



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

GEOLOŠKI ODSJEK

Ines Kovačić

**Aktivnost kisele deoksiribonukleaze
i histokemijske promjene u lizosomima
kao odgovor dagnje
Mytilus galloprovincialis
na čimbenike u okolišu**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2015.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF GEOLOGY

Ines Kovačić

**Acid deoxyribonuclease activity
and histochemical perturbation of
mussel *Mytilus galloprovincialis*
lysosomes in response
to environmental conditions**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2015.



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
GEOLOŠKI ODSJEK

Ines Kovačić

**Aktivnost kisele deoksiribonukleaze
i histokemijske promjene u lizosomima
kao odgovor dagnje
Mytilus galloprovincialis
na čimbenike u okolišu**

DOKTORSKI RAD

Mentor: izv.prof.dr.sc. Maja Fafanđel

Zagreb, 2015.



Sveučilište u Zagrebu
FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF GEOLOGY

Ines Kovačić

**Acid deoxyribonuclease activity
and histochemical perturbation
of mussel *Mytilus galloprovincialis*
lysosomes in response
to environmental conditions**

DOCTORAL THESIS

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

Zagreb, 2015.

ZAHVALA

Zahvaljujem mentorici izv.prof.dr.sc. Maji Fafandel na ukazanom povjerenju, podršci, razumijevanju, savjetima te posvećenom vremenu koje mi je pružila u mom znanstvenom radu. Zahvaljujem što je ponekad razumjela kako je biti žuti mačić u sivom leglu

Zahvaljujem voditeljici laboratorija prof. dr.sc. Nevenki Bihari na mogućnosti izrade disertacije u Laboratoriju za morsku ekotoksikologiju

Zahvaljujem članovima povjerenstva prof. dr. sc. Renatu Batelu, doc. dr. sc. Mauru Štifaniću i dr. sc. Loreni Perić na korisnim savjetima, brzini pri ispravljanju i poboljšanju ovog rukopisa

Zahvaljujem se dr. sc. Loreni Perić što mi je prenijela znanje korištenja kriotoma i histokemijskih metoda u istraživanju kao i mnogo stručnih savjeta

Zahvaljujem dr. sc. Martinu Phannkuchen na pomoći oko rada na fluorescentnom mikroskopu

Zahvaljujem se prijateljici i kolegici dr. sc. Emini Pustijanac na slušanju, brizi, razumijevanju i prijateljstvu na ovom putu

Zahvaljujem se kolegama iz CIM-a Kseniji Matošević, Ani Baričević, Mirti Smodlaki Tanković, Sandi Ravlić, Marinu Korleviću, Petri Burić, Paolu Paliagi na zajedničkim raspravama i izmjenjivanju iskustava o ispitima

Zahvaljujem se mojoj majci čiji je moto: Rad, red i disciplina!

Zahvaljujem se cijeloj mojoj obitelji Horvat, Kovačić i Zanetti koja je uvijek bila tu kada je bilo potrebno

Zahvaljujem se mom suprugu i djeci na ljubavi, sigurnosti, odvlačenju pažnje i beskrajnoj sreći koju mi pružaju

Doktorska disertacija izrađena je u Centru za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković u Rovinju, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Maje Fafandel, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Oceanologije pri Geološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Aktivnost kisele deoksiribonukleaze i histokemijske promjene u lizosomima kao odgovor dagnje *Mytilus galloprovincialis* na čimbenike u okolišu

INES KOVAČIĆ

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli, Znanost o moru, Zagrebačka 30, Pula

Kisela DNaza je lizosomalni enzim koji ima važnu ulogu u metabolizmu deoksiribonukleinskih kiselina. Aktivnost kisele DNaze utvrđena je u probavnoj žlijezdi i škragama dagnje *Mytilus galloprovincialis*. Kao dominantna DNaza, identificirana je i karakterizirana DNaza II koja je lokalizirana u lizosomu. Utvrđene promjene aktivnosti kisele DNaze u probavnoj žlijezdi povezane su s dostupnosti hrane u okolišu i ciklusom razmnožavanja, dok je aktivnost kisele DNaze u škragama povezana sa sezonskim promjenama temperature i saliniteta. Aktivnost kisele DNaze u oba organa u dagnjama na onečišćenoj postaji razlikuje se od aktivnosti u dagnjama s referentne postaje. Integracija aktivnosti kisele DNaze u probavnoj žlijezdi s histokemijski detektiranim lizosomalnim promjenama doprinijela je boljem razdvajanju odgovora obzirom na onečišćenje. Podatci koji se odnose na aktivnost kisele DNaze u probavnoj žlijezdi predstavljaju dobru osnovu za buduća istraživanja koja uključuju integrirani odgovor lizosoma prilikom procjene stanja okoliša.

(88 stranica, 24 slike, 15 tablice, 155 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: kiselina DNaza, DNaza II, odgovor lizosoma, školjkaši

Mentor: izv.prof.dr.sc. Maja Fafandel

Stručno povjerenstvo za ocjenu rada:

prof. dr.sc. Renato Batel

doc. dr. sc. Mauro Štifanić

dr. sc. Lorena Perić

dr.sc. Damir Kapetanović

Rad prihvaćen: 10. ožujka, 2015.

Acid deoxyribonuclease activity and histochemical perturbation of mussel *Mytilus galloprovincialis* lysosomes in response to environmental conditions

INES KOVAČIĆ

Juraj Dobrila University of Pula, Marine Sciences, Zagrebačka 30, Pula

Acid DNase is lysosomal enzyme that plays an important role in the deoxyribonucleic acid metabolism. DNase II was identified and characterized in digestive gland and gills lysosomes of mussel *Mytilus galloprovincialis* as the dominant and representative acid DNase. Acid DNase activity in the digestive gland was associated with food availability and reproduction cycle, while the acid DNase activity in the gills was associated with seasonal changes in seawater temperature and salinity. Acid DNase activity in both investigated organs differs between mussels from contaminated and reference sampling site. Integration of digestive gland acid DNase activity and histochemical perturbation of lysosomes enabled better differentiation of sampling station due to contamination. Observed acid DNase activity in the digestive gland represents a good basis for future environmental monitoring studies that would include integrated lysosomal response.

(88 pages, 24 figures, 15 tables, 155 references, original in Croatian)

Keywords: acid DNase, DNase II, lysosomal response, mussel

Supervisor: Maja Fafanđel, PhD

Reviewers:

prof. dr.sc. Renato Batel

doc. dr. sc. Mauro Štifanić

dr. sc. Lorena Perić

dr.sc. Damir Kapetanović

Thesis accepted: 10th March, 2015.

SADRŽAJ

1. Uvod	2
1.1. Dagnja, <i>Mytilus galloprovincialis</i> Lamarck, 1819	2
1.2. Lizosom	4
1.2.1. Lizosomalni odgovor na čimbenike u okolišu	9
1.3. Kisele hidrolaze	11
1.3.1. Kisela DNaza.....	12
2. Ciljevi i hipoteze istraživanja	18
2.1. Ciljevi istraživanja.....	18
2.2. Hipoteze istraživanja	18
3. Materijali i metode	20
3.1. Područje istraživanja i uzorkovanje školjkaša.....	20
3.2. Izolacija i priprema tkiva.....	22
3.3. Određivanje aktivnosti kisele DNaze denaturirajućim PAGE zimogramom (DPZ).....	22
3.4. Određivanje dozrijevanja kisele DNaze denaturirajućim PAGE zimogramom.....	23
3.5. Identifikacija DNaze II Western analizom.....	23
3.6. Imunohistokemijska lokalizacija DNaze II	24
3.7. Određivanje sezonske aktivnosti kisele DNaze.....	25
3.7.1. Preliminarno određivanje aktivnosti kisele DNaze jednostrukom radijalnom enzimskom difuzijom	25
3.7.2. Flourimetrijsko određivanje aktivnosti kisele DNaze	25
3.8. Histokemijske promjene u lizosomima probavne žlijezde dagnje	26
3.8.1. Određivanje stabilnosti lizosomalnih membrana	26
3.8.2. Određivanje količine lipofuscina	27

3.8.3. Određivanje količine neutralnih masti	27
3.9. Prikaz rezultata i statistička obrada	28
4. Rezultati	31
4.1. Aktivne izoforme kisele DNaze	31
4.2. Dozrijevanje kisele DNaze.....	31
4.3. Identifikacija DNaze II.....	33
4.4. Lokalizacija DNaze II	33
4.5. Sezonska aktivnost kisele DNaze.....	36
4.5.1. Preliminarna analiza aktivnosti kisele DNaze.....	36
4.5.2. Sezonska aktivnost kisele DNaze.....	36
4.6. Histokemijske promjene u lizosomima probavne žlijezde dagnje	41
4.6.1. Stabilnost lizosomalnih membrana	41
4.6.2. Količina lipofuscina	42
4.6.3. Količina neutralnih masti	43
4.7. Odgovor lizosoma na okolišne uvjete	45
5. Rasprava	55
5.1. Identifikacija, karakterizacija i aktivnost kisele DNaze u tkivima dagnje.....	55
5.2. Odgovor lizosoma probavne žlijezde na okolišne uvjete.....	63
6. Zaključci.....	69
7. Literatura	71
PRILOG	82
ŽIVOTOPIS	VIII

POPIS KRATICA

ACI	ACI Marina Rovinj
BCIP	5-brom-4-klor-3'indolilfosfat p-toluidinska sol
DNaza II	deoksiribonukleaza II
F Pž	aktivnost kisele DNaze u probavnoj žlijezdi
F Š	aktivnost kisele DNaze u škrigama
LF	lipofuscin
NM	neutralne masti
NBT	nitro – plavi tetrazolijski klorid
NPZ	nativna elektroforeza
PVDF	nitrocelulozna membrana
PC	glavna komponenta
PCA	analiza glavnih komponenata
SLM	stabilnost lizosomalne membrane
SDS – PAGE	natrij-dodecilsulfat elektroforeza na poliakrilamidnom gelu
SRED	<i>Single Radial Enzymatic Diffusion</i>
TEMED	N,N,N',N' - tetrametiletildiamin

1. UVOD

1. UVOD

1.1. DAGNJA, *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* LAMARCK, 1819

Mediteranska dagnja (*M. galloprovincialis*, Lamarck 1819) pripada obitelji *Mitilidea*, koljena Mollusca. Porijeklom je iz Mediteranskog, Crnog i Jadranskog mora, no putem balastnih voda i obraštajem trupa brodova proširila se na mnoga druga područja diljem svijeta. Naseljava obalna morska područja Mediterana, sjeverne obale Atlantskog oceana uz Afriku i Iberijski poluotok do Normandije. Pronađena je i na obalama južne Kalifornije, Kine, Japana, Australije i novog Zelanda. Mediteranska dagnja naseljava zonu plime i oseke izloženih stjenovitih obala s relativno visokom energijom valova, iako se može pronaći i na umjereno zaštićenim obalama te u gustim nakupinama na pješčano – muljevitim dnima slanih laguna (Ceccherelli i Rossi, 1984). Za podlogu se pričvršćuje bisusnim nitima te ju možemo pronaći i na plutačama, sidrenim konopima i usidrenim brodovima, kao i na podmorskim temeljima raznih građevina, na konstrukcijama naftnih platformi te kavezima za uzgoj riba, na dubinama preko 20m.

Tijelo dagnje zaštićeno je u ljušturi. S unutarnje strane ljuštura je prekrivena nježnim tkivom plašta. Trepetljike s unutarnje strane plašta usmjeravaju čestice hrane prema škrgama, a otpadne tvari prema crijevnom otvoru. U plaštu dagnje nalaze se gonade, koje otpuštaju gamete u plaštenu šupljinu (Seed i Suchanek, 1992). U plaštu se pohranjuju rezervne hranjive tvari (Gabbott, 1983). Zatvaranje ljuštura omogućeno je mišićem aduktorom.

Fiziologija dagnje određena je sjedilačkim načinom života. Dagnja kontinuirano filtrira morsku vodu pomoću škrga. Izmjena plinova u škrgama omogućena je lamelarnim strukturama od vezivnog tkiva prožetog krvnim žilicama koje imaju veliku površinu i bogato je opskrbljeno hemolimfom – optjecajnom tekućinom školjkaša. Škrge, osim disanja imaju i ključnu ulogu u hranjenju, te uz istodobno omogućavanje procesa disanja, osiguravaju i stalnu dobavu hranjivih čestica. U prehrani dagnje prevladavaju suspendirane čestice detritusa, bakterija, fitoplanktona i mikrozooplanktona, razgrađena organska tvar i anorganske čestice (Jørgensen, 1990). Zahvaljujući sposobnosti zatvaranja i otvaranja čvrstih ljuštura, prilagođena je životu u uvjetima povremenog izranjanja, izlaganja visokim temperaturama i promjenama saliniteta zbog evaporacije, što navodi na činjenicu da dagnja podnosi širok raspon saliniteta (Seed, 1976). Kao osmokonformerski organizmi, nemaju sposobnost

osmotske regulacije izvanstanične tekućine već reguliraju volumen stanice podešavanjem odgovarajuće koncentracije slobodnih aminokiselina i malih organskih molekula (Griffiths i Griffiths, 1987). Dagnje su i fakultativni anaerobi koji sniženu koncentracije kisika reguliraju prijelazom s aerobnog na anaerobni način života. Temperaturne promjene okoliša dovode do smanjenja potrošnje kisika, a promjene u metaboličkim putevima rezultiraju usporavanjem metabolizma (de Zwann, 1992). Izvanstanična probava događa se u lumenu probavila zahvaljujući brojnim probavnim enzimima koji se izlučuju sa stjenki, dok se unutarstanična probava odvija u probavnoj žlijezdi (Owen, 1972). Probavna žlijezda građena je od probavnih tubula, koje sadrže probavne i bazofilne stanice. Probava se odvija u lizosomima vakuoliziranih probavnih stanica, bogatih hidrolitičkim enzimima, nakon čega se krajnji produkti probave apsorbiraju u hemolimfu, a neprobavljeni se produkti nakupljaju u rezidualna tjelešca. U lizosomima probavne žlijezde nakupljaju se ugljikohidrati i masti, koji se koriste kao rezerve energije tijekom gametogeneze ili fiziološkog stresa (Bayne, 1976). Reproductivni ciklus dagnje obuhvaća cijeli niz događaja, od aktivacije gonada, gametogeneze, do ispuštanja zrelih gameta (faza mrijesta), te naknadne faze mirovanja gonada (Seed, 1976). Reproductivno razdoblje karakterizirano je s jednim ili više ciklusa gametogeneze, a svaki je popraćen otpuštanjem gameta iz zrelih reproductivnih folikula. Poput mnogih vodenih školjkaša, i dagnja podliježe sezonskom obrascu reproductivne (Gösling, 1992).

Biološka svojstva roda *Mytilus* omogućila su upotrebu mediteranske dagnje za praćenje stanja morskog okoliša (Viarengo i sur., 2007). Zbog načina ishrane, kontinuiranog filtriranja morske vode, u tkivima dagnje se akumuliraju onečišćivala iz morske vode. Geografski široko rasprostranjeni školjkaši, poput dagnje, dominantni su članovi obalnih zajednica, čime se smanjuje problem prikupljanja i uspoređivanja podataka različitih istraživanja. Dagnja je sjedilački organizam te je u danom okolišu bolji izbor od pokretnih vrsta. Relativno je otporna na široki raspon okolišnih uvjeta, uključujući umjereno povišene razine mnogih tipova onečišćenja. Mjerenje koncentracije onečišćivala u tkivu dagnje omogućuje procjenu biološke dostupnosti onečišćivala, što nije vidljivo iz mjerenja koncentracije onečišćivala u vodi, otopljenoj tvari ili sedimentu (Da Ros i sur., 2000; Zorita i sur., 2007). Populacije dagnji relativno su stabilne, te su dostatno velike za slučaj opetovanog uzorkovanja, čime se osigurava prikupljanje uzoraka za studije kratkoročnih i dugoročnih promjena razina onečišćenja. Dagnje se lako mogu prenijeti i održavati u kavezima, ili u zoni plime i oseke, ili

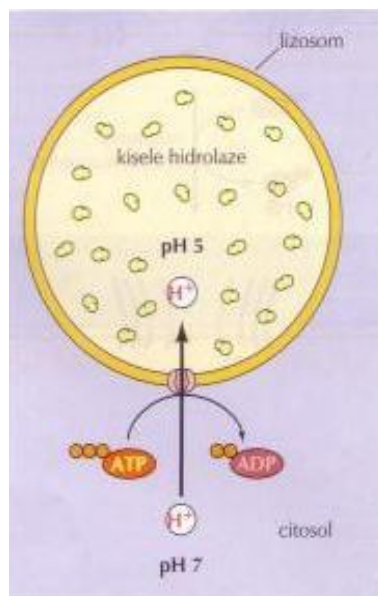
u dubini kada su pričvršćene na sidrišta, gdje zbog manjka supstrata za vezanje populacije dagnji nisu u mogućnosti normalno rasti.

Stvaran utjecaj nekog spoja u morskom ekosustavu na prirodnu populaciju dagnji teško je procijeniti, jer je u okolišu prisutan velik broj onečišćivala, koji dolaze u mješavinama te tako utječu na različite stupnjeve biološke organizacije u morskim organizmima, od molekularne razine do ekosistema. Na molekularnoj i substancičnoj razini najčešće dolazi do promjena u ekspresiji gena (Venier i sur., 2006), integriteta DNA (Regoli i sur., 2004) i aktivnosti enzima (Moore, 1988; Petrović i sur., 2004). Promjene na staničnoj razini očituju se u poremećaju u funkciji stanice, nakupljanju metaboličkih produkata i oštećenju lizosomalnih membrana. Štetno djelovanje na više razine odražava se kroz promjene u metabolizmu organizma, smanjenoj plodnosti, povećanoj osjetljivosti te u konačnici na skraćivanje životnog vijeka. Nastale promjene dovode do nepovratnih posljedica na višim razinama biološke organizacije na razini populacije, zajednice i ekosistema (Cheung i sur., 1993). Veliku važnost u praćenju promjena u organizmu imaju istraživanja ranog biološkog učinka na odabrani organizam, kako bi se na vrijeme mogao predvidjeti rizik za više razine biološke organizacije (Bayne, 1985).

1.2. LIZOSOM

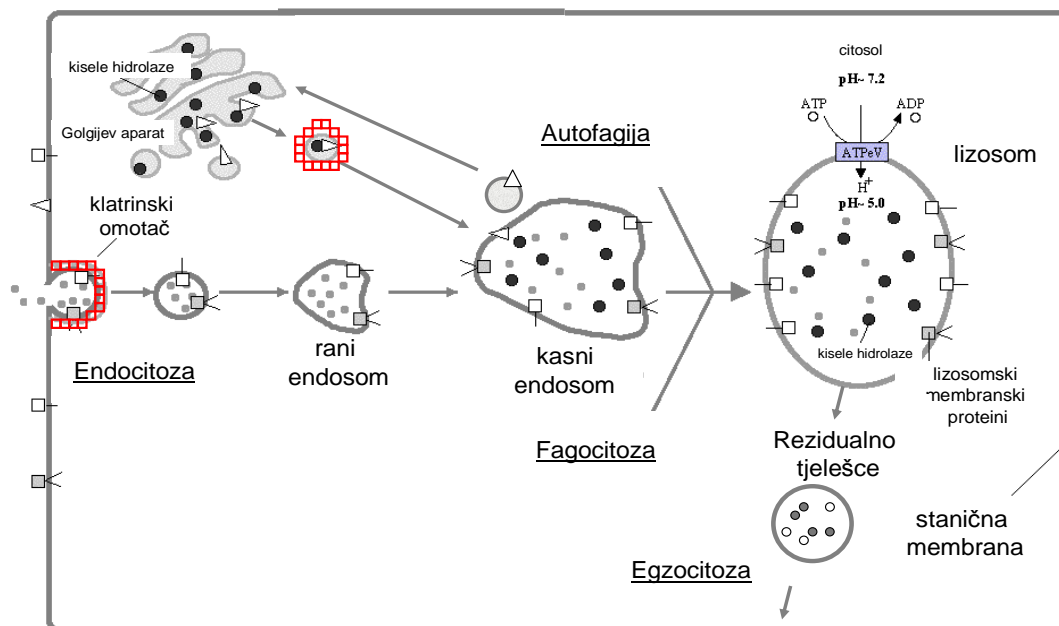
Lizosomi su organeli okruženi jednostrukom membranom, a nalaze se u citoplazmi eukariotskih stanica (Holtzman, 1989). Lizosomi su otkriveni 1955. godine u stanicama sisavaca (de Duve, 1983), a nalaze se u gotovo svim stanicama kod životinja i u nekoliko vrsta stanica kod biljaka. Najbrojniji su u stanicama koje su vezane uz probavu i razgradnju tvari, kao što su stanice jetre, gušterače, bubrega, slezene i stanica imunološkog sustava kao npr. u leukocitima i makrofagima kod životinja i ljudi. Veličina lizosoma obično varira od 0,2 μm do 0,8 μm u promjeru, ali mogu biti i do 8 μm u bubrežnim stanicama i makrofagima sisavaca. Naziv potječe od grčke riječi *lysis*, što znači raspad ili uništavanje, te *soma*, što znači tijelo. Lizosomi se smatraju glavnim probavnim sustavom stanice, koji razgrađuju tvari unesene u stanicu, kao i dotrajale dijelove stanice. U svom najjednostavnijem obliku, lizosomi izgledaju kao gusti okrugli mjehurići, ali mogu poprimiti različitu veličinu i oblik ovisno o svojstvima tvari koje se probavljaju. Lizosomi sadrže probavne enzime i litičke komponente (Huotari i Helenius, 2011). Lizosomalni enzimi su kisele hidrolaze koje kataliziraju

razgradnju supstrata dodatkom molekula vode, a aktivni su samo u kiselom mediju unutrašnjosti lizosoma. Kiseli pH unutar lizosoma nastaje djelovanjem protonskih crpki u lizosomalnoj membrani koja ubacuje protone iz citosola trošeći ATP hidrolizom (Slika 1.). Lizosomi također sudjeluju u procesu diferencijacije, preobrazbe, oplodnje, starenja, gladovanja te obrambenom mehanizmu stanica.



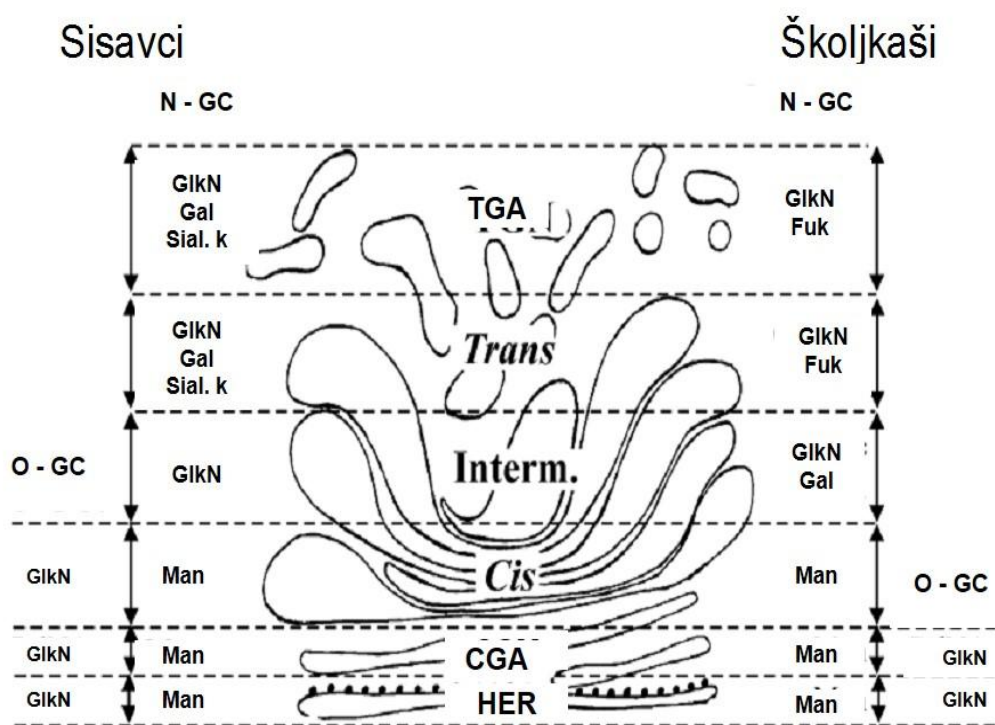
Slika 1. Shematski prikaz lizosoma (iz Cooper i Hausman, 2004).

Nastanak zrelog lizosoma predstavlja raskrižje između sekrecijskog puta, tijekom kojeg se lizosomalni enzimi dorađuju i endocitoznog puta, kojim se izvanstanične molekule unose sa stanične površine (Slika 2.). Sadržaj iz okoline unesen procesom endocitoze, spaja se s ranim endosomima. Endosomi postupno dozrijevaju u lizosome sa snižavanjem unutarnjeg pH do oko 5,5, što je ključno za aktivnost lizosomalnih enzima (Kurz i sur., 2008). Nužnost kiselog pH za lizosomske enzime osigurava dvostruku zaštitu od nekontrolirane razgradnje sastojaka citosola; čak ako se lizosomalna membrana ošteti, ispuštene kisele hidrolaze neće biti aktivne pri neutralnom pH citosola (pH 7,2).



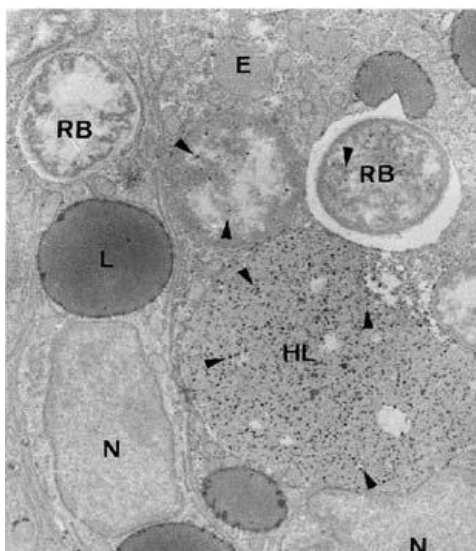
Slika 2. Shematski prikaz nastanka lizosoma i raskrižja puteva endocitoze, fagocitoze i autofagije.

Hidrolitički enzimi namijenjeni za lizosome su visoko glikozilirani proteini s različitim brojem oligosaharidnih ostataka. Glikozilacija enzima je vrlo važna za aktivnost enzima. Još dok se protein nalazi u endoplazmatskom retikulumu dolazi do njegove glikozilacije (Ruddock i Molinari, 2006). U Golgijevom aparatu proteini se dorađuju sintezom ugljikohidratnih dijelova glikoproteina (Braulke i Bonifacino, 2009). Proces je vrlo sličan kod ljudi i kod školjkaša (Robledo i sur., 2006) (Slika 3.). Prilikom prolaska proteina kroz endoplazmatski retikulum i Golgijev aparat N-glikozilacijom u stanicama probavne žlijezde *M. galloprovincialis* dodaju se galaktozni i fukozni ostatci (Robledo i sur., 1995), dok se kod stanica sisavaca dodaje sijalična kiselina i galaktoza. Proces O-glikozilacije u probavnim stanicama školjke *M. galloprovincialis* je iniciran zajedno s N-glikozilacijom u pred odjeljcima Golgijevog aparata i završen je pri dolasku na *cis* Golgijev aparat, dok se u stanicama sisavaca glikozilacija odvija u *cis* Golgijevom aparatu (Robledo i sur., 2006).



Slika 3. Shematski prikaz N-glikozilacije (GlkN) i O-glikozilacije (O-GC) lizosomalnih enzima u hrapavom endoplazmatskom retikulumu (HER), cis (CGA) i trans Golgijevom aparatu (TGA) dodavanjem manoze (Man), galaktoze (Gal), fukoze (Fuk) i sialične kiseline (Sial.k) kod sisavaca i školjkaša (Robledo i sur. 2006).

Probavna žlijezda i hemociti školjkaša roda *Mytilus* imaju dobro razvijen sustav vakuola lizosoma koji se naziva lizosomalni vakuolarni sustav (Slika 4.). Razvoj svjetlosne i elektronske mikroskopije je omogućio njihovo istraživanje kod mediteranske dagnje (Owen, 1970; 1972). Prema terminologiji Owen-a (1972) i drugih autora lizosomalni vakuolarni sustav je sastavljen od malih vezikularnih organela tzv. endosoma (E) na vršnom dijelu stanica. Vakuole nepravilnog oblika (heterofagosomi) su locirani u sredini probavnih stanica. Robledo i sur. (1995) su u heterofagosomima pronašli enzime kisele hidrolaze, stoga su ih nazvali endolizosomi. Heterolizosomi su velike vezikule u kojima je sadržaj homogeno raspršen, a granulirani materijal je citokemijski reaktivan. Enzimi koji se koriste za identifikaciju heterolizosoma (lizosomalni markeri) su kiselna fosfataza, β -glukuronidaza i arilsulfataza (Owen, 1970; 1972) te N-acetil β -heksozaminidaza (Moore, 1976). Lizosomalni vakuolarni sustav čine i rezidualna tjelešca koja se mogu pojaviti bilo gdje u stanici, ovisno o stupnju probavljene tvari. U rezidualnim tjelešcima sadržaj je akumuliran uz samu membranu.



Slika 4. Elektronsko-mikroskopska slika endosoma (E), heterolizosoma (HL) i rezidualnih tjelešaca (RB) u stanicama probavne žlijezde mediteranske dagnje *M. galloprovincialis* (Robledo i sur., 2006).

Lizosomalni vakuolarni sustav obavlja intracelularnu probavu tvari unešenih u stanicu kao i dotrajalih dijelova stanice procesima endocitoze, fagocitoze i autofagije. Endocitozom ulaze makromolekule i voda zaokružene odsječkom stanične membrane, koji zatim pupa u stanicu i oblikuje vezikulu koja se zatim spoji s ranim endosomom. Lizosomi su također uključeni u probavu materijala unesenim fagocitozom. U hemocitima mediteranske dagnje fagocitoza je najvažniji mehanizam obrane protiv invazije mikroorganizama (Moore i Allen, 2002). Autofagija je proces koji se aktivira u nepovoljnim uvjetima za stanicu, prilikom nedostatka hranjivih tvari, hipertermije, hipoksije i smanjenog saliniteta (Klionsky i Emr, 2000; Cuervo, 2004; Moore i sur., 2007). Tijekom autofagije stanica razgrađuje oštećene organele (endoplazmaski retikulum i mitohondrije) i ponovna sintetizira tvari iz vlastitih komponenata (Klionsky i Emr, 2000). Proces autofagije u lizosomima je predstavljen kao druga linija obrane organizma od oksidativnog stresa (Cuervo, 2004; Moore i sur., 2007). Degeneracijske promjene u probavnoj žlijezdi mekušaca, zbog povećanog prometa proteina u procesu autofagije uslijed oštećenja oksidativnim radikalima, dovode do oštećenja lizosomalne membrane (Kirchin i sur., 1992; Izagirre i Marigómez, 2009). Oštećeni dijelovi membrane nakupljaju se u obliku granula lipofuscina u rezidualnim tjelešcima lizosoma (Moore, 1988).

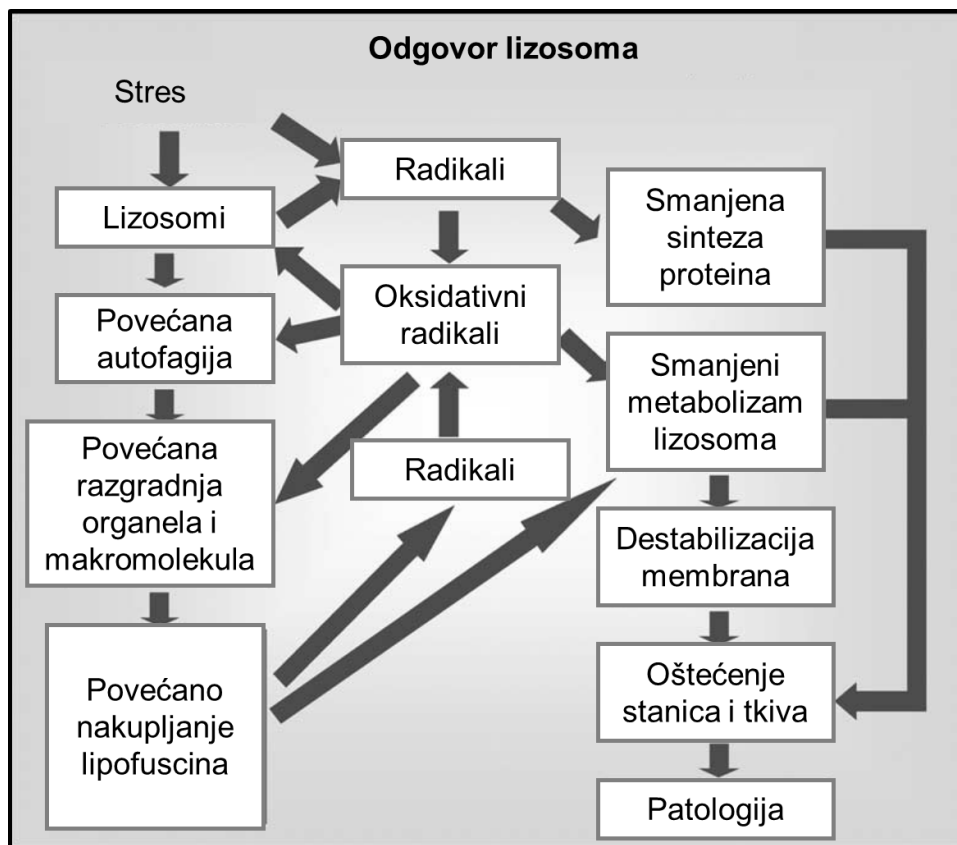
Također, povećano nakupljanje lipofuscina ukazuje na promjene uzrokovane starošću organizma. Povećano nakupljanje lipofuscina u lizosomima može inhibirati lizosomalne enzime, te smanjiti intenzitet metaboličkih procesa unutar organela (Dimitriadis i sur., 2004). Također, povećano nakupljanje lipofuscina, može uzrokovati pucanje lizosomalnih membrana, čime se narušava njihova stabilnost (Viarengo i sur., 2007). Moguće je da se tijekom perioda povećanog intenziteta hranjenja granule lipofuscina mobiliziraju iz produkata peroksidacije neutralnih masti oštećenih staničnih komponenti i nakupljaju se u lizosomima (Cajaraville i sur., 1995). Neutralne masti u lizosomima nakupljaju se u lipidne kapljice tijekom povećane fluktuacije hrane i za vrijeme reproduktivog ciklusa (Cancio i sur., 1999), te su važan izvor energije tijekom ovih procesa i rasta (Holland, 1978). Povećana količina lipofuscina i neutralnih masti može dovesti do oštećenja lizosoma i pucanja lizosomalne membrane (Brunk i Terman, 2002). Praćenje stabilnosti lizosomalne membrane je dobar pokazatelj integriteta lizosoma, te se koristi za praćenje odgovora na sezonske promjene abiotičkih parametara u okolišu (Bocchetti i Regoli, 2006; Moschino i sur., 2011) i onečišćenja (Petrović i sur., 2004).

1.2.1. LIZOSOMALNI ODGOVOR NA ČIMBENIKE U OKOLIŠU

Lizosomi u probavnim stanicama dagnje su glavno mjesto probave i unutarstanične razgradnje onečišćivala (Viarengo i Nott, 1993). Preopterećenje onečišćivalima mijenja strukturu i funkciju lizosoma, i time dovodi do oštećenja stanice i poremećaja na višim razinama biološke organizacije. Promjene lizosoma kod školjkaša *Mytilus galloprovincialis* mogu se pratiti na substaničnoj i staničnoj razini. Substanične promjene karakterizirane su promjenom u aktivnosti hidrolitičkih enzima, dok je poremećaj na nivou stanice zabilježen u promjeni u metabolizmu stanice kada dolazi do destabilizacije lizosomalnih membrana, te povećanog nakupljanja neutralnih masti i lipofuscina. Također, nakupljene tvari u lizosomu mogu utjecati na strukturne promjene u lizosomu, kao što su promjene broja, površine i volumena lizosoma. Do poremećaja na staničnom nivou dolazi uslijed unosa štetnih tvari u lizosom procesom endocitoze i autofagije. Nastala oštećenja dovode do destabilizacije lizosomalne membrane, pri čemu se sadržaj iz lizosoma ispusti u citoplazmu te narušava rad stanice (Brunk i Terman, 2002).

Moore i sur. (2006) su na temelju istraživanja utjecaja stresa na lizosomalni sustav, te promatranjem pojedinih lizosomalnih parametara razvili konceptualni model koji olakšava

razumijevanje procesa u lizosomu (Slika 5.). Ovaj konceptualni model omogućio je bolje razumijevanje fiziologije lizosoma i utjecaja stresa na promjenu lizosomalnih parametara.



Slika 5. Konceptualni model odgovora lizosoma (Moore i sur., 2006).

Utjecaj stresa na organizam, bilo prirodnog ili antropogenog porijekla može dovesti do povećanog stvaranja kisikovih radikala unutar lizosoma. Kisikovi radikali oštećuju membrane, proteine i DNA doprinoseći smanjenju sinteze proteina, oštećenja same stanice i patofiziološkim promjenama u stanici (Krishnakumar i sur., 1995; Regoli, 2000; Livingstone, 2001; Domouhtsidou i Dimitriadis, 2001).

Destabilizacija lizosomalnih membrana je dokazana kod izloženosti organizma na onečišćivala u laboratorijskim istraživanjima (Moore, 1988) i istraživanjima u okolišu (Domouhtsidou i Dimitriadis, 2001; Petrović i sur., 2004; Perić i sur., 2012). Stabilnost lizosomalnih membrana koristi se za predviđanje oštećenja jetre i tumora u jetri kod različitih vrsta riba (Múgica i sur., 2015). Također, povišeno nakupljanje lipofuscina unutar lizosoma posljedica je oštećenja stanične membrane zbog proizvodnje oksidacijskih radikala, koji

nastaju uslijed djelovanja različitih onečišćivala (Moore, 1988; Viarengo i Nott, 1993). Lipofilni organski onečišćivači mogu mijenjati i metabolizam neutralnih lipida što dovodi do njihovog nakupljanja unutar lizosoma u obliku kapljica (Moore, 1988; Krishnakumar i sur., 1995).

Odgovor lizosoma može se koristiti kao prognostički pokazatelj stanja organizma jer promjene u lizosomu prethode oštećenju stanice i patologiji tkiva (Moore i sur., 2006). Promjene u odgovoru lizosoma prate se kod različitih skupina organizama uključujući kolutićavce (Hankard i sur., 2004), mekušce (Hwang i sur., 2014; Izagirre i sur., 2014; Lekube i sur., 2014), rakove (Aguirre-Martínez i sur., 2013) i ribe (Nesto i sur., 2007). Kako bi se osiguralo pravilno praćenje stanja u okolišu razvijen je pristup kojim bi se više pokazatelja uključilo u skup alata ili indeks pogodan za otkrivanje i praćenje promjena u određenom organizmu (Hagger i sur., 2008). Indeksi utvrđeni za procjenu stanja u okolišu su indeks lizosomalnog odgovora (eng. *Lysosomal Response Indeks* – LRI) (Izagirre i Marigomez, 2009), indeks zdravstvenog stanja (eng. *Health Status Index* – HIS) (Dagnino i sur., 2007) i integrirani odgovor pokazatelja stresa (eng. *Integrated Biomarker Response* - IBR) (Beliaeff i Burgeot, 2002). Kako bi koristili indekse LRI, HIS i IBR, sedam pokazatelja, od kojih većina ukazuje na promjene u lizosomima je promatrano u probavnoj žlijezdi dagnji *M. galloprovincialis* uključujući pokazatelj općeg stresa, kao što su stabilnost lizosomalne membrane (SLM), količina neutralnih masti (NM) i lipofuscina (LF), srednja debljina probavnog epitela (MET), morfometrijske promjene u lizosomima i biomarkeri specifičnog stresa, kao što su sadržaj metalotioneina (MT), aktivnosti acetilkolinesteraze (AChE), EROD aktivnost i aktivnost superoksid dismutaze (SOD) i katalaze (CAT).

Prilikom određivanja indeksa mogu se pratiti različiti parametri i aktivnost enzima, uključujući i lizosomalne, a istraživanja lizosomalnih parametara i enzima koji će najbolje opisati stanje u okolišu su još u tijeku.

1.3. KISELE HIDROLAZE

U lizosomima se metaboliziraju kiselim hidrolazama makromolekule i čestice unesene endocitozom, fagocitozom ili autofagijom iz citosola (Hevelone i Hartman, 1988). Lizosomi sadrže oko 50 različitih enzima, razvrstanih u šest glavnih grupa: proteaze, glikozidaze, lipaze, fosfataze i sulfataze, te nukleaze (Saftig i Klumperman, 2009). Proteaze npr.

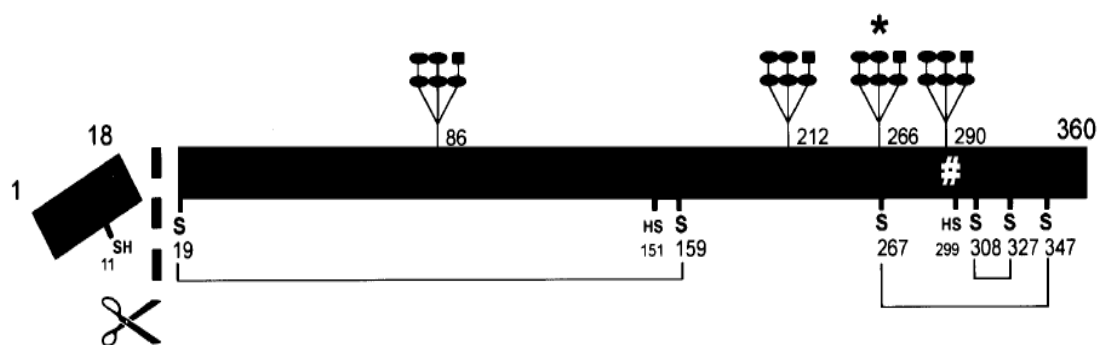
kolagenaze, katepsini i peptidaze hidroliziraju proteine u aminokiselinske ostatke. Glikozidaze hidroliziraju glikozidnu vezu, pretvarajući polisaharide u monosaharide. Enzimi koji sudjeluju u probavi ugljikohidrata su npr. β -glukozidaza, heksozaminidaza A, α -manozidaza, α -fukozidaza, sialidaza i dr. Sfingomijelidaza i esteraza su lipaze koje hidroliziraju lipide do masnih kiselina i alkohola. Fosfataze, npr. kisela fosfataza i kisela fosfodiesteraza hidroliziraju fosfatne skupine u organskim spojevima s fosfatima. Sulfataze, (npr. arilsulfataza) hidroliziraju sulfatnu skupinu u organskim spojevima sa sulfatima. Litička komponenta prisutna u lizosomima je laktoferin koji djeluje kao helator željeza, odnosno uklanja željezo iz lizosomskih vezikula tijekom litičke aktivnosti u lizosomima. Za hidrolizu nukleinskih kiselina u lizosomima se nalaze i dva tipa nukleaza, deoksiribonukleaza (DNaza) koja hidrolizira DNA i ribonukleaza (RNaza) koja hidrolizira RNA. Nukleinske kiseline se hidroliziraju do dušične baze, fosfata i šećera.

1.3.1. KISELA DNaza

Kisela DNaza (EC 3.1.22.1) je enzim koji je u literaturi i bazi podataka o enzimima (eng. *Braunschweig ENzyme Database - BRENDA*) poznat i pod nazivom DNaza II. Opisane su tri varijante DNaze II: DNaza II α , DNaza II β i L-DNaza II - LEI. DNaza II α je najbolje istražena kisela DNaza i glavni predstavnik DNaze II. Aktivnost DNaze II α utvrđena je u svim tkivima sisavaca (Cordonnier i Bernardi, 1968), a najveća aktivnost evidentirana je u slezeni (Cunningham i Laskowski, 1953). Ostale dvije varijante su vrlo specifične: DNaza II β utvrđena je u žlijezdama slinovnicama, te u plućima i prostati (Swenson i Hodes, 1969), dok L-DNaza II – LEI nastaje iz LEI prekursora djelovanjem elastaze i drugih serinskih proteaza u stanicama kože kod čovjeka (Torriglia i sur., 2008).

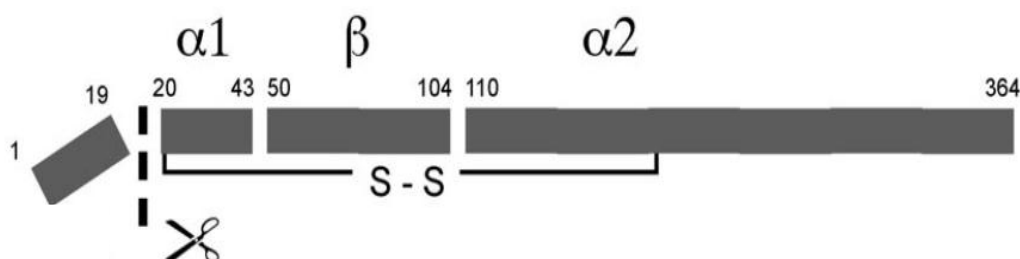
DNaza II otkrivena je kasnih 40-tih godina prošlog stoljeća (Catcheside i Holmes, 1947). Optimum djelovanja DNaze II je kiseli medij u rasponu pH 4,5 – 5,5 (Cordonnier i Bernardi, 1968). DNaza II zbog svoje aktivnosti u kiselom pH lokalizirana je u lizosomima (Ohkouchi i sur., 2013). Divalentni kationi kao što su Zn^{2+} ili Cu^{2+} inhibiraju aktivnost DNaze II (Bernardi, 1971; Hevelone i Hartman, 1988), kao i natrij-klorid (Yasuda i sur., 1992). Potpuna inaktivacija zabilježena je pri temperaturi od 75 °C (Murai i sur., 1980; Yasuda i sur., 1992). Obitelj DNaze II ne dijeli homologne slijedove aminokiselina s drugim proteinima, a unutar obitelji postoje vrlo konzervirani dijelovi (Baker i sur., 1998). Aminokiselinski slijedovi

DNaze II sadrže sedam cisteina (eng. *Cys*), od kojih je šest visoko konzervirano kod kralješnjaka, te formiraju barem jednu S-S vezu (MacLea i sur., 2002) (Slika 6.). Polipeptid sadrži barem četiri glikozilacijska mjesta, koja su vrlo bitna za dozrijevanje enzima i katalitičku aktivnost. Mutacije na bilo kojem od glikozilacijskih mjesta inhibiraju glikozilaciju, a nedostatak glikozilacijskih mjesta posljedično uzrokuje smanjenje molekularne mase zrelog enzima (MacLea i sur., 2003) (Slika 6.). Za katalitičku aktivnost enzima bitan je pH lizosoma, te proteolitičko procesiranje kod nekih vrsta. Otpuštanjem signalnog peptida započinje proteolitičko procesiranje enzima. Proteolitičkim procesiranjem DNaze II u svinji iz jedinog prekursora polipeptida nastaju tri peptida, a dva od njih su povezana disulfidnim vezama (Takeshita i sur., 1998; Wang i sur., 1998). Proteolitičko procesiranje odvija se u lizosomu, gdje iz prekursora proteina molekularne mase 45 kDa, nastaju forme molekularne mase 35 kDa i 10 kDa, koje se smatraju α i β podjedinicom (Slika 7.). Proteolitičko procesiranje u lizosomu nije nužno za aktivaciju enzima (Huang i sur., 2009).



Slika 6. Predložena struktura DNaze II kod čovjeka (MacLea i sur., 2003).

U stanicama čovjeka su utvrđene katalitički aktivne DNaze II različitih molekularnih masa u od 45 kDa (MacLea i sur., 2002; 2003) (Slika 6.), 38 kDa (Chou i sur., 2002), te 32 kDa (Nakajima i sur., 2002), a koje u lizosomu ne prolaze daljnje proteolitičko procesiranje (Cheng i sur., 2006).



Slika 7. Predložena struktura DNaze II kod svinje (MacLea i sur., 2002).

Proteolitičko procesiranje DNaze II kod miša odvija se u lizosomu (Ohkouchi i sur., 2013). Kod miša su utvrđene izoforme molekularne mase 45 kDa u mikrosomalnoj frakciji, te izoforme 30 kDa i 23 kDa u lizosomu (Ohkouchi i sur., 2013). Različita molekularna masa DNaze II u organizmima može ovisiti o sialičnoj kiselini vezanoj za ugljikohidratne komponente, te vezanog manoza – 6 - fosfata tipičnog za lizosomalne enzime (Baranovski i sur., 2004). Molekularna masa enzima može se razlikovati i zbog proteolitičkog procesiranja u lizosomu (Schafer i sur., 2007; Huang i sur., 2009; Ohkouchi i sur., 2013).

Istraživanja DNaza u morskih beskralješnjaka počela su 70 – tih godina prošlog stoljeća (Rasskazov i sur., 1975). Endonukleazna aktivnost kisele DNaze utvrđena je pri pH 4,5 – 5,5 u spužvama, školjkašima, glavonošcima, trpovima, zvjezdačama i zmijačama (Rasskazov i sur., 1975). Zajedničko obilježje kiselih DNaza istraživanih beskralješnjaka je da im je aktivnost inhibirana dvovalentnim kationima, te da razgrađuju nativnu DNA, a ne denaturiranu, kao što je slučaj kod viših organizmima. A-DNaza u spermijima ježinca pokazuje maksimalnu aktivnost u kiselom pH području, te je neovisna o djelovanju kationa, što vrijedi i za kisele DNaze viših organizama (Shastina i sur., 2003). Međutim, A-DNaza nije lokalizirana u lizosomima, već u perinuklearnom prostoru. U školjkaša *Crenomytilus grayanus* kiselu DNaza je lokalizirana u lizosomu, a utvrđena aktivnost u probavnoj žlijezdi je viša nego u škrgama (Menzorova i Rasskazov, 2007). Osim istraživanja aktivnosti kiselih DNaza provedena su istraživanja izoformi aktivnog enzima. U slatkovodnom pužu *Viviparus viviparus* utvrđene su brojne izoforme u probavnoj žlijezdi (Popov i sur., 2003). Djelomična karakterizacija kisele DNaze u školjkaša *Chlamys islandica* pokazala je konzerviranost DNaze II, te endonukleaznu aktivnost, a utvrđena aktivna forma enzima je molekularne mase

42 kDa (Øverbø i Myernes, 2006). U endosomu spužve *Tethya aurantium* utvrđena je jedna izoforma enzima, dok su u korteksu prisutne dvije izoforme enzima (Fafandel i sur., 2010). U istom istraživanju potvrđeno je da su aktivne izoforme DNaze II, glavni predstavnici kisele DNaze.

Uloga DNaze II je razgradnja DNA u lizosomu (Evans i Aguilera, 2003). DNaza II je nespecifična endodeoksiribonukleaza, koja hidrolizira fosfodiestersku vezu između bilo koja dva nukleotida osim četiri terminalna na 3'- kraju (Harosh i sur., 1991). Zbog nastanka 3' – P krajeva DNaza II ne može sudjelovati u replikaciji, popravku i rekombinaciji DNA molekule. DNaza II hidrolizira nativnu dvostruku DNA 5-10 puta bolje nego denaturiranu DNA, dok RNA ne može hidrolizirati (Murai, 1980). Istraživanjem katalitičkog mehanizama razgradnje DNA utvrđeno je da DNaza II prekida oba lanca DNA stvarajući jednostruke lomove (Tsubota i sur., 1974).

Osim metaboličke uloge, DNaza II ima zaštitnu ulogu u stanici. Istraživanja provedena na modelnim organizmima poput kolutićavca *Caenorhabditis elegans* pokazala su primarnu funkciju DNaze II u razgradnji DNA nakon fuzije lizosoma s fagosomom (Lyon i sur., 2000). Također je utvrđena obrambena uloga DNaze II u organizmu pri čemu se razgrađuje nagomilana, neprobavljena DNA u lizosomu hemocita nakon fagocitoze bakterija kod *C. elegans* (Seong i sur., 2006). Bergsmedh i sur. (2006) dokazali su da je razgradnja apoptotične DNA uz pomoć DNaze II mogući mehanizam zaštite od pojave tumorskih stanica. Također, dokazana je uloga DNaze II u razgradnji DNA unešene u lizosom procesom autofagije (Evans i Aguilera, 2003). Razgradnja DNA u makrofazima je sporedni proces razgradnje DNA, te se razlikuje od autonomne razgradnje stanične DNA prilikom apoptoze kada kaspaza aktivira DNazu ili endonukleazu G (McIlroy i sur., 2000; Krieser i sur., 2001).

Biološka uloga DNaza beskralješnjaka još nije utvrđena. Međutim, svojstvo metaboliziranja molekula DNA iskorišteno je za procjenu stanja okoliša (Menzorova i Rasskazov, 2009; Fafandel i sur., 2008). Promjene ukupne aktivnosti kiselih DNaza i povećan broj izoformi u probavnoj žlijezdi slatkovodnog puža *Viviparus viviparus* utvrđena je nakon izlaganja fenolu, teškim metalima i deterdžentu (Popov i sur., 2003). DNaze iz embrija morskog ježinca *Strongylocentrotus intermedius* koje hidroliziraju nativnu DNA u morskoj vodi inhibirane su u prisustvu teških metala, surfaktanta, pesticida i drugih derivata (Menzorova i Rasskazov, 1999). Aktivnost DNaza mijenja se i kao odgovor na izlaganje dagnje *M. galloprovincialis* deterdžentima, metalima i naftnim derivatima, gdje je utvrđena povećana aktivnost u

probavnoj žlijezdi i hemocitima uslijed djelovanja onečišćivala (Fafandjel i sur., 2008). Praćenje stanja u okolišu te utvrđivanje razlika među postajama na temelju aktivnosti kisele DNaze istraženo je kod školjkaša *Crenomytilus grayanus* (Menzorova i Rasskazov, 2007). Dosadašnja istraživanja identifikacije kisele DNaze kod beskralješnjaka mogu se djelomično usporediti s onima istraženim u višim organizmima (Øverbø i Myernes, 2006). Međutim, karakterizacija i biološka uloga kisele DNaze kod beskralješnjaka još nije dovoljno istražena.

2. CILJEVI I HIPOTEZE

2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

2.1. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

- 1) Identificirati i lokalizirati kiselu DNazu
- 2) Odrediti aktivnost kisele DNaze u škragama i probavnoj žlijezdi prirodnih populacija dagnje *Mytilus galloprovincialis* u različitim okolišnim uvjetima
- 3) Usporediti aktivnost kisele DNaze s histokemijskim promjenama u lizosomima obzirom na različite okolišne uvjete i prisutnost onečišćenja.

2.2. HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

Aktivnost kisele deoksiribonukleaze u mediteranskoj dagnji, *M. galloprovincialis*:

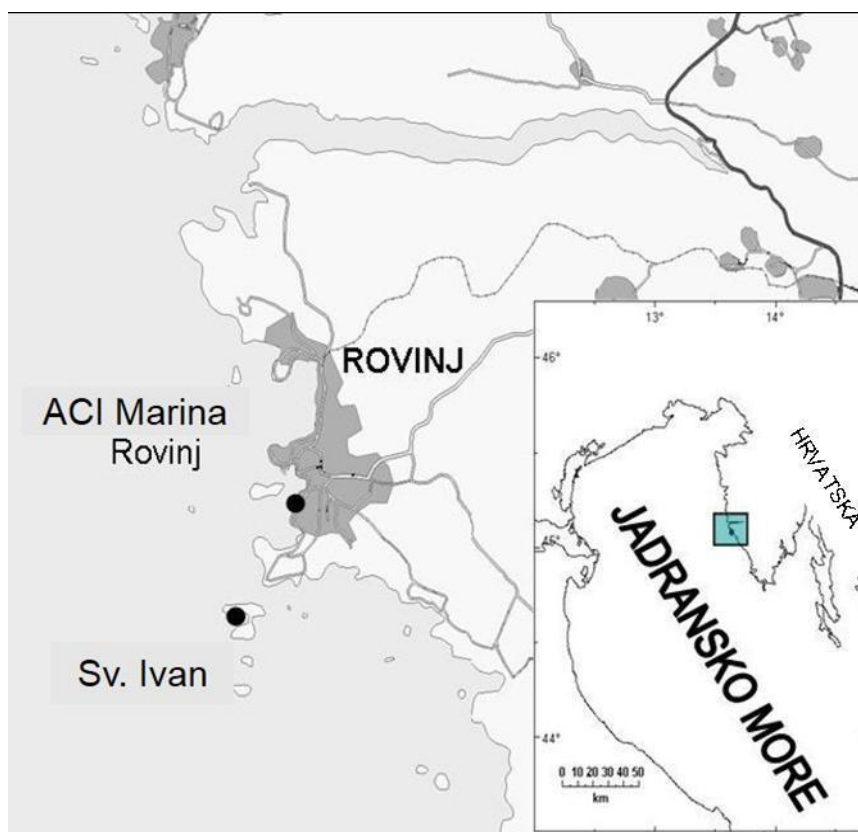
- 1) je tkivno specifična
- 2) odgovara aktivnosti lizosomalne DNaze II
- 3) odgovara na uvjete u okolišu
- 4) upotpunjuje integrirani odgovor lizosoma na okolišne uvjete

3. MATERIJALI I METODE

3. MATERIJALI I METODE

3.1. PODRUČJE ISTRAŽIVANJA I UZORKOVANJE ŠKOLJKAŠA

Uzorci dagnje, *M. galloprovincialis* Lamarck 1819, sakupljeni su od kolovoza 2012. godine do kolovoza 2013. godine, na dvije postaje u sjevernom Jadranu: otok Sv. Ivan i ACI Marina Rovinj (Slika 8.).



Slika 8. Mjesta uzorkovanja dagnje *Mytilus galloprovincialis* u sjevernom Jadranu, Rovinjski akvatorij (●).

Postaja Sv. Ivan nalazi se na zapadnoj obali istarskog poluotoka, te je udaljena 3 km zračne linije od Rovinja. U blizini postaje Sv. Ivan nema izvora onečišćenja, stoga se smatra kontrolnom postajom u istraživanju. Unutar urbaniziranog područja Rovinja nalazi se postaja ACI Marina Rovinj, mjesto koje je pod utjecajem mješavine onečišćivala porijeklom iz komunalnih ispusta i marine. Prilikom uzorkovanja dagnji tijekom godine dana sondom su izmjereni temperatura mora i salinitet (Multiline P4 Universal Pocket Meter, WTW). Najviše vrijednosti temperature zabilježene su u kolovozu (25 °C) na obje postaje (Tablica 1.). Temperatura mora u jesen opada (od 20 °C – 11 °C), a najniže vrijednosti zabilježene su u veljači i ožujku (10 °C). U svibnju temperature postepeno rastu (18 °C), te u srpnju ponovno

dostižu visoke vrijednosti (23 °C). Niže vrijednosti saliniteta u ljetnom i jesenskom razdoblju su zabilježene na obje postaje (31,2 – 34,5). Salinitet na postaji Sv. Ivan je viši od prosinca do svibnja (36,2 – 37), a na postaji ACI Marina od prosinca do travnja (35,1 – 37,1). U svibnju dolazi do pada saliniteta (29,2) na postaji ACI Marina.

Tablica 1. Temperatura i salinitet na postajama Sv. Ivan i ACI Marina od kolovoza (VIII) 2012. do kolovoza 2013. godine.

Vrijeme (mjeseci)	Temperatura (° C)		Salinitet	
	Sv. Ivan	ACI	Sv. Ivan	ACI
VIII	25	25	35	34
IX	22,5	23	34,5	34,5
X	20,1	22	34,5	34,2
XI	16	15,2	35	35,4
XII	12,2	12,4	36,2	36,2
I	10,3	11,1	37,4	35,1
II	9,9	10,2	37,5	36,8
III	9,7	10,5	37,4	37,1
IV	12,2	13	37	37,1
V	18	18,2	36	29,2
VI	21	22,4	35,9	34,6
VII	22,8	22,7	33,6	31,2
VIII	25	23,2	35,2	35,6

Po deset jedinki dagnji prosječne duljine (5 ± 1 cm), uzorkovane su iz prirodnih staništa svaki mjesec. Jedinke su nakon uzorkovanja, u spremnicima s morskom vodom, prenesene u laboratorij gdje se unutar jednog sata od uzorkovanja izoliralo tkivo.

3.2. IZOLACIJA I PRIPREMA TKIVA

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

Poprečni presjeci drugog para škrge i probavne žlijezde naglo su smrznuti u N-heksanu, prethodno ohlađenom u tekućem dušiku. Tako obrađeni uzorci pohranjeni su na -80 °C, do pripreme histoloških preparata.

3.3. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI KISELE DNaze DENATURIRAJUĆIM PAGE ZIMOGRAMOM (DPZ)

Za određivanje aktivnih izoformi kiselih DNaza u poliakrilamidnom gelu korištena je modificirana metoda zimograma (Lacks, 1981). Denaturirajuća SDS-PAGE elektroforeza je izvedena u denaturirajućim uvjetima u 7,5% akrilamidnom gelu (mješavina 29,2% akrilamida i 0,8% N,N bisakrilamida, 5X elektroforetski pufer, TEMED, 10% amonijev persulfat) koji je sadržavao 0,250 ml standarda DNA (2mg/ml) (Sigma - Aldrich, USA). Nakon dodavanja TEMEDA gelovi su polimerizirani u MINI protean II elektroforetskim komorama (Biorad, Munich, Germany). Uzorci su u puferu za nanošenje uzoraka (50% glicerol, 50% 1X elektroforetski pufer, 0,1% bromfenol plavilo) djelomično denaturirani 15 minuta pri temperaturi od 65 °C. Količina proteina nanesenih u jažice iznosila je 20 µg. Elektroforeza je izvođena pri konstantnom naponu od 90V u elektroforetskom puferu (25mM TRIS, 250mM glicin, pH 8,3, 0,1% SDS).

Nakon elektroforeze, gelovi su višekratno isprani u reaktivacijskom puferu i inkubirani u svježem reaktivacijskom puferu (50mM Na-acetat, pH 5,5) koji sadržava 250 µl otopine etidij bromida (2mg/ml), pri temperaturi od 27 °C u vremenu od 24h. Aktivne izoforme kiselih DNaza su vizualizirane nakon osvjetljavanja UV svjetlom. Gelovi obojeni etidij bromidom fluoresciraju nakon osvjetljavanja UV svjetlom (312nm), a pozitivna DNazna aktivnost očitovala se u pojavi tamne pruge na gelu na mjestu gdje je reaktivirana DNaza razgradila

DNA u gelu. Molekularna masa kisele DNaze određena je usporedbom sa proteinskim standardom (Bio-Rad).

Za vizualiziranje gelova korištena je kamera Gel Logic 100, a za obradu slika program 1D image analysis software (Gel Logic 100 Imaging system, KODAK, New Haven, USA).

3.4. ODREĐIVANJE DOZRIJEVANJA KISELE DNAZE DENATURIRAJUĆIM PAGE ZIMOGRAMOM

Za utvrđivanja dozrijevanja enzima kisele DNaze dagnje s kontrolne postaje Sv. Ivan prenesene su u termički izoliranim posudama i prebačene u akvarije s protočnom morskom vodom. Nakon 2 dana aklimatizacije dagnje su injektirane klorokinom (Sigma – Aldrich, USA), koji neutralizira pH lizosoma, te tako inaktivira lizosomalne enzime (Bergamini i sur., 2003). Skupina kontrolnih dagnji injektirana je sa 100 µl morske vode, dok su tretirane dagnje injektirane sa 100 µl otopine 30mM, 100mM i 300mM klorokina u morskoj vodi. Dagnje su izlagane 3, 8 i 24 sata, nakon čega je uslijedila izolacija škrge i probavne žlijezde. Koncentracija proteina određena je Lowry-evom metodom (1951), a aktivnost enzima zimogramom.

3.5. IDENTIFIKACIJA DNAZE II WESTERN ANALIZOM

U svrhu identifikacije proteinskih vrpca aktivnog enzima korištena je imunodetekcija antitijelima na DNazu II (Western analiza). Homogenati proteina (20 µg po jažici) su otopljeni u Laemmli-jevom puferu (Laemmli, 1970), te denaturirani pri 95 °C 10 minuta u termobloku (Thermomixer 5437, Eppendorf). Uzorci su razdvojeni SDS-PAGE elektroforezom u 12% poliakrilamidnom gelu. Elektroforeza se odvijala pri 90V u elektroforetskom puferu (25mM TRIS, 250mM glicin, pH 8,3, 0,1% SDS). Nakon razdjeljivanja proteina SDS-PAGE elektroforezom, proteini su preneseni s poliakrilamidnog gela na nitroceluloznu membranu (Hybond-C, Amersham) polusuhim transferom (Bio-Rad) u puferu za prijenos (25mM TrisHCl, 192mM glicin, 20% metanol V/V). Nakon transfera, membrana je blokirana preko noći u blokirajućem puferu (3% BSA u TBS-u, pH 8,0). Membrana je potom inkubirana u otopini ovčjeg primarnog poliklonalnog protutijela proizvedenog na ljudsku DNazu II (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA) u omjeru 1:100, nakon čega je ispirana 1X u TBST puferu (0,1% Tween 20 u TBS-u) po 10 minuta i 2X u

TBS puferu (150mM NaCl, 20mM NaCl) 10 minuta. Nakon ispiranja, vezano je sekundarno protutijelo razvijeno u magarcu na Ig G ovce i konjugirano s alkalnom fosfatazom (Sigma – Aldrich, USA) (1:3000). Dodavanjem supstrata NBT (nitro-plavi tetrazolijski klorid) i BCIP (5-brom-4-klor-3'-indolilfosfat p-toluidinska sol) koje alkalna fosfataza pretvara u vidljivi ljubičasti precipitat postaje vidljiv položaj DNazne proteinske vrpce. Molekularna masa vizualiziranog proteina određena je usporedbom s proteinskim standardom (Bio-Rad).

3.6. IMUNOHISTOKEMIJSKA LOKALIZACIJA DNAZE II

Lizosomalna lokalizacija DNaze II utvrđena je dvostrukim imunofluorescentnim bojanjem koristeći smjesu protutijela razvijenih na humanu DNazu II i katepsin D.

Tkivo dagnje, škrge i probavna žlijezda, uklopljeni su u O.C.T. mediju (Microm Inc. GmbH, Germany) te su poprečni presjeci debljine 10 μ m izrezani na kriotomu (Zeiss Hyrax C 50, Microm GmbH, Germany). Poprečni presjeci su nanoseni na suha predmetna stakalca prevučena poli-L-lizinom, potom rehidrirani 15 minuta u PBS-u (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 8mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄) te inkubirani u otopini za blokiranje (1% BSA u PBS-u) 30 minuta. Uzorci su inkubirani u smjesi primarnih komercijalnih poliklonalnih protutitijela na ljudsku DNazu II (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA) i protutijela na katepsin D (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA) razrijeđenim u omjeru 1:50. Uzorci su inkubirani u 50 μ l otopine protutijela u 1%-tnoj otopini BSA u omjeru u vlažnoj komori na +4 °C preko noći. Potom su preparati isprani u HS-PBS-u (1,8% NaCl u PBS-u) 2X po 15 minuta, a nakon toga u PBS-u 2X po 15 minuta. Za detekciju DNaze II korišteno je sekundarno protutijelo obilježeno fluorescein-izocijanatom (FITC) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA), molekulom koja emitira zelenu fluorescenciju, a za utvrđivanje katepsina D korišteno je sekundarno protutijelo obilježeno fluorescentnom bojom Alexa Fluor 546 (Molecular Probes, USA), koja emitira crvenu fluorescenciju. Inkubacija u otopini sekundarnih protutijela razrijeđenih u omjeru 1:100 u otopini 1%-tnog BSA izvođena je pri sobnoj temperaturi. Potom su preparati isprani u HS-PBS-u (1,8% NaCl u PBS-u) 2X po 15 minuta, a nakon toga u PBS-u 2X po 15 minuta. U svrhu vizualiziranja jezgre, stanična DNA je obojana DAPI bojom (Sigma-Aldrich, USA) (0,1 μ g/ml) koja osvijetljena UV svjetlošću emitira plavu svjetlost. Pokrovno stakalce pričvršćeno je glicerolom niske fluorescencije (Sigma – Aldrich, USA) na predmetno stakalce. Za vizualiziranje lizosoma korišten je fluorescentni mikroskop

Imager Z1 (Zeiss, Germany). Fotografije su snimljene kamerom AxioCam Hrm (Zeiss, Germany).

3.7. ODREĐIVANJE SEZONSKE AKTIVNOSTI KISELE DNAZE

3.7.1. PRELIMINARNO ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI KISELE DNAZE JEDNOSTRUKOM RADIJALNOM ENZIMSKOM DIFUZIJOM

Za preliminarno određivanje sezonskih razlika u aktivnosti kisele DNaze u homogenatima tkiva dagnje korištena je osjetljiva jednostruka radijalna enzimska difuzija (engl. *Single Radial Enzyme Diffusion* – SRED) (Nadano i sur., 1993). Otopina agaroze (0,5 %) priređena je u natrij – acetatnom puferu (50mM Natrij acetat, pH 5,5) u koju je dodana otopina DNA (0,2 mg/ml) i otopina etidij bromida (0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), te je izlivena u staklene petrijevke ($\varnothing 12\text{cm}$). Na čvrstom agaroznom gelu u pripremljene jažice naneseo je 2,5 μl homogenata tkiva (7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Gelovi su inkubirani 24h u termopeći pri temperaturi od 27 °C. Enzimatska aktivnost očitovala se u pojavi tamne kružne zone oko mjesta nanošenja uzorka koja je nastala zbog radijalne difuzije enzima koji razgrađuje DNA u gelu dok su prilikom osvjetljavanja gelova UV svjetlom (312 nm) izrazito fluorescirala mjesta gdje je etidij bromid vezan za nerazgrađenu DNA. Za vizualiziranje gelova korištena je kamera Gel Logic 100, a za obradu slika program 1D image analysis software (Gel Logic 100 Imaging system, KODAK, New Haven, USA).

3.7.2. FLUORIMETRIJSKO ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI KISELE DNAZE

Za mjerenje aktivnosti enzima kisele DNaze u homogenatu tkiva dagnje korištena je fluorimetrijska metoda. Aktivnost DNaza u tkivima određena je u mikrotitarskim pločama korištenjem fluorescentne boje PicoGreen® prema standardnom protokolu za fluorimetrijsko određivanje aktivnosti DNaza (Fafandel i sur., 2008). U pojedinu jažicu mikrotitarske pločice dodano je 10 μl homogenata tkiva (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) i 80 μl 50mM natrij acetatnog pufera. Enzimatska reakcija započela je dodavanjem 10 μl otopine dvolančane DNA (Sigma-Aldrich, USA) (0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Nakon inkubacije od 15 minuta pri 27 °C, u jažice je dodano 100 μl PicoGreen® boje, otopljene u TE puferu (10 mM Tris, 1 mM EDTA) u omjeru 1:200.

Određivanje aktivnosti DNaza temelji se na promjeni intenziteta fluorescencije zbog hidrolize DNA djelovanjem DNaza prisutnih u proteinskom ekstraktu i smanjenju udjela kompleksa dDNA - PicoGreen®. Fluorescencija je mjerena u nativnom uzorku (F_u), a zatim u uzorku

inkubiranom 15 minuta na temperaturi od 95 °C (F_o) u termobloku (Thermomixer 5437, Eppendorf). Aktivnost DNaze (ΔF) izračunata je prema izrazu $\Delta F = F_o - F_u$. Za mjerenje intenziteta fluorescencije korišten je čitač mikrotitarskih ploča Fluoroscanner Ascent microplate reader (Labsystem, Finland) opremljen kombinacijom filtera s ekscitacijom pri valnoj duljini od 485 nm i emisijom pri 520 nm.

3.8. HISTOKEMIJSKE PROMJENE U LIZOSOMIMA PROBAVNE ŽLIJEZDE DAGNJE

3.8.1. ODREĐIVANJE STABILNOSTI LIZOSOMALNIH MEMBRANA

Stabilnost lizosomalne membrane određena je histokemijskom metodom po Moore-u (1976). Poprečni prerezi probavnih žlijezdi smješteni su na nosač kriotoma prethodno ohlađenim na -30 °C. Za pojedini uzorak od pet žlijezda pripravljeno je 8 preparata prereza debljine 10 μ m. Smrznuti prerezi nanešeni su na predmetno stakalce zagrijano na sobnu temperaturu, a potom inkubirani u vodenoj kupelji na 27 °C u labilizirajućem citratnom puferu (0,1M Na-citratni pufer, 2,5% NaCl, pH 4,5) u vremenima od 2, 5, 10, 15, 20, 30 i 40 minuta. Zahvaljujući djelovanju labilizirajućeg pufera, tijekom inkubacije dolazi do destabilizacije lizosomalne membrane, nakon čega slijedi inkubacija u vodenoj kupelji pri temperaturi od 27 °C u otopini supstrata naftol AS - BI N-acetil β -D-glukozaminid-a (Sigma – Aldrich, USA) 20 minuta. Nakon inkubacije, preparati su isprani 3%-tnom otopinom NaCl-a 2-3 minute na sobnoj temperaturi. Preparati su bojani otopinom diazonijevih soli (1 mg/ml Fast Violet, 0,1 M Na-fosfatni pufer) pri sobnoj temperaturi. Nakon bojanja, preparati su isprani pod laganim mlazom tekuće vode te fiksirani u stabiliziranom fiksativu (Ca-formol 2% Ca-acetat, 10% formaldehid) 10 minuta pri temperaturi +4 °C. Preparati su uklopljeni u glicerol želatinu (Sigma – Aldrich, USA). Stabilnost lizosomalne membrane procijenjena je na svjetlosnom mikroskopu Nikon-SA povezan s CCD kamerom Ikegami ICD-803P. Analiza slika izvođena je pomoću programa Lucija 4,60.

Određivanje stabilnosti lizosomalne membrane temelji se na mjerenju aktivnosti enzima N-acetil β -D heksozaminidaze. Destabilizacija ili slabljenje lizosomalne membrane temelji se na povećanoj permeabilnosti membrane za supstrat (naftol AS - BI N-acetil β -D-glukozaminid). Reakcija enzima i supstrata u lizosomu vizualizira se u prisustvu diazonijevih soli. Labilizacijski period (LP) je vrijeme potrebno za proizvodnju maksimuma obojenja lizosoma (Moore, 1976). U početku reakcije stabilnost lizosomalne membrane je visoka i stoga ne dolazi do ulaska supstrata u lizosome, te je intenzitet obojenja slab. Produljenjem vremena

inkubacije dolazi do postepene destabilizacije membrane i povećanja propusnosti membrane za supstrat, te se intenzitet obojenja povećava. Vrijeme inkubacije u kojem je postignuto maksimalno obojenje preparata predstavlja vrijeme potrebno za potpunu destabilizaciju lizosomalne membrane (LP) (Moore 1976). Nakon toga, dolazi do degradacije lizosomalne membrane i raspršenja lizosomalnog sadržaja, zbog čega se intenzitet obojenja smanjuje. Općenito, vrijednosti labilizacijskog perioda iznad 20 minuta ukazuje na dobro stanje lizosoma, dok vrijednosti ispod 10 minuta ukazuju na stres (Viarengo i sur., 2000).

3.8.2. ODREĐIVANJE KOLIČINE LIPOFUSCINA

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

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

3.8.3. ODREĐIVANJE KOLIČINE NEUTRALNIH MASTI

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

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

3.9. PRIKAZ REZULTATA I STATISTIČKA OBRADA

Za statističku analizu i grafičke prikaze upotrebljavani su programi Microsoft Excel 2013, Statistica 6.0 i Primer 6+ za Windows.

Aktivnost kiselih DNaza prikazana je box-plot dijagramima (eng. *box whisker plot*). Statistička razlika između medijana vrijednosti (prikazanim box-plot dijagramima) dvije nezavisne varijable izračunata je neparametrijskim Mann – Whitney testom, dok je razlika između više varijabli izračunata Kruskal – Wallis testom. Za prikaz box-plot dijagrama korišten je program Statistica 6.0.

Ostali lizosomalni parametri prikazani su histogramima na temelju aritmetičkih sredina i standardne devijacije pomoću programa Microsoft Excel 2013.

Za određivanje povezanosti bioloških podataka s okolišnim parametrima korišten je Spearmanov koeficijent korelacije. Za izračunavanje Spearmanovog koeficijenta korelacije korišten je program Statistica 6.0.

Metoda analize glavnih komponenti (eng. *Principal Component Analysis – PCA*) korištena je kako bi se prikazao lizosomalni odgovor na temelju različitih parametara koji su izraženi u različitim mjernim jedinicama i skalama i ne sadrže velike blokove podataka čija je vrijednost jednaka nuli. Kao varijable korištene su srednje vrijednosti aktivnosti kisele DNaze, stabilnosti lizosomalnih membrana, te količine lipofuscina i neutralnih masti na postajama Sv. Ivan i ACI Marina od kolovoza 2012. godine do kolovoza 2013. godine. Prije PCA analize podaci su standardizirani logaritmiranjem, kako bi se sveli u zajedničku bezdimenzionalnu veličinu i zatim normalizirani tj. izraženi u obliku normaliziranih odstupanja od srednje vrijednosti, standardiziranoj na nulu. Nakon toga, podaci su transformirani na temelju euklidske udaljenosti koja se kao mjera varijabiliteta uzoraka koriste za izradu korelacijske matrice varijabli. Grupiranje postaja i međusobna udaljenost određena je na temelju njihovog međusobnog varijabiliteta. PCA analiza provedena je korištenjem programa Primer 6+.

Za grupiranje odnosno razdvajanje postaja na temelju stupnja sličnosti izmjerenih parametara, korištene su istovremeno klaster i MDS analiza. Multidimenzionalno skaliranje (eng. *Multidimensional scaling – MDS*) provedeno je na temelju matrice sličnosti uzoraka koji za mjeru sličnosti koristi Euklidsku udaljenost. Sličnosti uzoraka u mjesecima praćene su kroz varijable pojedinog lizosomalnog parametra koji opisuje njegova maksimalna, minimalna, srednja i medijan vrijednost. Nakon toga određena je dvodimenzionalna konfiguracija uzoraka

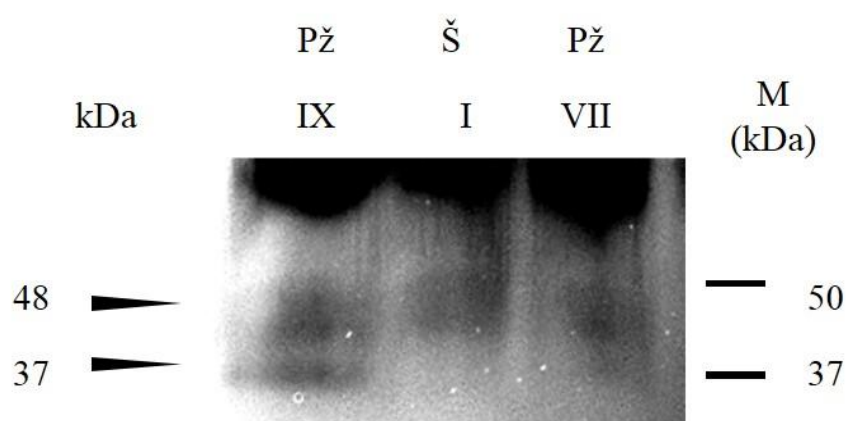
koja je odgovarala uvjetima postavljenim u matrici rangiranih koeficijenata sličnosti. Udaljenost između točaka uzoraka u dvodimenzionalnom prikazu u proporciji je s njihovom različitošću. Statistička značajnost prikaza mjeri se koeficijentom stresa. Ako je koeficijent manji od 0,1 analiza se smatra konačnom, međutim ako je vrijednost između 0,1 i 0,2 rezultat je potrebno potvrditi. Za potvrdu značajnosti razlike između postaja u pojedinim klasterima korišten je ANOSIM test. ANOSIM test je permutacijski test koji na osnovi matriksa rangiranih similariteta prema Euklidskoj udaljenosti računa sličnost među klasterima. Za MDS – analizu korišten je Primer 6+.

4. REZULTATI

4. REZULTATI

4.1. AKTIVNE IZOFORME KISELE DNAZE

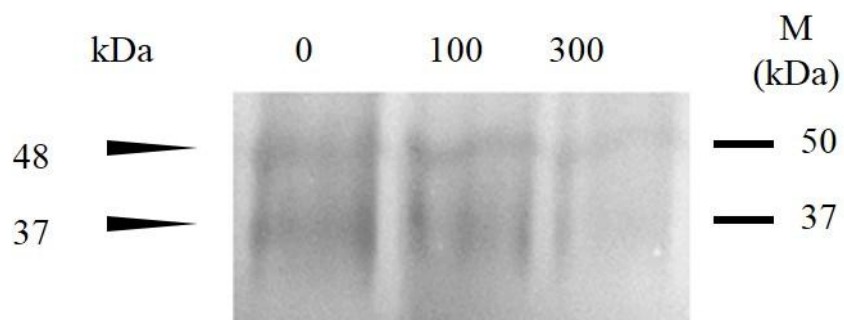
Zimogram proteinskih ekstrakata tkiva dagnji uzorkovanih u različitim mjesecima, pokazala je dvije aktivne izoforme enzima molekularne mase 48 i 37 kDa u proteinskim ekstraktima probavne žlijezde dok je u škrigama vidljiva samo jedna izoforma molekularne mase 48 kDa (Slika 9.).



Slika 9. Aktivnost kisele DNaze u proteinskim ekstraktima probavne žlijezde (Pž) i škriga (Š) dagnji uzorkovanih u studenom (XI) 2012., siječnju (I) i srpnju (VII) 2013. godine. Količina proteina u jažici je 20 µg.

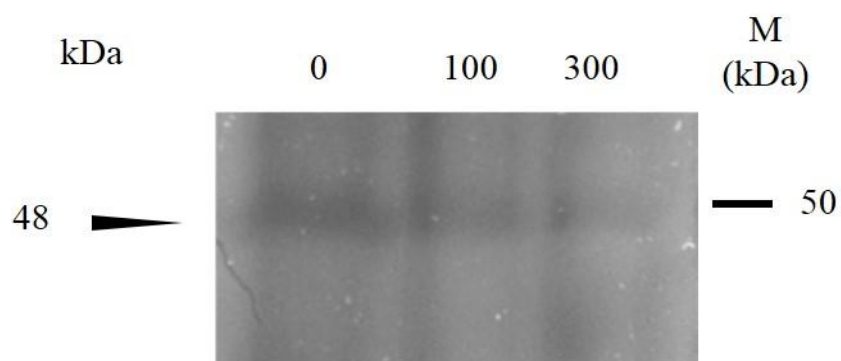
4.2. DOZRIJEVANJE KISELE DNAZE

U proteinskim ekstraktima probavne žlijezde 8h nakon injektiranja dagnje s 100mM klorokinom vidljiva je inhibicija proteinske vrpce molekularne mase 37 kDa, u odnosu na kontrolni uzorak (Slika 10.). Do potpune inhibicije proteina molekularne mase 37 kDa dolazi pri izlaganju dagnje koncentraciji klorokina od 300mM.



Slika 10. Aktivnost kisele DNaze u proteinskim ekstraktima probavnih žlijezda dagnji 8 h nakon injektiranja različitim koncentracijama klorokina: 0 - 0 µM, 100 - 100 µM, 300 – 300 µM.

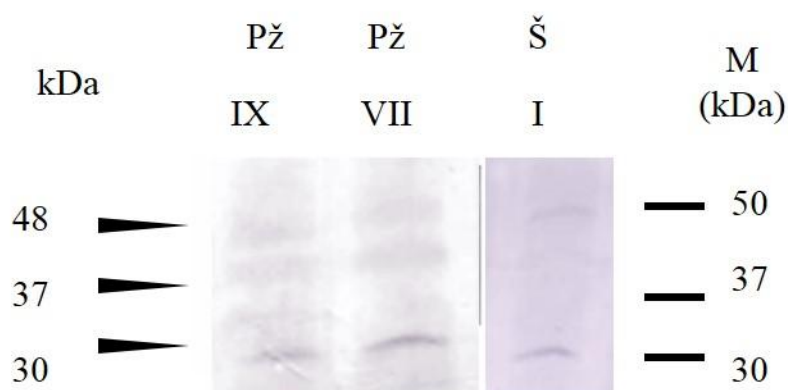
U proteinskim ekstraktima škrge vidljiva je jedna aktivna vrpca kisele DNaze molekularne mase 48 kDa, dok izoforma molekularne mase 37 kDa nije utvrđena (Slika 11.). Klorokin nije imao učinka na aktivnost proteinske izoforme molekularne mase 48 kDa.



Slika 11. Aktivnost kisele DNaze u proteinskim ekstraktima škrge dagnji 8 h nakon injektiranja različitim koncentracijama klorokina: 0 - 0 µM, 100 - 100 µM, 300 – 300 µM.

4.3. IDENTIFIKACIJA DNAZE II

Western analiza utvrdila je u proteinskim ekstraktima probavne žlijezde dagnji prisutnost dvije proteinske vrpce molekularne mase 48 kDa i 37 kDa (Slika 12.).



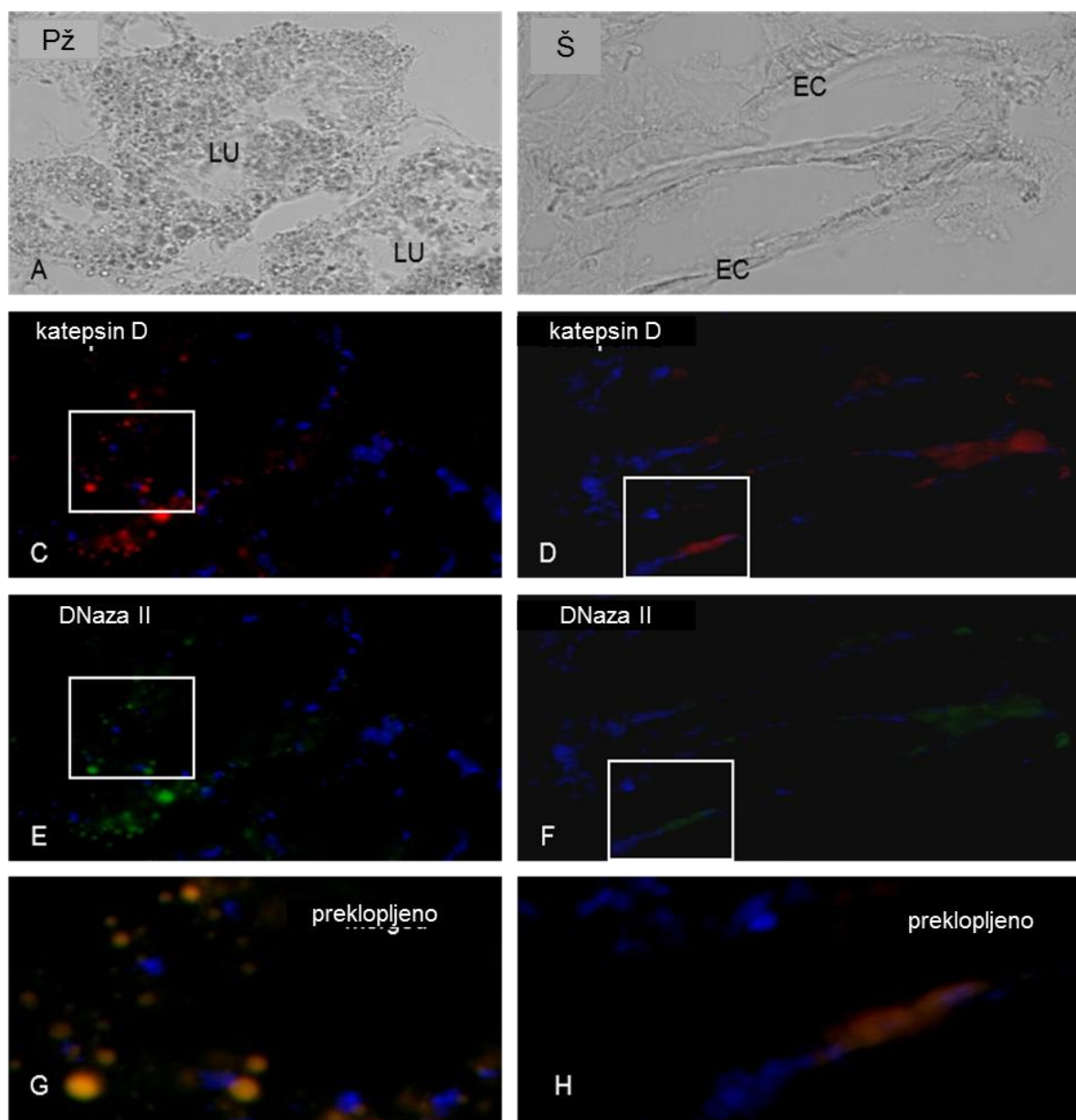
Slika 12. Imunodetekcija Western analizom DNaze II u proteinskim ekstraktima probavne žlijezde (Pž) i škrge (Š) dagnji *Mytilus galloprovincialis* uzorkovanih u studenom (IX), srpnju (VII) i siječnju (I).

U škragama su također utvrđene proteinske vrpce molekularne mase 48 kDa i 37 kDa, ali različitog intenziteta. Proteinska vrpca molekularne mase 37 kDa je slabijeg intenziteta od proteinske vrpce molekularne mase 48 kDa. Poliklonalnim protutijelom na DNazu II utvrđena je i prisutnost dodatne proteinske vrpce molekularne mase 30 kDa u proteinskim ekstraktima oba tkiva. U probavnoj žlijezdi intenzitet proteinskih vrpca molekularne mase 48 kDa i 37 kDa je jednak, dok je u škragama intenzitet proteinske vrpce molekularne mase 37 kDa manji u odnosu na vrpcu molekularne mase 48 kDa. Također, u oba organa proteinska vrpca molekularne mase 30 kDa je jačeg intenziteta od dvije vrpce većih molekularnih masa.

4.4. LOKALIZACIJA DNAZE II

U poprečnim presjecima tubula probavne žlijezde (Slika 13. A) i filamenata škrge (Slika 13. B) imunohistokemijskom analizom s poliklonalnim protutijelima na DNazu II i katepsin D dobiveni su pozitivni signali: lizosomi u stanicama probavne žlijezde dagnje (Slika 13. C) i škrge (Slika 13. D) lokalizirani su s katepsinom D označenim Alexa – Fluor fluorokromom, a

signal DNaze II na istim mjestima u lizosomima (Slika 13. E i F). Preklapanjem slika tkiva probavne žlijezde dagnje u kojima su lizosomi označeni katepsinom D, lizosomalnim markerom i slikom tkiva u kojima je lokalizirana DNaza II, potvrđena je lokalizacija enzima DNaze II u lizosomima stanica probavne žlijezde (Slika 13. G) i škrge (Slika 13. H).

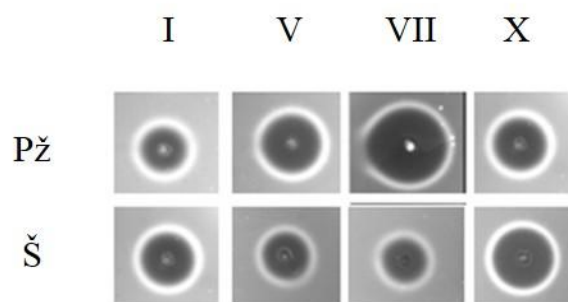


Slika 13. Imunohistokemijska lokalizacija DNaze II. Poprečni presjek tubula probavne žlijezde (A) i filamena škрге (B) dagnje *Mytilus galloprovincialis* uzorkovanih u ožujku 2013 godine: Pž – probavna žlijezda, Š – škрге, LU- lumen, ES-epitelne stanice. DNaza II u probavnoj žlijezdi i škrgama detektirana je protutijelima na ljudsku DNazu II, te sekundarnim protutijelom koji ima na sebi vezan FITC (zeleno obojenje). Vezikule lizosoma lokalizirane pomoću katepsina D vezanim s Alexa Fluor (crveno obojenje). Jezgre su obojene bojom DAPI (plavo obojenje). Vidljiva obojenja vezanih fluorokroma: DAPI + Alexa Fluor (C, D); DAPI + FITC (E, F); DAPI + Alexa Fluor + FITC (G, H).

4.5. SEZONSKA AKTIVNOST KISELE DNAZE

4.5.1. PRELIMINARNA ANALIZA AKTIVNOSTI KISELE DNAZE

Najmanja aktivnost kisele DNaze u probavnoj žlijezdi određena jednostrukom radijalnom difuzijom utvrđena je u siječnju (7 mm), a najveća u srpnju (11 mm), dok se aktivnosti u svibnju (mm) i listopadu ne razlikuju (9 mm) (Slika 14.). Aktivnost kisele DNaze u škragama u siječnju (8 mm) i listopadu (9 mm) je veća od aktivnosti u svibnju i srpnju (6 mm).

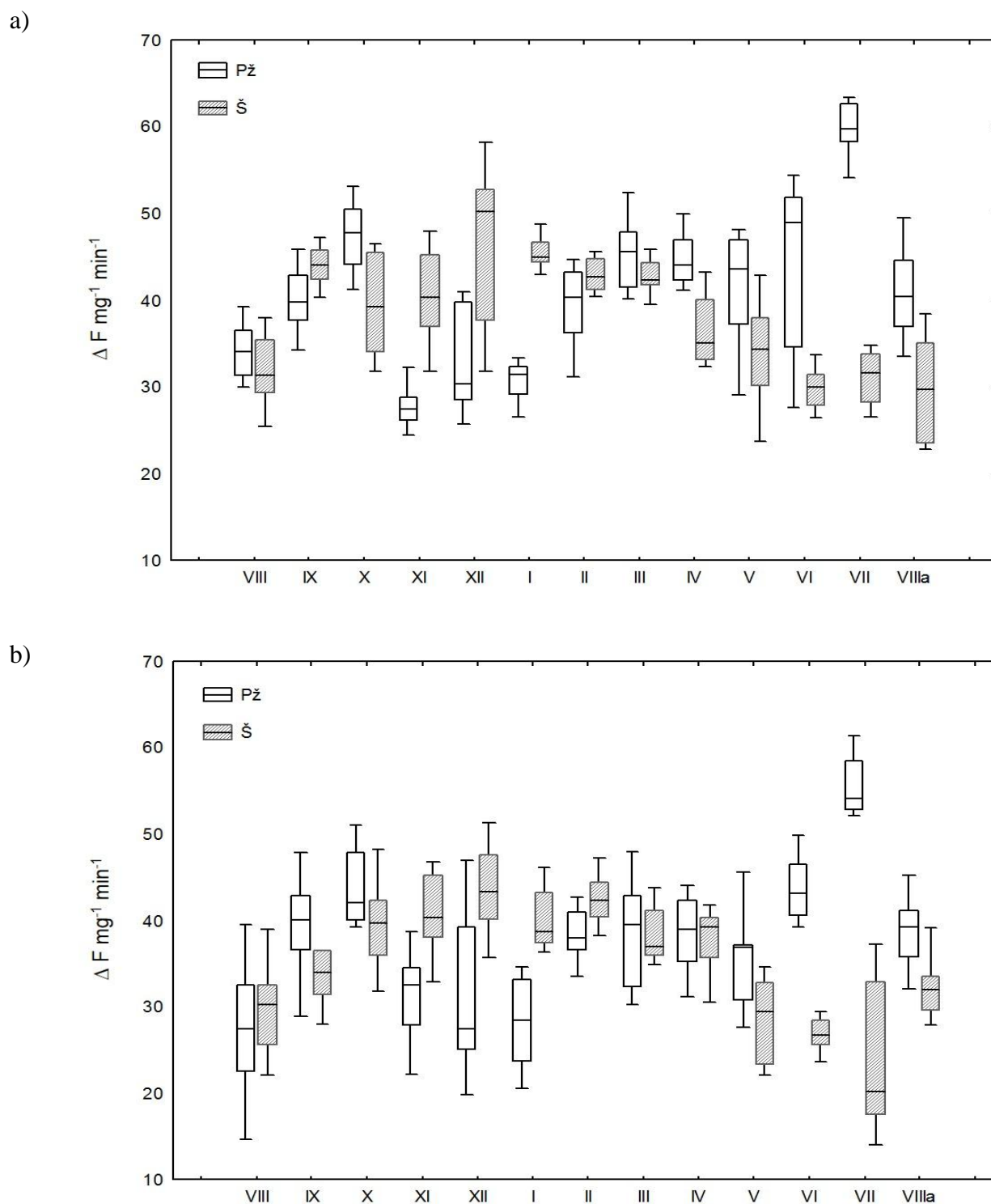


Slika 14. Jednostruka radijalna enzimatska difuzija. Aktivnosti kisele DNaze u proteinskim ekstraktima probavne žlijezde (Pž) i škrge (Š) dagnji uzorkovanih u siječnju 2013 (I), svibnju (V) 2013, srpnju (VII) 2013 i listopadu (X) 2012 na postaji Sv. Ivan.

Metodom jednostruke radijalne difuzije aktivnost enzima je bilo moguće odrediti u proteinskim ekstraktima tek nakon 24h inkubacije. Zbog dugotrajnosti metode i opasnosti od djelovanja etidij - bromida prilikom pripremanja gelova, za sezonsku usporedbu aktivnosti enzima kisele DNaze korištena je fluorimetrijska metoda.

4.5.2. SEZONSKA AKTIVNOST KISELE DNAZE

Mjesečne aktivnosti kisele DNaze (ΔF) u probavnoj žlijezdi i škragama dagnji uzorkovanih na postajama Sv. Ivan i ACI Marina prikazane su na Slici 15.



Slika 15. Aktivnost kisele DNaze u proteinskim ekstraktima probavne žlijezde (Pž) i škrge (Š) dagnji od kolovoza (VIII) 2012. do kolovoza (VIIIa) 2013. godine na postaji a) Sv. Ivan i b) ACI Marina. Broj analiziranih školjaka N=10.

Aktivnost kisele DNaze dagnji uzorkovanih na postaji Sv. Ivan u zimskom periodu je u probavnoj žlijezdi niža od aktivnosti u škragama, dok je za vrijeme proljetnih i ljetnih mjeseci aktivnost kisele DNaze u probavnoj žlijezdi viša od aktivnosti u škragama (Slika 15 a.).

U probavnoj žlijezdi dagnji uzorkovanih na postaji Sv. Ivan najniža aktivnost kisele DNaze izmjerena je u zimskim mjesecima, od studenog ($27,48 \text{ mg}^{-1}\text{min}^{-1}$) do siječnja ($31,42 \text{ mg}^{-1}\text{min}^{-1}$), te je statistički značajna razlika uočena u odnosu na mjesec prije i poslije zimskog perioda ($p < 0,05$) (Prilog, Tablica 5.). Aktivnost kisele DNaze počinje postepeno rasti u veljači ($40,40 \text{ mg}^{-1}\text{min}^{-1}$), te je od ožujka ($45,63 \text{ mg}^{-1}\text{min}^{-1}$) do lipnja ($48,90 \text{ mg}^{-1}\text{min}^{-1}$) konstantna i viša u odnosu na zimski period ($p < 0,05$).

Najviša aktivnost kisele DNaze u probavnoj žlijezdi zabilježena je u srpnju 2013. godine ($59,75 \text{ mg}^{-1}\text{min}^{-1}$), što je ujedno i statistički značajno različita vrijednost od aktivnosti proljetnog perioda koji je prethodio ($p < 0,05$). Aktivnost kisele DNaze izmjerene u proteinskom ekstraktu probavne žlijezde u kolovozu 2012. i 2013. nije statistički značajno različita, kao što se ne razlikuju od proljetnog perioda i rujna. U listopadu aktivnost kisele DNaze u probavnoj žlijezdi dagnje raste, te je uočena statistički značajna razlika u odnosu na kolovoz i period studeni – siječanj ($p < 0,05$).

Niska aktivnost kisele DNaze u proteinskim ekstraktima škrge dagnje uzorkovanim na postaji Sv. Ivan izmjerena je u proljetno – ljetnom periodu, od svibnja ($34,41 \text{ mg}^{-1}\text{min}^{-1}$) do kolovoza ($29,81 \text{ mg}^{-1}\text{min}^{-1}$). U rujnu aktivnost kisele DNaze u proteinskim ekstraktima škrge dagnje je statistički značajno viša ($44,11 \text{ mg}^{-1}\text{min}^{-1}$) u odnosu na prethodni ljetni period ($p < 0,05$) i ostaje konstantna do ožujka ($42,33 \text{ mg}^{-1}\text{min}^{-1}$). U travnju ($35,00 \text{ mg}^{-1}\text{min}^{-1}$) i svibnju ($34,41 \text{ mg}^{-1}\text{min}^{-1}$) aktivnost kisele DNaze u proteinskim ekstraktima škrge dagnje pada, ali bez statistički značajne razlike u odnosu na nadolazeće ljetno razdoblje.

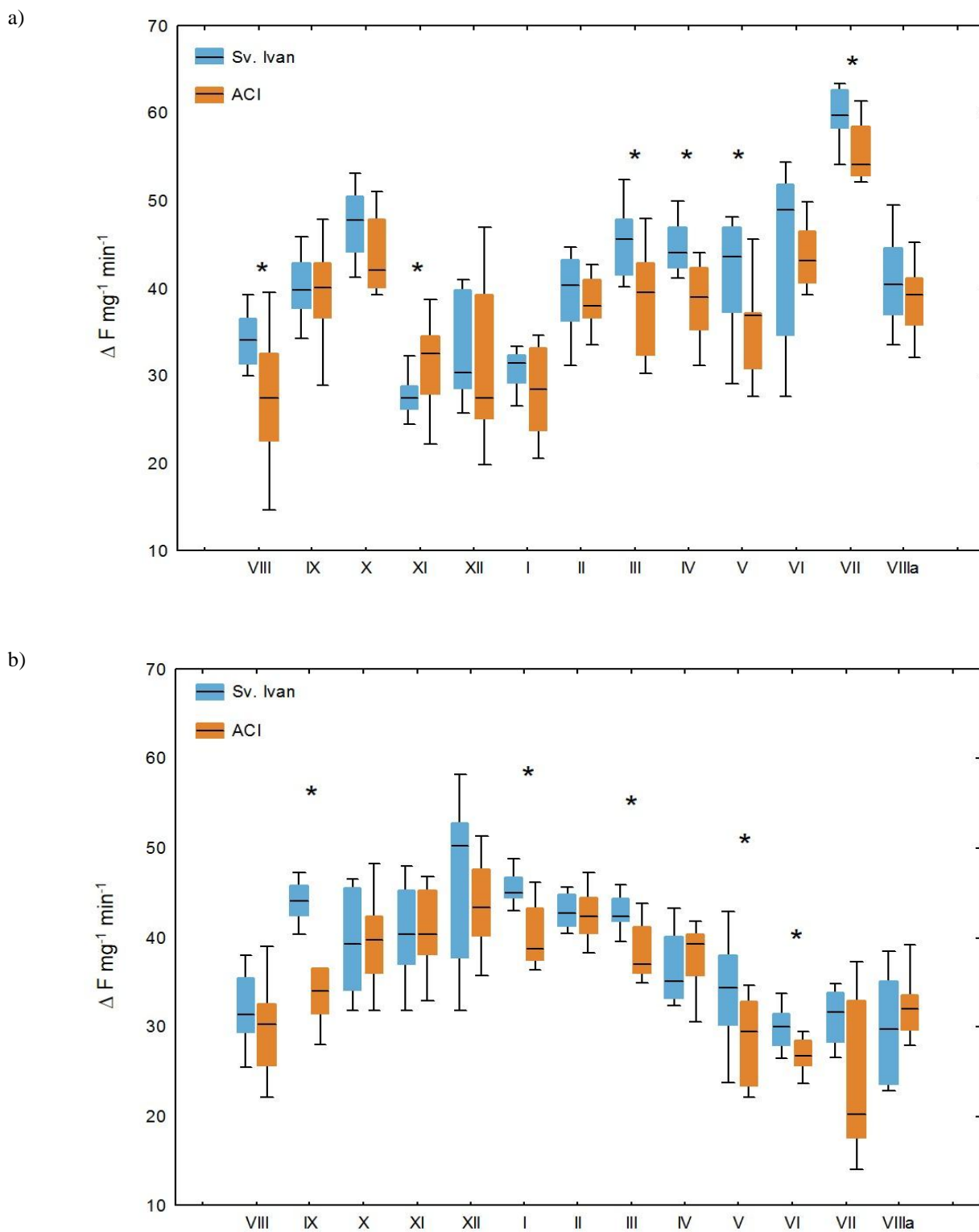
Promjene u aktivnosti kisele DNaze u oba organa dagnja uzorkovanih na postaji ACI Marina (Slika 15 b.) prati trendove aktivnosti na postaji Sv. Ivan. Aktivnost kisele DNaze u dagnjama uzorkovanim na postaji ACI Marina su statistički značajno različite u listopadu u odnosu na kolovoz i period od studenog do siječnja u probavnoj žlijezdi ($p < 0,05$) (Prilog, Tablica 6.). Najviša aktivnost kisele DNaze u probavnoj žlijezdi zabilježena je u srpnju ($54,09 \text{ mg}^{-1}\text{min}^{-1}$), dok je najniža u kolovozu 2012 ($27,43 \text{ mg}^{-1}\text{min}^{-1}$). Aktivnost kisele DNaze u probavnoj žlijezdi dagnji uzorkovanim u lipnju i srpnju je viša i statistički se značajno razlikuje od

kolovoza 2012, te u periodu od studenog do siječnja ($p < 0,05$). Najviša aktivnost kisele DNaze u škragama zabilježena je u prosincu ($43,37 \text{ mg}^{-1}\text{min}^{-1}$), dok je najniža vrijednost zabilježena u srpnju ($20,24 \text{ mg}^{-1}\text{min}^{-1}$). U škragama je aktivnost kisele DNaze u lipnju i srpnju različita u odnosu na cijeli period od listopada do veljače na postaji ACI Marina ($p < 0,05$). U svibnju je aktivnost kisele DNaze u škragama statistički značajno niža od izmjerenih aktivnosti u studenom, prosincu i veljači ($p < 0,05$).

Aktivnost kisele DNaze u probavnoj žlijezdi i škragama dagnje na postaji Sv. Ivan i ACI Marina prikazane su na Slici 16. Aktivnost kisele DNaze u probavnoj žlijezdi dagnji uzorkovanih na postaji Sv. Ivan tijekom godine je viša od aktivnosti kisele DNaze na postaji ACI Marina (Slika 16 a.).

U ljetnom periodu, od lipnja do kolovoza aktivnosti kisele DNaze u probavnoj žlijezdi na postajama Sv. Ivan i ACI Marina se statistički značajno međusobno razlikuju ($p < 0,05$). U jesenskom i zimskom periodu, statistički značajna razlika između aktivnosti kisele DNaze u probavnoj žlijezdi dagnji zabilježena je u studenom ($p < 0,05$). U proljetnom periodu, aktivnost kisele DNaze u probavnoj žlijezdi dagnji na postaji Sv. Ivan je viša od aktivnosti na postaji ACI Marina te se aktivnost statistički značajno razlikuje ($p < 0,05$).

U škragama postoje dva glavna perioda aktivnosti kisele DNaze (Slika 16 b.). U jesensko – zimskom periodu u škragama dagnji sa obje postaje zabilježene su više vrijednosti aktivnosti kisele DNaze u odnosu na proljetno - ljetni period. Statistički značajna razlika u aktivnosti kisele DNaze u škragama dagnji na postajama Sv. Ivan i ACI Marina zabilježena je u rujnu, siječnju i ožujku ($p < 0,05$). U proljetno – ljetnom periodu, za vrijeme nižih vrijednosti kisele DNaze u škragama dagnji, zabilježena je statistički značajna razlika u aktivnosti kisele DNaze dagnji između postaja Sv. Ivan i ACI Marina u svibnju i lipnju ($p < 0,05$).

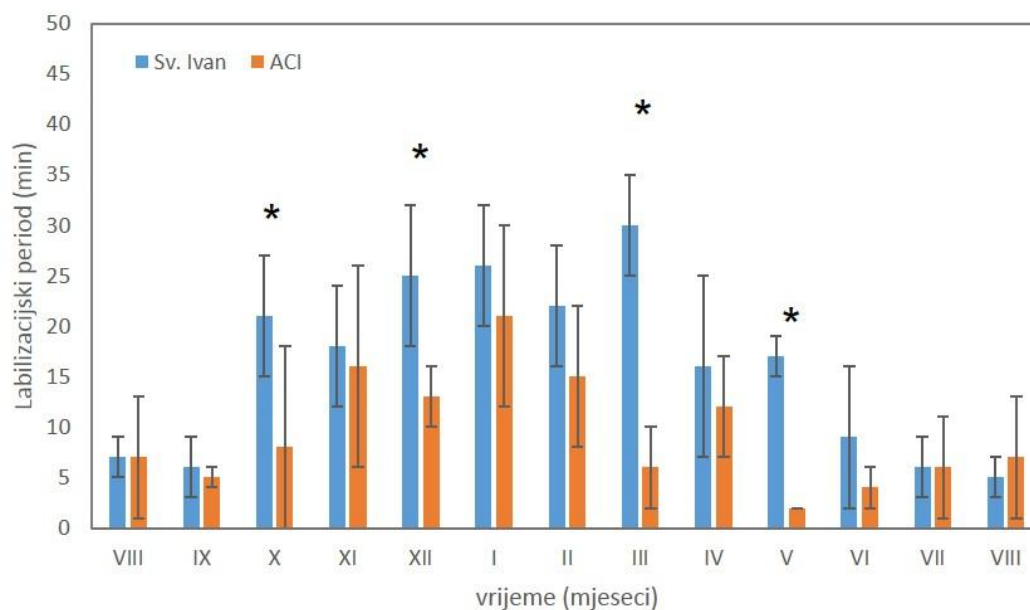


Slika 16. Aktivnost kisele DNaze u proteinskim ekstraktima a) probavne žlijezde i b) škrge dagnje od kolovoza (VIII) 2012. do kolovoza (VIIIa) 2013. godine na postaji Sv. Ivan i ACI Marina. Statistički značajna razlika (* $p < 0,05$) između aktivnosti na postajama izračunata je Mann Whitney testom. Broj analiziranih školjaka $N=10$.

4.6. HISTOKEMIJSKE PROMJENE U LIZOSOMIMA PROBAVNE ŽLIJEZDE DAGNJE

4.6.1. STABILNOST LIZOSOMALNIH MEMBRANA

Godišnje kretanje stabilnosti lizosomalnih membrana probavnih žlijezda dagnji uzorkovanih na postaji Sv. Ivan i ACI Marina izraženo kao srednje vrijednosti labilizacijskog perioda prikazano je na Slici 17.



Slika 17. Stabilnost lizosomalnih membrana u probavnoj žlijezdi dagnje od kolovoza (VIII) 2012. do kolovoza 2013. godine na postaji Sv. Ivan i ACI Marina. Statistički značajna razlika (* $p < 0,05$) između vrijednosti na postajama izračunata je Mann Whitney testom. Broj analiziranih školjaka $N=5$.

Labilizacijski period lizosomalne membrane u probavnoj žlijezdi dagnji uzorkovanih na postaji Sv. Ivan od listopada do ožujka je iznad 20 minuta. Najveći labilizacijski period zabilježen je u ožujku, a statistički je veći u odnosu na mjesec u ljetnom periodu od lipnja do kolovoza ($p < 0,05$) (Prilog, Tablica 8.).

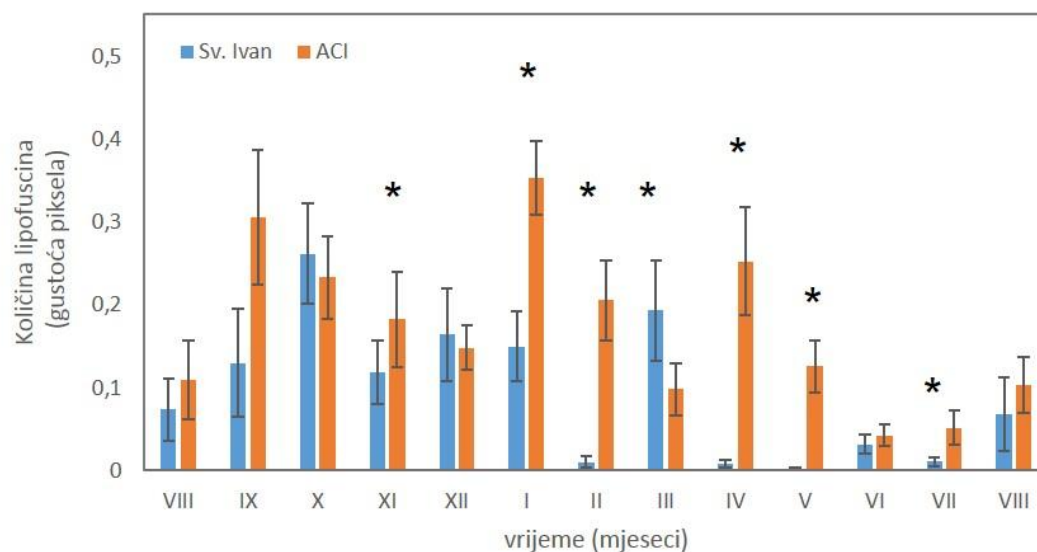
U travnju i svibnju labilizacijski period pada na 16 minuta, dok su u periodu od lipnja do rujna su vrijednosti ispod 10 minuta. Najniže vrijednosti labilizacijskog perioda zabilježene su u srpnju (6 minuta) i kolovozu (5 minuta) na postaji Sv. Ivan, te se vrijednosti razlikuju od labilizacijskog perioda zabilježenog u ožujku, kada je izmjerena najveća vrijednost labilizacijskog perioda (30 minuta) ($p < 0,05$).

Na postaji ACI Marina zabilježen je labilizacijski period u dagnjama u zimskom periodu od studenog do travnja između 10 i 20 minuta, s iznimkom u ožujku kada je labilizacijski period ispod 10 minuta. Vrijednosti labilizacijskog perioda od svibnja do listopada na postaji ACI Marina su ispod 10 minuta. Najniža vrijednost labilizacijskog perioda u dagnjama na postaji ACI Marina zabilježena je u svibnju (2 minute), te se razlikuje od vrijednosti izmjerenim u periodu od prosinca do veljače ($p < 0,05$).

Labilizacijski period u probavnoj žlijezdi dagnji na postaji Sv. Ivan tijekom zime prati trend na postaji ACI Marina, iako su vrijednosti labilizacijskog perioda na postaji ACI Marina niže. U kolovozu, listopadu, ožujku i svibnju labilizacijski period u dagnjama na postaji ACI Marina je niži u odnosu na postaju Sv. Ivan, a razlika u vrijednostima statistički značajna ($p < 0,05$) (Slika 17.).

4.6.2. KOLIČINA LIPOFUSCINA

Godišnje kretanje količine lipofuscina u lizosomima probavnih žlijezda dagnji uzorkovanih na postaji Sv. Ivan i ACI Marina prikazano je na Slici 18.



Slika 18. Količina lipofuscina u probavnoj žlijezdi dagnje od kolovoza (VIII) 2012. do kolovoza 2013. godine na postaji Sv. Ivan i ACI Marina (ACI). Statistički značajna razlika ($* p < 0,05$) između postaja izračunata je Mann Whitney testom. Broj analiziranih školjaka $N=5$.

Količina nakupljenog lipofuscina u lizosomima probavnih žlijezda dagnji uzorkovanih na postaji Sv. Ivan rastu od kolovoza do listopada, kada je zabilježena maksimalna vrijednost. U

studenom količina lipofuscina pada i ostaje stalna do siječnja. Minimalna vrijednost lipofuscina zabilježena je u veljači, te je statistički značajna u odnosu na maksimalnu vrijednosti zabilježenu u listopadu ($p < 0,05$) (Prilog, Tablica 10.). U ožujku, količina lipofuscina u probavnoj žlijezdi dagnji na postaji Sv. Ivan raste, te ponovno pada do minimalnih vrijednosti u mjesecima od travnja do srpnja.

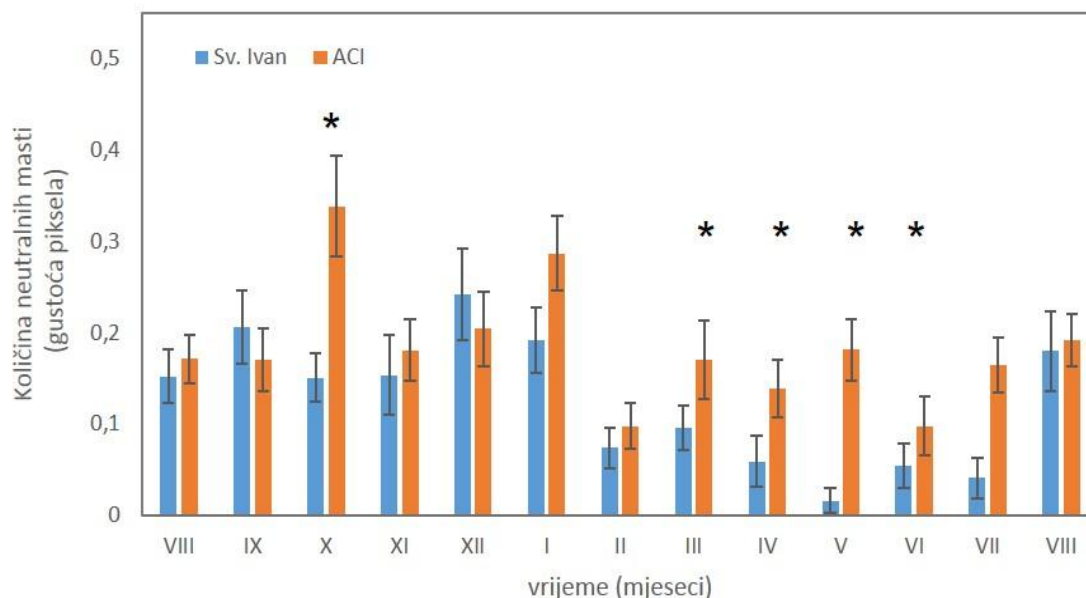
Najniža količina lipofuscina u dagnjama na postaji Sv. Ivan izmjerena je u svibnju te je statistički značajna u odnosu na zimski period ($p < 0,05$).

Izmjerene vrijednosti količine lipofuscina u dagnjama uzorkovanim na postaji ACI Marina prate period od kolovoza do siječnja postaje Sv. Ivan, ali s povišenim vrijednostima na postaji ACI Marina. Najviša vrijednost količine lipofuscina u probavnoj žlijezdi dagnje zabilježena je u siječnju na postaji ACI Marina, te se statistički značajno razlikuje od vrijednosti količine lipofuscina zabilježenih u ožujku, lipnju i srpnju na istoj postaji ($p < 0,05$). Proljetni period se ne razlikuje statistički značajno u odnosu na zimski period na postaji ACI Marina. U lipnju i srpnju, količina lipofuscina u probavnoj žlijezdi dagnji na postaji ACI Marina je niska i statistički različita u odnosu na rujan i siječanj, kada je količina lipofuscina povišena.

Razlika u vrijednostima količine lipofuscina između postaja Sv. Ivan i ACI Marina zabilježena je u studenom, te u periodu od siječnja do svibnja i u srpnju ($p < 0,05$).

4.6.3. KOLIČINA NEUTRALNIH MASTI

Godišnje kretanje količine neutralnih masti u lizosomima probavnih žlijezda dagnji uzorkovanih na postaji Sv. Ivan i ACI Marina prikazano je na Slici 19.



Slika 19. Nakupljanje neutralnih masti u probavnoj žlijezdi dagnje od kolovoza (VIII) 2012. do kolovoza 2013. godine na postaji Sv. Ivan i ACI Marina. Statistički značajna razlika (* $p < 0,05$) između vrijednosti na postajama izračunata je Mann Whitney testom. Broj analiziranih školjaka $N=5$.

Nakupljanje neutralnih masti u dagnjama na postaji Sv. Ivan može se opisati kroz dva perioda. Period od kolovoza do siječnja karakteriziran je s povišenim vrijednostima količine neutralnih masti, dok u periodu od veljače do srpnja vrijednosti padaju te ostaju niske bez statistički značajne razlike među mjesecima. Najniža vrijednost količine neutralnih masti u probavnoj žlijezdi dagnji na postaji Sv. Ivan izmjerena je u svibnju te je statistički značajna u odnosu na rujan i zimski period, od prosinca do veljače ($p < 0,05$) (Prilog, Tablica 12.). Najviša količina neutralnih masti u probavnoj žlijezdi dagnji na postaji Sv. Ivan zabilježena je u prosincu, te se razlikuje od količine izmjerene u svibnju i srpnju ($p < 0,05$).

Količina neutralnih masti u dagnjama uzorkovanim na postaji ACI Marina prate jesenski i zimski trend postaje Sv. Ivan, iako su u gotovo svim mjesecima vrijednosti više na postaji ACI Marina, ali bez statistički značajnih razlika u odnosu na postaju Sv. Ivan. U listopadu je zabilježena maksimalna vrijednost neutralnih masti u probavnoj žlijezdi dagnji na postaji ACI Marina, koja se razlikuje i od vrijednosti neutralnih masti zabilježenih u veljači i lipnju na istoj postaji ($p < 0,05$). U veljači količina nakupljenih masti u probavnoj žlijezdi dagnji na postaji ACI Marina pada. U periodu od ožujka do lipnja količina neutralnih masti na postaji ACI Marina je statistički značajno viša u odnosu na postaju Sv. Ivan ($p < 0,05$)

4.7. ODGOVOR LIZOSOMA NA OKOLIŠNE UVJETE

Promjena u lizosomalnom odgovoru uspoređene su s promjenama okolišnih uvjeta (temperature i saliniteta). Koeficijent korelacije lizosomalnih parametara: aktivnost kisele DNaze, stabilnost lizosomalnih membrana, nakupljanje lipofuscina i neutralnih masti u probavnoj žlijezdi s okolišnim čimbenicima prikazani su Tablici 2.

Tablica 2. Spearmanov koeficijent korelacije između lizosomalnih parametara: aktivnost kisele DNaze u probavnoj žlijezdi (ΔF PŽ), stabilnost lizosomalnih membrana (SLM), nakupljanje lipofuscina (LF), nakupljanje neutralnih masti (NM) u dagnjama uzorkovanim od kolovoza 2012. do kolovoza 2013. godine na postaji Sv. Ivan i ACI Marina s temperaturom i salinitetom.

Parametar	Koeficijent korelacije	
	Temperatura	Salinitet
ΔF PŽ	0,152	-0,136
ΔF Š	-0,701	-0,551
SLM	-0,670	-0,615
LF	-0,200	-0,311
NM	0,070	-0,202

Korelacija između aktivnosti kisele DNaze u probavnoj žlijezdi s temperaturom i salinitetom je jako slaba, dok je aktivnosti kisele DNaze u škrgama negativno korelirana s temperaturom ($r = -0,701$, $p < 0,05$) i salinitetom ($r = -0,551$, $p < 0,05$) (Tablica 2.). Stabilnost lizosomalnih membrana na postajama Sv. Ivan i ACI Marina je negativno korelirane s temperaturom ($r = 0,67$, $p < 0,05$) i salinitetom ($r = -0,615$, $p < 0,05$). Količina lipofuscina je u negativnoj korelaciji s temperaturom i salinitetom, dok količina neutralnih masti nije u korelaciji s okolišnim čimbenicima. Aktivnost kisele DNaze u probavnoj žlijezdi nije u korelaciji s okolišnim čimbenicima ($p < 0,05$).

Odgovor lizosoma praćen je i prema koeficijentu varijabilnosti pojedinog parametra. Koeficijenti varijabilnosti lizosomalnih parametara: aktivnost kisele DNaze, stabilnost lizosomalnih membrana, nakupljanje lipofuscina i neutralnih masti u probavnoj žlijezdi na postajama Sv. Ivan i ACI Marina prikazani su Tablici 3.

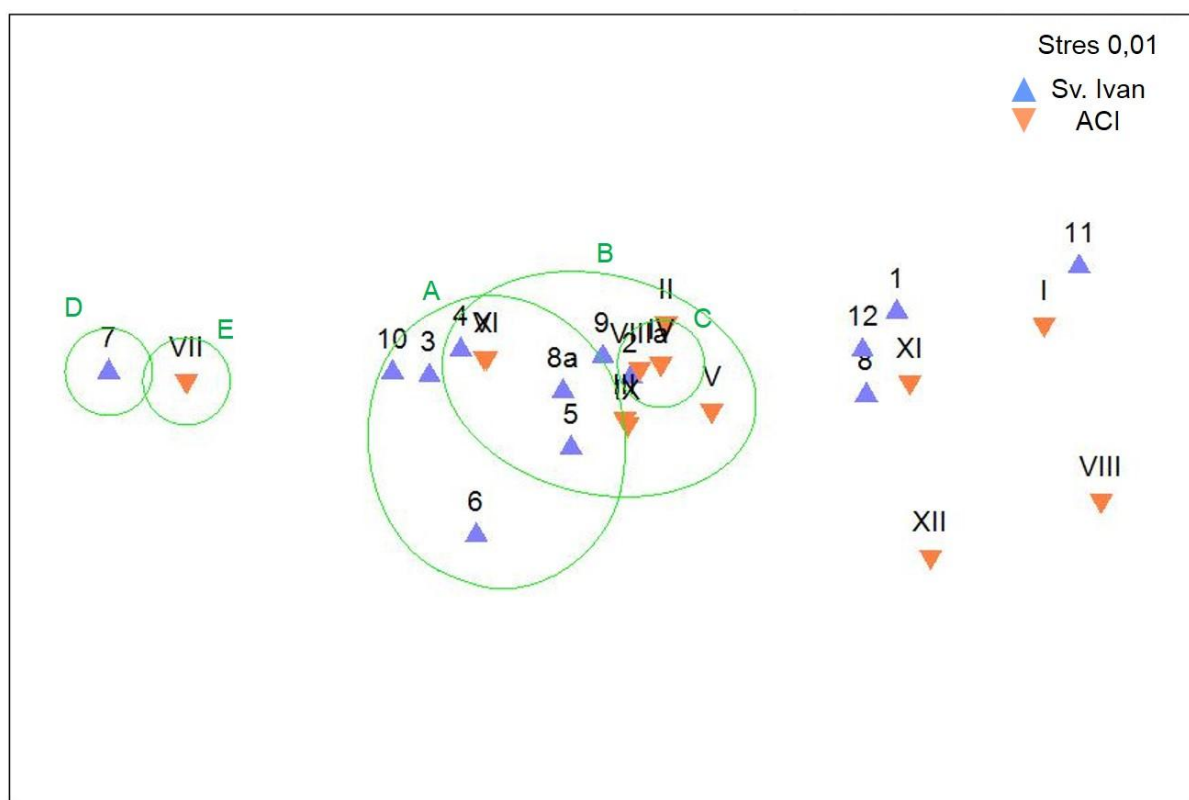
Tablica 3. Koeficijent varijabilnosti lizosomalnih parametara: aktivnost kisele DNaze u probavnoj žlijezdi (ΔF Pž), stabilnost lizosomalnih membrana (SLM), nakupljanje lipofuscina (LF), nakupljanje neutralnih masti (NM) u dagnjama uzorkovanim od kolovoza 2012. do kolovoza 2013. godine na postaji Sv. Ivan i ACI Marina (ACI).

Parametar	Koeficijent varijabilnosti (CV) (%)	
	Sv. Ivan	ACI
ΔF Pž	22,88	14,58
ΔF Š	11,38	14,71
SLM	36,25	56,40
LF	47,55	27,94
NM	34,12	20,30

Najmanji koeficijent varijabilnosti pokazuje aktivnost kisele DNaze u škrigama na postaji Sv. Ivan (CV = 11,38%) i ACI Marina (CV = 14,71%), te u probavnoj žlijezdi dagnji na postaji Sv. Ivan (CV = 22,88%) i ACI Marina (CV = 14,58%). Najveći koeficijent varijabilnosti ima količina lipofuscina (CV = 47,55%) u probavnoj žlijezdi dagnji na postaji Sv. Ivan. Na postaji ACI Marina, stabilnost lizosomalnih membrana je parametar s najvećim koeficijentom varijabilnosti (CV = 56,40%).

Kako bi se utvrdio značaj pojedinog lizosomalnog parametra u probavnoj žlijezdi u odvajanju postaja na temelju onečišćenja, te kako bi se grupirali mjeseci s obzirom na sličnost prema odgovoru u mjesecima, pojedini odgovor lizosoma je prikazan multidimenzionalnim skaliranjem.

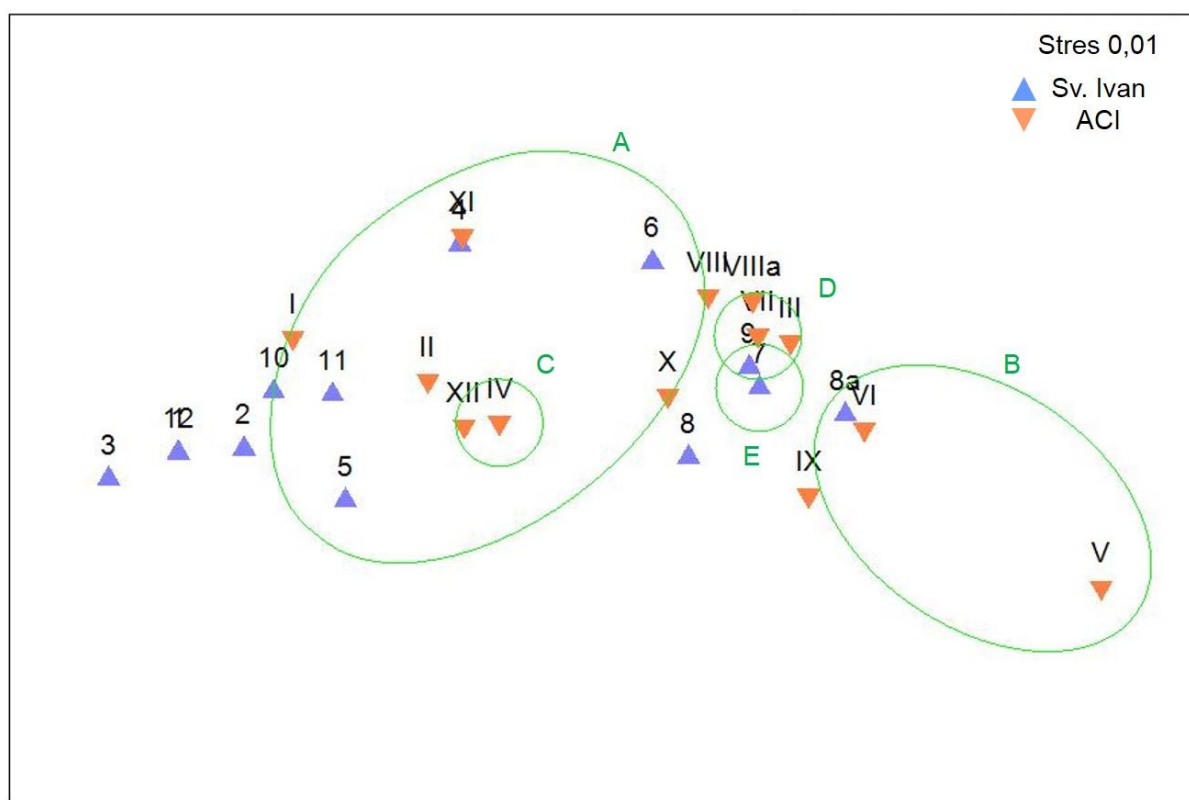
Razdvajanje postaja Sv. Ivan i ACI Marina na temelju aktivnosti kisele DNaze u probavnoj žlijezdi u istraživanom periodu prikazano je na Slici 20.



Slika 20. Dvodomenzionalni prikaz multidimenzionalnog skaliranja aktivnosti kisele DNaze u probavnoj žlijezdi dagnje uzorkovanim od kolovoza 2012. do kolovoza 2013. na postaji Sv. Ivan (8-8a) i ACI Marina (VIII-VIIIa). Zatvorene crte označavaju grupirane mjeseci za postaje Sv. Ivan i ACI Marina svrstane unutar klastera generiranih prema stupnju sličnosti u sklopu multidimenzionalne analize. Privid preklapanja klastera proizlazi iz dvodomenzionalnog prikaza.

U lijevom dijelu prikaza odvojene su postaje Sv. Ivan (Slika 20., klaster D) i ACI Marina (Slika 20., klaster E) u srpnju. U sredini dvodomenzionalnog prikaza grupirana je postaja Sv. Ivan u periodu od ožujka do lipnja, izuzev svibnja, te listopad, kao i postaja ACI Marina u lipnju i listopadu (Slika 20., klaster A). U centralnom dijelu još se grupirala postaja ACI Marina od veljače do svibnja, te u rujnu i postaja Sv. Ivan u svibnju, kolovozu 2013, te rujnu (Slika 20., klaster B). U centralnom dijelu posebno se grupirala postaja ACI Marina u travnju i kolovozu 2013 (Slika 20., klaster C). U desnom dijelu prikaza odvojene su postaje Sv. Ivan i ACI Marina od studenog do siječnja i kolovoz 2012. Svi klasteri se statistički značajno međusobno razlikuju ($R = 0,41$, $p < 0,02$).

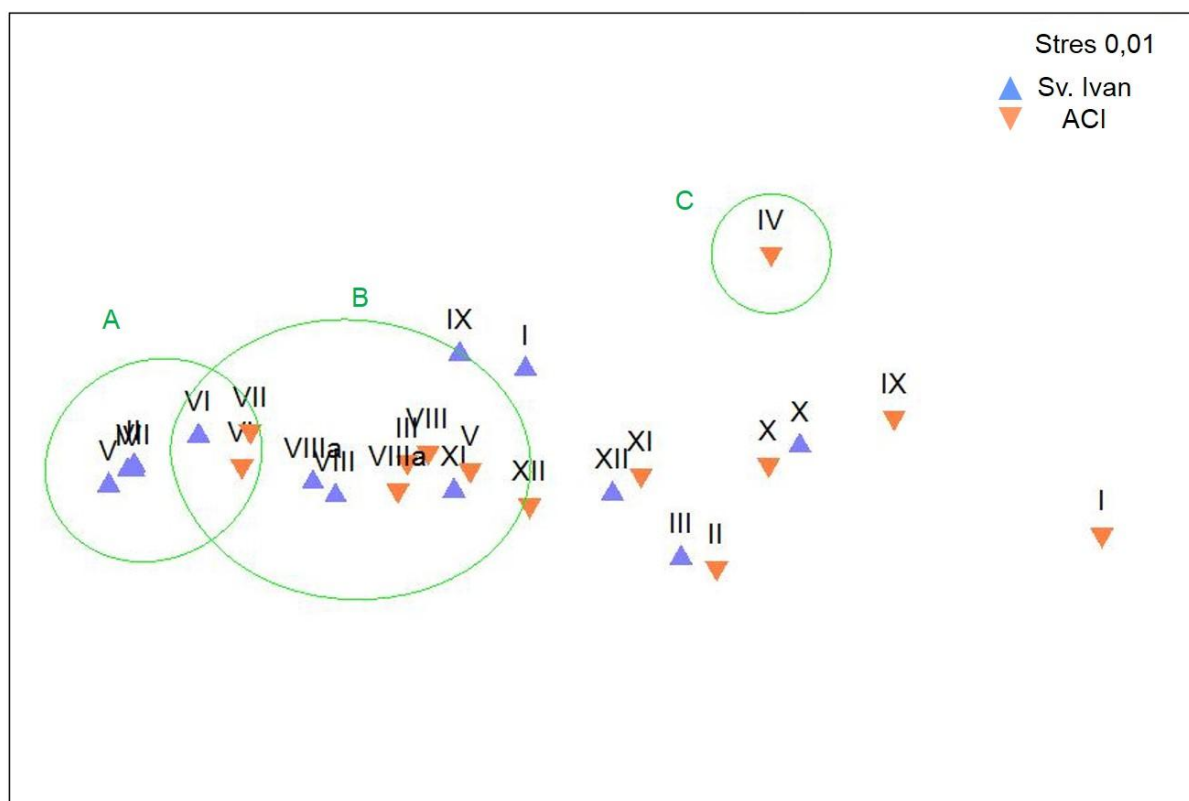
Razdvajanje postaja u gotovo svim mjesecima na temelju stabilnosti lizosomalnih membrana u probavnoj žlijezdi u istraživanom periodu prikazano je na Slici 21.



Slika 21. Dvodimenzionalni prikaz multidimenzionalnog skaliranja stabilnosti lizosomalnih membrana uzorkovanim od kolovoza 2012. do kolovoza 2013. na postaji Sv. Ivan (8-8a) i ACI Marina (VIII-VIIIa). Zatvorene crte označavaju grupirane mjeseci za postaje Sv. Ivan i ACI Marina svrstane unutar klastera generiranih prema stupnju sličnosti u sklopu multidimenzionalne analize. Privid preklapanja klastera proizlazi iz dvodimenzionalnog prikaza.

U lijevom dijelu prikaza odvojena je postaja Sv. Ivan od prosinca do ožujka. U sredini prikaza grupirana je postaja Sv. Ivan od travnja do lipnja i studeni, te postaja ACI Marina u periodu od listopada do veljače i travnju (Slika 21., klaster A). U sredini prikaza izvojena je postaja ACI Marina u travnju i prosincu (Slika 21., klaster C). Postaja Sv. Ivan i ACI Marina ne odvajaju se od srpnja do rujna. U sredini dvodimenzionalnog prikaza grupirana je postaja ACI Marina u ožujku i svibnju (Slika 21., klaster D), te postaja Sv. Ivan u srpnju i rujnu (Slika 21., klaster E). Postaja ACI Marina u svibnju i lipnju grupirana je u desnom dijelu prikaza (Slika 21., klaster B) te se jasno odvaja od postaje Sv. Ivan u istim mjesecima. Svi klasteri se statistički značajno međusobno razlikuju ($R = 0,67$, $p < 0,001$).

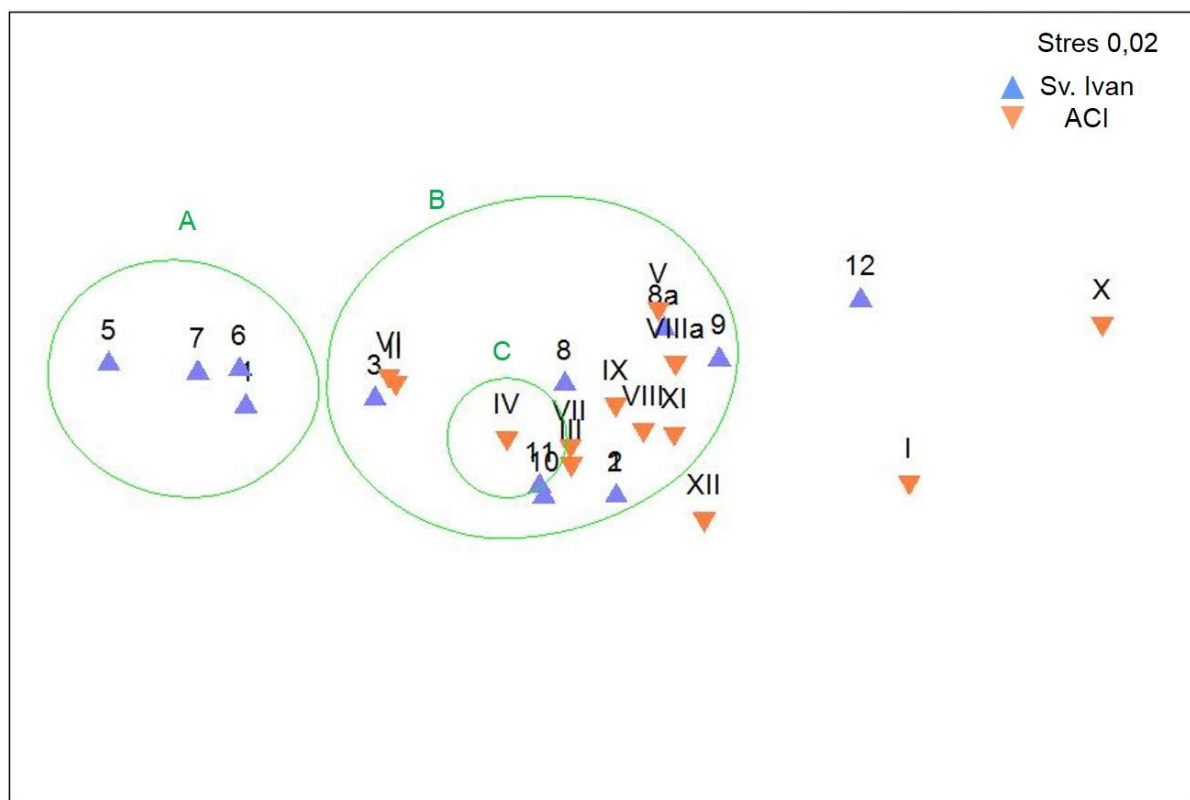
Razdvajanje postaja Sv. Ivan i ACI Marina u gotovo svim mjesecima na temelju količine lipofuscina u probavnoj žlijezdi u istraživanom periodu prikazano je na Slici 22.



Slika 22. Dvodimenzionalni prikaz multidimenzionalnog skaliranja lipofuscina u dagnjama uzorkovanim od kolovoza 2012 do kolovoza 2013 na postaji Sv. Ivan (8-8a) i ACI Marina (VIII-VIIIa). Zatvorene crte označavaju grupirane mjesece za postaje Sv. Ivan i ACI Marina svrstane unutar klastera generiranih prema stupnju sličnosti u sklopu multidimenzionalne analize. Pravid preklapanja klastera proizlazi iz dvodimenzionalnog prikaza.

U lijevom dijelu prikaza grupirana je postaja Sv. Ivan u periodu od veljače do lipnja, izuzev ožujka (Slika 22., klaster A). Prema sredini prikaza postaja ACI Marina odvojena je od svibnja do kolovoza zajedno s postajom Sv. Ivan u kolovozu i studenom (Slika 22, klaster B). Od sredine ka desnom dijelu prikaza odvajaju se postaje u siječnju i rujnu. U listopadu i prosincu postaje se raspoređuju prema desnom dijelu prikaza, ali se ne odvajaju. Postaja ACI Marina u travnju svrstana je u zasebni klaster (Slika 22., klaster C). Svi klasteri se statistički značajno međusobno razlikuju ($R = 0,59$, $p < 0,001$).

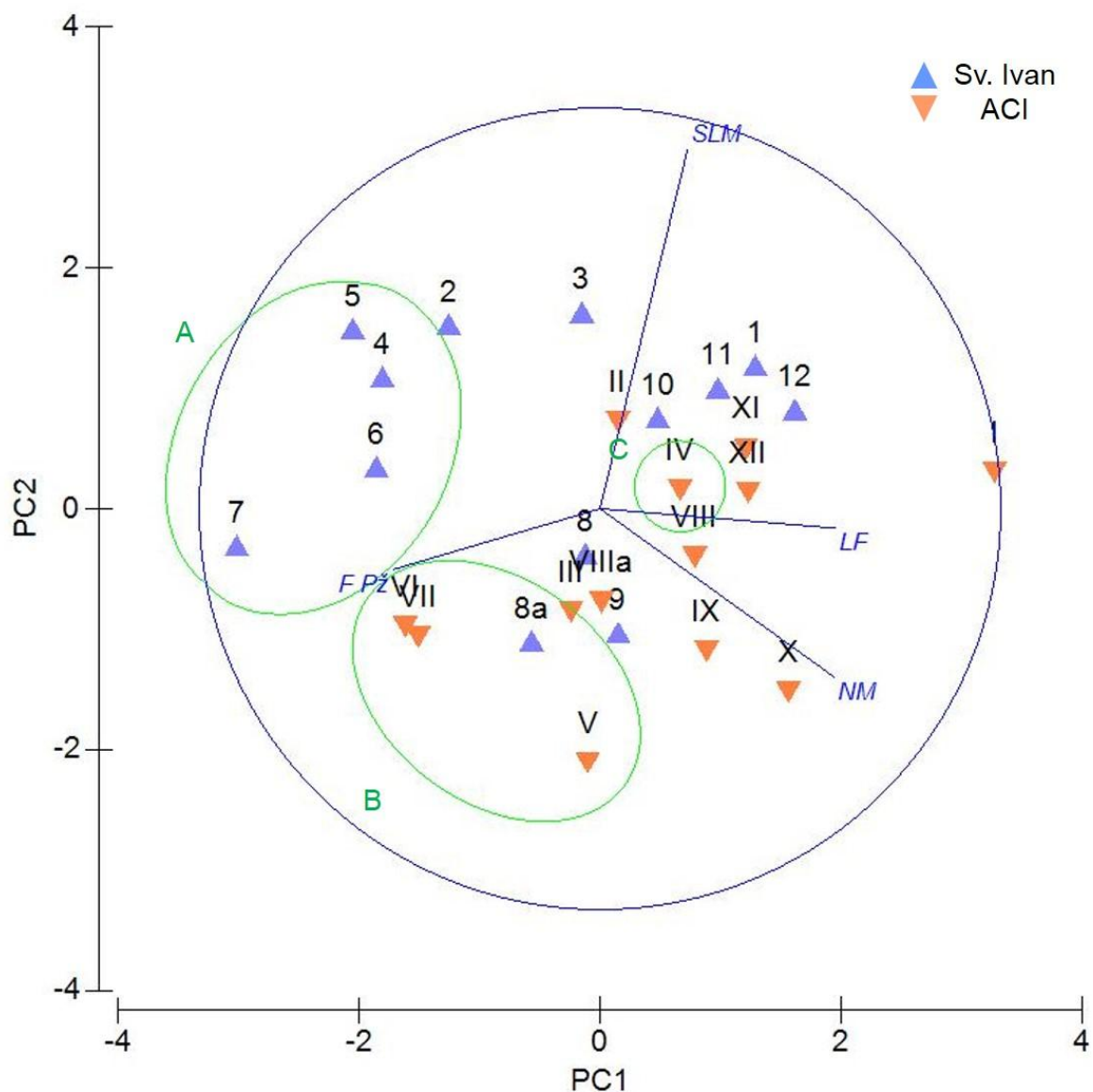
Razdvajanje postaja Sv. Ivan i ACI Marina u gotovo svim mjesecima na temelju količine neutralnih masti u probavnoj žlijezdi u istraživanom periodu prikazano je na Slici 23.



Slika 23. Dvodomensionalni prikaz multivariacionog skaliranja neutralnih masti u dagnjama uzorkovanim od kolovoza 2012 do kolovoza 2013 na postaji Sv. Ivan (8-8a) i ACI Marina (VIII-VIIIa). Zatvorene crte označavaju grupirane mjesece za postaje Sv. Ivan i ACI Marina svrstane unutar klastera generiranih prema stupnju sličnosti u sklopu multivariacione analize. Privid preklapanja klastera proizlazi iz dvodomensionalnog prikaza.

U lijevom dijelu prikaza grupirana je postaja Sv. Ivan u periodu od travnja do srpnja (Slika 23., klaster A). U sredini prikaza grupirana je postaja Sv. Ivan od siječnja do ožujka i od kolovoza do studenog, te postaja ACI Marina od veljače do rujna i u studenom (Slika 23., klaster B). Postaja ACI Marina grupirala se zasebno u travnju (Slika 23., klaster C). Od sredine ka desnom dijelu prikaza odvajaju se obje postaje u prosincu, te postaja ACI Marina u siječnju i listopadu. Svi klasteri se statistički značajno međusobno razlikuju ($R = 0,65$, $p < 0,002$).

Za utvrđivanje integriranog lizosomalnog odgovora (aktivnost kisele DNaze, stabilnost lizosomalne membrane, te količina neutralnih masti i lipofuscina) u probavnoj žlijezdi dagnji na postajama Sv. Ivan i ACI Marina korištena je analiza glavnih komponenata. Glavne komponente 1 i 2 (PC 1 i PC 2) (Slika 24.), najvećih svojstvenih vrijednosti zajedno opisuju 77% varijabiliteta (Prilog, Tablica 15.).



Slika 24. Dvodimenzionalna analiza glavnih komponenata lizosomalnih parametara dagnje uzorkovanim od kolovoza 2012. do kolovoza 2013. godine na postaji Sv. Ivan (8 – 8a) i ACI Marina (VIII-VIIIa). Zatvorene crte označavaju grupirane mjesecе za postaje Sv. Ivan i ACI Marina u klasterе.

Glavna komponenta 1 opisuje 50,4% varijacije, a glavna komponenta 2 opisuje 26,60% varijacije. Svojevrsne vrijednosti za glavnu komponentu 1 i 2 iznosile su 2,02 i 1,06 (Prilog, Tablica 14.).

Iz koeficijenta varijabli koje opisuju linearnu kombinaciju svih osi glavnih komponenta proizlazi da u smjeru osi glavne komponente 1 raste količina lipofuscina i neutralnih masti dok aktivnost kisele DNaze u probavnoj žlijezdi pada (Prilog, Tablica 15.). U smjeru glavne komponente 2 raste vrijednost stabilnosti lizosomalnih membrana.

Ordinacijom varijabli došlo je do razdvajanja postaja Sv. Ivan i ACI Marina. Duž PC 1 i PC 2 osi formirani su gradijenti. Promatrajući gradijent postaja od negativnog dijela PC 1 osi ka pozitivnom, na najekstremnijem položaju nalazi se postaja Sv. Ivan u srpnju zbog iznimno visokih vrijednosti kisele DNaze u negativnom dijelu glavne komponente 1. Istovremeno je izražena niska stabilnost lizosomalnih membrana i količina lipofuscina i neutralnih masti. Postepeno se u negativnom dijelu PC 1 osi i pozitivnom dijelu PC 2 osi uključuje postaja Sv. Ivan u proljetnom periodu od travnja do lipnja, koja je ujedno i grupirana s obzirom na više vrijednosti kisele DNaze i niske količine lipofuscina i neutralnih masti te se travnju i svibnju bilježe više vrijednosti stabilnosti lizosomalne membrane, dok su nešto niže u lipnju (Slika 24, klaster A). Postaja Sv. Ivan u veljači uključuje se blizu grupiranih mjeseci, ali nije grupirana s periodom od travnja do lipnja zbog pada aktivnosti kisele DNaze i porasta stabilnosti lizosomalnih membrana. Postaja ACI Marina u lipnju i srpnju prema svim parametrima odvojena je u negativnom dijelu PC 1 i PC 2 osi, te su mjeseci grupirani na temelju visoke aktivnosti kisele DNaze, a smanjene količine lipofuscina i neutralnih masti i stabilnosti lizosomalnih membrana (Slika 24., klaster B). Zajedno s navedenim mjesecima grupirana je postaja ACI Marina u svibnju, zbog veće aktivnosti kisele DNaze i porasta količine neutralnih masti i lipofuscina, a smanjene stabilnosti lizosomalnih membrana (Slika 24., klaster B). Obje postaje u kolovozu i rujnu koncentriraju se na prijelazu iz negativnog u pozitivni dio PC1 osi, a negativnom dijelu PC 2 osi, gdje opada aktivnost kisele DNaze, smanjena je stabilnost lizosomalnih membrana, a količina lipofuscina i neutralnih masti postepeno raste. U središtu PC 1 osi i pozitivnom dijelu PC 2 osi nalaze se postaja Sv. Ivan u ožujku i listopadu, te ACI Marina u veljači, zbog intermedijarnih vrijednosti aktivnosti kisele DNaze, te količine lipofuscina i neutralnih masti, ali povišene stabilnosti lizosomalnih membrana. Dijagonalno prema gore odvojene su u pozitivnom dijelu obje osi postaje Sv. Ivan od studenog do siječnja i ACI Marina u travnju, studenom i prosincu zbog niske aktivnosti

kisele DNaze, kao i porasta količine lipofuscina i neutralnih masti te povišene stabilnosti lizosomalnih membrana. Pozitivni dio PC 1 osi u smjeru dijagonalno prema dolje, a negativnom dijelu PC 2 osi zauzela je i postaja ACI Marina u listopadu, kada su zabilježene visoke količine lipofuscina i neutralnih masti i snižene stabilnosti lizosomalnih membrana. U ekstremno pozitivnom dijelu PC1 osi odvaja se postaja ACI Marina u siječnju zbog niske aktivnosti kisele DNaze, ali s izrazito velikim vrijednostima lipofuscina i neutralnih masti.

Os glavne komponente 2 odvaja postaju Sv. Ivan u svom pozitivnom dijelu i postaju ACI Marina u svojem negativnom dijelu u gotovo svim mjesecima tijekom istraživnog perioda. Izuzetak je u središnjem dijelu glavne komponente 2 postaja Sv. Ivan u srpnju, kolovozu i rujnu koja se odvaja zajedno s postajom ACI Marina. Također, u središnjem dijelu PC 1 osi odvaja se postaja ACI Marina u periodu od studenog do veljače, a travanj je zasebno grupiran (Slika 24, klaster C). Usporedbom jednogodišnjih rezultata u odnosu na sve izmjerene lizosomalne promjene, uočeno je najbolje grupiranje postaja Sv. Ivan i ACI Marina i međusobno odvajanje u periodu od travnja do srpnja.

5. RASPRAVA

5. RASPRAVA

Školjkaši roda *Mytilus* najrašireniji su rod među mekušcima i predstavljaju organizme od velike gospodarske važnosti. Mediteranska dagnja, *Mytilus galloprovincialis*, u velikoj mjeri se koristi kao modelni organizam u projektima praćenja stanja okoliša. Aktivnost enzima, kao i histokemijske promijene u lizosomu ukazuju na odgovor organizma koji se može povezati s onečišćenjem okoliša. Kao važna karika molekularnih i biokemijskih putova u pozadini biološkog odgovora identificirane su deoksiribonukleaze (DNaze), probavni enzimi koji imaju ulogu razgradnje deoksiribonukleinske kiseline (DNA) u lizosomu stanice.

5.1. IDENTIFIKACIJA, KARAKTERIZACIJA I AKTIVNOST KISELE DNAZE U TKIVIMA DAGNJE

Preliminarnim istraživanjem utvrđena je aktivnost kisele DNaze u probavnoj žlijezdi i škragama mediteranske dagnje, *M. galloprovincialis* metodom zimograma. U probavnoj žlijezdi dagnje tijekom istraživanog perioda detektirane su dvije izoforme aktivnog enzima molekularne mase 48 i 37 kDa, što je u skladu s rezultatima istraživanja mišje i svinjske DNaze II, gdje su također otkrivene višestruke izoforme enzima. U jetri miša, molekularna masa kisele DNaze iznosi 45 kDa i 30 kDa (Ohkouchi i sur., 2013), dok je u svinjskoj slezeni utvrđena aktivna izoforma kisele DNaze molekularne mase 46,5 kDa i 35 kDa (Huang i sur., 2009). Kod beskralješnjaka višestruke izoforme kisele DNaze utvrđene su u probavnoj žlijezdi slatkovodnog puža *Viviparus viviparus* (Popov i sur., 2003), a u endosomu spužve *Tethya aurantium* utvrđene su dvije izoforme enzima kisele DNaze (Fafandel i sur., 2010).

Utvrđena jedna proteinska vrpca molekularne mase 48 kDa ukazuje na prisutnost jedne aktivne izoforme enzima kisele DNaze u škragama dagnje. Jedna izoforma aktivnog enzima kisele DNaze molekularne mase 45 kDa utvrđena je u staničnim linijama ljudskih embrionskih stanica bubrega (Schafer i sur., 2007) te u morskim beskralješnjacima, kapici *Chlamys islandica* molekularne mase 42 kDa (Øverbø i Myrnes, 2006) i morskom ježincu *Strongylocentrotus intermedius*, molekularne mase 37 kDa (Shastina i sur., 2003), korteksu spužve *T. aurantium* molekularne mase 25kDa (Fafandel i sur., 2010). Razlika u aktivnim izoformama u škragama, u odnosu na probavnu žlijezdu kod mediteranske dagnje, gdje su utvrđene dvije izoforme enzima kisele DNaze proizlazi iz denaturirajućih uvjeta zimograma.

Može se pretpostaviti da se proteinska vrpca molekularne mase 37 kDa u škragama dagnji nije u mogućnosti rekonstruirati (Liao, 1985). Mogući razlog nepojavljivanja vrpce od 37 kDa u škragama može se objasniti denaturirajućim uvjetima SDS – PAGE elektroforeze, koja prethodi razvijanju zimograma. Naime, tijekom denaturirajuće SDS-PAGE elektroforeze u prisustvu ionskog deterdženta SDS-a dolazi do djelomičnog razaranja sekundarne i tercijarne strukture proteina, kako bi se proteini mogli razdvojiti u električnom polju prema molekularnoj masi (Rosenthal i Lacks, 1977). Međutim, pritom je ipak očuvan određeni stupanj strukture koja će omogućiti renaturiranje proteina u reaktivacijskom puferu i uspostavu njegove normalne katalitičke aktivnosti (Bischoff i sur., 1998). Moguće je da su enzimske forme kisele DNaze u škragama osjetljivije na djelovanje deterdženta od izoformi u probavnoj žlijezdi ili da je za uspostavu pravilne konformacije proteina u probavnoj žlijezdi dovoljan samo kiseli pH karakterističan za lizosome (Carballal i sur., 1997; Perić, 2008). Nadalje postranslacijske modifikacije koje su specifične za pojedine organe mogu utjecati na povećanu stabilnost i aktivnost enzima (Ohkouchi i sur., 2013). Lizosomalni enzimi se sintetiziraju kao prekursori polipeptida u endoplazmatskom retikulumu, te glikoziliraju, a zatim sele u Golgijev aparat gdje se fosforiliraju, kako u sisavaca (Farquhar i Palade, 1981), tako i školjkaša (Robledo i sur., 2006). Signalni peptidi se postranslacijski izrezuju, a proenzimi se proteolitički obrađuju u lizosomu, čime se smanjuje molekularna masa proteina (Ohkouschi i sur., 2013). Budući da su u proteinskom ekstraktu probavne žlijezde i škraga dagnje prisutni proteini iz svih staničnih organela, ispitana je prisutnost izoforme u probavnoj žlijezdi dagnje molekularne mase od 37 kDa nakon izlaganja klorokinu. Klorokin je inhibitor pH lizosoma, koji unutar lizosoma veže na sebe vodikove ione podižući pH lizosoma, te na taj način onemogućava aktivnost lizosomalnih enzima aktivnih pri niskom pH (Glaumann i sur., 1986). Pretpostavlja se da kiselu DNazu molekularne mase 48 kDa nalazi u ranom endosomu, te da se daljnja dorada u enzim molekularne mase od 37 kDa odvija u lizosomu. Izostanak proteinske vrpce molekularne mase 37 kDa, u proteinskom ekstraktu probavne žlijezde, zbog izlaganja klorokinu ukazuje da je proizvod lizosomalne proteolitičke obrade izoforme molekularne mase od 48 kDa u lizosomu. *In vivo* inkubacija u klorokinu inhibirala je aktivnost lizosomalnih enzima uzrokujući nestanak izoforme molekularne mase 37 kDa i sugerirajući postranslacijsku lizosomalnu obradu kisele DNaze u probavnoj žlijezdi dagnje, (Huang i sur., 2009). Većina lizosomalnih enzima kao što su katepsin B (Mach i sur., 1992) i D (Gieselmann i sur., 1985) i DNaza II (Huang i sur., 2009; Ohkouchi i sur., 2013) se proteolitički procesiraju tijekom dozrijevanja u lizosomu. Istraživanjem katepsina D, najbolje

istraženog lizosomalnog enzima utvrđena je proteinska vrpca molekularne mase 53 kDa koja je prekursor polipeptida te rezanjem signalnog peptida nastaje forma molekularne mase 47 kDa, koje se dalje procesira u lizosomu (Hasilik i Neufeld, 1980). Ovakav mehanizam objašnjava različite molekularne mase kisele DNaze u različitim organima kod svinje (Liao, 1985; Wang i sur., 1998; Huang i sur., 2009) goveda (Swenson i Hodes, 1969), ljudi (MacLea i sur. 2002, 2003), miša (Ohkouchi i sur., 2013) i beskrležnjaka (Popov i sur., 2003; Shiomi i sur., 2004; Øverbø i Myrnes, 2006; Fafandel i sur., 2010)

Za razliku od probavne žlijezde, proteinski ekstrakt škrge sadrži jednu aktivnu izoformu enzima molekularne mase 48 kDa, što ukazuje da proteolitička obrada enzima nije bitan korak za aktivnost kisele DNaze. Ujedno, obilježja kisele DNaze utvrđena u ovom radu mogu biti odraz tkivno specifične dorade proteina u dagnjama, kao što je dokazano kod DNaze II iz miša, gdje tkivo specifični uvjeti utječu na dozrijevanje DNaze II (Ohkouchi i sur., 2013). Istraživanjem Ohkoucki-ja i sur. (2013) dokazana je važnost količine katepsina L u pojedinom organu koji sudjeluje u procesiranju lizosomalne DNaze II iz forme molekularne mase 30 kDa u formu molekularne mase 23 kDa. Proteinska vrpca molekularne mase 23 kDa je utvrđena u jetri, ali ne i u slezeni, što upućuje da je za procesiranje u lizosomima slezene odgovoran drugi enzim osim katepsina L. Također, moguće je, kao što je već navedeno, da se proteinska vrpca molekularne mase 37 kDa u škrgama dagnji nije u mogućnosti rekonstruirati (Liao, 1985) zbog denaturirajućih uvjeta SDS – PAGE elektroforeze.

Aktivna u oba tkiva dagnje pri kiselom pH 5,5, je izoforma kisele DNaze molekularne mase 48 kDa što upućuje na lokalizaciju u lizosomu. Proteinska izoforma molekularne mase 48 kDa je vjerojatno polipeptidna izoforma nastala autoproteolitičkom aktivnošću u oba tkiva i stabilna prilikom djelovanja klorokina, kao što je dokazano za DNazu II u svinji (Huang i sur., 2009). Isto tako, Nishimura i sur. (1987) su dokazali da je izoforma katepsina D od 47 kDa u lizosomu katalitički aktivna u kiselom pH, za razliku od drugih formi enzima. Smatra se da se jednom razdvojene podjedinice proteina, kao i proteolitički obrađene izoforme enzima u lizosomu ne mogu reaktivirati tijekom SDS-PAGE analize (Liao, 1985). Također, čini se da proteolitički proces u lizosomu nije uvjet za enzimsku aktivnost, ali se odvija u lizosomu (Huang i sur., 2009). Nasuprot tomu, glikozilacija karakteristična za sve lizosomalne enzime je od velike važnosti za aktivnost kisele DNaze (Schafer i sur., 2007). Molekularna masa 45 kDa visoko glikozilirane forme kisele DNaze utvrđena je u čovjeku (MacLea i sur., 2002; MacLea i sur., 2003) i svinje (Cheng i sur., 2006). Uspoređujući molekularnu masu kisele DNaze kod kralješnjaka s dobivenom izoformom kisele DNaze

molekularne mase od 48 kDa, može se pretpostaviti da je dobivena izoforma visoko glikozilirana i aktivna u lizosomima dagnje.

Kako bi se utvrdilo da je DNaza II glavni predstavnik kisele DNaze, te da se aktivnost kisele DNaze utvrđene zimogramom pripisuje DNazi II, provedena je Western analiza u proteinskim ekstraktima probavne žlijezde i škrge dagnje. Budući da je DNaza II filogenetski konzerviran protein (Evans i Aguilera, 2003), u analizi je korišteno poliklonalno protutijelo na ljudsku DNazu II. Utvrđene su tri glavne proteinske vrpce u probavnoj žlijezdi i škragama dagnje. U oba tkiva utvrđene su dvije veće proteinske vrpce molekularne mase od oko 48 kDa i 37 kDa. Proteinske vrpce dobivene Western analizom u proteinskom ekstraktu probavne žlijezde, odgovaraju izoformama u zimogramu. Proteinske vrpce od 47 i 35 kDa zabilježene su i u svinjskoj slezeni, gdje je proteinska vrpca od 47 kDa utvrđena u mikrosomalnoj frakciji, a manja vrpca je proteolitički procesirana u lizosomu (Huang i sur., 2009). Proteinska vrpca molekularne mase 48 kDa u ekstraktima škrge je jačeg intenziteta od proteinske vrpce molekularne mase 37 kDa, što se može objasniti nemogućnošću potpune rekonstitucije enzima nakon denaturirajuće SDS – PAGE elektroforeze (Liao, 1985). Uz proteinske vrpce molekularne mase 48 i 37 kDa, Western analizom utvrđena je treća proteinska vrpca molekularne mase 30 kDa. Proteinska vrpca od 30 kDa, može odgovarati mišjem obliku teškog lanca molekularne mase 23 kDa, koji nastaje nakon proteolitičke obrade propeptida molekularne mase 37 kDa u lizosomima (Ohkouchi i sur., 2013).

Struktura DNaze II je vrlo konzervirana te su glikozilacijska mjesta, kao i položaj cisteina jednaki kod mnogih vrsta (MacLea i sur., 2002). Položaj cisteina uvjetuje disulfidne veze u DNazi II čovjeka (MacLea i sur., 2002) i svinje (Huang i sur., 2009). Struktura DNaze II u slezeni svinje upućuje na građu od 3 podjedinice koje su međusobno povezane disulfidnim mostovima. Zbog izrazitih denaturirajućih uvjeta tijekom Western analize moguće je da se denaturiranjem kidaju disulfidne veze koje rezultiraju pojavom proteinskih vrpca manjih molekularnih masa, a čija aktivnost nije utvrđena zimogramom, zbog nemogućnosti reaktiviranja razdvojenih podjedinica. Može se zaključiti da je DNaza II molekularne mase 48 kDa lokalizirana u lizosomima, obzirom da je utvrđena njena aktivnost u kiselom pH a identitet potvrđen imunodetekcijom. Daljnja dorada koja uključuje promjenu molekularne mase na 37 kDa odvija se u lizosomima. Proteinska vrpca molekularne mase 30 kDa može predstavljati laki lanac utvrđene vrpce od 37 kDa ili njenu podjedinicu koju je moguće utvrditi Western analizom zbog prepoznavanja antitijela, ali nije aktivna pri kiselom pH i ne može se utvrditi zimogramom.

Indicije lizosomalne lokalizacije DNaze II potvrđene su u mnogim istraživanjima, te je utvrđeno da je DNaza II kao glavni predstavnik kiselih DNaza lokalizirana uglavnom u lizosomima (Evans i Aguilera, 2003). Imunohistokemijskom analizom lokalizirana je DNaza II u lizosomima probavne žlijezde i škraga dagnje. Pozitivni signali za DNazu II su lokalizirani s onima za katepsin D u ispitivanim tkivima, što ukazuje da je DNaza II lokalizirana u lizosomima (Ohkouchi i sur., 2013). Obilježavanjem katepsina L, lizosomalnog enzima i Lamp 1, enzima na membrani lizosoma dokazana je lokalizacija DNaze II u lizosomima slezene i kosti miša (Ohkouchi i sur., 2013).

Zbog niske osjetljivosti metode, zimogram nije pokazao razliku u razini aktivnosti DNaze II tijekom ispitanih mjeseci. Stoga je u preliminarnom istraživanju, sezonska aktivnost kisele DNaze određena vrlo osjetljivom jednostrukom radijalnom enzimatskom difuzijom. Ona otkriva prisutnost kisele DNaze u proteinskim ekstraktima probavne žlijezde i škragama dagnji uzorkovanih tijekom reprezentativnih mjeseci u sezonama. Uočene su razlike jasno pokazale sezonsku i tkivno specifičnu aktivnost kisele DNaze. Unatoč tome što se pokazala vrlo osjetljivom, jednostruka radijalna enzimatska difuzija zahtjeva 24 – satnu inkubaciju, stoga je promjena u aktivnosti kisele DNaze analizirana metodom koja u kratkom vremenu omogućuje obradu većeg broja uzoraka (Fafandel i sur., 2008). Mjerenjem promjene fluorescencije PicoGreen® - DNA kompleksa tijekom hidrolize DNA utvrđena je razlika u aktivnosti kisele DNaze dagnjama tijekom godine dana, od kolovoza 2012. do kolovoza 2013. godine, kao i razlike među tkivima. Različiti obrazac u aktivnosti kisele DNaze u dvjema tkivima javlja se zbog različite fiziološke uloge tkiva (Banni i sur., 2011). Period povišene aktivnosti kisele DNaze u probavnoj žlijezdi dagnje utvrđen je tijekom proljeća i ljeta, u vrijeme kada se u probavnoj žlijezdi odvija većina metaboličke aktivnosti enzima (Gabbott, 1983). Ipak u istraživanjima uz obalu Tunisa analizom ekspresije gena otkrivena je povećana stopa metaboličkih procesa nukleinskih kiselina tijekom zimskih mjeseci što upućuje na povezanost vanjskih čimbenika okoliša na određenom području, posebice dostupnost hrane (Banni i sur., 2011). Moguće je, da enzim kiselina DNaza nije bila među 265 gena uključenih u ovo istraživanje ili da razlike u aktivnosti enzima koji metaboliziraju nukleinske kiseline između sezona proizlaze iz varijacija u godišnjem ciklusu između školjkaša uzorkovanih uz obalu Tunisa i jadranskih školjkaša. Aktivnost kisele DNaze u probavnoj žlijezdi dagnje odražava sezonske varijacije vanjskih čimbenika u okolišu, kao što su dostupnost hrane, temperatura, rast, te endogenih čimbenika kao što su reprodukcija i imunološki sustav

(Viarengo i sur., 1991; Solé i sur., 1995; Power i Sheehan, 1996). Kisele DNaze ima ulogu u sazrijevanju gameta tijekom spermatogeneze kod morskog ježinca *Strongylocentrotus intermedius* (Shastina i sur., 2003) i sazrijevanju oocita u lososu *Oncorhynchus tshawytscha* (Yamamoto, 1971). S obzirom na reproduktivni ciklus, visoka aktivnost enzima u probavnoj žlijezdi može se očekivati tijekom ranog proljeća i krajem ljeta, te početkom jeseni, kada su dagnje uglavnom u posljednjoj fazi gametogeneze i mrijesta (Gabbott, 1983). Povećana aktivnost kisele DNaze u veljači mogla bi se povezati s početkom gametogeneze dagnji, koja je utvrđena u ovom periodu u populacijama dagnje istraživanim u sjevernom dijelu Jadranskog mora (Hrs-Brenko, 1971). Maksimalna zrelost gameta zabilježena je u rano proljeće i jesen, kada sazrijevanje gameta tijekom reproduktivnog ciklusa zahtijeva intenzivni metabolizam i aktivnost lizosomskih enzima u probavnoj žlijezdi. Dostupnost hrane je podložna sezonskim varijacijama te time može utjecati na aktivnost enzima u školjkašima (Gabbott, 1983). U sjevernom Jadranu, fitoplankton, kao jedan od glavnih izvora hrane za dagnje, ima dva razdoblja intenzivnog cvata. Prvi period zabilježen je od ožujka do svibnja, a drugi u listopadu (Marić i sur., 2012). Kao posljedica visoke dostupnosti hrane, povećana metabolička stopa tijekom ranog proljeća i krajem ljeta dovodi do viška proizvodnje kisikovih radikala koji bi mogli oštetiti DNA morskih organizama (Breen i Murphy, 1995; Cadet i sur., 1997), a time dovesti i do povećanja fagocitoze i endocitoze čime bi se povećala aktivnost lizosomskih enzima u probavnoj žlijezdi (Robert i sur., 2011). U tom pogledu, aktivnost kisele DNaze u probavnoj žlijezdi može se smatrati tipičnim odgovorom školjkaša tijekom perioda intenzivnog hranjenja, kao posljedica pojačanog metabolizma tijekom gametogeneze.

Za razliku od probavne žlijezde, aktivnost kisele DNaze u škrgama pokazuje dva jasno izražena perioda aktivnosti. U ljetnom periodu aktivnost kisele DNaze u škrgama je niža od vrijednosti utvrđenim u probavnoj žlijezdi, što je utvrđeno i kod školjkaša *Crenomytilus grayanus* (Menzorova i Rasskazov, 2007). U škrgama dagnji, aktivnost enzima razlikuje dva perioda, jesen - zima i proljeće - ljeto kada je aktivnost više ili manje konstantna, s niskom varijabilnošću. Povišena aktivnost kisele DNaze u škrgama u odnosu na probavnu žlijezdu zimi može se objasniti činjenicom da su škrge jedini aktivni organ tijekom zimskog perioda, koji ujedno i preuzima ulogu prehrane tj. unosa tvari (Power i Sheehan, 1996). U škrgama dagnji, povišena aktivnost kisele DNaze u škrgama utvrđena je u jesenskom i zimskom razdoblju, kada je dostupnost hrane u okolišu smanjena. Aktivnost enzima u tkivima školjkaša obično je posljedica promjena u metaboličkim uvjetima za vrijeme smanjene dostupnosti hrane u okolišu, kada dolazi do razgradnje i recikliranja proteina i organela procesom

autofagije kako bi se dobila energija za normalno odvijanje životnih procesa (Bergamini i sur., 2003; Cuervo, 2004). Za vrijeme autofagije koja se odvija u lizosomima metabolizam tvari vrše kisele hidrolaze, a među njima, kisel DNaza metabolizira DNA (Evans i Aguilera, 2003). Nadalje, povišene aktivnosti kisele DNaze tijekom zime koje su u korelaciji s temperaturom morske vode mogle bi biti povezane sa potrebom povećanog utroška energije pri crpljenju vode, čija je viskoznost povećana pri niskim temperaturama (Larsen i Riisgård, 2009). Od vanjskih faktora, osim temperature na aktivnost kisele DNaze utječe i promjena saliniteta. Čini se da kisel DNaza sudjeluje u procesima koji omogućuju škrgama aktivnu ulogu u prehrani i prilagodbi na stres u okolišu tijekom aklimatizacije na niske temperature morske vode i saliniteta, kao što je primijećeno kod MXR – proteina i acetil kolinesteraze u mediteranskoj dagnji (Minier i sur., 2000). Prehrambenu i obrambenu ulogu u dagnji imaju stanice hemociti koji cirkuliraju kroz škrge optjecajnim sustavom (Carballal i sur., 1997). Hemociti endocitozom i fagocitozom unose makromolekule (Gabott, 1983), prilikom čega dolazi i do razgradnje unesene DNA kiselom DNazom (Evans i Aguilera, 2003). Koncentracija cirkulirajućih hemocita ne pokazuje sezonske promjene, ali njihova aktivnost je karakterizirana okolišnim i endogenim faktorima (Carballal i sur., 1998). Fagocitna aktivnost hemocita istraživana u mediteranskoj dagnji Jadranskog mora karakterizirana je najvišim vrijednostima u zimskom periodu, s maksimalnom aktivnosti u siječnju te padom tijekom proljetnih mjeseci, dosežući najniže razine u srpnju i kolovozu (Ciacci i sur., 2009), što je u skladu s aktivnosti kisele DNaze u škrgama. Aktivnost enzima u škrgama dagnje također odražava sezonalnost endogenih čimbenika, kao što su aktivnosti vezane uz imunološki sustav i egzogenih čimbenika u okolišu, kao što su dostupnost hrane, temperatura i salinitet, (Gabbott, 1983; Viarengo i sur., 1991; Sole i sur., 1995; Power i Sheehan, 1996).

Od vanjskih čimbenika okoliša, onečišćenje može utjecati na aktivnost enzima u tkivima dagnje, kada se javljaju odstupanja u aktivnosti u odnosu na kontrolnu postaju (Regoli, 1998; Solé i sur., 1995; Borković i sur., 2005). U ovom radu utvrđena je promjena u aktivnosti kisele DNaze u škrgama i probavnoj žlijezdi mediteranske dagnje na postaji ACI Marina koja je pod utjecajem onečišćenja, za razliku od kontrolne postaje Sv. Ivan. Aktivnost kisele DNaze u oba organa na postaji Sv. Ivan prati sezonska aktivnost kisele DNaze na onečišćenoj postaji. Međutim, razlika u aktivnosti utvrđena je u proljetno - ljetnom periodu u oba organa te u studenom u probavnoj žlijezdi, kao i u rujnu i siječnju u škrgama. Iz ovog istraživanja proizlazi da sniženje aktivnosti kisele DNaze na postaji s opterećenjem u odnosu na kontrolnu postaju nije maskirano okolišnim faktorima tijekom većine mjeseci u godini. Okolišni i

biološki čimbenici kao što su količina hrane i reprodukcijski period utječu na aktivnost enzima tijekom zimskog i rano proljetnog perioda (Regoli, 1998; Orbea i sur., 2002; Leiniö i Lehtonen, 2005), kao što je prikazano i ovim istraživanjem.

Smatra se da se utjecaj onečišćenja u tkivima mijenja tijekom godine, što proizlazi iz promjene u aktivnosti enzima uslijed metabolizma onečišćivala u organima (Regoli, 1998; Sheehan i Power, 1999). Procesi biotransformacije i eliminacije onečišćivala u organizmu utječu na aktivnost enzima (McVeigh i sur., 2004). Vremenski se tijek promjene aktivnosti DNaza u tkivima s različitim ulogama može objasniti specifičnim procesima unosa, raspodjele i pohrane onečišćivala (McVeigh i sur., 2004). Onečišćivala iz okoliša utječu na proizvodnju oksidacijskih radikala u organizmu, koji oštećuju stanične organele, te DNA u jezgri i organelima. Razgradnja stanične DNA procesom autofagije koja se odvija u lizosomima stanica (Bergamini i sur., 2003), može utjecati na aktivnost kiselih DNaza. Značajne razlike u aktivnosti DNaza u beskralješnjacima su tkivno specifične i vremenski ovisne nakon *in vivo* izlaganja toksičnim spojevima s obzirom na vrstu spoja (Popov i sur., 2003; Menzorova i Rasskazov, 2007; Fafandel i sur., 2008). Promjena aktivnosti kiselih DNaza i broja izoformi kisele DNaze u probavnoj žlijezdi nakon izlaganja industrijskim onečišćivalima utvrđena je u slatkovodnom pužu *Viviparus viviparus* (Popov i sur., 2003). Razlika u aktivnosti kisele DNaze u dagnji *M. galloprovincialis* pod utjecajem onečišćivala utvrđena je na postajama s različitim opterećenjem. Promjenom omjera aktivnosti kiselih DNaza u probavnoj žlijezdi i hemocita dagnje omogućeno je razlučivanje odgovora kisele DNaze na onečišćivala, kao i istraživanih postaja prema onečišćenju (Fafandel i sur., 2008). Vrijednosti omjera su u tretiranim organizmima, kao i na postajama s različitim opterećenjem, bile veće u odnosu na kontrolne skupine organizama. Smanjenje aktivnosti kiselih DNaza, obzirom na onečišćenje morske vode, zabilježeno je u istraživanju provedenom u tkivu školjkaša *Crenomytilus grayanus* (Menzorova i Rasskazov, 2007), što je u skladu s istraživanjem u ovom radu gdje su vrijednosti kisele DNaze na postaji s opterećenjem bile niže u odnosu na kontrolnu postaju.

Stvaran utjecaj nekog spoja u morskom ekosustavu na prirodnu populaciju dagnji teško je procijeniti, jer je u okolišu prisutan velik broj onečišćivala, koji dolaze u mješavinama te tako utječu na različite stupnjeve biološke organizacije u morskim organizmima, od substanične, preko stanične razine do razine ekosistema. Kako bi se osiguralo pravilno praćenje stanja u okolišu potrebno je razviti pristup kojim bi se više pokazatelja uključilo u skup alata ili indeks

sposoban za otkrivanje i praćenje promjena u određenom organizmu (Hagger i sur., 2008). U indekse kojima se prate promjene u morskom okolišu uključene su promjene u lizosomima dagnji koje mogu dati uvid u stanje organizma na različitim razinama organizacije.

5.2. ODGOVOR LIZOSOMA PROBAVNE ŽLIJEZDE NA OKOLIŠNE UVJETE

Promjene lizosoma uslijed promjena uvjeta u okolišu kod školjkaša *M. galloprovincialis* mogu se pratiti na substaničnoj i staničnoj razini. Substanične promjene karakterizirane su promjenom u aktivnosti hidrolitičkih enzima, kao što je kisela DNaza, dok se poremećaj na nivou stanice očituje u promjeni u metabolizmu stanice kada dolazi do povećanog nakupljanja neutralnih masti i lipofuscina. Povećana količina neutralnih masti i lipofuscina dovode do destabilizacije lizosomalne membrane, pri čemu se sadržaj iz lizosoma ispusti u citoplazmu te narušava rad stanice (Brunk i Terman, 2002).

U ovom radu promatrane su histokemijske promjene u dagnji, te njihove sezonske promjene. Utvrđena stabilnost lizosomalnih membrana, visoka je od listopada do svibnja na kontrolnoj postaji, dok na onečišćenoj postaji pada već u veljači na vrlo niske vrijednosti, što je karakteristično za ovo područje (Petrović i sur., 2004; Perić i sur., 2012). Destabilizacija lizosomalnih membrana na postaji ACI Marina tijekom ljetnih mjeseci odgovara razini zabilježenih na postajama pod utjecajem onečišćenja u području Jonskog mora (Pisoni i sur., 2004), Jadranskog mora (Regoli, 1992) i Grčke (Domouhtsidou i Dimitriadis, 2001). Međutim, stabilnost lizosomalnih membrana tijekom jesenskog razdoblja je vrlo visoka. Stoga se čini da je funkcija lizosomalnog sustava ograničena tijekom zime i zbog toga strukturne karakteristike lizosoma, koje se odnose na sezonske promjene, mogu biti pogrešno pripisane onečišćenju, ako su istraživanja provedena tijekom ove sezone (Bocchetti i Regoli, 2006; Koukouzika i sur., 2009). Povišene vrijednosti nakupljenog lipofuscina zabilježene su na mjestima antropogenog utjecaja, kao posljedica prisustva organskih zagađivala i metala u okolišu (Petrović i sur., 2004; Da Ros i sur., 2011). U skladu s navedenim, iako su na postaji ACI Marina uočene sezonske promjene lipofuscina, značajno povišenje količine lipofuscina uočeno u listopadu i periodu od veljače do lipnja u odnosu na postaju Sv. Ivan ukazuje na opterećenje organskim onečišćivalima. Uočene povišene vrijednosti lipofuscina, mogle bi biti povezane s prolaskom dagnji kroz fazu mrijesta koje se događa u upravo u ovom periodu (Banni i sur., 2011). Niske količine lipofuscina tijekom ljeta u odnosu na povišene količine zimi, koje su zabilježene i u ovom istraživanju uočene su u populacijama dagnji u sjevernom Jadranu (Petrović i sur., 2004), kao i u Italiji (Bocchetti i Regoli, 2006; Moschino i sur., 2011)

i u sjevernijim morima (Giarratano i sur., 2011; Nahrgang i sur., 2013; Schmidt i sur., 2013). Metabolizam lipofuscina i neutralnih masti ovisi o fiziološkom ciklusu (Moschino i sur., 2011). Naime, u zimskom periodu, tijekom cvata fitoplanktona (Marić i sur., 2012) dolazi do nakupljanja rezervi neutralnih masti, a prilikom faze otpuštanja gameta, njihova količina naglo pada (Bocchetti i Regoli, 2006). Sukladno tome, kako je pokazano u ovom istraživanju, ljeti je količina neutralnih masti niska na postaji Sv. Ivan, što objašnjava očuvanost fiziološkog ciklusa u mediteranskoj dagnji (Bayne, 1976). Isto tako, niske vrijednosti neutralnih masti zabilježene su u listopadu nakon drugog mrijesta (Da Ros i sur., 1985; Petrović i sur., 2004). Niske količine neutralnih masti zabilježene u periodu prvog mrijesta, od veljače do svibnja su u skladu s istraživanjem Petrovića i sur. (2004). Međutim, niske količine neutralnih masti zadržane su tijekom ljeta, dok su Petrović i sur. (2004) zabilježili maksimalne vrijednosti. To ukazuje na različitost utjecaja ekoloških čimbenika na promatrani parametar u pojedinim periodima istraživanja. Neutralne masti su vrlo važni izvori energije tijekom rasta i reprodukcije (Holland, 1978). Fiziološki procesi akumulacije rezervi i produkcija gameta su odvojeni. Neutralne masti se nakupljaju u probavnoj žlijezdi tijekom faze pojačane ishrane školjkaša, a nakon toga se rezerve masti pohranjuju u reproduktivnom tkivu tijekom gametogeneze i mrijesta (Cancio i sur., 1999). Iako su na postaji ACI Marina uočene sezonske promjene neutralnih masti, značajno povišenje njihove razine zabilježene u periodu od veljače do lipnja u odnosu na postaju Sv. Ivan mogu se povezati s utjecajem organskim onečišćivalima lipofilnog karaktera (Moore, 1988; Da Ros i sur., 2011), koja induciraju nakupljanje neutralnih masti ili poremećaj u razgradnji masti (Krishnakumar i sur., 1995).

Pokazatelji stanja u okolišu trebali bi biti pod malim utjecajem čimbenika okoliša. Međutim, u stvarnosti nije tako. Ovo istraživanje potvrđuje da učinak onečišćenja na histokemijske parametre i lizosomalne enzime može biti maskiran sezonskim varijacijama uvjetovanim fiziološkim ciklusom dagnje i čimbenicima okoliša u nekim mjesecima promatranog perioda. Kako bi se utvrdilo u kojoj je mjeri aktivnost kisele DNaze maskirana fiziološkim ciklusom dagnje, u odnosu na stabilnost lizosomalnih membrana, te količinu lipofuscina i neutralnih masti, promatran je koeficijent varijabilnosti pojedinog parametra, te korelacija s temperaturom i salinitetom. Utvrđeno je da je stabilnost lizosomalnih membrana na postaji ACI Marina parametar s najvećim koeficijentom varijabilnosti. Također, stabilnost lizosomalnih membrana je ovim istraživanjem pokazala visoku negativnu korelaciju s temperaturom, što je i prikazano u istraživanjima Izagirre i Marigomez-a (2009) i Zhang-a i

sur. (2006), i sa salinitetom što je prikazano u istraživanju Bayne-a i sur. (1986). Nadalje, količina lipofuscina u lizosomima na obje postaje je promjena s najvećim koeficijentom varijabilnosti, što ukazuje na utjecaj okolišnih čimbenika. Međutim, od ranog proljeća do ranog ljeta postaje Sv. Ivan i ACI Marina se razlikuju prema količini lipofuscina, gdje dolazi do izrazito povišenih vrijednosti na postaji ACI Marina uslijed onečišćenja. Količina lipofuscina je u korelaciji s temperaturom kao što je prikazano u istraživanju Petrovića i sur. (2004). Također, i neutralne masti imaju visok koeficijent varijabilnosti, ali u proljetno – ljetnom periodu dolazi do razlike u količini neutralnih masti na postajama. Količina neutralnih masti na postajama Sv. Ivan i ACI Marina nije u korelaciji sa okolišnim parametrima, što je u skladu s istraživanjima Petrovića i sur. (2004) na ovom području. U ovom istraživanju utvrđeno je da je u usporedbi s histokemijskim parametrima lizosoma aktivnost kisele DNaze u škragama parametar s najnižim koeficijentom varijabilnosti, međutim u visokoj je negativnoj korelaciji sa salinitetom i temperaturom. Aktivnost kisele DNaze u probavnoj žlijezdi, također je parametar s niskim koeficijentom varijabilnosti, ali za razliku od aktivnosti kisele DNaze u škragama karakterizira ga izrazito niska korelacijom s temperaturom i salinitetom. Zbog navedenih karakteristika, aktivnost kisele DNaze u probavnoj žlijezdi dagnje potvrđuje se kao potencijalan indikator stresa u morskom okolišu (Fafandjel i sur., 2008) koji dopunjuje odgovor lizosoma u uvjetima onečišćenja.

Sezonska raspodjela ukazala je na određena razdoblja u kojima je utvrđena razlika između čiste (Sv. Ivan) i onečišćene postaje (ACI Marina) s obzirom na svaki pojedini istraživani lizosomalni parametar (aktivnost kisele DNaze, stabilnost lizosomalne membrane, količina lipofuscina i neutralnih masti). Multivarijantna analiza multidimezionalnim skaliranjem na temelju matriksa rangiranih sličnosti (Hair i sur., 1995) omogućila je detaljniji uvid u odnosu na grafičke prikaze srednjih vrijednosti u sposobnost svakog istraživanog parametra da odvoji čistu i onečišćenu postaju unatoč utvrđenim sezonskim razlikama, te grupira mjesece na temelju sličnosti pojedinog parametra. Za svaki od istraženog parametra, razdoblje u kojem je odvajanje postaja najbolje uočeno je od travnja do srpnja, dakle uglavnom u kasno proljetnom i ljetnom periodu. Može se zaključiti da je kasno proljetni i ljetni period najprikladnije vrijeme za uzorkovanje dagnji na sjevernojadranskom području i promatranje stanja okoliša na temelju lizosomalnih parametara kao što je prethodno utvrđeno za druga područja (Petrović i sur., 2004; Da Ros i sur., 2007), kao i u Grčkoj (Koukouzika i sur., 2009) i Španjolskoj (Marigomez i sur., 2006). Iako u ovom istraživanju dolazi do odvajanja čiste i onečišćene postaje na temelju lizosomalnih parametara i u travnju, u rano proljetnom periodu,

zbog tadašnjeg fiziološkog statusa dagnji travanj se ipak ne preporuča za uzorkovanje dagnji u svrhu procjene stanja morskog okoliša (Koukouzika i sur., 2009).

Kako bi se utvrdilo fiziološko stanje organizma, a time i stanje u okolišu potrebno je promatrati više parametara koji zajedno ukazuju na onečišćenje na nekom području (Hagger i sur., 2008). U svrhu prikaza i razdvajanja postaja na temelju onečišćenja koriste se različite statističke metode, multivarijatne analize kao što je analiza glavnih komponenata (Moschino i sur., 2011; Shaw i sur., 2011; Fields i sur., 2012). Analiza glavnih komponenata omogućila je razdvajanje lizosomalnih odgovora i po postajama i mjesecima. Početkom jeseni i tijekom zime, lizosomalni sustav karakteriziran je visokim vrijednostima lipofuscina i neutralnih masti i visokom stabilnosti lizosomalnih membrana, ali sniženom aktivnosti kisele DNaze u probavnoj žlijezdi. Prethodna su istraživanja pokazala da tijekom jeseni i zime na promatrane parametre lizosomalnog sustava uvelike utječe fiziološki ciklus (Dimitriadis i sur., 2004). Također, u zimskom periodu uz povišene vrijednosti lipofuscina uočeno je i oštećenje DNA u hemocitima dagnji (Schmidt i sur., 2013) u odnosu na ljetni period. Slijedom navedenog, moguće je da se povećana aktivnost kisele DNaze uočena u proljetnom periodu može povezati s metabolizmom oštećene DNA koja je nastala uslijed vezanja oksidativnih radikala u probavnoj žlijezdi. Izraženo nakupljanje lipofuscina u lizosomima može ometati funkciju samih lizosoma (Dimitriadis i sur., 2004). Naime, lipofuscin se veže za lizosomalne enzime i onemogućava njihovu aktivnost, čime se može objasniti snižena aktivnost kisele DNaze u probavnoj žlijezdi od studenog do siječnja, kada je količina lipofuscina visoka. Između ostalog, istraživanja su pokazala da lipofuscin ometa i aktivnost N-acetil-heksozaminidaze u lizosomima mediteranske dagnje (Dimitriadis i sur., 2004). Zbog svega navedenog, niska aktivnost kisele DNaze u probavnoj žlijezdi dagnje zimi mogla bi se objasniti povećanom količinom neutralnih masti i lipofuscina. Analiza glavnih komponenata ukazala je na trend izdvajanja mjeseci kada se parametri na postajama značajno razlikuju i razdvajaju postaje prema onečišćenju. Prema istraživanim lizosomalnim parametrima, postaja ACI Marina razlikuje se od postaje Sv. Ivan u periodu od travnja do srpnja, kada fiziološki čimbenici u dagnji ne maskiraju onečišćenje okoliša, kao što je prikazano za histokemijske promjene u lizosomima u istraživanjima na području Mediterana (Petrović i sur., 2004; Bocchetti i Regoli, 2006; Marigomez i sur., 2006; Da Ros i sur., 2007).

Veza između izlaganja kemijskih onečišćivala i biološkog odgovora lizosoma utvrđena je u brojnim istraživanjima, a metode za determinaciju lizosomalnih parametara poput stabilnosti

lizosomalnih membrana, nakupljanje lipofuscina i neutralnih masti, već su uključene u redovita praćenja stanja okoliša (Cajaraville i sur., 1995; Domouithsidou i Dimitriadis, 2001; Petrović i sur., 2004; Zorita i sur., 2007). Međutim, zbog sezonskih promjena te ovisnosti pojedinog parametra o fiziologiji samog školjkaša, pojedini parametri ne mogu prikazati pravo stanje u okolišu (Cajaraville i sur., 2000; Narbonne i sur., 2005; Hylland i sur., 2008). U novije vrijeme pokušavaju se ujediniti parametri koji bi najbrže, najjeftinije i najbolje opisali stanje u okolišu te razlučiti postaje pod opterećenjem. Kako bi se povećala kvaliteta procjene stanja okoliša, predloženi su indeksi odgovora pokazatelja koji uključuju promjene u lizosomalnim parametrima (Beliaeff i Burgeot, 2002; Dagnino i sur., 2007; Izagirre i Marigomez, 2009). Međutim, još se istražuje koji pokazatelji stanja organizma bi bili u primjeni za uporabu u ukupnom indeksu za procjenu stanja (Hagger i sur., 2010). Ovo istraživanje pokazalo je da je aktivnost kiselih DNaza u probavnoj žlijezdi lizosomalni odgovor koji pokazuje nisku sezonsku varijabilnost i moć razlučivanja okolišnih utjecaja, kao i jednostavnost metode. Iako rezultati ovog istraživanja nedvojbeno ukazuju na fiziološku povezanost aktivnost kisele DNaze sa stabilnosti lizosomalnih membrana, nakupljanjem lipofuscina i neutralnih masti, ali bez međusobne korelacije, za integrirani lizosomalni odgovor među već etablirane parametre predlaže se uvrstiti i aktivnost kisele DNaze. Kako bi se potvrdio značaj predloženog pristupa potrebno je provesti analize populacija dagnje na većem području, a u daljnjim laboratorijskim istraživanjima validirati integrirani lizosomalni odgovor na pojedina onečišćivala.

6. ZAKLJUČCI

6. ZAKLJUČCI

1. Aktivnost kisele DNaze u mediteranskoj dagnji, *M. galloprovincialis* razlikuje se u probavnoj žlijezdi i škragama. Aktivne izoforme kisele DNaze utvrđene u probavnoj žlijezdi su molekularne mase 48 i 37 kDa, a u škragama 48 kDa
2. Proteolitičko procesiranje kisele DNaze u lizosomima nije nužno za katalitičku aktivnost enzima
3. U probavnoj žlijezdi i škragama dagnje utvrđena je aktivnost kisele DNaze koja je identificirana u lizosomima kao DNaza II
4. Aktivnost kisele DNaze u probavnoj žlijezdi ovisi o reproduktivnom ciklusu i ishrani u kasnu jesen te krajem zime, dok je aktivnost kisele DNaze u škragama povezana s promjenama temperature i saliniteta u okolišu
5. Na pfoštaji pod utjecajem onečišćenja utvrđena je razlika u aktivnosti kisele DNaze u oba organa tijekom većeg dijela godine.
6. Promjene ekoloških čimbenika i fiziološki ciklus dagnje tijekom ranog proljeća i ljeta ne utječu na aktivnost kisele DNaze u probavnoj žlijezdi čime se ne maskira utjecaj onečišćenja
7. Aktivnost kisele DNaze u probavnoj žlijezdi doprinosi integriranom odgovoru lizosoma koji se koristi kao pokazatelj stanja u okolišu

7. LITERATURA

7. LITERATURA

- Aguirre-Martínez, G.V., Buratti, S., Fabbri, E., Del Valls, T.A., Martín-Díaz, M.L., 2013. Stability of lysosomal membrane in *Carcinus maenas* acts as a biomarker of exposure to pharmaceuticals. *Environmental Monitoring and Assessment* 185, 3783-3793.
- Baker, K.P., Baron, W.F., Henzel, W.J., Spencer, S.A., 1998. Molecular cloning and characterization of human and murine DNase II. *Gene* 215, 281-289.
- Banni, M., Negri, A., Mignone, F., Boussetta, H., Viarengo, A., Dondero, F., 2011. Gene expression rhythms in the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) across an annual cycle. *PLoS One* 6, e18904.
- Baranovskii, A.G., Buneva, V.N., Nevinsky, G.A., 2004. Human Deoxyribonucleases. *Biochemistry* 69, 587-601.
- Bayne, B.L., 1976. *Marine Mussels, Their Ecology and Physiology*. Cambridge University Press.
- Bayne, B.L., 1985. *Responses to environmental stress: tolerance, resistance and adaptation*. Wiley and Son, Chichester.
- Bayne, B.L., 1986. Measuring the Effects of Pollution at the Cellular and Organism Level, in: G. Kullenberg (Ed.), *The Role of the Oceans as a Waste Disposal Option*. Springer Netherlands, 617-634.
- Beliaeff, B., Burgeot, T., 2002. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC* 21, 1316-1322.
- Bergamini, E., Cavallini, G., Donati, A., Gori, Z., 2003. The anti-ageing effects of caloric restriction may involve stimulation of macroautophagy and lysosomal degradation, and can be intensified pharmacologically. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 57, 203-208.
- Bergsmedh, A., Ehnfors, J., Kawane, K., Motoyama, N., Nagata, S., Holmgren, L., 2006. DNase II and the Chk2 DNA damage pathway form a genetic barrier blocking replication of horizontally transferred DNA. *Molecular Cancer Research* 4, 187-195.
- Bernardi, G., 1971. 11 Spleen Acid Deoxyribonuclease, in: D.B. Paul (Ed.), *The Enzymes*. Academic Press, 271-287.
- Bischoff, K.M., Shi, L., Kennelly, P.J., 1998. The detection of enzyme activity following sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 260, 1-17.
- Bocchetti, R., Regoli, F., 2006. Seasonal variability of oxidative biomarkers, lysosomal parameters, metallothioneins and peroxisomal enzymes in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* from Adriatic Sea. *Chemosphere* 65, 913-921.
- Borković, S.S., Šaponjić, J.S., Pavlović, S.Z., Blagojević, D.P., Milošević, S.M., Kovačević, T.B., Radojičić, R.M., Spasić, M.B., Žikić, R.V., Saičić, Z.S., 2005. The activity of antioxidant defence enzymes in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Adriatic Sea. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 141, 366-374.

- Braulke, T., Bonifacino, J.S., 2009. Sorting of lysosomal proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1793, 605-614.
- Breen, A.P., Murphy, J.A., 1995. Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radical Biology & Medicine* 18, 1033-1077.
- Brunk, U.T., Terman, A., 2002. Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radical Biology & Medicine* 33, 611-619.
- Cadet, J., Berger, M., Douki, T., Ravanat, J.L., 1997. Oxidative damage to DNA: Formation, measurement, and biological significance, *Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology*, Volume 131. Springer Berlin Heidelberg, 1-87.
- Cajaraville, M.P., Robledo, Y., Etxeberria, M., Marigomez, I., 1995. Cellular biomarkers as useful tools in the biological monitoring of environmental pollution: molluscan digestive lysosomes, in: M.P. Cajaraville (Ed.), *Cell Biology in Environmental Toxicology*, Bilbo, 29-55.
- Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Science of The Total Environment* 247, 295-311.
- Cancio, I., Ibabe, A., Cajaraville, M.P., 1999. Seasonal variation of peroxisomal enzyme activities and peroxisomal structure in mussels *Mytilus galloprovincialis* and its relationship with the lipid content. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Pharmacology, Toxicology & Endocrinology* 123, 135-144.
- Carballal, M.a.J., López, C., Azevedo, C., Villalba, A., 1997. Enzymes Involved in Defense Functions of Hemocytes of Mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 70, 96-105.
- Carballal, M.a.J., Villalba, A., López, C., 1998. Seasonal Variation and Effects of Age, Food Availability, Size, Gonadal Development, and Parasitism on the Hemogram of *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 72, 304-312.
- Catcheside, D.G., Holmes, B., 1947. The action of enzymes on chromosomes. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 225-231.
- Ceccherelli, V.U., Rossi, R., 1984. Settlement, growth and production of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Ecology Progress Series* 16, 173-184.
- Cheng, Y.C., Hsueh, C.C., Lu, S.C., Liao, T.H., 2006. Identification of three crucial histidine residues (His115, His132 and His297) in porcine deoxyribonuclease II. *The Biochemical Journal* 398, 177-185.
- Cheung, S.G., 1993. Population dynamics and energy budgets of green-lipped mussel *Perna viridis* (Linnaeus) in a polluted harbour. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 168, 1-24.
- Chou, S.F., Chen, H.L., Lu, S.C., 2002. Up-regulation of human deoxyribonuclease II gene expression during myelomonocytic differentiation of HL-60 and THP-1 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 296, 48-53.
- Ciacci, C.F., R.; Betti, M.; Roch, P.; Canesi, L. , 2009. Seasonal changes in functional parameters of the hemolymph of *Mytilus galloprovincialis*. *Invertebrate Survival Journal* 6, 44-48.

- Cordonnier, C., Bernardi, G., 1968. A comparative study of acid deoxyribonucleases extracted from different tissues and species. *Canadian Journal Biochemistry* 46, 989-995.
- Cooper, G., Hausman, R., 2004. Stanica - molekularni pristup. Medicinska naklada d.o.o., Zagreb, 356-397.
- Cuervo, A.M., 2004. Autophagy: in sickness and in health. *Trends in Cell Biology* 14, 70-77.
- Cunningham, L., Laskowski, M., 1953. Presence of two different desoxyribonucleodepolymerases in veal kidney. *Biochimica et Biophysica Acta* 11, 590-591.
- Da Ros, L., Bressan, M., Marin, M.G., 1985. Reproductive cycle of the mussel (*Mytilus galloprovincialis* Lmk) in Venice Lagoon (North Adriatic). *Bolletino di Zoologia* 52, 223-229.
- Da Ros, L., Nasci, C., Marigomez, I., Soto, M., 2000. Biomarkers and trace metals in the digestive gland of indigenous and transplanted mussels, *Mytilus galloprovincialis*, in Venice Lagoon, Italy. *Marine Environmental Research* 50, 417-423.
- Da Ros, L., Moschino, V., Guerzoni, S., Halldórsson, H.P., 2007. Lysosomal responses and metallothionein induction in the blue mussel *Mytilus edulis* from the south-west coast of Iceland. *Environment International* 33, 362-369.
- Da Ros, L., Moschino, V., Macic, V., Schintu, M., 2011. An ecotoxicological approach for the Boka Kotorska Bay (south-eastern Adriatic Sea): first evaluation of lysosomal responses and metallothionein induction in mussels. *Marine Pollution Bulletin* 63, 326-333.
- Dagnino, A., Allen, J.I., Moore, M.N., Broeg, K., Canesi, L., Viarengo, A., 2007. Development of an expert system for the integration of biomarker responses in mussels into an animal health index. *Biomarkers: biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals* 12, 155-172.
- de Duve, C., 1983. Lysosomes revisited. *European Journal of Biochemistry* 137, 391-397.
- de Zwann, A.M., M., 1992. Cellular biochemistry and endocrinology, in: G. E.M. (Ed.), *The Mussel Mytilus: Ecology, Physiology, Genetics and culture* Elsevier Science Publishers B.V
- Dimitriadis, V.K., Domouhtsidou, G.P., Cajaraville, M.P., 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.
- Domouhtsidou, G.P., Dimitriadis, V.K., 2001. Lysosomal and lipid alterations in the digestive gland of mussels, *Mytilus galloprovincialis* (L.) as biomarkers of environmental stress. *Environmental Pollution* 115, 123-137.
- Evans, C.J., Aguilera, R.J., 2003. DNase II: genes, enzymes and function. *Gene* 322, 1-15.
- Fafandjel, M., Bihari, N., Smodlaka, M., Ravlić, S., 2008. Hemocytes/coelomocytes DNA content in five marine invertebrates: Cell cycles and genome sizes. *Biologia* 63, 730-736.
- Fafandjel, M., Ravlić, S., Smodlaka, M., Bihari, N., 2010. Deoxyribonucleases (DNases) in the cortex and endosome from the marine sponge *Tethya aurantium*. *Russian Journal of Marine Biology* 36, 383-389.
- Farquhar, M.G., Palade, G.E., 1981. The Golgi apparatus (complex)-(1954-1981)-from artifact to center stage. *The Journal of Cell Biology* 91, 77-103.
- Fields, P.A., Zuzow, M.J., Tomanek, L., 2012. Proteomic responses of blue mussel (*Mytilus*) congeners to temperature acclimation. *The Journal of Experimental Biology* 215, 1106-1116.

- Gabbott, P.A., 1983. Developmental and seasonal metabolic activities in marine molluscs. *The Mollusca: Their Ecology and Physiology* 2, 165-217.
- Giarratano, E., Gil, M.N., Malanga, G., 2011. Seasonal and pollution-induced variations in biomarkers of transplanted mussels within the Beagle Channel. *Marine Pollution Bulletin* 62, 1337-1344.
- Gieselmann, V., Hasilik, A., von Figura, K., 1985. Processing of human cathepsin D in lysosomes *in vitro*. *The Journal of Biological Chemistry* 260, 3215-3220.
- Glaumann, H., Ahlberg, J., Berkenstam, A., Henell, F., 1986. Rapid isolation of rat liver secondary lysosomes--autophagic vacuoles--following chloroquine administration. *Experimental Cell Research* 163, 151-158
- Gösling, E.G., 1992. *The Mussel Mytilus: Ecology, Physiology, Genetics, and Culture*. Elsevier.
- Griffiths, C.L., Griffiths, R. J., 1987. *Bivalvia*. In: Pandian. Academic Press, New York.
- Hagger, J.A., Jones, M.B., Lowe, D., Leonard, D.R., Owen, R., Galloway, T.S., 2008. Application of biomarkers for improving risk assessments of chemicals under the Water Framework Directive: a case study. *Marine Pollution Bulletin* 56, 1111-1118.
- Hair, J.F.J.R., Anderson, R.E., Tatham, R.L., Black, W.C., 1995. *Multivariate Data Analysis (with Readings)*, Forth Edition, Prentice – Hall International, USA
- Hankard, P.K., Svendsen, C., Wright, J., Wienberg, C., Fishwick, S.K., Spurgeon, D.J., Weeks, J.M., 2004. Biological assessment of contaminated land using earthworm biomarkers in support of chemical analysis. *The Science of The Total Environment* 330, 9-20.
- Harosh, I., Binninger, D.M., Harris, P.V., Mezzina, M., Boyd, J.B., 1991. Mechanism of action of deoxyribonuclease II from human lymphoblasts. *European Journal of Biochemistry* 202, 479-484.
- Hasilik, A., Neufeld, E.F., 1980. Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts. Phosphorylation of mannose residues. *The Journal of Biological Chemistry* 255, 4946-4950.
- Hevelone, J., Hartman, P.S., 1988. An endonuclease from *Caenorhabditis elegans*: Partial purification and characterization. *Biochemical Genetics* 26, 447-461.
- Holland, D.L., 1978. Lipid reserves and energy metabolism in the larvae of benthic marine invertebrates., in: D.C. Malins, Sargent, J. R. (Ed.), *Biochemical and Biophysical Perspectives in Marine Biology*. Academic Press, New York.
- Holtzman, E., 1989. *Lysosomes: A Survey (Cell Biology Monographs) Continuation of Protoplasmatologia, Vol. 3. XI, 298 S., 56 Abb.* Wien–New York.
- Hrs - Brenko, M., 1971. The reproductive cycle of the *Mytilus galloprovincialis* Lamk in the Northern Adriatic Sea and *Mytilus edulis* L. at Long Island Sound. *Thalassia Jugoslavica*. 7:533-542.
- Huang, R.T., Liao, T.H., Lu, S.C., 2009. Proteolytic processing of porcine deoxyribonuclease II occurs in lysosomes but is not required for enzyme activation. *The FEBS Journal* 276, 1891-1899.
- Huotari, J., Helenius, A., 2011. Endosome maturation. *The EMBO Journal* 30, 3481-3500.
- Hwang, H.M., Stanton, B., McBride, T., Anderson, M.J., 2014. Polycyclic aromatic hydrocarbon body residues and lysosomal membrane destabilization in mussels exposed to

- the Dubai Star bunker fuel oil (intermediate fuel oil 380) spill in San Francisco Bay. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 33(5):1117-21
- Hylland, K., Tollefsen, K.-E., Ruus, A., Jonsson, G., Sundt, R.C., Sanni, S., Røe Utvik, T.I., Johnsen, S., Nilssen, I., Pinturier, L., Balk, L., Baršienė, J., Marigómez, I., Feist, S.W., Børseth, J.F., 2008. Water column monitoring near oil installations in the North Sea 2001–2004. *Marine Pollution Bulletin* 56, 414-429.
- Izagirre, U., Marigomez, I., 2009. Lysosomal enlargement and lysosomal membrane destabilisation in mussel digestive cells measured by an integrative index. *Environmental Pollution* 157, 1544-1553.
- Izagirre, U., Errasti, A., Bilbao, E., Múgica, M., Marigómez, I., 2014. Combined effects of thermal stress and Cd on lysosomal biomarkers and transcription of genes encoding lysosomal enzymes and HSP70 in mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology* 149, 145-156.
- Jørgensen, C.B., 1990. Bivalve Filter Feeding: Hydrodynamics, Bioenergetics, Physiology and Ecology. Olsen & Olsen.
- Kirchin, M.A., Moore, M.N., Dean, R.T., Winston, G.W., 1992. The role of oxyradicals in intracellular proteolysis and toxicity in mussels. *Marine Environmental Research* 34, 315-320.
- Klionsky, D.J., Emr, S.D., 2000. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science (New York, N.Y.)* 290, 1717-1721.
- Koukouzika, N., Raftopoulou, E.K., Dimitriadis, V.K., 2009. Seasonal differences of lysosomal, lipid and lipofuscin parameters in the digestive gland of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Molluscan Studies*. 75 (3): 261-267.
- Krieser, R.J., MacLea, K.S., Park, J.P., Eastman, A., 2001. The cloning, genomic structure, localization, and expression of human deoxyribonuclease II β . *Gene* 269, 205-216.
- Krishnakumar, P.K., Casillas, E., Varanasi, U., 1995. Effects of chemical contaminants on the health of *Mytilus edulis* from Puget Sound, Washington. II. Cytochemical detection of subcellular changes in digestive cells. *Marine Biology* 124, 251-259.
- Kurz, T., Terman, A., Gustafsson, B., Brunk, U.T., 2008. Lysosomes and oxidative stress in aging and apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1780, 1291-1303.
- Lacks, S.A., 1981. Deoxyribonuclease I in mammalian tissues. Specificity of inhibition by actin. *The Journal of Biological Chemistry* 256, 2644-2648.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Larsen, P.S., Riisgård, H.U., 2009. Viscosity and not biological mechanisms often controls the effects of temperature on ciliary activity and swimming velocity of small aquatic organisms. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 381, 67-73.
- Leiniö, S., Lehtonen, K.K., 2005. Seasonal variability in biomarkers in the bivalves *Mytilus edulis* and *Macoma balthica* from the northern Baltic Sea. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 140, 408-421.
- Lekube, X., Izagirre, U., Soto, M., Marigómez, I., 2014. Lysosomal and tissue-level biomarkers in mussels cross-transplanted among four estuaries with different pollution levels. *Science of The Total Environment* 472, 36-48.

- Liao, T.H., 1985. The subunit structure and active site sequence of porcine spleen deoxyribonuclease. *The Journal of Biological Chemistry* 260, 10708-10713.
- Livingstone, D.R., 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin* 42, 656-666.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.
- Lyon, C.J., Evans, C.J., Bill, B.R., Otsuka, A.J., Aguilera, R.J., 2000. The *C. elegans* apoptotic nuclease NUC-1 is related in sequence and activity to mammalian DNase II. *Gene* 252, 147-154.
- Mach, L., Stuwe, K., Hagen, A., Ballaun, C., Glossl, J., 1992. Proteolytic processing and glycosylation of cathepsin B. The role of the primary structure of the latent precursor and of the carbohydrate moiety for cell-type-specific molecular forms of the enzyme. *The Biochemical Journal* 282 (Pt 2), 577-582.
- MacLea, K.S., Krieser, R.J., Eastman, A., 2002. Revised structure of the active form of human deoxyribonuclease II alpha. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 292, 415-421.
- MacLea, K.S., Krieser, R.J., Eastman, A., 2003. Structural requirements of human DNase II alpha for formation of the active enzyme: the role of the signal peptide, N-glycosylation, and disulphide bridging. *Biochemical Journal*. 371, 867-876.
- Marić, D., Kraus, R., Godrijan, J., Supić, N., Djakovac, T., Precali, R., 2012. Phytoplankton response to climatic and anthropogenic influences in the north-eastern Adriatic during the last four decades. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 115, 98-112.
- Marigomez, I., Soto, M., Cancio, I., Orbea, A., Garmendia, L., Cajaraville, M.P., 2006. Cell and tissue biomarkers in mussel, and histopathology in hake and anchovy from Bay of Biscay after the Prestige oil spill (Monitoring Campaign 2003). *Marine Pollution Bulletin* 53, 287-304.
- McIlroy, D., Tanaka, M., Sakahira, H., Fukuyama, H., Suzuki, M., Yamamura, K.-i., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y., Nagata, S., 2000. An auxiliary mode of apoptotic DNA fragmentation provided by phagocytes. *Genes & Development* 14, 549-558.
- McVeigh, A., Allen, J.I., Moore, M.N., Dyke, P., Noble, D., 2004. A carbon and nitrogen flux model of mussel digestive gland epithelial cells and their simulated response to pollutants. *Marine Environmental Research* 58, 821-827.
- Menzorova, N.I., Rasskazov, V.A., 1999. Application of the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* embryo DNase test in the evaluation of marine water pollution by various toxicants. *Russian Journal of Marine Biology* 25, 60-64.
- Menzorova, N.I., Rasskazov, V.A., 2007. Application of different test systems and biochemical indicators for environmental monitoring of the Troitsa Bay, Sea of Japan. *Russian Journal of Marine Biology* 33, 118-124.
- Menzorova, N.I., Rasskazov, V.A., 2009. Evaluation of the ecological state of the Sea of Japan and the Sea of Okhotsk using the DNase test system. *Oceanology* 49, 824-832.
- Minier, C., Borghi, V.V., Moore, M.N., Porte, C., 2000. Seasonal variation of MXR and stress proteins in the common mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology* 50, 167-176.

- Moore, M.N., 1976. Cytochemical demonstration of latency of lysosomal hydrolases in digestive cells of the common mussel, *Mytilus edulis*, and changes induced by thermal stress. *Cell and Tissue Research* 175, 279-287.
- Moore, M.N., 1988. Cytochemical responses of the lysosomal system and NADPH-ferrihemoprotein reductase in molluscan digestive cells to environmental and experimental exposure to xenobiotics. *Marine Ecology Progress Series* 46 81-89.
- Moore, M.N., Allen, J.I., 2002. A computational model of the digestive gland epithelial cell of marine mussels and its simulated responses to oil-derived aromatic hydrocarbons. *Marine Environmental Research* 54, 579-584.
- Moore, M.N., Icarus Allen, J., McVeigh, A., 2006. Environmental prognostics: an integrated model supporting lysosomal stress responses as predictive biomarkers of animal health status. *Marine Environmental Research* 61, 278-304.
- Moore, M.N., Viarengo, A., Donkin, P., Hawkins, A.J., 2007. Autophagic and lysosomal reactions to stress in the hepatopancreas of blue mussels. *Aquatic Toxicology* 84, 80-91.
- Moschino, V., Delaney, E., Meneghetti, F., Ros, L., 2011. Biomonitoring approach with mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) and clam *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850) in the Lagoon of Venice. *Environmental Monitoring and Assessment* 177, 649-663.
- Múgica, M., Sokolova, I.M., Izagirre, U., Marigómez, I., 2015. Season-dependent effects of elevated temperature on stress biomarkers, energy metabolism and gamete development in mussels. *Marine Environmental Research* 103, 1-10.
- Murai, K., Yamanaka, M., Akagi, K., Anai, M., 1980. Purification and properties of deoxyribonuclease II from human urine. *Journal of Biochemistry* 87, 1097-1103.
- Nadano, D., Yasuda, T., Kishi, K., 1993. Measurement of deoxyribonuclease I activity in human tissues and body fluids by a single radial enzyme-diffusion method. *Clinical chemistry* 39, 448-452.
- Nahrgang, J., Brooks, S.J., Evenset, A., Camus, L., Jonsson, M., Smith, T.J., Lukina, J., Frantzen, M., Giarratano, E., Renaud, P.E., 2013. Seasonal variation in biomarkers in blue mussel (*Mytilus edulis*), Icelandic scallop (*Chlamys islandica*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*) — Implications for environmental monitoring in the Barents Sea. *Aquatic Toxicology* 127, 21-35.
- Nakajima, T., Yasuda, T., Takeshita, H., Mori, S., Mogi, K., Kaneko, Y., Nakazato, E., Kishi, K., 2002. Production and characterization of murine monoclonal anti-human DNase II antibodies, and their use for immunoaffinity purification of DNase II from human liver and urine. *Biochimica et Biophysica Acta* 1570, 160-164.
- Narbonne, J.F., Aarab, N., Clerandau, C., Daubeze, M., Narbonne, J., Champeau, O., Garrigues, P., 2005. Scale of classification based on biochemical markers in mussels: application to pollution monitoring in Mediterranean coasts and temporal trends. *Biomarkers: biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals* 10, 58-71.
- Nesto, N., Romano, S., Moschino, V., Mauri, M., Da Ros, L., 2007. Bioaccumulation and biomarker responses of trace metals and micro-organic pollutants in mussels and fish from the Lagoon of Venice, Italy. *Marine Pollution Bulletin* 55, 469-484.

- Nishimura, Y., Higaki, M., Kato, K., 1987. Identification of a precursor form of cathepsin D in microsomal lumen: Characterization of enzymatic activation and proteolytic processing in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 148, 335-343.
- Ohkouchi, S., Shibata, M., Sasaki, M., Koike, M., Safig, P., Peters, C., Nagata, S., Uchiyama, Y., 2013. Biogenesis and proteolytic processing of lysosomal DNase II. *PloS One* 8, e59148.
- Orbea, A., Ortiz-Zarragoitia, M., Solé, M., Porte, C., Cajaraville, M.P., 2002. Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalve molluscs, crabs and fish from the Urdaibai and Plentzia estuaries (Bay of Biscay). *Aquatic Toxicology* 58, 75-98.
- Øverbø, K., Myrnes, B., 2006. Deoxyribonuclease II from the Icelandic scallop (*Chlamys islandica*): isolation and partial characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry & Molecular Biology* 143, 315-318.
- Owen, G., 1970. The fine structure of the digestive tubules of the Marine Bivalve *Cardium edule*. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 258, 245-260.
- Owen, G., 1972. Lysosomes, peroxisomes and bivalves. *Science Progress* 60, 299-318.
- Perić, L. 2008. Deoksiribonukleaze u tkivima dagnje *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 te njihova aktivnost tijekom apoptoze. Doktorska disertacija, Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet
- Perić, L., Smodlaka Tanković, M., Ravlić, S., 2012. Evaluation of marine water quality along North-Eastern Adriatic coast based on lysosomal membrane stability in mussels *Mytilus galloprovincialis* Lam. - A long term study. Procjena kvalitete morske vode uzduž sjeveroistočne obale Jadrana korištenjem testa stabilnosti lizosomalne membrane u dagnjama *Mytilus galloprovincialis* Lam. - Dugoročna studija, *Acta Adriatica* 53(3), 457-466.
- Petrović, S., Semenčić, L., Ozretić, B., Ozretić, M., 2004. Seasonal variations of physiological and cellular biomarkers and their use in the biomonitoring of north Adriatic coastal waters (Croatia). *Marine Pollution Bulletin* 49, 713-720.
- Pisoni, M., Cogotzi, L., Frigeri, A., Corsi, I., Bonacci, S., Iacocca, A., Lancini, L., Mastrototaro, F., Focardi, S., Svelto, M., 2004. DNA adducts, benzo(a)pyrene monooxygenase activity, and lysosomal membrane stability in *Mytilus galloprovincialis* from different areas in Taranto coastal waters (Italy). *Environmental Research* 96, 163-175.
- Popov, A.P., Konichev, A.S., Tsvetkov, I.L., 2003. Effect of toxic industrial pollutants on the activity and isoforms of acid DNase in the freshwater snail *Viviparus viviparus* sL. *Applied Biochemistry and Microbiology* 39, 454-458.
- Power, A., Sheehan, D., 1996. Seasonal variation in the antioxidant defence systems of gill and digestive gland of the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 114, 99-103.
- Rasskazov, V.A., Pirozhnikova, V.V., Galkin, V.V., 1975. Some properties and specificity of deoxyribonucleases from marine invertebrates and fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 51, 343-347.
- Regoli, F., 1992. Lysosomal responses as a sensitive stress index in biomonitoring heavy metal pollution. *Marine Ecology Progress Series* 84, 63-69.

- Regoli, F., 1998. Trace metals and antioxidant enzymes in gills and digestive gland of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 34, 48-63.
- Regoli, F., 2000. Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress. *Aquatic Toxicology* 50, 351-361.
- Regoli, F., Frenzilli, G., Bocchetti, R., Annarumma, F., Scarcelli, V., Fattorini, D., Nigro, M., 2004. Time-course variations of oxyradical metabolism, DNA integrity and lysosomal stability in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment. *Aquatic Toxicology* 68, 167-178.
- Robert, T., Vanoli, F., Chiolo, I., Shubassi, G., Bernstein, K.A., Rothstein, R., Botrugno, O.A., Parazzoli, D., Oldani, A., Minucci, S., Foiani, M., 2011. HDACs link the DNA damage response, processing of double-strand breaks and autophagy. *Nature* 471, 74-79.
- Robledo, J.A.F., Santarém, M.M., González, P., Figueras, A., 1995. Seasonal variations in the biochemical composition of the serum of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. and its relationship to the reproductive cycle and parasitic load. *Aquaculture* 133, 311-322.
- Robledo, Y., Marigomez, I., Angulo, E., Cajaraville, M.P., 2006. Glycosylation and sorting pathways of lysosomal enzymes in mussel digestive cells. *Cell and Tissue Research* 324, 319-333.
- Rosenthal, A.L., Lacks, S.A., 1977. Nuclease detection in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 80, 76-90.
- Ruddock, L.W., Molinari, M., 2006. N-glycan processing in ER quality control. *Journal of Cell Science* 119, 4373-4380.
- Saftig, P., Klumperman, J., 2009. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 10, 623-635.
- Schafer, P., Cymerman, I.A., Bujnicki, J.M., Meiss, G., 2007. Human lysosomal DNase II alpha contains two requisite PLD-signature (HxK) motifs: evidence for a pseudodimeric structure of the active enzyme species. *Protein science: a publication of the Protein Society* 16, 82-91.
- Schmidt, W., Power, E., Quinn, B., 2013. Seasonal variations of biomarker responses in the marine blue mussel (*Mytilus sp.*). *Marine Pollution Bulletin* 74, 50-55.
- Seed, R., 1976. Ecology. In: Bayne, B.L. *Marine Mussels*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Seed, R., Suchanek, T.H., 1992. Population and community ecology of *Mytilus*, in: G. E. (Ed.), *The Mussel Mytilus: Ecology, Physiology, Genetics and Culture*, 87-169.
- Seong, C.-S., Varela-Ramirez, A., Aguilera, R.J., 2006. DNase II deficiency impairs innate immune function in *Drosophila*. *Cellular Immunology* 240, 5-13.
- Shastina, V.V., Menzorova, N.I., Sibirtsev, Y.T., Rasskazov, V.A., 2003. Purification and characteristics of Ca²⁺,Mg²⁺- and Ca²⁺,Mn²⁺-dependent and acid DNases from spermatozoa of the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *Biochemistry*. 68, 582-592.
- Shaw, J.P., Dondero, F., Moore, M.N., Negri, A., Dagnino, A., Readman, J.W., Lowe, D.R., Frickers, P.E., Beesley, A., Thain, J.E., Viarengo, A., 2011. Integration of biochemical,

- histochemical and toxicogenomic indices for the assessment of health status of mussels from the Tamar Estuary, U.K. *Marine Environmental Research* 72, 13-24.
- Sheehan, D., Power, A., 1999. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 123, 193-199.
- Shiomi, K., Midorikawa, S., Ishida, M., Nagashima, Y., Nagai, H., 2004. Plancitoxins, lethal factors from the crown-of-thorns starfish *Acanthaster planci*, are deoxyribonucleases II. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 44, 499-506.
- Solé, M., Porte, C., Albaigés, J., 1995. The use of biomarkers for assessing the effects of organic pollution in mussels. *Science of The Total Environment* 159, 147-153.
- Swenson, M.K., Hodes, M.E., 1969. The separation of the phosphodiesterase and deoxyribonuclease II activities of bovine spleen. *The Journal of Biological Chemistry* 244, 1803-1807.
- Takeshita, H., Yasuda, T., Iida, R., Nakajima, T., Hosomi, O., Nakashima, Y., Mori, S., Nomoto, H., Kishi, K., 1998. Identification of the three non-identical subunits constituting human deoxyribonuclease II. *FEBS Letters* 440, 239-242.
- Torriglia, A., Lepretre, C., Padron-Barthe, L., Chahory, S., Martin, E., 2008. Molecular mechanism of L-DNase II activation and function as a molecular switch in apoptosis. *Biochemical Pharmacology* 76, 1490-1502.
- Tsubota, Y., Yamanaka, M., Takagi, Y., 1974. Mode of action of acid deoxyribonucleases from human gastric mucosa and cervix uteri. *The Journal of Biological Chemistry* 249, 3890-3894.
- Venier, P., De Pittà, C., Pallavicini, A., Marsano, F., Varotto, L., Romualdi, C., Dondero, F., Viarengo, A., Lanfranchi, G., 2006. Development of mussel mRNA profiling: Can gene expression trends reveal coastal water pollution? *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 602, 121-134.
- Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Livingstone, D.R., 1991. Seasonal variations in the antioxidant defence systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 100, 187-190.
- Viarengo, A., Nott, J.A., 1993. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 104, 355-372.
- Viarengo, A., Lafaurie, M., Gabrielides, G.P., Fabbri, R., Marro, A., Romeo, M., 2000. Critical evaluation of an intercalibration exercise undertaken in the framework of the MED POL biomonitoring program. *Marine Environmental Research* 49, 1-18.
- Viarengo, A., Dondero, F., Pampanin, D.M., Fabbri, R., Poggi, E., Malizia, M., Bolognesi, C., Perrone, E., Gollo, E., Cossa, G.P., 2007. A biomonitoring study assessing the residual biological effects of pollution caused by the HAVEN wreck on marine organisms in the Ligurian Sea (Italy). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 53, 607-616.
- Wang, C.C., Lu, S.C., Chen, H.L., Liao, T.H., 1998. Porcine spleen deoxyribonuclease II. Covalent structure, cDNA sequence, molecular cloning, and gene expression. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 17192-17198.

Yamamoto, M., 1971. Purification and some properties of an acid deoxyribonuclease from testes of chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis* 228, 95-104.

Yasuda, T., Nadano, D., Sawazaki, K., Kishi, K., 1992. Genetic polymorphism of human deoxyribonuclease II (DNase II): low activity levels in urine and leukocytes are due to an autosomal recessive allele. *Annals of Human Genetics* 56, 1-10.

Zhang, Z., Li, X., Vandeppeer, M., Zhao, W., 2006. Effects of water temperature and air exposure on the lysosomal membrane stability of hemocytes in pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 256, 502-509.

Zorita, I., Apraiz, I., Ortiz-Zarragoitia, M., Orbea, A., Cancio, I., Soto, M., Marigomez, I., Cajaraville, M.P., 2007. Assessment of biological effects of environmental pollution along the NW Mediterranean Sea using mussels as sentinel organisms. *Environmental Pollution* 148, 236-250.

PRILOG

Tablica 4. Srednje vrijednosti i standardna devijacija aktivnosti kisele DNaze u proteinskim ekstraktima probavne žlijezde (PŽ) i škrge (Š) dagnje od kolovoza (VIII) 2012. do kolovoza (VIIIa) 2013. godine na postaji Sv. Ivan i ACI Marina. Statistički značajna razlika (* $p < 0,05$) između postaja izračunata je Mann Whitney testom.

Tkivo	Vrijeme (mjeseci)	Specifična aktivnost DNaza F mg-1 min-1					
		Sv. Ivan			ACI		
			±			±	
Probavna žlijezda	VIII	33,43	±	4,78	27,16	±	7,32 *
	IX	39,92	±	3,46	39,20	±	5,88
	X	47,21	±	4,01	43,81	±	4,48
	XI	27,50	±	3,03	31,37	±	4,78 *
	XII	32,58	±	5,77	30,01	±	8,96
	I	31,09	±	3,22	28,52	±	4,83
	II	39,69	±	4,26	38,36	±	3,07
	III	45,67	±	4,11	38,74	±	6,04 *
	IV	44,65	±	2,85	38,58	±	4,22 *
	V	42,06	±	6,28	36,07	±	6,13 *
	VI	44,26	±	9,57	43,56	±	3,45
	VII	59,81	±	2,94	55,35	±	3,14 *
VIII	40,99	±	5,14	38,59	±	3,93	
Škrge	VIII	31,94	±	3,65	30,80	±	7,69
	IX	44,34	±	2,02	36,14	±	4,96 *
	X	39,47	±	5,94	39,33	±	4,81
	XI	40,60	±	5,16	40,85	±	4,53
	XII	46,50	±	8,80	43,61	±	4,87
	I	45,27	±	2,42	40,29	±	3,26 *
	II	42,88	±	1,82	41,79	±	4,18
	III	42,69	±	1,91	38,21	±	3,10 *
	IV	36,37	±	3,86	38,18	±	3,52
	V	33,75	±	5,78	28,92	±	4,89 *
	VI	30,02	±	2,39	26,68	±	2,02 *
	VII	31,29	±	2,88	24,32	±	9,27
VIII	29,78	±	6,04	32,41	±	3,84	

Tablica 5. Sumarni rezultati statistički značajne analize aktivnosti kisele DNaze u proteinskim ekstraktima (*) probavne žlijezde (PŽ) i (+) škrga (Š) dagnje od kolovoza (VIII) 2012. do kolovoza 2013. godine na postaji Sv. Ivan tijekom godine izračunati su višestrukom usporedbom srednje vrijednosti za sve skupine, Kruskal - Wallis testom na razini značajnosti $p < 0,05$.

Vrijeme (mjeseci)	VIII	IX	X	XI	XII	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
VIII			*									*	PŽ
IX	+											*	
X				*	*	*							
XI								*	*	*	*	*	
XII	+							*				*	
I	+							*	*		*	*	
II	+											*	
III													
IV													
V						+							
VI		+		+	+	+	+	+					
VII		+			+	+	+	+					
VIII	Š	+			+	+	+	+					

Tablica 6. Sumarni rezultati statističke analize aktivnosti kisele DNaze u proteinskim ekstraktima (*) probavne žlijezde (PŽ) i (+) škrga (Š) dagnje od kolovoza (VIII) 2012. do kolovoza 2013. godine na postaji ACI Marina (ACI) tijekom godine izračunati su višestrukom usporedbom srednje vrijednosti za sve skupine, Kruskal - Wallis testom na razini značajnosti $p < 0,05$.

Vrijeme (mjeseci)	VIII	IX	X	XI	XII	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
VIII			*								*	*	PŽ
IX													
X				*	*	*							
XI											*	*	
XII	+										*	*	
I													
II	+												
III													
IV													
V				+	+		+						
VI			+	+	+	+	+						
VII			+	+	+	+	+						
VIII	Š				+								

Tablica 7. Srednje vrijednosti i standardna devijacija stabilnosti lizosomalnih membrana u probavnim žlijezdama dagnje od kolovoza (VIII) 2012. do kolovoza 2013. godine na postaji Sv. Ivan i ACI Marina (ACI). Statistički značajna razlika (* $p < 0,05$) između postaja izračunata je Mann Whitney testom.

Vrijeme (mjeseci)	Labilizacijski period (minuta)					
	Sv. Ivan			ACI		
VIII	7	±	2	7	±	6
IX	6	±	3	5	±	1
X	21	±	6	8	±	10 *
XI	18	±	6	16	±	10
XII	25	±	7	13	±	3 *
I	26	±	6	21	±	9
II	22	±	6	15	±	7
III	30	±	5	6	±	4 *
IV	16	±	9	12	±	5
V	17	±	2	2	±	0 *
VI	9	±	7	4	±	2
VII	6	±	3	6	±	5
VIII	5	±	2	7	±	6

Tablica 8. Sumarni rezultati statističke analize stabilnosti lizosomalnih membrana u probavnoj žlijezdi dagnje od kolovoza (VIII) 2012. do kolovoza 2013. godine na postajama Sv. Ivan i ACI Marina tijekom godine izračunata je višestrukom usporedbom srednje vrijednosti za sve skupine, Kruskal - Wallis testom, na razini značajnosti $p < 0,05$ (*).

Vrijeme (mjeseci)	VIII	IX	X	XI	XII	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
	VIII								*				
IX								*					
X													
XI													
XII													
I													
II													
III											*	*	*
IV													
V					*	*	*						
VI													
VII													
VIII	ACI												

Tablica 9. Srednje vrijednosti i standardna devijacija lipofuscina u probavnim žlijezdama dagnje od kolovoza (VIII) 2012. do kolovoza 2013. godine na postaji Sv. Ivan i ACI Marina. Statistički značajna razlika (* p < 0,05) između postaja izračunata je Mann Whitney testom.

Vrijeme (mjeseci)	Nakupljanje lipofuscina (gustoća piksela)					
	Sv. Ivan			ACI		
VIII	0,07	±	0,04	0,11	±	0,05
IX	0,13	±	0,06	0,30	±	0,08
X	0,26	±	0,06	0,23	±	0,05
XI	0,12	±	0,04	0,18	±	0,06 *
XII	0,16	±	0,06	0,15	±	0,03
I	0,15	±	0,04	0,35	±	0,04 *
II	0,01	±	0,01	0,21	±	0,05 *
III	0,19	±	0,06	0,10	±	0,03 *
IV	0,01	±	0,00	0,25	±	0,06 *
V	0,00	±	0,00	0,13	±	0,03 *
VI	0,03	±	0,01	0,04	±	0,01
VII	0,01	±	0,01	0,05	±	0,02 *
VIII	0,07	±	0,05	0,10	±	0,03

Tablica 10. Sumarni rezultati statističke analize količine lipofuscina u probavnoj žlijezdi dagnje od kolovoza (VIII) 2012. do kolovoza 2013. godine na postajama Sv. Ivan i ACI Marina tijekom godine izračunata je višestrukom usporedbom srednje vrijednosti za sve skupine, Kruskal - Wallis testom na razini značajnosti p < 0,05 (*).

Vrijeme (mjeseci)	VIII	IX	X	XI	XII	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
VIII													Sv. Ivan
IX													
X							*		*	*		*	
XI													
XII										*			
I										*			
II													
III						*				*			
IV													
V													
VI		*				*							
VII		*				*							
VIII	ACI												

Tablica 11. Srednje vrijednosti i standardna devijacija nakupljenih neutralnih masti u probavnim žlijezdama dagnje od kolovoza (VIII) 2012. do kolovoza 2013. godine na postaji Sv. Ivan i ACI Marina. Statistički značajna razlika (* $p < 0,05$) između postaja izračunata je Mann Whitney testom.

Vrijeme (mjeseci)	Nakupljanje neutralnih masti (gustoća piksela)					
	Sv. Ivan			ACI		
VIII	0,15	±	0,03	0,17	±	0,03
IX	0,21	±	0,04	0,17	±	0,03
X	0,15	±	0,03	0,34	±	0,06 *
XI	0,15	±	0,04	0,18	±	0,03
XII	0,24	±	0,05	0,20	±	0,04
I	0,19	±	0,04	0,29	±	0,04
II	0,07	±	0,02	0,10	±	0,02
III	0,10	±	0,02	0,17	±	0,04
IV	0,06	±	0,03	0,14	±	0,03 *
V	0,02	±	0,01	0,18	±	0,03 *
VI	0,05	±	0,02	0,10	±	0,03 *
VII	0,04	±	0,02	0,16	±	0,03 *
VIII	0,18	±	0,04	0,19	±	0,03

Tablica 12. Sumarni rezultati statističke analize neutralnih masti u probavnoj žlijezdi dagnje od kolovoza (VIII) 2012. do kolovoza 2013. godine na postajama Sv. Ivan i ACI Marina tijekom godine izračunata je višestrukom usporedbom srednje vrijednosti za sve skupine, Kruskal - Wallis testom na razini značajnosti $p < 0,05$ (*).

Vrijeme (mjeseci)	VIII	IX	X	XI	XII	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
VIII													Sv. Ivan
IX										*			
X													
XI													
XII										*		*	
I										*			
II			*							*			
III													
IV													
V													
VI			*										
VII													
VIII	ACI												

Tablica 13. PC točke glavnih komponenata lizosomalnih parametara dagnje uzorkovanih na postajama Sv. Ivan i ACI Marina (ACI) od kolovoza 2012 (VIII) do kolovoza 2013 godine (VIIIa).

Postaja-Vrijeme	PC točka 1	PC točka 2
Sv. Ivan-VIII	-0,122	-0,402
Sv. Ivan-IX	0,151	-1,060
Sv. Ivan-X	0,479	0,726
Sv. Ivan-XI	0,980	0,974
Sv. Ivan-XII	1,620	0,795
Sv. Ivan-I	1,290	1,160
Sv. Ivan-II	-1,260	1,500
Sv. Ivan-III	-0,150	1,600
Sv. Ivan-IV	-1,810	1,060
Sv. Ivan-V	-2,050	1,470
Sv. Ivan-VI	-1,860	0,319
Sv. Ivan-VII	-3,020	-0,336
Sv. Ivan-VIIIa	-0,568	-1,130
ACI-VIII	0,787	-0,373
ACI-IX	0,885	-1,150
ACI-X	1,560	-1,490
ACI-XI	1,210	0,527
ACI-XII	1,230	0,165
ACI-I	3,280	0,334
ACI-II	0,150	0,753
ACI-III	-0,241	-0,824
ACI-IV	0,665	0,185
ACI-V	-0,103	-2,080
ACI-VI	-1,620	-0,950
ACI-VII	-1,510	-1,040
ACI-VIIIa	0,012	-0,746

Tablica 14. Svojstvene vrijednosti, postotak varijacije i kumulativne varijacije kojeg opisuju osi glavnih komponenata u ordinaciji lizosomalnih parametara dagnje uzorkovanih na postajama Sv. Ivan i ACI Marina od kolovoza 2012 (VIII) do kolovoza 2013 godine (VIIIa).

Glavna komponenta	svojstvena vrijednost	% varijacije	% kum. varijacije
1	2,02	50,40	50,40
2	1,06	26,60	77,00
3	0,66	16,50	93,50
4	0,26	6,50	100,00

Tablica 15. Koefficijenti svojstvenih vektora koji čine linearnu kombinaciju varijabli osi glavnih komponenata (PC) u ordinaciji lizosomalnih parametara dagnji uzorkovanim na postajama Sv. Ivan i ACI Marina od kolovoza 2012 (VIII) do kolovoza 2013 godine (VIIIa).

Varijabla	PC 1	PC 2	PC 3	PC 4
SLM	0,218	0,894	-0,194	0,34
LF	0,589	-0,048	-0,566	-0,575
NM	0,583	-0,419	-0,061	0,693
Δ F Pž	-0,515	-0,151	-0,799	0,271

ŽIVOTOPIS

Ines Kovačić je rođena 19.05.1981. u Pakracu, Hrvatska. Osnovnu školu završila je u Lipiku. 1995 upisuje Opću gimnaziju u Pakracu, a 1999. godine upisuje studij biologije, smjer Ekologija, na Biološkom odsjeku Prirodoslovno – matematičkog fakultetu u Zagrebu. Tijekom apsolvantske godine upisuje smjer prof. biologije, također na Biološkom odsjeku Prirodoslovno – matematičkog fakultetu u Zagrebu. Diplomirala je 2005. godine u svibnju smjer – Ekologija, a u rujnu smjer – prof. biologije s diplomskim radom "Ozoniranje u pripremi pitke vode" pod vodstvom prof. dr. sc. Stilinovića na Prirodoslovno – matematičkom fakultetu, Laboratorij za mikrobiologiju, u Zagrebu.

Od listopada 2005. do lipnja 2009. zaposlena je u Srednjoj školi Pakrac. Nakon preseljenja u Pulu, zaposlena je na Sveučilištu Jurja Dobrile u Puli kao asistent na Sveučilišnom preddiplomskom studiju Znanost o moru, te kao vanjski suradnik u Laboratoriju za morsku ekotoksikologiju, Centra za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković u Rovinju, gdje je pod vodstvom mentorice izv. prof. dr. sc. Maje Fafandel izradila doktorsku disertaciju.

Aktivno je radila na nacionalnom projektu. Autor je 1 znanstvenog rada, te jednog priopćenja s nacionalnim i dva međunarodna znanstvena skupa. Stručno se usavršavala na brojnim međunarodnim i nacionalnim radionicama. Organizator je i predstavnik Sveučilišta u Puli na Festivalu znanosti koji se održava u Hrvatskoj.

ORIGINALNI ZNANSTVENI RAD KOJI CITIRA CURRENT CONTENTS

1. Kovačić I., Fafandel, M. and Bihari N.

“Lysosomal acid DNase in mussel *Mytilus galloprovincialis*: characterization and seasonality”, Marine Biology Research

**RADOVI U ZBORNICIMA SKUPOVA I ZBORNICMA SKUPOVA S MEĐUNARODNOM
RECENZIJOM**

1. Kovačić I., Fafandžel M.

Acid DNase activity in mussel *Mytilus galloprovincialis*: Temporal variations and pollution effect , *39th CIESM Conference*, Marseille, Francuska, 2013

2. Batel I, Fafandžel M, Perić L, Kovačić I

DNase activity as a new biomarker for marine environmental contamination: field study , *40th CIESM Conference* , Venice, Italija, 2010

3. Kovačić I, Fafandžel M, Perić L

Tissue-specific response of acid DNase activity in mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to mixture of pollutants in sea-water organic extracts *CROTOX*, Primošten, Hrvatska, 2012

STRUČNO USAVRŠAVANJE

1. Summer School of the BIOMINTEC Marie Curie Initial Training Network, Rovinj, Hrvatska, 16 – 21 kolovoz 22, 2009
2. Joint Workshop/MC Meeting of COST Action TD0903: ‘‘Understanding and manipulating enzymatic and proteomic processes in biomineralization’’, Pula, Hrvatska, 20-22 svibanj, 2010
3. Methodological courses in biology and medicine "DNA" and "RNA" Zagreb, Hrvatska, 22 – 26 listopad 2010
4. Summer School of the BIOMINTEC Marie Curie Initial Training Network, Rovinj, Hrvatska, 15 – 21 kolovoz 22, 2010
5. International Graduate School of Conservation Biology, Rovinj, Hrvatska, 23 lipanj – 1 srpanj 2012

6. Joint Workshop/MC Meeting of COST Action FA 1004: ‘‘Conservation Physiology of Marine Fishes’’, Pula, Hrvatska, 24-26 rujana, 2012
7. InnoMol Workshop: ‘‘Bioimaging’’ Ruđer Bošković Institute, Zagreb, Hrvatska, 20-22. listopada, 2014.
8. Program praćenja stanja Jadranskog mora uspostava sustava praćenja i promatranja za stalnu procjenu stanja Jadranskog mora, Rovinj, Hrvatska, 3. – 7. lipnja 2013
9. Međunarodna radionica za doktorske studije i programe Sveučilišta u Zagrebu: ‘‘How to publish your article in a research journal?’’ Zagreb, Hrvatska, 06. – 10. listopada, 2014.