaša s KIZ postaje. Povišene aktivnosti CAT također su uočene kod slatkovodnih školjkaša vrsta *D. polymorpha* i *D. bugensis* izloženih Cr i Ni (Potet i sur., 2016). Rano aktiviranje CAT moglo bi ukazivati na to da je ovaj enzim prva linija obrane protiv oksidacijskog stresa izazvanog i anorganskim i organskim onečišćivačima.

5.2.2.2. Koncentracija GSH: biomarker antioksidacijskog kapaciteta

GSH, kao najvažniji stanični tiol, ima ključnu ulogu u zaštiti stanica od toksičnosti metala putem stvaranja kompleksa s nekim metalnim ionima (kao što su Cd, Cu i Pb), koji zbog svojih kemijskih svojstava imaju sklonost formiranju kovalentnih veza sa sulfhidrilnim skupinama proteina i peptida (Ercal i sur., 2001). Zbog toga se porast razine GSH ponekad opaža u vodenim organizmima kao posljedica izloženosti metalima, što su primjerice zabilježili Machado i suradnici (2014) kod slatkovodnog školjkaša *Lasmigona costata*. Osim toga, pretpostavlja se da GSH sudjeluje u reakcijama konjugacije s različitim pesticidima, te su tako povećane razine GSH uočene i u probavnoj žlijezdi vrste *U. tumidus* na postaji s povećanim koncentracijama policikličkih aromatskih ugljikovodika, polikloriranih bifenila i organoklornih pesticida u sedimentu (Cossu i sur., 2000).

Suprotno tome, smatra se da se sadržaj GSH u organizmima smanjuje pod djelovanjem povećanog OS što se povezuje s njegovom antioksidacijskom funkcijom, odnosno trošenjem u neutralizaciji radikala i drugih reaktivnih spojeva (Ercal i sur., 2001). Stoga smanjenje koncentracije GSH u probavnoj žlijezdi školjkaša koji žive na povijesno onečišćenoj lokaciji (KIZ) ukazuje na pojavu OS u tim organizmima, uzrokovanog metalima i/ili organskim tvarima na toj lokaciji (Dragun i sur., 2022a; Stipaničev i sur., 2023). Dobiveni rezultati su u skladu s rezultatima više studija koje su pokazale smanjenje GSH kod školjkaša kronično izloženih povećanim koncentracijama prooksidativnih tvari, kako organskih tako i anorganskih. Leonard i suradnici (2004) izvijestili su kako prooksidativni metali poput Cu i Pb, čije su povišene koncentracije također detektirane u probavnoj žlijezdi *U. crassus* s KIZ lokacije, mogu biti povezani sa smanjenjem koncentracija GSH, dok su Doyotte i sur. (1997) zabilježili isti učinak kod vrste *U. tumidus* izložene organokloriranim pesticidima.

U konačnici, postoje uvjerljivi dokazi kako su razine GSH značajno smanjene pod utjecajem metalnih i organskih tvari, te da odgovor ovog antioksidansa može varirati ovisno o vrsti

onečišćivača, trajanju izloženosti, koncentraciji kontaminanta, izloženom organu te individualnoj fiziologiji određene životinjske vrste.

5.2.2.3. Aktivnost GST: biomarker detoksikacije ksenobiotika

Iako metal(oid)i nisu prirodni supstrati za GST, nekoliko je studija pokazalo da kod školjkaša koji su izloženi metalima, bilo u laboratorijskim ili okolišnim uvjetima, može doći do pojačane aktivnosti GST, ponekad praćene padom razine GSH (Vidal–Liñán i sur., 2014). Stoga bi povećana aktivnost GST u probavnoj žlijezdi *U. crassus* na KIZ lokaciji mogla predstavljati mehanizam detoksikacije metala, što bi u konačnici moglo dovesti do smanjenja koncentracija GSH.

Međutim, GST primarno sudjeluje u konjugaciji GSH s organskim tvarima (npr. pesticidima), stvarajući manje reaktivne i polarne glutation S–konjugate (Gonçalves i sur., 2021). Istraživanje na školjkašu *U. tigridis* izloženom pesticidu klorpirifosu pokazalo je progresivno povećanje aktivnosti GST s porastom koncentracije i trajanjem izloženosti (Hanna i Shekha, 2023). S obzirom da su na KIZ lokaciji na rijeci Mrežnici utvrđene više koncentracije pesticida u vodi nego na REF lokaciji (Dragun i sur., 2022a), povećana aktivnost GST u probavnoj žlijezdi *U. crassus* s ove lokacije nije iznenađujuća.

5.2.2.4. Koncentracija MDA: biomarker oksidativnog oštećenja

U ovom istraživanju, prostorne razlike u koncentracijama MDA bile su statistički značajne u proljeće, pri čemu su prosječne vrijednosti na KIZ lokaciji bile približno 23 % više nego na REF lokaciji. Povećanje koncentracija MDA u kontekstu onečišćenja različitim metal(oid)ima ranije je zabilježeno u probavnoj žlijezdi slatkovodnih školjkaša vrste *U. mancus* (Paçal i sur., 2022), *U. tumidus* (Cossu i sur., 2000) i *U. crassus* (Třešňáková i sur., 2020). S druge strane, laboratorijska istraživanja pokazala su da izloženost organokloriranim i organofosforim pesticidima također može povećati oksidacijski stres, što se očituje povećanom proizvodnjom MDA. Primjerice, Köprücü i sur. (2010) zabilježili su povišene vrijednosti MDA u probavnoj žlijezdi vrste *U. elongatulus eucirrus* nakon izloženosti cipermertrinu, dok su Khudhur i Shekha (2019) uočili značajno povećanje koncentracija/aktivnosti MDA i CAT, uz istodobno smanjenje koncentracija GSH u *U. pictorum* izloženoj 1–naftil metil–karbamatu.

Zaključno, rezultati o aktivnostima/koncentracijama CAT, GSH, GST i MDA u probavnoj žlijezdi *U. crassus* iz rijeke Mrežnice zajednički upućuju na izražene posljedice OS u

organizmima s povijesno onečišćene lokacije. Posljedice su se očitovale kroz indukciju antioksidativne obrane i sustava za detoksikaciju, ali i već prisutno oksidativno oštećenje. Iako su se prostorne razlike mogle uočiti u oba godišnja doba, rezultati za GSH i MDA ukazali su na izraženije razlike među lokacijama u proljeće, kada su i razlike u kontaminaciji lijekovima između lokacija bile višestruko veće (Stipaničev i sur., 2023). Ovakve brze promjene u odgovorima biomarkera OS u probavnoj žlijezdi *U. crassus* ukazuju na njihovu osjetljivost na promjene razina onečišćenja prooksidativnim metalima i/ili organskim spojevima, i potvrđuju da ovi biomarkeri mogu predstavljati pouzdanu komponentu u istraživanjima za procjenu onečišćenja voda.

5.2.3. Promjene biomarkera neurotoksičnosti (AChE)

Jedan od enzima koji je posebno osjetljiv na organska onečišćenja je AChE. On je uglavnom prisutan u postsinaptičkim neuronima i važan je za hidrolizu neurotransmitera acetilkolina, čime prekida živčani impuls i omogućuje stanici da se vrati u stanje mirovanja (Bainy i sur., 2006). Neki organski spojevi, poput organofosfornih pesticida i karbamata, poznati su po tome što se vežu na aktivno mjesto AChE i inhibiraju njegovu aktivnost, što potencijalno može dovesti do promjena u ponašanju, paralize, pa čak i smrti (Gonçalves i sur., 2021).

U proljetnom razdoblju, aktivnost AChE u probavnoj žlijezdi *U. crassus* bila je značajno viša na KIZ lokaciji u usporedbi s REF lokacijom. Kaizer i suradnici (2005) su predložili kako povećana aktivnost AChE može biti posljedica pojačane LPO, koja može utjecati na integritet i funkcionalnost kolinergičkog sustava. U proljetnom razdoblju, koncentracije lijekova, uključujući nesteroidni protuupalni lijek ibuprofen, zabilježene su u znatno većim koncentracijama na KIZ lokaciji (ibuprofen: 109 ng L^{-1}) nego na REF lokaciji, gdje ibuprofen nije niti detektiran (Stipaničev i sur., 2023). Budući da je ibuprofen (pri koncentraciji od $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) uzrokovao značajna oksidativna oštećenja u slatkovodnom školjkašu *D. polymorpha* (André i Gagné, 2017), indukcija AChE u ovom razdoblju u probavnoj žlijezdi *U. crassus* mogla bi biti posljedica LPO potaknute lijekovima i povećanih koncentracija MDA.

S druge strane, u jesenskom razdoblju zabilježeno je smanjenje aktivnosti AChE na KIZ lokaciji. Takvi rezultati nisu iznenađujući, budući da se inhibicija AChE često koristi kao pokazatelj neurotoksičnosti uzrokovane prisutnošću organofosfornih i karbamatnih pesticida u okolišu (Bainy i sur., 2006). Sličan učinak zabilježen je kod školjkaša *U. tigridis* nakon izloženosti različitim koncentracijama klorpirifosa, uobičajenog sastojka organofosfornih pesticida, pri čemu je aktivnost značajno opadala s porastom doze i duljinom trajanja izloženosti

(Hanna i Shekha, 2023). Osim toga, mehanizam djelovanja nekih farmaceutskih spojeva poput anksiolitika/antidepresiva uključuje inhibiciju određenih neurotransmitera te bi njihova prisutnost u vodi mogla doprinijeti smanjenju aktivnosti ovog enzima. Nedavna istraživanja su pokazala kako AChE može biti inhibirana ne samo organskim spojevima već i teškim metalima (Georgieva i sur., 2022; Yoloğlu i sur., 2018). Različiti metal(oid)i mogu potencijalno interferirati s acetilkolinskim receptorem i smanjiti učinkovitost vezanja AChE, što dovodi do inhibicije njegove aktivnosti (Bainy i sur., 2006). U skladu s time, Georgieva i sur. (2022) su zabilježili smanjenje aktivnosti AChE kod školjkaša *Sinanodonta woodiana*, izloženih raznim okolišnim onečišćivačima, uključujući metale i metaloide.

U oba godišnja doba KIZ lokacija pokazala je veće opterećenje i anorganskim i organskim onečišćivačima u vodi u odnosu na REF lokaciju, uključujući prisutnost farmaceutika s neuroaktivnim učinkom (anksiolitika, antidepresiva), te insekticida poput nikotina, poznatog inhibitora aktivnosti AChE (Chang i Taylor, 1973). Koncentracije nikotina bile su više u jesenskom (REF: 347 ng L⁻¹; KIZ: 578 ng L⁻¹) nego u proljetnom razdoblju (REF: 198 ng L⁻¹; KIZ: 309 ng L⁻¹) (Dragun i sur., 2022a; Stipaničev i sur., 2023). Istodobno je u probavnoj žlijezdi školjkaša *U. crassus* s KIZ lokacije zabilježena izraženija bioakumulacija više metal(oid)a (Ag, Bi, Cs, Pb, Sb, Tl, U), osobito u jesenskom razdoblju. Stoga se može pretpostaviti da je sinergističko djelovanje ovih anorganskih i organskih tvari moglo dovesti do blage inhibicije AChE aktivnosti na KIZ lokaciji u listopadu 2021. U cjelini, dobiveni rezultati dodatno potvrđuju da AChE predstavlja vrijedan integrativni biomarker za procjenu neurotoksičnosti, demonstrirajući njegovu primjenjivost u prepoznavanju učinaka složenih mješavina onečišćivala.

5.2.4. Sezona kao zajednički čimbenik koji utječe na odgovore biomarkera

Sezonske razlike u karakteristikama lokacija, uključujući abiotičke čimbenike poput temperature i razine kisika, posljedične promjene u bioraspoloživosti metala i drugih tvari te biotičke čimbenike poput godišnjeg rasta, aktivnosti hranjenja i reproduktivnog ciklusa školjkaša, mogu pridonijeti u odgovorima biomarkera (Ivanković i sur., 2005; Yoloğlu i sur., 2018). Varijacije temperature i dostupnosti hrane duž riječnog režima također mogu značajno utjecati na biologiju školjkaša (Regoli i sur., 2014; Yoloğlu i sur., 2018).

Rezultati ovog istraživanja, prikupljeni tijekom dvije sezone uzorkovanja provedene u različitim dijelovima godine (kasno proljeće – početak lipnja 2021.; i rana jesen – početak listopada 2021.), ukazali su na značajne sezonske razlike u biomarkerskim odgovorima u

probavnoj žlijezdi *U. crassus*. To je bilo osobito izraženo kod MT i MDA, s višim koncentracijama u proljeće, dok su CAT, GSH i GST pokazali više aktivnosti/koncentracije u jesen. TP-i nisu pokazali značajnu sezonsku varijabilnost, dok su varijacije u aktivnosti AChE odražavale sezonske promjene u okolišnoj izloženosti anorganskim i organskim onečišćivalima.

Jedan od čimbenika koji je mogao uzrokovati veće koncentracije MT i MDA u kasno proljeće vjerojatno je viša temperatura vode u lipnju u odnosu na listopad. Nekoliko studija pokazalo je da viša temperatura vode dovodi do povećanih koncentracija MT i MDA kod školjakaša (Yoloğlu i sur., 2018). Osim toga, poznati induktor MT-a, neesencijalni element Cd, bio je akumuliran u većim koncentracijama u probavnoj žlijezdi *U. crassus* u proljeće na obje lokacije, što također može objasniti veće proljetne koncentracije MT-a. Također, nekoliko autora istaknulo je kako koncentracije ova dva biomarkera mogu biti pod utjecajem čimbenika poput organske tvari, nutrijenata, cvjetanja fitoplanktona i aktivnosti hranjenja (Ivanković i sur., 2005). Očekivano, u proljeće 2021. godine na rijeci Mrežnici zabilježene su više razine nutrijenata nego u jesen (npr. nitrati, ukupni fosfor; Dragun i sur., 2022a), što je vjerojatno dovelo do intenzivnije aktivnosti hranjenja kod školjakaša, a posljedično i do povećanog metabolizma te viših razina MDA i MT u probavnoj žlijezdi *U. crassus*. Ipak, treba naglasiti kako se *U. crassus* razmnožava tijekom proljetnih i ljetnih mjeSEi (Selak, 2016), što je potvrđeno i u ovom istraživanju prisutnošću glohidija (neobjavljeni rezultati). Stoga bi povećane koncentracije MT-a mogle također odražavati i povećanu sintezu MT-a tijekom razvoja glohidija.

Biomarkeri karakteristični za OS (CAT, GSH i GST) imali su povećane koncentracije/aktivnosti u jesenskom razdoblju. Ovi rezultati suprotni su od ranijih istraživanja koji su bilježili višu aktivnost i koncentracije ovih biomarkera u proljeće, što se objašnjava razvojem gonada i višim temperaturama koje doprinose većoj osjetljivosti na OS (Viarengo i sur., 1999; Yoloğlu i sur., 2018). Međutim, u ovom radu su zabilježene povećane citosolske koncentracije nekoliko neesencijalnih metala u probavnoj žlijezdi tijekom jesenske sezone uzorkovanja u usporedbi s proljetnom na obje lokacije (Ag, Cs). Osim toga, koncentracije insekticida (npr. nikotina) u vodi rijeke Mrežnice bile su također više u jesen nego u proljeće na obje lokacije (Dragun i sur., 2022a). Kombinacija povećane izloženosti metalima i organskim onečišćivalima mogla je dodatno inducirati aktivaciju antioksidativnih mehanizama u probavnoj žlijezdi *U. crassus* u jesenskom razdoblju. Budući da sposobnost prilagodbe ili zasićenja antioksidativne obrane ovisi o intenzitetu i varijabilnosti okolišnih čimbenika (Regoli i sur., 2014), prethodno spomenuta sezonska varijabilnost u razinama onečišćenja može

poslužiti kao objašnjenje za porast aktivnosti/koncentracija biomarkera OS-a u jesenskom razdoblju.

Dodatno, uočene sezonske varijacije naglašavaju važnost određivanja vrijednosti biomarkera u različitim godišnjim dobima, što predstavlja važan preduvjet za točniju interpretaciju bioloških odgovora i postizanje pouzdanije procjene posljedica okolišnog onečišćenja.

5.3. Karakterizacija citosolskih biomolekula koje vežu metal(oid)e (MBB) u probavnoj žlijezdi školjkaša U. crassus

Langston i sur. (2002) izvijestili su da povišene razine esencijalnih i neesencijalnih elemenata u okolišu mogu dovesti do pomaka u njihovoj raspodjeli među citosolskim ligandima. Stoga je znanje o specijaciji citosolskih elemenata među različitim citosolskim ligandima kritičan čimbenik u određivanju njihove toksičnosti i bioraspoloživosti (Szpunar i Łobiński, 2002).

5.3.1. Inicijalna karakterizacija i obrasci vezanja za citosolske MBB-e pri različitim razinama izloženosti/bioakumulacije

Dva elementa u ovom istraživanju bila su pretežito eluirana s VMM biomolekulama, i to esencijalni elementi Fe i Mo. Najistaknutiji Fe pik na obje lokacije bio je Fe-VMM-2 (MM ~355–380 kDa) čije se vrijeme elucije podudaralo s vremenom elucije proteinskog standarda apoferitina. Feritin pročišćen iz visceralne mase školjkaša *Crassostrea gigas* imao je molekulsku masu od 420 kDa (Durand i sur., 2002), što se također dobro slaže s HPLC-procijenjenom molekulskom masom proteina unutar Fe-VMM-2 pika (~355 – 380 kDa). Određene razlike u MM mogu se pripisati stupnju zasićenja feritinske molekule, budući da jedna molekula može pohraniti do 4500 Fe³⁺ iona (Aisen i sur., 2001; Beard i sur., 1996). Visoka elucija Fe unutar područja vjerojatnog feritinskog pika u skladu je s različitim poznatim i pretpostavljenim funkcionalnim ulogama feritina u mekušaca, uključujući ulogu u rastu, homeostazi i detoksifikaciji teških metala, urođenom imunitetu, pohrani i oslobađanju željeza, razvoju ljuštare i toleranciji na toplinski stres (Sumithra i sur., 2021). He i sur. (2013) su utvrdili da je najviša razina feritina u slatkovodnom školjkašu *Hyriopsis schlegelii* zabilježena u probavnoj žlijezdi, gdje je feritin aktivno uključen u metabolizam željeza. Osim Fe, u svim analiziranim uzorcima u području pretpostavljenog feritinskog pika eluirali su, više ili manje izraženo, i drugi esencijalni (Co, Cu, Mn, Zn) te neesencijalni elementi (Ag, As, Pb). Budući da feritin može vezati različite metale na više strukturalih mjesta, npr. u unutrašnjoj šupljini,

blizu unutarnjih kanalskih otvora ili na vanjskoj površini (Durand i sur., 2002), njegova uloga u sekvestraciji i pohrani metala vjerojatno nije ograničena samo na željezo. Nekoliko studija potvrdilo je vezanje više metalnih iona, uključujući neke od iona vezanih u potencijalnom feritinskom piku ovog istraživanja (npr. Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+}), na unutarnjoj površini feritinske strukture (Maity i sur., 2019; Tosha i sur., 2010). Istraživanja provedena na različitim vodenim beskralješnjacima također su pokazala sposobnost feritina da, uz Fe, veže i druge metale poput Zn, Pb, Cu i Po (Durand i sur., 2002; Webb i sur., 1985). Vezanje metal(oid)a kao što su Co, Cu, Mn, Zn, Ag, As i Pb na feritin u probavnoj žlijezdi *U. crassus* može ukazivati na moguću ulogu ovog proteina u sekvestraciji navedenih metala.

Elucija Mo u VNMM području, koja je ranije zabilježena u višim organizmima (npr. ribljim vrstama poput europskog i vardarskog klana (*Squalius cephalus* i *Squalius vardarensis*; Krasnići i sur., 2018, 2013), potočne pastrve (*Salmo trutta*; Dragun i sur., 2018), šarana (*Carassius gibelio*; Dragun i sur., 2020) i štuke (*Esox lucius*; Dragun i sur., 2022b)), mogla bi ukazivati na vezanje Mo na metalošaperone ili neproteinske kofaktore, poput obitelji niskomolekulskih pterinskih kofaktora, Moco (Mendel, 2013). S druge strane, elucija Fe u VNMM području tijekom SE-HPLC separacije rijetko je zabilježena, a do sada je prijavljena za jetru potočne pastrve (*S. trutta*, 5 – 10 kDa; Dragun i sur., 2018), gdje je objašnjena mogućim vezanjem Fe na tzv. prijelazni niskomolekulski Fe-pool koji sudjeluje u unutarstaničnom transportu Fe (Dragun i sur., 2018; Fontecave i Pierre, 1991). Međutim, činjenica da su izračunate mase ovih liganda koji vežu Fe u probavnoj žlijezdi *U. crassus* bile niže od 500 Da upućuje na drugu mogućnost, a to je vezanje slobodnog citosolskog Fe na reduktivno sredstvo dodano uzorcima putem homogenizacijskog pufera, tj. β -merkaptometanol (78,13 g/mol).

Najizraženija povećanja intenziteta pika s citosolskim koncentracijama zabilježena su za Fe-VMM pikove i Mo-SMM pikove, što nije iznenađujuće s obzirom na značajnu ulogu koju predloženi metaloproteini (npr. feritin) i različiti enzimi mogu imati u ovoj vrsti školjkaša (Battelli i sur., 2016; Durand i sur., 2002). Također je vrijedno napomenuti da, kada se intenzitet pika Fe-VMM-2 (~350 – 380 kDa) povećao u KIZ-uzorcima (2 – 4 puta veće koncentracije Fe u odnosu na REF-uzorke), intenzitet pika Fe-VMM-1 (~560 – 615 kDa) ostao je približno isti u svim slučajevima. Postoji mogućnost da je unutar ova dva pika eluiran feritin, predstavljajući različite izoferitine. Proteinska ljuska feritina sastoji se od 24 proteinske podjedinice dviju vrsta, teške (H, ~21 kDa) i lake (L, ~19 kDa) podjedinice, a višestruki oblici feritina temelje se na omjeru dviju prisutnih podjedinica (Koorts i Viljoen, 2007). Međutim, molekulska masa feritinskih podjedinica može varirati među vrstama. Primjerice, Potrykus i Kosakowska (2009) izolirali su feritin iz mekih tkiva *M. trochus* i zabilježili prisutnost feritinskih podjedinica s

molekulskim masama od čak 26,5 do 28 kDa. Ove feritinske podjedinice obavljaju različite funkcije u procesu mineralizacije željeza. Feritini bogati H-podjedinicama olakšavaju dinamički promet željeza, dok feritini bogati L-podjedinicama primarno pohranjuju željezo i obilni su u stanicama koje skladište željezo (Koorts i Viljoen, 2007). Stoga, kako akumulacija Fe raste, čini se da raste i prisutnost feritina bogatog L-podjedinicama (za kojeg se pretpostavlja da odgovara Fe-VMM-2 pik) u probavnoj žlijezdi *U. crassus*.

Analizom elucijskih profila MBB utvrđeno je da se određeni elementi podjednako vežu na komplekse visokih i srednjih molekulskih masa. U tu skupinu spadaju esencijalni elementi Co, Mn i Zn te neesencijalni elementi Bi i Tl. Prisutnost više VMM i SMM proteina koji vežu esencijalne elemente u uzorcima školjkaša bila je očekivana, budući da su oni nužni za brojne metaboličke procese te imaju važnu ulogu kao kofaktori za niz metaloproteina i enzima u većini živih organizama. Suprotno tome, vezanje neesencijalnih elemenata Bi i Tl na proteine iz VMM i SMM raspona moglo bi upućivati na mogući toksični učinak (Hauser-Davis i sur., 2021). Iako su svi navedeni elementi pokrivali ista široka područja molekulskih masa, eluirajući unutar brojnih slabo razdvojenih pikova, neki su pikovi bili izraženiji od drugih. Tako su Zn i Tl pretežito eluirali unutar VMM pika koji je odgovarao MM od ~120 – 175 kDa. Analiza SE-ICP-MS i SDS-PAGE termostabilnih proteina u probavnim žlijezdama školjkaša *Perna perna* također je pokazala vezivanje Zn za protein u sličnom rasponu MM (Lavradas i sur., 2016). Za preostala tri elementa, tj. Co, Mn i Bi, najdominantniji pikovi pronađeni su u SMM području. Pretežiti udjeli Mn i Bi eluirali su unutar SMM pika koji je odgovarao ~55 – 75 kDa (Tablica 2) te su koeluirali s proteinskim standardom transferinom. Iako je njegova primarna uloga vezanje iona željeza (III) i njihov transport do mjesta potrebnih za metaboličke procese, transferin može biti uključen i u transport te uklanjanje drugih slobodnih ioniziranih metala (npr. Mn, Zn, V) u organizmu, čime štiti stanice od oksidativnih oštećenja (Cornelis i sur., 2005). Najistaknutiji SE-Co pik (~50 – 55 kDa) imao je isto vrijeme elucije kao proteinski standard albumina, transportnog proteina (Hauser-Davis i sur., 2021) koji može imati značajnu ulogu u homeostazi metala kod školjkaša.

Značajni udjeli Mn, Zn i Bi dodatno su eluirali unutar NMM područja. Dominantni Bi pik odgovarao je ~25 – 30 kDa, uz dodatni pik na ~15 – 17,5 kDa. Cink je također eluirao unutar pika koji se djelomično preklapao s potonjim Bi-pikom (~17,5 – 22 kDa) te u dodatnom pik) koji se preklapao s Mn (~8 – 11 kDa). Ovaj posljednji pik imao je slično vrijeme elucije kao i MT-proteinski standardi, dok se za Zn i Bi pikove u rasponu od ~15 – 22 kDa može pretpostaviti da odražavaju vezanje ovih metala na MT-dimere. MT su proteini niske molekulske mase, dobro poznati po svojoj ulozi u homeostazi esencijalnih metala (kao što su Cu i Zn), ali i u

detoksifikaciji neesencijalnih metala (kao što su Cd i Ag) (Amiard i sur., 2006). Osim dobro poznatog vezanja Ag, Cu i Cd na MT (koje smo također našli eluirane unutar potencijalnih MT-pikova u ovom istraživanju, o čemu je diskutirano u sljedećem poglavlju) česta su istraživanja i o vezanju niza drugih elemenata za MT biomolekule, uključujući Bi i Pb (Dragun i sur., 2022a; Krasnići i sur., 2013; Yang i sur., 2024). Istraživanje Sun i Szeto (2003) na Zn-MT iz jetre kunića pokazala je kako se Bi vrlo snažno veže na MT(II) te lako istiskuje ne samo Zn nego i Cd ione. S druge strane, AEX-HPLC razdvajanje citosolskih biomolekula u jetri *E. lucius* nije jasno potvrdilo Bi-MT vezu (Dragun i sur., 2024), unatoč jasnoj Bi-eluciji unutar potencijalnog MT-pika nakon SE-razdvajanja istih uzoraka (Dragun i sur., 2022a). Analize Bi-MBB niskih molekulskih masa iz bubrega štakora također su ukazale da ti proteini vjerojatno nisu identični MT-ima (Szymanska i Piotrowski, 1980). Sve to dodatno naglašava složenu dinamiku proteina koji vežu metale, poput MT-a, koji na promjene u opterećenju metalima odgovaraju prilagodbom svog afiniteta i kapaciteta vezanja.

Nadalje, Co, Zn, Bi i Tl također su eluirali unutar VNMM područja. Vezanje mnogih elemenata za biomolekule MM ispod 10 kDa moglo bi upućivati na povezanost s reduciranim glutationom (GSH, 307 Da) ili s metalošaperonima (Dragun i sur., 2020), koji sudjeluju u detoksifikaciji metala vezanjem viška metalnih iona (Lavradas i sur., 2016). Nekoliko studija pokazalo je indukciju GSH-metal kompleksa u različitim organizmima nakon izloženosti metalima, i to putem tiolnog sumporovog atoma (Guidi i sur., 2010; Pearson i Cowan, 2021). Zapravo, predloženo je kako GSH može kompleksirati s metalnim kationima i tako ih detoksificirati odmah nakon njihova ulaska u stanice (Lavradas i sur., 2016). U slučaju Co, elucija unutar VNMM područja može se dodatno povezati s kobalaminom ili vitaminom B12 (~1,3 kDa), koji je esencijalni nutrijent za mnogostanične vrste životinja. On ima ključnu ulogu u metaboličkim procesima poput sinteze DNA, metabolizma masnih kiselina i metabolizma aminokiselina, a također je uključen u pravilno funkcioniranje živčanog sustava (Vogeler i sur., 2022). Iako je njegova uloga u školjkaša još uvijek predmet rasprave, Mikkelsen i Apostolopoulos (2019) pretpostavili su kako visoke razine B12 u školjkaša mogu igrati ulogu u odgovorima na oksidativni stres smanjenjem razine homocisteina.

Na kraju, većina uočenih pikova povezanih s esencijalnim elementima imali su veće intenzitete u uzorcima s višim citosolskim koncentracijama elemenata, što je u skladu s njihovim različitim staničnim funkcijama. Međutim, činjenica da je sličan obrazac zabilježen i za Bi i Tl, osobito unutar VMM i SMM područja, ukazuje na njihov potencijalni toksični učinak kroz vezanje za ključne stanične komponente. Iako su određeni znakovi detoksifikacije za oba elementa bili vidljivi (npr. vezanje Bi i Tl za VNMM biomolekule te vjerojatno vezanje Bi za MT), njihova

sklonost premještanju prema frakcijama većih molekulskih masa pri povećanim koncentracijama u stanicama sugerira nepotpunu detoksifikaciju. Takav mehanizam ranije je ponuđen kao objašnjenje za Tl u jetri smuđa (*Perca flavescens*; Caron i sur., 2018). U slučaju Tl, toksičnost se može povezati sa zamjenom K uslijed njihove kemijske sličnosti, što može dovesti do poremećaja aktivnosti različitih enzima, primjerice aldehyd dehidrogenaze (~120 – 240 kDa) i ATP-aze (~100 – 200 kDa) u $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ izmjenjivačkoj pumpi (Kumar Jaiswal i sur., 2012). Povećano eluiranje Tl unutar VMM područja, kao posljedica njegove povećane bioakumulacije, ranije je zabilježeno u jetri nekoliko ribljih vrsta (*S. trutta*, na 140 kDa, Dragun i sur., 2018; *P. flavescens*, na ~50 – 450 kDa, Caron i sur., 2018; *E. lucius*, 170 kDa; Dragun i sur., 2025), dok su slični obrasci elucije za Bi (porast SMM pikova na ~60 – 80 kDa i VMM pikova na ~300 – 600 kDa) zabilježeni kod vrste *E. lucius* (Dragun i sur., 2022a).

U okviru ovog istraživanja, dominantno vezanje na MBB srednjih molekulskih masa zabilježeno je za esencijalni element Cu te neesencijalne elemente Ag, Cd i Pb. Standardi MT1 i MT2 također su eluirali unutar istog SMM području zajedno s Cu, Ag, Cd i Pb, što, u skladu s općim saznanjima o ovim elementima (npr. Ivanković i sur., 2005; Strižak i sur., 2014; Yang i sur., 2024), upućuje na njihvu moguću sekvencijaciju putem MT-a u probavnoj žlijezdi *U. crassus*. Iako molekulske mase MT standarda iznose oko 6 kDa, njihova vremena eluiranja na SE koloni odgovarala su gotovo dvostruko većoj masi (12 kDa), što je karakteristično odstupanje na SE-HPLC-u za ove proteine. Krasnići i sur. (2019) potvrdili su pomoću MALDI-TOF MS analize da su molekulske mase MT standarda i SE-HPLC-om odvojenih te izoliranih MT frakcija iz jetre vardarskog klena (eluiranih u području s prividnom masom od 12 kDa) bile oko 6 kDa. Nadalje, ranija istraživanja su pokazala da veličina MT-a varira među različitim vrstama, pa SE tehnika možda ne može učinkovito odvojiti sve MT izoforme niti precizno odrediti MM biomolekula (Lavradas i sur., 2016).

Bakar je pretežito eluiran unutar SMM pika koji odgovara MM od ~7,5 – 10 kDa, ali i unutar dva dodatna SMM pika (~16 – 17,5 i ~20 – 25 kDa), što potencijalno odražava nekoliko MT izoformi ili čak dimere. Kao što je ranije spomenuto, eluiranje Zn i Bi uočeno je u istom području koje se preklapa s Cu-pikovima, Zn na ~8 – 11 kDa i 17,5 – 22 kDa, a Bi na ~15 – 17,5 kDa, preklapajući se sa srednjim Cu-SMM-pikom (Prilog 8). Srebro i gotovo sav Cd, s druge strane, bili su pretežito vezani za SMM pikove u rasponu od ~16 – 19 kDa, također se preklapajući sa srednjim Cu-SMM-pikom i s Bi, što upućuje na prisutnost zasebne MT-izoforme koja veže neesencijalne metale. Slično tome, prethodna istraživanja identificirala su MT izoformu od 10 kDa (HPLC-prividna masa kao u ovom istraživanju) induciranu Cd, Zn i Cu ionima u vrsti *M. galloprovincialis* (Dondero i sur., 2005), dok je u vrstama roda *Mytilus*

Cd inducirao izoformu od 20 kDa (Ivanković i sur., 2005; Mackay i sur., 1993). Usporedba ovih rezultata s onima dobivenim za ribe primjenom SE-HPLC razdvajanja otkrila je zanimljive razlike u eluiranju metala u MT području; konkretno, kod riba se metali poznati po vezanju za MT (Cu, Zn, Cd i Ag) obično eluiraju unutar jednog preklapajućeg pika, dok se tek dodatnim HPLC razdvajanjem, primjerice primjenom AEX kolone, mogu razlikovati dvije glavne MT-izoforme (Dragun i sur., 2024, 2022a, 2020, 2018; Krasnići i sur., 2019, 2013). Za razliku od riba, rezultati za probavnu žlijezdu *U. crassus* već nakon osnovnog SE-HPLC razdvajanja jasno ukazuju na postojanje više MT-izoformi koje se razlikuju u sklonosti vezanja metala, što je u skladu s ranijim opažanjima za beskralježnjake.

Olovo se donekle razlikovalo od ostala tri neesencijalna elementa, jer je pretežito eluiralo unutar SMM pika s maksimumom na ~17,5 – 22 kDa, tj. potpuno se preklapalo s mogućom Zn-MT izoformom veće MM ili s MT-dimerom. Takav obrazac elucije sugerira da se Pb vjerojatno detoksificira posredstvom MT-a, ali mehanizmom koji se razlikuje od onog zabilježenog za Ag, Cd i Bi. To je u skladu s poznatom činjenicom da se sekvestracija Pb u stanicama odvija unutar metalom bogatih granula ili inkluzija, u čijem formiranju sudjeluje MT (Zuo i sur., 2009). Sva ova saznanja zajednički naglašavaju značaj MT-a i MT-sličnih proteina kao ključnih čimbenika u detoksikaciji i sekvestraciji metala kod *U. crassus*, čime se organizmi štite od potencijalno štetnih učinaka, ali i stvaraju rezerve esencijalnih metala. Međutim, daljnja istraživanja, koja bi uključivala primjenu naprednih tehnika masene spektrometrije, omogućila bi potpunu identifikaciju i razumijevanje funkcioniranja ovih važnih biomolekula.

Iako MT-i očito imaju glavnu ulogu u metabolizmu gore spomenutih elemenata, značajni udjeli Cu i Ag također su eluirali unutar VMM i VNMM područja, dok je Pb eluiralo i u SMM području. Bakar je esencijalni element u tragovima, nužan za niz metaboličkih procesa (npr. stanično disanje, uklanjanje slobodnih radikala superoksida; Gaetke i sur., 2014) u većini živih organizama, što objašnjava njegovo vezanje na više različitih biomolekula u ovom istraživanju. Naspuprot tome, vezanje Ag na VMM proteine pri višim razinama akumulacije, kao i prisutnost Cd i Pb u istom području je zabrinjavajuće i upućuje na moguće poremećaje u staničnim procesima. Kao što je ranije spomenuto, Ag i Pb su bili vezani za biomolekulu od ~330 – 450 kDa, koja je koeluirala s apoferitinskim standardom. Veća akumulacija metala osim Fe i njihovo moguće vezanje za feritin može dovesti do inhibicije katalitičke aktivnosti ovog proteina ili uzrokovati njegove strukturne promjene (Durand i sur., 2002). Ova pojava posebno je zabrinjavajuća jer su intenziteti ovih potencijalnih feritinskih pikova oba neesencijalna elementa (Ag i Pb) pokazali pozitivne, iako ne značajne, korelacije s izmjerenim citosolskim koncentracijama ovih metala u probavnoj žlijezdi. Takva akumulacija neesencijalnih metala u

feritinu može potaknuti oksidativni stres, što dodatno povećava rizik od oštećenja proteina i stanične disfunkcije (Maity i sur., 2019). U slučaju Pb, najuočljivije dodatno eluiranje zabilježeno je na ~34 kDa, blisko eluirajući sa standardom enzima SOD, što bi moglo odražavati vezanje Pb na različite važne enzime, potencijalno uzrokujući stanična oštećenja.

Za sva četiri gore spomenuta elementa (Ag, Cd, Cu i Pb) povećane citosolske koncentracije odrazile su se na porast eluiranja u pretpostavljenom MT-području. Takva povezanost potvrđena je značajnim pozitivnim korelacijama intenziteta pikova s citosolskim koncentracijama elemenata, što ukazuje da je određeni dio svakog elementa bio sekvstriran MT-ima, i stoga vjerojatno detoksificiran. Sličan obrazac povećanog eluiranja u MT području nakon porasta citosolskih koncentracija metala prethodno je opažen za Cd i Cu u probavnoj žlijezdi *M. galloprovincialis* (Stržak i sur., 2014). Za Cu, kao esencijalni element, povećano eluiranje uočeno je i u dodatnim elucijskim pikovima, što je također potvrđeno i značajnim pozitivnim korelacijama između njegovih koncentracija i intenziteta tih pikova. To odražava esencijalnu ulogu Cu u funkciji mnogih proteina i enzima, uključujući transportni protein albumin (50 kDa), GSH (307 Da) ili druge metalošaperone (Hauser-Davis i sur., 2021; Lavradas i sur., 2016). Međutim, eluiranje Ag, Cd i Pb unutar dodatnih VMM i SMM pikova također se povećalo, u različitom stupnju ovisno o metalu, što ukazuje na njihovu potencijalnu toksičnost i nepotpunu detoksifikaciju pri višim razinama njihove bioakumulacije. Ta su povećanja bila posebno izražena za Ag na ~330 – 405 kDa i Pb na ~30 – 35 kDa.

Iako je veliki udio Se (do 48 %) eluirao unutar VMM područja, prikazali smo ga zajedno s As zbog njihove zajedničke sklonosti vezanju za VNMM biomolekule. Takav obrazac je u skladu s istraživanjem Lavradas i sur. (2016), koji su pokazali da širok raspon proteina s MM manjom od 7 kDa sudjeluje u vezanju As, Se i nekih drugih (ne)esencijalnih elemenata u probavnoj žlijezdi školjkaša *P. perna*. U našem istraživanju, glavno eluiranje Se zabilježeno je unutar VNMM pikova u rasponu od 250 do 300 Da, uz vrlo mali dodatni pik na 130 – 140 Da. S obzirom na poznatu biološku ulogu Se u održavanju stanične redoks ravnoteže te detoksifikaciji reaktivnih kisikovih vrsta pri normalnim fiziološkim koncentracijama (Cossu i sur., 1997), njegovo eluiranje unutar VNMM područja sugerira da se Se u probavnoj žlijezdi *U. crassus* može nalaziti u obliku malih, biološki aktivnih antioksidativnih spojeva poput selenometionina (~0,2 kDa; Klotz i sur., 2003) ili selenoneina (~0,5 kDa; Yamashita i sur., 2012).

Arsen je eluirao u više pikova unutar područja VNMM, pri čemu je najizraženiji signal zabilježen na 1,5 – 1,7 kDa. Studija Hauser-Davis i sur. (2021) na školjkašu *P. perna* također je potvrdila vezanje As za VNMM biomolekule te predložila GSH kao mogući ligand za njegovo vezanje (307 Da). Arsen je dobro poznat po svom prooksidativnom djelovanju, a

izloženost ovom elementu povezana je s narušavanjem antioksidativne obrane u vodenim organizmima (Guidi i sur., 2010). Istraživanje na slatkovodnom školjkašu *U. pictorum* pokazalo je da As stvara komplekse s GSH, čime se olakšava njegovo izlučivanje i biotransformacija putem procesa redukcije/metilacije (Lavradas i sur., 2016). Naši rezultati, dobiveni na *U. crassus*, također su pokazali da razine GSH značajno ovise o prisutnosti anorganskih i organskih onečišćivala, pri čemu intenzitet odgovora ovog antioksidansa može, među ostalim čimbenicima, varirati ovisno o vrsti i koncentraciji onečišćivala, trajanju izloženosti, vrsti analiziranog organa i fiziologiji pojedine životinjske vrste. Međutim, važno je napomenuti da toksičnost As snažno ovisi o njegovu kemijskom obliku. U morskim školjkašima prevladavajući oblik je arsenobetain (~180 Da), netoksičan spoj koji se smatra krajnjim produktom biotransformacije As u morskim ekosustavima (Narukawa i sur., 2006; Soeroes i sur., 2005). Nasuprot tome, u slatkovodnim školjkašima *U. pictorum* arsenobetain je prisutan u manjem postotku (Schaeffer i sur., 2006), što bi se moglo povezati s našim opažanjem slabije povezanosti As unutar VNMM-6 pika (~150 – 170 kDa područje). Osim toga, u istraživanju na pet vrsta slatkovodnih školjaka iz rijek Dunav, Soeroes i sur. (2005) su pokazali da su arsenošćeri (90 – 500 Da; Schmeisser i sur., 2004) dominantni oblik As u ispitivanim uzorcima. Arsenošćeri su ribozidi koji sadrže As i imaju ulogu u biokemijskim ciklusima As, a njihova sinteza predstavlja mehanizam detoksifikacije As u vodenim organizmima (Xue i sur., 2019). Raspon VNMM biomolekula koje vežu As (0,15 – 3,15 kDa) u ovom istraživanju mogao bi predstavljati slične spojeve povezane s detoksikacijom i biotransformacijom As u *U. crassus*.

Kao što je već spomenuto, veći udjeli Se također su eluirali u VMM području (~400 – 560 i ~175 – 190 kDa), dok je manji pik uočen u SMM području na ~45 – 60 kDa. Adam-Guillermin i sur. (2009) također su zabilježili eluiranje Se u širokom rasponu moleulskih masa u školjkašu *Corbicula fluminea*. Selen je esencijalni element koji se većinom kovalentno veže unutar selenoproteina potrebnih za biokemijske procese u stanicama (Urien i sur., 2018). Dosad je identificirano oko 30 selenoproteina, od kojih je poznata biološka funkcija potvrđena za njih 12 (Arteel i Sies, 2001). Spojevi koji su se u našem istraživanju eluirali na ~45 – 60 kDa mogli bi odgovarati proteinima poput selenoproteina P (~50 kDa), koji sudjeluje u transportu Se i identificiran je kod vodenih organizama (Adam-Guillermin i sur., 2009). Trombini i sur. (2022) pokazali su kako Se također ublažava negativne učinke izloženosti Cd-u, uključujući oksidativni stres i stanična oštećenja u probavnoj žlijezdi školjakaša *Scrobicularia plana*. Ovaj obrambeni učinak može se pripisati vezanju toksičnih metala za selenoproteine ili povećanoj

aktivnosti enzima ovisnih o Se, poput glutation-peroksidaze (~50 kDa) (Adam-Guillermin i sur., 2009; Trombini i sur., 2022).

Međutim, budući da je Se biološki koristan samo u uskom rasponu koncentracija Se, njegov višak može uzrokovati toksične učinke (Urien i sur., 2018). U ovom istraživanju, značajno povećanje intenziteta pikova s povećanjem koncentracije Se uočeno je samo za VNMM pik na 250 – 300 Da, što vjerojatno upućuje na detoksifikaciju viška Se. U slučaju As, značajno povećanje intenziteta pikova s porastom koncentracije As zabilježeno je za VNMM pik na ~1,5 – 1,7 kDa. Međutim, povećanje eluiranja As uočeno je i u VMM pikovima (na 400 i 580 kDa). Toksičnost As u velikoj se mjeri pripisuje njegovom snažnom afinitetu prema sulfhidrilnim (–SH) skupinama. Dobro je poznato da As može vezati endogene tiole u koenzimima (npr. lipoična kiselina) ili cisteinske ostatke smještene u aktivnim mjestima ključnih enzima, čime se narušava njihova katalitička aktivnost (Nurchi i sur., 2020). Takve interakcije sa strukturnim ili enzimskim proteinima mogle bi objasniti povećano eluiranje As u VMM području pri većoj bioakumulaciji As te ukazati na potencijalne molekularne ciljeve njegove toksičnosti u tkivu školjkaša.

5.3.2. Karakterizacija temeljena na ukupnom naboju, odnosno na kiselim/bazičnim svojstvima biomolekula koje vežu metal(oid)e

Jedna od ključnih karakteristika MBB jest njihova izoelektrična točka (pI), koja predstavlja pH-vrijednost pri kojoj je ukupni naboj proteina jednak nuli, odnosno proteini su pozitivno nabijeni kada se nalaze u mediju čiji je pH ispod njihova pI, a negativno nabijeni kada je pH iznad pI (Tokmakov i sur., 2021). Vrijednost pI proteina može znatno varirati, od izrazito kiselih do izrazito alkalnih vrijednosti (otprilike 4,0 – 12,0), a prvenstveno je određena aminokiselinskim slijedom (Kurotani i sur., 2019). Distribucija pI vrijednosti proteoma većine organizama je bimodalna, pri čemu su pI vrijednosti dviju glavnih skupina proteina oko 5,0 – 6,0 i 8,0 – 9,0 (kisele i bazični proteini) (Kiraga i sur., 2007). Ipak, među vrstama postoje razlike u zastupljenosti kiselih i bazičnih proteina koje u konačnici određuju njihove metaboličke i fiziološke karakteristike, a mogu biti povezane s taksonomijom, ekološkom nišom ili subcelularnom lokalizacijom (Kiraga i sur., 2007). Primjerice, citoplazmatski proteini te proteini Golgijeva aparata, vakuola, lizosoma i citoskeleta uglavnom su kiseliji (pI 5,0 – 6,0), dok su mitohondrijski i membranski proteini u pravilu alkalniji (pI 8,5 – 9,0). S druge strane, proteom jezgre sadrži približno jednak udio kiselih i bazičnih proteina (širok raspon pI: 4,5 – 10,0) (Ho i sur., 2006). Konačno, pokazano je da kisele MBB-e imaju veći broj interakcija u prokariotskim i eukariotskim proteomima te su većih MM u usporedbi s bazičnim proteinima.

Bazični proteini, s druge strane, pokazuju veću varijabilnost pI vrijednosti te raznolikost u odnosu na kisele proteine (Kiraga i sur., 2007). Podaci o kiselobazičnim proteinima u vodenim organizmima generalno su oskudni, pogotovo u školjkašima. Postojeća istraživanja uglavnom se odnose na pojedinačne analize malog broja MBB, poput metalotioneina (Geret i Cosson, 2002), selenoproteina (Kristan i sur., 2013; Moreno i sur., 2001) ili As-MBB (Tibon i sur., 2021), dok sveobuhvatna istraživanja većeg broja MBB u ovoj skupini organizama zasad nisu provedene.

Ovo istraživanje donosi prve sveobuhvatne podatke o raspodjeli 14 elemenata među citosolskim MBB u probavnoj žlijezdi slatkovodnog školjkaša *U. crassus*. Njihovo razdvajanje provedeno je primjenom dviju IEX kromatografskih kolona pod neutralnim fiziološkim uvjetima (pH 7,4) kako bi se što vjernije oponašalo okruženje slično onome u stanicama i tkivu probavne žlijezde. Pod tim uvjetima, MBB-i kisele prirode (pI približno ispod 7) eluirali su na AEX koloni, dok su MBB-i bazične prirode (pI približno iznad 8) eluirali na CEX koloni. Rezultati su pokazali gotovo potpuno eluiranje većine analiziranih elemenata na AEX koloni, što ukazuje da su citosolski MBB u probavnoj žlijezdi *U. crassus* pretežno kisele prirode. Takva distribucija u skladu je s prethodnim istraživanjima o citosolskim proteinima (Kiraga i sur., 2007). Ipak, činjenica da samo tri elementa (Mo, Bi i Pb) nisu eluirala na CEX koloni, što sugerira da, uz dominantne kisele MBB-e, u probavnoj žlijezdi postoji i široki spektar bazičnih MBB koji bi mogli biti odgovorni za regulaciju većeg broja metala u ovom školjkašu.

Molibden, Bi i Pb gotovo su u potpunosti eluirali na AEX koloni, dok na CEX koloni nije zabilježeno eluiranje nijedne MBB za ove elemente. Kod Mo, samo je prvi pik eluirao u blizini drugih proteinskih standarda s pI ~5. Aldehid oksidaza (pI = 5,58; Zhang i sur., 2020), poznati Mo-enzim, prethodno je identificirana u probavnoj žlijezdi triju vrsta puževa (Large i Connock, 1993). Ovaj citosolski enzim poznat je po antioksidativnoj ulozi, a sam Mo njegova je esencijalna komponenta potrebna za katalitičku ulogu (Pryde i sur., 2010). U istom elucijskom području zabilježeno je koeluiranje Fe, Zn, Ag, Cd, Co, As i Cu (Prilog 9). Aldehid oksidaza građena je od podjedinica, od kojih je svaka podijeljena na tri domene: N terminalni kraj koji veže dva Fe-klastera, središnju domenu u kojoj se nalazi flavin adenin dinukleotid i C terminalni kraj u kojem se nalazi Mo (Pryde i sur., 2010). Iako uloga ovog enzima u školjkašima nije do kraja razjašnjena, može se pretpostaviti da ima sličnu antioksidativnu ulogu kao i u drugim vrstama (Large i Connock, 1993; Liao i sur., 2021). Unatoč visokom postotku vezanja Bi na AEX koloni, elucijski pikovi bili su slabo izraženi i niske rezolucije, što potencijalno ukazuje na slabiju regulaciju ovog elementa u probavnoj žlijezdi školjkaša. Jasno vidljivi pik Bi, u kojem su koeluirali i Pb, Fe, Zn, Cd i Mn, eluirao je u području bliskom proteinskom

standardu transferina. Iako je primarna uloga transferina transport Fe, on može biti uključen i u transport te uklanjanje drugih slobodnih metala poput Mn, Pb i Zn, čime štiti stanice od oksidativnih oštećenja (Cornelis i sur., 2005). Ova povezanost dodatno je poduprta činjenicom da su Bi, Mn, Pb i Zn eluirali u SMM području (~80 kDa) na SE koloni, što odgovara području elucije transferina. Osim toga, poznato je da se Bi snažno veže za transferin u ljudskom serumu (Sun i Szeto, 2003), dok su Qian i Morgan (1990) pokazali da Pb može inhibirati endocitozu transferina i transport željeza u zečjim retikulocitima. Transferinu slični proteini pronađeni su i u određenim vrstama mekušaca (Herath i sur., 2015), što upućuje na mogućnost da su slični proteini prisutni i kod slatkovodnih školjkaša.

Povećanje intenziteta pikova s obzirom na akumulaciju metala bilo je posebno vidljivo kod Mo i Pb. Za sva tri AEX-Mo pika zabilježene su vrlo jake pozitivne korelacije s citosolskim koncentracijama Mo, pri čemu je najdominantniji pik, eluiran pri kraju gradijenta, ukazivao na prisutnost vrlo kiselih Mo-MBB. Slične proteine kisele prirode koji vežu Mo opisali su i Dragun i sur. (2024) u jetri štuke, što ukazuje na postojanje potencijalno sličnih proteina u *U. crassus* koji sudjeluju u regulaciji Mo. Pozitivna korelacija između intenziteta pikova i citosolskih koncentracija Pb također je uočena u području kiselijih proteina. Kiseliji proteini općenito su manje MM (Kiraga i sur., 2007), a vezanje Pb za MBB vrlo niskih MM (< 2,8 kDa) već je dokazano u ovom istraživanju. S obzirom na već dokazanu visoku toksičnost Pb za slatkovodne školjkaše (Hossain i sur., 2023), njegovo vezanje za široki raspon MBB na AEX koloni može upućivati na istodobnu aktivaciju više detoksifikacijskih mehanizama, ali i na mogućnost negativnog nespecifičnog vezanja za funkcionalno važne proteine, što dodatno pojačava rizik od narušavanja određenih staničnih procesa.

Elementi koji su u velikom postotku eluirali na AEX koloni (> 95 %), uz dodatno prisustvo manjih, ali jasno izraženih pikova na CEX koloni, bili su esencijalni elementi Fe i Zn te neesencijalni elementi Ag i Cd. Dva dominantna AEX-Fe pika registrirana su na 13,1 i 13,9 min, a njihova vremena elucije bila su najbliža području elucije standarda transferina. Na temelju poznavanja metabolizma Fe te rezultate SE–analize Fe–MBB u probavnoj žlijezdi *U. crassus*, u kojoj glavna elucija Fe bila povezana s proteinima molekulske mase oko 400 kDa, pretpostavili smo da ovi pikovi predstavljaju različite izoforme skladišnog proteina feritina (pI 4,5 – 5,5; Sumithra i sur., 2021). Koelucija drugih metala s ovim pikovima (Zn na 13,1 i 13,9 min; Ag na 13,8 min; Cd na 13,2 min; Pb na 13,0 i 13,9 min; Tl na 13,9 min) dodatno podupire hipotezu o višestrukoj ulozi feritina, ne samo u skladištenju i transportu Fe, nego i sekvencijaciji drugih metala koji su vidljivi u SE- i AEX-HPLC analizama. U svrhu potvrde tih pretpostavki provedene su daljnje analize navedenih pikova primjenom dvodimenzionalne kromatografije

(AEX–SE) i MALDI–TOF–MS masene spektrometrije, koje su opisane u idućim poglavljima. Iako je mali udio Fe bio vezan na CEX koloni, uočena su tri jasna pika u ranom dijelu gradijenta, što upućuje na prisutnost dodatnih bazičnih Fe–MBB. Rano eluiranje Fe–MBB u *U. crassus*, u usporedbi sa znatno kasnijim eluiranjem ovih biomolekula zabilježenim u jetri štuke (Dragun i sur., 2024), ukazuje na razlike u pI vrijednostima i strukturi ovih proteina između vrsta. Istraživanja bazičnih proteina u vodenim organizmima veoma su oskudna, a ovi rezultati upućuju na složenost i postojanje širokog spektra MBB koji mogu imati važnu ulogu u Fe unutarstaničnoj regulaciji, osobito u uvjetima povećanog opterećenja metalima.

Nadalje, Zn je bio raspodijeljen među čak 18 AEX–pikova. Prvih osam pikova je eluiralo unutar vremena elucije standardnih proteina (uključujući poznate Zn–proteine poput alkohol–dehidrogenaze, superoksid–dismutaze, metalotioneina i ugljične anhidraze (CA)), što sugerira vrijednost pI unutar raspona 4 – 6. Cink je esencijalni element i jedan od najvažnijih nutrijenata u životinjskom svijetu, a njegova je prisutnost neophodna za pravilnu funkciju brojnih proteina, enzima i transkripcijskih faktora (Sloup i sur., 2017). Dominantni AEX–Zn pik u ovom dijelu elucije bio je pik s maksimumom na 11,1 min, koji je koeluirao s Cu. Taj pik eluirao je u blizini proteinskog standarda SOD, poznatog po tome što sadrži i Cu i Zn (Wang i sur., 2017). Iako se vremena elucije ne podudaraju u potpunosti, Letendre i sur. (2008) potvrdili su postojanje različitih izoformi Cu/Zn–SOD kod školjkaša *M. edulis*, koje su imale niže pI vrijednosti od proteinskog standarda (pI = 4,55 – 4,7), što može objasniti nešto kasnije eluiranje kod *U. crassus*. Osim ovog pika, veliki broj drugih AEX–Zn pikova vremenski se preklapao s Cu, što je u skladu s rezultatima SE–HPLC analize provedenima na istom školjkašu. Dodatno, prisutnost velikog broja Zn–MBB, koji su u određenoj mjeri koeluirali s Cu–MBB, također je potvrđena AEX analizom citosola jetre štuke (Dragun i sur., 2024). Međutim, u tom istraživanju gotovo svi Zn–MBB eluirali su unutar raspona proteinskih standarda, dok je u probavnoj žlijezdi *U. crassus* u ovom istraživanju uočeno čak deset pikova koji su eluirali nakon zadnjeg proteinskog standarda, što ukazuje na prisutnost MBB mnogo kiseliije prirode u školjkašu. Nadalje, Zn je u nešto većem postotku eluirao i na CEX koloni, što je u skladu s rezultatima za Zn–MBB u citosolu jetre štuke (Dragun i sur., 2024). Ipak, u *U. crassus* su CEX–Zn pikovi bili jasnije razlučeni u odnosu na štuku (Dragun i sur., 2024). Ovakav široki raspon i veliki broj dosad neistraženih Zn–MBB ukazuje na kompleksne mehanizme njegove regulacije u slatkovodnim organizmima, pogotovo školjkašima, naglašavajući važnost daljnjih istraživanja u ovom području.

Slično kao i za Bi, unatoč visokom postotku vezanja Ag na AEX koloni (~95 %), zabilježeni pikovi bili su slabo izraženi i niske rezolucije. Nekoliko istaknutih pikova imalo je vremena

elucije u blizini pretpostavljenih enzima CA i SOD. Također je uočeno preklapanje kasnije eluiranog pika ($t_e = 15,1$ min) s Cu, Zn i Cd. Na temelju poznatog ponašanja ovih elemenata u stanicama, te sličnoj koeluciji navedenih elemenata na SE koloni u MT području, pretpostavlja se kako bi ovaj AEX pik mogao odgovarati jednoj od MT izoformi. Geret i Cosson (2002) su utvrdili postojanje i do 6 izoformi ovog proteina u probavnoj žlijezdi školjkaša *M. edulis*. MT su proteini mali, cisteinom bogati proteini (oko 60 aminokiselina, od kojih je oko 30 % konzerviranih cisteina) koji ne sadrže aromatske aminokiseline. Njihove izoforme imaju sličnu molekulsku masu, ali se razlikuju po neto naboju (Vergani i sur., 2007). MT izoforme u probavnoj žlijezdi školjkaša vjerojatno imaju niži pI od sisavaca (kunića), što je ranije opaženo u tkivima slatkovodnog školjkaša *D. polymorpha* (High i sur., 1997). Uz prethodno navedeni pik Cd (na 15,1 min), detektiran je i dodatni Cd pik koji je eluirao nešto kasnije (~ 17 min). S obzirom da je poznato kako je Cd snažan induktor sinteze MT-a u različitim vrstama školjkaša (Falfushynska i sur., 2014; Ivanković i sur., 2010), ovaj kasniji pik mogao bi predstavljati drugu MT izoformu. S ovim pikom su također koeluirali Cu i Zn, što upućuje na njihovu moguću zajedničku prisutnost u istoj MT izoformi. Slična raspodjela Ag, Cd, Cu i Zn među pretpostavljenim MT izoformama utvrđena je AEX analizom i u jetri štuke (Dragun i sur., 2024). Međutim, u tom su slučaju MT izoforme eluirale znatno ranije nego kod školjkaša, što dodatno potvrđuje niže pI vrijednosti MT-a u *U. crassus* u odnosu na više organizme. S obzirom na ključnu funkciju MT u regulaciji esencijalnih i detoksikaciji neesencijalnih elemenata (Amiard i sur., 2006), važno je utvrditi prag nakon kojega sposobnost MT-a za detoksikaciju prestaje biti učinkovita te identificirati druge biomolekule na koje se mogu vezati potencijalno toksični elementi u stanicama. Ova je spoznaja osobito važna ako uzmemo u obzir da su u ovom istraživanju neesencijalni elementi Ag i Cd, unatoč dominantnom vezanju na AEX koloni, pokazali i dodatno eluiranje na CEX koloni. Iako je postotak njihovog vezanja na CEX koloni bio nizak, prisutnost jasno definiranih pikova za oba elementa sugerira njihovu interakciju s bazičnim proteinima. Kadmij je, primjerice, eluirao dosta kasno, u relativnoj blizini standarda citokroma C ($pI \sim 9,6$), što ukazuje na mogućnost njegova vezanja za bazične proteine pri višim koncentracijama u citosolu i time na mogućnost poremećaja normalne stanične funkcije.

U ovom istraživanju značajno povećanje intenziteta pikova s povećanjem koncentracija metala utvrđeno je na AEX koloni za Fe na vremenu elucije 8,51. Osim toga, vrlo visoke korelacije uočene su gotovo za sve ostale Fe pikove, uključujući i one koji odgovaraju feritinu, što ne čudi s obzirom na njegovu funkciju u skladištenju i regulaciji Fe (Sumithra i sur., 2021). Statistički značajne pozitivne korelacije utvrđene su i za čak četiri AEX-Cd pika. Sličan obrazac

dominantnog vezanja Cd za MT i povećanja indukcije MT s porastom bioakumulacije Cd već su ranije potvrdili Falfushynska i sur. (2014) u probavnoj žlijezdi *A. anatina* upotrebom SE–HPLC analize. Razlike u afinitetu MT izoformi prema pojedinim metalima također su već opisane u literaturi. Primjerice, Soazig i Laulier (2003) pokazali su da Cd specifično inducira MT–2 izoformu u *M. edulis*, dok MT–1 pokazuje širi spektar vezanja, ne samo za Cd nego i za druge metale, te generalno sudjeluje u održavanju homeostaze i regulacijskim fiziološkim procesima. Za razliku od Cd, za Zn i Ag nisu zabilježene značajne korelacije u pretpostavljenim MT pikovima, dok su korelacije u slučaju Ag čak bile i negativne. Istraživanje Dragun i sur. (2024) također je pokazalo da, iako se u jetri štuke Ag vezalo na MT, povećanje bioakumulacije Ag nije rezultiralo proporcionalnim porastom intenziteta Ag–MT pikova u AEX analizi, što su potencijalno pripisali umjerenim koncentracijama metala. Sličan uzrok vjerojatno je prisutan i kod probavne žlijezde *U. crassus* u ovom istraživanju, osobito s obzirom na nizak intenzitet AEX–Ag kromatograma. Međutim, utvrđena je vrlo jaka pozitivna korelacija intenziteta prvog AEX–Ag pika s citosolskim koncentracijama Ag ($r = 0,96$) u probavnoj žlijezdi *U. crassus*. Ovaj pik bio je eluiran u blizini vremena elucije enzima CA, što je u skladu s rezultatima Caricato i sur. (2019), koji su pokazali da se u probavnoj žlijezdi *M. galloprovincialis* inducira CA nakon izloženosti raznim metalima, uključujući i Ag. Rezultati dodatnih korelacija za Cd izvan MT–područja pokazuju da ovaj element nije u potpunosti detoksificiran putem MT–a, nego se može vezati i za druge MBB. Ovu mogućnost dodatno potkrepljuju jake, iako statistički ne značajne, pozitivne korelacije intenziteta CEX pikova za oba elementa (Cd i Ag). Takva interakcija s drugim potencijalno biološki važnim proteinima mogla bi imati određeni toksični učinak u stanicama *U. crassus*.

Elementi koji su se vezali 60 – 95 % za AEX kolonu te su također eluirali na CEX koloni bili esencijalni elementi Co, Mn i Se, i neesencijalni element As. Većina uočenih AEX pikova za navedene elemente eluirali su u početnom dijelu gradijenta, usporedno s proteinskim standardima. Proteini koji vežu Co u ljudskom serumu i plazmi karakterizirani su pI od 5, dok su u cijelom uzorku krvi dodatno karakterizirani pI vrijednošću od 7 (Schumacher–Wittkopf, 1984). U slučaju Co, većina pikova eluirala je u početnom dijelu pI gradijenta, bliže neutralnom pI. Ovo se dodatno može objasniti i rezultatima SE–Co analize u probavnoj žlijezdi *U. crassus*, gdje je veliki udio Co bio vezan za proteine visoke molekulske mase (~150 – 580 kDa). Nadalje, AEX–Co pikovi generalno su bili sličnih intenziteta, no najistaknutiji je eluirao u završnom dijelu gradijenta ukazujući i na prisutnost kiselih Co–MBB. Ovaj pik mogao bi se odnositi na esencijalno vezanje Co u kobalaminu (vitamin B12), koji ima pI od 1,9 i malu molekulsku masu

(1,3 kDa) (Ericson i Nihlen, 1959). To je dodatno u skladu sa SE–Co profilom u probavnoj žlijezdi *U. crassus*, odnosno njegovim eluiranjem s biomolekulama molekulske mase ~1,3 kDa. Uočeno eluiranje Co i na CEX koloni ukazuje na postojanje dodatnih bazičnih MBB odgovornih za njegovu regulaciju. Esencijalni element Mn eluirao je u dva AEX–pika, od kojih je dominantni pik s vremenom elucije na 8,13 min odgovarao vremenu elucije proteinskog standarda CA. Prisutnost CA ranije je potvrđena u probavnoj žlijezdi školjkaša *M. galloprovincialis* (Caricato i sur., 2019), gdje je pokazala povećanu aktivnost tijekom izloženosti različitim metalima. Premda je CA primarno Zn–metaloenzim, Lionetto i sur. (2016) pokazali su da se i drugi divalentni ioni, uključujući Mn, mogu vezati na histidin u aktivnom mjestu CA. Njezina molekulska masa u školjkašu *M. galloprovincialis* procijenjena je 28 kDa (Cardoso i sur., 2019), što se podudara i sa SE analizom, gdje je uočeno eluiranje Mn s MBB veličine ~30 kDa. Slično eluiranje Mn na AEX, ali i na CEX koloni vidljivo je i u citosolu jetre štuke (Dragun i sur., 2024), pri čemu je na CEX koloni također uočen samo jedan jasan Mn pik, koji je eluirao nešto kasnije nego u školjkašu. Postoji mogućnost da ovaj CEX–Mn pik odgovara citosolskoj formi Mn–SOD–a, za koju je u nekim beskralježnjacima zabilježen bazičan pI (8,98 kod raka *Eriocheir hepueensis*, Liao i sur., 2021). Iako je Se u visokom postotku bio vezan na AEX koloni, zabilježeni pikovi bili su slabo izraženi i niske rezolucije, što se može povezati s općenito niskim koncentracijama Se i njegovih formi u biološkim uzorcima (Wang i sur., 2010). Unatoč tome, na AEX–kromatogramu probavne žlijezde *U. crassus* jasno su bila razlučiva tri pika. Kristan i sur. (2013) su identificirali selenoproteine, uključujući selenocistein i selenometionin kod školjkaša *M. galloprovincialis* korištenjem AEX–HPLC metode. Ovi selenoproteini (MM ~50 kDa) svrstani su u različite skupine, no zajedničko im je da sudjeluju u antioksidativnim procesima (Suzuki, 2005), što dodatno naglašava njihovu važnost u staničnoj homeostazi *U. crassus*, pogotovo kada se uzme u obzir eluiranje Se s biomolekulama ~50 kDa uočenih upotrebom SE analize. Osim na AEX koloni, jasniji i izraženiji Se–pik zabilježen je i na CEX koloni. Ova bazična MBB bi mogla odgovarati trimetil–selenu, pozitivno nabijenom organskom selenospoju koji sudjeluje u metabolizmu Se u školjkašima i drugim vodenim organizmima (Quijano i sur., 2000). Njegova prisutnost prethodno je dokazana i u dagnjama upravo na CEX koloni (Moreno i sur., 2001). Ovaj selenospoj niske je MM (< 10 kDa; Quijano i sur., 2000), što je u skladu sa SE–Se profilom, gdje je značajan udio Se bio vezan za MBB u VNMM regiji. Pikovi As većinom su eluirali u rasponu proteinskih standarda, pri čemu je najistaknutiji pik vidljiv odmah nakon praznog volumena, što ukazuje na vezanje za MBB blizu neutralnog pI, potencijalno većih MM. Ovaj se pik preklapao s Co, a vezanje As za proteine visokih MM (> 150 kDa) potvrđeno je i

primjenom SE analize. Toksična svojstva As dobro su poznata i ovise kako o njegovoj koncentraciji, tako i o kemijskom obliku kojem je organizam izložen (Whaley–Martin i sur., 2012). Vezanje As za MBB većih MM te vidljivo koeluiranje s esencijalnim elementima upućuju na mogućnost kompetitivnog vezanja za funkcionalno važne proteine, odnosno potencijalni toksični učinak u probavnoj žlijezdi *U. crassus*. Dodatno, ovaj neesencijalni element eluirao je i na CEX koloni. GSH i GST prepoznati su kao jedni od glavnih enzima odgovornih za vezanje i detoksikaciju As kod brojnih vrsta školjaka (Martins i sur., 2014; Rajkumar, 2013). Također je dokazano kako postoje različite izoforme GST sa širokim rasponom izoelektričnih točaka (pI 4,5 – 9,4). Ovo je dodatno potvrđeno i SE analizom u kojem je vidljivo visoko eluiranje As u području VNMM biomolekula.

Povećanje intenziteta elucijskih pikova s porastom koncentracija metal(oid)a generalno je utvrđeno za većinu pikova navedenih elemenata. Statistički značajna korelacija bila je vidljiva samo za AEX-Co pik s vremenom elucije 11,5 min, dok su za većinu AEX i CEX pikova esencijalnih elemenata Co, Mn i Se uočene vrlo jake pozitivne korelacije. Iako je riječ o esencijalnim elementima, dokazano je da u ribama Co može specifično blokirati aktivni transport Ca kroz škrge, dok su u slatkovodnim algama zabilježeni njegovi mgući inhibitorni učinci na enzimsku aktivnost (Saili i sur., 2021). Također, Urien i sur. (2018) već su potvrdili kako je samo uski raspon koncentracija Se koristan za stanice, dok prekoračenje fizioloških koncentracija može utjecati na pojavu toksičnih učinaka. U tom kontekstu, porast intenziteta kod esencijalnih elemenata u ovom istraživanju moglo bi ukazivati na povećanu detoksikaciju viška elemenata. S druge strane, zapaženo povećanje intenziteta s citosolskim koncentracijama As u AEX i CEX pikovima moglo bi biti zabrinjavajuće, s obzirom da je ovaj neesencijalni element poznat po svojoj sposobnosti vezanja na aktivna mjesta ključnih enzima (Nurchi i sur., 2020). Takvo vezanje može narušiti enzimsku aktivnost te potencijalno izazvati određene poremećaje staničnih metaboličkih procesa u probavnoj žlijezdi *U. crassus*.

Elementi koji su se u najmanjem postotku vezali za AEX kolonu, te su također eluirali na CEX koloni bili su esencijalni element Cu i neesencijalni element Tl. Jedini element koji je eluirao samo na CEX koloni bio je Cs. Bakar se vezao za široki raspon MBB na AEX koloni, od kojih je većina eluirala do 12 min ukazujući na vezanje za proteine blago kisele do neutralne prirode. Dva dominantna pika usporedih intenziteta, s maksimumom na 8,08 min i na 11,2 min, koeluirala su s proteinskim standardima CA i alkoholne dehidrogenaze. U vodenim organizmima CA sudjeluje u održavanju pH ravnoteže, disanju, transportu elektrolita, te drugim metaboličkim reakcijama (Supuran, 2016). U školjkašima su otkriveni brojni CA izoenzimi u

plaštu, škragama, hemolimfi te probavnoj žlijezdi (Wang i sur., 2017). Caricato i sur. (2019) također su pokazali da u probavnoj žlijezdi *M. galloprovincialis* dolazi do indukcije aktivnosti CA pri kroničnoj izloženosti raznim metalima (npr. Cu, Cd, Cr, Ni, Pb, itd.). Rezultati SE analize, u kojoj je Cu eluirao u NMM području (~28 kDa) koje odgovara veličini CA (Cardoso i sur., 2019), dodatno potvrđuje njegovu moguću povezanost s ovim enzimom. Uz to, Cu je koeluirao s Zn u području eluiranja SOD proteina, te s Ag i Cd u pretpostavljenim pikovima MT–izoformi, što je u skladu i s rezultatima SE analize. Uloga MT, ali i drugih MBB u citosolu školjkaša od velike je važnosti, no za njihovu karakterizaciju potrebna je daljnja analiza te upotreba višedimenzionalne kromatografije i drugih tehnika spektrometrija masa. Nadalje, na CEX koloni dodatno je uočeno osam CEX-Cu pikova koji su eluirali u cijelom gradijentu, ukazujući na prisutnost različitih, vrlo bazičnih Cu–MBB. Prisutnost sličnih, bazičnih Cu–MBB potvrđena je i u citosolu štuke (Dragun i sur., 2024). Nadalje, Tl je bio gotovo ravnomjerno raspoređen između AEX i CEX kolone. Vrijeme elucije prvog, ujedno i najdominantnijeg AEX pika bilo je blizu praznog volumena, što upućuje na moguću prisutnost biomolekule veće molekulske mase. Ova pretpostavka je dodatno potkrijepljena SE–Tl profilom, u kojem je uočeno snažno vezanje Tl za biomolekulu MM oko 160 kDa. Prijašnja istraživanja sugerirala su prisutnost P–glikoproteina (~150 kDa) u školjkašima i njegovu potencijalnu ulogu u detoksikaciji toksičnih metala, uključujući i Tl (Cornwall i sur., 1995). Osim toga, na CEX koloni uočen je vrlo jasan Tl pik na 13,5 min. Doige i Sharom (1991) su prikazali različite strategije pročišćavanja ovog transportnog proteina korištenjem raznih kromatografskih tehnika, što otvara mogućnost primjene sličnih pristupa u budućim istraživanjima radi identifikacije Tl–vezujućih proteina i razjašnjavanja njihovih funkcionalnih uloga u odgovoru na metalni stres kod slatkovodnih školjkaša. U probavnoj žlijezdi *U. crassus*, jedini element koji je bio u potpunosti vezan za CEX kolonu bio je Cs. Oba uočena pika eluirala su mnogo ranije od korištenih proteinskih standarda, a najdominantniji pik bio je blizu praznog volumena, što ukazuje na prisutnost MBB veoma blizu neutralnom pI. Slični rezultati zabilježeni su i u citosolu jetre štuke, gdje su na CEX koloni također uočena dva Cs pika blizu neutralnom pI (Dragun i sur., 2024).

Generalno, intenziteti svih AEX i CEX pikova pokazali su porast s povećanjem citosolskih koncentracija metala. Jače pozitivne korelacije za Cu i Tl uočene su za AEX pikove koji su eluirali u području bliže neutralnom pI, što sugerira njihovo snažnije vezanje za MBB većih molekulskih masa pri većim koncentracijama u citosolu. Na CEX koloni, snažne pozitivne korelacije za Cu bile su utvrđene za pikove vrlo bazičnih pI vrijednosti, koji su eluirali nakon

posljednjeg proteinskog standarda lizozima ($pI = 11,1$). Ovakav obrazac ukazuje na sposobnost Cu da se veže za širok spektar MBB različitih izoelektričnih točaka, što je potvrđeno u svim korištenim kromatografskim analizama. Zajedno sa sličnim rezultatima dobivenim u citosolu jetre štuke (Dragun i sur., 2024), ovi nalazi ukazuju na središnju ulogu Cu u regulaciji brojnih metaboličkih procesa u slatkovodnim organizmima. Od svih analiziranih Tl pikova, značajna pozitivna korelacija između intenziteta pika i citosolskih koncentracija Tl zabilježena je isključivo za pik na CEX koloni. Vrlo jaka pozitivna korelacija utvrđena je i za oba Cs–CEX pika. S obzirom na visoku toksičnost ova dva neesencijalna elementa te njihovu sklonost nespecifičnom vezanju za potencijalno važne biomolekule, identificirane Cs– i Tl–MBB svakako zahtijevaju daljnju karakterizaciju.

5.4. Karakterizacija feritina: izoferitini i identifikacija feritinskih podjedinica MALDI–TOF MS–om

Željezo je esencijalni element u tragovima, ali može biti i vrlo toksičan ako se akumulira u velikim količinama (Permyakov, 2021). Prema našem saznanju, podatci o metabolizmu Fe u probavnoj žlijezdi školjkaša *U. crassus* nedostaju, a isto tako, prisustvo feritina, proteina koji pohranjuje Fe, te igra ključnu ulogu u metabolizmu Fe (Durand i sur., 2002), nije potvrđeno u ove vrste školjkaša. Stoga rezultati prezentirani u ovom radu predstavljaju prve rezultate o izolaciji i karakterizaciji feritina u probavnoj žlijezdi *U. crassus*.

Raspodjela Fe među biomolekulama različitih molekulskih masa (SE) te različitog negativnog naboja (AEX) prethodno je opisana. Primarni SE₂₀₀ profili pokazali su pretežno vezanje Fe za biomolekule VMM, s najdominantnijim pikom na 17.9 min (~400 kDa) koji je koeluirao s proteinskim standardom apoferitina. Ovaj je pik hipotetski povezan s vezanjem Fe za feritin, čija je masa od 420 kDa potvrđena i kod školjkaša (Durand i sur., 2002). Ova pretpostavka je potkrijepljena opažanjem dva pika (AEX–Fe4 i AEX–Fe5) na AEX–Fe kromatogramima za koje pretpostavljamo kako je riječ o feritinskim izoformama. Različito eluiranje na AEX koloni proizlazi iz različitih pI vrijednosti feritinskih izoformi, koje su pak posljedica različitog omjera specifičnih feritinskih podjedinica (He i sur., 2013). Zanimljivo je da se sadržaj Fe vezanog za drugi pik (AEX–Fe5) povećavao s citosolskom koncentracijom Fe, dok se sadržaj u prvom piku (AEX–Fe4) nije značajno mijenjao s promjenom akumulacije, što sugerira na potencijalno različitu ulogu Fe–MBB-a iz ova dva pika u probavnoj žlijezdi *U. crassus*. S obzirom na

navedeno, odabrali smo uzorke školjaka s većom i manjom citosolskom koncentracijom Fe te proveli dvodimenzionalno kromatografsko razdvajanje, kako bi nedvojbeno povezali SE₂₀₀-Fe pik sa specifičnim AEX-Fe pikovima. Ovo dvodimenzionalno razdvajanje uključuje dodatno SE₂₀₀-HPLC razdvajanje odabranih AEX pikova. Dvodimenzionalno HPLC razdvajanje korisno je jer omogućuje pročišćavanje ciljanih biomolekula i njihovu pouzdaniju identifikaciju metodama masene spektrometrije (Krasnići i sur., 2019). U ovom istraživanju, kada je primijenjeno razdvajanje pomoću SE₂₀₀ kolone kao prvi korak razdvajanja citosola, uočeno je koeluiranje dominantnog SE₂₀₀-Fe pika s pikom molibdena. Međutim, kada je primijenjena AEX kolona, do koeluiranja s Mo nije došlo. Upravo zbog toga što Mo na AEX koloni eluira kasnije u odnosu na Fe, AEX-HPLC kromatografija odabrana je kao prvi korak razdvajanja. Sakupljene su tri AEX-Fe-MBB frakcije koje su zatim dalje analizirane pomoću SE₂₀₀-HPLC. Navedene frakcije odgovarale su područjima eluiranja dvaju glavnih AEX-Fe pikova za koje smo pretpostavili da sadrže različite izoforme proteina feritina. Nakon što su frakcije puštene na SE₂₀₀ kolonu, u svim je frakcijama i u oba uzorka uočen jedan dominantan pik na 17.9 min, koji odgovara eluciji apoferitinskog standarda te glavnog Fe pika na početnom SE₂₀₀-Fe profilu. Jedine razlike bile su u intenzitetima: u uzorku s nižom koncentracijom Fe, najveći intenzitet SE₂₀₀-Fe pika zabilježen je u frakciji (A), tj. u frakciji za koju smo pretpostavili da sadrži bazičniju feritinsku izoformu, dok je u uzorku s većom koncentracijom Fe intenzitet bio najveći u frakciji (C), odnosno u frakciji s kiselijom izoformom feritina. Tako su rezultati dobiveni dvodimenzionalnim kromatografskim razdvajanjem potvrdili hipotezu o povezanosti između SE₂₀₀-Fe pika određene molekulske mase (hipotetskog feritinskog pika) sa specifičnim AEX-Fe pikovima, odnosno potencijalnim feritinskim izoformama. Za dobijanje više informacija o identitetu Fe-MBB-a sadržanih u glavnom Fe piku iz drugog koraka razdvajanja, skupljena je SE₂₀₀-AEX-Fe frakcija (17-19 min) te analizirana pomoću tehnike masene spektrometrije MALDI-TOF MS.

MALDI-TOF MS analiza skupljene SE₂₀₀-AEX-Fe frakcije otkrila je brojne jasno izražene *m/z* pikove u svim skupljenim frakcijama za oba uzorka, no s *m/z* vrijednostima koje su bile puno manje nego što bi se to očekivalo s obzirom na procijenjenu molekulsku masu biomolekula (~400 kDa) u ovoj frakciji. Poznato je da je feritin oligomerni protein sastavljen od 24 podjedinice, koje mogu biti teški (H) ili laki (L) lanci, s molekulskim masama od približno 21 kDa i 19 kDa. Dok L podjedinice prvenstveno sudjeluju u pohrani željeza, H podjedinice su odgovorne za oksidaciju topljivog Fe(II) u netoksični Fe(III) oblik (Lan i Zenobi, 2019). Važno je napomenuti da je detekcija pojedinačnih podjedinica umjesto cijelog intaktnog proteina

uobičajena pojava u MALDI-TOF analizama (Huang i sur., 2004). To je posebno izraženo kod proteina velike molekulske mase (> 400 kDa) poput feritina, budući da čak i najveći intenzitet lasera često ne omogućuje stvaranje molekularnog iona intaktnog proteina. Slijedom navedenog, opaženi MALDI-TOF MS m/z pikovi u ovom istraživanju najvjerojatnije odgovaraju različitim podjedinicama feritina. Tako je u frakciji (B) uočen m/z pik na 18,9 kDa, što bi moglo odgovarati potencijalno lakoj podjedinici feritina. Ovo je u skladu s veličinom lake podjedinice feritina izoliranom iz puža *Lymnaea stagnalis* L. (~ 19 kDa; Bottke, 1984). Osim toga, u istoj frakciji (B), uočen je i pik na 6,2 kDa koji bi odgovarao trostruko nabijenoj 18,9 kDa podjedinici. Slično tome, Bootsma i sur. (1988) su u probavnoj žlijezdi školjkaša *M. edulis* okarakterizirali dvije feritinske podjedinice veličine 18,5 i 24,6 kDa. U probavnoj žlijezdi školjkaša *U. crassus*, najizraženiji m/z pik pri 8,2 kDa zabilježen je u frakciji (A), u oba analizirana uzorka. Zanimljivo je da je MALDI-TOF intenzitet ovog pika bio izraženiji u uzorku UC(Fe–MBB)–1, koji je sadržavao nižu koncentraciju Fe, ali je istovremeno pokazivao i veći AEX-Fe pik u frakciji (A). Smatramo da bi ovaj 8,2 kDa pik mogao predstavljati trostruko nabijenu 24,6 kDa podjedinicu, što je u skladu s veličinom teške podjedinice feritina izoliranih iz probavne žlijezde školjkaša *M. edulis* (Bootsma i sur., 1988). Iako pojava 8,2 kDa m/z pika u svim skupljenim frakcijama nije neuobičajena s obzirom na blizinu skupljenih AEX–Fe pikova, upravo najveći intenzitet u frakciji (A) snažno ukazuje na potencijalnu prisutnost dodatne feritinske izoforme odgovorne za skladištenje Fe u probavnoj žlijezdi *U. crassus*. Ovu hipotezu bi dodatno mogli poduprijeti najizraženiji pikovi na 5,4 i 10,8 kDa u frakciji (A), koji bi mogli predstavljati četverostruko i dvostruko nabijenu 21,6 kDa podjedinicu. Vrijedno je spomenuti da citosolski feritini u beskralježnjaka pokazuju veliku sličnost s onima u kralježnjaka, a 21,6 kDa feritinska podjedinica pronađena je i u mitohondrijima čovjeka (Popescu, 2009). Mitohondrijski feritin vrlo je sličan citosolskim feritinima i ima ključnu ulogu u skladištenju željeza (Bou-Abdallah i sur., 2005), što sugerira sličnu ulogu i u probavnoj žlijezdi *U. crassus*.

S druge strane, u frakcijama koje su obuhvaćale drugi AEX–Fe pik, posebno su bili izraženi pikovi na 10,1 kDa (dvostruko nabijeni 20,2 kDa) i 20,2 kDa (intaktna feritinska podjedinica). Karakterizacija kompletnog feritinskog gena iz školjkaša *P. viridis* otkrila je dio sekvence koji kodira protein od 175 aminokiselina, s izračunatom molekulskom masom od 19,97 kDa (Sumithra i sur., 2021). Molekulska masa od 20,2 kDa za feritinsku podjedinicu potvrđena je i u slatkovodnom školjkašu *H. cumingii* (Bai i sur., 2011). Odsutnost ovih pikova (10,1 i 20,2 kDa) u frakciji (A) dodatno ukazuje na potencijalnu prisutnost različitih feritinskih podjedinica

u *U. crassus*. Istraživanje Simao i sur. (2020) otkrilo je čak četiri feritinske podjedinice u školjkašu *Ruditapes decussatus*. Svaka od podjedinica imala je određenu ulogu, uključujući antioksidativnu obranu, detoksikaciju metala, imunološki odgovor i skladištenje Fe. Del Rio (2016) je pokazao prisutnost čak sedam različitih izoformi feritina u *Bathymodiolus azoricus*, koje pokazuju sličnosti s feritinima drugih vrsta školjakašâ poput *M. edulis* i *M. chilensis*. Njegovo istraživanje je dodatno prikazalo indukciju određenih izoformi feritina u probavnoj žlijezdi nakon izlaganja povećanim koncentracijama Fe. Svi ovi rezultati zajedno jasno upućuju na potencijalno postojanje različitih feritinskih izoformi u školjakašima *U. crassus*, čije se specifične uloge u metabolizmu željeza i odgovoru na stres bi se trebale preciznije odrediti daljnjim istraživanjima.

5.5. Karakterizacija MT izoformi i ostalih MBB koji vežu Cu i Zn: dvodimenzionalno razdvajanje i identifikacija pomoću MALDI-TOF MS-a

Raspodjela Zn, Cu, Cd, Ag i Pb nakon SE₇₅-HPLC-ICP-MS analize otkrila je jedan zajednički, preklapajući pik za sve elemente na vremenu elucije od 21 minute (MM~27,5 kDa). Ovaj pik eluirao je u blizini više proteinskih standarda (SOD, t_e = 19,9 min; CA, t_e = 21,3 min; MT-2, t_e = 22,8 min; MT-1, t_e = 23,9 min). Uloga MT proteina u detoksikaciji i regulaciji navedenih elemenata je već poznata, a sami MT kod školjakaša, uključujući slatkovodne vrste, pojavljuju se u brojnim izoformama koje se razlikuju u slijedu aminokiselina, svojstvima vezanja metala i razinama ekspresije (Ivanković i sur., 2002; Strižak i sur. 2014). Ove izoforme često se vrlo malo razlikuju jedna od druge s obzirom na njihove molekulske mase (Vergani i sur., 2007). Sukladno tome, oba standarda MT-1 i MT-2 (apotioneinski oblici bez vezanog Zn) iz zečje jetre (Enzo Life Sciences, SAD), koji su korišteni u ovom istraživanju, deklarirani su s MM od 6,145 kDa, dok njihovi potpuno zasićeni oblici (uključujući sedam iona Zn) imaju masu od 6,603 kDa. Carpenè i Vašák (1989) identificirali su dvije MT izoforme (MT-1 i MT-2) u jetri zlatne ribice (*C. auratus*) koristeći kromatografiju ionske izmjene i sekvenciranje aminokiselina. Dvije izoforme razlikovale su se u samo jednom aminokiselinskom ostatku, pri čemu je MT-1 sadržavao 61, a MT-2 62 aminokiseline. S obzirom na navedene spoznaje te činjenicu da se izoforme razlikuju međusobno prvenstveno po naboju (Vergani i sur., 2007), proveli smo dvodimenzionalno razdvajanje (SE i AEX) radi utvrđivanja prisutnosti pojedinih izoformi MT u probavnoj žlijezdi *U. crassus*. Za analizu su odabrana dva uzorka školjakaša s različitim citosolnim koncentracijama navedenih elemenata (Zn, Cu, Cd, Ag i Pb) kako bi se

uočile i usporedile razlike u ekspresiji pojedinih MT izoformi, njihovoj distribuciji i potencijalnom vezanju za druge MBB biomolekule. Sakupljena je SE₇₅-MT frakcija od 19-24 min, koja je potom analizirana AEX-HPLC metodom.

AEX profili pokazali su brojne, ponekad preklapajuće pikove za svaki od analiziranih metala. Dobiveni AEX profil podijeljen je u deset AEX-frakcija koje su odgovarale pikovima jednog ili više metala. Daljnja analiza skupljenih frakcija tehnikom MALDI-TOF MS potvrdila je prisutnost MT izoformi u svih deset AEX-frakcija, pokazujući dobro podudaranje s MT standardima (MT1: 6,2 kDa; MT2: 6,1 kDa). Ovakva heterogenost MT izoformi u školjkašu *U. crassus* nije iznenađujuća, s obzirom da su Geret i Cosson (2002) u probavnoj žlijezdi školjkaša *M. edulis* dokazali postojanje čak šest izoformi ovog proteina. Naše rezultate dodatno potvrđuju *m/z* pikovi od 6,2 kDa i 12,3 – 12,5 kDa u prve tri, bazičnije frakcije (A – C), koji najvjerojatnije predstavljaju monomerni i dimerni oblik MT1-izoforme. To nije neuobičajeno, budući da su MT-i skloni oksidaciji i tijekom kromatografskih analiza često dimeriziraju (Zangger i sur., 2001). Od četvrte frakcije nadalje (D – J) detektiran je pik od 6,1 kDa, koji odgovara standardu MT-2 izoforme, dok je u posljednje tri AEX-frakcije (H – J) primijećen dodatni pik od 6,9 kDa. S obzirom da su upravo u tim frakcijama zabilježeni najviši intenziteti Cd, s maksimumom pika u frakciji (I), može se pretpostaviti da 6,9 kDa signal predstavlja Cd-inducirane izoforme. Ovo je u skladu s rezultatima Soazig i Laulier (2003) na *M. edulis*, koji su pokazali da Cd specifično inducira MT-2 izoforme, dok MT-1 generalno sudjeluje u održavanju homeostaze i regulacijskim fiziološkim procesima. Ovu činjenicu dodatno potvrđuje preklapanje Cd sa Zn u frakciji (I), uz odsutnost Cu, te zajedničko preklapanje sva tri elementa u frakciji (H). Studija Orihuela i sur. (2008) pokazala je da je vezanje Cu za MT slabije pri višim koncentracijama Zn i Cd, te da se Cu specifično veže za MT-1. Također je pokazano da MT-1 može vezati Cd pri nižim koncentracijama, dok se MT-2 specifično inducira u prisutnosti vrlo visokih koncentracija Cd, ali i Zn, što je vjerojatno bio slučaj i u probavnoj žlijezdi *U. crassus*. Dodatno, *m/z* pik na 6,9 kDa je bio najviši upravo u frakciji (I), gdje je zabilježen najveći intenzitet Cd. Veličina MT-a može varirati od 6,0 do 6,9 kDa (Křížková i sur., 2007), ovisno o proučavanoj vrsti te stupnju zasićenosti MT-a metalima. Mackay i sur. (1993) su pokazali da se MT u školjkašu *M. edulis* sastoje od četiri monomerne izoforme sa 72 aminokiseline (~7,0 kDa) prividne molekulske mase 10 kDa, te pet dimernih izoformi prividne molekulske mase 20 kDa, sastavljenih od monomernih jedinica sa 71 aminokiselinom (~6,9 kDa). Sukladno ovom istraživanju, *m/z* pik na 6,9 kDa u *U. crassus* također bi se mogao smatrati dimernom

izoformom MT, a njegovo pojavljivanje u frakciji s najvećim intenzitetom Cd upućuje na važnu ulogu ove MT izoforme u detoksikaciji Cd u probavnoj žlijezdi.

Osim toga, u bazičnijim AEX-frakcijama (B-D), koje su karakterizirane elucijom Zn i Cu, MALDI-TOF MS analiza identificirala je dodatne dominantne m/z pikove. Ranije je komentirana moguća prisutnost SOD, enzima koji sadrži i Cu i Zn (Wang i sur., 2017). Pikovi na 3,8 – 4,0 kDa i 7,6 – 7,8 kDa vjerojatno odgovaraju četverostruko i dvostruko nabijenim podjedinicama SOD-a, dok bi manji pik na 15,7 kDa mogao odgovarati intaktnoj podjedinici SOD-a, što je u skladu sa spektrom dobivenim za standard SOD-a. Prisutnost SOD-a u citosolu prethodno je potvrđena i u jetri klena (Krasnići i sur., 2019), a njezin MALDI-TOF MS spektar bio je u skladu sa spektrom dobivenim u ovom istraživanju.

U prvoj frakciji (A) eluirao je isključivo Cu, a vrijeme elucije ovog pika preklapa se s vremenom elucije enzima CA. Postoji 5 superobitelji CA enzima, a u školjkašima su otkrivene brojne izoforme prisutne u plaštu, škrigama, hemolimfi te probavnoj žlijezdi (Cardoso i sur., 2019). Veličina ovih izoformi ovisi o proučavanoj vrsti. U probavnoj žlijezdi *U. crassus* pik na 17,4 kDa u frakciji A mogao bi predstavljati dvostruko nabijenu CA izoformu, što se dobro slaže s CA-2 veličine 34,76 kDa opisanoj u japanskoj kamenici *C. gigas*. Nadalje, u frakciji (D) uočen je m/z pik od 7,2 kDa, koji bi mogao odgovarati četverostruko nabijenoj CA izoformi slične veličine kao ona pronađena u školjkašu *M. galloprovincialis* (28 kDa; Cardoso i sur., 2019).

6. ZAKLJUČCI

1. Dugotrajni utjecaj povijesnog ispuštanja štetnih tvari u rijeku Mrežnicu i dalje je vidljiv kroz povećane koncentracije metal(oid)a (Ag, Cs, Fe, Pb, Se, Sn, Zn) bilo u vodi i/ili sedimentu te kroz značajniju akumulaciji metal(oid)a u probavnoj žlijezdi slatkovodnog školjkaša *U. crassus* na povijesno onečišćenoj postaji. Ovo je ujedno prvi put da se za ovu vrstu školjkaša prikazuju podaci o akumulaciji tako velikog raspona elemenata, što dodatno naglašava važnost dobivenih rezultata i potrebu za dugoročnim praćenjem ovakvih ekosustava.
2. Iako ne pružaju potpunu informaciju o toksičnim učincima na organizme, ukupne koncentracije esencijalnih (Co, Fe, Mn, Mo) i neesencijalnih (Ag, Bi, Cs) metala u probavnoj žlijezdi *U. crassus* ukazale su na uglavnom više vrijednosti na povijesno onečišćenoj postaji u odnosu na referentnu, što ukazuje na i dalje prisutne posljedice ranijeg onečišćenja i akumulaciju ovih elemenata u sedimentima i bioti rijeke Mrežnice.
3. Citosolske koncentracije metal(oid)a u probavnoj žlijezdi školjkaša pokazale su se pouzdanijim pokazateljem njihove bioraspoloživosti u vodenom ekosustavu od ukupne koncentracije metal(oid)a.
4. Povišene vrijednosti određenih metal(oid)a u vodi (Ca, Ba, Cr, Mg, Mn i Sr) na postaji uzvodno od poznatih izvora povijesnog onečišćenja povezane su s prirodno visokim pozadinskim koncentracijama Ca, budući da Mrežnica u svom gornjem toku ima obilježja tipične krške rijeke.
5. Unatoč postojanju sezonskih razlika u koncentracijama metal(oid)a, prostorne razlike bile su izraženije u probavnoj žlijezdi *U. crassus*, što ukazuje na dominantan utjecaj lokalnih izvora onečišćenja u odnosu na sezonsku varijabilnost okolišnih i bioloških čimbenika.
6. Primjenom multibiomarkerskog pristupa utvrđeno je da se koncentracije MT nisu razlikovale između postaja, unatoč povećanoj bioakumulaciji Cd i Zn na referentnoj postaji te Bi, Pb i Cu na povijesno onečišćenoj postaji. Nasuprot tomu, u probavnoj žlijezdi školjkaša s onečišćene postaje zabilježene su izraženije promjene biomarkera antioksidativne zaštite, detoksikacije i oksidativnog oštećenja, uključujući povećanu aktivnost CAT i GST te povišenu koncentraciju MDA, uz istodobno sniženje GSH. Ovi nalazi predstavljaju prve podatke o ovolikom skupu proučavanih biomarkera za ovu vrstu školjkaša koji jasno upućuju na prisutnost oksidativnog stresa i oštećenja stanica zbog izloženosti povijesno akumuliranim onečišćivalima u Mrežnici.
7. Primjenom vezanog sustava SEC–ICP–MS određene su raspodjele esencijalnih (Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Se, Zn) i neesencijalnih (Ag, As, Bi, Cd, Pb, Tl) elemenata među citosolskim

biomolekulama različitih molekulskih masa u probavnoj žlijezdi školjkaša *U. crassus* iz rijeke Mrežnice te se može istaknuti sljedeće:

- esencijalni elementi pretežno su se vezali za biomolekule visokih (VMM; > 100 kDa) i srednjih molekulskih masa (SMM; 30 – 100 kDa), što je u skladu s njihovom ulogom u strukturi i funkciji brojnih proteina; neesencijalni elementi većinom su eluirali u području niskih (NMM; 10 – 30 kDa) i vrlo niskih molekulskih masa (VNMM; < 10 kDa), što sugerira vezanje za detoksikacijske biomolekule poput MT ili GSH
- dominantna elucija Fe u VMM području, koje obuhvaća i molekulsku masu feritina, upućuje na feritin kao primarni protein za regulaciju Fe u probavnoj žlijezdi školjkaša
- prevladavajuće eluiranje Co u VNMM području najvjerojatnije je povezano s kobalaminom (~1,3 kDa), koji je esencijalni nutrijent za mnogostanične vrste životinja
- dominantna raspodjela Cu, Ag, Cd i Pb u SMM području, zajedno s elucijom MT standarda, upućuje na MT-posredovanu detoksikaciju ovih metala u ovoj vrsti školjkaša
- dominantna raspodjela Se u području VNMM, uz dodatnu eluciju unutar SMM područja, podudara se s molekulskim masama poznatih selenospojeva poput selenoneina, selenometionina i selenoproteina P
- dominantna raspodjela As u području VNMM sugerira GSH kao mogući ligand odgovoran za detoksikaciju As

8. Primjenom vezanog sustava AEX– i CEX–ICP–MS određene su raspodjele esencijalnih (Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Se, Zn) i neesencijalnih (Ag, As, Bi, Cd, Cs, Pb, Tl) elemenata među citosolskim biomolekulama različitih naboja u probavnoj žlijezdi školjkaša *U. crassus* iz rijeke Mrežnice te se može istaknuti sljedeće:

- gotovo svi elementi eluirali su na AEX koloni, što je u skladu s poznatim pI vrijednostima citosolskih proteina koji su pretežno kisele prirode
- eluiranje 11 elemenata i na CEX koloni ukazuje na prisutnost širokog spektra bazičnih biomolekula koje vežu metale te na složenost mehanizama njihovog vezanja u ovoj vrsti školjkaša
- eluiranje Mo na AEX koloni ukazuje na njegovo vezanje za aldehid oksidazu, citosolni enzim koji kao ključnu komponentu sadrži Mo
- koelucija Cu, Zn, Ag i Cd ukazuje na vezanje za različite MT izoforme

- veliki broj pikova za Cu i Zn na AEX i CEX koloni upućuje na njihovu veliku biološku važnost u metabolizmu i funkciji mnogih citosolskih biomolekula u probavnoj žlijezdi *U. crassus*
- jedino Cs nije eluirao na AEX koloni, dok jasno vidljivi pikovi na CEX koloni upućuju na prisutnost bazičnih biomolekula odgovornih za njegovu detoksikaciju

9. Primjenom MALDI-TOF-MS tehnike nakon dvodimenzionalnog kromatografskog razdvajanja provedeno je precizno određivanje molekulskih masa i karakterizacija nekoliko odabranih biomolekula koje vežu Fe, Zn, Cu, Cd, Ag i Pb u probavnoj žlijezdi školjkaša *U. crassus*:

- analizom biomolekula VMM (~400 kDa) koje vežu Fe, primjenom MALDI-TOF MS-a utvrđena je prisutnost molekulskih iona na ~5,37 kDa i ~10,1 kDa, što odgovara četverostruko i dvostruko nabijenoj feritinskoj podjedinici od 21,6 kDa; prisutnost molekuskog iona na ~8,20 kDa odgovara trostruko nabijenoj feritinskoj podjedinici teškog lanca od 24,6 kDa
- analizom biomolekula NMM (~27,5 kDa) koje vežu Zn, Cu, Cd, Ag i Pb, primjenom MALDI-TOF MS-a utvrđena je prisutnost molekulskih iona na ~6,09 – 6,96 kDa i ~12,3 – 12,5 kDa, što odgovara monomernim i dimernim oblicima MT izoformi; prisutnost molekulskih iona na 3,8 – 4,0 kDa te 7,6 – 7,8 kDa odgovara četverostruko i dvostruko nabijenim SOD-podjedinicama, dok manji pik na 15,7 kDa ukazuje na intaktnu SOD-podjedinicu; prisutnost molekuskog iona na 7,2 kDa odgovara četverostruko nabijenoj CA izoformi

7. LITERATURA

- Adam-Guillermín C, Fournier E, Floriani M, Camilleri V, Massabuau JC, Garnier-Laplace J (2009) Biodynamics, subcellular partitioning, and ultrastructural effects of organic selenium in a freshwater bivalve. *Environmental Science and Technology* 43: 2112–2117.
- Aebersold R, Goodlett DR (2001) Mass spectrometry in proteomics. *Chemical Reviews Journal* 101: 269–295.
- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105: 121–126.
- Ahmad P, Jaleel CA, Salem MA, Nabi G, Sharma S (2010) Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Critical Reviews in Biotechnology* 30: 161–175.
- Aisen P, Enns C, Wessling-Resnick M (2001) Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 33: 940–959.
- Ajduković A (2017) Koncentracija oksidiranih proteina kod pacijenata s bolestima štitnjače. Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko–biokemijski fakultet, Zagreb.
- Almeshal W, Takács A, Aradi L, Sandil S, Dobosy P, Zárny G (2022) Comparison of freshwater mussels *Unio tumidus* and *Unio crassus* as biomonitors of microplastic contamination of Tisza River (Hungary). *Environments* 9: 122.
- Amiard JC, Amiard-Triquet C, Barka S, Pellerin J, Rainbow PS (2006) Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology* 76: 160–202.
- Amiard JC, Cosson RP (1997) Les métallothionéines. U: Lagadic L, Caquet T, Amiard JC, Ramade F (ur.) *Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects Fondamentaux*. Masson, Paris, str. 53–66.
- André C, Gagné F (2017) Cumulative effects of ibuprofen and air emersion in zebra mussels *Dreissena polymorpha*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 55: 156–164.
- Arteel GE, Sies H (2001) The biochemistry of selenium and the glutathione system. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 10: 153–158.
- Aureli A (2010) The UNESCO IHP's shared aquifer resources management global project. *AQUAmundi* 1: 1–6.

Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S (2014) Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 360438.

Aziz KHH, Mustafa FS, Omer KM, Hama S, Hamarawf RF, Rahman KO (2023) Heavy metal pollution in the aquatic environment: efficient and low-cost removal approaches to eliminate their toxicity: a review. *RSC Advances* 13: 17595.

Bai Z, Yuan Y, Yue G, Li J (2011) Molecular cloning and copy number variation of a ferritin subunit (Fth1) and its association with growth in freshwater pearl mussel *Hyriopsis cumingii*. *PLOS One* 6: e22886.

Bainy ACD, Gennari De Medeiros MH, Di Mascio P, de Almeida EA (2006) In vivo effects of metals on the acetylcholinesterase activity of the *Perna perna* mussel's digestive gland. *Biotemas* 19: 35–39.

Bakalowicz M (2005) Karst groundwater: a challenge for new resources. *Hydrogeology Journal* 13: 148–160.

Balbi T, Ciacci C, Grasselli E, Smerilli A, Voci A, Canesi L (2017) Utilization of *Mytilus* digestive gland cells for the in vitro screening of potential metabolic disruptors in aquatic invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 191: 26–35.

Balistrieri LS, Seal II RR, Piatak NM, Paul B (2007) Assessing the concentration, speciation, and toxicity of dissolved metals during mixing of acid-mine drainage and ambient river water downstream of the Elizabeth Copper Mine, Vermont, USA. *Applied Geochemistry* 22: 930–952.

Banni M, Jebali J, Daubeze M, Clerandau C, Guerbej H, Narbonne JF, Bousetta H (2005) Monitoring pollution in Tunisian coasts: Application of a classification scale based on biochemical markers. *Biomarkers* 10: 105–116.

Barth HG, Saunders GD (2012) The state of the art and future trends of size-exclusion chromatography packing and columns. *LCGC North America* 30: 544–563.

Battelli MG, Polito L, Bortolotti M, Bolognesi A (2016) Xanthine oxidoreductase-derived reactive species: Physiological and pathological effects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 3527579.

- Bautista NM, Petersen EE, Jensen RJ, Natarajan C, Storz JF, Crossly DA, Fago A (2021) Changes in hemoglobin function and isoform expression during embryonic development in the American alligator, *Alligator mississippiensis*. *American Journal of Physiology* 321: 869–878.
- Beard JL, Dawson H, Pifiero J, Are with P (1996) Iron metabolism: A comprehensive review. *Nutrition Reviews* 54: 295–317.
- Beauchemin D (2006) Inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 78: 4111–4135.
- Bebianno MJ, Langston WJ (1989) Quantification of metallothionein in marine invertebrates using differential pulse polarography. *Portugal Electrochimica Acta* 7: 59–64.
- Bellinger EG, Sigee DC (2010) *Freshwater Algae: Identification and use as bioindicators*. Wiley–Blackwell, UK.
- Benali I, Boutiba Z, Grandjean D, de Alencastro LF, Rouane–Hacene O, Chèvre N (2017) Spatial distribution and biological effects of tracemetals (Cu, Zn, Pb, Cd) and organic micropollutants (PCBs, PAHs) in mussels *Mytilus galloprovincialis* along the Algerian west coast. *Marine Pollution Bulletin* 115: 539–550.
- Bensellam M, Laybutt DR, Jonas JC (2021) Emerging roles of metallothioneins in beta cell pathophysiology: beyond and above metal homeostasis and antioxidant response. *Biology* 10: 176.
- Beone GM, Ravera O, Cenci R, Dantas M, GDigiani P (2003) Trace element concentrations in freshwater mussels and macrophytes as related to those in their environment. *Journal of Limnology* 62: 61–70.
- Beyer J, Green NW, Brooks S, Allan IJ, Ruus A, Gomes T, Bråte ILN, Schøyen M (2017) Blue mussels (*Mytilus edulis* spp.) as sentinel organisms in coastal pollution monitoring: a review. *Marine Environmental Research* 130: 338–365.
- Bibi M, Samiullah, Behlil F, Afzal S, Sahifa (2023) Essential and non-essential heavy metals sources and impacts on human health and plants. *Pure and Applied Biology* 12: 835–847.
- Binz PA, Kägi JHR (1999) Metallothionein: molecular evolution and classification. U: Klaassen C (ur.) *Metallothionein IV*. Birkhäuser Verlag, Basel, str. 7–13.
- Bonacci O, Pipan T, Culver DC (2009) A framework for karst ecohydrology. *Environmental Geology* 56: 891–900.

Bootsma DM, Macey DJ, Webb J, Talbot V (1988) Isolation and characterization of ferritin from the hepatopancreas of the mussel *Mytilus edulis*. *Biometals* 1: 106–111.

Borković SS, Kovačević TB, Perendija BR, Despotović S, Gavrić J, Pavlović S, Saičić ZS (2011) Superoxide dismutase and catalase activities in the digestive gland and gills of the freshwater bivalve *Unio Pictorum* from the Sava River. *Archives of Biological Sciences* 63: 185–192.

Botsoglou NA, Fletouris DJ, Papageorgiou GE, Vassilopoulos VN, Mantis AJ, Trakatelliss AG (1994) Rapid, sensitive, and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food, and feedstuff samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42: 1931–1937.

Bottke W, Burschik M, Volmer J (1988) On the origin of the yolk protein ferritin in snails. *Wilhelm Roux's archives of developmental biology* 197: 377–382.

Bou-Abdallah F, Santambrogio P, Levi S, Arosio P, Chasteen ND (2005) Unique iron binding and oxidation properties of human mitochondrial ferritin: a comparative analysis with Human H-chain ferritin. *Journal of Molecular Biology* 347: 543–554.

Bourdineaud J-P, Štambuk A, Šrut M, Radić Brkanac S, Ivanković D, Lisjak D, Sauerborn Klobučar R, Dragun Z, Bačić N, Klobučar G (2021) Gold and silver nanoparticles effects to the earthworm *Eisenia fetida* – the importance of tissue over soil concentrations. *Drug and Chemical Toxicology* 44: 21–29.

Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248–254.

Brian JJ, Aldridge DC (2019) Endosymbionts: An overlooked threat in the conservation of freshwater mussels? *Biological Conservation* 237: 155–165.

Brouwer M, Brouwer-Hoexum TH, Engel DW (1984) Cadmium accumulation by the blue crab *Callinectes sapidus*: involvement of hemocyanin and characterization of cadmium-binding proteins. *Marine Environmental Research* 14: 71–88.

Brucker N, do Nascimento SN, Bernardini L, Charão MF, Garcia SC (2020) Biomarkers of exposure, effect, and susceptibility in occupational exposure to traffic-related air pollution: A review. *Journal of Applied Toxicology* 40: 722–736.

- Campbell PGC, Giguère A, Bonneris E, Hare L (2005) Cadmium–handling strategies in two chronically exposed indigenous freshwater organisms – The yellow perch (*Perca flavescens*) and the floater mollusc (*Pyganodon grandis*). *Aquatic Toxicology* 72: 83–97.
- Capolupo M, Franzellitti S, Kiwan A, Valbonesi P, Dinelli E, Pignotti E, Birke M, Fabbri E (2017) A comprehensive evaluation of the environmental quality of a coastal lagoon (Ravenna, Italy): integrating chemical and physiological analyses in mussels as a biomonitoring strategy. *Science of Total Environment* 598: 146–159.
- Cardoso JCR, Ferreira V, Zhang X, Anjos L, Felix RC, Batista FM, Power DM (2019) Evolution and diversity of alpha-carbonic anhydrases in the mantle of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Scientific reports* 9: 10400.
- Caricato R, Giordano RE, Schettino T, Maisano M, Mauceri A, Giannetto A, Cappello T, Parrino V, Ancora S, Caliani I (2019) Carbonic anhydrase integrated into a multimarker approach for the detection of the stress status induced by pollution exposure in *Mytilus galloprovincialis*: A field case study. *Science of The Total Environment* 690: 140–150.
- Carignan V, Villard MC (2002) Selecting indicator species to monitor ecological integrity: A review. *Environmental Monitoring and Assessment* 78: 45–61.
- Caron A, Rosabal M, Drevet O, Couture P, Campbell PGC (2018) Binding of trace elements (Ag, Cd, Co, Cu, Ni, and Tl) to cytosolic biomolecules in livers of juvenile yellow perch (*Perca flavescens*) collected from lakes representing metal contamination gradients. *Environmental Toxicology and Chemistry* 37: 576–586.
- Carpenè E, Vašák V (1989) Hepatic metallothioneins from goldfish (*Carassius auratus* L.), *Comparative Biochemistry and Physiology B* 92: 463–468.
- Chait BT (2006) Mass spectrometry: Bottom–up or top–down? *Science* 314: 65–66.
- Chang PL, Taylor JJ (1973) Effect of chronic administration of acetylcholinesterase activity in the hypothalamus and medulla oblongata of the rat brain. An ultrastructural study. *Brain Research* 54: 75.
- Chiarelli R, Roccheri MC (2014) Marine invertebrates as bioindicators of heavy metal pollution. *Open Journal of Metal* 4: 93–106.
- Choong G, Liu Y, Templeton DM (2014) Interplay of calcium and cadmium in mediating cadmium toxicity. *Chemico-Biological Interactions* 211: 54–65.

Choubert JM, Pomiès M, Coquery M, Ruel SM (2011) Influent concentrations and removal performances of metals through municipal wastewater treatment processes. *Water Science and Technology* 63: 1967–1973.

Choudhury AKR (2006) *Textile Preparation and Dyeing*. Science Publishers, Enfield.

Cornelis R, Caruso J, Crews H, Heumann KG (2005) *Elemental speciation: Species in the environment, food, medicine and occupational health*. John Wiley & Sons, Chichester.

Cornwall R, Holland Toomey B, Bard S, Baconb C, Jarmanb WM, Epel D (1995) Characterization of multixenobioticmultidrug transport in the gills of the mussel *Mytilus californianus* and identification of environmental substrates. *Aquatic Toxicology* 31: 277–296.

Cossu C, Doyotte A, Babut M, Exinger A, Vasseur P (2000) Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediments. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 45:106–121.

Cossu C, Doyotte A, Jacquin MC, Babut M, Exinger A, Vasseur P (1997) Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 38: 122–131.

Cukrov N, Frančišković–Bilinski S, Hlača B, Barišić D (2011) A recent history of metal accumulation in the sediments of Rijeka harbor, Adriatic Sea, Croatia. *Marine Pollution Bulletin* 62: 154–167.

Čerkez T (2021) Geokemijske značajke vode i sedimenta rijeke Mrežnice. PMF–Biološki odsjek, Zagreb.

da Silva JJR, Williams RJP (2001) *The Biological Chemistry of the Elements: The Inorganic Chemistry of Life*. Oxford University Press, UK.

Daniels G (2007) Functions of red cell surface proteins. *Vox Sanguinis* 93: 331–340.

Das AK, Chakraborty R, Cervera ML, de la Guardia M (2006) Analytical techniques for the determination of bismuth in solid environmental samples. *Trends in Analytical Chemistry* 25: 599–608.

Das S, Jana BB (1999) Dose-dependent uptake and Eichhornia-induced elimination of cadmium in various organs of the freshwater mussel, *Lamellidens marginalis* (Linn.). *Ecological Engineering* 12: 207–229.

Dautović J (2006) Determination of metals in natural waters using high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry. Sveučilište u Zagrebu

Dautović J, Fiket Ž, Barešić J, Ahel M, Mikac N (2014) Sources, distribution and behaviour of major and trace elements in a complex karst lake system. *Aquatic Geochemistry* 20: 19–38.

de la Calle Guntiñas MB, Bordin G, Rodriguez AR (2002) Identification, characterization and determination of metal binding proteins by liquid chromatography. A review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 374: 369–378.

de la Calle Guntiñas MB, Bordin G, Rodriguez AR (2004) Study of the feasibility of using a pellicular anion–exchange column for separation of transferrin isoforms in human serum by HPLC with UV detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378: 383–387.

de Lafontaine Y, Gagné F, Blaise C, Costan G, Gagnon P, Chan HM (2000) Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St. Lawrence River (Canada). *Aquatic Toxicology* 50: 51–71.

Decena SC, Arguilles M, Robel L (2018) Assessing heavy metal contamination in surface sediments in an urban river in the Philippines. *Polish Journal of Environmental Studies* 27: 1983–1995.

DeForest DK, Meyer JS (2015) Critical Review: Toxicity of Dietborne Metals to Aquatic Organisms. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 45: 1176–1241.

Delafiori J, Ring G, Furey A (2016) Clinical applications of HPLC–ICP–MS element speciation: A review. *Talanta* 153: 306–331.

del Rio GF (2016) Transcriptomic approach of the response to metals in the hydrothermal mussel *Bathymodiolus azoricus*. Doktorski rad (original na Engleskom jeziku). Pariz: Universite Pierre et Marie Curie – Paris VI .

Dimitriadis VK, Domouhtsidou GP, Cajaraville MP (2004) Cytochemical and histochemical aspects of the digestive gland cells of the mussel *Mytilus galloprovincialis* L. in relation to function. *Journal of Molecular Histology* 35: 501–509.

Dondero F, Piacentini L, Banni M, Rebelo M, Burlando B, Viarengo A (2005) Quantitative PCR analysis of two molluscan metallothionein genes unveils differential expression and regulation. *Gene* 345: 259–270.

Doige CA, Sharom FJ (1991) Strategies for the purification of P-glycoprotein from multidrug-resistant Chinese hamster ovary cells. *Protein Expression and Purification* 2: 256–265.

Doyen P, Morhain E, Rodius F (2015) Modulation of metallothionein, pi-GST and Se-GPx mRNA expression in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha* transplanted into polluted areas. *AIMS Environmental Science* 2: 333–344.

Doyotte A, Cossu C, Jacquin MC, Babut M, Vasseur P (1997) Antioxidant enzymes, glutathione, and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Aquatic Toxicology* 39: 93–110.

Dragun Z, Erk M, Ivanković D, Žaja R, Filipović–Marijić V, Raspor B (2010) Assessment of low-level metal contamination using the Mediterranean mussel gills as the indicator tissue. *Environmental Science and Pollution Research* 17: 977–986.

Dragun Z, Krasnići N, Kolar N, Filipović Marijić V, Ivanković D, Erk M (2018) Cytosolic distributions of highly toxic metals Cd and Tl and several essential elements in the liver of brown trout (*Salmo trutta* L.) analyzed by size exclusion chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Chemosphere* 207: 162–173.

Dragun Z, Krasnići N, Ivanković D, Filipović Marijić V, Mijošek T, Redžović Z, Erk M (2020) Comparison of intracellular trace element distributions in the liver and gills of the invasive freshwater fish species, Prussian carp (*Carassius gibelio* Bloch, 1782). *Science of the Total Environment* 730: 138923.

Dragun Z, Stipaničev D, Fiket Ž, Lučić M, Udiković Kolić N, Puljko A, Repec S, Šoštarić Vulić Z, Ivanković D, Barac F, Kiralj Z, Kralj T, Valić D (2022a) Yesterday's contamination—A problem of today? The case study of discontinued historical contamination of the Mrežnica River (Croatia). *Science of the Total Environment* 848.

Dragun Z, Ivanković D, Krasnići N, Kiralj Z, Cvitanović M, Karamatić I, Valić D, Barac F, Filipović Marijić V, Mijošek T, Gjurčević E, Matanović K, Kužir S (2022b) Metal-binding biomolecules in the liver of the northern pike (*Esox lucius* Linnaeus 1758): The first data for the family Esocidae. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 257: 109327.

Dragun Z, Kiralj Z, Pećnjak A, Ivanković D (2024) The study of acidic/basic nature of metallothioneins and other metal-binding biomolecules in the soluble hepatic fraction of the northern pike (*Esox lucius*). *International Journal of Biological Macromolecules* 256: 128209.

- Dragun Z, Kiralj Z, Fiket Ž, Ivanković D (2025) Preliminary insight into the intracellular behaviour of rare earths and other technology-critical elements (TCEs) in northern pike liver: study of TCE-binding biomolecules via size-exclusion HPLC-ICP-MS. *Environmental Science: Processes and Impacts* 27:262–276.
- Dudgeon D, Arthington AH, Gessner MO, Kawabata ZI, Knowler DJ, Lévêque C, Naiman RJ, Prieur–Richard AH, Soto D, Stiassny MLJ, Sullivan CA (2006) Freshwater biodiversity: importance, threats, status, and conservation challenges. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 81: 163–182.
- Durand JP, Goudard F, Barbot C, Pieri J, Fowler SW, Cotret O (2002) Ferritin and hemocyanin: 210Po molecular traps in marine fish, oyster and lobster. *Marine Ecology Progress Series* 233: 199–205.
- El Haimeur B, Bouhallaoui M, Zbiry M, Elkhiaati N, Talba S, Sforzini S, Viarengo A, Benhra A (2017) Use of biomarkers to evaluate the effects of environmental stressors on *Mytilus galloprovincialis* sampled along the Moroccan coasts: integrating biological and chemical data. *Marine Environmental Research* 130: 60–68.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7: 88–95.
- Enayati AA, Ranson H, Hemingway J (2005) InSEt glutathione transferases and inSEticide resistance. *InSEt Molecular Biology* 14: 3–8.
- Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin–Burns N (2001) Toxic metals and oxidative stress part i: mechanisms involved in metal–induced oxidative damage. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 1: 529–539.
- Ericson LE, Nihlen H (1953) Electrophoretic studies of cobalamins. *Acta Chemica Scandinavica* 7: 980–983.
- Erk M, Ivanković D, Raspor B, Pavičić J (2002) Evaluation of different purification procedures for the electrochemical quantification of mussel metallothioneins. *Talanta* 57: 1211–1218.
- Erk M, Ivanković D, Župan I, Čulin J, Dragun Z, Puljas S, Peharda M (2018) Changes in the tissue concentrations of trace elements during the reproductive cycle of Noah’s Ark shells (*Arca noae* Linnaeus, 1758). *Marine Pollution Bulletin* 133: 357–366.
- Esterbauer H, Cheeseman KH (1990) Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4–hydroxynonenal. *Methods in Enzymology* 186: 407–421.

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 L. 226: 1–17.

Faggio C, Tsarpali V, Dailianis S (2018) Mussel digestive gland as a model tissue for assessing xenobiotics: An overview. *Science of Total Environment* 636: 220–229.

Fahey RC, Sundquist AR (1991) Evolution of glutathione metabolism. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* 64: 1–53.

Falfushynska H, Gnatyshyna L, Pryidun K, Dedourge O, Stoliar O, Geffard A (2009) Variability of metallothioneins in freshwater bivalve *Anodonta cygnea* (Unionidae) from two feral populations. *Biology Series* 51: 28–36.

Falfushynska HI, Gnatyshyna LL, Farkas A, Vehivszky A, Gyori J, Stoliar OB (2010a) Vulnerability of biomarkers in the indigenous mollusk *Anodonta cygnea* to spontaneous pollution in a transition country. *Chemosphere* 81: 1342–1349.

Falfushynska HI, Gnatyshyna LL, Stoliar OB, Dedourge–Geffard O, Geffard A (2010b) Application of a multi–marker approach for assessment of stress syndrome in transplanted mussels *Dreissena polymorpha*. *Studia Biologica* 4: 27–36.

Falfushynska HI, Gnatyshyna LL, Stoliar OB (2013) Effect of in situ exposure history on the molecular responses of freshwater bivalve *Anodonta anatina* (Unionidae) to trace metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 89: 73–83.

Falfushynska HI, Gnatyshyna LL, Gyori J, Stoliar OB (2014) Metallothioneins, Caspase–3 and oxidative stress responses in the multi–marker study of freshwater mussel inhabiting sites of various human impact. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 14: 591–603.

Faria M, Carrasco L, Diez S, Riva MC, Bayona JM, Barata C (2009) Multi–biomarker responses in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* exposed to polychlorobiphenyls and metals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 149: 281–288.

Farombi EO, Adelowo OA, Ajimoko YR (2007) Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in African catfish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 4: 158–165.

- Ferrarello CN, Fernández de la Campa MDR, Muñiz CS, Sanz-Medel A (2000) Metal distribution patterns in the mussel *Mytilus edulis* cytosols using size-exclusion chromatography and double focusing ICP-MS detection. *Analyst* 125: 2223–2229.
- Ferrarello CN, Fernández de la Campa MR, Carrasco JF, Sanz-Medel A (2002a) Speciation of metallothionein-like proteins of the mussel *Mytilus edulis* by orthogonal separation mechanisms with inductively coupled plasma-mass spectrometry detection: effect of selenium administration. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 57: 439–449.
- Ferrarello CN, Fernandez de la Campa MR, Sanz-Medel A (2002b) Multielement trace-element speciation in metal-biomolecules by chromatography coupled with ICP-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 373: 412–421.
- Fiket Ž, Ivanić M, Furdek Turk M, Mikac, N, Kniewald G (2018) Distribution of trace elements in waters of the Zrmanja river estuary (eastern Adriatic coast, Croatia). *Croatia Chemica Acta* 91: 29–41.
- Fitzpatrick PJ, Sheehan D (1993) Separation of multiple forms of glutathione S-transferase from the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Xenobiotica* 23: 851–861.
- Fontecave M, Pierre JL (1991) Iron metabolism: the low-molecular-mass iron pool. *Biological Metals* 4: 133–135.
- Fowler BA, Hildebrand CE, Kojima Y, Webb M (1987) Nomenclature of metallothioneins. U: Kägi JHR, Kojima Y (ur.) *Metallothionein II*. Birkhäuser Verlag, Basel, str. 19–22.
- Foyer CH, Noctor G (2011) Ascorbate and glutathione: The heart of the redox hub. *Plant Physiology* 155: 2–18.
- Frančišković-Bilinski S (2008) Detection of coal combustion products in stream sediments by chemical analysis and magnetic-susceptibility measurements. *Mineralogical Magazine* 72:43–48.
- Frančišković-Bilinski S, Bilinski H, Maldini K, Milović S, Zhang Q, Appel E (2017) Chemical and magnetic tracing of coal slag pollutants in karstic river sediments. *Environmental Earth Sciences* 76:476.
- Fraústo da Silva JJR, Williams RJP (2001) *The biological chemistry of the elements: the inorganic chemistry of life*. Oxford University Press, New York, SAD.

- Furey NM, Mackie IJ, Racey PA (2010) Bat diversity in Vietnamese limestone karst areas and the implications of forest degradation. *Biodiversity and Conservation* 19: 1821–1838.
- Gaetke LM, Chow-Johnson HS, Chow CK (2014) Copper: toxicological relevance and mechanisms. *Archives of Toxicology* 88: 1929–1938.
- Gaillardet J, Veirs J, Dupre B (2003): Trace elements in river water. U: Drever JI (ur.) *Surface and groundwater, weathering and soils*. Elsevier, Amsterdam, str. 225–272.
- Galaris D, Evangelou A (2002) The role of oxidative stress in mechanisms of metal-induced carcinogenesis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 42: 93–103.
- Georgieva E, Antal L, Stoyanova S, Aranudova D, Velcheva I, Iliev I, Vasileva, T (2022) Biomarkers for pollution in caged mussels from three reservoirs in Bulgaria: A pilot study. *Heliyon* 8: e10916.
- Geret F, Cosson RP (2002) Induction of Specific Isoforms of Metallothionein in Mussel Tissues After Exposure to Cadmium or Mercury. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 42: 36–42.
- Glorieux C, Calderon PB (2017) Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Journal of Biological Chemistry* 398: 1095–1108.
- Gomes T, Pinheiro JP, Cancio I, Pereira CG, Cardoso C, Bebianno MJ (2011) Effects of copper nanoparticles exposure in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environmental Science and Technology* 45: 9356–9362.
- Gonçalves AMM, Rocha CP, Marques JC, Gonçalves FJM (2021) Enzymes as useful biomarkers to assess the response of freshwater communities to pesticide exposure – A review. *Ecological Indicators* 122: 107303.
- Greco V, Piras C, Pieroni L, Ronci M, Putignani L, Roncada P, Urbani A (2018) Applications of MALDI–TOF mass spectrometry in clinical proteomics. *Expert Review of Proteomics* 15: 683–696.
- Guidi P, Frenzilli G, Benedetti M, Bernardeschi M, Falleni A, Fattorini D, Regoli F, Scarcelli V, Nigro M (2010) Antioxidant, genotoxic and lysosomal biomarkers in the freshwater bivalve (*Unio pictorum*) transplanted in a metal polluted river basin. *Aquatic Toxicology* 100: 75–83.

Gupta SK, Singh J (2011) Evaluation of mollusc as sensitive indicator of heavy metal pollution in aquatic systems: A review. IIOAB Journal 2: 49–57.

Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione S–transferase. Journal of Biological Chemistry 25: 7130–7139.

Halamić J, Peh Z, Miko S, Galović L, Šorša A (2012) Geochemical atlas of Croatia: Environmental implications and geodynamical thread. Journal of Geochemical Exploration 115: 36–46.

Halliwell B, Gutteridge JMC (2007) Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, New York, SAD.

Hambach R, Lison D, D'Haese PC, Weyler J, De Graef E, De Schryver A, Lamberts LV, van Sprundel M (2013) Co–exposure to lead increases the renal response to low levels of cadmium in metallurgy workers. Toxicology Letters 222: 233–238.

Hanna NS, Shekha YA (2024) Acute toxicity of chlorpyrifos on the freshwater bivalves (*Unio tigridis*) and effects on bioindicators. Baghdad science Journal 21: 14.

Haraguchi H (2004) Metallomics as integrated biometal science. Journal of Analytical Atomic Spectrometry 19:5–14.

Hartl FU, Bracher A, Hayer–Hartl M (2011) Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. Nature 475: 324–332.

Hauser-Davis RA, Lavradas RT, Monteiro F, Rocha RCC, Bastos FF, Araújo GF, Sales Júnior SF, Bordon IC, Correia FV, Saggioro EM, Saint’Pierre TD, Godoy JM (2021) Biochemical metal accumulation effects and metalloprotein metal detoxification in environmentally exposed tropical *Perna perna* mussels. Ecotoxicology and Environmental Safety 208.

Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR (2005) Glutathione transferases. Annual Review of Pharmacology and Toxicology 45: 51–88.

He S, Peng K, Hong Y, Wang J, Sheng J, Gu Q (2013) Molecular properties and immune defense of two ferritin subunits from freshwater pearl mussel, *Hyriopsis schlegelii*. Fish and Shellfish Immunology 34: 865–874.

Herath HB, Elvitigala DAS, Godahewa GI, Whang I, Lee J (2015). Molecular insights into a molluscan transferrin homolog identified from disk abalone (*Haliotis discus discus*) evidencing

its detectable role in host antibacterial defense. *Developmental and Comparative Immunology*, 53: 222–233.

High KA, Barthet VJ, McLaren JW, Blais JS (1997) Characterization of metallothionein-like proteins from zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 16: 1111–1118.

Ho E, Hayen A, Wilkins MR (2006) Characterisation of organellar proteomes: a guide to subcellular proteomic fractionation and analysis. *Proteomics* 6: 5746–5757.

Hochwald S (2001) Plasticity of life-history traits in *Unio crassus*. U: Bauer G, Wächtler K (ur.) *Ecology and evolution of the freshwater mussels Unionoida*. Springer, Berlin, Heidelberg, str. 127–141.

Holt EA, Miller SW (2011) Bioindicators: using organisms to measure environmental impacts. *Nature Education Knowledge* 2: 8.

Hong P, Koza S, Bouvier ESP (2012) Size exclusion chromatography for the analysis of protein biotherapeutics and their aggregates. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 35: 2923–2950.

Hossain MA, Chowdhury T, Chowdhury G, Schneider P, Hussain M, Das B, Iqbal MM (2023) Impact of Pb toxicity on the freshwater pearl mussel, *Lamellidens marginalis*: growth metrics, hemocyto-immunology, and histological alterations in gill, kidney, and muscle tissue. *Toxics* 11: 475.

Howard JK, Cuffey KM (2006) The functional role of native freshwater mussels in the fluvial benthic environment. *Freshwater Biology* 51: 460–474.

Huang HQ, Xiao ZQ, Chen X, Lin QM, Cai Z–W, Chen P (2004) Characteristics of structure, composition, mass spectra, and iron release from the ferritin of shark liver (*Sphyrna zygaena*). *Biophysical chemistry* 111: 213–22.

Huebner JD, Pynnonen KS (1992) Viability of glochidia of two species of *Anodonta* exposed to low pH and selected metals. *Canadian Journal of Zoology* 70: 2348–2355.

Hurley RR, Rothwell JJ, Woodward JC (2017) Metal contamination of bed sediments in the irwell and upper Mersey catchments, Northwest England: exploring the legacy of industry and urban growth. *Journal of Soils and Sediments* 17: 2648–2665.

Hyne RV, Maher WA (2003) Invertebrate biomarkers: Links to toxicosis that predict population decline. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54: 366–374.

Iavicoli I, Leso V, Schulte PA (2016) Biomarkers of susceptibility: State of the art and implications for occupational exposure to engineered nanomaterials. *Toxicology and Applied Pharmacology* 299: 112–24.

IUCN (2024) The IUCN Red List of Threatened Species Version 2024–2.

Ivanić M, Durn G, Škapin SD, Sondi I (2020) Size-related mineralogical and surface physicochemical properties of the mineral particles from the recent sediments of the eastern Adriatic Sea. *Chemosphere* 249: 126531.

Ivanković D, Pavičić J, Beatović V, Klobučar RS, Klobučar GIV (2010) Inducibility of metallothionein biosynthesis in the whole soft tissue of zebra mussels *Dreissena polymorpha* exposed to cadmium, copper, and pentachlorophenol. *Environmental Toxicology* 25:198–211.

Ivanković D, Pavičić J, Erk M, Filipović–Marijić V, Raspor B (2005) Evaluation of the *Mytilus galloprovincialis* Lam. digestive gland metallothionein as a biomarker in a long-term field study: Seasonal and spatial variability. *Marine Pollution Bulletin* 50:1303–1313.

Izvor 1. (2012) Rijekom Mrežnicom pluta nepoznata bijela mrlja. <https://www.vecernji.hr/vijesti/rijekom-mreznicom-pluta-nepoznata-bijela-mrlja-438595/galerija-24945?page=5>

Izvor 2. <https://geoportal.dgu.hr/>

Jain S, Jain A (2023) A brief review on different chromatography techniques. *Journal of pharma insights and research* 2: 72–77.

Jebali J, Banni M, Guerbej H, Almeida EA, Bannaoui A, Boussetta H (2006) Effects of malathion and cadmium on acetylcholinesterase activity and metallothionein levels in the fish *Seriola dumerilli*. *Fish Physiology and Biochemistry* 32: 93–98.

Jeddi ZM, Hopf NB, Viegas S, Price AB, Pains A, van Thriel C, Benfenati E, Ndaw S, Bessems J, Behnisch PA, Leng G, Duca RC, Verhagen H, Cubadda F, Brennan L, Ali I, David A, Mustieles V, Fernandez MF, Louro H, Pasanen–Kase R (2021) Towards a systematic use of effect biomarkers in population and occupational biomonitoring. *Environment International* 146: 106257.

Jeffree RA, Markich SJ, Brown PL (1993) Comparative accumulation of alkaline–earth metals by two freshwater mussel species from the Nepean River, Australia: Consistencies and a resolved paradox. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 44: 609–643.

Jeong H, Byeon E, Kim DH, Maszczyk P, Lee JS (2023) Heavy metals and metalloid in aquatic invertebrates: A review focused on the effects of single/mixed forms combined with environmental factors and pollutants. *Marine Pollution Bulletin*. 191: 114959.

Jozefczak M, Remans T, Vangronsveld J, Cuypers A (2012) Glutathione is a key player in metal–induced oxidative stress defenses. *International Journal of Molecular Sciences* 13: 3145–3175.

Kaizer RR, Corrêa MC, Spanevello RM, Morsch VM, Mazzanti CM, Gonçalves JF, Schetinger MRC (2005) Acetylcholinesterase activation and enhanced lipid peroxidation after long-term exposure to low levels of aluminum on different mouse brain regions. *Journal of Inorganic Biochemistry* 99: 1865–1870.

Karas M, Bachmann D, Bahr U, Hillenkamp F (1987) Matrixassisted ultraviolet laser desorption of non–volatile compounds. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 78: 53–68.

Kastner M (2000) *Protein liquid chromatography*. Elsevier, Amsterdam.

Katsallah GIM, Rukayya M, Sambo D, Sule TG (2013) Comparative metal analysis of the soft tissues of three species of Anodonta (class: Bivalvia) from kubanni lake in zaria nigeria. *Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology* 6: 18–23.

Kelly KA, Havrilla CM, Brady TC, Abramo KH, Levin ED (1998) Oxidative stress intoxicology: Established mammalian and emerging piscine model systems. *Environmental Health Perspectives* 106:375–384.

Khoma VV (2019) The content of metals in metallothioneins of the bivalve mollusk *Unio tumidus* depending on different in situ and in vitro exposures. *Studia Biologica* 13:61–70.

Khudhur SM, Shekha YA (2019) Histopathological and biochemical biomarker response of mussel, *Unio pictorum*, to carbamate pesticide carbaryl: A laboratory study. *Indian Journal of Animal Research* 1–5.

Kiraga J, Mackiewicz P, Mackiewicz D, Kowalczyk M, Biecek P, Polak N, Smolarczyk K, Dudek MR, Cebrat S (2007) The relationships between the isoelectric point and: length of proteins, taxonomy and ecology of organisms. *BMC Genomics* 8: 163.

- Klotz LO, Krö KD, Buchczyk DP, Sies H (2003) Role of copper, zinc, selenium and tellurium in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress. *Journal of Nutrition* 133: 1448–1451.
- Koorts AM, Viljoen M (2007) Ferritin and ferritin isoforms I: Structure-function relationships, synthesis, degradation and SEretion. *Archives of Physiology and Biochemistry* 113:30–54.
- Kopecka–Pilarczyk J (2010) The effect of pesticides and metals on acetylcholinesterase (AChE) in various tissues of blue mussel (*Mytilus trossulus* L.) in short-term in vivo exposures at different temperatures. *Journal of Environmental Science and Health Part B* 45: 336–346.
- Köprücü K, Yonar SM, Şeker E (2010) Effects of cypermethrin on antioxidant status, oxidative stress biomarkers, behavior, and mortality in the freshwater mussel *Unio elongatulus eucirrus*. *Fisheries Science Research* 76: 1007–1013.
- Koukouzika N, Dimitriadis V (2005) Multiple biomarker comparison in *Mytilus galloprovincialis* from the Greece coast: lysosomal membrane stability, neutral red retention, micronucleus frequency and stress on stress. *Ecotoxicology* 14: 449–463.
- Krasnići N, Dragun Z, Erk M, Ramani S, Jordanova M, Rebok K, Kostov V (2018) Size-exclusion HPLC analysis of trace element distributions in hepatic and gill cytosol of Vardar chub (*Squalius vardarensis* Karaman) from mining impacted rivers in north-eastern Macedonia. *Science of the Total Environment* 613–614:1055–1068.
- 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, Kazazić S, Muharemović H, Erk M, Jordanova M, Rebok K, Kostov V (2019) Characterization and identification of selected metal-binding biomolecules from hepatic and gill cytosols of Vardar chub (*Squalius vardarensis* Karaman, 1928) by various techniques of liquid chromatography and mass spectrometry. *Metallomics* 11:1060–1078.
- Krishnamurthy P, Wadhwani A (2012) Antioxidant enzymes and human health. Antioxidant enzyme. InTechOpen, London, UK.
- Kristan U, Planinšek P, Benedik L, Falnoga I, Stibilj V (2015) Polonium–210 and selenium in tissues and tissue extracts of the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Gulf of Trieste). *Chemosphere* 119: 231–241.

- Křížková S, Zítka O, Adam V, Beklová M, Horna A, Svobodová Z (2007) Possibilities of electrochemical techniques in metallothionein and lead detection in fish tissues. *Czech Journal of Animal Science* 52: 143–148.
- Kucuksezgin F, Uluturhan E, Batki H (2008) Distribution of heavy metals in water, particulate matter and sediments of Gediz River (Eastern Aegean). *Environmental Monitoring and Assessment* 141: 213–225.
- Kumar Jaiswal A, Kumar Vidua R, Kumar A, Jaiswal AI, Sharma D, Iftishna I, Vidua R, Kumar A (2012) Thallium poisoning: Analytical aspects with brief overview. *Journal of South India Medicolegal Association* 4: 68–75.
- Kurotani A, Tokmakov AA, Sato K-I, Stefanov VE, Yamada Y, Sakurai T (2019) Localization-specific distributions of protein pI in human proteome are governed by local pH and membrane charge. *BMC Molecular and Cell Biology* 20: 36.
- Labieniec M, Gabryelak T (2007) Antioxidative and oxidative changes in the digestive gland cells of freshwater mussels *Unio tumidus* caused by selected phenolic compounds in the presence of H₂O₂ or Cu²⁺ ions. *Toxicology in Vitro* 21:146–156.
- Ladeira C, Viegas S (2016) Human Biomonitoring—An overview on biomarkers and their application in occupational and environmental health. *Biomonitoring* 3: 15–24.
- Lajtner J, Maguire I, Klobučar GIV, Jelić M, Crnčan P (2010) NATURA 2000 Rasprostranjenost vrste *Unio crassus* u Hrvatskoj. Emys, Zagreb.
- Lan J, Zenobi R (2019) Characterizing the iron loading pattern of ferritin using high-mass matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry* 33: 1855–1860.
- Langston WJ, Bebianno MJ, Burt GR (1998) Metal handling strategies in molluscs. U: Langston WJ, Bebianno MJ (ur.) *Metal Metabolism in Aquatic Environments*. Chapman and Hall, London, str. 219–283.
- Langston WJ, Chesman BS, Burt GR, Pope ND, Mcevoy J (2002) Metallothionein in liver of eels *Anguilla anguilla* from the Thames Estuary: an indicator of environmental quality? *Marine Environmental Research* 53: 269–293.
- Large AT, Connock MJ (1993) Aromatic alcohol oxidase and aldehyde oxidase activities in the digestive gland of three species of terrestrial gastropod (*Helix aspersa*, *Arion ater*, *Limax flavus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 104: 489–491.

Lathe GH, Ruthven CRJ (1956) The separation of substances and estimation of their relative molecular sizes by the use of columns of starch in water. *Biochemical Journal* 62: 665–674.

Lavradas RT, Rocha RCC, Saint' Pierre TD, Godoy JM, Hauser-Davis RA (2016) Investigation of thermostable metalloproteins in *Perna perna* mussels from differentially contaminated areas in Southeastern Brazil by bioanalytical techniques. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 34:70–78.

Lecoeur S, Videmann B, Berny P (2004) Evaluation of metallothionein as a biomarker of single and combined Cd/Cu exposure in *Dreissena polymorpha*. *Environmental Research* 94: 184–191.

Lemire JA, Harrison JJ, Turner RJ (2013) Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nature Reviews Microbiology* 11: 371–384.

Leonard SS, Harris GK, Shi X (2004) Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radical Biology and Medicine* 37: 1921–1942.

Letendre J, Chouquet B, Rocher B, Manduzio H (2008) Differential pattern of Cu/Zn superoxide dismutase isoforms in relation to tidal spatio-temporal changes in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 148: 211–216.

Li D, Pan B, Chen L, Wang Y, Wang T, Wang J, Wang H (2021) Bioaccumulation and human health risk assessment of trace metals in the freshwater mussel *Cristaria plicata* in Dongting Lake, China. *Journal of Environmental Sciences* 104: 335–350.

Li W, Zhang W, Shan B, Sun B, Guo X, Li Z (2022) Risk assessment of heavy metals in suspended particulate matter in a typical urban river. *Environmental Science and Pollution Research* 29: 46649–46664.

Li Y, Schellhorn H (2007) Rapid kinetic microassay for catalase activity. *Journal of Biomolecular Techniques* 18: 185–187.

Liao HW, Jiang ZC, Zhou H, Qin XQ, Huang QB, Zhong L, Pu ZG (2022) Dissolved heavy metal pollution and assessment of a karst basin around a mine, southwest China. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 19: 14293.

Liao Y, Liu K, Ren T, Zhang Z, Ma Z, Dan SF, Zhu P (2021). The characterization, expression and activity analysis of three superoxide dismutases in *Eriocheir hepensis* under azadirachtin stress. *Fish and Shellfish Immunology*, 117: 228–239.

Lionetto MG, Caricato R, Calisi A, Giordano ME, Schettino T (2013) Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: new insights and future perspectives. *BioMed Research International* 2013: 321213.

Lionetto MG, Caricato R, Giordano ME, Schettino T (2004) Biomarker application for the study of chemical contamination risk on marine organisms in the Taranto marine coastal area. *Chemistry and Ecology* 20: 333–343.

Lionetto MG, Caricato R, Giordano ME, Schettino T (2016) The complex relationship between metals and carbonic anhydrase: new insights and perspectives. *International Journal of Molecular Sciences* 17: 127.

Liu Y, Wu Z, Guo K, Zhou Y, Xing K, Zheng J, Sun Y, Zhang J (2022) Metallothionein–1 gene from *Exopalaemon carinicauda* and its response to heavy metal ions challenge. *Marine Pollution Bulletin* 175: 113324.

Lobinski R, Becker JS, Haraguchi H, Sarkar B (2010) Metallomics: guidelines for terminology and critical evaluation of analytical chemistry approaches (IUPAC technical report). *Pure and Applied Chemistry* 82: 493–504.

Lobiński R, Szpunar J (1999) Biochemical speciation analysis by hyphenated techniques. *Analytica Chimica Acta* 400: 321–332.

Lopes-Lima M, Sousa R, Geist J, Aldridge DC, Araujo R, Bergengren J, Bespalaya Y, Bodis E, Burlakova L, Van Damme D, Douda K, Froufe E, Georgiev D, Gumpinger C, Karatayev A, Kebapci U, Killeen I, Lajtner J, Larsen BM, Lauceri R, Legakis A, Lois S, Lundberg S, Moorkens E, Motte G, Nagel KO, Ondina P, Outeiro A, Paunovic M, Prie V, von Proschwitz T, Riccardi N, Rudzīte M, Rudzītis M, Scheder C, Seddon M, Sereflisan H, Simić V, Sokolova S, Stoeckl K, Taskinen J, Teixeira A, Thielen F, Trichkova T, Varandas S, Vicentini H, Zajac K, Zajac T, Zogaris S (2016) Conservation Status of Freshwater Mussels in Europe: State of the Art and Future Challenges. *Biological Reviews* 92: 572–607.

Lučić, M., Mikac, N., Bačić, N., Vdović, N., 2021. Appraisal of geochemical composition and hydrodynamic sorting of the river suspended material: application of time-integrated suspended sediment sampler in a medium-sized river (the Sava River catchment). *Journal of Hydrology* 597: 125768.

Lushchak VI (2011) Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology* 1: 13–30.

- Machado AAS, Wood CM, Bianchini A, Gillis PL (2014) Responses of biomarkers in wild freshwater mussels chronically exposed to complex contaminant mixtures. *Ecotoxicology* 23:1345–1358.
- Mackay EA, Dunbar B, Davidson I, Fothergill JE (1990) Polymorphism of cadmium–induced mussel metallothionein. *Experientia* 46: 36.
- Mackay EA, Overnell J, Dunbar B, Davidson I, Hunziker PE, Kagi JHR, Fothergill JE (1993) Complete amino acid sequences of five dimeric and four monomeric forms of metallothionein from the edible mussel *Mytilus edulis*. *European Journal of Biochemistry* 218: 183–194.
- Maity B, Hishikawa Y, Lu D, Ueno T (2019) Recent progresses in the accumulation of metal ions into the apo-ferritin cage: Experimental and theoretical perspectives. *Polyhedron* 172: 104–111.
- Maldini K, Cukrov N, Pikelj K, Matić N, Mlakar M (2023) Geochemistry of metals and organic matter in water and sediments of the karst river Cetina, Croatia. *Water* 15: 1429.
- Manahan SE (2003) *Toxicological chemistry and biochemistry*. CRC Press Company, Boca Raton, Florida.
- Maradin M (2007) *Mrežnica – važnost rijeke u kršu*. Zagreb: Geografski odsjek Prirodoslovno matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Hrvatsko geografsko društvo.
- Margoshes M, Vallee BL (1957) A cadmium protein from equine kidney cortex. *Journal of the American Chemical Society* 79: 4813–4814.
- Marigómez I, Zorita I, Izagirre U, Ortiz–Zarragoitia M, Navarro P, Etxebarria N, Orbea A, Soto M, Cajaraville MP (2013) Combined use of native and caged mussels to assess biological effects of pollution through the integrative biomarker approach. *Aquatic Toxicology* 136–137: 32–48.
- Markich SJ, Jeffree RA (1994) Absorption of divalent trace metals as analogues of calcium by Australian freshwater bivalves: an explanation of how water hardness reduces metal toxicity. *Aquatic Toxicology* 29: 257–290.
- Marrocco I, Altieri F, Peluso I (2017) Measurement and clinical significance of biomarkers of oxidative stress in humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017: 6501046.
- Martins J, Campos A, Osório H, da Fonseca R, Vasconcelos V (2014) Proteomic Profiling of Cytosolic Glutathione Transferases from Three Bivalve Species: *Corbicula fluminea*, *Mytilus*

galloprovincialis and *Anodonta cygnea*. International Journal of Molecular Sciences. 15: 1887–1900.

Martins M, Costa PM, Raimundo J, Vale C, Ferreira AM, Costa MH (2012) Impact of remobilized contaminants in *Mytilus edulis* during dredging operations in a harbour area: bioaccumulation and biomarker responses. Ecotoxicology and Environmental Safety 85: 96–103.

Mason AZ, Jenkins KD (1995) Metal detoxification in aquatic organisms. U: Tessier A, Turner DR (ur.) Metal speciation and bioavailability in aquatic systems. IUPAC, Wiley, New York, str. 479–608.

Matas M (2009) Krš Hrvatske – geografski pregled i značenje, Hrvatsko geografsko društvo, Split.

Mayer FL, Versteeg DJ, McKee MJ, Folmar LC, Graney RL, McCume DC, Rattner BA (1992) Physiological and nonspecific biomarkers. U: Huggett RJ, Kimerle RA, Mehrle Jr. PM, Bergman HL (ur.) Biomarkers. Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. Lewis Publishers, SAD, str. 5–85.

Mendel RR (2013) Metabolism of molybdenum. U: Banci L (ur.) Metallomics and the cell. Metal ions in life sciences. Springer, Dordrecht, str. 503–528.

Mijošek T, Filipović Marijić V, Dragun Z, Krasnići N, Ivanković D, Erk M (2019) Evaluation of multi-biomarker response in fish intestine as an initial indication of anthropogenic impact in the aquatic karst environment. Science of the Total Environment 660: 1079–1090.

Mijošek T, Filipović Marijić V, Dragun Z, Ivanković D, Krasnići N, Redžović Z, Sertić Perić M, Vidović N, Bačić N, Dautović J, Erk M (2020) The assessment of metal contamination in water and sediments of the lowland Ilova River (Croatia) impacted by anthropogenic activities. Environmental Science and Pollution Research 27: 25374–25389.

Mijošek T, Kljaković-Gašpić Z, Kralj T, Valić D, Redžović Z, Šariri S, Karamatić I, Filipović Marijić V (2023) Spatial and temporal variability of dissolved metal(loid)s in water of the karst ecosystem: consequences of long-term exposure to wastewaters. Environmental Technology and Innovation 32: 103254.

Mikac I, Fiket Ž, Terzić S, Barešić J, Mikac N, Ahel M (2011) Chemical indicators of anthropogenic impacts in sediments of the pristine karst lakes. Chemosphere 84: 1140–1149.

- Mikkelsen K, Apostolopoulos V (2019) Vitamin B12, folic acid, and the immune system. In: Mahmoudi M, Rezae N (ur.) Nutrition and immunity. Springer, Cham, str. 103–114.
- Mir ZA, Arafat MY, Bakhtiyar Y (2021) Benthic macroinvertebrates as bioindicators of water quality in freshwater bodies. U: Dar GH, Hakeem KR, Mehmood MA, Qadri H (ur.) Freshwater pollution and aquatic ecosystems. Apple academic press, Canada, str. 165–184.
- Mitra S, Chakraborty AJ, Tareq AM, Emran TB, Nainu F, Khusro A, Idris AM, Khandaker MU, Osman H, Alhumaydhi FA, Simal–Gandara J (2022) Impact of heavy metals on the environment and human health: Novel therapeutic insights to counter the toxicity. Journal of King Saud University – Science 34: 101865.
- Modesto V, Ilarri M, Souza AT, Lopes-Lima M, Douda K, Clavero M, SoSAD R (2018) Fish and mussels: Importance of fish for freshwater mussel conservation. Fish and Fisheries 19: 244–259.
- Montes–Bayón M, DeNicola K, Caruso JA (2003) Liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1000: 457–476.
- Moreno P, Quijano MA, Gutiérrez AM, Pérez–Conde MC, Cámara C (2001) Fractionation studies of selenium compounds from oysters, and their determination by high–performance liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. Journal of Analytical Atomic Spectrometry 16: 1044–1050.
- Moses M, Pidwirny M (2010) Biogeochemical cycles. Biogeochemistry, Preuzeto s <http://www.eoearth.org/view/article/150616>.
- Mosher S, Cope WG, Weber FX, Shea D, Kwak TJ (2012) Effects of lead on Na⁺, K⁺–ATPase and hemolymph ion concentrations in the freshwater mussel *Elliptio complanata*. Environmental Toxicology 27: 268–276.
- N.A.S. (1980) The International Mussel Watch. Report of a workshop sponsored by the environment studies board. Natural Resources Commission, National Research Council. National Academy of Science, Washington, DC.
- Naimo TJ (1995) A review of the effects of heavy metals on freshwater mussels. Journal of Ecotoxicology 4: 341–362.
- Namieśnik J, Rabajczyk A (2010) The speciation and physico-chemical forms of metals in surface waters and sediments. Chemical Speciation and Bioavailability 22: 1–24.

- Narukawa T, Kuroiwa T, Yarita T, Chiba K (2006) Analytical sensitivity of arsenobetaine on atomic spectrometric analysis and the purity of synthetic arsenobetaine. *Applied Organometallic Chemistry* 20: 565–572.
- Nishida Y (2011) The chemical process of oxidative stress by copper (II) and iron (III) ions in several neurodegenerative disorders. *Monatshefte fur Chemie* 142: 375–384.
- Nowrouzi M, Mansouri B, Nabizadeh B, Pourkhabbaz A (2014) Analysis of heavy metals concentration in water and sediment in the Hara biosphere reserve, southern Iran. *Toxicology and Industrial Health* 30: 64–72.
- Nurchi VM, Djordjevic AB, Crisponi G, Alexander J, Bjørklund G, Aaseth J (2020) Arsenic toxicity: Molecular targets and therapeutic agents. *Biomolecules* 10: 235.
- Orihuela R, Domenech J, Bofill R, You C, Mackay EA, Kagi JHR, Capdevilla M, Atrian S (2008) The metal-binding features of the recombinant mussel *Mytilus edulis* MT-10-IV metallothionein. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 13: 801–812.
- Paçal E, Gümüş A, Günel Ç, Erkmen B, Arslan P, Yıldırım Z, Erkoç F (2022) Oxidative stress response as biomarker of exposure of a freshwater invertebrate model organism (*Unio mancus* Lamarck, 1819) to antifouling copper pyrrhione. *Pesticides and Phytomedicine* 37: 63–76.
- Pagano M, Porcino C, Briglia M, Fiorino E, Vazzana M, Silvestro S, Faggio C (2017) The influence of exposure of cadmium chloride and zinc chloride on haemolymph and digestive gland cells from *Mytilus galloprovincialis*. *International Journal of Environmental Research* 11: 207–216.
- Parmar TK, Rawtani D, Agrawal YK (2016) Bioindicators: The natural indicator of environmental pollution. *Frontiers in Life Science* 9: 110–118.
- Paulet YM, Lorrain A, Richard J, Pouvreau S (2006) Experimental shift in diet $\delta^{13}\text{C}$: A potential tool for ecophysiological studies in marine bivalves. *Organic Geochemistry* 37: 1359–1370.
- Pavluchenko OV, Yermoshyna TV (2017) Parasites of unionid molluscs (Bivalvia, Unionidae) and their effect on the body of molluscs. *Regulatory Mechanisms in Biosystems* 8: 482–488.
- Pearson SA, Cowan JA (2021) Glutathione-coordinated metal complexes as substrates for cellular transporters. *Metallomics* 13: mfab015.

- Pempkowiak J, Pazdro K, Kopecka J, Perez E, Solé M (2006) Toxicants accumulation rates and effects in *Mytilus trossulus* and *Nereis diversicolor* exposed separately or together to cadmium and PAHs. *Journal of Environmental Science and Health, A* 41: 2571–2586.
- Perendija BR, Borković SS, Kovačević TB, Pavlović SZ, Stojanović BD, Paunović MM, Čakić PD, Radojičić RM, Pajović SB, Saičić ZS (2007) Glutathione dependent enzyme activities in the foot of three freshwater mussel species in the Sava River, Serbia. *Archives of Biological Sciences, Belgrade* 59: 169–175.
- Perić L, Nerlović V, Žurga P, Žilić L, Ramšak A (2017) Variations of biomarkers response in mussels *Mytilus galloprovincialis* to low, moderate and high concentrations of organic chemicals and metals. *Chemosphere* 174: 554–562.
- Permyakov EA (2021) Metal binding proteins. *Encyclopedia* 1: 261–292.
- Ponce de León CA, Montes-Bayón M, Caruso JA (2002) Elemental speciation by chromatographic separation with inductively coupled plasma mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A* 974: 1–21.
- Popescu BF (2009) Novel synchrotron-based analyses of metal pathology in Friedrich's ataxia.
- Potet M, Devin S, Pain-Devin S, Rousselle P, Giambérini L (2016) Integrated multi-biomarker responses in two dreissenid species following metal and thermal cross-stress. *Environmental Pollution* 218: 39–49.
- Potrykus J, Kosakowska A (2009) Purification and characterisation of ferritin from the Baltic blue mussel *Mytilus trossulus*. *Oceanologia* 51: 525–539.
- Pourang N, Richardson CA, Mortazavi MS (2010) Heavy metal concentrations in the soft tissues of swan mussel (*Anodonta cygnea*) and surficial sediments from Anzali wetland, Iran. *Environmental Monitoring and Assessment* 163: 195–213.
- Pryde DC, Dalvie D, Hu Q, Jones P, Obach RS, Tran TD (2010) Aldehyde oxidase: An enzyme of emerging importance in drug discovery. *Journal of Medicinal Chemistry* 53: 8441–8460.
- Qian ZM, Morgan EH (1990) Effect of lead on the transport of transferrin-free and transferrin-bound iron into rabbit reticulocytes. *Biochemical Pharmacology* 40: 1049–1054.
- Quémerais B, Lum KR, Lemieux C (1996) Concentrations and transport of trace metals in the St. Lawrence River. *Aquatic Sciences* 58: 52–68.

- Quijano MA, Moreno P, Gutierrez AM, Perez-Conde MC, Camara C (2000). Selenium speciation in animal tissues after enzymatic digestion by high-performance liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 35: 878–884.
- Radwan EH, Mawgood AA, Ghonim AZ, Nagar R (2018) The possibility of using the fresh water bivalve, *Spathopsis rubens*, in the Nile River, El Mahmoudia water stream as bioindicator for pollution. *International Journal of Limnology* 1: 1–23.
- Rahman I, Kode A, Biswas S (2007) Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature Protocols* 1: 3159–3165.
- Rainbow PS (2002) Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? *Environmental Pollution* 120: 497–507.
- Rajkumar JSI (2013) Reduced glutathione and acetylcholinesterase expressions in *Perna indica* exposed to trivalent arsenic. *International Journal of Biological Research* 1: 1–4.
- Rambeau CMC, Baize D, Saby N, Matera V, Adatte T, Föllmi KB (2010) High cadmium concentrations in Jurassic limestone as the cause for elevated cadmium levels in deriving soils: A case study in Lower Burgundy, France. *Environmental Earth Sciences* 61: 1573–1585.
- Ran Y, Fu JM, Sheng GY, Beckett R, Hart BT (2000) Fractionation and composition of colloidal and suspended particulate materials in rivers. *Chemosphere* 41: 33–43.
- Raspor B, Pavičić J (1991) Induction of metallothionein-like proteins in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* after a chronic exposure to the mixture of trace heavy metals. *Chemical Speciation and Bioavailability* 3: 39–46.
- Raspor B, Dragun Z, Erk M, Ivanković D, Pavičić J (2004) Is the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* a tissue of choice for estimating cadmium exposure by means of metallothioneins? *Science of the Total Environment* 333: 99–108.
- Ravera O, Beone GM, Trincerini R, Riccardi N (2007) Seasonal variations in metal content of two *Unio pictorum* *mancus* (Mollusca, Unionidae) populations from two lakes of different trophic state. *Journal of Limnology* 66: 28–39.
- Regoli F, Orlando E (1994) Seasonal variation of trace metal concentrations in the digestive gland of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*: Comparison between a polluted and a non-polluted site. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 27: 36–43.

- Regoli F, Principato G (1995) Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquatic Toxicology* 31: 143–164.
- Regoli F, Pellegrini D, Cicero AM, Nigro M, Benedetti M, Gorbi S, Fattorini D, D’Errico G, Di Carlo M, Nardi A, Gaion A, Scuderi A, Giuliani S, Romanelli G, Berto D, Trabucco B, Guidi P, Bernardeschi M, Scarcelli V, Frenzilli G (2014) A multidisciplinary weight of evidence approach for environmental risk assessment at the Costa Concordia wreck: Integrative indices from Mussel Watch. *Marine Environmental Research* 96: 92–104.
- Rodriguez-Gonzalez P, Marchante-Gayon JM, Alonso JIG, Sanz-Medel A (2005) Isotope dilution analysis for elemental speciation: a tutorial review. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 60: 151–207.
- Roesijadi G, Fowler BA (1991) Purification of invertebrate metallothioneins. *Methods in Enzymology* 205: 263–275.
- Roesijadi G (1992) Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquatic Toxicology* 22: 81–114.
- Roeva NN, Sidorov AV, Yurovitskii YG (1999) Metallothioneins, proteins binding heavy metals in fish. *Biology Bulletin* 26: 617–622.
- Roglić J (2004) Krš i njegovo značenje – sabrana djela, Geografsko društvo, Hrvatsko geografsko društvo, PMF – Geografski odsjek, Split, Zadar, Zagreb.
- Saili KS, Cardwell AS, Stubblefiel WA (2021) Chronic toxicity of cobalt to marine organisms: application of a species sensitivity distribution approach to develop international water quality standards. *Environmental Toxicology and Chemistry* 40: 1405–1418.
- Samuel MS, Datta S, Khandge RS, Selvarajan E (2021) A state of the art review on characterization of heavy metal binding metallothioneins proteins and their widespread applications. *Science of The Total Environment* 775: 145829.
- Saout C, Quere C, Donval A, Paulet YM, Samain JF (1999) An experimental study of the combined effects of temperature and photoperiod on reproductive physiology of *Pecten maximus* from the Bay of Brest (France). *Aquaculture* 172: 301–314.
- Sárkány-Kiss A, Herczeg I, Palombi B, Grigorszky I, Antal L, Bácsi I, Mozsár A, Kalmár AF, Nagy SA (2012) Toxicity tests of chlorinated hydrocarbons on the river mussel, *Unio crassus* (Bivalvia, Unionidae). *North-Western Journal of Zoology* 8: 358–361.

Schaeffer R, Francesconi KA, Kienzl N, Soeroes C, Fodor P, Váradi L, Raml R, Goessler W, Kuehnelt D (2006) Arsenic speciation in freshwater organisms from the river Danube in Hungary. *Talanta* 69: 856–865.

Schijf J, Zoll AM (2011) When dissolved is not truly dissolved—the importance of colloids in studies of metal sorption on organic matter. *Journal of Colloid and Interface Science* 361: 137–147.

Schmeisser E, Raml R, Francesconi KA, Kuehnelt D, Lindberg AL, Sörös C, Goessler W (2004) Thio arsenosugars identified as natural constituents of mussels by liquid chromatography-mass spectrometry. *Chemical Communications* 2004: 1824–1825.

Schumacher–Wittkopf E (1984) Characterisation of cobalt-binding proteins in occupational cobalt exposure. *Toxicological and Environmental Chemistry* 8: 185–193.

Selak L (2016) Biološke i ekološke značajke slatkovodnog školjkaša *Unio crassus* Philipsson, 1788. Sveučilište u Zagrebu, PMF – Biološki odsjek.

Sharma M, Kant R, Sharma AK, Sharma AK (2024) Exploring the impact of heavy metals toxicity in the aquatic ecosystem. *International Journal of Energy and Water Resources* 9: 267–280.

Simão M, Leite RB, Cancela ML (2020) Expression of four new ferritins from grooved carpet shell clam *Ruditapes decussatus* challenged with *Perkinsus olseni* and metals (Cd, Cu and Zn). *Aquatic Toxicology* 229: 105675.

Sinnhuber RO, Yu TC, Yu TC (1958) Characterization of the red pigment formed in the 2–thiobarbituric acid determination of oxidative rancidity. *Journal of Food Science* 23: 626–634.

Sloup V, Jankovska I, Nechybova S, Perinkova P, Langrova I (2017) Zinc in the animal organism: A review. *Scientia agriculturae bohemia* 48: 13–21.

Soazig M, Laulier M (2003) Potential use of the levels of the mRNA of a specific metallothionein isoform (MT–20) in mussel (*Mytilus edulis*) as a biomarker of cadmium contamination. *Marine Pollution Bulletin* 46: 1450–1455.

Soeroes C, Goessler W, Francesconi KA, Schmeisser E, Raml R, Kienzl N, Kahn M, Fodor P, Kuehnelt D (2005) Thio arsenosugars in freshwater mussels from the Danube in Hungary. *Journal of Environmental Monitoring* 7: 688–692.

- Sokolova IM, Ringwood AH, Johnson C (2005) Tissue-specific accumulation of cadmium in subcellular compartments of eastern oysters *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *Aquatic Toxicology* 74: 218–228.
- Soroka M, Wasowicz B, Zając K (2021) Conservation status and a novel restoration of the endangered freshwater mussel *Unio crassus* Philipsson, 1788: Poland case. 422: 3.
- Steckling N, Gotti A, Bose-O'Reilly S, Chapizanis D, Costopoulou D, De Vocht F, Garí M, Grimalt JO, Heath E, Hiscock R, Jagodic M, Karakitsios SP, Kedikoglou K, Kosjek T, Leondiadis L, Maggos T, Mazej D, Polańska K, Povey A, Rovira J, Schoierer J, Schuhmacher M, Špirić Z, Stajanko A, Stierum R, Tratnik JS, Vassiliadou I, Annesi-Maesano I, Horvat M, Sarigiannis DA (2018) Biomarkers of exposure in environment-wide association studies – Opportunities to decode the exposome using human biomonitoring data. *Environmental Research* 164: 597–624.
- Stipaničev D, Dragun Z, Repec S, Ivanković D, Barac F, Kiralj Z, Kralj T, Valić D (2023) Dynamics of drug contamination of the river-water in the rural, semirural and urban areas of the Mrežnica River in Croatia during COVID-19 pandemic (2020–2021). *Environmental Science and Pollution Research* 30: 93652–93666.
- Stohs SJ, Bagchi D (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metals ions. *Free Radical Biology and Medicine* 2: 321–336.
- Strižak Ž, Ivanković D, Pröfrock D, Helmholz H, Cindrić A–M, Erk M, Prange A (2014) Characterization of the cytosolic distribution of priority pollutant metals and metalloids in the digestive gland cytosol of marine mussels: seasonal and spatial variability. *Science of the Total Environment* 470–471: 159–170.
- Sumithra TG, Neethu BR, Reshma KJ, Anusree VN, Reynold P, Sanil NK (2021) A novel ferritin subunit gene from Asian green mussel, *Perna viridis* (Linnaeus, 1758). *Fish and Shellfish Immunology* 115: 1–6.
- Sun H, Szeto KY (2003) Binding of bismuth to serum proteins: implication for targets of Bi(III) in blood plasma. *Journal of Inorganic Biochemistry* 94: 114–120,
- Supuran CT (2016) Structure and function of carbonic anhydrases. *Biochemical Journal* 473: 2023–2032.
- Suteja Y, Dirgayusa IGNP, Purwiyanto AIS (2020) Chromium in Benoa Bay, Bali – Indonesia. *Marine Pollution Bulletin* 153: 111017.

Suzuki KT (2005) Metabolomics of Selenium: Se Metabolites Based on Speciation Studies. *Journal of Health Science*. 51: 107–114.

Szpunar J (2000) Bio–inorganic speciation analysis by hyphenated techniques. *The Analyst* 125: 963–988.

Szpunar J, Łobiński R (2002) Multidimensional approaches in biochemical speciation analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 373: 404–411.

Szymanowska A, Samecka-Cymerman A, Kempers AJ (1999) Heavy metals in three lakes in west Poland. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 43: 21–29.

Szymanska J, Piotrowski J (1980) Studies to identify the low molecular weight bismuth-binding proteins in rat kidney. *Biochemical Pharmacology* 29: 2913–2922.

Štefan L, Tepšić T, Zaviđić T, Urukalo M, Tota D, Domitrović R (2007) Lipidna peroksidacija – uzroci i posljedice. *Medicina* 43: 84–93.

Tamás MJ, Martinoia E (2005) Molecular biology of metal homeostasis and detoxification: from microbes to man. Springer Verlag, Heidelberg, Njemačka.

Taylor P, Radić Z (1994) The cholinesterases: from genes to proteins. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 34: 281–320.

Templeton DM, Cherian MG (1991) Toxicological significance of metallothionein. *Methods in Enzymology* 205: 11–24.

The Council of European Communities (CEC) (1991) Council Directive 91/271/EEC of 21 May 1991 concerning urban waste–water treatment. *Official Journal L*. 135: 40–52.

Thorsen WA, Cope WG, Shea D (2006) Toxicokinetics of environmental contaminants in freshwater bivalves, U: Farris JL, van Hassel JH (ur.) *Freshwater Bivalve Ecotoxicology*, str. 169–213.

Tibon J, Silva M, Sloth JJ, Amlund H, Sele V (2021) Speciation analysis of organoarsenic species in marine samples: method optimization using fractional factorial design and method validation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 413: 3909–3923.

Tietze F (1969) Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical Biochemistry* 27: 502–522.

Tokmakov AA, Kurotani A, Sato K-I (2021) Protein pI and intracellular localization. *Frontiers in Molecular Biosciences* 8: 775736.

Tosha T, Ng HL, Bhattasali O, Alber T, Theil EC (2010) Moving metal ions through ferritin-protein nanocages from three-fold pores to catalytic sites. *Journal of the American Chemical Society* 132: 14562–14569.

Třešňáková N, Çağlan Günal A, Başaran Kankılıç G, Paçal E, Nihan Tavşanoğlu Uyar R, Erkoç F (2020) Sub-lethal toxicities of zinc pyrrhione, copper pyrrhione alone and in combination to the indicator mussel species *Unio crassus* Philipsson, 1788 (Bivalvia, Unionidae). *Chemistry and Ecology* 36: 292–308.

Trnka D, Hossain FM, Jordt LM, Gellert M, Lillig CH (2020) Role of GSH and iron-sulfur glutaredoxins in iron metabolism—review. *Molecules* 25: 3860.

Trombini C, Rodríguez-Moro G, Ramírez Acosta S, Gómez Ariza JL, Blasco J, García-Barrera T (2022) Single and joint effects of cadmium and selenium on bioaccumulation, oxidative stress and metabolomic responses in the clam *Scrobicularia plana*. *Chemosphere* 308: 136474.

Türkmen EU, Arslan P, Erkoç F, Günal AÇ, Duran H (2024) The cerium oxide nanoparticles toxicity induced physiological, histological and biochemical alterations in freshwater mussels, *Unio crassus*. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 83: 127371.

Tyedmers J, Mogk A, Bukau B (2010) Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11: 777–788.

Urien N, Jacob S, Couture P, Campbell PGC (2018) Cytosolic distribution of metals (Cd, Cu) and metalloids (As, Se) in livers and gonads of field-collected fish exposed to an environmental contamination gradient: An SE-ICP-MS analysis. *Environments* 5: 102.

Valko M, Morris H, Cronin MTD (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry* 12: 1161–1208.

Vergani L, Grattarola M, Grasselli E, Dondero F, Viarengo A (2007) Molecular characterization and function analysis of MT-10 and MT-20 metallothionein isoforms from *Mytilus galloprovincialis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 465: 247–253.

Viarengo A, Burlando B, Dondero F, Marro A, Fabbri R. (1999) Metallothionein as a tool in biomonitoring programmes. *Biomarkers* 4: 455–466.

- Viarengo A, Ponzano E, Dondero F, Fabbri R (1997) A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Marine Environmental Research* 44: 69–84.
- Vidal–Liñán L, Villaverde–de–Sáa E, Rodil R, Quintana JB, Beiras R (2018) Bioaccumulation of UV filters in *Mytilus galloprovincialis* mussel. *Chemosphere* 190: 267–271.
- Vidmar J, Zuliani T, Novak P, Drinčić A, Ščančar J, Milačić R (2017) Elements in water, suspended particulate matter and sediments of the Sava River. *Journal of Soils and Sediments* 17: 1917–1927.
- Viers J, Dupré B, Gaillardet J (2009) Chemical composition of suspended sediments in World Rivers: New insights from a new database. *Science of the total environment* 407: 853–868.
- Vlada Republike Hrvatske (2023) Uredba o izmjenama i dopunama Uredbe o standardu kakvoće voda. *Narodne novine* 20/2023-341 (NN 20/2023), Zagreb, Hrvatska.
- Vogeler S, Wikfors GH, Li X, Sauvage J, Joyce A (2022) Distribution of vitamin B12 in bivalve tissues: Investigations of larval and adult life stages. *Aquaculture* 561: 738712.
- Wang GL, Wang Q, Xu ZC, Wang YY, Li JL (2017) Identification, structural characterization and expression analysis of a novel carbonic anhydrase from freshwater mussel *Hyriopsis cumingii*. *Gene* 636: 78–86.
- Wang W, Chen Z, Davey DE, Naidu R (2010) Speciation of selenium in biological samples by ion chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 33: 1151–1173.
- Wang WX (2013) Prediction of metal toxicity in aquatic organisms. *Chinese Science Bulletin* 58: 194-202.
- Webb J, Macey DJ, Talbot V (1985) Identification of ferritin as a major high molecular weight zinc-binding protein in the tropical rock oyster, *Saccostrea cucullata*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 14: 403–407.
- Whaley–Martin KJ, Koch I, Moriarty M, Reimer KJ (2012) Arsenic Speciation in Blue Mussels (*Mytilus edulis*) Along a Highly Contaminated Arsenic Gradient. *Environmental Science and Technology* 46: 3110–3118.

- Widyarini S, Allanson M, Gallagher NL, Pedley J, Boyle GM, Parsons PG, Whiteman DC, Walker C, Reeve VE (2006) Isoflavonoid photoprotection in mouse and human skin is dependent on metallothionein. *Journal of Investigative Dermatology* 126: 198–204.
- Williams RJP (2001) Chemical selection of elements by cells. *Coordination Chemistry Reviews* 216–217: 583–595.
- Wright DA (1995) Trace metal and major ion interactions in aquatic animals. *Marine Pollution Bulletin* 31: 8–18.
- Wysocki VH, Resing KA, Zhang Q, Cheng G (2005) Mass spectrometry of peptides and proteins. *Methods* 35: 211–222.
- Xue XM, Ye J, Raber G, Rosen BP, Francesconi K, Xiong C, Zhu Z, Rensing C, Zhu YG (2019) Identification of steps in the pathway of arsenosugar biosynthesis. *Environmental Science and Technology* 53: 634–643.
- 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.
- Yang H, Wu Z, Li X, Li H, Wang L (2024) Metal binding feature of copper-induced metallothionein from freshwater crab *Sinopotamon henanense* reveals its Cu-thionein character. *Protein Expression and Purification* 221: 106519.
- Yates JR, Ruse CI, Nakorchevsky A (2009) Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. *Annual Review of Biomedical Engineering* 11: 49–79.
- Yiğiterhan O, Murray JW (2008) Trace metal composition of particulate matter of the Danube River and Turkish rivers draining into the Black Sea. *Marine Chemistry* 111: 63–76.
- Yin H, Xu L, Porter NA (2011) Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chemical Reviews*. 111: 5944–5972.
- Yoloğlu E, Uçkun M, Uçkun AA (2018) Metal accumulation and biochemical variations in the freshwater mussels (*Unio mancus*) collected from Atatürk Dam Lake, Turkey. *Biochemical Systematics and Ecology* 79: 60–68.
- Zahner–Meike E, Hanson JM (2001) Effect of muskrat predation on naiads. U: Bauer G, Wächtler K (ur.) *Ecology and evolution of the freshwater mussels Unionida*. *Ecological Studies (Analysis and Synthesis)*. Springer, Berlin, str. 163–184.

Zangger K, Shen G, Oz G, Otvos JD, Armitage IM (2001) Oxidative dimerization in metallothionein is a result of intermolecular disulphide bonds between cysteines in the α -domain. *Biochemical Journal* 359: 353–360.

Zenčić M (2017) Određivanje antioksidacijske aktivnosti i inhibicijskog djelovanja vodenog ekstrakta gorke naranče (*Citrus aurantium* L.) na aktivnost acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze. Sveučilište u Splitu, Kemijsko tehnološki fakultet, Split.

Zhan J, Li X, Christie P, Wu L (2021) A review of soil potentially toxic element contamination in typical karst regions in southwest China. *Current Opinion in Environmental Science and Health* 100284.

Zhang Y, Yang Y, Shen G, Mao X, Jiao M, Lin Y (2020) Identification and characterization of aldehyde oxidase 5 in the pheromone gland of the silkworm (Lepidoptera: Bombycidae). *Journal of InSEt Science* 20: 31.

Zhao S, Shi X, Li C, Zhang H, Wu Y (2014) Seasonal variation of heavy metals in sediment of Lake Ulansuhai, China. *Chemistry and Ecology* 30: 1–14.

Zhou Y, Li H, Sun H (2022) Metalloproteomics for biomedical research: methodology and applications. *Annual Review of Biochemistry* 91: 449–473.

Zuo P, Qu W, Cooper RN, Goyer RA, Diwan BA, Waalkes MP (2009) Potential role of α -synuclein and metallothionein in lead-induced inclusion body formation. *Toxicological Sciences* 111: 100–108.

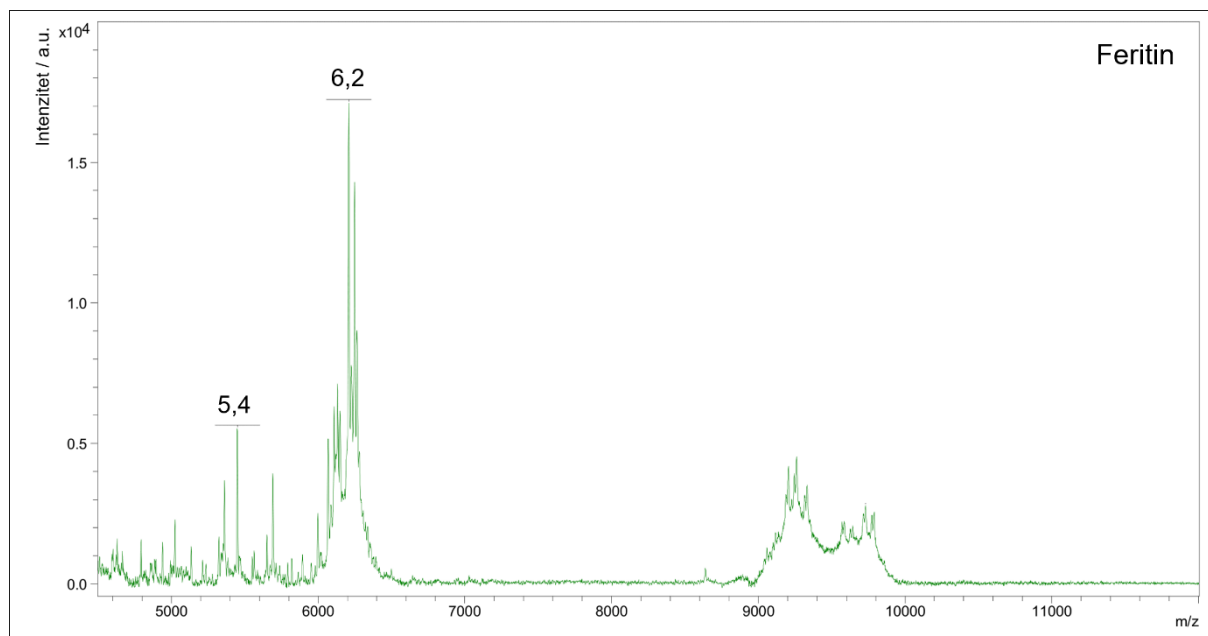
Zuykov M, Pelletier E, Harper DAT (2013) Bivalve mollusks in metal pollution studies: From bioaccumulation to biomonitoring. *Chemosphere* 93: 201–208.

8. PRILOZI

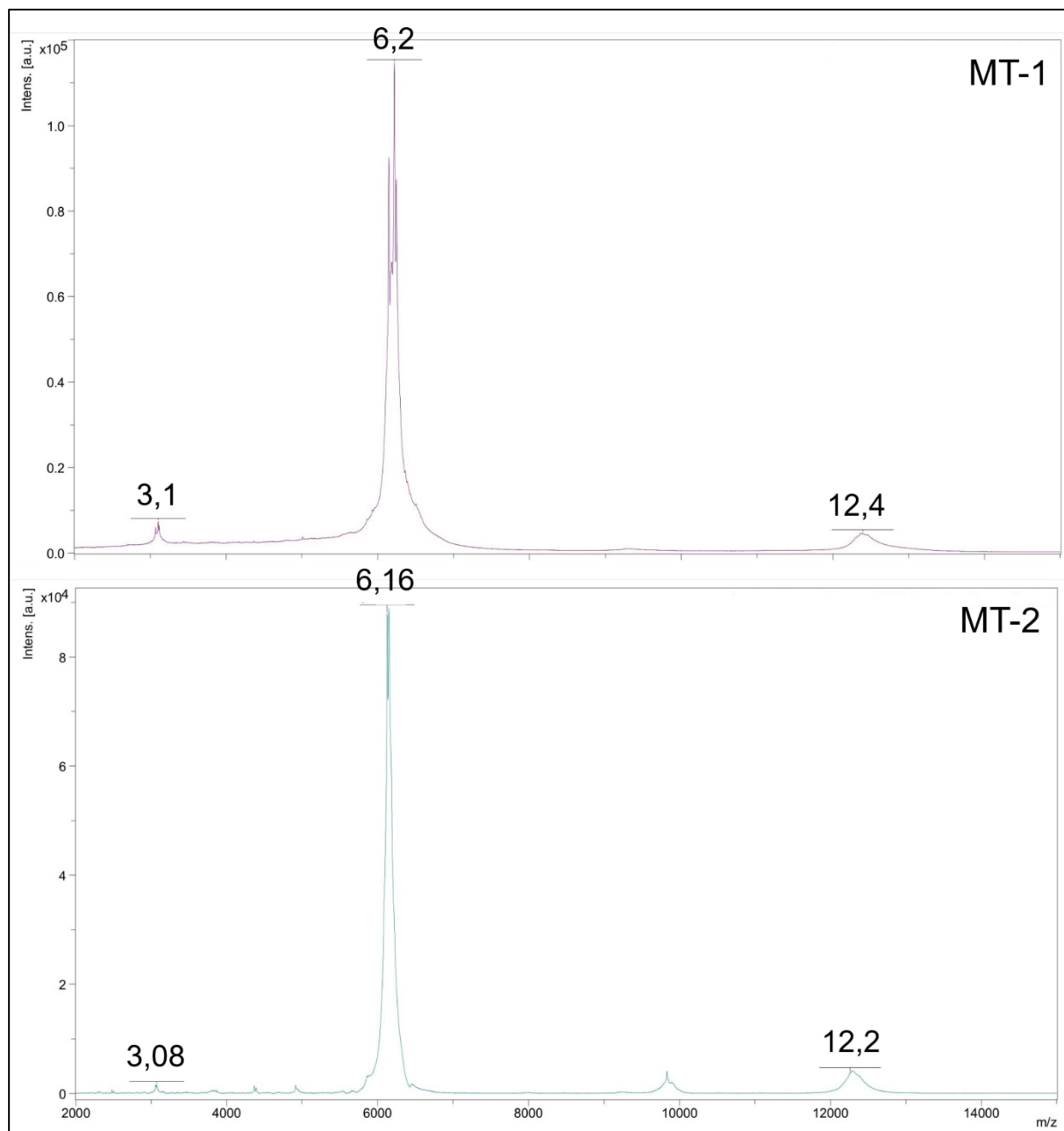
Prilog 1. Rezultati provjere točnosti i preciznosti mjerenja u kontrolnim uzorcima (UNEP/GEMS, Canada) za (ne)esencijalne elemente (n = 5).

Iskorištenje / %	
Ca	97.6±0.8
K	98.2±3.2
Mg	100.2±1.5
Na	102.2±0.6
Ag	—
Al	98.2±2.6
As	104.9±5.1
Ba	101.1±2.3
Bi	—
Cd	101.3±1.8
Co	103.6±4.4
Cr	103.0±1.9
Cs	—
Cu	102.6±2.5
Fe	98.4±3.8
Mn	101.8±2.3
Mo	100.9±2.0
Ni	103.2±3.4
Pb	100.4±0.4
Rb	—
Sb	95.4±1.5
Se	—
Sr	105.9±1.9
Tl	—
U	—
V	—
Zn	105.2±3.0

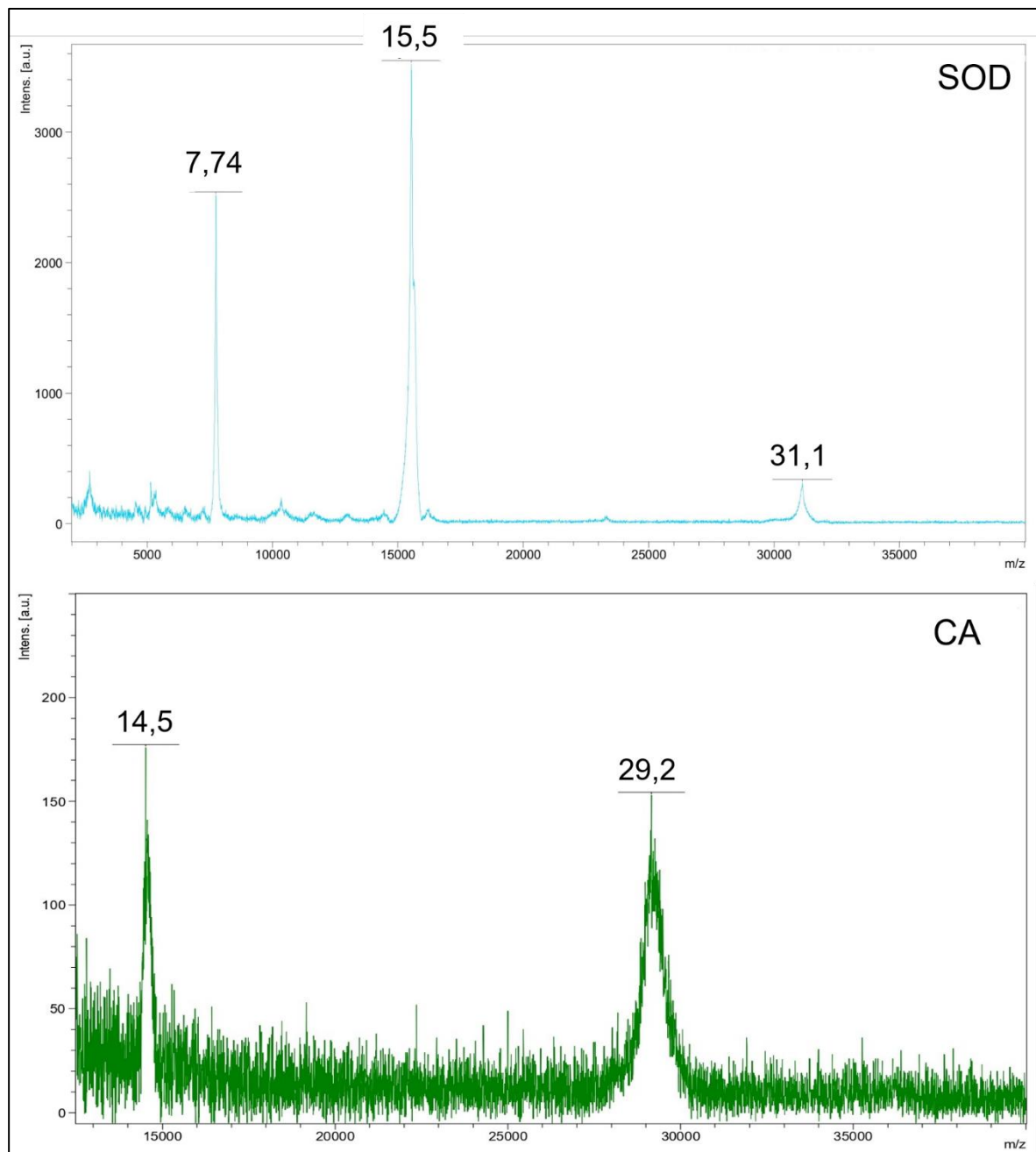
Prilog 2. Spektar masa dobiven MALDI-TOF MS analizom proteinskog standarda feritina (Sigma, SAD). Rezultati su prikazani kao intenzitet (y-os) naspram m/z vrijednosti (x-os). Maksimumi važnih pikova označeni su unutar slike (m/z).



Prilog 3. Spektar masa dobiven MALDI-TOF MS analizom metalotioneinskih (MT) izoformi: MT-1 i MT-2 proteinski standardi (Enzo Life Sciences, SAD). Rezultati su prikazani kao intenzitet (y-os) naspram m/z vrijednosti (x-os). Maksimumi važnih pikova označeni su unutar slike (m/z).



Prilog 4. Spektar masa dobiven MALDI-TOF MS analizom proteinskih standarda superoksid dismutaze (SOD; Sigma, SAD) i ugljične anhidraze (CA; Sigma, SAD). Rezultati su prikazani kao intenzitet (y-os) naspram m/z vrijednosti (x-os). Maksimumi važnih pikova označeni su unutar slike (m/z).



Prilog 5. Usporedba koncentracija metal(oid)a (izražena u $\mu\text{g L}^{-1}$ ili mg L^{-1}) u otopljenoj frakciji vode rijeke Mrežnice izmjerene na dvije postaje (referentna postaja – REF; industrijska zona grada Karlovca – KIZ) u dvije sezone (lipanj i listopad 2021. godine) s vrijednostima zabilježenim u svjetskim rijekama i nekoliko drugih, neonečišćenih^a i onečišćenih^b krških rijeka u Hrvatskoj te krškom rijekom Sidi (Kina).

	Mrežnica^a (REF)	Mrežnica^b (KIZ)	Svjetske rijeke	Cetina^a	Korana^a
	Rezultati ovog rada		Gaillardet i sur., 2003	Maldini i sur., 2023	Dautović i sur., 2014
Al	<0,556 – 0,634	1,81 – 2,86	32,0	1,76 – 27,1	0,804
As	0,162 – 0,285	0,159 – 0,310	0,620	0,074 – 0,170	0,107
Ba	6,46 – 6,71	6,88 – 6,97	23,0	3,98 – 6,98	3,87
Cd	0,006 – 0,010	0,002 – 0,009	0,080	<0,010 – 0,078	0,002
Co	0,025 – 0,030	0,025 – 0,028	0,148	<0,010 – 0,231	0,005
Cr	0,030 – 0,143	0,049 – 0,179	0,700	0,145 – 0,810	0,058
Cs	0,001	0,003	0,011	<0,015	–
Cu	0,071 – 0,144	<0,053 – 0,182	1,48	0,390 – 1,08	0,103
Fe	4,68 – 7,49	6,21 – 9,68	66,0	2,91 – 58,1	0,459
Mn	1,01 – 2,29	1,43 – 1,66	34,0	<0,050 – 7,77	0,062
Mo	0,438 – 0,978	0,417 – 0,921	0,420	0,144 – 0,938	0,271
Ni	<0,006 – 0,067	<0,006 – 0,067	0,810	0,035 – 1,87	0,091
Rb	0,262 – 0,411	0,298 – 0,443	1,63	0,102 – 0,409	–
Sb	0,027 – 0,032	0,030 – 0,036	0,070	<0,015 – 0,135	–
Se	0,101 – 0,105	0,076 – 0,098	–	<0,090 – 0,280	–
Sr	79,3 – 103	74,6 – 97,4	60,0	42,4 – 244	37,8
Tl	0,004 – 0,006	0,004 – 0,005	–	<0,003 – 0,021	0,002
U	0,487 – 0,662	0,490 – 0,654	0,372	0,307 – 0,748	0,493
V	0,419 – 0,425	0,454 – 0,483	0,710	0,317 – 0,894	0,618
Zn	<0,519	<0,519 – 0,640	0,600	0,440 – 7,65	0,033
Ca*	56,9 – 57,9	48,3 – 56,1	–	–	46,2
K*	0,333 – 0,494	0,347 – 0,481	–	–	0,270
Mg*	9,24 – 16,1	9,19 – 14,2	–	–	18,3
Na*	1,09 – 1,20	1,32 – 1,38	–	–	0,778

Prilog 5. – nastavak.

	Una^a	Zrmanja^a	Krka^a	Krka^b (komunalne otpadne vode)	Krka^b (industrijske otpadne vode)	Sidi – (povijesno onečišćenje, rudarenje)
	Dautović, 2006	Fiket i sur., 2018	Mijošek i sur., 2023			Liao i sur., 2022
Al	–	0,328	–	–	–	–
As	0,170	0,179	0,103 – 0,234	0,122 – 0,461	0,106 – 0,295	0,200 – 1,40
Ba	8,74	15,6	4,26 – 5,76	4,73 – 18,9	8,90 – 14,3	–
Cd	0,005	–	0,006 – 0,022	0,003 – 0,012	0,003 – 0,014	0,100 – 16,0
Co	0,016	0,011	0,023 – 0,076	0,068 – 0,248	0,218 – 1,38	–
Cr	0,150	0,192	0,249 – 0,688	0,193 – 2,61	0,127 – 0,940	0,400 – 2,10
Cs	–	0,008	0,002 – 0,004	0,002 – 0,021	0,001 – 0,006	0,300 – 4,10
Cu	0,100	<0,05	0,191 – 0,448	0,184 – 0,944	0,278 – 0,809	4,00 – 120
Fe	1,63	10,1	0,562 – 3,66	7,92 – 53,2	9,8 – 716	0,300 – 97,5
Mn	1,64	0,190	0,004 – 0,080	5,62 – 87,3	9,2 – 75,9	–
Mo	0,49	0,468	0,217 – 0,961	0,528 – 2,02	0,394 – 1,07	–
Ni	0,14	0,025	0,121 – 0,448	0,191 – 28,8	0,436 – 14,2	–
Rb	–	3,53	–	–	–	–
Sb	–	–	0,016 – 0,019	0,026 – 0,303	0,043 – 0,071	–
Se	0,080	–	0,053 – 0,184	0,054 – 0,234	0,037 – 0,204	–
Sr	125,0	295	68,2 – 190	166 – 494	211 – 640	33,0 – 171
Tl	0,005	–	0,005 – 0,012	0,001 – 0,007	0,002 – 0,009	–
U	–	0,425	–	–	–	–
V	–	0,391	–	–	–	–
Zn	0,220	–	0,326 – 3,42	1,90 – 12,1	10,9 – 20,7	2,10 – 2057
Ca*	73,9	–	61,5 – 73,5	73,4 – 124	79,6 – 149	22,2 – 69,9
K*	0,400	–	0,352 – 0,768	0,584 – 5,49	1,57 – 7,12	0,300 – 2,90
Mg*	9,30	–	11,3 – 16,3	10,9 – 20,5	14,7 – 23,9	5,20 – 14,8
Na*	2,12	–	1,94 – 16,2	2,87 – 42,8	4,5 – 19,3	1,20 – 3,00

Prilog 6. Usporedba raspona koncentracija metal(oid)a ($\mu\text{g/g}$, na osnovi mokre mase) u probavnoj žlijezdi različitih vrsta slatkovodnih školjkaša uzorkovanih na postajama s različitim stupnjem onečišćenja diljem svijeta. ^A Ovo istraživanje; ^B Khoma, 2019; ^C Yoloğlu i sur., 2018; ^D Falfushynska i sur., 2014; ^E Falfushynska i sur., 2009.

Vrsta školjkaša	Postaja	As	Cd	Cr	Cu
<i>Unio crassus</i> ^A	REF	0.49 – 1.23	0.10 – 1.59	0.89 – 2.37	1.24 – 2.82
	KIZ	0.58 – 0.96	0.021 – 0.13	0.35 – 1.15	2.15 – 5.66
<i>Unio timidus</i> ^B	A	–	0.29 – 1.25	–	1.37 – 3.39
<i>Unio mancus</i> ^C	A	1.56 – 2.09	0.12 – 0.13	0.23 – 0.24	2.07 – 2.53
	B	0.93 – 1.90	0.05 – 0.07	0.14 – 0.32	1.23 – 2.44
<i>Anodonta anatine</i> ^D	B	–	1.10 – 2.40	–	5.50 – 31.50
	C	–	0.70 – 3.50	–	1.50 – 4.50
<i>Anodonta cygnea</i> ^E	A	–	0.22 – 0.70	–	1.31 – 20.72
	B	–	0.220 – 0.620		0.90 – 6.73

REF – referentna postaja; KIZ – onečišćena postaja;

A – ruralno područje; B – urbano/industrijsko područje; C – šuma

Prilog 6. – nastavak.

Vrsta školjkaša	Postaja	Fe	Ni	Pb	Zn
<i>Unio crassus</i> ^A	REF	145 – 334	0.08 – 0.29	0.02 – 0.06	8.68 – 17.30
	KIZ	127 – 335	0.10 – 0.32	0.04 – 0.25	9.76 – 16.85
<i>Unio timidus</i> ^B	A	–	–	–	62.9–98.2
<i>Unio mancus</i> ^C	A	178 – 225	0.37 – 0.49	0.05 – 0.17	11.7 – 26.5
	B	84.4 – 165	0.23 – 0.34	0.03 – 0.17	7.14 – 11.84
<i>Anodonta anatina</i> ^D	B	–	–	–	95.0 – 175
	C	–	–	–	25.0 – 80.0
<i>Anodonta cygnea</i> ^E	A	–	–	–	19.3 – 26.8
	B	–	–	–	14.4 – 166

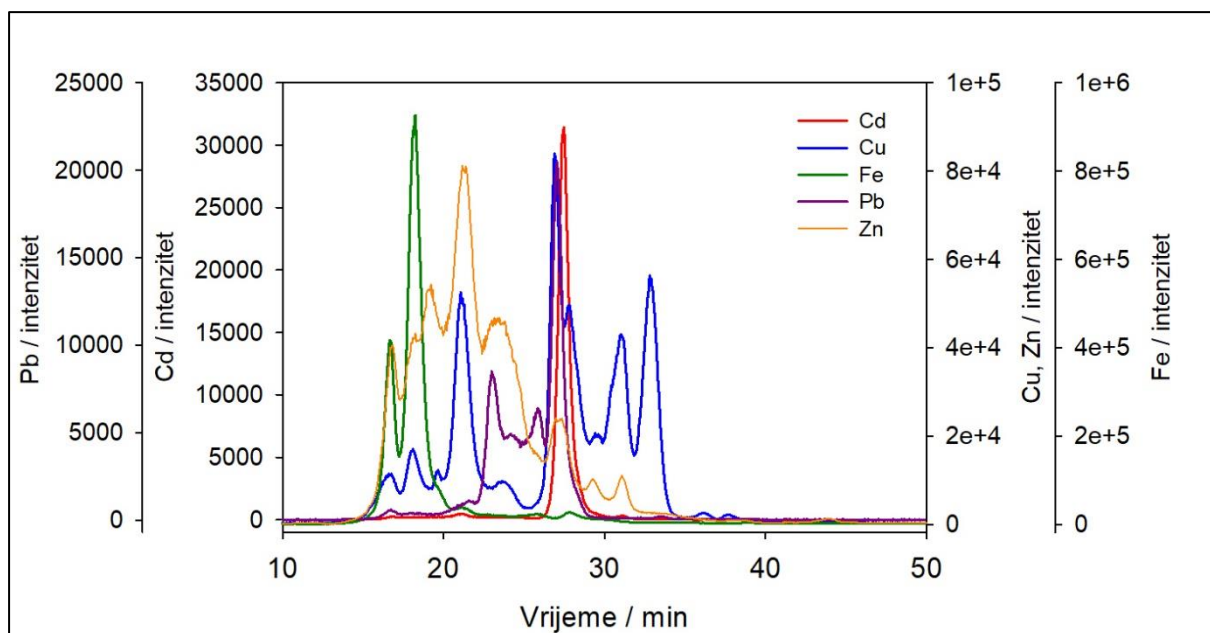
REF – referentna postaja; KIZ – onečišćena postaja;

A – ruralno područje; B – urbano/industrijsko područje; C – šuma

Prilog 7. Literaturni podaci za organska onečišćivala u vodi na dvije postaje (referentna postaja – REF; industrijska zona grada Karlovca – KIZ) u dvije sezone (travanj i rujan 2021. godine) na rijeci Mrežnici (Dragun i sur., 2022; Stipaničev i sur., 2023).

Organska onečišćivala u vodi	Sezona	Postaja	
		REF	KIZ
Herbicidi / $\mu\text{g L}^{-1}$	Travanj 2021	0.007	0.029
	Rujan 2021	0.002	0.002
Insekticidi / $\mu\text{g L}^{-1}$	Travanj 2021	0.198	0.309
	Rujan 2021	0.347	0.578
Farmaceutici / ng L^{-1}	Travanj 2021	10.6	429
	Rujan 2021	443	491

Prilog 8. Kromatografski profili raspodjele odabranih elemenata (Cd, Cu, Fe, Pb i Zn), koji su imali više preklapajućih pikova u različitim rasponima molekulske mase. Rezultati su prikazani kao intenziteti elemenata (y-os) u odnosu na vrijeme elucije (min; x-os).



POPIS KORIŠTENIH KRATICA

ACHe	acetilkolinesteraza
AEX–HPLC	anionsko izmjenjivačka tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s isključenjem
BM	biomarker
BSA	albumin govedeg seruma
CAT	katalaza
CEX–HPLC	kationsko izmjenjivačka tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s isključenjem
GD	granica detekcije
GSH	glutation
GST	glutation–S–transferaza
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
HPLC–ICP–MS	vezani sustav tekućinske kromatografije i spektrometrije masa s induktivno spregnutom plazmom
HR ICP–MS	spektrometrija masa visoke rezolucije s induktivno spregnutom plazmom
ICP–MS	spektrometrija masa s induktivno spregnutom plazmom
KFP	kalij fosfatni pufer
LPO	lipidna peroksidacija
MALDI–TOF MS	spektrometrija masa s matricom potpomognutom ionizacijom desorpcijom laserskog zračenja s analizatorom masa s vremenom leta
MBB	citosolske biomolekule koje vežu metal(oid)e
MDA	malondialdehid
MM	molekulska masa
MS	spektrometrija masa
MT	metalotionein
NMM	biomolekule niskih molekulskih masa (10 – 30 kDa)
OS	oksidativni stres
ROS	reaktivna kisikova vrsta

SE–HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s isključenjem po veličini
SMM	biomolekule srednjih molekulskih masa (30 – 100 kDa)
SOD	superoksid dismutaza
SSA	salicilna kiselina
TBA	tiobarbiturarna kiselina
TP	ukupni protein
VMM	biomolekule visokih molekulskih masa (> 100 kDa)
VNMM	biomolekule vrlo niskih molekulskih masa (< 10 kDa)

9. ŽIVOTOPIS

Zoran Kiralj rođen je 31.12.1996. u Vukovaru gdje je završio osnovnu i srednju školu. Preddiplomski studij Biologije završio je 2018. godine na Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku na Odjelu za Biologiju. Diplomski studij Eksperimentalna biologija, smjer Fiziologija i imunobiologija završio je 2021. godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu čime je stekao akademski naziv magistra eksperimentalne biologije (*mag. biol. exp.*). Na mjestu doktoranda u Laboratoriju za biološke učinke metala na Institutu Ruđer Bošković (IRB) zapošljava se u lipnju 2021. godine te u akademskoj godini 2021./2022. upisuje Poslijediplomski sveučilišni doktorski studij biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Njegov znanstveni interes obuhvaća interdisciplinarno polje akvatičke ekotoksikologije i okolišne kemije, s posebnim naglaskom na izloženost bioindikatorskih organizama različitim vrstama onečišćenja. Dobitnik je dvije stipendije Grada Zagreba, stipendije Hrvatskog toksikološkog društva, SHIMADZU Europe te CROTOX stipendije za mladog znanstvenika za sudjelovanje na međunarodnim kongresima. Dodatno je dobitnik IRB stipendije za mobilnost za jednomjesečno usavršavanje na Zavodu za fizičku i analitičku kemiju na Sveučilištu u Oviedu u području mjerenja nanočestica u različitim tipovima uzoraka primjenom tehnika tekućinske kromatografije i spektrometrije masa. Za znanstvene aktivnosti i dostignuća dodijeljena mu je godišnja nagrada Zavoda za istraživanje mora i okoliša IRB-a za znanstveni rad objavljen u časopisu visokog čimbenika odjeka za 2023. godinu.

Do sada je autor/suautor na 12 znanstvenih radova u časopisima citiranim u Web of Science (WoS) bazi podataka, od kojih su 5 prvoautorskih. Aktivno je sudjelovao na nizu domaćih i međunarodnih kongresa, kao i radionica.

Popis objavljenih znanstvenih radova

1. Dragun Z, **Kiralj Z**, Fiket Ž, Ivanković D (2025) Preliminary insight into intracellular behaviour of rare earths and other technology critical elements (TCE) in the northern pike liver: study of TCE-binding biomolecules by size-exclusion HPLC–ICP–MS. *Environmental Science-Processes and Impacts* 27: 262-276.
2. Dragun Z, Fiket Ž, Tepić N, **Kiralj Z**, Kralj T, Šoštarić Vulić Z, Ivanković D, Lučić M, Puljko A, Udiković-Kolić N, Valić D (2025) The problem of diffuse pollution of a major river

running through predominantly rural area: the case of potentially detrimental levels of tungsten, silver, and manganese in the Mura River. *Environmental Chemistry and Ecotoxicology* 7: 2043–2066.

3. **Kiralj Z**, Dragun Z, Lajtner J, Trgovčić K, Mijošek Pavin T, Bušić B, Ivanković D (2025) Changes in subcellular responses in the digestive gland of the freshwater mussel *Unio crassus* from a historically contaminated environment. *Fishes* 10: 317.

4. Dragun Z, **Kiralj Z**, Ivanković D, Bilić B, Kazazić S, Kazazić S (2024) Iron-binding biomolecules in the soluble hepatic fraction of the northern pike (*Esox lucius*): two-dimensional chromatographic separation with mass spectrometry detection. *Analytical & Bioanalytical Chemistry* 416: 5097–5109.

5. Dragun Z, **Kiralj Z**, Pećnjak A, Ivanković D (2024) The study of acidic/basic nature of metallothioneins and other metal-binding biomolecules in the soluble hepatic fraction of the northern pike (*Esox lucius*). *International Journal of Biological Macromolecules* 256: 128209.

6. Dragun Z, Ivanković D, Tepić N, Filipović Marijić V, Šariri S, Mijošek Pavin T, Drk S, Gjurčević E, Matanović K, Kužir S, Barac F, **Kiralj Z**, Kralj T, Valić D (2024) Metal bioaccumulation in the muscle of the northern pike (*Esox lucius*) from historically contaminated river and the estimation of the human health risk. *Fishes* 9: 364.

7. Bujas N, Lajtner J, Ivanković D, **Kiralj Z**, Trgovčić K, Dragun Z, Uvanović H, Peharda M (2024) Age structure and growth patterns of the endangered freshwater mussel *Unio crassus* Philipsson, 1788 under different environmental conditions. *Aquatic Sciences* 86: 92.

8. **Kiralj Z**, Dragun Z, Lajtner J, Trgovčić K, Valić D, Ivanković D (2023) Accumulation of metal(loid)s in the digestive gland of the mussel *Unio crassus* Philipsson, 1788: a reliable detection of historical freshwater contamination. *Environmental Pollution* 334: 122164, 11.

9. Stipaničev D, Dragun Z, Repec S, Ivanković D, Barac F, **Kiralj Z**, Kralj T, Valić D (2023) Dynamics of drug contamination of the river-water in the rural, semirural and urban areas of the Mrežnica River in Croatia during COVID-19 pandemic (2020–2021). *Environmental Science and Pollution Research* 30: 93652–93666.

10. Dragun Z, Ivanković D, Krasnići N, **Kiralj Z**, Cvitanović M, Karamatić I, Valić D, Barac F, Filipović Marijić V, Mijošek T, Gjurčević E, Matanović K, Kužir S (2022) Metal-binding biomolecules in the liver of northern pike (*Esox lucius* Linnaeus, 1758): the first data for the

family Esocidae. *Comparative Biochemistry and Physiology C: Toxicology & Pharmacology* 257: 109327.

11. Dragun Z, Stipaničev D, Fiket Ž, Lučić M, Udiković-Kolić N, Puljko A, Repec S, Šoštarić Vulić Z, Ivanković D, Barac F, **Kiralj Z**, Kralj T, Valić D (2022) Yesterday's contamination – a problem of today? The case study of discontinued historical contamination of the Mrežnica River (Croatia). *Science of the Total Environment* 848: 157775.

12. Sadžak A, Vlašić I, **Kiralj Z**, Batarello M, Oršolić N, Jazvinščak Jembrek M, Kušen I, Šegota S (2021) Neurotoxic effect of flavonol myricetin in the presence of excess copper. *Molecules* 26(4): 845.

Kongresna priopćenja

1. **Kiralj Z**, Dragun Z, Valić D, Kralj T, Ivanković D, Corte-Rodríguez M, Suarez Priede A, Montes-Bayón M, Detection and comparison of four metal nanoparticles in the muscles of two freshwater fish species from Bobovica Lake using SP-ICP-MS. *14th Symposium for European Freshwater Sciences*, Bolu, Turska, 2025. (predavanje)

2. **Kiralj Z**, Ivanković D, Dragun Z, Kazazić S, Kazazić S, Presence of multiple metallothionein isoforms with specific metal binding properties in the digestive glands of a native freshwater mussel. *9th Faculty of Science PhD Student Symposium*, Sveučilište u Zagrebu Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 2025. (poster)

3. Kiralj Z, Dragun Z, Ivanković D, Variability of free amino acid composition in the digestive gland of freshwater mussels exposed to environmental pollution. *7th Fresh Blood for Fresh Water Conference. HUN-REN Centre for Ecological Research*, Budimpešta, 2025. (predavanje)

4. **Kiralj Z**, Dragun Z, Ivanković D, Distribution of selected technology-critical elements among cytosolic biomolecules in the northern pike liver analysed by hyphenated system of size exclusion high-performance liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry (SE–HPLC–ICP–MS). *34th International Symposium on Chromatography*, Liverpool, Ujedinjeno Kraljevstvo, 2024. (poster)

5. **Kiralj Z**, Izolacija i karakterizacija metalotioneiskih izoformi u probavnoj žlijezdi nativnih školjkaša *Unio crassus* pomoću dvodimenzionalnog kromatografskog razdvajanja i

spektrometrije masa. *2. skupa mladih znanstvenika Zavoda za istraživanje mora i okoliša Instituta Ruđer Bošković*, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, 2024. (predavanje)

6. **Kiralj Z**, Dragun Z, Ivanković D, Comparison of metal distribution patterns between wild and Cd-exposed mussels: the role of distinct metallothionein isoforms in cadmium sequestration/detoxification. *8th Faculty of Science PhD Student Symposium*, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 2024.

7. **Kiralj Z**, Dragun Z, Šoštarić Vulić Z, Kralj T, Ivanković D, Valić D, Utjecaj antropogenih aktivnosti i hidroloških uvjeta na koncentraciju otopljenih metala (Co, Fe, Mn, Ag i Pb) u površinskoj vodi rijeke Mure. *4. Znanstvena škola o okolišu Nekonvencionalni pristupi konvencionalnim izazovima*, Zagreb, Hrvatska, 2023. (predavanje)

8. **Kiralj Z**, Dragun Z, Ivanković D, Bilić B, Kazazić S, Kazazić S, Mass spectrometry analysis of Fe-binding cytosolic biomolecules from the liver of the northern pike (*Esox lucius*) after two-dimensional chromatographic separation. *15th Mass Spectrometry School in Biotechnology and Medicine*, Dubrovnik, Hrvatska, 2023. (poster)

9. **Kiralj Z**, Dragun Z, Pećnjak A, Ivanković D, Cytosolic Cd-, Cs-, Pb-, and Tl-binding metalloproteins of the digestive gland of the bivalve *Unio crassus* analysed by anion-/cation-exchange high-performance liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry. *51st International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques*, Düsseldorf, Njemačka, 2023. (poster)

10. **Kiralj Z**, Dragun Z, Ivanković D, Analiza citosolskih biomolekula koje vežu željezo u jetri štuke (*Esox lucius*) i probavnoj žlijezdi školjkaša *Unio crassus* pomoću dvodimenzionalnog kromatografskog razdvajanja i spektrometrije masa. *1. skup mladih znanstvenika ZIMO-a*, Zagreb, Hrvatska, 2023. (predavanje)