



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Nesrete Krasnići

**RASPODJELA ODABRANIH METALA
MEĐU CITOSOLSKIM BIOMOLEKULAMA
ŠKRGGA I JETRE KLENOVA (*Squalius
cephalus* (Linnaeus) i *Squalius vardarensis*
Karaman; Actinopterygii, Cyprinidae) IZ
RIJEKA ONEČIŠĆENIH METALIMA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2019.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
DIVISION OF BIOLOGY

Nesrete Krasnići

**DISTRIBUTION OF SELECTED METALS
AMONG CYTOSOLIC BIOMOLECULES
IN GILLS AND LIVER OF CHUB
(*Squalius cephalus* (Linnaeus) and
Squalius vardarensis Karaman;
Actinopterygii, Cyprinidae) FROM
METAL CONTAMINATED NATURAL
WATERS**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2019

Ovaj je doktorski rad izrađen u Laboratoriju za biološke učinke metala Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu pod vodstvom dr. sc. Zrinke Dragun, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

INFORMACIJE O MENTORU

Dr. sc. Zrinka Dragun rođena je 6. lipnja 1971. godine u Vinkovcima, gdje je završila osnovnoškolsko te srednjoškolsko obrazovanje, matematičko-informatičkog smjera. Na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu diplomirala je 1996. godine te stekla zvanje dipl. inž. medicinske biokemije. Magistrirala je 2001. godine na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (grana toksikologija) te doktorirala 2006. godine na istome fakultetu. Zaposlena je na mjestu više znanstvene suradnice na Institutu „Ruđer Bošković“ u Zagrebu, gdje radi od 2002. godine. Godine 2018. stekla je zvanje znanstvene savjetnice u znanstvenom području prirodnih znanosti (polje interdisciplinarne prirodne znanosti). Autor je i suautor brojnih znanstvenih i stručnih radova te priopćenja na znanstvenim skupovima, kao i voditelj nekoliko znanstvenih projekata te studentskih radova.

ZAHVALE

Najljepša hvala mojoj mentorici dr. sc. Zrinki Dragun na pomoći, usmjeravanju, te vrijednim savjetima tijekom izrade rada.

Veliko hvala svim članicama Laboratorija za biološke učinke metala Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu na pruženoj prilici za izradu ovog doktorskog rada te prepoznavanju potrebe za daljnjim napredovanjem i usavršavanjem.

Veliko hvala dr. sc. Saši Kazaziću i dr. sc. Snježani Kazazić, kao i Hasanu Muharemoviću iz Laboratorija za spektrometriju masa i funkcionalnu proteomiku, što su me upoznali s čarima masene spektrometrije te omogućili provođenje eksperimentalnog dijela ovog doktorskog rada.

Hvala kolegama iz Sjeverne Makedonije, dr. sc. Vasilu Kostovu, prof. dr.sc. Maji Jordanovoj i dr. sc. Katerini Rebok na angažmanu oko prikupljanja uzoraka.

Zahvaljujem se članovima Laboratorija za anorgansku geokemiju okoliša i kemodinamiku nanočestica, a posebno dr. sc. Nevenki Mikac, što su mi omogućili mjerenje metala na HR ICP-MS-u.

Zahvaljujem također svim kolegama i prijateljima koji su izradu ovog doktorskog rada učinili malo lakšim i zabavnijim. Puno hvala Tanji na pomoći i savjetima tijekom pisanja rada.

Najveće hvala mojoj obitelji i roditeljima koji su uvijek bili uz mene, pružali mi bezrezervnu ljubav i podršku te me dodatno ohrabivali i motivirali.

**RASPODJELA ODABRANIH METALA MEĐU CITOSOLSKIM
BIOMOLEKULAMA ŠKRGGA I JETRE KLENOVA (*Squalius cephalus* (Linnaeus) i
Squalius vardarensis Karaman; Actinopterygii, Cyprinidae) IZ RIJEKA
ONEČIŠĆENIH METALIMA**

NESRETE KRASNIĆI

Institut Ruđer Bošković, Zagreb

Citosolske raspodjele nekoliko odabranih elemenata (Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Pb, Se i Zn) u jetrima i škragama dvaju slatkovodnih bioindikatorskih organizama, klena (*Squalius cephalus*) iz rijeke Sutle u Hrvatskoj i vardarskog klena (*Squalius vardarensis*) iz triju rijeka sjeveroistočne Sjeverne Makedonije, izučavane su primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s isključenjem po veličini (SEC-HPLC) i spektrometrije masa visoke rezolucije s induktivno spregnutom plazmom (HR ICP-MS). Određene su raspodjele metala/nemetala među citosolskim biomolekulama različitih molekulskih masa svojstvene uvjetima niske izloženosti metalima u riječnoj vodi, kao i promjene u raspodjelama koje su javljaju kao posljedica povišenih razina izloženosti. Primjena anionsko izmjenjivačke kromatografije (AEC-HPLC) kao drugog stupnja razdvajanja i pročišćavanja citosolskih biomolekula te dviju tehnika spektrometrije masa (MALDI-TOF-MS i LC-MS/MS) omogućila je identifikaciju ili precizno određivanje molekulskih masa nekoliko citosolskih biomolekula koje vežu metale u jetrima i škragama vardarskog klena, poput izoformi metalotioneina koje vežu Cd, Cu i Zn, hemoglobinskih podjedinica koje vežu Fe te toplinski stabilnih biomolekula koje vežu Mo. Primijenjeni analitički pristup pokazao se korisnim u istraživanju unutarstanične sudbine i ponašanja metala u organima riba te otkrivanju potencijalnih novih biomarkera izloženosti i učinaka metala.

(190 stranica, 34 slike, 17 tablica, 340 literaturna navoda, jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: klen, vardarski klen, metali, citosolske biomolekule, kromatografija, spektrometrija masa

Mentor: dr. sc. Zrinka Dragun, viša znanstvena suradnica

Ocjenjivači: dr. sc. Dušica Ivanković, viša znanstvena suradnica

dr. sc. Saša Kazazić, viši znanstveni suradnik

izv. prof. dr. sc. Renata Matonićkin Kepčija

Rad je prihvaćen: 11. rujna 2019. godine

DISTRIBUTION OF SELECTED METALS AMONG CYTOSOLIC BIOMOLECULES IN GILLS AND LIVER OF CHUB (*Squalius cephalus* (Linnaeus) and *Squalius vardarensis* Karaman; Actinopterygii, Cyprinidae) FROM METAL CONTAMINATED NATURAL WATERS

NESRETE KRASNIĆI

Ruđer Bošković Institute, Zagreb

The cytosolic distributions of several selected elements (Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Pb, Se, and Zn) in the liver and gills of two freshwater bioindicators, European chub (*Squalius cephalus*) from the Sutla River in Croatia and Vardar chub (*Squalius vardarensis*) from three rivers of north-eastern Macedonia, were studied using size-exclusion high performance liquid chromatography (SEC-HPLC) and high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry (HR ICP-MS). Distributions of metals/non-metal among the biomolecules of different molecular masses which are characteristic for low metal exposure in the river water were determined, as well as the changes in distribution which occur as a consequence of increased exposure to metals. The use of anion-exchange high performance liquid chromatography (AEC-HPLC) as the second step of separation and purification of cytosolic biomolecules, as well as the use of two mass spectrometry techniques (MALDI-TOF-MS and LC-MS/MS) have enabled the identification or exact determination of molecular masses of several cytosolic biomolecules that bind metals in the liver and gills of Vardar chub, such as the metallothionein isoforms that bind Cd, Cu and Zn, the hemoglobin subunits that bind Fe and heat stable biomolecules that bind Mo. Applied analytical approach has proven to be useful in the study of intracellular fate and behavior of metals in organs of fish, as well as in the process of discovery of potential new biomarkers of metal exposure and effects.

(190 pages, 34 figures, 17 tables, 340 references, original in Croatian)

Keywords: European chub, Vardar chub, metals, cytosolic biomolecules, chromatography, mass spectrometry

Supervisor: Zrinka Dragun, PhD, Senior Research Associate

Reviewers: Dušica Ivanković, PhD, Senior Research Associate
Saša Kazazić, PhD, Senior Research Associate
Renata Matoničkin Kepčija, PhD, Associate Professor

Thesis accepted: September 11th 2019

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Ciljevi rada.....	4
1.2. Hipoteze	5
2. LITERATURNI PREGLED.....	6
2.1. Metali u slatkovodnim sustavima	7
2.1.1. Rijeka Sutla	9
2.1.2. Rijeke sjeveroistočne Sjeverne Makedonije.....	11
2.1.2.1. Rijeka Bregalnica.....	12
2.1.2.2. Zletovska Reka	12
2.1.2.3. Kriva Reka	13
2.2. Metali u vodenim organizmima	14
2.3. Bioindikatori	16
2.3.1. Klen (<i>Squalius cephalus</i> L., 1758)	17
2.3.2. Vardarski klen (<i>Squalius vardarensis</i> Karaman, 1928.....	18
2.3.3. Ciljni organi za analizu metala	19
2.4. Metalomika	19
2.4.1. Analitičke metode za razdvajanje i pročišćavanje biomolekula na koje se vežu metali	22
2.4.1.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s isključenjem po veličini (SEC-HPLC).....	22
2.4.1.2. Ionsko izmjenjivačka tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (IEC-HPLC)	24
2.4.2. Analitičke metode za određivanje metala	25
2.4.3. Primjena spektrometrije masa (MS) za analizu biomolekula koje vežu metale	26
2.4.3.1. Matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem (MALDI)	28
2.4.3.2. Ionizacija elektroraspršenjem (ESI)	29
2.4.4. Metalomika u okolišnim istraživanjima	31
3. ZNANSTVENI RADOVI.....	35

4. RASPRAVA	91
4.1. Raspodjela odabranih esencijalnih (Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Se, Zn) i neesencijalnih (Cd, Pb) elemenata među citosolskim biomolekulama različitih molekulskih masa u jetrima i škrigama klena (<i>S. cephalus</i>) iz rijeke Sutle	92
4.2. Raspodjela esencijalnih (Co, Fe, Mn, Mo, Se, Cu i Zn) i neesencijalnog (Cd)elementa među citosolskim biomolekulama različitih molekulskih masa u jetrima i škrigama vardarskog klena (<i>S. vardarensis</i>) iz triju makedonskih rijeka	102
4.3. Karakterizacija i identifikacija odabranih citosolskih biomolekula u jetrima i škrigama vardarskog klena (<i>S. vardarensis</i>) primjenom dvodimenzionalne tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (SEC-AEC-HPLC) i dviju tehnika spektrometrije masa (MALDI-TOF-MS i LC-MS/MS).....	108
4.3.1. Biomolekule koje vežu Fe	110
4.3.2. Toplinski stabilne biomolekule koje vežu Cd, Cu i Zn	112
4.3.3. Toplinski stabilne biomolekule koje vežu Mo	116
5. ZAKLJUČCI.....	119
6. POPIS LITERATURE	124
7. PRILOZI	156
8. ŽIVOTOPIS	185

**U OVOJ DOKTORSKOJ DISERTACIJI OBJEDINJENI SU SLJEDEĆI
ZNAJSTVENI RADOVI:**

1. **Krasnići N**, Dragun Z, Erk M, Raspor B: Distribution of selected essential (Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Se, Zn) and nonessential (Cd, Pb) trace elements among protein fractions from hepatic cytosol of European chub (*Squalius cephalus* L.). Environmental Science and Pollution Research 20 (2013), 4: 2340-2351. doi:10.1007/s11356-012-1105-8
2. **Krasnići N**, Dragun Z, Erk M, Raspor B: Distribution of Co, Cu, Fe, Mn, Se, Zn and Cd among cytosolic proteins of different molecular masses in gills of European chub (*Squalius cephalus* L.). Environmental Science and Pollution Research 21 (2014), 23: 13512-13521. doi:10.1007/s11356-014-3274-0
3. **Krasnići N**, Dragun Z, Erk M, Ramani S, Jordanova M, Rebok K, Kostov V: Size-exclusion HPLC analysis of trace element distributions in hepatic and gill cytosol of Vardar chub (*Squalius vardarensis* Karaman) from mining impacted rivers in north-eastern Macedonia. Science of the Total Environment 613/614 (2018): 1055-1068. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.09.160
4. **Krasnići N**, Dragun Z, Kazazić S, Muharemović H, Erk M, Jordanova M, Rebok K, Kostov V: Characterization and identification of selected metal-binding biomolecules from hepatic and gill cytosols of Vardar chub (*Squalius vardarensis* Karaman, 1928) by various techniques of liquid chromatography and mass spectrometry. Metallomics 11 (2019), 1060-1078. doi:10.1039/C9MT00036D

UVOD

1. UVOD

Onečišćenje prirodnih voda metalima u porastu je zbog tehnološkog napretka ljudske zajednice, pri čemu industrija, rudarstvo, poljoprivreda, otpad iz domaćinstava i promet predstavljaju njegove najznačajnije izvore. Za razliku od organskih zagađivala, metali se ne mogu kemijski niti biološki razgraditi pa tako jednom uneseni u vodotoke mogu promijeniti kemijski oblik te postati manje ili više toksični, ali se iz biogeokemijskog kruženja ne mogu ukloniti (Sadiq, 1992.). Neki metali u vodenim organizmima imaju važnu biološku ulogu, sastavni su dio enzima i drugih složenih biomolekula, tzv. metaloproteina (Smith i sur., 1997.), te su prozvani esencijalnim metalima (npr., Cu, Fe i Zn). Metaloproteini su uključeni u niz procesa, poput transporta elektrona i metala, skladištenja kisika, hidrolize kemijskih veza, redoks procesa i sinteza bioloških spojeva (Gellein i sur., 2007.). Cijeli niz drugih metala nema poznatih uloga u živim organizmima te su stoga prozvani neesencijalnim metalima (npr., Cd i Pb). Uslijed unosa neesencijalnih metala, koji su toksični već u vrlo niskim koncentracijama, ili prekomjernog unosa esencijalnih metala, koji također mogu biti toksični kada su u organizmu prisutni u povišenim koncentracijama, u vodenim organizmima može doći do poremećaja homeostaze i razvoja toksičnih učinaka (Livingstone, 1993.). Nakon unosa, metali se raspodjeljuju po organima i stanicama vodenih organizama te naposljetku i po različitim unutarstaničnim odjeljcima, kao što su citosol, granule, organele i stanične membrane, a njihova toksičnost većinom nastaje uslijed reakcija u citosolu, odnosno nespecifičnog vezanja metala na fiziološki važne molekule i njihove posljedične inaktivacije (Mason i Jenkins, 1995.). Stoga se u istraživanjima izloženosti metalima i njihovih toksičnih učinaka u vodenim ekosustavima često koriste bioindikatorski organizmi. Među najčešće korištene indikatorske organizme za praćenje posljedica onečišćenja slatkovodnih ekosustava metalima ubrajaju se ribe jer se nalaze na vrhu hranidbenog lanca, imaju potencijal za akumulaciju metala, prikladnu veličinu te dugi životni vijek (Dragun i sur., 2015.). U brojnim europskim vodotocima često se kao bioindikatorski organizam koristi klen (*Squalius cephalus* L., 1758), dok se, na primjer, u makedonskim rijekama može naći srodna vrsta, vardarski klen (*Squalius vardarensis* Karaman, 1928). Obje vrste kao svejedi odražavaju izloženost metalima iz raznih izvora, kako iz vode tako i iz hrane životinjskog i biljnog podrijetla. Najčešće korišteni organi za analize metala su jetra, kao najvažnije mjesto metabolizma, pohranjivanja i detoksikacije metala, te škrge, kao mjesto unosa metala putem vode (Giguère i sur., 2006.; Kraemer i sur., 2005.). Dosadašnja istraživanja izloženosti metalima i njihovih učinaka kod klena i vardarskog klena uključuju uglavnom određivanje ukupnih koncentracija

akumuliranih metala u organima klena (Dragun i sur., 2007; 2012; 2016; 2019) te ne daju informaciju o mogućem toksičnom učinku metala ili njihovoj detoksikaciji (de la Calle Guntiñas i sur., 2002.). Stoga je potrebno detaljnije istražiti sudbinu metala nakon njihovog unosa u organizam, odnosno njihovu unutarstaničnu raspodjelu. Biološka funkcija, kao i mehanizmi toksičnosti i detoksikacije metala u mnogim organizmima još uvijek nisu dovoljno istraženi, dok su biomolekule koje vežu pojedine metale u ribama tek djelomično prepoznate i opisane (Janz, 2012.; McGeer i sur., 2012.). Prepoznavanje staničnih komponenata s kojima metali stupaju u interakcije pri različitim razinama izloženosti značajan je korak u predviđanju njihovih potencijalnih toksičnih učinaka. U skladu s tim, razvijeno je novo područje u istraživanju metala, nazvano metalomika, koje je Szpunar (2005.) definirala kao "sveobuhvatnu analizu svih oblika metala i metaloida u stanicama ili tkivima", a koje obuhvaća specijaciju metala u najširem smislu, uključujući izučavanje kompleksiranja elemenata, kao i utjecaja tog kompleksiranja na okoliš te posljedično i na ljudsko zdravlje. U području metalomike danas se koriste različite instrumentalne tehnike. Jedan je od najprihvaćenijih pristupa primjena kombinacije tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC; za razdvajanje citosolskih biomolekula) i spektrometrije masa s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS; za određivanje koncentracija metala) (Montes-Bayón i sur., 2003.). Brojne kromatografske tehnike razdvajanja mogu se koristiti za analizu raspodjele metala među citosolskim biomolekulama, poput kromatografije s isključenjem po veličini (SEC-HPLC) i anionsko-izmjenjivačke kromatografije (AEC-HPLC), koje se odlikuju visokom osjetljivošću i selektivnošću (Montes-Bayón i sur., 2003.; Szpunar, 2005.). Kombinirana primjena različitih kromatografskih tehnika i ICP-MS-a predstavlja vrijedan alat za razlučivanje citosolske raspodjele metala među proteinima i drugim molekulama različitih molekulskih veličina i naboja. Konačno prepoznavanje i karakterizacija biomolekula koje vežu metale, zahtjevan je korak u kojemu se primjenjuju razne tehnike spektrometrije masa (MS) za identifikaciju struktura molekula na koje su vezani metali, poput tekućinske kromatografije - tandemne spektrometrije mase (LC-MS/MS) te spektrometrije masa s analizatorom masa s vremenom leta (TOF) uz matricom potpomognutu desorpciju i ionizaciju laserskim zračenjem (MALDI) (Salekdeh i sur., 2002.). Ovakav višestruki analitički pristup povezuje detektore za elemente i molekularne detektore, sa svrhom olakšane identifikacije metaloproteina čak i u vrlo niskim koncentracijama (Gómez-Ariza i sur., 2004.). Promjene u raspodjeli metala među citosolskim biomolekulama, kao i prepoznavanje i karakterizacija biomolekula koje vežu metale nakon izloženosti organizama povišenim koncentracijama metala u vodi, predstavljaju osnovu za razvoj novih biomarkera izloženosti i toksičnih

učinaka metala, koji će se s vremenom moći ugraditi u sustave praćenja stanja prirodnih voda.

1.1. Ciljevi i svrha rada

Biološka funkcija i mehanizmi toksičnosti u različitim organizmima, a posebice u ribama, za mnoge metale još nisu dovoljno istraženi te je važno odrediti točan identitet citosolskih biomolekula na koje se ti metali vežu. U skladu s time, osnovni cilj ovoga istraživanja bio je produbljivanje razumijevanja unutarstanične sudbine metala nakon njihovog unosa u jetra i škrge dvaju odabranih bioindikatorskih organizama, dviju srodnih ribljih vrsta, klena (*S. cephalus*) i vardarskog klena (*S. vardarensis*), pri različitim razinama izloženosti tih organizama metalima u umjereno i izrazito metalima onečišćenim rijekama u Hrvatskoj i Sjevernoj Makedoniji. Istraživanje je bilo usmjereno na devet elemenata, sedam esencijalnih (Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Se i Zn) i dva neesencijalna (Cd i Pb).

Cilj istraživanja ostvaren je kroz sljedeće aktivnosti:

- određivanje citosolskih koncentracija odabranih elemenata akumuliranih u jetrima i škragama klena (*S. cephalus*) iz rijeke Sutle te vardarskog klena (*S. vardarensis*) iz triju rijeka sjeveroistočne Sjeverne Makedonije sa svrhom prepoznavanja jedinki s povećanom bioakumulacijom uslijed povećane izloženosti metalima u vodi;
- definiranje raspodjela odabranih elemenata među citosolskim biomolekulama različitih molekulskih masa u jetrima i škragama klena (*S. cephalus*) i vardarskog klena (*S. vardarensis*) pri niskim izloženostima te definiranje promjena u raspodjelama koje nastaju uslijed povišene izloženosti metalima u riječnoj vodi primjenom SEC-HPLC-a i ICP-MS visoke rezolucije (HR);
- definiranje raspodjela odabranih elemenata među toplinski stabilnim biomolekulama u jetrima i u škragama vardarskog klena (*S. vardarensis*) primjenom SEC-HPLC-a i HR ICP-MS;
- primjenu AEC-HPLC-a kao drugog stupnja razdvajanja citosolskih biomolekula na koje se vežu metali na temelju razlika u naboju, sa svrhom dodatnog pročišćavanja metaloproteina i razdvajanja njihovih izoformi iz jetara i škrge vardarskog klena (*S. vardarensis*);
- karakterizaciju i identifikaciju nekoliko odabranih citosolskih biomolekula koje vežu Fe, Cd, Cu, Zn i Mo u jetrima i škragama vardarskog klena (*S. vardarensis*) primjenom dviju tehnika spektrometrije masa (MALDI-TOF-MS i LC-MS/MS).

1.2. Hipoteze istraživanja

Provođenjem istraživanja testirali smo sljedeće hipoteze:

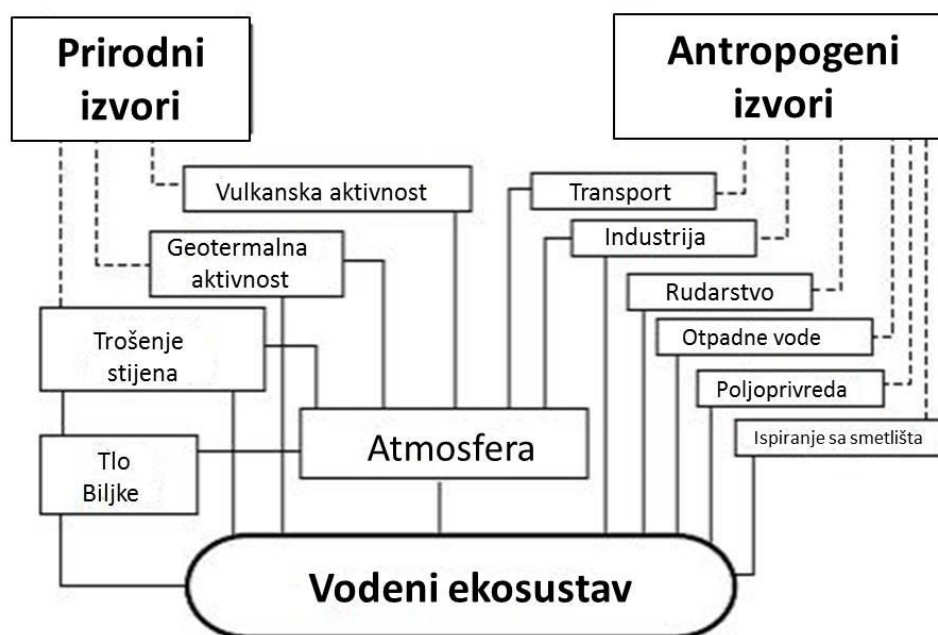
- raspodjela esencijalnih (Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Se i Zn) i neesencijalnih elemenata (Cd i Pb) među citosolskim biomolekulama u jetrima i škrigama klena (*S. cephalus*) i vardarskog klena (*S. vardarensis*) mijenja se uslijed promjene razine izloženosti metalima/nemetalu u vodi;
- raspodjela esencijalnih elemenata (Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Se i Zn) i neesencijalnog elementa Cd među citosolskim biomolekulama različita je u različitim organima (jetrima i škrigama) obiju istraživanih vrsta, klena i vardarskog klena;
- raspodjela istraživanih elemenata među citosolskim biomolekulama usporediva je u dvjema srodnim vrstama riba, klenu (*S. cephalus*) i vardarskom klenu (*S. vardarensis*), koje se stoga mogu usporedno koristiti u monitoringu.

LITERATURNI PREGLED

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Metali u slatkovodnim sustavima

U šarolikom rasponu onečišćivača metali imaju važnu ulogu jer mogu uzrokovati toksične učinke u vodenim organizmima (Maritim i sur., 2016.; Tessier i Turner, 1995.), iako brojni metali imaju i bitnu ulogu u funkcioniranju svih živih organizama te se prirodno nalaze u svim sastavnicama okoliša (Cukrov i sur., 2006.). Koncentracija metala u vodenom okolišu regulirana je procesima poput kemijskog i mehaničkog trošenja stijena i tla pod utjecajem vanjskih sila te njihovog ispiranja oborinskim vodama ili raznošenja vjetrom. Nadalje, prirodne koncentracije metala u velikoj mjeri ovise i o području u kojem se nalaze, odnosno o sastavu stijena i tla (Cukrov i sur., 2006.). Osim prirodnim putem, metali u vodu dospjevaju i iz brojnih antropogenih izvora, koji su u porastu zbog tehnološkog napretka ljudske zajednice, pri čemu razvoj industrije (proizvodnja plastičnih i električnih elemenata), rudarstvo, promet, napredna poljoprivreda (putem gnojiva) i gradske otpadne vode imaju najznačajniju ulogu u onečišćenju vodenih ekosustava metalima (Slika 1.) (Gaillardet i sur., 2004.).



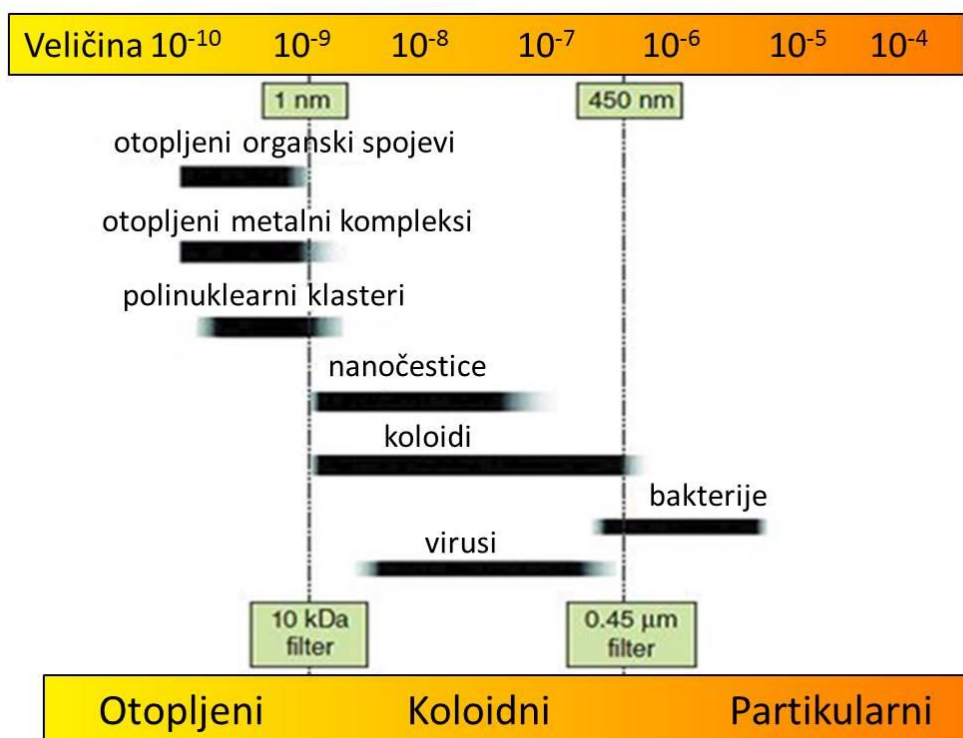
Slika 1. Izvori onečišćenja vodenog ekosustava metalima (preuzeto i prilagođeno prema Gaillardet i sur., 2004.).

Budući da su prirodne koncentracije većine metala u rijekama niske, od nekoliko nanograma do nekoliko mikrograma po litri, zbog čega su nazvani metalima u tragovima,

svaki dodatni unos utječe na njihove koncentracije i time mijenja prirodnu ravnotežu u vodenim ekosustavima (Gaillardet i sur., 2004.). Kada antropogeni unos nadmaši prirodni, dolazi do poremećaja prirodnog biogeokemijskog ciklusa metala, što za posljedicu može imati povećanu akumulaciju metala u vodenim organizmima te eventualno i prekomjerni unos u ljudski organizam (Flora i sur., 2008.; Mikac i sur., 2007.). U vodenim ekosustavima, metali se javljaju u raznovrsnim organskim i anorganskim oblicima, od hidratiziranih iona do velikih organskih kompleksa (Slika 2.), a njihova specijacija u vodi određuje njihovu bioraspoloživost, što predstavlja glavni čimbenik o kojemu ovisi utjecaj toksičnih metala na organizme. Naime, vrste metala u tragovima u vodi su raspodijeljene između različitih fizičkih i kemijskih oblika, npr. jednostavnih anorganskih i organskih spojeva, labilnih i inertnih kompleksa, kao i onih adsorbiranih na čvrstim i koloidnim česticama (Branica, 1999.).

Najjednostavnija kategorizacija metala u vodi zasniva se na podjeli na otopljenu i partikularnu fazu nakon filtriranja uzoraka vode kroz filter promjera pora 0,45 µm. Frakcija koja prođe kroz filter definirana je kao otopljena, dok je frakcija prikupljena na filteru definirana kao partikularna. Unatoč tome, kroz filter promjera pora 0,45 µm mogu proći i koloidni oblici metala koji obuhvaćaju čestice čija se veličina nalazi u rasponu 1 nm do 450 nm te mogu biti organski i anorganski (Gaillardet i sur., 2004.).

Nakon što metali dospiju u okoliš, mogu mijenjati kemijski oblik te tako postati više ili manje bioraspoloživi, a time i toksičniji za živi svijet u vodi. Na kemijski oblik u kojem se nalazi pojedini metal, odnosno na specijaciju metala u prirodnom okolišu utječe niz čimbenika, poput saliniteta, pH, temperature, prisustva organske tvari i otopljenog kisika (Mason, 2013.). Primjerice, pri nižim pH vrijednostima (kiseliji okoliš), više metala je prisutno u obliku hidratiziranog metalnog iona koji je pristupačniji i toksičniji za biotu (Campbell i Stokes, 1985.). Također, na primjeru kalifornijske pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) dokazano je kako je toksičnost pojedinih metala (Cu, Zn, Pb i Hg) slabija u tvrdoj vodi, jer Ca ima veći afinitet za vezanje na membranu škrge riba, u odnosu na ostale katione u vodi, što smanjuje njihovu apsorpciju kroz škrge i posljedično akumulaciju u tkivima riba (Mason, 2002.). Utjecaj okolišnih čimbenika na metale u vodi, kao i činjenica da je voda dinamični medij (posebno u rijekama), ukazuje kako za procjenu utjecaja metala na biotu nije dovoljno odrediti samo ukupnu koncentraciju nekog metala u vodi. Ta koncentracija zapravo odražava trenutnu vrijednost u trenutku uzorkovanja i ne daje informaciju o biološki raspoloživoj koncentraciji toga metala, kao i o njegovim potencijalnim toksičnim učincima (Florence i Batley, 1977.).



Slika 2. Shematski prikaz sastavnica vode, prema njihovoj veličini, na temelju korištenja filtera promjera pora 0,45 µm (preuzeto i prilagođeno iz Aiken i sur., 2011.).

Radi pouzdane procjene onečišćenja vodenih sustava metalima i njegovog utjecaja na žive organizme u vodi te posljedično i na ljude putem prehrane, potrebno je istražiti posljedice dugoročne izloženosti biote metalima, izučavanjem bioakumulacije i toksičnih učinaka metala na vodene organizme. Kao primjer slatkovodnih sustava umjereno i izrazito onečišćenih metalima bit će prikazane rijeka Sutla u Hrvatskoj te tri rijeke sjeveroistočne Sjeverne Makedonije, Bregalnica, Kriva Reka i Zletovska Reka.

2.1.1. Rijeka Sutla u Hrvatskoj

Rijeka Sutla izvire u Sloveniji na južnim obroncima Maceljske gore te je granična rijeka između Hrvatske i Slovenije (Slika 3.), ukupne dužine oko 91 km, od toga u Hrvatskoj 89 km. Prema Okvirnoj direktivi o vodama Europske unije, rijeka Sutla svojom površinom porječja od 581 km² pripada kategoriji srednje velikih rijeka (EPCEU, 2000.; Dragun i sur., 2011.). U rijeku Savu, jednu od triju najdužih rijeka na teritoriju Republike Hrvatske, utječe kao lijeva pritoka kod Savskog Marofa. Nadalje, rijeka Sutla nalazi se u području Hrvatskog zagorja, koje je bogato termalnim izvorima i kupeljima (Teskeredžić i sur., 2009.).



Slika 3. Karta rijeke Sutle s označenim mjestima uzorkovanja (Hum na Sutli, Donje Brezno, Kumrovec, Klanjec te Drenje Brdovečko) (preuzeto iz Dragun i sur., 2011.).

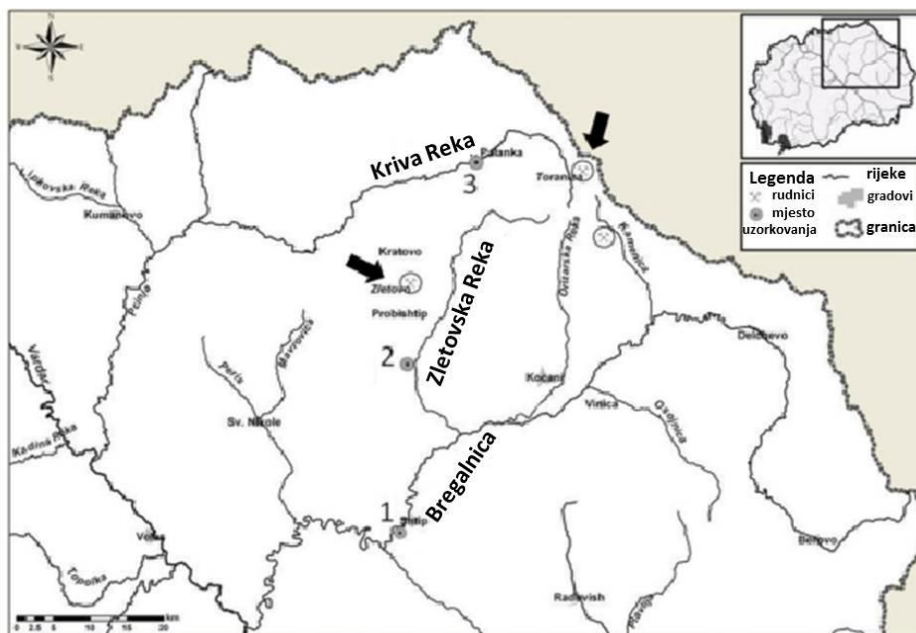
Rijeka Sutla smatra se umjereno onečišćenom metalima, a poznati izvori onečišćenja odnose se na male industrijske objekte, poput tvornice stakla, te na komunalne otpadne vode, poljoprivredne aktivnosti i ispuštanje otpadnih voda iz termalnih kupališta (Dragun i sur., 2011.). Zbog smanjene mogućnosti razrjeđenja unesenih toksičnih tvari uslijed niskog protoka vode (tijekom 2009. godine: $0,73-68,8 \text{ m}^3\text{s}^{-1}$; Dragun i sur., 2011.), mali vodotoci poput rijeke Sutle posebno su osjetljivi na onečišćenje. Istraživanje provedeno na rijeci Sutli u jesen 2009. godine (Dragun i sur., 2011.) pokazalo je kako su unatoč umjerenom antropogenom utjecaju koncentracije nekoliko otopljenih metala (Fe, Mn i Cd) na pojedinim postajama u ovoj rijeci bile uočljivo povišene, što je vidljivo iz širokog raspona njihovih koncentracija (Fe: $3,1-80,5 \mu\text{g L}^{-1}$; Mn: $0,44-261,1 \mu\text{g L}^{-1}$; Cd: $6-308 \text{ ng L}^{-1}$). Nasuprot tome, koncentracije otopljenog Zn i Cu bile su niske duž cijelog riječnog toka (Zn: $<5 \mu\text{g L}^{-1}$; Cu: $0,17-3,74 \mu\text{g L}^{-1}$). Najviše su koncentracije metala zabilježene u riječnoj vodi gornjeg toka rijeke Sutle, uglavnom na postajama Hum na Sutli (utjecaj industrije stakla) i Donje Brezno

(mogući utjecaj otpadnih voda termalnih kupališta) (Dragun i sur., 2011.). Iako koncentracije metala izmjerene u rijeci Sutli još uvijek nisu premašile ograničenja koja se smatraju opasnim za život u vodi ili u konačnici za ljudsko zdravlje, uočena su značajna povećanja te se zabilježene koncentracije metala u vodi ove rijeke treba smatrati upozorenjem i poticajem za zaštitu malih i srednjih rijeka s ciljem sprječavanja budućeg pogoršanja, prema preporukama Okvirne direktive o vodama (ODV; EPCEU, 2008.)

2.1.2. Rijeke sjeveroistočnog dijela Sjeverne Makedonije

Otpadne vode rudnika ubrajaju se, uz difuzno onečišćenje izazvano poljoprivrednim aktivnostima, u najopasnije izvore onečišćenja koji mogu dovesti do degradacije slatkovodnih ekosustava širom svijeta (Byrne i sur., 2012.; Cerqueira i sur., 2011.; Environmental Agency, 2006.; Silva i sur. 2011. a, b, c). Uzrok toksičnosti otpadnih voda rudnika nalazi se u njihovoj izrazitoj kiselosti i visokim koncentracijama metala. U kiselim vodama metali su većinom prisutni u ionskom obliku, koji je biološki raspoloživiji te se lako akumulira u ribama i drugim vodenim organizmima, što značajno ugrožava njihovo zdravlje i vodi ka smanjenju bioraznolikosti (Jordanova i sur., 2016.; Stuhlberger, 2010.; Wojtkowska, 2013.).

Geološka i tektonska obilježja makedonskog teritorija bila su preduvjet za stvaranje raznovrsnih, brojnih i često veoma velikih ležišta metala, nemetala i energetskih mineralnih resursa (Spasovski i sur., 2011.). Posljednjih godina Sjeverna Makedonija je zauzela značajno mjesto u regiji u iskorištavanju ruda olova i cinka. Od brojnih nalazišta olovnih i cinkovih ruda posebno treba istaknuti najvažnija područja bogata tim mineralnim sirovinama, a to su područje Sasa - Toranica, te Kratovo i Zletovo. Ondje se nalaze tri velika rudnika olova i cinka: Zletovo, Sasa i Toranica. Ti rudnici predstavljaju sirovinsku bazu olova i cinka i pratećih nusproizvoda (srebra, bizmuta, kadmija, sumporne kiseline, superfosfata, itd.) (Spasovski i sur., 2011.). Zbog brojnih aktivnih rudnika, otpadne vode rudnika u Makedoniji još uvijek predstavljaju vrlo ozbiljan ekološki problem, uzimajući u obzir da su koncentracije Pb i Zn u rudama i ležištima i do tisuću puta više u odnosu na ostala područja (Alderton i sur., 2005.; Midžić i Silajdžić, 2005.). Ramani i sur. (2014.) procijenili su utjecaj dvaju trenutno aktivnih rudnika Pb i Zn (Zletovo i Toranica) na kakvoću vode dviju rijeka u sjeveroistočnom dijelu Sjeverne Makedonije (Slika 4.), vezano uz onečišćenje metalima i promjene fizikalno-kemijskih karakteristika riječne vode.



Slika 4. Karta područja istraživanja s označenim mjestima uzorkovanja u sjeveroistočnoj Sjeverne Makedoniji (Bregalnica, Zletovska Reka i Kriva Reka) (Ramani i sur., 2014.).

2.1.2.1. Rijeka Bregalnica

Rijeka Bregalnica druga je po veličini makedonska rijeka te je najduža lijeva pritoka rijeke Vardar, najveće rijeke u Republici Sjevernoj Makedoniji. Ukupna dužina rijeke je 225 km, a površina njenog sliva iznosi 4307 km². Rijeka Bregalnica je manje onečišćena metalima od ostalih rijeka sjeveroistočne Sjeverne Makedonije jer nije pod izravnim utjecajem rudnika. Onečišćenje ove rijeke karakteristično je za područja intenzivne poljoprivredne aktivnosti, a javlja se zbog ispiranja tla rižinih polja (Andreevska i sur., 2013.) te se odnosi na pojavu povišenih koncentracija nekoliko metala/metaloida (na primjer, As, Ba, Fe, Mo, U i V), nitrata i fosfata, kao i pojavu izrazitog fekalnog onečišćenja vode uslijed utjecaja poljoprivrednih farmi grada Štipa (Ramani i sur., 2014.). U ovoj rijeci nađene su i povišene koncentracije herbicida koji se koriste u uzgoju riže (Stipaničev i sur., 2017.).

2.1.2.2. Zletovska Reka

Ukupna dužina Zletovske Reke je 56 km, a površina njenog sliva iznosi 460 km². U gornjem dijelu toka ova rijeka protječe kroz strmu klisuru koju je sama izdubila u stijenama te zbog toga na pojedinim mjestima ima pad od 42%, puno brzaca i dva vodopada. Jedna je od najzagađenijih pritoka rijeke Bregalnice (Dolenc i sur., 2005.), a zagađenje pretežno potječe od rudnika Pb i Zn, Zletovo. Rudnik je aktivno radio od 1940.-ih, a njegova proizvodnja i

dalje traje, iako je bilo nekoliko kratkotrajnih prekida. Rude iz rudnika Zletovo, koje sadržavaju više od 9% Pb i 2% Zn te značajnu količinu Ag, Bi, Cd i Cu (Alderton i sur., 2005.), obrađuju se u malom gradiću Probištipu dok se otpad iz rudnika odlaže u susjednim dolinama. Pritoke Zletovske Reke, Kiselica i Koritnica, ispiru glavno područje iskopa ruda kod Probištipa, (Alderton i sur., 2005.) te tako metali dospijevaju i u druge rijeke. Osim toga, otpadne vode iz rudnika Zletovo, onečišćene metalima, ispuštaju se iz koncentracijskog postrojenja u rijeku Kiselicu, pritoku Zletovske Reke, bez prethodne obrade ili neutralizacije. Zbog toga u Kiselici nema mnogo života, odnosno prisutne su samo one vrste vodenih organizama koje su otpornije na onečišćenje te su u njima nađene visoke razine metala (Midžić i Silajdžić, 2005.). U Zletovskoj Reci, nizvodno od rudnika Zletovo, nađene su iznimno visoke koncentracije Cd, Co, Cs, Cu, Li, Mn, Ni, Rb, Sn, Sr, Tl i Zn te sulfata i klorida. Osobito visoke koncentracije pojedinih metala bile su izmjerene u jesen 2012. godine, u vrijeme izrazito niskog vodostaja (npr., Cd $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$; Mn $2,5 \text{ mg L}^{-1}$; Zn $1,5 \text{ mg L}^{-1}$), što je jasan pokazatelj utjecaja rudnika na kakvoću riječne vode (Ramani i sur., 2014.). Pored onečišćenja rudarskim otpadom (Dragun i sur., 2019.; Ramani i sur., 2014.), Zletovska Reka je i pod utjecajem otpadnih voda grada Probištipa, uključujući i otpadne vode tvornice akumulatora (Spasovski i Dambov, 2009.).

2.1.2.3. Kriva Reka

Kriva Reka je najveća pritoka rijeke Pčinje, koja je lijevi pritok rijeke Vardar i najznačajnija rijeka u sjeveroistočnom dijelu Sjeverne Makedonije. Dužina ove rijeke je 78,7 km, dok površina sliva iznosi 968 km^2 (Ramani i sur., 2014.). Onečišćenje Krive Reke metalima potječe pretežno od otpada iz aktivnog rudnika Pb i Zn, Toranica. Proizvodnja Pb i Zn iz rudnika Toranica traje od 1987. godine, s nekoliko jednogodišnjih prekida nakon 2000. godine (Alderton i sur., 2005.). Rude iz rudnika Toranica sadržavaju oko 6,5% Pb+Zn s dodatno povišenim koncentracijama Cd, Cu, Mn, Ag i Bi (Serafimovski i sur., 2007.). Prema Ramani i sur. (2014.) u Krivoj Reci su zabilježene povišene koncentracije samo za Cd ($0,270 \mu\text{g L}^{-1}$) i Pb ($1,85 \mu\text{g L}^{-1}$) u proljeće 2012. godine te je, slično kao u Bregalnici, zamijećeno i izrazito fekalno onečišćenje, kao i povišene koncentracije amonijevih i fosfatnih iona, vjerojatno uslijed utjecaja otpada okolnih vrtova i obradivih površina.

2.2. Metali u vodenim organizmima

Unos metala u vodene organizme iz okolišne vode može se odvijati putem cijele vanjske površine organizma, putem respiratornih organa (škrge), putem probavnog epitela iz vode i hrane ili kombinacijom tih puteva (Brown i Depledge, 1998.). Nakon ulaska u izvanstanične tjelesne tekućine, unos metala u stanicu se vrši preko staničnih membrana procesima jednostavne difuzije, olakšane difuzije, aktivnog transporta i pinocitoze (Simkiss, 1998.), pri čemu je za unos u stanice najraspoloživiji hidratizirani ionski oblik metala. Ribe izlučuju štetne tvari iz organizma putem žuči, bubrega, škrge i kože (Heath, 1995). Akumulirana količina metala u stanicama odražava razliku između unosa i izlučivanja metala (Rainbow, 2018.).

S obzirom na svoju funkciju u živim organizmima metali se mogu podijeliti na esencijalne i neesencijalne. Metali koji predstavljaju važnu komponentu u metaboličkim procesima živih organizama, a dio su enzima ili vitamina, ubrajaju se u esencijalne ili biološki neophodne metale. To su, na primjer, makroelementi poput Ca, K, Mg i Na te mikroelementi poput Zn, Cu, Co, Se i Fe, koji su ljudima i životinjama potrebni u malim količinama, ali prekomjernim unosom i oni postaju toksični (Verma i Dwivedi, 2013.). One metale i metaloide za koje do sada nije otkrivena uloga u metaboličkim procesima živih organizama nazivamo neesencijalnim, a to su, na primjer, Pb, As, Hg, Ni i Cd koji su toksični već u vrlo malim količinama (Verma i Dwivedi, 2013.). Međutim, za veći broj mikroelemenata ustanovljeno je da na organizam mogu djelovati kako u toksičnom tako i u stimulativnom smislu, ovisno o unesenoj koncentracijskoj razini (Luckey i sur., 1975.). Stoga oštro razgraničavanje metala/metaloida na apsolutno toksične ili netoksične nije u potpunosti prihvatljivo s obzirom na raznolikost fiziološko-biokemijskih mehanizama svojstvenih organizmima različitih dobi i vrsta. Reakcija organizma na metale koja ovisi o promjeni njihovih koncentracija može se opisati krivuljom koja prikazuje međuovisnost koncentracije i učinka, gdje se za svaki metal/metaloid može definirati područje tolerancije, s graničnim donjim i gornjim koncentracijama, koje čini prijelaz između stanja deficijencije i intoksikacije. To područje tolerancije za svaki pojedini metal ovisi o djelotvornosti regulacijskih mehanizama u organizmu, koji se znatno razlikuju među organizmima na različitom stupnju razvoja (Engel i Fowler, 1979.)

U vodenim organizmima metali mogu izazvati široki spektar učinaka koji se mogu pojaviti na raznim biološkim razinama: na razini stanice, organa, organizma, populacije, zajednice ili kombinacijama tih kategorija (Phillips i Rainbow, 1993.). Učinci na razini

organizma obično se dijele na morfološke (deformacije ljuštura, skeleta, škruga, itd.), bihevioralne (motoričke promjene, promjene hranjenja) i fiziološke. Fiziološki učinci obuhvaćaju promjene na razini cijelog organizma, na razini tkiva i organa, ali i stanične promjene (biokemijske i citokemijske). Svaki toksični učinak započinje biokemijskim procesima na razini stanice koji potom mogu dovesti do promjena na cijelom organizmu. Učinci metala na staničnoj razini su mnogobrojni, a neki od njih su: inhibiranje ili promjene funkcija proteina, oksidativni stres, inhibicija mitohondrijske aktivnosti, poremećaj propusnosti membrana (Phillips i Rainbow, 1993.; Dragun i sur., 2017.). Iako brojni metali u organizmima imaju važne biološke uloge, kao sastavni dio enzima ili drugih složenih molekula, takozvanih metaloproteina (Smith i sur., 1997.), oni svojim vezanjem na različite proteine mogu uzrokovati njihovu inhibiciju ili im promijeniti funkciju (Viarengo, 1985.). To se može dogoditi zamjenom esencijalnog metala vezanog na protein ili vezanjem na deaktivacijsko mjesto enzima. Štetni učinak metala može se očitovati i kroz oksidativni stres, odnosno stvaranjem reaktivnih oblika kisika. Reaktivnih oblici kisika obuhvaćaju radikale kisika (superoksidni, hidroksilni, peroksidni) i reaktivne neradikalne derivate kisika (vodikov peroksid, hipokloritna kiselina) te mogu izazvati inaktivaciju enzima, lipidnu peroksidaciju, oštećenja DNA, kao i povećati rizik od razvoja raka (Viarengo, 1985.). Nadalje, mitohondriji, organele odgovorne za aerobnu sintezu ATP-a, akumuliraju velike količine metala, između ostalog Hg, Cd, Zn i Fe. Inhibicija mitohondrijske aktivnosti i oksidativne fosforilacije ubrajaju se u moguće štetne učinke metala (Viarengo, 1985.). Poremećaj propusnosti membrana može se očitovati kroz poremećaj aktivnog i pasivnog transporta. Živa i Cd se primjerice mogu vezati na fosfatnu skupinu lipidnog sloja membrane i tako poremetiti pasivni transport iona. Aktivni transport se može narušiti izravno inhibicijom enzima Na/K ovisne ATP-aze, ili posredno, smanjenjem raspoloživosti ATP-a (Bouquignau i Gilles; 1979; Viarengo, 1985.).

U organizmu, međutim, postoje različiti homeostatski mehanizmi za održavanje koncentracija metala u uskim rasponima, kao i detoksikacijski mehanizmi, koji sprječavaju, umanjuju ili poništavaju štetne interakcije metala s esencijalnim makromolekulama (Mason i Jenkins, 1995.), poput stvaranja netopljivih granula metala, odjeljivanja metala unutar lizosoma te vezanja metala za specifične biomolekule, pa do toksičnog učinka dolazi samo ukoliko je narušena ravnoteža (Viarengo i Nott, 1993.).

Uz sve navedeno, toksični utjecaj metala na organizam ovisi i o stanju organizma, odnosno o stupnju razvoja, starosti, veličini, spolu, prebivalištu i prehrani (Livingstone, 1993.), kao i o nizu vanjskih čimbenika, odnosno o uvjetima okoliša poput temperature,

saliniteta, pH vrijednosti, intenziteta svjetlosti, otopljenog kisika, itd. (Hamelink i sur., 1994.). Prisustvo drugih toksičnih tvari također može utjecati na djelovanje metala na organizme, izazivajući sinergistički ili antagonistički učinak.

2.3. Bioindikatori

U procjeni onečišćenja pojedinih ekosustava metalima koriste se prikladni bioindikatorski organizmi. Bioindikatori su organizmi koji svojom prisutnošću ili specifičnom reakcijom na određene čimbenike u okolišu mogu odražavati stanje okoliša. Bioindikatorske vrste, osim ekološkog stanja nekog vodenog sustava, mogu biti i dobar pokazatelj antropogenog utjecaja na taj ekosustav. Osnovne karakteristike indikatorskih organizama su široka rasprostranjenost i zastupljenost vrste, ograničeno područje kretanja, dovoljno dug životni vijek, dovoljna veličina za provođenje analiza te relativno jednostavna determinacija i dostupnost mjesta uzorkovanja (de Andrade i sur., 2004.). Kao bioindikatorski organizmi za praćenje izloženosti slatkovodnih ekosustava metalima najčešće se koriste ribe, školjkaši i raci (Dragun i sur., 2015). Prednost riba kao bioindikatora u tome je što se nalaze na vrhu prehrambenog lanca u slatkovodnim ekosustavima, imaju potencijal za akumuliranje metala, dug životni vijek i optimalnu veličinu za provođenje analiza, lako se uzorkuju te imaju veliku ekonomsku važnost (Dragun i sur., 2013.a i b). Budući da pripadaju kralježnjacima, pogodne su za izučavanje i zbog fiziološke sličnosti sa sisavcima, a k tome su i važan dio ljudske prehrane pa razina bioakumulacije metala iznad pravilnikom definiranih vrijednosti može predstavljati opasnost za ljudsko zdravlje (Baldwin i Kramer, 1994.). Zbog svih navedenih karakteristika ribe se smatraju jednim od najznačajnijih bioindikatora u slatkim vodama za procjenu onečišćenja metalima u tragovima (Evans i sur., 1993.; Barak i Mason, 1990.; Rashed, 2001.). Međutim, značajan problem kod upotrebe riba kao indikatorskih organizama ponekad može predstavljati njihova mobilnost, uslijed čega je teško precizno definirati mjesto i izvor onečišćenja, kao i vrijeme i trajanje izloženosti (Chovanec i sur., 2003.).

Riblja vrsta koja se često primjenjuje kao bioindikatorski organizam u europskim vodotocima je klen (*Squalius cephalus* L., 1758). Klen ima izvrsnu sposobnost prilagodbe tako da nastanjuje i tekućice i jezera te se ubraja u skupinu predatorskih riba (Habeković i sur., 1993.). Dok se u rijekama u Hrvatskoj može naći vrsta *S. cephalus*, u makedonskim rijekama obitava srodna vrsta istoga roda, odnosno vardarski klen (*Squalius vardarensis* Karaman, 1928).

2.3.1. Klen (*Squalius cephalus* L., 1758)

Klen (*Squalius cephalus* L., 1758) (Slika 5.), pripadnik porodice šaranki (Cyprinidae), slatkovodna je omnivorna riblja vrsta široko rasprostranjena u Europi s izrazitom otpornošću na kemijsko i fizikalno zagađenje (Gandolfi i sur., 1991.; Maitland i Campbell, 1992.; Vostradovsky, 1973.).

Znanstvena klasifikacija:

Carstvo:	Animalia
Koljeno:	Chordata
Razred:	Actinopterygii
Red:	Cypriniformes
Porodica:	Cyprinidae
Rod:	<i>Squalius</i>
Vrsta:	<i>Squalius cephalus</i> Linnaeus, 1758



Slika 5. Prikaz klena *Squalius cephalus* Linnaeus, 1758.

Autor fotografije: dr. sc. Damir Valić.

Naseljava mnoge stajaćice i tekućice nizinskog, prijelaznog i djelomično visinskog karaktera koje pripadaju slivu Sjevernog, Baltičkog, Crnog i Azovskog mora u Europi i dijelu Azije (Habeković, 1982.). Ima vretenasto snažno tijelo, prilagođeno plivanju i u pojačanim vodenim strujama (Habeković i sur., 1993.). Može narasti i do 80 cm dužine i 4 kg mase. Spolno sazrijeva u dobi od 4 do 5 godina pri dužini od 20 cm, a mrijesti se višekratno od travnja do lipnja kada temperatura vode dostigne 15°C, u plitkim zonama bogatim kisikom i čistog dna (Habeković, 1982.; Habeković i sur., 1993.). Unatoč velikoj sposobnosti

prilagođavanja, najčešće se zadržava ispod brana i drugih zapreka, gdje se hrani. S obzirom na sve navedeno, kao i na široku rasprostranjenost i relativno dug životni vijek, klen predstavlja pogodan bioindikatorski organizam za praćenje kakvoće slatkih voda (Kurtović i sur., 2007.; 2008.).

2.3.2. Vardarski klen (*Squalius vardarensis* Karaman, 1928)

U makedonskim rijekama može se naći druga vrsta iz roda *Squalius*, odnosno vardarski klen (*Squalius vardarensis* Karaman, 1928) (Slika 6.). Vardarski klen nastanjuje rijeke i potoke umjerenih tokova na području Sjeverne Makedonije i Grčke, a može narasti i do 60 cm ukupne dužine te se mrijesti od svibnja do lipnja u rijekama i potocima s čistom vodom (Kottelat i Freyhof, 2007.). Budući da je vrhunski grabežljivac, vardarski klen predstavlja izvrstan izbor za praćenje utjecaja kemijskih agenasa i metala na slatkovodnu biotu (Jordanova i sur., 2016.).

Znanstvena klasifikacija:

Carstvo:	Animalia
Koljeno:	Chordata
Razred:	Actinopterygii
Red:	Cypriniformes
Porodica:	Cyprinidae
Rod:	<i>Squalius</i>
Vrsta:	<i>Squalius vardarensis</i> Karaman, 1928



Slika 6. Prikaz vardarskog klana (*Squalius vardarensis* Karaman, 1928).

Autorica fotografije: dr. sc. Zrinka Dragun.

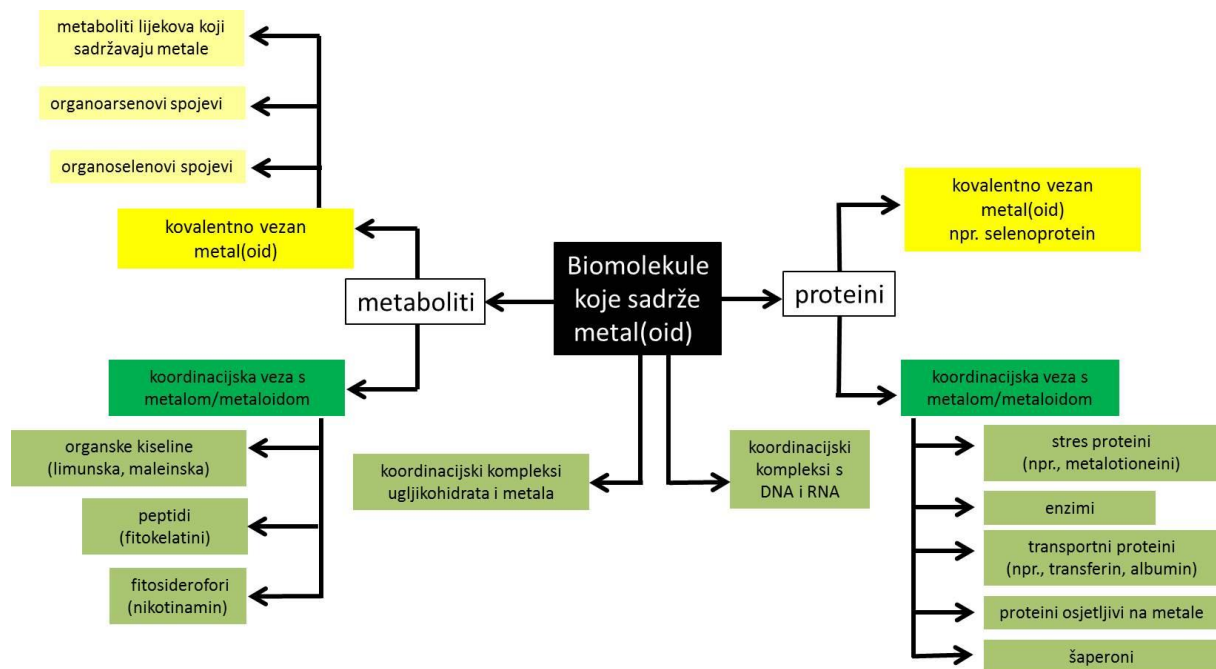
2.3.3. Ciljni organi za analizu metala

Metali se mogu akumulirati u različitim dijelovima organizma riba, ovisno o kojem se metalu radi. Primjerice, Pb ima veliki afinitet za kalcificiranim tkivima dok se u mekim tkivima najviše taloži u jetrima i bubrezima, nakon čega slijedi koža, mozak i mišići (Roberts i sur., 1976.; Sedak i sur., 2015.), Cd ima najveći afinitet za taloženje u jetrima (oko 50 % Cd) i bubrezima (Sedak i sur., 2015.; Siddiqui, 2010.), Zn u jetrima (Bawuro i sur., 2018.; Dragun i sur., 2019.), dok se Hg akumulira u mišićima, a k tome je jedan od rijetkih metala koji se i biomagnificira u hranidbenom lancu te može biti izrazito toksična za ljude putem prehrane (Frodello i sur., 2000.; Mason i sur., 2006.; Sedak i sur., 2015.). Za procjenu dugotrajne, kronične izloženosti riba metalima najbolje je analize provoditi u jetrima (Miller i sur., 1992.), budući da se radi o glavnom detoksikacijskom organu i metaboličkom centru organizma (Giguere i sur., 2004.) te organu koji raspolaže najučinkovitijom sposobnošću akumulacije raznih zagađivala (Papagiannis i sur., 2004.; Vukosav i sur., 2014.). Nadalje, hepatociti, dominantna vrsta stanica u jetrima, sadrže, kao obrambeni mehanizam, visoke razine unutarstaničnih proteina i peptida koji vežu metale i pomažu u njihovom uklanjanju, tako sprječavajući interakcije metala s potencijalno osjetljivim biomolekulama; to obilježje jetara omogućava proučavanje metala i detoksikacijskih mehanizama (Di Giulio i Hinton, 2008.; Heath, 1995.; Sigel i sur., 2009.). S druge strane, škrge su, kao važno mjesto izravnog unosa toksičnih tvari iz vode, prikladne za praćenje kratkotrajne izloženosti metalima te naglih promjena u razini izloženosti. Zbog relativno niske topljivosti kisika u vodi, ribe imaju vrlo veliku respiratornu površinu, propuštaju veliki volumen vode kroz škrge u jedinici vremena te imaju tanke epitelne membrane, što sve zajedno olakšava unos tvari iz vode, kao i njihov prijenos u krv (Chovanec i sur., 2003.; Heath, 1995.; Reid i McDonald, 1991.).

2.4. Metalomika

Metali se u živim organizmima javljaju vezani na cijeli niz različitih biomolekula (Slika 7.). Veliki broj proteina zahtijeva metal kao kofaktor, a obično se radi o prijelaznim metalima, poput Cu, Fe, Zn ili Mo (Mounicou i sur., 2009.; Tainer i sur., 1991.). Metalni ioni, nadalje, mogu kontrolirati regulaciju ekspresije proteina u stanicama, npr. metalotioneina, proteina bitnog u homeostazi i procesima detoksikacije (Maret, 2004.). Šaperoni metala štite i usmjeravaju metalne ione kroz citoplazmu (Rosen, 2005.; Rosenzweig, 2002.), dok su izvanstanični proteini poput albumina i transferina bitni kao transporter metala u krvi (Mounicou i sur., 2009.). Stoga je unutarstanična koncentracija nekoliko metala, njihova

raspodjela među različitim staničnim odjeljcima te njihova ugradnja u metaloproteine strogo kontrolirana (Outten i O'Halloran, 2001.).

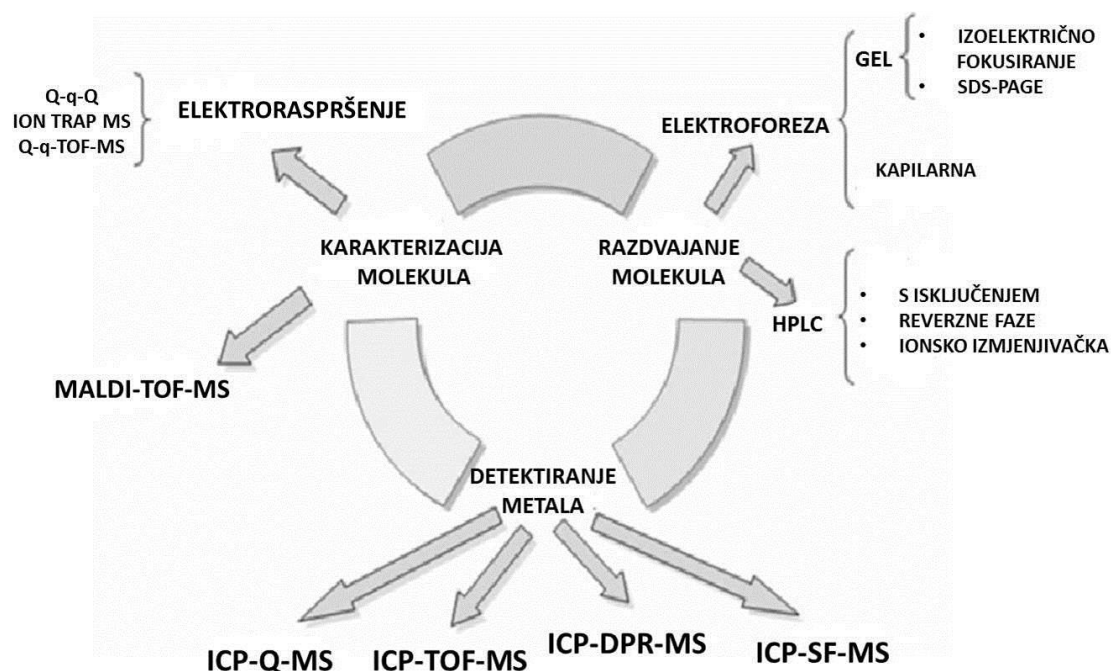


Slika 7. Različiti oblici metala u biološkom okruženju (Mounicou i sur., 2009.).

Zbog svega navedenog, sustavni pristup proučavanju sadržaja metala, njihove specijacije, lokalizacije i upotrebe unutar organizama i ekosustava postaje sve važniji (Thiele i Gitlin, 2008.). U prošlosti su istraživanja metala u okolišu bila pretežno usmjerena na fiziološke mehanizme unosa, toksičnosti i izlučivanja te se većina razvijenih metoda odnosila na mjerenje ukupnih koncentracija pojedinačnih metala u vodi i u organizmima, koje ne daju informaciju o metabolizmu i mehanizmima toksičnosti metala, kao ni o mehanizmima njihove detoksikacije (de la Calle Guntiñas i sur., 2002.). Posljednjih godina razvijene su „omičke“ tehnike, koje uključuju strukturnu genomiku, transkriptomiku, proteomiku, toksikoproteomiku i metalomiku te koje su usmjerene na sveobuhvatna izučavanja na molekularnoj i staničnoj razini, a koriste se i u okolišnim istraživanjima za prepoznavanje novih biomarkera učinaka raznih zagađivala na organizme (Shi i Chance, 2008.). U skladu s tim, metalomika je, prema Szpunar (2004.), definirana kao "sveobuhvatna analiza svih oblika metala i metaloida u stanicama ili tkivima," a obuhvaća specijaciju metala u najširem smislu, uključujući izučavanje kompleksiranja elemenata, kao i utjecaja tog kompleksiranja na okoliš i na ljudsko zdravlje. Metalomika se, nadalje, bavi proučavanjem i razjašnjavanjem fizioloških uloga i funkcija biomolekula koje vežu metalne ione u biološkim sustavima

(Monicou i sur., 2009.). Predstavlja transdisciplinarno istraživačko područje, koje povezuje razna druga znanstvena područja, poput geokemije, kliničke biologije, farmakologije, biljne i životinjske fiziologije (Monicou i sur., 2009.). Krajnji je cilj metalomike pružiti sveopće i sustavno razumijevanje unosa, prijenosa, uloge i izlučivanja metala u biološkim sustavima (Monicou i sur., 2009.). Istraživanja u području metalomike provode se pomoću različitih tehnoloških i metodoloških pristupa, no ne postoji nijedna tehnologija koja bi bila prikladna za samostalnu primjenu. Analize se sastoje od niza koraka koji zahtijevaju različite metodološke pristupe, a organizacija i integracija analitičkih koraka predstavljaju ključ uspjeha (Gómez-Ariza i sur., 2005.)

Metalomičke analize, dakle, zahtijevaju složene multidimenzionalne analitičke pristupe, uključujući (1) tehnike razdvajanja, poput različitih tehnika tekućinske kromatografije i elektroforeze, (2) detektore visoke osjetljivosti specifične za elemente te (3) molekularne detektore utemeljene na spektrometriji masa za karakterizaciju razdvojenih biomolekula koje vežu metale (Slika 8.) (Gómez-Ariza i sur., 2004.; Mounicou i sur., 2009.; Szpunar i Łobiński, 2002.).



Slika 8. Spregnute tehnike u analizama metala i biomolekula koje vežu metale (prilagođeno prema radu Mounicou i sur., 2009.).

2.4.1. Analitičke metode za razdvajanje i pročišćavanje biomolekula na koje se vežu metali

Za analizu metaloproteina i drugih biomolekula koje vežu metale razvijene su brojne metode razdvajanja, poput kromatografije i elektroforeze (kapilarna ili gel elektroforeze) (Gómez-Ariza i sur., 2005.; Monicou i sur., 2009.; Szpunar i Łobiński, 1999.).

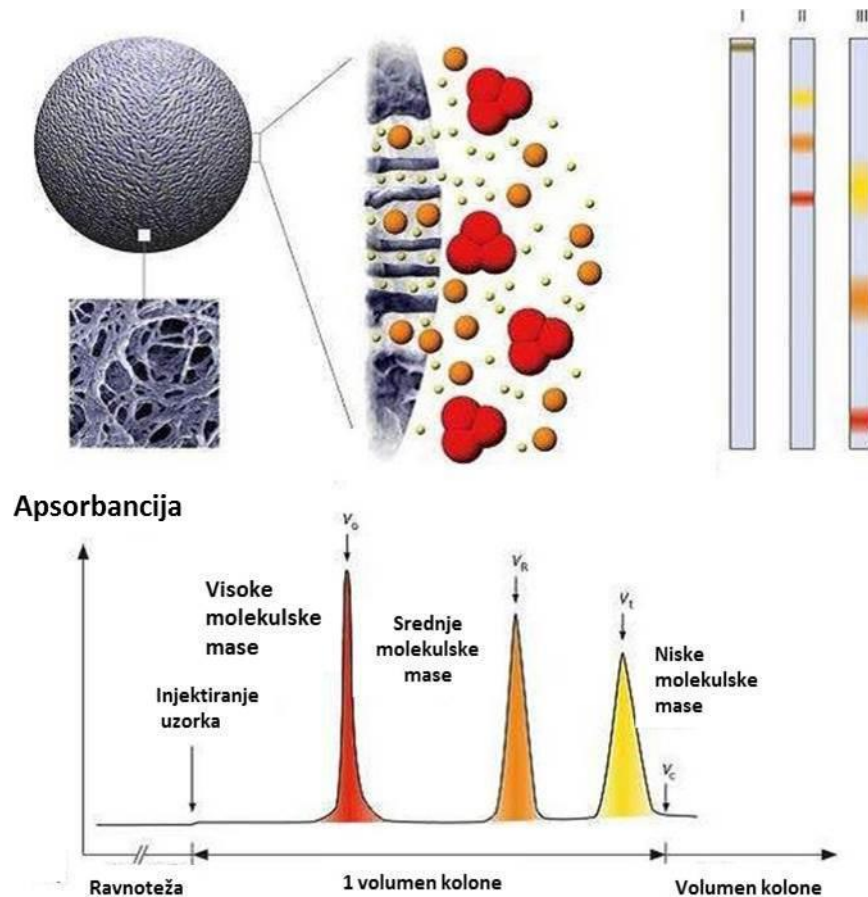
Kromatografija je jedna od analitičkih metoda koje se najčešće primjenjuju, a čiji je razvoj počeo šezdesetih godina prošlog stoljeća (Majors, 2003.). Tekućinska kromatografija osnovna je višenamjenska tehnika razdvajanja koja se primjenjuje u modernim biološkim znanostima i u komplementarnim znanstvenim područjima kao što su analitička ili preparativna kemija (Cindrić i sur., 2009.). To je tehnika koja se koristi za razdvajanje otopljenih tvari. Tvari iz otopina u različitoj mjeri stupaju u interakciju sa stacionarnom (nepokretnom) i tekućom mobilnom (pokretnom) fazom na osnovu razlika u adsorpciji, ionskoj izmjeni, razdiobi između faza, razlici u veličini čestica ili stereokemijskih interakcija. Kao posljedica navedenih razlika, različite se tvari različito dugo zadržavaju na kromatografskoj stacionarnoj fazi (Cindrić i sur., 2009.; Sattayasai, 2012.).

Za razliku od mnogih drugih tehnika razdvajanja koje imaju različita ograničenja, poput plinske kromatografije koja nije pogodna za razdvajanje toplinski nestabilnih molekula, tekućinska kromatografija može uspješno poslužiti za razdvajanje širokog raspona molekula kao što su polimeri, male molekule farmaceutika ili njihovih metabolita, kao i peptida i proteina (Cindrić i sur., 2009.). Nadalje, dodatna prednost tekućinske kromatografije je mogućnost izravnog povezivanja s drugim analitičkim tehnikama (Cindrić i sur., 2009.). Za početno pročišćavanje staničnih biomolekula koje vežu metale korisna je primjena kromatografije s isključenjem po veličini (SEC) u kombinaciji s ionsko-izmjenjivačkom kromatografijom (IEC). Primjenom ovih dviju metoda postiže se visoka osjetljivost i selektivnost (Montes-Bayón i sur., 2003.; Szpunar, 2004.) te zadovoljavajuće razlučivanje prilikom razdvajanja biomolekula koje vežu metale, odnosno izbjegava se istovremeno eluiranje više oblika istog elementa (Mounicou i sur., 2009.).

2.4.1.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s isključenjem po veličini (SEC-HPLC)

SEC-HPLC često se koristi kao osnovna metoda za razdvajanje metaloproteina i drugih biomolekula koje vežu metale (Slika 9.). Temelji se na učinku molekularnih sita koja omogućavaju razdvajanje molekula prema njihovoj veličini te u manjoj mjeri i prema obliku (de la Calle Guntinas i sur., 2002.; Szpunar, 2004.). Najbolji je izbor za analize proteina i

raznih drugih biomolekula, budući da nakon pročišćavanja izvorna struktura i funkcija proteina ostaju očuvane, a može se koristiti i široki spektar pufera kako bi se ostvarili odgovarajući uvjeti za razdvajanje pojedinih proteina (Rambo, 2017.).



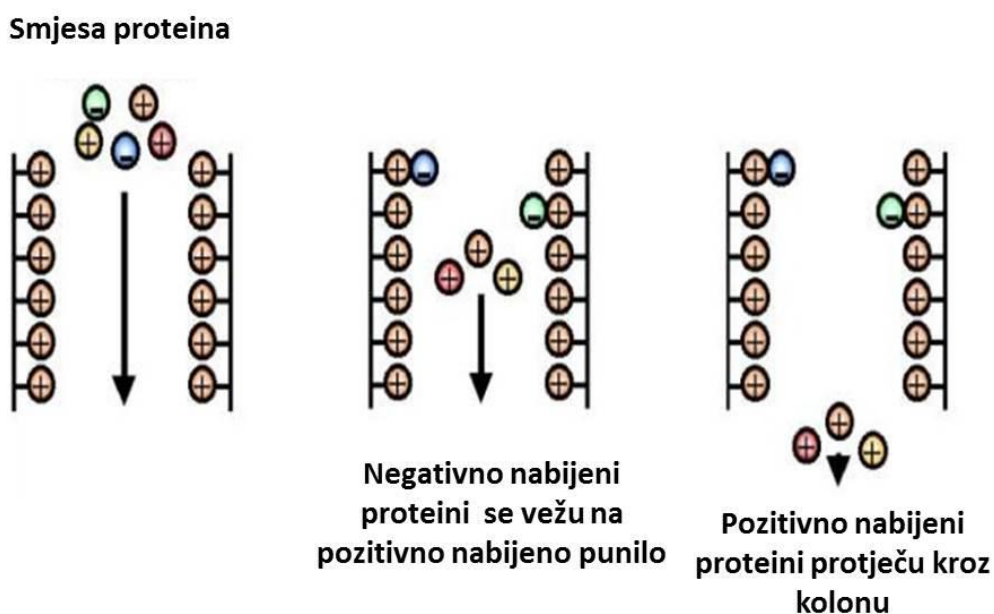
Slika 9. Kromatografija isključivanjem ili gel-filtracijska kromatografija. Metoda se temelji na difuziji molekula kroz porozne šupljine punila koje sačinjavaju kolonu. Mehanizam razdvajanja se temelji na prodiranju molekula u pore čestica punila, tako da manje molekule, koje mogu ulaziti u pore, zaostaju, dok veće, koje to ne mogu, prolaze između čestica punila te prije izlaze iz kolone. S obzirom na to da pore u punilu stacionarne faze, nisu jednake veličine, samo najveće molekule bit će u potpunosti izuzete od prodiranja u pore punila, dok će sve druge ulaziti s većom ili manjom učestalosti (manje češće, veće rjeđe), te će duže zaostajati u punilu stacionarne faze. Tako će najprije izaći najveće molekule, pa onda srednje i na kraju najmanje molekule. Slika je prilagođena prema Hagel i Haneski (2010.).

Prednost ove metode je što proteini, ako se razdvajanje odvija pod blagim, fiziološkim uvjetima, ostaju gotovo netaknuti, a to je jako važno pri razdvajanju biomolekula koje su osjetljive na promjenu pH te analizama metaloproteina (De la Calle Guntiñas i sur., 2002.).

Dodatnu prednost u odnosu na ostale kromatografske metode ima zbog mogućnosti povezivanja sa spektrometrijom masa uz ionizaciju induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS) za određivanje koncentracija metala. Odabirom odgovarajućih kromatografskih uvjeta koji ne štete analizi spektrometrijom masa (npr., hlapljivih pufera, stabilnog i niskog protoka, upotrebe polarnih organskih otapala), tekućinski se kromatograf može jednostavno povezati sa spektrometrom masa (Cindrić i sur., 2009.). U mnogim je istraživanjima tehnika SEC-HPLC u kombinaciji s ICP-MS-om korištena kao polukvantitativna tehnika za specijaciju elemenata poput Cd (Ferrarello i sur., 2000.), Se (McSheehy i sur., 2001.), ili As (McSheehy i Szpunar, 2000.).

2.4.1.2. Ionsko izmjenjivačka tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (IEC-HPLC)

Biološke molekule su uglavnom polarne te stoga mogu biti nabijene. Upravo je to svojstvo molekula iskorišteno u izvedbi ionsko-izmjenjivačke kromatografije (IEC), koja se zasniva na razdvajanju otopljenih molekula na osnovu razlika u naboju (Slika 10.).



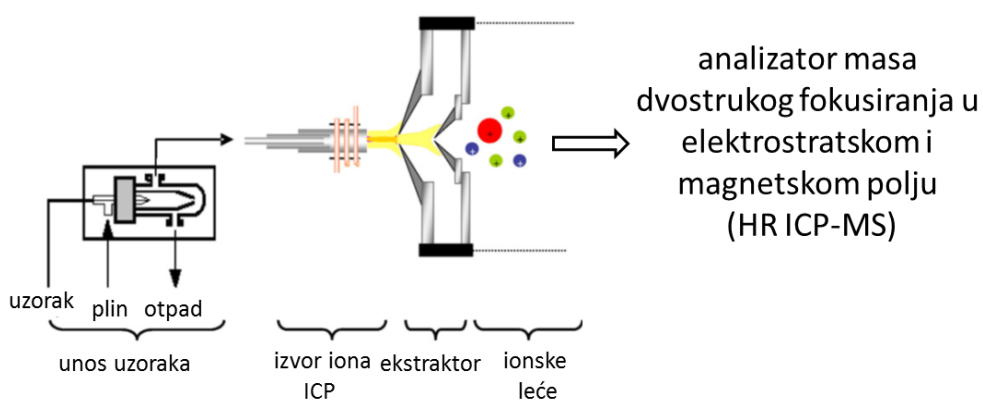
Slika 10. Princip anionsko-izmjenjivačke kromatografije. Proteini se razdvajaju na temelju svoga neto-naboja (preuzeto i prilagođeno iz Berg i sur., 2002.).

Može se primijeniti za razdvajanje gotovo bilo koje vrste nabijenih molekula uključujući velike proteine, male nukleotide i aminokiseline (Loeschner i sur., 2015.). Dvije vrste ionsko-izmjenjivačke kromatografije su anionsko-izmjenjivačka (AEC) i kationsko-

izmjenjivačka (CEC) kromatografija. Molekule koje su topljive i nabijene, kao što su proteini, aminokiseline i peptidi, vežu se na suprotno nabijene funkcionalne skupine netopljive stacionarne faze stvaranjem ionskih veza (Sattayasai, 2012.). U kationsko-izmjenjivačkoj kromatografiji primjenjuje se anionska stacionarna faza kada su željene molekule koje se razdvajaju kationi, a anionsko-izmjenjivačka kromatografija primjenjuje kationsku stacionarnu fazu za odjeljivanje aniona. Molekule vezane na stacionarnu fazu ispiru se povećavanjem ionske jakosti ili promjenom pH eluensa, odnosno mobilne faze. Kationsko i anionsko izmjenjivačka kromatografija često se koriste u istraživanjima metala u biološkim uzorcima (Sanz-Medel i sur., 2003.; Szpunar, 2000.), na primjer pri razdvajanju metalotioneina (Lehman i Klaassen, 1986.; Rodríguez-Cea i sur., 2003.; Van Campenhout i sur., 2008.) i serumskih proteina (Soldado Cabezuelo i sur., 1997.; Wrobel i sur., 1995.).

2.4.2. Analitičke metode za određivanje metala u uzorcima iz okoliša

Postoji niz različitih tehnika kojima se mogu određivati metali u uzorcima iz okoliša, kao i u kromatografski razdvojenim frakcijama tih uzoraka (Bettmer i sur., 2009.; Garcia i sur., 2006; Gómez-Ariza i sur., 2004.; 2005.; Szpunar, 2004.). Kemijske analize metala provode se korištenjem sofisticiranih metoda visoke osjetljivosti poput atomske apsorpcijske spektrometrije (AAS - plamena i grafitna tehnika), atomske emisijske spektrometrije s induktivno spregnutom plazmom (ICP-AES), spektrometrije masa s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS) te elektrokemijskih metoda (Csuros i Csuros, 2002.; Lobinski i Marczenko, 1997.; Michalke and Nischwitz, 2010.; Skoog i sur., 1999). U nekim slučajevima koriste se i dodatne tehnike, poput analize neutronske aktivacije (NAA) ili djelomično inducirane rendgenske emisije (PIXE).

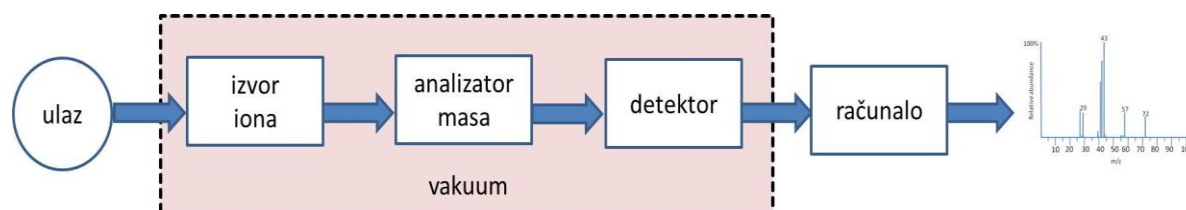


Slika 11. Shematski prikaz spektrometrije masa uz ionizaciju induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS; preuzeto iz Bettmer i sur., 2009.)

ICP-MS (Slika 11.) je svestrana tehnika u kojoj se induktivno spregnuta plazma koristi kao ionizacijski izvor, a detekcija se vrši spektrometrijom masa, na temelju određivanja omjera mase i naboja (m/z) analiziranih iona (Montaser, 1998.; Thomas, 2013.). Od svoje prve pojave tijekom ranih 1980.-ih (Houk i sur., 1980.), ICP-MS tehnika postala je jednim od najvažnijih načina određivanja više od 70% elemenata periodnog sustava (Betmmer i sur., 2009.) te spada u najbrže razvijajuće tehnike za analizu metala u tragovima (Grochowski i sur., 2019.). Iako se njome mogu odrediti isti elementi kao i ostalim spektroskopskim tehnikama, ICP-MS ima veliku prednost zbog multielementne i brze analize te niskih granica detekcije (Al-Hakkani, 2019.; Garcia i sur., 2006.; He i sur., 2017.).

2.4.3. Primjena spektrometrije masa (MS) u analizi biomolekula koje vežu metale

U prošlom nas je desetljeću razvoj spektrometrije mase doveo u novo doba analize proteina i peptida. Spektrometrija masa radi na principu ioniziranja kemijskih komponenti promatranog uzorka stvarajući nabijene molekule ili fragmente molekula te zatim mjeri njihove omjere mase i naboja (m/z) (Banerjee i Mazumdar, 2012.; Galić, 2004.; Gross, 2004.). Metode spektrometrije masa neprekidno se razvijaju, a u današnje se vrijeme upotrebljavaju za određivanje masa čestica, sastava uzoraka ili molekula, kvalitativnog i kvantitativnog određivanja sastava smjesa te za razjašnjavanje kemijskih struktura molekula, primjerice peptida (Galić i Cindrić, 2008.; Urban, 2016.). Spektrometrija masa omogućuje određivanje masa peptida i/ili proteina, identifikaciju proteina, određivanje aminokiselinskog slijeda, identifikaciju i određivanje položaja post translacijskih modifikacija, određivanje mutacija te provjeru struktura i čistoće proteina dobivenih genetskim inženjeringom (Calderón-Celis i sur., 2018.; de Hoffman i Stroobant, 2007.; Graves i Haystead, 2002.; Rathore i sur., 2018.). Nadalje, primjenjuje se i u istraživanju različitih interakcija između proteina i iona metala, malih organskih molekula i različitih bioloških spojeva (Galić i Cindrić, 2008.; Gibson i Costello, 2000.).



Slika 12. Shematski prikaz spektrometra masa

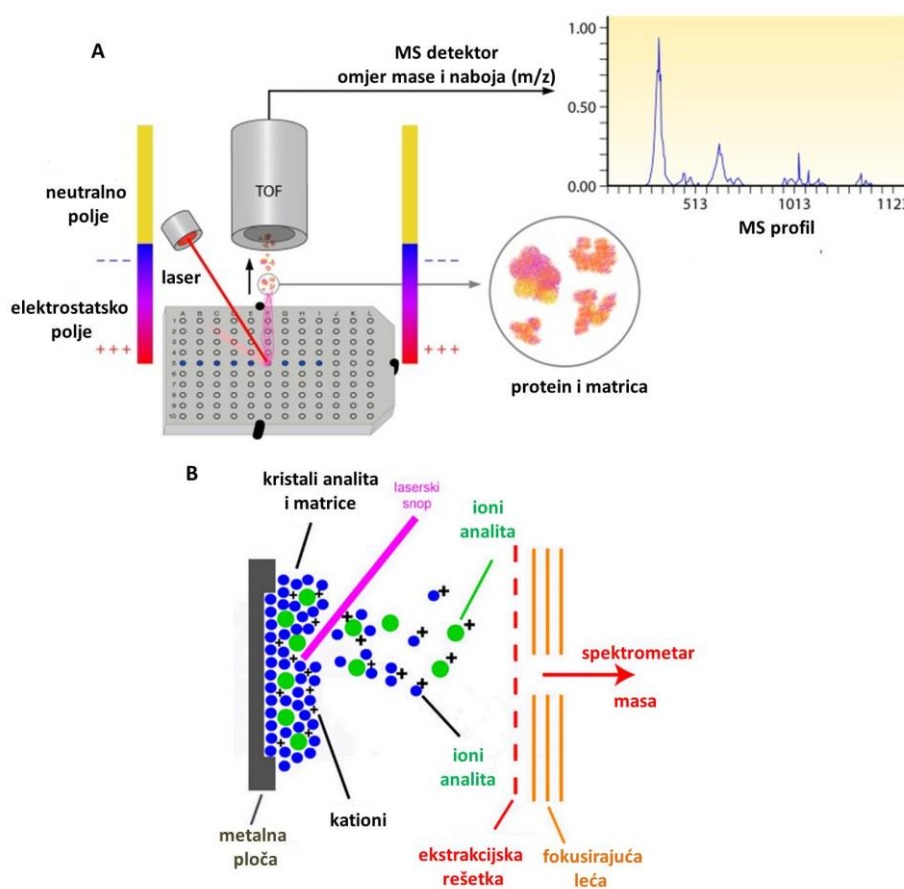
Uređaj, spektrometar masa (Slika 12.), sastoji se od ionskog izvora, analizatora masa te detektora i sustava za obradu podataka (de Hoffmann i Stroobant, 2007.; Galić i Cindrić 2008.). Nakon unosa uzorka u spektrometar masa dolazi do ionizacije i pretvorbe molekula analita u plinsku fazu što je osnovni zahtjev za daljnu analizu. Ioni nastali u plinovitoj fazi u analizatoru masa se razdvajaju na temelju omjera m/z djelovanjem magnetskog ili električnog polja (Galić, 2004.). Detekcija se vrši pomoću elektronskog pojačala ili scintilacijskog brojača (Mornar, 2013.; Sertić, 2013.; Watson, 1999.), a rezultati se prikazuju grafički u obliku spektara masa koji pokazuju relativnu zastupljenost različitih ionskih vrsta (Galić, 2004.; Nigović, 2015.).

Postoji nekoliko različitih metoda ionizacije, a za analizu peptida i proteina najčešće se koriste ESI i MALDI tehnike. Analiza proteina spektrometrijom masa obuhvaća analizu intaktnog proteina ili analizu peptida nastalih enzimskom ili kemijskom razgradnjom proteina te se može provoditi pristupima odozgo nadolje (engl. *top-down*) i odozdo nagore (Slika 13.) (engl. *bottom-up*) (Bogdanov i Smith, 2005.; Chait, 2006.; Kelleher, 2004.; Khalsa-Moyers i McDonald, 2006.; Monicou i sur., 2009.; Switzar i sur., 2013.).

Učestaliji način analize proteina je odozdo nagore, a uključuje cijepanje proteina i odstranjivanje posttranslacijskih modifikacija enzimskim putem (pomoću proteaza ili glikozidaza), kemijskim putem (pomoću hidrolizirajućih reagensa) ili kombinirano (Amunugama i sur., 2013.; Galić i sur., 2008.; Gillet i sur., 2016.; Manes i Nita-Lazar i sur., 2018.). Zbog visokospecifične i ponovljive reakcije cijepanja proteina najčešće korišteni proteolitički reagens je tripsin. Cijepanjem tripsinom u većini slučajeva nastaju peptidi duljine od 5-30 aminokiselina, što je optimalna duljina niza za analizu spektrometrijom masa (Corthals i sur., 1999.; Gundry i sur., 2001.). Dva osnovna pristupa u identifikaciji proteina su identifikacija proteina putem pretrage baze podataka i identifikacija proteina *de novo* sekvenciranjem (Reinders i sur., 2004). Identifikacija proteina postiže se putem pretrage baze podataka i temelji se na usporedbi eksperimentalno dobivenih podataka s teoretski izračunatim vrijednostima dobijenim iz baza podataka proteinskih sekvenci, dok se identifikacija proteina sekvenciranjem *de novo* temelji na eksperimentalnom iščitavanju slijeda aminokiselina na osnovu MS/MS spektra (Galić i Cindrić, 2008.; Nesvizhskii, 2007.; Taylor i Johnson, 2001.).

2.4.3.1. Matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem (MALDI)

MALDI (engl. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) je tehnika ionizacije molekula koju su utemeljili znanstvenici Karas i Hillenkamp 1988. godine, koji su prvi snimili spektar biomolekula molekulskih masa iznad 10 kDa u smjesi uzorka s matricom, dok je Koichi Tanaka 2002. godine dobio Nobelovu nagradu za kemiju za proučavanje velikih biomolekula pomoću MALDI ionizacijske tehnike (Cho i Normile, 2002.).



Slika 13. Shematski dijagram koji prikazuje tijek rada MALDI-TOF-MS-a. Kratkim pulsevima lasera (1-20 ns) bombardiraju se kristali matrice i uzorka što dovodi do njihove desorpcije i ionizacije (preuzeto i prilagođeno iz Clark i sur., 2013.).

MALDI-TOF-MS (Slika 13.) je brza metoda, kojom se u kratko vrijeme može analizirati veliki broj uzoraka (Kuckova i sur., 2007.), te je u današnje vrijeme jedna od najpopularnijih tehnika spektrometrije masa koja se koristi za brzu i osjetljivu analizu biomolekula (Dave i sur., 2011.; Horvatić i Cindrić, 2009.; Swiatly i sur., 2017.; Webster i Oxley, 2012.). Ubraja se u blage ionizacijske tehnike koje omogućuju ionizaciju molekula

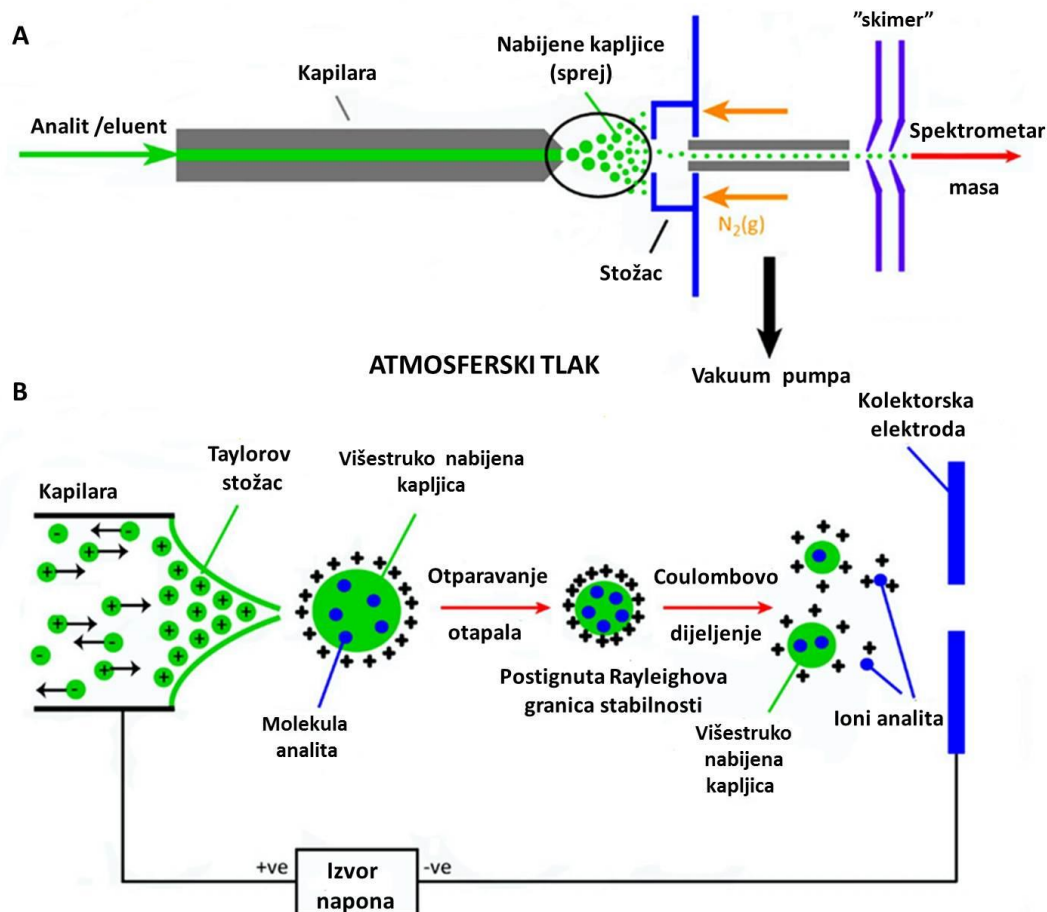
vrlo velikih molekulskih masa (do 200 kDa) te ovom tehnikom uglavnom nastaju jednostruko nabijeni ioni (Galić i Cindrić, 2008.; Horvatić i Cindrić, 2009.; Singhal i sur., 2015.). Analit se ugrađuje u kristalnu strukturu molekula matrice i kristalizira s matricom nakon isparavanja otapala (Kazazić i sur., 1999.; Chait i Kent, 1992.; Chalmers i Gaskel, 2000.; Pomastowski i sur., 2019.). Potom se kristalizirana matrica pod djelovanjem laserske zrake trenutno zagrijava (Senko i sur., 1994.) te dolazi do isparavanja i ionizacije molekula matrice i analita, pri čemu nastaju ioni protoniranih molekula, koji su najčešće jednostruko nabijeni, a javlja se i slabo izražena fragmentacija (Galić i Cindrić, 2008.). Ioni zatim ulaze u analizator masa, gdje se razdvajaju prema omjeru mase i naboja (Cindrić i sur., 2009.; Galić i Cindrić, 2008.; Kazazić i sur., 1999.; Pomastowski i sur., 2019.). Navedena se tehnika ionizacije zbog svojeg pulsnog karaktera najčešće primjenjuje u kombinaciji s analizatorom koji mjeri vrijeme leta (eng. Time Of Flight, TOF), odnosno vrijeme potrebno da ioni stignu do analizatora, što je proporcionalno njihovoj masi (Boesl, 2017.; de Hoffmann i Stroobant, 2007.; Galić i Cindrić, 2008.).

Ova je analitička metoda pogodna za analizu biomolekula i proteina koji vežu metale (Szpunar, 2004.; Szpunar i Łobiński, 2002.). MALDI-TOF-MS se odlikuje iznimnom osjetljivošću od femtomola do pikomola, a čak postoje radovi u kojima se određivanja vrše na nivou atomola (Gevaert i sur., 1997), velikom brzinom analiza (moguće je analizirati oko 100 uzoraka u 10 min) (Duncan i sur., 2008.; Galić i Cindrić, 2008.; Kuckova i sur., 2007.).

2.4.3.2. Ionizacija elektroraspršenjem (ESI)

ESI (engl. Electrospray Ionization) tehnika također spada u skupinu blagih ionizacijskih tehnika, a postupak se odvija pri atmosferskom tlaku (Slika 14.). Ioni koji nastaju mogu biti pozitivnog ili negativnog naboja te ovisno o kemijskoj strukturi analita, odnosno broju kemijskih skupina koje se mogu ionizirati, mogu biti jednostruko ili višestruko ionizirani (Cindrić i sur., 2009.; Mornar i sur., 2013.). Iako je pojava ionizacije elektroraspršenjem poznata još s početka 20. stoljeća, i prvi opis principa objavljen je 1968. (Dole i sur., 1968.), do razvoja ESI došlo je sredinom 1980.-ih nakon radova što su ih objavili John Fenn (Fenn i sur., 1989.; Yamashita i Fenn, 1984.) i grupa ruskih istraživača (Aleksandrov i sur., 1984.). Za ovaj doprinos znanosti, Fenn je dobio Nobelovu nagradu za kemiju 2002. godine. Važnost ESI-ja i njegov ogroman doprinos modernoj spektrometriji masa proizlazi iz njegovih jedinstvenih karakteristika. To je vrlo blagi način ionizacije koji uglavnom rezultira nastankom višestruko nabijenih molekulskih iona peptida/proteina te je moguće sačuvati i nekovalentno vezane biomolekularne komplekse tijekom prevođenja

molekula analita u plinsku fazu (Awad i sur., 2015.; Banerjee i Mazumdar, 2012.; Talkington i sur., 2005.).



Slika 14. Shematski dijagram koji prikazuje tijek rada u ESI-MS-u (preuzeto i prilagođeno prema Gates, 2014.). Proces elektroraspršenja prikladno je podijeliti u tri faze: nastajanje kapljica, otparavanje kapljica i nastajanje iona u plinskoj fazi (Bruins, 1998.; Cech i sur., 2001.; Galić, 2004.; Galić i Cindrić, 2009.).

Za razliku od MALDI ionizacije, primjenom ESI-ja nastaju i višestruko nabijeni ioni (Galić, 2004.; Ozeki i sur., 2019.). Kod ovog oblika ionizacije plinska faza i analit ulaze u ionizator kroz kapilaru koja predstavlja elektrodu priključenu na pozitivni kraj izvora napona (Cindrić i sur., 2009.). Pod utjecajem električnog polja razdvajaju se pozitivni i negativni naboji u otopini, pri čemu pozitivno nabijeni ioni putuju prema katodi i akumuliraju se na površini tekućine koja se nalazi na kraju kapilare (de Hoffmann i Strobant, 2007.). Pri kritičnoj jakosti električnog polja, na vršku kapilare se formira tzv. Taylorov stožac u kojem se neprestano proizvode kapljice obogaćene pozitivno nabijenim ionima (Bruins, 1998.;

Galić, 2004.; Ho i sur., 2003.;). Otapalo se zatim otparava pod utjecajem struje dušika, temperature i električnog potencijala te se smanjuje veličina kapljica (Cindrić i sur., 2009.). Kada se kapljice dovoljno smanje, tako da se svi ioni nalaze na njihovoj površini, dolazi do njihovog otparavanja ili razbijanja na manje kapljice (Coulombovo dijeljenje), nakon čega analit. Tako formirani molekularni ioni prelaze u visoki vakuum do analizatora masa (Slika 14.) (Cindrić i sur., 2009.; Crotti i sur., 2011.; Ho i sur., 2003.).

Dok je kod MALDI ionizacije neophodan kristalizirani uzorak, ESI ionizira analit u otopini što čini ovu tehniku pogodnom za povezivanje s HPLC sustavima (Glish i Vachet, 2003.). MALDI je pogodna tehnika za analizu relativno jednostavnih smjesa peptida (npr., pojedinačnih proteina), dok se HPLC-ESI-MS sustavi koriste za kompleksne uzorke (Fenn i sur., 1989.). Osjetljivost ESI tehnike dodatno je povećana smanjenjem brzine protoka analizirane otopine (npr. mikroraspršenjem ili nanoraspršenjem) pa je granica detekcije spuštена do reda veličine atomola (10^{-18} mol) (Galić, 2004.; Valaskovic i sur., 1995.). Dodatna prednost u analizi iona može se ostvariti primjenom tandemne spektrometrije masa (LC-MS/MS), s ciljem da se poboljša fragmentacija iona, kako bi se na temelju dobivenih spektara masa odredila struktura analiziranog iona (Goudou i sur., 2008.).

2.4.4. Metalomika u okolišnim istraživanjima

Od svoga su otkrića, ionizacijske metode spektrometrije masa elektroraspršenje (ESI-MS) i matricom potpomognuta ionizacija i desorpcija laserskim zračenjem (MALDI-MS) te ICP-MS postale iznimno važne tehnike u analizi bioloških makromolekula (Gómez-Ariza i sur., 2004.; Mounicou i sur., 2009.; Sanz-Medel, 2005.; Szpunar, 2004.). Iako navedene tehnike u metalomici pružaju veliki broj mogućnosti u istraživanjima (Montes-Bayón i sur., 2003.), što je prepoznato u mnogim znanstvenim područjima, primjena metalomike u okolišnim istraživanjima nije još dovoljno prisutna te se takva istraživanja uglavnom provode u strogo kontroliranim laboratorijskim uvjetima, najčešće nakon izlaganja samo jednome metalu, dok su istraživanja u stvarnim okolišnim uvjetima iznimno rijetko zastupljena. Primjer takvih laboratorijskih istraživanja su istraživanja metabolizma Fe na laboratorijskim štakorima hranjenim mlijekom bogatim željezom (Alves Peixoto i sur., 2019.; Fernández-Menéndez i sur., 2018.) te Cd i As na izlaganom domaćem mišu (*Mus musculus*; García-Sevillano i sur., 2014.).

Sustavni metalomički pristup u izučavanju biomolekula koje vežu metale u raznim vodenim organizmima još uvijek nije opsežno primijenjivan te stoga predstavlja područje širokih mogućnosti za ekotoksikološka znanstvena istraživanja. Dosad je otkriveno tek

nekoliko metaloproteina u ribama koji se primjenjuju kao biomarkeri, dok njihove funkcionalne uloge u fiziologiji riba još uvijek nisu u cijelosti poznate (Hauser-Davis i sur., 2012.). Donedavno se metalomička tehnologija na vodenim organizmima uglavnom koristila u istraživanju pojedinačnih metaloproteina, poput metalotioneina (MT), primjenom različitih tehnika tekućinske kromatografije visoke djelotovornosti (Lobinski i sur., 1998.). Razdvajanje biomolekula pomoću dvodimenzionalne kromatografije (SEC-AEC-HPLC) primijenjeno je tijekom istraživanja MT iz nekoliko ribljih vrsta, poput jegulje (*Anguilla anguilla*; Rodríguez-Cea i sur., 2003.; Van Campenhout i sur., 2008.), bisernog ciklida (*Geophagus brasiliensis*; Rodríguez-Cea i sur., 2006.), plosnatica (*Limanda limanda* i *Microstomus kitt*; Duquesne i Richard, 1994.), limande (*L. limanda*; Lacorn i sur., 2001.), kao i iz dagnji (*Mytilus edulis*; Geret i Cosson, 2002.). Nadalje, Goenaga Infante i sur. (2006.) analizirali su komplekse metala s izoformama MT primjenom AEC-HPLC-a u kombinaciji s ICP-MS-om u babuški (*Carassius auratus gibelio*), dok su Lavradas i sur. (2016.) primjenom elektroforeze (SDS-PAGE) i SEC-HPLC-a u kombinaciji s ICP-MS-om proveli istraživanje toplinski stabilnih proteina metalotioneina u školjkašima (*Perna perna*). Dvodimenzionalno razdvajanje pomoću SEC-AEC-HPLC-a nadograđeno MS analizama primijenjeno je i u identifikaciji kompleksa Hg, Cd, Cu i Zn s metalotioneinima u jetrima bjeloboke pliskavice (*Lagenorhynchus acutus*; Pedrero i sur., 2012.) te u istraživanju indukcije i vezanja Cd, Cu i Zn na MT u jetrima, bubregu i škragama šarana (*Cyprinus carpio*; Goenaga Infante i sur., 2003.).

Nadalje, pojedini istraživači metalomički pristup koriste u istraživanju pojedinačnih metala i biomolekula koje ih vežu. Na primjer, primjenom višestrukog analitičkog pristupa koji povezuje ionsko-izmjenjivačku kromatografiju, detektore za elemente (ICP-MS) i molekularne detektore (ESI-MS, LC-MS/MS i MALDI-TOF-MS), sa svrhom olakšane identifikacije metaloproteina u vrlo niskim koncentracijama (Gómez-Ariza i sur., 2004.), omogućena je i identifikacija i karakterizacija biomolekula koje vežu Fe u kalifornijskoj pastrvi (*Oncorhynchus mykiss*; Fago i sur., 2002.), dok je karakterizacija selenoproteina u pacifičkoj plavoperajnoj tuni (*Thunnus orientalis*) provedena dvodimenzionalnim kromatografskim razdvajanjem (SEC-AEC-HPLC) u kombinaciji s LC-ESI-MS-om (Yamashita i Yamashita, 2010.).

Kanadska grupa znanstvenika tek je nedavno započela s istovremenim istraživanjem sudbine većeg broja metala u vodenim organizmima, uključujući njihovu raspodjelu unutar tkiva i u različitim unutarstaničnim odjeljcima (npr., citosolu, granulama i organelima) primjenom diferencijalnog centrifugiranja (Vijever i sur. 2004.; Campbell i sur. 2005.; Giguère i sur., 2006.) te njihovu specijaciju u citosolu primjenom različitih analitičkih tehnika

koje se primjenjuju u metalomici (Caron i sur., 2018.; Urien i sur., 2018.). Primjena diferencijalnog centrifugiranja značajna je za procjenu raspodjele metala između staničnih frakcija osjetljivih na metale i detoksiciranih frakcija metala. Prema Wallace i sur. (2003.), stanične frakcije osjetljive na prisutnost metala uključuju organele (mitohondriji, lizosomi, mikrosomi) i toplinski nestabilne proteine (poput enzima), dok detoksicirane frakcije metala uključuju granule bogate metalima i toplinski stabilne proteine (poput metalotioneina). Takva je unutarstanična raspodjela metala specifična za pojedini metal, organ i organizam, ali i dinamična ovisno o uvjetima izloženosti metalima i nizu drugih okolišnih čimbenika (Wang i Rainbow, 2006.). Ista je skupina znanstvenika u novije vrijeme proširila svoja istraživanja uvođenjem metalomičkih metoda, provodeći istovremene analize cijelog niza metala u ribama s ciljem određivanja njihove raspodjele među citosolskim biomolekulama različitih molekulskih masa. Citosolske raspodjele za Ag, Cd, Cu, Co, Ni i Tl odredili su u mladim američkim žutim grgečima (*Perca flavescens*, Caron i sur., 2018.), a za Cd, Cu, As i Se u bijelim sisačima (*Catostomus commersonii*, Urien i sur., 2018.), pomoću kombinacije SEC-HPLC-a i ICP-MS-a.

Metalomičke pristupe i strategije potrebno je češće sustavno primjenjivati u okolišnim istraživanjima, sa svrhom otkrivanja mehanizama koji se nalaze u pozadini metaboličkih funkcija, mehanizama detoksikacije i toksičnih učinaka metala te naposljetku identificiranja novih biomarkera izloženosti metalima i njihovih učinaka (Gómez-Ariza i sur., 2004.; Hauser-Davis i sur., 2012.; Mounicou i sur., 2009.).

ZNANSTVENI RADOVI

3.1. Distribution of selected essential (Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Se, Zn) and nonessential (Cd, Pb) trace elements among SEC-HPLC separated protein fractions from hepatic cytosol of European chub (*Squalius cephalus*)

Nesrete Krasnići, Zrinka Dragun, Marijana Erk, Biserka Raspor

Environmental Science and Pollution Research 20 (2013), 4: 2340-2351.

doi:10.1007/s11356-012-1105-8

3.2. Distribution of Co, Cu, Fe, Mn, Se, Zn, and Cd among cytosolic proteins of different molecular masses in gills of European chub (*Squalius cephalus* L.)

Nesrete Krasnići, Zrinka Dragun, Marijana Erk, Biserka Raspor

Environmental Science and Pollution Research 21 (2014), 23: 13512-13521.

doi:10.1007/s11356-014-3274-0

3.3. Size-exclusion HPLC analysis of metal/metalloid distribution in hepatic and gill cytosol of Vardar chub (*Squalius vardarensis* Karaman) from mining impacted rivers in north-eastern Macedonia

Nesrete Krasnići, Zrinka Dragun, Marijana Erk, Sheriban Ramani, Maja Jordanova, Katerina Rebok, Vasil Kostov

Science of the Total Environment 613/614 (2018): 1055-1068.

doi:10.1016/j.scitotenv.2017.09.160

3.4. Characterization and identification of selected metal-binding biomolecules from hepatic and gill cytosols of Vardar chub (*Squalius vardarensis* Karaman, 1928) by various techniques of liquid chromatography and mass spectrometry

Nesrete Krasnići, Zrinka Dragun, Saša Kazazić, Snježana Kazazić, Hasan Muharemović, Marijana Erk, Maja Jordanova, Katerina Rebok, Vasil Kostov

Metallomics 11 (2019), 1060-1078. doi:10.1039/C9MT00036D

RASPRAVA

4. RASPRAVA

Metali predstavljaju važnu sastavnicu svakog vodenog okoliša te o njihovoj prisutnosti često ovisi i biorazolikost vodenih ekosustava. Onečišćenje voda metalima je u porastu zbog tehnološkog napretka ljudske zajednice, pri čemu najznačajniju ulogu imaju industrija, rudarstvo, napredna poljoprivreda, otpad iz domaćinstava i promet. Zbog toksičnosti metala, njihovog trajnog zadržavanja u okolišu i mogućnosti akumulacije u tkivima vodenih organizama, onečišćenje vodenih ekosustava metalima može predstavljati ozbiljan problem (Harte i sur., 1991.). Za razliku od organskih zagađivala, metali se ne mogu kemijski niti biološki razgraditi. Stoga jednom uneseni u vodotoke mogu promijeniti kemijski oblik te postati manje ili više toksični, ali se ne mogu ukloniti iz biogeokemijskog kruženja (Sadiq, 1992.). Kao posljedica može doći do razvoja kroničnih oboljenja vodenih organizama te se poremećaji mogu pojaviti čak i na razini populacije (Holcombe i sur., 1976.). Neki metali u živim organizmima imaju važnu biološku ulogu (npr., Cu, Fe, Zn) te su nazvani esencijalnim metalima, a sastavni su dio enzima i drugih proteina, takozvanih metaloproteina (Smith i sur., 1997.). Metaloproteini su uključeni u transport elektrona i metala, skladištenje kisika, hidrolize kemijskih veza, redoks procese i sinteze bioloških spojeva (Gellein i sur., 2007.). Za niz drugih metala (npr., Cd, Pb) funkcije u živim organizmima nisu poznate te su stoga nazvani neesencijalnim metalima. Štetni utjecaj metala nastupa pri unosu neesencijalnih metala već u vrlo niskim količinama ili esencijalnih metala u prekomjernim količinama koje mogu narušiti homeostazu organizma. Na taj način može nastati štetno djelovanje na različitim organizacijskim razinama, počevši od stanice, preko pojedinačnih organizama pa sve do populacije, što napokon može štetno utjecati i na zdravlje ljudi koji vodene organizme koriste u prehrani (Livingstone, 1993.).

Za ovo istraživanje kao bioindikatorski organizmi izabrane su dvije vrste riba (klen, *S. cephalus* Linnaeus, 1758., i vardarski klen, *S. vardarensis* Karaman, 1928.). Dosadašnja istraživanja na ovim bioindikatorskim organizmima provedena u svrhu procjene izloženosti metalima bila su utemeljena na određivanju ukupnih ili citosolskih koncentracija metala bioakumuliranih u njihovim organima (npr., Casiot i sur., 2009.; Dragun i sur., 2007.; 2009.; 2012.; 2013.a; 2013.b; 2016.; 2019.; Duman i Kar, 2012.; Podrug i sur., 2009.; Rašković i sur., 2018.). Metali akumulirani u organima riba raspodijeljeni su u različite unutarstanične odjeljke (npr., citosol, granule, organele, stanične membrane). Pretpostavlja se da toksičnost metala za vodene organizme potječe od reakcija u citosolu, putem njihovog nespecifičnog

vezanja na fiziološki važne molekule te posljedične inaktivacije tih biomolekula (Mason i Jenkins, 1995.). Stoga, ukupne i citosolske koncentracije metala ne daju potpunu informaciju o metabolizmu, bioraspoloživosti te mogućim toksičnim učincima metala, kao ni o njihovoj detoksikaciji (de la Calle Guntiñas i sur., 2002.). Svi navedeni procesi na staničnoj i molekularnoj razini ovise o vezanju metala na različite stanične biomolekule, a te biomolekule, kao ni biološka funkcija i mehanizmi toksičnosti mnogih metala u vodenim organizmima, još uvijek nisu dovoljno istraženi. Tek je nekoliko biomolekula na koje se metali vežu u stanicama vodenih organizama dosad prepoznato i iscrpno opisano npr., metalotioneini (MT) (Cd, Cu, Zn, Rodriguez-Cea i sur., 2003.; Goenaga Infante i sur., 2003.; Van Campenhout i sur., 2008.; Li i sur., 2018.), transferin (Fe, Neves i sur, 2009.; Mn, Schäfer, 2004.), hemoglobin (Fe, Fago i sur., 2002), peptidi koji vežu Se (Yamashita i Yamashita, 2010.). Stoga je cilj ovoga rada bio primijeniti moderne analitičke pristupe u opisivanju i prepoznavanju odabranih biomolekula koje vežu metale u jetrima i škrigama dviju vrsta klena, što će dalje u raspravi biti iscrpno izneseno.

4.1. Raspodjela odabranih esencijalnih (Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Se, Zn) i neesencijalnih (Cd, Pb) elemenata među citosolskim biomolekulama različitih molekulskih masa u jetrima i škrigama klena (*S. cephalus*) iz rijeke Sutle

U ovome smo dijelu istraživanja opisali temeljne raspodjele devet odabranih metala/nemetala među citosolskim biomolekulama različitih molekulskih masa u jetrima i škrigama klenova (*S. cephalus*), odnosno utvrdili smo raspone molekulskih masa citosolskih biomolekula koje vežu esencijalne elemente Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Se i Zn te neesencijalne elemente Cd i Pb u uvjetima niske izloženosti u okolišu. Nadalje, opisali smo i promjene raspodjela koje se javljaju pri povišenoj bioakumulaciji navedenih elemenata. Rezultati ovog dijela istraživanja objavljeni su u radovima pod rednim brojem 1 i 2 u popisu znanstvenih radova (str. 35-56).

Kao ciljne organe za ove analize odabrali smo jetra klena, jer odražavaju dugoročno pohranjivanje metala, te škrge, jer odražavaju koncentracije metala u vodi u kojoj ribe prebivaju (Romeo i sur., 1999.). Kako su ribe migratorni organizmi koji ne obitavaju samo na jednom području rijeke, prednost je škrge kao ciljnog organa što odražavaju trenutnu izloženost metalima u vodi u kojoj se ribe nalaze, dok se u jetrima kao glavnom detoksikacijskom organu može uočiti utjecaj dugotrajne izloženosti, koja može biti vezana i uz neki drugi dio riječnog toka, a ne isključivo uz onaj u kojemu je riba ulovljena (Giguère i

sur., 2004.; Romeo i sur., 1999.). Prema nekim se istraživanjima u škrigama uslijed izravnog dodira s vodom može očekivati brzi odgovor na promjene u razini izloženosti metalima, poput Cd (Barišić i sur., 2015.; Kraemer i sur., 2005.). U škrigama se očekuje niža razina bioakumulacije za većinu elemenata u odnosu na jetra, budući da se akumulirani metali iz škriga krvlju prenose u jetra i druge organe (Souza i sur., 2013.).

Klenovi korišteni u ovome istraživanju uzorkovani su u rijeci Sutli u Hrvatskoj u rujnu 2009. godine. Koncentracije otopljenih metala u vodi rijeke Sutle u jesen 2009. godine bile su većinom usporedive s nezagađenim vodotocima ili umjereno povišene (Co, 0,06-0,42 $\mu\text{g L}^{-1}$; Cu, 0,17-3,74 $\mu\text{g L}^{-1}$; Fe, 3,1- 80,5 $\mu\text{g L}^{-1}$; Mn, 0,4-261,1 $\mu\text{g L}^{-1}$; Mo, 0,5-20,1 $\mu\text{g L}^{-1}$; Zn, $<5,0 \mu\text{g L}^{-1}$; Cd, 0,01-0,31 $\mu\text{g L}^{-1}$; Pb, $\leq 1,18 \mu\text{g L}^{-1}$; Dragun i sur., 2011.). Izuzetak su predstavljale uočljivo povišene koncentracije otopljenog Fe, Mn, Cd i Pb na pojedinim ograničenim područjima ove rijeke, koje su omogućile praćenje promjena citosolskih raspodjela tih metala u jetrima i škrigama klena pri povišenoj izloženosti u riječnoj vodi.

Prema našim saznanjima, rezultati dobiveni u ovome istraživanju prvi su podaci o citosolskim raspodjelama devet odabranih elemenata u jetrima i škrigama klena, kao bionidikatorskog organizma. Uobičajeni prvi korak u prepoznavanju biomolekula koje vežu metale predstavlja frakcioniranje citosola primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s isključenjem po veličini (SEC-HPLC) te određivanje koncentracija metala i nemetala u frakcijama koje sadrže biomolekule određenih molekulskih masa primjenom masenog spektrometra s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS) (Michalke i Schramel, 2004.; Montes-Bayón i sur., 2003.). Na taj se način može doći do informacija o profilima raspodjele pojedinih elemenata među citosolskim biomolekulama različitih molekulskih masa, što predstavlja početnu točku u identifikaciji tih biomolekula. Radi jednostavnijeg opisivanja profila raspodjele dobivenih primjenom SEC₂₀₀-HPLC-a (kolona Superdex 200, raspon razdvajanja 10-600 kDa) i ICP-MS-a visoke rezolucije (HR), definirali smo četiri glavne skupine biomolekula koje vežu metale, uzimajući u obzir njihovu molekulsku masu:

1. VMM ili biomolekule visoke molekulske mase ($>100 \text{ kDa}$);
2. SMM ili biomolekule srednje molekulske mase (30-100 kDa);
3. NMM ili biomolekule niske molekulske mase (10-30 kDa);
4. JNMM ili biomolekule jako niske molekulske mase ($<10 \text{ kDa}$).

Među analiziranim elementima, esencijalni metali Co, Mo, Mn i Zn imali su najuži raspon citosolskih koncentracija u jetrima i škrigama klena. U usporedbi s prethodnim istraživanjima i uzimajući u obzir nisku izloženost klenova ovim metalima u rijeci Sutli,

citosolske koncentracije Co (jetra: 2,1-5,1 ng mL⁻¹; škrge: 1,02-1,60 ng mL⁻¹), Mo (jetra: 8,7-38,5 ng mL⁻¹; škrge: 0,56-8,41 ng mL⁻¹), Mn (jetra: 73,5-252,8 ng mL⁻¹; škrge: 33,7-69,1 ng mL⁻¹) i Zn (jetra: 3,0-11,1 µg mL⁻¹; škrge: 9,6-21,0 µg mL⁻¹) u jetrima i škragama klenova bilo je moguće definirati kao bazalne razine (Dragun i sur., 2013.a; 2013.b; 2016.; Podrug i sur., 2009.). Stoga je za navedena četiri metala bilo moguće utvrditi samo temeljnu raspodjelu među biomolekulama različitih molekulskih masa, karakterističnu za uvjete niske izloženosti metalima u riječnoj vodi.

Kobalt je esencijalni element za ribe i druge organizme, a ima važnu ulogu u izgradnji kobalamina (vitamina B12), u kojemu čini 4,5% molekulske mase (Blust, 2012.). Kobalt u suvišku može djelovati toksično na ribe, jer kationi kobalta (Co²⁺) ometanjem transporta Ca mogu ometati normalnu funkciju škrge, uključujući ionsku regulaciju, održavanje acidobazne ravnoteže, prijenos plinova te izlučivanje suvišnog dušika (Hille, 1992.; Richards i Playle, 1998.). Kobalt nadalje može sudjelovati u procesima stvaranja slobodnih radikala, što rezultira proizvodnjom reaktivnih vrsta kisika (Battaglia i sur., 2009.; Olivieri i sur., 2001.; Wang i sur., 1993.). No, Co je ipak manje toksičan za ribe u usporedbi s toksičnim učincima drugih metalnih iona (Kubrak i sur., 2011.; Marr i sur., 1998.). Niska citosolska koncentracija Co u jetrima mogla bi se objasniti njegovim većim afinitetom za akumulaciju u crijevima i bubrezima nego u jetrima pri umjerenj izloženosti, što je uočeno u istraživanjima na različitim vrstama riba (Baudin i Fritsch, 1989.), dok uloga jetre postaje važnija tek nakon povećane izloženosti kobaltu (Mukherjee i Kaviraj, 2009.). Profili raspodjele Co među citosolskim biomolekulama u jetrima i škragama klena ukazali su na značajnu prisutnost ovoga metala u području VMM biomolekula (jetra: 61-407 kDa; škrge: 20-310 kDa), dok je dio Co bio raspodijeljen i između dva JNMM područja citosolskih biomolekula (maksimumi na ~4 kDa i 1-2 kDa), pri čemu drugo područje odgovara molekulskoj masi kobalamina (1.3 kDa; Kirschbaum, 1981.). Raspodjela Co između triju navedenih molekulskih područja u jetrima klena bila je jasnija, a pikovi su bili viši, uži i oštriji u odnosu na škrge, kao posljedica ~2-3 puta viših citosolskih koncentracija Co u jetrima nego u škragama. Nadalje, prisutnost Co u jetrima bila je dominantno vezana uz VMM biomolekule, dok je u škragama bila usporediva u svim trima skupinama biomolekula. Iako je najpoznatija uloga Co vezana uz izgradnju strukture kobalamina, profili raspodjele Co u jetrima klena ukazuju na značajnu ulogu te potrebu daljnjeg istraživanja VMM biomolekula koje vežu Co.

Molibden je važan esencijalni mikronutrijent koji čini katalitički centar više od pedeset enzima (Ricketts, 2009.) te služi kao kofaktor za najmanje sedam enzima (Beers i

Berkow, 1998.). Reid (2002.) je uočio da se Mo, za razliku od Co, akumulira u jetrima riba neovisno o dozi te da ne postoji poznati homeostatski kontrolni sustav za Mo u ribama unatoč činjenici da je riječ o bitnom mikronutrijentu. Niske citosolske koncentracije Mo u jetrima i škragama klena stoga mogu biti objašnjene otkrićem Anana i sur. (2002.), koji su u istraživanjima na kornjačama također izmjerili niske koncentracije Mo u citosolu uslijed specifične akumulacije Mo u jezgri i mitohondrijima. Zbog naročito niskih citosolskih koncentracija Mo u škragama (0,56-8,41 ng mL⁻¹; Dragun i sur., 2016), profile raspodjele bilo je moguće odrediti samo za jetra klena. Najveći dio Mo u jetrima bio je eluiran u području VMM biomolekula (62-407 kDa), koje obuhvaćaju poznate enzime kojima je Mo kofaktor, poput aldehid oksidaze, ~130 kDa (Uchida i sur., 2003.), sulfid oksidaze, ~120 kDa (Johnson i Rajagopalan, 1976.) te Fe-Mo flavoprotein ksantin oksidaze, 275 kDa (Truglio i sur., 2002.). Manji dio Mo bio je eluiran u području JNMM (maksimum na 7,1 kDa). Usporedbom sa standardom MT (MM eluiranja nakon SEC-HPLC razdvajanja: 12,5 kDa) utvrdili smo da se Mo u jetrima klena ne veže na MT pri izloženosti molibdenu u riječnoj vodi do 20 µg L⁻¹. Naši su rezultati bili u skladu s tvrdnjama Rickettsa (2009.) i Reida (2011.) da MT nije uključen u detoksikaciju molibdena kod potočne pastrve (*Salmo trutta*) i kalifornijske pastrve (*Oncorhynchus mykiss*), čak ni pri izloženosti do 1000 mg L⁻¹.

Mangan u živim organizmima ima esencijalnu ulogu u aktivnosti raznih enzima, poput Mn-superoksid dismutaze, piruvat karboksilaze, jetrene arginaze, glutamin sintetaze i oksalacetat dekarboksilaze te ga možemo naći i u proteinima poput β-globulina i albumina (Fridovich i Freeman, 1986.; Garcia i sur., 2006.; Libor i sur., 1979.; Mogobe i sur., 2015.; Singh i Singh 1990.). Niske koncentracije Mn u citosolima jetara i škraga klena unatoč povremeno visokoj izloženosti u riječnoj vodi moguće je objasniti postojanjem homeostatske kontrole, ali i, slično Mo, većom zastupljenošću ovoga metala u mitohondrijima nego u citosolu. Dva najvažnija manganova metaloenzima kod sisavaca, Mn-superoksid dismutaza, jedan od najvažnijih unutarstaničnih antioksidacijskih enzima, te piruvat karboksilaza, lokalizirana su u mitohondrijima. Profili raspodjele Mn u jetrima ukazuju na njegovu prisutnost u tri biomolekulska područja, koja pokrivaju široko područje molekulskih masa (7-400 kDa): VMM biomolekule (62-407 kDa), SMM biomolekule (36-62 kDa) te NMM biomolekule (7-36 kDa). Budući da su koncentracije Mn u citosolu škraga bile čak do 8 puta niže u usporedbi s koncentracijama Mn u citosolu jetara, pikovi Mn u škragama bili su slabije razlučeni te je Mn bio raspodijeljen unutar istog područja molekulskih masa kao i u jetrima, ali u samo dva biomolekulska područja. Prvo područje pokriva VMM i SMM biomolekule

(35-310 kDa), a drugo odgovara NMM piku jetara (2-35 kDa). Molekulske mase biomolekula s kojima je eluiran najveći dio mangana (VMM i SMM) obuhvaćaju i molekulske mase enzima arginaze (100 kDa; Wolf i sur., 2007.) i Mn-superoksid dismutaze (~88-95 kDa; Fridovich i Freeman, 1986.), kao i molekulske mase poznatih transportnih proteina, albumina (66 kDa) i transferina (80 kDa; Martin-Antonio i sur., 2009.). Albumin sudjeluje u transportu Mn iz probavnog sustava u jetra, dok transferin veže Mn u jetrima te u tom obliku predstavlja izvor Mn za prijenos u druga tkiva (Schäfer, 2004.).

Cink je esencijalni element za sve stanice svih poznatih organizama te je nakon Fe drugi najzastupljeniji element u tragovima u većini kralježnjaka (Vallee, 1986.). Neophodan je za različite osnovne biološke procese, uključujući metabolizam proteina, nukleinskih kiselina, ugljikohidrata i lipida, a također je uključen i u rad imunološkog sustava, neurotransmisiju i staničnu signalizaciju (Beyersmann, 2002.; Coleman, 1992.; Murakami i Hirano, 2008.). Sastavni je dio enzima koji kataliziraju više od 50 različitih biokemijskih reakcija te je sastavni dio i proteina uključenih u ekspresiju gena (Hogstrand i sur, 1991.; de la Calle Guntiñas i sur., 2002.). Visoke koncentracije cinka u stanicama mogu izazvati toksičnost za vodene organizme, zbog čega je Agencija za zaštitu okoliša SAD-a uključila Zn u popis prioritetnih zagađivala (USEPA, 2002.). Međutim, ribe su sposobne regulirati akumulaciju Zn i održavati ga u uskim koncentracijskim rasponima čak i pri vrlo visokoj izloženosti u okolišu (Watanabe i sur., 1997). Istraživanje na jetrima grgeča (*Perca fluviatilis*) (Hogstrand i sur. 1991.) pokazalo je da stotruko povećanje ukupne koncentracije Zn u vodi dovodi do samo 20% povišene akumulacije Zn u jetrima grgeča (Hogstrand i sur., 1991.). Kako su koncentracije otopljenog Zn u vodi rijeke Sutle bile vrlo niske (<5 $\mu\text{g L}^{-1}$; Dragun i sur., 2011.), bilo je očekivano da će koncentracije citosolskog Zn u jetrima i škrigama klena biti održane unutar bazalnog raspona. Raspodjela Zn u jetrima i škrigama klenova karakterizirana je slabom razlučivošću pikova koji pokrivaju širok raspon molekulskih masa (~10 do >600 kDa), što ukazuje na vezanje Zn na veliki broj staničnih biomolekula. Takav rezultat je u skladu sa strukturnim i katalitičkim ulogama Zn u brojnim proteinima i enzimima. Potvrđeno je kako kod ljudi više od 3.000 proteina veže Zn, što predstavlja 10% cjelokupnog ljudskog genoma, dok je kod riba utvrđeno da 10% svih gena u sekvenciranom genomu nosi oznaku vezanja Zn (Andreini i sur., 2006.; Passerini i sur., 2007.). Profili raspodjele Zn u jetrima klena obuhvaćali su, dakle, tri glavna pika: VMM (~400 do >600 kDa), SMM (~35-400 kDa) i NMM (~9-27). Profili raspodjele Zn u škrigama klena obuhvaćali su četiri glavna pika: VMM1 (~400 do >600 kDa), VMM2 (10-310 kDa), JNMM1

(1-5) i JNMM2 (<1). Molekulske mase VMM i SMM biomolekula koje vežu Zn u jetrima i škragama klena obuhvaćaju, na primjer, molekulske mase enzima alkohol dehidrogenaze (150 kDa), transportnog proteina albumina (66 kDa), Cu-Zn superoksid dismutaze (32,5 kDa) i ugljične anhidraze (29 kDa) (Sanz-Medel i sur., 2003.; Szpunar i Lobinski, 1999.). U jetrima je zabilježeno i eluiranje Zn koje se podudara s vremenom eluiranja MT, što je u skladu sa značajnom ulogom MT, proteina niskih molekulskih masa bogatih cisteinom, u detoksikaciji toksičnih metala, poput Cd, i održavanju homeostaze esencijalnih metala, poput Zn i Cu (Coyle i sur., 2002.; Huang i sur., 2004.). U škragama jasno razlučeni pik cinka u području eluiranja MT nije bio zabilježen, ali je uočeno eluiranje Zn u JNMM području biomolekula (<5 kDa), i to samo u uzorcima škrge s višim citosolskom koncentracijama cinka.

Za razliku od esencijalnih metala Co, Mo, Mn i Zn, preostala tri analizirana esencijalna elementa, metali Fe i Cu te nemetal Se, imali su širi raspon citosolskih koncentracija u jetrima klena, dok su u škragama bili prisutni u relativno uskom koncentracijskom području: Fe (jetra: 2,3-16,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$; škrge: 3,27-5,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$), Cu (jetra: 0,45-3,87 $\mu\text{g mL}^{-1}$; škrge: 40,7-76,0 ng mL^{-1}) i Se (jetra: 25,6-229,2 ng mL^{-1} ; škrge: 59,6-147,2 ng mL^{-1}). Ovakvi rezultati ukazuju na pojačanu akumulaciju navedenih elemenata u jetrima klena, dijelom zbog povećane izloženosti (na primjer, Fe), a dijelom zbog manje izražene regulacije unosa i pohranjivanja. Zbog širokog koncentracijskog raspona navedena tri elementa u jetrima klena, bilo je moguće osim opisivanja temeljnih profila raspodjele metala/nemetala među biomolekulama različitih molekulskih masa zabilježiti i promjene u njihovim raspodjelama nastale uslijed povišene akumulacije u jetrima pri umjereno povišenoj izloženosti u riječnoj vodi. Usporedno će biti opisane i temeljne raspodjele Fe, Cu i Se u škragama klena.

Željezo je metal esencijalan za život, jer ima mnogobrojne uloge u fiziološkim funkcijama živih organizama. Sastavni je dio metaloproteina hemoglobina koji sudjeluje u prijenosu kisika krvlju te citokrom oksidaze koja sudjeluje u mitohondrijskom prijenosu elektrona (Bury i sur., 2012.). Također ima važnu ulogu u sintezi DNA (Bury i sur., 2012.) te u obrani od bakterijskih infekcija (Vidal i sur., 1993.). Temeljni profili raspodjele Fe među citosolskim biomolekulama, kako u jetrima, tako i u škragama klena, ukazali su na prisutnost željeza u dva područja citosolskih biomolekula: VMM (~150-700 kDa) i SMM (~10-80 kDa). Opravdano je pretpostaviti kako VMM biomolekule koje vežu Fe (maksimum na ~400 kDa) odgovaraju proteinu feritinu (450 kDa), koji je predominantno prisutan u jetrenom tkivu, a služi za pohranu te održavanje Fe u citoplazmi u topljivom, bioraspoloživom i netoksičnom

obliku (Martin-Antonio i sur., 2009.; Szpunar i Lobinski, 1999.). Prisutnost Fe u području SMM biomolekula vjerojatno je rezultat vezanja Fe na poznate proteine raznih funkcija, poput krvnog proteina hemoglobina (65 kDa), enzima katalaze (60 kDa) (Martin-Antonio i sur., 2009.) ili transportnog proteina mioglobina (17 kDa) (Wolf i sur., 2007.). Razlika između jetara i škriga prvenstveno se očitovala u povišenoj prisutnosti Fe u feritinskom piku u jetrima, dok je u škrigama Fe dominantno prisutno u području SMM biomolekula. Nadalje, u jetrima je povišenje citosolskih koncentracija Fe bilo praćeno porastom feritinskog pika, što ukazuje na značajnu ulogu jetre, ali ne i škriga, u skladištenju Fe. Neves i sur. (2009.) su također potvrdili jaču ekspresiju feritina u jetrima, kao glavnom organu za pohranu Fe, u usporedbi s mozgom brancina (*Dicentrarchus labrax*).

Bakar je neophodan za normalno funkcioniranje svih stanica, a važan je sastavni dio proteina i enzima (Mumtaz, 2002.). Esencijalni je element za sve aerobne organizme budući da se njegov redoks potencijal koristi pomoću mitohondrijske citokrom c oksidaze u staničnom disanju (Solomon i Lowery, 1993.). Neophodan je i za niz drugih metaboličkih procesa (npr., stvaranje vezivnog tkiva, stvaranje i održavanje mijelina, uklanjanje slobodnih radikala superoksida) (Gaetke i sur., 2014.), jer ima važnu ulogu kao kofaktor brojnih enzima i metaloproteina (Hauser-Davis i sur., 2012.). Glavni organ za pohranjivanje i održavanje homeostaze Cu su jetra, gdje se sintetizira protein koji sadrži Cu, ceruloplazmin, koji se izlučuje u krv te predstavlja izvor Cu za sve ostale organe (Harris, 2000.). Profili raspodjele Cu među citosolskim biomolekulama u jetrima klena ukazali su na njegovu najizraženiju prisutnost u području NMM biomolekula (maksimum na 16 kDa), što odgovara standardu MT, pa se može pretpostaviti da se u citosolu jetara Cu dominantno veže na taj protein. Naši su rezultati pokazali da u citosolu jetara klena MT ima dominantnu ulogu u vezanju, a tako i detoksikaciji Cu. To je potvrđeno i porastom prisutnosti Cu u najvećoj mjeri u području MT pri povišenju citosolskih koncentracija Cu u jetrima. Manja količina Cu u jetrima bila je raspodijeljena i unutar SMM biomolekulskog područja (27-62 kDa), što može ukazivati na vezanje Cu na poznate biomolekule raznih funkcija, poput superoksid dismutaze (32 kDa, Richardson i sur., 1975.) ili ugljične anhidraze (29 kDa). Sanchez i sur. (2005.) smatrali su kako vezanje Cu na biomolekule superoksid dismutaze ukazuje na bitnu ulogu Cu u zaštiti od oksidacijskog stresa, dok su Vutukuru i sur. (2006.) ukazali na vezanje Cu na superoksid dismutazu kao na potencijalni rizik od inhibicijskog učinka na taj antioksidacijski enzim, što znači da je potrebno razmotriti značaj prisutnosti Cu u području molekulskih masa viših od molekulske mase MT. Raspodjela Cu u škrigama klena otkrila je da se značajan dio ovoga

metala pojavljuje u području VMM biomolekula (~60 do >600 kDa), što nije uočeno kod jetara klena. No, slično jetrima, dominantna količina Cu eluirana je u području SMM biomolekula (5-60 kDa), koje obuhvaćaju i molekulsku masu MT. Vezanje na MT ipak je bilo izraženije i jasnije u jetrima, vjerojatno zbog značajnije uloge jetara u pohranjivanju Cu. Zanimljivo je da je, za razliku od jetara, u uzorcima s povišenom koncentracijom citosolskog Cu u škrgama bilo uočeno pojačano vezanje Cu na VMM biomolekule, koje mogu obuhvaćati albumin (66 kDa), ceruloplazmin (151 kDa; Boivin i sur., 2001.), β -amilazu (200 kDa) ili transkriptin (270 kDa; Liu i sur., 2007.), a koje može ukazivati na povećani rizik od toksičnog učinka bakra.

Selen je nemetal, esencijalni element za žive organizme, ali s vrlo uskim rasponom esencijalnosti i toksičnosti (Jukola i sur., 1996.). Biološka uloga Se primarno se odnosi na njegovu ugradnju u proteine te ga, na primjer, nalazimo kao sastavni dio glutathion peroksidaze i vitamina E (Watanabe i sur., 1997.). Međutim, za većinu selenoproteina riba funkcije još nisu poznate te se vrlo malo zna o njegovom metaboliziranju u ribama (Hauser-Davis i sur., 2012.). Profili raspodjele Se u jetrima klena pokazali su da je mali dio Se u jetrima eluiran u VMM području (~60-400 kDa), a najveći dio u NMM području (~7-60 kDa), što je ukazivalo na vjerojatno vezanje ovoga nemetala na poznate selenoproteine koji su katalitički aktivni u redoks procesima (Hauser-Davis i sur., 2012.), poput glutathion peroksidaze (85 kDa, Shulgin i sur., 2008.), jodotironin dejodinaze (~10-30 kDa) ili tioredoksin reduktaze (66 kDa, Larsson, 1973.). Paliwal i sur. (1986.) su u svojim istraživanjima utvrdili kako i određena izoforma MT pokazuje afinitet za jedinstveno vezanje Se, dok su Ferrarello i sur. (2002.) istaknuli da vezanje Se na MT ima sinergističku zaštitnu uloga protiv toksičnosti drugih teških metala. S druge strane, Iwai i sur. (1988.) utvrdili su da se radioaktivno obilježeni Se uglavnom eluira u području molekulskih masa većih od MT, što je u skladu s našim rezultatima. I u našem je istraživanju na jetrima klena uočeno da je samo veoma mala količina Se prisutna u rubnom području NMM biomolekula, što može ukazivati na vezanje na MT. Nadalje, manja je količina Se u jetrima klena bila raspodijeljena i u području JNMM biomolekula (<2 kDa). Profili raspodjele Se među citosolskim biomolekulama u škrgama bili su usporedivi s profilima u jetrima te su obuhvaćali tri pika (VMM, NMM i JNMM), uz tu razliku što se u škrgama većina Se veže uz JNMM biomolekule. Moguće je pretpostaviti kako se radi o selenospojevima jako niskih molekulskih masa koji su učinkoviti u obrani organizama od oksidacijskog stresa, poput nedavno identificiranog organskog selenovog spoja u tuni (*Thunnus orientalis*), selenoneina (~0.5 kDa;

Yamashita i Yamashita, 2010.; Yamashita i sur., 2012.), ili selenometionina (~0.2 kDa; Klotz i sur., 2003.). Povećanje citosolskih koncentracija Se u jetrima rezultiralo je izraženijom prisutnošću u NMM području, dok se povećanje citosolskih koncentracija Se u škragama uglavnom odražavalo u povećanoj prisutnosti u JNMM području, što je bilo u skladu s temeljnim profilima raspodjele obaju organa.

Dobro je poznato da su neesencijalni elementi Cd i Pb toksični i pri vrlo niskoj izloženosti, uslijed činjenice da u organizmima riba nije razvijena učinkovita regulacija bioakumulacije neesencijalnih elemenata (Heath, 1995.). U jetrima klena uočeno je da su od svih ispitivanih metala najširi koncentracijski raspon imali upravo Cd (3,4-59,4 ng mL⁻¹) i Pb (<granice detekcije (0.10 ng mL⁻¹) do 44,2 ng mL⁻¹). Bioakumulacija u škragama za oba metala bila je nešto slabije izražena pa su analize raspodjele provedene samo za Cd (0,48-1,03 ng mL⁻¹), dok profile za Pb nije bilo moguće jasno definirati. Prepoznavanje staničnih komponenata, odnosno biomolekula na koje se vežu Cd i Pb u jetrima te Cd u škragama pri nižim i višim razinama izloženosti značajan je korak u razumijevanju njihovih potencijalnih toksičnih učinaka na klena.

Kadmij je neesencijalni metal čiji je toksični učinak otkriven početkom 20. stoljeća kada je porasla njegova uporaba u industriji (Schäfer i sur., 1999.). Veže se na metaloproteine kompeticijom sa Fe, Mn, Zn, Cu i drugim esencijalnim elementima, pri čemu dolazi do pogrešnog smatanja proteina, proizvodnje reaktivnih kisikovih radikala ili reaktivnih spojeva dušika, što sve može dovesti do oksidacijskih oštećenja te smrti stanice (Sarkar i sur., 2013.; Sedak i sur., 2015.). Temeljna raspodjela Cd u jetrima i škragama klena ukazuje na dominantnu prisutnost Cd u područje NMM biomolekula (~5-30 kDa), što po vremenu eluiranja i molekulskoj masi odgovara standardu proteina MT. Pri porastu citosolskih koncentracija Cd u jetri 10-15 puta, većina dodatne bioakumulirane količine Cd veže se i dalje na MT, što potvrđuje dobro poznati visoki afinitet Cd za vezanje na MT, kao mehanizam zaštite od toksičnosti (Roesijadi, 1992.; Park i sur., 2001.). No, pri povišenju citosolskih koncentracija Cd u jetri, uočeno je i dodatno vezanje Cd na SMM biomolekule (~35-100 kDa), što je pokazatelj da pri povećanoj bioakumulaciji Cd u jetrima možda ne dolazi do njegove potpune detoksikacije putem vezanja na MT, već se dio Cd veže i na druge biomolekule viših molekulskih masa, što ostavlja mogućnost razvoja toksičnih učinaka. U škragama već pri relativno niskim citosolskim koncentracijama postoji naznaka raspodjele Cd unutar područja VMM i SMM biomolekula. Poznata je činjenica da se detoksikacija Cd odvija primarno putem glutationa (GSH) i MT pa nepotpuna detoksikacija Cd može dovesti

do kompeticije toga metala s esencijalnim metalima za vezna mjesta na drugim važnim biomolekulama te potencijalno dovesti do staničnih oštećenja (McGeer i sur., 2012.). Stoga je potrebno provesti daljnja istraživanja, po mogućnosti pri izloženosti višim koncentracijama Cd, kako bi bilo točnije utvrđeno na koje se biomolekule osim MT Cd veže kada je u stanicama prisutan u povišenim koncentracijama te odražava li njegovo vezanje na SMM biomolekule dodatni oblik detoksikacije ili mogućnost za razvoj toksičnih učinaka. Matz i Krone (2007.) te Kwong i sur. (2011.) u svojim su istraživanjima predložili da osim GSH i MT u fiziološkim promjenama vezanima uz zaštitu stanica kod riba izloženih Cd značajnu ulogu igra i indukcija proteina toplinskog stresa, HSP70 i HSP90, čije su molekulske mase također obuhvaćene kadmijevim SMM-pikom, kao i molekulska masa transferina (80 kDa), koji je nedavno prepoznat kao glavni protein koji veže Cd u krvnoj plazmi šarana (*Cyprinus carpio*) (De Smet i sur., 2001.).

Olovo se ubraja u metale koji su izrazito štetni za zdravlje (Permyakov, 2009.) te je kao i Cd europskom Okvirnom direktivom o vodama uključeno u popis prioriternih toksičnih zagađivala (EU ODV; EPCEU, 2008.). Toksični učinci olova povezani su s njegovim interakcijama s enzimima, čija je aktivnost ovisna o prisutnosti slobodnih sulfhidrilnih (SH) skupina s kojima olovo stvara merkaptide (Duraković i Labar, 2000.; Goering, 1993.). Organizam tada te skupine više ne može koristiti za stvaranje hemoglobina i citokroma. Već vrlo niske koncentracije olova inhibiraju i Na^+, K^+ -ATP-azu, što rezultira povećanom krhkošću eritrocita i skraćivanjem njihova vijeka trajanja (Duraković i Labar, 2000.). Olovo se u organizmu najviše apsorbira u kostima, a od mekih tkiva u jetrima i bubrezima (Sedak i sur., 2015.). Profili raspodjele Pb u jetrima klena ukazali su na dominantnu prisutnost Pb u području SMM biomolekula (~35-240 kDa), što može ukazivati na njegov potencijal za toksično djelovanje. Preostala količina Pb bila je raspodijeljena između nekoliko manjih pikova među kojima se ističe NMM pik (~9-20 kDa), koji odgovara području eluiranja MT. O eluiranju Pb u području MT izvijestili su i Pavičić i sur. (1993.) kod dagnji (*Mytilus sp.*) izloženih smjesi metala (Cd, Cu i Pb). No, nekoliko je drugih autora izvijestilo o izostanku indukcije MT olovom u tkivima riba (Reichert i sur., 1979; Roesijadi i Robinson, 1994). Budući da je Pb slabiji inducer MT u usporedbi s drugim metalima kao što su Cd i Zn (Waalkes i Klaassen, 1985.), moguće je da je uočeno vezanje Pb na MT povezano sa stvaranjem inkluzijskog tijela prilikom detoksikacije Pb uklapanjem u granule (Mager, 2012.).

4.2. Raspodjela esencijalnih (Co, Fe, Mn, Mo, Se, Cu i Zn) i neesencijalnog (Cd) elementa među citosolskim biomolekulama različitih molekulskih masa u jetrima i škragama vardarskog klena (*S. vardarensis*) iz triju makedonskih rijeka

Istraživanje provedeno na klenu (*S. cephalus*) nadalje je prošireno na srodnu vrstu, pripadnika istoga roda *Squalius*, vardarskog klena (*S. vardarensis*) iz triju različito onečišćenih makedonskih rijeka. Cilj je bio utvrditi temeljne profile raspodjele među citosolskim biomolekulama različitih molekulskih masa, kao i njihove promjene za iste elemente kao i kod klena (*S. cephalus*), odnosno za esencijalne elemente Co, Fe, Mn, Mo, Se, Cu i Zn te neesencijalne elemente Cd i Pb, u jetrima i škragama kao ciljnim organima, pod različitim uvjetima izloženosti metalima. Rezultati ovog dijela istraživanja objavljeni su u radovima pod rednim brojem 3 u popisu znanstvenih radova (str. 57-70). Instrumentalna mogućnost detektiranja pojedinih elemenata, međutim, ograničila je naše istraživanje na određivanje raspodjela Co, Fe, Mn, Mo, Se, Cu, Zn i Cd u jetrima te Fe, Mo, Se, Zn i Cd u škragama vardarskog klena. Ovakav istraživački pristup omogućio nam je usporedbu raspodjela, odnosno sudbine navedenih elemenata u jetrima i škragama dvaju srodnih ribljih vrsta te procjenu mogu li se navedene vrste koristiti usporedno u monitoringu udaljenih slatkovodnih sustava.

Vardarski klenovi korišteni u ovome istraživanju uzorkovani su u rijekama Bregalnici, Krivoj Reci i Zletovskoj Reci u sjeveroistočnoj Makedoniji u svibnju i lipnju 2012. godine. Rijeka Bregalnica karakterizirana je blažim onečišćenjem metalima u usporedbi s drugim dvjema rijekama, a izvor onečišćenja predstavljalo je ispiranje poljoprivrednog tla, u najvećoj mjeri rižinih polja (Ramani i sur., 2014.; Stipaničev i sur., 2017.). Rijeke Kriva i Zletovska izložene su utjecaju otpadnih voda iz aktivnih rudnika Pb i Zn, Toranica i Zletovo (Ramani i sur., 2014.). Od analiziranih osam elemenata, u rijeci Bregalnici nađene su najviše koncentracije otopljenog Fe i Mo (Fe, $61,3 \pm 3,4 \mu\text{g L}^{-1}$; Mo, $0,950 \pm 0,010 \mu\text{g L}^{-1}$), u Zletovskoj Reci otopljenog Cd, Co, Cu, Mn i Zn (Cd, $0,272 \pm 0,002 \mu\text{g L}^{-1}$; Co, $1,51 \pm 0,01 \mu\text{g L}^{-1}$; Cu, $3,38 \pm 0,07 \mu\text{g L}^{-1}$; Mn, $351,9 \pm 6,5 \mu\text{g L}^{-1}$; Zn, $197,0 \pm 2,9 \mu\text{g L}^{-1}$) te u Krivoj Reci otopljenog Cd (Cd, $0,270 \pm 0,009 \mu\text{g L}^{-1}$) (Ramani i sur., 2014.). U makedonskim rijekama povišene koncentracije u riječnoj vodi u usporedbi s rijekom Sutlom, uslijed utjecaja aktivnih rudnika, nađene su za metale Mn i Zn, što nam je omogućilo da promjene koje se događaju u citosolskim raspodjelama pri izrazito visokoj izloženosti u riječnoj vodi utvrdimo za veći broj elemenata. Zanimljivo je spomenuti da su u vardarskim klenovima iz navedenih rijeka provedene i histološke analize na više organa (Barišić i sur., 2015.; Jordanova i sur., 2016.,

2017.) te su zapažena izraženija oštećenja na škragama, jetrima i slezeni riba iz rijeka onečišćenih rudničkim otpadom, a napose iz Zletovske Reke, u kojoj je zabilježena i najizraženija bioakumulacija brojnih metala u jetrima i škragama vardarskih klenova (Dragun i sur., 2019.). Kao i u istraživanju na klenu iz rijeke Sutle, za analize smo primijenili kombinaciju fracioniranja citosola jetara i škruga pomoću SEC₂₀₀-HPLC-a te mjerenja metala/nemetala pomoću HR ICP-MS-a, kao i svrstavanje biomolekula na temelju njihovih molekulskih masa u četiri skupine (VMM, SMM, NMM i JNMM). Budući da su neke od biomolekula koje vežu metale i služe u njihovoj detoksikaciji, poput MT, toplinski stabilne na vrlo visokim temperaturama (Dragun i sur., 2009.; Lavradas i sur., 2016.), istraživanje na vardarskom klenu je osim na ukupnim citosolima provedeno i na citosolima toplinski obrađenima na 70°C (Erk i sur., 2002.). Metali vezani na toplinski stabilne proteine i peptide smatraju se detoksiciranim frakcijama metala u stanici, dok su biomolekule osjetljive na visoke temperature definirane kao stanična frakcija osjetljiva na metale i podložna njihovom toksičnom djelovanju (Giguère i sur., 2006.; Goto i Wallace, 2010., Rosabal i sur., 2015.). Uz iznimku iscrpnih studija toplinski stabilnih proteina MT (npr., Goenaga Infante i sur., 2006.; Hauser-Davis i sur., 2012., Mason i sur., 2004.; Rodríguez-Cea i sur., 2003.), prema našim saznanjima u znanstvenoj literaturi nema informacija o drugim toplinski stabilnim biomolekulama koje vežu metale/nemetale u jetrima i škragama riba. Za analize raspodjela metala/nemetala u toplinski obrađenim citosolima primijenjena je SEC₇₅-HPLC metoda (kolona Superdex 75, raspon razdvajanja 3-70 kDa) te je u citosolima jetara i škruga vardarskog klenu utvrđena prisutnost toplinski stabilnih molekula koje vežu Mo, Se, Cu, Zn i Cd.

Citosolske koncentracije Co u analiziranim jetrima vardarskog klenu iz triju makedonskih rijeka nalazile su se u rasponu od 2,56-5,54 ng mL⁻¹. Kobalt je bio raspodijeljen među četiri pika, jedan u VMM području, jedan u SMM i dva u JNMM području. Najveći dio citosolskog Co u jetrima bio je vezan uz VMM biomolekule (~110-380 kDa), što je u skladu s prethodnim istraživanjima koja su pokazala da ioni Co imaju visoki afinitet za vezanje na enzimske proteine visokih molekulskih masa (Paustenbach i sur., 2013.; Wojcieszek i Ruzik, 2016.). Dominantno vezanje Co za VMM biomolekule uočeno je i u jetrima pastrve (*Salmo trutta*; Dragun i sur., 2018.), kao i u jetrima grgeča (*P. flavescens*; Caron i sur., 2018.). Znatno manje količine Co bile su vezane uz SMM biomolekule (~30-85 kDa), kao i uz JNMM biomolekule (<5 kDa), unatoč već prije spomenutoj značajnoj ulozi Co u izgradnji kobalamina (vitamin B12; Blust, 2012.), kao i značajnoj ulozi jetara u njegovom metabolizmu

(Wang i sur., 2001.). Zbog relativno uskog raspona citosolskih koncentracija Co u analiziranim uzorcima, razlike u njegovoj citosolskoj raspodjeli pri različitim razinama bioakumulacije bile su jedva uočljive. Povišenjem citosolskih koncentracija Co u jetrima vardarskog klena dolazi tek do slabog porasta u VMM području, dok u drugim biomolekulskim područjima nije bilo razlike, zbog čega bi se dodatna pozornost trebala posvetiti upravo proučavanju VMM biomolekula na koje se veže Co. Zbog niskih citosolskih koncentracija Co u škragama, njegovu raspodjelu nije bilo moguće odrediti za taj organ vardarskog klena.

Citosolske koncentracije Fe u analiziranim vardarskim klenovima iz triju makedonskih rijeka nalazile su se u rasponu od 6,4 do 14,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ te u jetrima od 5,5 do 28,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ u škragama. Profili raspodjele Fe među citosolskim biomolekulama, kako u jetrima tako i u škragama vardarskog klena, ukazali su na njegovu prisutnost u dva područja citosolskih biomolekula, u VMM području (~230-630 kDa) te u SMM području (24-51 kDa), što je uočeno i u jetrima potočne pastrve (*S. trutta*; Dragun i sur., 2018.). Razlika raspodjele Fe između dvaju organa bila je u tome što je u jetrima količina Fe eluirana unutar VMM područja bila usporediva ili viša nego u SMM području, dok je u škragama većina Fe bila eluirana unutar SMM područja te je prisutnost Fe u VMM području bila zabilježena samo u uzorku s najvišom citosolskom koncentracijom Fe (28,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Kao što je već navedeno u istraživanju na klenu (*S. cephalus*), VMM područje obuhvaća molekulsku masu skladišnog proteina feritina (450 kDa) (Szpunar i Łobiński, 1999.; Martin-Antonio i sur., 2009.), dok bi raspodjela Fe unutar SMM područja mogla biti rezultat vezanja Fe na razne poznate funkcionalne proteine željeza. Povišenje citosolskih koncentracija Fe u jetrima rezultiralo je povećanim eluiranjem Fe u VMM feritinskom području što je u skladu s pojačanom sintezom feritina pri povećanoj dostupnosti Fe (Torti i Torti, 2002.). Nasuprot tome, u škragama je povećanje citosolskog Fe uglavnom rezultiralo povećanim eluiranjem unutar SMM biomolekulskog područja, izuzev u uzorku s najvišom citosolskom koncentracijom Fe. Dobiveni rezultati potvrdili su značajniju ulogu jetre nego škrge vardarskog klena u skladištenju Fe.

Citosolske koncentracije Mn u analiziranim jetrima vardarskog klena iz triju makedonskih rijeka nalazile su se u rasponu 214,5 do 408,6 ng mL^{-1} . Profili raspodjele za esencijalni element Mn određeni su samo za jetra zbog niske citosolske koncentracije u škragama vardarskog klena. Mangan je u jetrima bio raspodijeljen unutar dvaju slabo razlučenih pikova u VMM (~85-380 kDa) i SMM (24-85 kDa) području biomolekula, pri

čemu SMM područje obuhvaća molekulske mase proteina uključenih u transport Mn, albumina (66 kDa) i transferina (80 kDa; Martin-Antonio i sur., 2009.), kao što je već uočeno i kod klena (*S. cephalus*). Sličan profil raspodjele Mn zabilježen je i u jetrima potočne pastrve (*S. trutta*; Dragun i sur., 2018.). Profili raspodjele Mn bili su usporedivi u svim uzorcima jetara vardarskog klena iz svih triju rijeka, a pri porastu citosolskih koncentracija ponekad je došlo do porasta eluiranja Mn u VMM području, a ponekad u SMM području biomolekula.

Citosolske koncentracije Mo u analiziranim vardarskim klenovima iz triju makedonskih rijeka nalazile su se u rasponu od 12,6 do 26,6 ng mL⁻¹ u jetrima te od 2,55 do 3,05 ng mL⁻¹ u škragama. Profili citosolskih raspodjela za esencijalni element Mo određeni su samo za jetra zbog znatno nižih citosolskih koncentracija u škragama vardarskog klena. Molibden je u jetrima bio raspodijeljen unutar širokog područja molekulskih masa u VMM području biomolekula (~100 do >600 kDa), što ukazuje na njegovo vezanje za veliki broj citosolskih biomolekula, uključujući i različite enzime kojima Mo služi kao kofaktor (Beers i Berkow, 1998.), poput aldehid oksidaze (~130 kDa; Uchida i sur., 2003.), sulfid oksidaze (~120 kDa; Johnson i Rajagopalan, 1976.) ili Fe-Mo flavoprotein ksantin oksidaze (275 kDa, Truglio i sur., 2002.). Slični profili raspodjele, s eluiranjem Mo u području biomolekula molekulskih masa od 100 do 500 kDa, opisani su za jetra potočne pastrve (*S. trutta*; Dragun i sur., 2018.) te jetra grgeča (*P. flavescens*; Caron i sur., 2018.). Nadalje, manji dio Mo bio je eluiran i u području JNMM biomolekula (3-7 kDa). Povišenje citosolskih koncentracija u jetrima vardarskog klena odrazilo se na njegovom pojačanom eluiranju dominantno unutar VMM područja, potvrđujući prevladajuće vezanje Mo na VMM biomolekule. Nakon toplinske obrade citosola jetara, povećava se prisutnost Mo u području JNMM biomolekula (5-9 kDa), što ukazuje na preraspodjelu Mo među citosolskim biomolekulama ili na razgradnju većih proteina/peptida osjetljivih na visoke temperature na manje toplinski stabilne molekule koje vežu Mo. Primjenom SEC₇₅-HPLC-a uspjeli smo provesti analizu citosolske raspodjele Mo i za škrge. U škragama također nalazimo Mo vezan na toplinski stabilne biomolekule unutar JNMM područja (5-11 kDa), ali je njegova prisutnost usporediva prije i nakon toplinske obrade.

Citosolske koncentracije Se u analiziranim vardarskim klenovima iz triju makedonskih rijeka nalazile su se u rasponu od 85,8 do 631,1 ng mL⁻¹ u jetrima te od 57,9 do 469,0 ng mL⁻¹ u škragama. Profili raspodjele Se u jetrima vardarskog klena pokazuju njegovu prisutnost u širokom biomolekulskom području, i to vezanog na VMM (~110-300 kDa), NMM (~20-50 kDa) i JNMM biomolekule (2-5 kDa i <2 kDa). Raspodjela Se u škragama

razlikovala se samo po izostanku vezanja Se na VMM biomolekule, a bila je karakterizirana eluiranjem Se u oštrom, jasno odvojenom piku u JNMM području (<2 kDa), što može ukazivati na prisutnost nisko molekulskih selenospojeva koji djeluju kao jaki čistači slobodnih radikala te su učinkoviti u obrani od oksidacijskog stresa (npr., selenometionin, ~0,2 kDa, Klotz i sur., 2003.; selenonein, ~0,5 kDa, Yamashita i Yamashita, 2010.; Yamashita i sur., 2012.). Pri povišenim koncentracijama Se u škragama javlja se povećanje Se-pika isključivo u JNMM području, dok se u jetrima javlja i povišenje NMM pika, što može ukazivati na vezanje Se na selenoproteine katalitički aktivne u redoks procesima, poput glutation peroksidaze, jodotironin dejodinaze i tioredoksin reduktaze (Hauser-Davis i sur., 2012.). Nadalje, u citosolima jetara vardarskog klena utvrđena je prisutnost toplinski stabilnih biomolekula koje vežu Se unutar dvaju JNMM područja (3-6 kDa; 0,5-1,6 kDa), a u škragama samo unutar drugog JNMM područja (0,5-1,3 kDa), što je moguće povezati s nekim peptidima ili aminokiselinama koji sadrže Se, poput selenocisteina (Se-Cys) i selenometioneina (Se-Met) (Rahmanto i Davies, 2012.).

Citosolske koncentracije Cu u analiziranim jetrima vardarskog klena iz triju makedonskih rijeka nalazile su se u rasponu od 1,67 do 6,54 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Profili citosolskih raspodjela za esencijalni element Cu određeni su samo za jetra zbog znatno nižih citosolskih koncentracija u škragama vardarskog klena. Profili raspodjele Cu među citosolskim biomolekulama u jetrima vardarskog klena ukazali su na dominantnu prisutnost ovoga metala samo u području NMM biomolekula (7-40 kDa), što odgovara molekulskoj masi i vremenu eluiranja standarda MT te ukazuje na vezanje Cu na MT. Dominantno vezanje Cu za MT-frakciju opisano je i za jetra grgeča (*P. flavescens*; Caron i sur., 2018.), jegulje (*Anguilla anguilla*; Van Campenhout i sur., 2008.; Rodriguez-Cea i sur., 2003.) i babuške (*Carassius gibelio*; Van Campenhout i sur., 2010.). Povišenjem citosolskih koncentracija Cu dolazi do vidljivog porasta u MT-području, što je u skladu s najvećim kapacitetom za indukciju MT u tkivima koja su aktivna u uzimanju, skladištenju i izlučivanju elemenata u tragovima, poput škrga, crijeva, jetara i bubrega (Roesijadi i Robinson, 1994.). Nadalje, pri povišenju citosolske koncentracije Cu opaženo je i širenje NMM pika prema višim molekulskim masama, što bi moglo ukazivati na vezanje Cu i na druge citosolske biomolekule pri njegovoj povišenoj bioakumulaciji, na primjer superoksid dismutazu (32 kDa), kao znak bitne uloge Cu u zaštiti stanica od oksidacijskog stresa (Sanchez i sur., 2005.).

Citosolske koncentracije Zn u analiziranim vardarskim klenovima iz triju makedonskih rijeka nalazile su se u rasponu od 3,51-8,37 $\mu\text{g mL}^{-1}$ u jetrima te od 4,28-14,4

$\mu\text{g mL}^{-1}$ u škragama. U jetrima vardarskog klena Zn je bio raspodijeljen u tri biomolekulska područja: VMM (>500 kDa), SMM ($\sim 30\text{-}400$ kDa) i NMM ($7\text{-}24$ kDa), pri čemu je najizraženija prisutnost Zn bila u uskom, oštrom piknu u NMM području što odgovara vremenu eluiranja i molekulskoj masi MT, koji sudjeluje u transportu i homeostazi Zn (Sakulsak, 2012.). Usporedivi profili Zn dobiveni su za jetra potočne pastrve (*S. trutta*) iz rijeke Krke (Dragun i sur., 2018.). U škragama, manji dio Zn eluiran je u VMM području (>400 kDa), a najveći dio unutar jednog širokog područja molekulskih masa s maksimumom u SMM području ($\sim 10\text{-}300$ kDa, s maksimumom na 85 kDa), koje obuhvaća i neke dobro poznate proteine koji sadrže Zn, poput alkohol dehidrogenaze (150 kDa, Szpunar i Łobiński, 1999.). Za razliku od jetara, u škragama jasno vezanje Zn na MT područje nije bilo uočeno. Raspodjela Zn među biomolekulama u jetrima i škragama bila je usporediva u svim uzorcima iz svih triju rijeka i nije bilo moguće jasno utvrditi promjene u raspodjeli Zn kao rezultat njegove povećane bioakumulacije.

Citosolske koncentracije Cd u analiziranim vardarskim klenovima iz triju makedonskih rijeka nalazile su se u rasponu od $2,38$ do $68,2$ ng mL^{-1} u jetrima te od $0,34$ do $30,0$ ng mL^{-1} u škragama. Slično bakru, i Cd je bio raspodijeljen unutar jednog jasnog i uskog NMM područja biomolekula ($7\text{-}24$ kDa) u oba organa vardarskog klena, što po vremenu eluiranja i molekulskoj masi odgovara standardu MT. Kadmij je snažan inducer MT, koji služi kao mehanizam zaštite od njegove toksičnosti (Park i sur., 2001.; Roesijadi, 1992.). Povišenje citosolskih koncentracija Cd u uzorcima jetara i škraga vardarskog klena iz Zletovske Reke i Krive Reke, koje su izložene utjecaju onečišćenja iz rudnika, rezultiralo je proporcionalnim povećanjem eluiranja Cd unutar MT područja, dok vezanje Cd na druge biomolekule nije bilo uočeno. Dominantno eluiranje Cd u MT frakciji, kao i porast prisutnosti Cd vezanog za MT pri povišenju njegove bioakumulacije u jetrima zabilježen je i kod potočne pastrve (*S. trutta*; Dragun i sur. 2018.). Ovakav rezultat upućuje na gotovo potpunu detoksikaciju Cd u oba organa vardarskog klena u ispitivanim uvjetima, što su već prije Lavradas i sur. (2016.) pokazali za smeđe dagnje (*Perna perna*). Analizom toplinski obrađenih citosola jetara i škraga vardarskog klena potvrđena je prisutnost toplinski stabilnih proteina koji vežu Cd, najvjerojatnije MT, u području NMM biomolekula ($\sim 10\text{-}30$ kDa). Potvrđeno je i istovremeno vezanje Cu i Zn na te iste toplinske stabilne biomolekule u jetrima vardarskog klena. No, zanimljiv je nalaz izostanak vezanja Zn na toplinski stabilnu MT frakciju u škragama vardarskog klena, što je u skladu s rezultatima prethodno dobivenim za klena (*S. cephalus*).

Rezultati ostvareni za dvije vrste klena (klen, *S. cephalus*, i vardarski klen, *S. vardarensis*) pokazali su da su raspodjele metala/nemetala među citosolskim biomolekulama različitih molekulskih masa u jetrima i škragama kao ciljnim organima većinom jednake u objema vrstama, što omogućuje usporedbu rezultata dobivenih primjenom ovih dviju srodnih vrsta u monitoringu udaljenih slatkovodnih sustava. Između dviju vrsta klena nije bilo razlika u citosolskim raspodjelama Fe, Se i Cd u škragama, kao ni u citosolskim raspodjelama Co, Cu, Fe, Mn, Mo i Se u jetrima. Manje razlike zabilježene su za citosolske raspodjele Zn u jetrima i škragama te Cd u jetrima. Iako je u jetrima obiju vrsta klena uočeno vezanje Zn na NMM biomolekule (MT), to je vezanje bilo puno jasnije vidljivo u jetrima vardarskog klena. Nadalje, vezanje Zn na JNMM biomolekule (<5 kDa) u škragama uočeno je samo kod klena (*S. cephalus*). U jetrima klena pri višim je koncentracijama uz vezanje Cd na NMM biomolekule (MT) uočeno i vezanje Cd na SMM biomolekule (~35-100 kDa), što nije uočeno kod vardarskog klena gdje je sav Cd bio vezan na MT. Postoji mogućnost da izraženije vezanje Zn i Cd na MT u jetrima vardarskog klena ukazuje na snažniju sposobnost detoksikacije te vrste ili na prilagodbu uvjetima povećane izloženosti metalima u rijekama onečišćenim rudničkim otpadom.

4.3. Karakterizacija i identifikacija odabranih citosolskih biomolekula u jetrima i škragama vardarskog klena (*S. vardarensis*) primjenom dvodimenzionalne tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (SEC-AEC-HPLC) i dviju tehnika spektrometrije masa (MALDI-TOF-MS i LC-MS/MS)

Nakon opisanih temeljnih raspodjela devet odabranih metala/nemetala u jetrima i škragama klena (*S. cephalus*) i vardarskog klena (*S. vardarensis*), sljedeći je korak u istraživanju bio pobliza karakterizacija i identifikacija nekoliko odabranih biomolekula koje vežu Fe, Cd, Cu, Zn i Mo u jetrima i škragama vardarskog klena. Radi nastavka istraživanja, provedeno je dodatno uzorkovanje u makedonskim rijekama Bregalnici i Zletovskoj Reci, u lipnju 2015. godine. Na jetrima i škragama vardarskih klenova uzorkovanih 2015. godine ponovljena su razdvajanja pomoću SEC₂₀₀-HPLC-a i SEC₇₅-HPLC-a te određivanje profila raspodjele pomoću HR ICP-MS-a, radi preciznog definiranja vremena eluiranja odabranih biomolekula te prikupljanja frakcija odgovarajućih molekulskih masa za njihove daljnje analize. Dobiveni profili raspodjele bili su podudarni s profilima raspodjele definiranim za organe vardarskih klenova uzorkovanih u proljeće 2012. godine. Rezultati ovog dijela istraživanja objavljeni su u radovima pod rednim brojem 4 u popisu znanstvenih radova (str. 71-89).

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s isključivanjem po veličini (SEC-HPLC) često se koristi kao osnovna metoda za razdvajanje metaloproteina i drugih biomolekula koje vežu metale/nemetale, a zasniva se na načelu molekularnih sita koja omogućuju razdvajanje molekula prema njihovoj veličini te u manjoj mjeri prema njihovom obliku (Szpunar, 2005.). Međutim, isključivom primjenom SEC-HPLC-a kao metode razdvajanja ne bismo bili u mogućnosti precizno odrediti molekulske mase biomolekula na koje se vežu metali/nemetali u organima riba, jer ona omogućava samo grubo razdvajanje biomolekula i približno određivanje njihovih molekulskih masa na temelju usporedbe sa proteinskim standardima poznatih molekulskih masa. Za zahtijevan korak preciznije karakterizacije te konačnog prepoznavanja citosolskih biomolekula, potrebno je primijeniti dodatne analitičke postupke, poput raznih tehnika spektrometrije masa (npr., MALDI-TOF-MS i LC-MS/MS), za čiju je primjenu potrebno prethodno izolirati biomolekule od interesa. No, sama SEC-HPLC metoda nije uvijek dovoljna za razdvajanje i izoliranje tih biomolekula sa svrhom njihovog daljnjeg analiziranja pomoću spektrometra masa, jer više molekula približno jednakih molekulskih masa može biti eluirano u isto vrijeme, odnosno može doći do preklapanja pikova različitih citosolskih biomolekula. Budući da je očekivano da će većina frakcija izdvojenih pomoću SEC-HPLC-a sadržavati smjesu više citosolskih biomolekula, preporučljiva je primjena dodatnih tehnika razdvajanja, kako bismo što uspješnije pročistili i izdvojili biomolekule od interesa. Stoga smo za daljnju karakterizaciju biomolekula koje vežu metale u jetrima i škragama vardarskog klana, nakon prvog stupnja razdvajanja pomoću SEC-HPLC-a, primijenili anionsko-izmjenjivačku kromatografiju (AEC-HPLC), koja uz osnovno razdvajanje biomolekula na temelju njihovih molekulskih masa doprinosi izdvajanju biomolekula od interesa njihovim razdvajanjem na temelju razlike u naboju. Analiza tako izdvojenih biomolekula provedena je metodama MALDI-TOF-MS i LC-MS/MS. Iako navedene tehnike pružaju veliki broj mogućnosti u istraživanjima (Montes-Bayon i sur., 2003.), što je prepoznato u mnogim znanstvenim područjima, primjena istraživanja specijacije metala u stanicama, poznatog i kao metalomika (Szpunar, 2004.), u okolišnim istraživanjima nije još dovoljno zastupljena. Takva se istraživanja uglavnom provode u strogo kontroliranim laboratorijskim uvjetima, najčešće nakon izlaganja samo jednome metalu (Ju i sur., 2011.), dok su multielementna istraživanja u stvarnim okolišnim uvjetima iznimno rijetka (npr., Caron i sur., 2018., Rosabal i sur., 2016.; Urien i sur., 2018.). Stoga je primjena opisane analitičke metodologije u istraživanju citosolskih biomolekula koje vežu metale u škragama i jetrima vardarskog klana iz rijeka izrazito onečišćenih metalima omogućila bolji uvid u

sudbinu i ponašanje metala u stanicama ciljnih organa tog značajnog bioindikatorskog organizma.

U ovome dijelu istraživanja, pozornost je bila usmjerena na analize sljedećih biomolekula:

- (1) biomolekula koje u jetrima i škragama vardarskog klena vežu Fe, a razdvajanjem pomoću SEC₂₀₀-HPLC-a bile su eluirane u području molekulskih masa ~25-50 kDa;
- (2) toplinski stabilnih biomolekula koje u jetrima i škragama vardarskog klena vežu Cd, Cu i Zn, a razdvajanjem pomoću SEC₂₀₀-HPLC-a bile su eluirane u području molekulskih masa ~5-25 kDa te razdvajanjem pomoću SEC₇₅-HPLC-a u području molekulskih masa ~10-30 kDa (vjerojatna metalotioneinska frakcija);
- (3) toplinski stabilnih biomolekula koje u jetrima i škragama vardarskog klena vežu Mo, a razdvajanjem pomoću SEC₇₅-HPLC-a bile su eluirane u području molekulskih masa ~5-10 kDa.

4.3.1. Biomolekule koje vežu Fe

Primjenom SEC₂₀₀-HPLC-a u razdvajanju citosolskih frakcija organa vardarskih klenova uzorkovanih 2015. godine, Fe je u jetrima bilo podjednako raspodijeljeno između dvaju biomolekulskih područja, VMM (~180-640 kDa) i SMM (~25-50 kDa), dok je u većini uzoraka škraga Fe bilo raspodijeljeno unutar samo jednog biomolekulskog područja, SMM (~20-50 kDa). Ovi rezultati u skladu su s prethodnim rezultatima o raspodjeli Fe u jetrima i škragama vardarskih klenova uzorkovanih 2012. godine, kao i klenova uzorkovanih u rijeci Sutli. Za analize spektrometrijom masa prikupljene su SMM frakcije (~20-50 kDa) iz jetara i škraga vardarskih klenova, koje su se djelomično, u rubnim područjima, preklapale sa SEC₂₀₀-HPLC pikovima Cu i Zn. MALDI-TOF-MS analizom potvrđena je moguća prisutnost Cu,Zn-superoksid dismutaze u izdvojenim SMM frakcijama, budući da su u njihovim spektrima masa zabilježeni m/z pikovi koji su odgovarali masenom profilu standarda superoksid dismutaze (m/z : 31 kDa, 15,5 kDa (2+) i 7,75 kDa (4+)).

Sa svrhom pročišćavanja SMM frakcija željeza i uklanjanja primjesa Cu i Zn, proveden je dodatni korak razdvajanja primjenom AEC-HPLC-a. AEC-HPLC često se primjenjuje tijekom izolacije i karakterizacije biomolekula koje vežu Fe nakon početnog razdvajanja pomoću SEC-HPLC-a, na primjer u ljudskom serumu (Mestek i sur., 2007.; Montes-Bayón i sur., 1999.; Muniz i sur., 2001.) ili ribama (npr., kalifornijska pastrva, *O. mykiss*; Fago i sur., 2002.). U ovome istraživanju, primjenom AEC-HPLC-a ostvareno je

uspješno razdvajanje biomolekula koje vežu Fe od biomolekula koje vežu Cu i Zn, što upućuje na prednost primjene ove tehnike u postupcima finog razdvajanja biomolekula.

Za konačnu karakterizaciju izdvojenih SMM biomolekula koje vežu Fe, razdvojenih i pročišćenih dvodimenzionalnom kromatografijom, primijenjene su dvije tehnike spektrometrije masa, MALDI-TOF-MS i LC-MS/MS. MALDI-TOF-MS spektri u jetrima su uvijek pokazivali glavni m/z pik na 15,4 kDa, dok su u nekim uzorcima jetara bila prisutna i dva dodatna niža m/z pika na 31,5 kDa i 46,9 kDa, što je najvjerojatnije ukazivalo na spektre hemoglobina, s karakterističnim hemoglobinskim monomerima (~15 kDa), dimerima (~30 kDa) i trimerima (~45 kDa). Iako je hemoglobin protein molekulske mase približno 64,5 kDa, on sadrži četiri polipeptidne podjedinice, pri čemu se svaka podjedinica sastoji od α ili β polipeptidnog lanca i prostetičke skupine hema (Perutz i sur., 1960.). Naši rezultati za jetra podudaraju se s istraživanjima provedenima na kalifornijskoj pastrvi (*O. mykiss*), kod koje je bilo identificirano pet glavnih α lanaca i četiri glavna β lanca, s rasponom molekulskih masa od 15,1 do 16,0 kDa (Fago i sur., 2002.). Yu i sur. (1997.) u analizama ljudske krvi također su uočili istovremenu pojavu monomera i dimera nakon razdvajanja hemoglobina pomoću SDS-poliakrilamidne gel elektroforeze. Sukladno tome, m/z pik na ~15 kDa najvjerojatnije odgovara α -lancu ili β -lancu, m/z pik na ~30 kDa vjerojatno odgovara kovalentnom produktu α - α , β - β ili α - β povezivanja, dok m/z pik na ~45 kDa vjerojatno odgovara kovalentno vezanom trimeru (Yu i sur., 1997.). MALDI-TOF-MS spektri dobiveni za SMM frakcije Fe u škragama također su pokazali jasne m/z pikove na ~15 kDa, koje je moguće pripisati hemoglobinskim monomerima. No, opaženi su i dodatni m/z pikovi na nižim molekulskim masama, što ukazuje na vjerojatnu prisutnost višestruko nabijenih biomolekula (na primjer, dvostruko nabijenih (m/z : 7,7 kDa; 2+) ili trostruko nabijenih (m/z : 5,1 kDa; 3+)), dok istovremeno u škragama pojava multimera nije zabilježena.

Uporabom LC-MS/MS-a i pretraživanjem baza Mascot sustavom, u prikupljenim je i pročišćenim SMM frakcijama jetara i škruga vardarskog klana potvrđena prisutnost hemoglobina. I u jetrima i u škragama identificirana je β podjedinica hemoglobina, dok je α -podjedinica identificirana samo u jednom uzorku škruga. U MALDI-TOF masenom spektru škruga u kojemu je pronađena α podjedinica, pored m/z pika na 15,3 kDa, uočena su i dva dodatna m/z pika nižih molekulskih masa, 11,3 kDa i 13,5 kDa, za koje se može pretpostaviti da odgovaraju upravo hemoglobinskoj α podjedinici. Niža molekulska masa α -podjedinice (15,1 kDa) u usporedbi s β -podjedinicom (15,9 kDa) već je i prije zabilježena u ljudskom

hemoglobinu (Yu i sur., 1997.), kao i hemoglobinu štakora (α : 15,3 kDa, β : 16.0 kDa) (Fernández-Menéndez i sur., 2018.).

Naši su rezultati nedvojbeno potvrdili prisutnost krvi u jetrima i škragama vardarskog klena, što nije bilo iznenađujuće budući da izdvajanju organa i citosolskih frakcija nije prethodila perfuzija organa. U uzorcima jetara obično je očekivano da dio Fe bude vezan na transportni protein transferin (80 kDa; Neves i sur., 2009.). No, kao što je vidljivo iz gore prikazanih rezultata, u našem je istraživanju Fe i u jetrima i u škragama bilo raspodijeljeno u području biomolekula čije su molekulske mase bile ili znatno više ili nešto niže od molekulske mase transferina. Predominantno vezanje Fe na hemoglobin, a ne transferin, u skladu je s nalazima Fernández-Menéndez i sur. (2018.) koji su pokazali da je u crvenim krvnim stanicama štakora tek 13% ukupnog Fe vezano na transferin. Povezivanje dvodimenzionalne tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (SEC-AEC-HPLC) i raznih tehnika spektrometrije masa (HR ICP-MS; MALDI-TOF-MS; LC-MS/MS) pokazalo se osjetljivim i optimalnim načinom detekcije, karakterizacije i identifikacije biomolekula koje vežu Fe, kao što je već i ranije zabilježeno tijekom istraživanja hemoglobina (Kleinert i sur., 2008.).

4.3.2. Toplinski stabilne biomolekule koje vežu Cd, Cu i Zn

Razdvajanjem citosolskih frakcija jetara i škraga vardarskih klenova uzorkovanih 2015. godine primjenom SEC₂₀₀-HPLC-a zabilježeno je vezanje Cd, Cu i Zn u području NMM biomolekula (~5-25 kDa), vjerojatno MT, kao i dodatno vezanje Zn u području VMM (~500 do >600 kDa) i SMM biomolekula (~25-300 kDa). Rezultati za Cu odnose se samo na jetrima vardarskog klena jer zbog niskih citosolskih koncentracija nije bilo moguće postojecom analitičkom opremom provesti analize Cu u škragama. Ostvareni rezultati podudaraju se s rezultatima o raspodjeli Cd, Cu i Zn u jetrima i škragama vardarskih klenova uzorkovanih 2012. godine. Uzimajući u obzir značajnu funkciju MT u održavanju homeostaze i detoksikaciji Zn, Cu i Cd, u daljnjem je tijeku istraživanja radi prepoznavanja MT izoformi u organima vardarskog klena primijenjen dodatni korak razdvajanja NMM citosolskih biomolekula (~5-20 kDa, dobivenih pomoću SEC₂₀₀-HPLC-a) na temelju njihovog naboja, primjenom AEC-HPLC-a.

Znanstvenici su u dosadašnjim istraživanjima utvrdili postojanje različitog broja izoformi MT u raznim vodenim organizmima. Tako su kod kalifornijske pasrtve (*O. mykiss*) (Kay i sur., 1986.), morskog ježinca (*Echinoidea*) (Wilkinson i Nemer, 1987.) i oštrige

(*Ostrea edulis*) (Roesijadi i sur., 1989.) opisane dvije izoforme, dok su kod hlapa (*Homarus gammarus*) utvrđene tri izoforme MT. Istraživanje MT izoformi može značajno doprinijeti razumijevanju regulacije esencijalnih elemenata poput Cu i Zn te detoksikacije neesencijalnih metala poput Cd u različitim organizmima (Szpunar i Łobiński, 1999). Izoforme MT razlikuju se u aminokiselinskom sastavu, ne uključujući cistein, zbog čega imaju različite izoelektrične točke i različitu hidrofobnost, što omogućuje njihovo razdvajanje pomoću AEC-HPLC-a. AEC-HPLC razdvajanjem NMM biomolekula (~5-20 kDa) iz jetara i škriga vardarskog klana dobivena su dva dobro razdvojena AEC-pika koja su u oba organa imala identična vremena eluiranja. Jetreni AEC-pikovi sadržavali su sva tri analizirana metala (Cd, Cu i Zn), dok je AEC-pik u škrigama sadržavao samo Cd, a vezanje Zn u MT-frakciji škriga nije bilo potvrđeno. Prvi AEC-pik podudara se s vremenom eluiranja standardne otopine izoforme MT-I, dok se drugi pik podudara s vremenom eluiranja standardne otopine izoforme MT-II, potvrđujući vezanje Cd, Cu i Zn u jetrima te Cd u škrigama na dvije MT izoforme. Znanstvenici Duquesne i Richard (1994.) također su u svojim istraživanjima u jetrima dviju vrsta riba (obični iverak, *Limanda limanda*, i maloglavi iverak, *Microstomus kitt*) potvrdili postojanje dviju izoformi MT, s dominantnom prisutnošću izoforme MT-II. Nekoliko drugih autora također je izvijestilo o vezivanju Cd za dvije MT izoforme, MT-I i MT-II, u organima raznih vrsta riba: u jetrima jegulje (*A. anguilla*) i iverka (*L. limanda*) te u jetrima i škrigama zlatne ribice (*Carassius auratus*), žutog soma (*Pelteobagrus fulvidraco*), bezribice (*Pseudorasbora parva*) i grdobine (*Squaliobarbus curriculus*) (Giugere i sur., 2006.; Lacorn i sur., 2001.; Li i sur., 2018.). Izostanak vezanja Zn na MT u škrigama vardarskog klana bio je u skladu s našim prethodnim rezultatima. Uočene razlike između jetara i škriga u vezanju Zn na MT ukazale su na moguće razlike u fiziološkim ulogama izoformi MT u različitim tkivima i organima. Iako su u oba organa nađene obje izoforme, MT-I i MT-II, moguće je da se aminokiselinski slijedovi pojedinih izoformi razlikuju između organa te tako predstavljaju subizoforme MT-I i MT-II svojstvene škrigama i jetrima. Stoga je moguće da jetrene subizoforme metalotioneina koje sadrže i Zn i Cu imaju istovremeno ulogu i u detoksikaciji nesencijalnih i u pohrani esencijalnih metala te po potrebi mogu poslužiti kao izvor tih metala za druge proteine. S druge strane, moguće je da subizoforme MT svojstvene škrigama, koje sadrže Cd, a ne sadrže Zn, imaju prvenstveno ulogu u detoksikaciji. Nadalje, moguće je da te MT izoforme uz Cd sadrže i Cu, ali to nije bilo moguće utvrditi zbog jako niskih citosolskih koncentracija Cu u škrigama.

Za razliku od biomolekula koje vežu Fe, a kod kojih je nakon dvodimenzionalnog kromatografskog razdvajanja provedena analiza spektrometrijom masa, NMM biomolekule koje vežu Cd, Cu i Zn dodatno smo toplinski obradili prije daljnjih analiza, kao dodatni stupanj pročišćavanja toplinskih stabilnih proteina metalotioneina. Toplinski obrađeni citosoli jetara vardarskog klana razdvojeni su SEC₇₅-HPLC-om te je izdvojena NMM frakcija (~10-30 kDa), koja je nadalje fracionirana pomoću AEC-HPLC-a, čime je potvrđeno vezanje Cd, Cu i Zn na dvije MT izoforme, MT-I i MT-II. Dvije dobivene AEC-frakcije analizirali smo pomoću MALDI-TOF-MS-a, kako bismo odredili njihovu točnu molekulsku masu i utvrdili postoje li uočljive razlike u masama MT-I i MT-II izoformi iz jetara vardarskog klana. Na temelju dobivenih masenih spektara utvrđeno je kako obje MT izoforme u jetrima vardarskog klana imaju jednaku molekulsku masu od 6,0 kDa, što je samo 100-200 Da niže od molekulskih masa standarda MT-I (6,2 kDa) i MT-II (6,1 kDa), koji se međusobno razlikuju za samo 100 Da. Uzimajući u obzir točnost MALDI-TOF-MS instrumenta, kao i mogućnost razlika u zasićenju MT ili u sadržaju specifičnih metala vezanih na MT, koji mogu rezultirati razlikama od nekoliko stotina Da u masi (Chassaigne i Łobiński, 1998), naša su istraživanja pokazala da je masa dviju MT izoformi izoliranih iz jetara vardarskog klana podudarna s masama analiziranih MT-I i MT-II standarda. Budući da se MT izoforme međusobno vrlo malo razlikuju u masi (Carpené i Vašák, 1989), očigledno ih nije moguće razdvojiti samo primjenom SEC-HPLC-a te je vidljiva važnost dodatne primjene AEC-HPLC-a, odnosno dvodimenzionalnog razdvajanja. Carpené i Vašák (1989.) identificirali su dvije izoforme MT (MT-I i MT-II) u jetrima zlatne ribice (*C. auratus*) koristeći također anionsko izmjenjivačku kromatografiju i sekvencioniranje aminokiselina, dok se uporaba dvodimenzionalnog pristupa razdvajanju MT (SEC-AEC-HPLC) često primjenjuje u istraživanjima različitih vodenih organizmima, poput riba iverka (*L. limanda*; Lacorn i sur., 2001.), babuške (*C. auratus gibelio*; Goenaga Infante i sur., 2006.), jegulje (*A. anguilla*; Rodríguez-Cea i sur., 2003.), morskog soma (*Netuma barba*) i bisernog ciklida (*Geophagus brasiliensis*) (Rodríguez-Cea i sur., 2003.) te mekušaca (Maltez i sur., 2009.).

Daljnja sličnost između dviju izoformi MT iz jetara vardarskog klana i dvaju standarda (MT-I i MT-II) odnosi se na činjenicu da su i kod jednih i kod drugih u masenim spektrima detektirani i niži pikovi na 12,0 kDa za jetra te 12,3-12,4 kDa za MT standarde, a koji vjerojatno odgovaraju MT dimerima. Da osim MT izoformi postoje i MT varijante različitih molekulskih masa, odnosno monomeri (10 kDa, MT-10) i dimeri (20 kDa, MT-20), potvrđeno je u prijašnjim istraživanjima na raznim organizmima, i to na ribama

(mozambičkoj tilapiji (*Oreochromis mossambicus*), Chan, 1994.; Wu i sur., 1999.; vrsti iz reda Somovki (*Heteropneustes fossilis*), Chatterjee i Maiti, 1987.; morskoj mački bljedici (*Scyliorhinus canicula*), Hidalgo i sur., 1988.), na štakorima (Hidalgo i sur., 1988.), na školjkašima (oštrigama (*O. edulis*), Fowler i sur., 1986.; dagnjama (*Mytilus galloprovincialis*), Frazier i sur., 1985.; Ivanković i sur., 2002.) i na puževima (*Gastropoda*) (Langston i Zhou, 1978.).

Toplinski obrađeni citosoli škrge vardarskog klena također su bili razdvojeni SEC₇₅-HPLC-om te je izdvojena NMM frakcija (~10-30 kDa). No, ona nije dalje frakcionirana pomoću AEC-HPLC-a zbog nemogućnosti detekcije uslijed prevelikog razrijeđenja, već je provedena izravna analiza pomoću MALDI-TOF-MS-a. U dobivenim masenim spektrima NMM frakcije škrge zabilježena su tri *m/z* pika, od kojih je najuočljiviji bio *m/z* pik na 4,9 kDa, koji zbog svoje relativno niske molekulske mase nije djelovao kao da predstavlja pik metalotioneina. No, i Maltez i sur. (2009.) su pronašli izraziti pik kadmija na 5,1 kDa provodeći istraživanje na pužu (*Marisa cornuarietis*). Iako su u početku zaključili kako je ova molekulska masa preniska u usporedbi s već klasificiranim metalotioneinima ili metalotioneinu sličnim proteinima (MLP), analizirajući aminokiselinski slijed ipak su zaključili kako je moguće da MLP izoforma na 5,1 kDa odgovara metalotioneinu. U masenim spektrima škrge vardarskog klena zabilježena su i dva manja *m/z* pika, jedan na 6,2 kDa koji odgovara molekulskoj masi standarda MT (6,1-6,2 kDa) te drugi na 3,1 kDa koji se vjerojatno odnosi na dvostruko nabijeni molekulski ion MT. Upotreba ovakvog pristupa analizi biomolekula primjenom masene spektrometrije nakon samo jednog stupnja razdvajanja citosola (SEC-HPLC) očito ima svoje nedostatke, budući da ne osigurava mogućnost pouzdanog razlučivanja dviju MT izoformi. No, s druge strane, rezultati dobiveni našim istraživanjima ukazali su na postojanje razlika MT prisutnih u jetrima i u škragama. Kao prvo, naše otkriće da vezanje Zn na MT u škragama, za razliku od MT u jetrima, nije bilo moguće detektirati, u skladu je s otkrićem Noël-Lambota i sur. (1978.) da MT u škragama jegulja (*A. anguilla*), za razliku od MT u jetrima, vežu vrlo male količine Zn i Cu. Ovi su znanstvenici također tvrdili kako MT nije prirodno prisutan u škragama, već njegovu sintezu u škragama inducira izloženost kadmiju (Noël-Lambota i sur., 1978.). Van Campenhout i sur. (2004.) primjetili su sličnu razliku između MT u jetrima i bubrežima šarana (*C. carpio*), gdje je samo 2% citosolskog Zn bilo vezano za MT u bubrežima, a više od 30% u jetrima. Razlika između MT u škragama i MT u jetrima vardarskog klena dodatno je potvrđena činjenicom da je u škragama dominantno prisutna MT izoforma niže molekulske mase (~5 kDa), uz prisutnost vrlo male količine uobičajene izoforme MT, molekulske mase 6 kDa.

4.3.3. Toplinski stabilne biomolekule koje vežu Mo

U znanstvenoj je literaturi navedeno kako zasad nije provedena molekularna karakterizacija transportera molibdena, niti proteina za pohranjivanje Mo u ribama, kao ni genomička i proteomička istraživanja riba izloženih molibdenu (Reid, 2011.). Tijekom istraživanja na vardarskim klenovima uzorkovanim 2012. godine, analizom toplinski obrađenih citosola jetara i škruga utvrdili smo postojanje toplinski stabilnih citosolskih biomolekula koje vežu Mo, molekulskih masa u rasponu ~5-10 kDa. Kako su te biomolekule zasad neistražene, cilj nam je bio provesti njihovu dodatnu karakterizaciju u jetrima i škrugama vardarskih klenova uzorkovanih 2015. godine te je u tu svrhu ponovljeno razdvajanje citosola pomoću SEC₇₅-HPLC-a, prije i poslije toplinske obrade. U jetrenim citosolima prije toplinske obrade najveći je dio Mo bio raspodijeljen u području SMM biomolekula (~30-140 kDa), dok je samo manji dio bio prisutan u području JNMM biomolekula (~5-10 kDa). No, nakon toplinske obrade citosola, Mo-SMM pik bio je gotovo potpuno uklonjen, dok je uočeno izrazito povećanje Mo-JNMM pika, ukazujući na mogućnost da je dio Mo prešao iz SMM područja u JNMM područje. Pretpostavka je da se to događa uslijed raspadanja toplinski osjetljivih Mo-SMM proteina u manje, toplinski stabilne molekule jako niskih molekulskih masa. Nasuprot tome, Mo je u škrugama i prije i poslije toplinske obrade bio vezan na JNMM biomolekule (~5-10 kDa). Profili raspodjele Mo dobiveni za vardarske klenove iz 2015. godine podudarali su se s rezultatima dobivenim za vardarske klenove uzorkovane 2012. godine.

Kako dodatno razdvajanje pomoću AEC-HPLC-a nije bilo moguće provesti zbog niskih citosolskih koncentracija Mo, molibdenske JNMM frakcije iz obaju organa (~5-10 kDa) dobivene pomoću SEC₇₅-HPLC-a izravno su analizirane primjenom MALDI-TOF-MS-a. U masenim spektrima obaju organa bila su prisutna dva jasno razlučena *m/z* pika. U jetrima je *m/z* pik najvećeg intenziteta bio zabilježen na 8,5 kDa, dok je drugi niži *m/z* pik bio zabilježen na 4,2-4,4 kDa te se vjerojatno radilo o dvostruko nabijenom molekulskom ionu. Za razliku od jetre, u škrugama je *m/z* pik većeg intenziteta bio zabilježen na 3,3 kDa, dok je niži *m/z* pik bio zabilježen na 8,5 kDa te je odgovarao masi glavnog jetrenog *m/z* pika. Moguće je pretpostaviti kako se biomolekule molekulske mase 8,5 kDa, dominantno prisutne u jetrima, a puno manje u škrugama, odnose na JNMM biomolekule koje vežu Mo, a koje se u citosolu pojavljuju tek nakon toplinske obrade, vjerojatno raspadanjem SMM biomolekula. Nasuprot

tome, manje biomolekule na ~3 kDa, dominantno prisutne u škrigama, vjerojatno se odnose na toplinski stabilne biomolekule koje su prisutne u citosolu škriga čak i prije toplinske obrade. Budući da zbog upotrebe spektrometra masa niskog razlučivanja, LC-MS/MS analiza s naknadnim Mascot pretraživanjem nije rezultirala definitivnim prepoznavanjem tih dviju toplinskih stabilnih biomolekula koje vežu Mo, analize smo proširili na njihovo sekvenciranje koje je trenutno u tijeku. U masenim spektrima u jetrima zabilježeno je i nekoliko manjih pikova na 6,9 kDa i 9,6 kDa, koji zasad nisu identificirani, također zbog niskog razlučivanja primijenjenog spektrometra masa.

ZAKLJUČCI

5. ZAKLJUČCI

1. Analiziranje raspodjela odabranih elemenata među citosolskim biomolekulama u jetrima i škragama dvaju srodnih bioindikatorskih organizama, klena (*Squalius cephalus*) i vardarskog klena (*Squalius vardarensis*), kombiniranom primjenom kromatografskih tehnika i nekoliko tehnika spektrometrije masa provedeno u sklopu izrade ove doktorske disertacije predstavlja početni korak u istraživanju unutarstanične sudbine i ponašanja metala u organima riba. Dobiveni rezultati predstavljaju osnovu za razvoj novih biomarkera izloženosti, odnosno toksičnih učinaka metala.
2. Primjenom SEC-HPLC-a i HR ICP-MS-a određene su raspodjele esencijalnih elemenata Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Se i Zn te neesencijalnih elemenata Cd i Pb među citosolskim biomolekulama različitih molekulskih masa u jetrima i škragama klena (*S. cephalus*) iz umjereno onečišćene rijeke Sutle i vardarskog klena (*S. vardarensis*) iz makedonskih rijeka pod utjecajem aktivnih rudnika, pri uvjetima niskih i povišenih izloženosti metalima u riječnoj vodi. Od dobivenih se rezultata posebno može istaknuti sljedeće:
 - raspodjela kobalta predominantno u području biomolekula visokih molekulskih masa (~20-410 kDa) te u dva područja biomolekula jako niskih molekulskih masa (~2-9 kDa i <2 kDa) u jetrima obiju vrsta klena te u škragama klena *S. cephalus*; biomolekule molekulskih masa ispod 2 kDa odgovaraju molekulskoj masi kobalamina;
 - raspodjela bakra predominantno u području biomolekula niskih molekulskih masa (~5-40 kDa), čija molekulska masa i vrijeme eluiranja odgovaraju MT u jetrima obiju vrsta klena te u škragama klena *S. cephalus*;
 - raspodjela željeza u području biomolekula visokih molekulskih masa (~140-700 kDa) koje obuhvaća molekulsku masu feritina, proteina koji služi za pohranu željeza, te u području biomolekula srednjih molekulskih masa (~10-80 kDa) u jetrima i škragama obiju vrsta klena;
 - raspodjela mangana u širokom području molekulskih masa od 2 do 400 kDa, s najvećom prisutnošću u području biomolekula visokih molekulskih masa (~60-400 kDa) te znatno manjom u području biomolekula srednjih molekulskih masa (~25-85kDa) koje obuhvaćaju i molekulske mase transportnih proteina

albumina i transferina, u jetrima obiju vrsta klena i u škrigama klena *S. cephalus*;

- raspodjela molibdena predominantno u području biomolekula visokih molekulskih masa (~60 do >600 kDa), koje obuhvaćaju molekulske mase enzima poput aldehid oksidaze, sulfit oksidaze i Fe-Mo flavoprotein ksantin oksidaze, te raspodjela manjeg dijela Mo među biomolekulama niskih molekulskih masa (~3-12 kDa) u jetrima obiju vrsta klena;
- raspodjela selena u širokom području molekulskih masa (~1-400 kDa), i to predominantno vezanog na biomolekule niskih molekulskih masa (~20-60 kDa) i jako niskih molekulskih masa (<5 kDa) u jetrima obiju vrsta klena; u škrigama obiju vrsta klena većina Se je bila raspodijeljena među biomolekulama jako niskih molekulskih masa, ispod 5 kDa, koje obuhvaćaju molekulske mase poznatih selenospojeva, selenoneina i selenometionina, koji sudjeluju u obrani organizma od oksidativnog stresa;
- raspodjela cinka u području biomolekula visokih molekulskih masa (>400 kDa) i srednjih molekulskih masa (~10-380 kDa) u jetrima i škrigama obiju vrsta klena te izražena prisutnost u području biomolekula niskih molekulskih masa (~7-27 kDa), koje odgovaraju molekulskoj masi proteina MT, samo u jetrima obiju vrsta klena; samo u škrigama klena *S. cephalus* Zn se pojavljuje i u području biomolekula jako niskih molekulskih masa (<5 kDa);
- raspodjela kadmija predominantno u području biomolekula niskih molekulskih masa (~5-30 kDa), što odgovara molekulskoj masi i vremenu eluiranja proteina MT u jetrima i škrigama obiju vrsta klena;
- raspodjela olova predominantno u području biomolekula srednjih molekulskih masa (~35-240 kDa) u jetrima klena, što može ukazivati na njegov potencijal za toksično djelovanje; manji dio olova bio je raspodijeljen u području biomolekula niskih molekulskih masa (~9-20 kDa), što odgovara području eluiranja MT.

3. Analiza utjecaja različitih razina izloženosti metalima u riječnoj vodi na njihovu citosolsku raspodjelu u jetrima i škragama klena i vardarskog klena pokazala je da povećanje izloženosti ne dovodi do kvalitativnih promjena u raspodjeli tih metala među citosolskim biomolekulama. Pri povišenoj izloženosti dolazi samo do kvantitativnih promjena, odnosno do povećanog vezanja pojedinih metala na iste biomolekule na koje se vežu i pri niskoj izloženosti, poput vezanja Cd na MT.
4. Raspodjela pojedinih metala među citosolskim biomolekulama različita je u jetrima i škragama obiju vrsta klenova (*S. cephalus* i *S. vardarensis*) ovisno o različitim funkcijama organa. Na primjer, željezo je u jetrima većinom vezano na biomolekule visokih molekulskih masa, vjerojatno skladišni protein feritin, dok je u škragama to vezanje zanemarivo, a većina je Fe vezana na biomolekule srednjih molekulskih masa. Nadalje, za cink je u jetrima uočeno izrazito vezanje na protein MT koji sudjeluje u održavanju homeostaze cinka, dok u škragama takvo vezanje nije zabilježeno.
5. Raspodjele metala (Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Se, Zn i Cd) među citosolskim biomolekulama pri niskoj i povišenoj izloženosti usporedive su u dvjema srodnim vrstama klena (*S. cephalus* i *S. vardarensis*), što omogućuje usporedbu rezultata dobivenih njihovom primjenom u monitoringu udaljenih slatkovodnih sustava. Manje razlike zabilježene su za citosolske raspodjele Zn i Cd u jetrima dviju vrsta. Iako je u jetrima obiju vrsta klena uočeno vezanje Zn i Cd na niskomolekulske biomolekule, vjerojatno MT, to je vezanje bilo puno jasnije izraženo u jetrima vardarskog klena, što možda ukazuje na snažniju sposobnost detoksikacije te vrste ili na prilagodbu uvjetima povećane izloženosti metalima u rijekama onečišćenim rudničkim otpadom.
6. Analizom toplinski obrađenih citosola dvaju organa vardarskog klena primjenom SEC-HPLC-a i HR ICP-MS-a potvrđena je prisutnost toplinskih stabilnih biomolekula (~10-30 kDa) koje vežu Cd, Cu i Zn u jetrima te Cd u škragama. Utvrđeno je i postojanje toplinski stabilnih biomolekula vrlo niskih molekulskih masa (≤ 10 kDa) koje vežu Mo i Se.

7. Primjenom dviju tehnika spektrometrije masa (MALDI-TOF-MS i LC-MS/MS) nakon dvodimenzionalnog kromatografskog razdvajanja provedeno je precizno određivanje molekulskih masa i identifikacija nekoliko odabranih biomolekula koje vežu Fe, Cd, Cu, Zn i Mo u jetrima i škragama vardarskog klana:

- analizom biomolekula srednjih molekulskih masa (~20-50 kDa) koje vežu Fe, primjenom MALDI-TOF-MS-a utvrđena je prisutnost molekulskih iona na ~15.5 kDa, ~31kDa i ~47 kDa u jetrima, što odgovara monomerima, dimerima i trimerima hemoglobinskih podjedinica; u škragama je utvrđena prisutnost molekulskih iona i na nižim masama (na ~11 kDa, ~13 kDa i ~15 kDa); uporabom LC-MS/MS-a u oba je organa identificirana β podjedinica hemoglobina, dok je α -podjedinica identificirana samo u škragama;
- AEC-HPLC razdvajanjem citosolskih biomolekula niskih molekulskih masa (~5-25 kDa) utvrđeno je vezanje Cd, Cu i Zn u jetrima te Cd u škragama na dvije MT izoforme, MT-I i MT-II;
- toplinski stabilnim biomolekulama niskih molekulskih masa koje vežu Cd (~10-30 kDa), primjenom MALDI-TOF-MS-a određena je molekulska masa od 6,0 kDa u jetrima te 4,9 kDa u škragama, što odgovara literaturnim podacima za MT;
- toplinski stabilnim biomolekulama jako niskih molekulskih masa (~5-10 kDa) koje vežu Mo, primjenom MALDI-TOF-MS-a određene su molekulske mase od 3,3 kDa i 8,5 kDa, pri čemu su biomolekule mase 8,5 kDa dominantno prisutne u jetrima, a biomolekule mase 3,3 kDa u škragama.

LITERATURA

6. POPIS LITERATURE

- Aiken GR, Hsu-Kim H, Ryan JN (2011) Influence of Dissolved Organic Matter on the Environmental Fate of Metals, Nanoparticles, and Colloids. *Environmental Science & Technology* 45: 3196-3201.
- Al-Hakkani MF (2019) Guideline of inductively coupled plasma mass spectrometry “ICP–MS”: fundamentals, practices, determination of the limits, quality control, and method validation parameters. *SN Applied Sciences* 1(7).
- Alderton DHM, Serafimovski T, Mullen B, Fairall K, James S (2005) The chemistry of waters associated with metal mining in Macedonia. *Mine Water and the Environment* 24: 139–149.
- Aleksandrov ML, Gall LN, Krasnov VN, Nikolaev VI, Pavlenko VA, Shkurov VA (1984) Extraction of Ions from Solutions at Atmospheric Pressure – a Method for Mass Spectrometric Analysis of Bioorganic Substances. *Doklady Akademii Nauk SSSR* 277: 379-383.
- Alves Peixoto RR, Fernández-Menéndez S, Fernández-Colomer B, Cadore S, Sanz-Medela A, Fernández-Sánchez ML (2019) Quantitative speciation analysis for the in vivo study of iron metabolism and bioavailability from formula milk fortified with stable isotope enriched iron oxo-hydroxide nanoparticles. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 34: 774-781.
- Amunugama R, Jones R, Ford M, Allen D (2013) Bottom-Up Mass Spectrometry–Based Proteomics as an Investigative Analytical Tool for Discovery and Quantification of Proteins in Biological Samples. *Advances in Wound Care (New Rochelle)* 2: 549–557.
- Anan Y, Kunito T, Sakai H, Tanabe S (2002) Subcellular distribution of trace elements in the liver of sea turtles. *Marine pollution bulletin* 45: 224– 229.
- Andreevska D, Menkovska M, Andov D (2013) Overview of the current condition, in production consumption and the research potential of the rice crop in the Republic of Macedonia. *Macedonian Journal of Animal Science* 3: 219–228.
- Andreini C, Banci L, Bertini I, Rosato A (2006) Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *Journal of proteome research* 5: 196-201.
- Awad H, Khamis MM, El-Aneed A (2015) Mass Spectrometry, Review of the Basics: Ionization. *Applied Spectroscopy Reviews* 50: 158-175.

- Baldwin IG, Kramer KJM (1994) Biological early warning systems (BEWS). U: Kramer KJM (urednik) Biomonitoring of coastal waters and estuaries CRC Press, Boca Raton, str. 1–28.
- Banerjee S, Mazumdar S (2012) Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. International Journal of Analytical Chemistry Vol. 2012, Article ID 282574.
- Barak NAE, Mason CF (1990) Mercury, cadmium and lead concentrations in five species of freshwater fish from Eastern England. Science of the Total Environment 92: 257–263.
- Barišić J, Dragun Z, Ramani S, Filipović Marijić V, Krasnići N, Čož-Rakovac R, Kostov V, Rebok K, Jordanova M (2015) Evaluation of histopathological alterations in the gills of Vardar chub (*Squalius vardarensis* Karaman) as an indicator of river pollution. Ecotoxicology and Environmental Safety 118: 158-166.
- Battaglia V, Compagnone A, Bandino A, Bragadin M, Rossi CA, Zanetti F, Colombatto S, Grillo MA, Toninello A (2009) Cobalt induces oxidative stress in isolated liver mitochondria responsible for permeability transition and intrinsic apoptosis in hepatocytes primary cultures. International Journal of Biochemistry and Cell Biology 41: 586–594.
- Baudin JP, Fritsch AF (1989) Relative contributions of food and water in the accumulation of ^{60}Co by a freshwater fish. Water Research 23: 817–823.
- Bawuro AA, Voegborlo RB, Adimado AA (2018). Bioaccumulation of Heavy Metals in Some Tissues of Fish in Lake Geriyo, Adamawa State, Nigeria. Journal of Environmental and Public Health. Vol. 2018, Article ID 1854892.
- Beers MH, Berkow R (1998) The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, Beers MH i Berkow R (urednici). 17 izd., Whitehouse Station, NJ: Merck & Co.
- Bettmer J, Montes-Bayón M, Ruiz Encinar J, Fernández Sánchez ML, de la Campa MRF, Sanz Medel A (2009) The emerging role of ICP-MS in proteomic analysis. Journal of Proteomics 72: 989–1005.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2002) Biochemistry (5 izd.), W.H. Freeman and Company, New York, str. 79-91.
- Beyersmann D (2002) Homeostasis and cellular functions of zinc. Materialwissenschaft und Werkstofftechnik 33: 764–769.

- Blust R (2012) Cobalt. U: Wood CM, Farrell AP, Brauner CJ (urednici) Fish Physiology: homeostasis and toxicology of essential metals. Vol. 31A. Academic, London, str. 291–326.
- Boesl U (2017) Time-of-flight mass spectrometry: Introduction to the basics. Mass Spectrometry Reviews 36: 86-109.
- Bogdanov B, Smith RD (2005) Proteomics by FTICR mass spectrometry: top down and bottom up. Mass Spectrometry Reviews 24: 168-200.
- Boivin S, Aouffen M, Fournier A, Mateescu M (2001) Molecular characterization of human and bovine ceruloplasmin using MALDI-TOF mass spectrometry. Biochemical and Biophysical Research Communications 288: 1006–1010.
- Bouquignau JM, Giles R (1979) Osmoregulation and pollution of the aquatic medium. U: Gilles R (urednik) Metabolism of Osmoregulation in Animals. John Wiley and Sons Ltd, New York, str. 563-580.
- Branica M (1999) Tragovi metala u prirodnim vodama. Zbornik radova 2. hrvatske konferencije o vodama u Dubrovniku, Hrvatske vode, Zagreb, str. 43-52.
- Brown MT, Depledge MH (1998) Determinants of trace metal concentrations in marine organisms. U: Langston WJ, Bebianno MJ (urednici), Metal Metabolism in Aquatic Environments. Chapman & Hall, London str. 185–217.
- Bruins AP (1998) Mechanistic aspects of electrospray ionization. Journal of Chromatography A 794: 345–357.
- Byrne P, Wood PJ, Reid I (2012) The impairment of river systems by metal mine contamination: A review including remediation options. Critical Reviews in Environmental Science and Technology 42: 2017–2077.
- Bury NR, Boyle D, Cooper CA (2012) Iron. U: Wood CM, Farrell AP, Brauner CJ (urednici) Fish physiology: Homeostasis and toxicology of essential metals, Vol. 31A. Academic, London, str. 201–251.
- Calderón-Celis F, Encinar JR, Sanz-Medel A (2018) Standardization approaches in absolute quantitative proteomics with mass spectrometry. Mass Spectrometry Reviews 37: 715-737.
- Campbell PGC, Stokes PM (1985) Acidification and toxicity of metals to aquatic biota. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 42: 2034-2049.

- Campbell PGC, Giguère A, Bonneris E, Hare L (2005) Cadmium-handling strategies in two chronically exposed indigenous freshwater organisms - the yellow perch (*Perca flavescens*) and the floater mollusc (*Pyganodon grandis*). *Aquatic Toxicology* 72: 83-97.
- Caron A, Rosabal M, Drevet O, Couture P, Campbell PGC (2018) Binding of trace elements (Ag, Cd, Co, Cu, Ni, and Tl) to cytosolic biomolecules in livers of juvenile yellow perch (*Perca flavescens*) collected from lakes representing metal contamination gradients. *Environmental Toxicology and Chemistry* 37: 576-586.
- Carpenè E, Vašák M (1989) Hepatic metallothioneins from goldfish (*Carassius auratus* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 92: 463-468.
- Casiot C, Egal M, Elbaz-Poulichet F, Bruneel O, Bancon-Montigny C, Cordier M-A, Gomez E, Aliaume C (2009) Hydrological and geochemical control of metals and arsenic in a Mediterranean river contaminated by acid mine drainage (the Amous River, France); preliminary assessment of impacts on fish (*Leuciscus cephalus*). *Applied Geochemistry* 24: 787-799.
- Cech NB, Enke CG (2001) Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrometry Reviews* 20:362-387.
- Cerqueira B, Vega FA, Serra C, Silva LFO, Andrade ML (2011) Time of flight secondary ion mass spectrometry and high-resolution transmission electron microscopy/energy dispersive spectroscopy: a preliminary study of the distribution of Cu²⁺ and Cu²⁺/Pb²⁺ on a Bt horizon surfaces. *Journal of Hazardous Materials* 195: 422-431.
- Chait BT (2006) Mass spectrometry: Bottom-up or top-down? *Science* 314: 65-66.
- Chait BT, Kent SBH (1992) Weighing naked proteins: practical, high-accuracy mass measurement of peptides and proteins. *Science* 257: 1885-1894.
- Chalmers MJ, Gaskel SJ (2000) Advances in mass spectrometry for proteome analysis. *Current Opinion in Biotechnology* 11: 384-390.
- Chan KM (1994) PCR-cloning of goldfish and tilapia metallothionein complementary DNAs. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 205:368-374.
- Chatterjee A, Maiti IB (1987) Purification and immunological characterization of cattish *Heteropneustes fossilis* metallothionein. *Molecular and Cellular Biochemistry* 78:55-64.

- Chassaigne H, Łobiński R (1998) Polymorphism and identification of metallothionein isoforms by reversed-phase HPLC with on-line ion-spray mass spectrometric detection. *Analytical Chemistry* 70: 2536-2543.
- Cho A, Normile D (2002) Nobel prize in chemistry. Mastering macromolecules. *Science*. 298: 527–528.
- Chovanec A, Hofer R, Schiemer F (2003) Fish as bioindicators. U: Markert BA, Breure AM, Zechmeister HG (urednici) *Bioindicators & Biomonitoring: Principles, Concepts and Applications*. Elsevier, str. 639-676.
- Cindrić M, Marković A, Horvatić A (2009) Sprengute tehnike tekućinski kromatograf–spektrometar masa: osnove metodologije i primjene. *Medicina* 45: 218-232.
- Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM (2013) Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* 26: 547-603.
- Coleman JE (1992) Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins. *Annual Review of Biochemistry* 61: 897–946.
- Corthals GL, Gygi SP, Aebersold R, Patterson SD (1999) Identification of proteins by mass spectrometry. U: Rabilloud T (urednik) *Proteome research: 2-D Gel electrophoresis and detection methods*. Springer, New York.
- Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Rofe AM (2002) Metallothionein: the multipurpose protein. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59: 627–647.
- Crotti S, Seraglia R, Traldi P (2011) Review: Some thoughts on electrospray ionization mechanisms. *European Journal of Mass Spectrometry* 17: 85–100.
- Csuros M, Csuros C (2002) *Environmental Sampling and Analysis for metals*, Lewis Publishers, poglavlja 7., 8., 9., 12.
- Cukrov M, Jalžić B, Omanović D, Cukrov N (2006) Tragovi metala u vodenom stupcu Urinjske špilje. *Subterranea Croatica* 7: 25-30.
- Dave KA, Headlam MJ, Wallis TP, Gorman JJ (2011) Preparation and analysis of proteins and peptides using MALDI TOF/TOF mass spectrometry. *Current Protocols in Protein Science* Chapter 16: Unit 16.13.
- de Andrade VM, Silva J, Silva FR, Heuser VD, Dias JF, Yoneama ML, de Freitas TRO (2004) Fish as bioindicators to assess the effects of pollution in two southern Brazilian rivers using the Comet assay and micronucleus test. *Environmental and Molecular*

- Mutagenesis 44: 459-468.
- de Hoffmann E, Stroobant V (2007) Mass spectrometry: Principles and applications, John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- de la Calle Guntiñas MB, Bordin G, Rodriguez AR (2002) Identification, characterization and determination of metal binding proteins by liquid chromatography. A review. Analytical and Bioanalytical Chemistry 374: 369–378.
- De Smet H, Blust R, Moens L (2001) Cadmium-binding to transferrin in the plasma of the common carp *Cyprinus carpio*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 128: 45–53.
- Di Giulio RT, Hinton DE (2008) The Toxicology of Fishes. Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, str. 1101.
- Dole M, Mack LL, Hines RL, Mobley RC, Ferguson LD, Alice MB (1968). Molecular Beams of Macroions. The Journal of Chemical Physics, 49: 2240–2249.
- Dolenec T, Serafimovski T, Dobnikar M, Tasev G, Dolenec M (2005) Mineralogical and heavy metal signature of acid mine drainage impacted paddy soil from the western part of the Kočani field (Macedonia). RMZ-Materials and Geoenvironment 52: 397–402.
- Dragun Z, Raspor B, Podrug M (2007) The influence of the season and the biotic factors on the cytosolic metal concentrations in the gills of the European chub (*Leuciscus cephalus* L.). Chemosphere 69: 911-919.
- Dragun Z, Podrug M, Raspor B (2009) The assessment of natural causes of metallothionein variability in the gills of European chub (*Squalius cephalus* L.). Comparative Biochemistry and Physiology Part C -Toxicology and Pharmacology 150: 209-217.
- Dragun Z, Kapetanović D, Raspor B, Teskeredžić E (2011) Water quality of medium size watercourse under baseflow conditions: the case study of river Sutla in Croatia. Ambio 40: 391–407.
- Dragun Z, Krasnići N, Strižak Ž, Raspor B (2012) Lead concentration increase in the hepatic and gill soluble fractions of European chub - an early indicator of increased Pb exposure from the river water. Environmental Science and Pollution Research 19: 2088–2095.
- Dragun Z, Fiket Ž, Vuković M, Raspor B (2013a) Multielement analysis in the fish hepatic cytosol as a screening tool in the monitoring of natural waters. Environmental Monitoring and Assessment 185: 2603-2614.

- Dragun Z, Filipović Marijić V, Kapetanović D, Valić D, Vardić Smrzlić I, Krasnići N, Strižak Ž, Kurtović B, Teskeredžić E, Raspor B (2013b) Assessment of general condition of fish inhabiting a moderately contaminated aquatic environment. *Environmental Science and Pollution Research* 20: 4954–4968.
- Dragun Z, Filipović Marijić V, Vuković M, Raspor B (2015) Metal bioavailability in the Sava River water. U: Milačić R, Ščančar J, Paunović M (urednici) *The Sava River, The handbook of environmental chemistry*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, str. 123-155.
- Dragun Z, Tepić N, Krasnići N, Teskeredžić E (2016) Accumulation of metals relevant for agricultural contamination in gills of European chub (*Squalius cephalus*). *Environmental Science and Pollution Research* 23: 16802-15.
- Dragun Z, Filipović Marijić V, Krasnići N, Ramani S, Valić D, Rebok K, Kostov V, Jordanova M, Erk M (2017) Malondialdehyde concentrations in the intestine and gills of Vardar chub (*Squalius vardarensis* Karaman) as indicator of lipid peroxidation. *Environmental Science and Pollution Research International* 24: 16917-16926
- Dragun Z, Krasnići N, Kolar N, Filipović Marijić V, Ivanković D, Erk M (2018) Cytosolic distributions of highly toxic metals Cd and Tl and several essential elements in the liver of brown trout (*Salmo trutta* L.) analyzed by size exclusion chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Chemosphere* 207: 62-173.
- Dragun Z, Tepić N, Ramani S, Krasnići N, Filipović Marijić V, Valić D, Kapetanović D, Erk M, Rebok K, Kostov V, Jordanova M (2019) Mining waste as a cause of increased bioaccumulation of highly toxic metals in liver and gills of Vardar chub (*Squalius vardarensis* Karaman, 1928). *Environmental pollution* 247: 564-576.
- Duman F, Kar M (2012) Temporal variation of metals in water, sediment and tissues of European chub (*Squalius cephalus* L.). *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 89: 428–433.
- Duncan MW, Heinrich Roder H, Hunsucker SW (2008) Quantitative matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* 7: 355–370.
- Duraković Z, Labar B (2000) Hematološke promjene kao posljedice otrovanja. U: *Klinička toksikologija*, Grafos, Zagreb, str. 83-87.

- Duquesne S, Richard A (1994) Isolation and characterization of naturally and artificially induced hepatic metallothioneins from two species of flatfish: *Limanda limanda* and *Microstomus kitt*. *Marine Biology* 119: 461-470.
- Engel DW, Fowler BA (1979) Factors influencing cadmium accumulation and its toxicity to marine organisms. *Environmental Health Perspectives* 28: 81-88.
- Environmental Agency (2006) Attenuation of mine pollutants in the hyporheic zone. Environment Agency, Bristol.
- Erk M, Ivanković D, Raspor B, Pavičić J (2002) Evaluation of different purification procedures for the electrochemical quantification of mussel metallothioneins. *Talanta* 57: 1211–1218.
- European Parliament and the Council of the European Union (EPCEU) (2000) Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy (EU-WFD). Official J L 327/1.
- European Parliament and the Council of the European Union (EPCEU) (2008) Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC, and amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council. Official J L 348/84.
- Evans DW, Dodoo DK, Hanson PJ (1993) Trace element concentrations in fish livers: Implications of variations with fish size in pollution. *Marine Pollution Bulletin* 26: 329-334.
- Fago A, Forest E, Weber RE (2002) Hemoglobin and subunit multiplicity in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hemoglobin system. *Fish Physiology and Biochemistry* 24: 335-342.
- Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM (1989) Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246: 64-71.
- Fernández-Menéndez S, Fernández-Sánchez ML, Alves Peixoto RR, Fernández-Colomer B, Sanz-Medel A (2018) In vivo study of the effect of lactoferrin on iron metabolism and bioavailability from different iron chemical species for formula milk fortification. *Electrophoresis* 39: 1702-1713.

- Ferrarello CN, Montes-Bayón M, de la Campa MF, Sanz-Medel A (2000) Multi-elemental speciation studies of trace elements associated with metallothionein-like proteins in mussels by liquid chromatography with inductively coupled plasma time-offlight mass spectrometric detection. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 15: 1558–1563.
- Ferrarello CN, Fernandez de la Campa MR, Carrasco JF, Sanz-Medel A (2002) Speciation of metallothionein-like proteins of the mussel *Mytilus edulis* by orthogonal separation mechanisms with inductively coupled plasma–mass spectrometry detection: effect of selenium administration. *Spectrochimica Acta Part B* 57: 439–449.
- Flora SJS, Mittal M, Mehta A (2008) Heavy metal induced oxidative stress and its possible reversal by chelation therapy. *Indian Journal of Medical Research* 128: 501-523.
- Florence TM, Batley GE (1977) Determination of the chemical forms of trace metals in natural waters, with special reference to copper, lead, cadmium and zinc. *Talanta* 24: 151-158.
- Fowler BA, Engel DW, Brouwer M (1986) Purification and characterization studies of cadmium-binding proteins from the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Environmental Health Perspectives* 65: 63-9.
- Frazier JM, George SS, Overnell J, Coombs TL, Kagi J (1985) Characterization of two molecular weight classes of cadmium binding proteins from the mussel, *Mytilus edulis* (L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C, Comparative Pharmacology and Toxicology* 80: 257-262.
- Fridovich I, Freeman B (1986) Antioxidant defenses in the lung. *Annual Review of Physiology* 48: 693–702.
- Frodello JP, Romeo M, Viale D (2000) Distribution of mercury in the organs and tissues of five toothed-whale species of the Mediterranean. *Environmental Pollution* 108: 447-452.
- Gaetke LM, Chow-Johnson HS, Chow CK (2014) Copper: toxicological relevance and mechanisms. *Archives of Toxicology* 88: 1929–1938.
- Gaillardet J, Viers J, Dupré B (2004) Trace elements in river waters. U: Holland HD & Turekian K K (urednici) *Treatise on geochemistry: Trace Elements in River Waters*. Vol. 5. Amsterdam: Elsevier, str. 225–272.
- Galić N (2004) Elektroraspršenje - ionizacija u masenoj spektrometriji. *Kemija u Industriji* 53: 117–123.

- Galić N, Cindrić M (2008) Analiza proteina spektrometrijom masa. *Kemija u Industriji* 57: 231-243.
- Gandolfi G, Zerunian S, Torricelli P, Marconato A (1991) *I pesci delle acque interne italiane*. Roma, Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato, str. 617.
- Garcia JS, Schmidt de Magalhaes C, Zezzi Arruda MA (2006) Trends in metal-binding and metalloprotein analysis. *Talanta* 69: 1–15.
- García-Sevillano MA, García-Barrera T, Navarro F, Abril N, Pueyo C, López-Barea J, Gómez-Ariza JL (2014) Use of metallomics and metabolomics to assess metal pollution in Doñana National Park (SW Spain). *Environmental Science & Technology* 48: 7747–7755.
- Gates PJ (2014) Electrospray mass spectrometry: some tricks and tools for structural characterisation of natural products. *European Pharmaceutical Review* 19: 29-32.
- Gellein K, Roos PM, Evje L, Vesterberg O, Flatena TP, Nordberg M, Syversen T (2007) Separation of proteins including metallothionein in cerebrospinal fluid by size exclusion HPLC and determination of trace elements by HR-ICP-MS. *Brain Research* 1174: 136–142.
- Geret F, Cosson RP (2002) Induction of specific isoforms of metallothionein in mussel tissues after exposure to cadmium or mercury. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 42: 36-42.
- Gevaert K, Demol H, Puype M, Broekaert B, De Boeck S, Houthaève T, Vandekerckhove J (1997) Peptides adsorbed on reverse-phase chromatographic beads as targets for femtomole sequencing by post-source decay matrix assisted laser desorption ionization-reflectron time of flight mass spectrometry (MALDI-RETOF-MS). *Electrophoresis* 18: 2950-2960.
- Gibson D, Costello CE (2000) Mass spectrometry of biomolecules. *Separation Science and Technology* 2: 299-327.
- Giguère A, Campbell PGC, Hare L, McDonald DG, Rasmussen JB (2004) Influence of lake chemistry and fish age on cadmium, copper, and zinc concentrations in various organs of indigenous yellow perch (*Perca flavescens*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 61: 1702–1716.
- Giguère A, Campbell PGC, Hare L, Couture P (2006) Sub-cellular partitioning of cadmium, copper, nickel and zinc in indigenous yellow perch (*Perca flavescens*) sampled along a

- polymetallic gradient. *Aquatic Toxicology* 77: 178–189.
- Gillet LC, Leitner A, Aebersold R (2016) Spectrometry Applied to Bottom-Up Proteomics: Entering the High-Throughput Era for Hypothesis Testing *Annu. Reviews in Analytical Chemistry* 9: 449–472.
- Glish GL, Vachet RW (2003) The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nature Reviews Drug Discovery* 2: 140-150.
- Goenaga Infante H, Van Campenhout K, Schaumlöffel D, Blust R, Adams FC (2003) Multi-element speciation of metalloproteins in fish tissue using size-exclusion chromatography coupled “on-line” with ICP-isotope dilution-time-of-flight-mass spectrometry. *Analyst* 128: 651–657.
- Goenaga Infante H, Van Campenhout K, Blust R, Adams FC (2006) Anion-exchange high performance liquid chromatography hyphenated to inductively coupled plasma-isotope dilution-time-of-flight mass spectrometry for speciation analysis of metal complexes with metallothionein isoforms in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) exposed to environmental metal pollution. *Journal of Chromatography A* 1121: 84–190.
- Goering PL (1993) Lead-protein interactions as a basis for lead toxicity. *Neurotoxicology*. Summer-Fall 14: 45-60.
- Gómez-Ariza JL, García-Barrera T, Lorenzo F, Bernal V, Villegas MJ, Oliveira V (2004) Use of mass spectrometry techniques for the characterization of metal bound to proteins (metallomics) in biological systems. *Analytica Chimica Acta* 524: 15–22.
- Gómez-Ariza JL, García-Barrera T, Lorenzo F, Arias A (2005) Analytical characterization of bioactive metal species in the cellular domain (metallomics) to simplify environmental and biological proteomics. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 85: 255-266.
- Goto D, Wallace WG (2010) Metal intracellular partitioning as a detoxification mechanism for mummichogs (*Fundulus heteroclitus*) living in metal-polluted salt marshes. *Marine Environmental Research* 69: 163–171.
- Goudog C, Pramanik BN, Liu YH, Urooj AM (2008) Application of LC/MS in structure identification of small molecules and proteins in drug discovery. *Journal of Mass Spectrometry* 42: 279-87.
- Graves PR, Haystead TA (2002) Molecular biologist’s guide to proteomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66: 39–63.

- Grochowski C, Blicharska E, Krukow P, Jonak K, Maciejewski M, Szczepanek D, Jonak K, Flieger J, Maciejewski R (2019) Analysis of Trace Elements in Human Brain: Its Aim, Methods, and Concentration Levels. *Frontiers in chemistry* 7: 115.
- Gross JH (2011) *Mass spectrometry: a textbook*, 2. izd., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Gundry RL, White MY, Murray CI, Kane LA, Fu Q, Stanley BA, Van Eyk JE (2009) Preparation of Proteins and Peptides for Mass Spectrometry Analysis in a Bottom-Up Proteomics Workflow. *Current protocols in molecular biology*; CHAPTER: Unit 10.25.
- Habeković D, Aničić I, Safner R (1993) Dinamika rasta klena u rijeci Savi. *Ribarstvo* 48: 79-88.
- Habeković D, Debeljak Lj, Pažur K, Popović J, Homen Z, Marko S, Fašaić K, Mavračić D (1982) Studija o utjecaju hidroenergetskog sistema RHE Obrovac na riblji fond i ribarstvo. *Fak. polj. znan. Zagreb, Istraživački razvojni centar za ribarstvo, Zagreb.*
- Hagel L, Haneskog L (2010) Size-exclusion chromatography. *U: Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley and Sons, Chichester, <http://www.els.net>.
- Hamelink JL, Landrum PF, Harold BL, William BH (1994) *Bioavailability: Physical, Chemical, and Biological Interactions*. Boca Raton, FL: CRC Press Inc.
- Harte J, Holdren C, Schneider R, Shirley C (1991) *Toxics A to Z, a guide to everyday pollution hazards*. Oxford, Engleska, University of California Press.
- Harris ED (2000) Cellular copper transport and metabolism. *Annual Review of Nutrition* 20: 291-310.
- Hauser-Davis RA, de Campos RC, Zioli RL (2012) Fish metalloproteins as biomarkers of environmental contamination. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 218: 101-123.
- He M, Huang L, Zhao B, Chen B, Hu B (2017) Advanced functional materials in solid phase extraction for ICP-MS determination of trace elements and their species - a review. *Analytica Chimica Acta* 973: 1–24.
- Heath AG (1995) *Water pollution and fish physiology*. CRC Press, Boca Raton, Florida, str. 339.
- Hidalgo J, Bernuces J, Thomas DG, Garvey JS (1988) Effect of 2-mercaptoethanol on the electrophoretic behavior of rat and dogfish metallothionein and chromatographic evidence of a naturally occurring metallothionein polymerization. *Comparative*

- Biochemistry and Physiology - Part C 89: 191-196.
- Hille B (1992) Ionic channels of excitable membranes, 2. izd., Sinauer Associates Inc., Sunderland.
- Ho CS, Lam CWK, Chan MHM, Cheung RCK, Law LK, Lit LCW, Ng KF, Suen MWM, Tai HL (2003) Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. *The Clinical Biochemist Reviews* 24: 3–12.
- Hogstrand C, Lithner G, Haux C (1991) The importance of metallothionein for the accumulation of copper, zinc and cadmium in environmentally exposed perch, *Perca fluviatilis*. *Pharmacology and Toxicology* 68: 492–501.
- Holcombe GW, Benoit DA, Leonard EN, McKim JM (1976) Long term effects of lead exposure on three generations of brook trout, *Salvelinus fontinalis*. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 33: 1731-1741.
- Horvatić A, Cindrić M (2009) Analiza farmaceutskih peptida spektrometrijom masa. *Medicina* 45: 258-263.
- Houk RS, Fassel VA, Flesch GD, Svec HJ, Gray AL, Taylor CE (1980) Inductively coupled argon plasma as an ion-source for mass-spectrometric determination of trace-elements. *Analytical Chemistry* 52: 2283–9.
- <http://www.mhhe.com/>
- Huang ZY, Shen JC, Zhuang ZX, Wang XR, Lee FSC (2004) Metallothionein as a biomarker for mercury in tissues of rat fed orally with cinnabar. *Applied Organometallic Chemistry* 18: 255–261.
- Ivanković D, Pavičić J, Kozar S, Raspor B (2002) Multiple forms of metallothionein from the digestive gland of naturally occurring and cadmium exposed mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Helgoland Marine Research* 56: 95-101.
- Iwai N, Watanabe C, Suzuki T, Suzuki KT, Tohyama C (1988) Metallothionein induction by sodium selenite at two different ambient temperature in mice. *Archives of Toxicology* 62: 447–451.
- Janz DM (2012) Selenium. U: Wood CM, Farrell AP, Brauner CJ (urednici) *Fish physiology: Homeostasis and toxicology of essential metals*, Vol 31A. Academic, London, str. 327-374.
- Johnson JL, Rajagopalan KV (1976) Purification and properties of sulphite oxidase from human liver. *Journal of Clinical Investigation* 58: 543–550.

- Jordanova M, Rebok K, Dragun Z, Ramani S, Ivanova L, Kostov V, Valić D, Krasnići N, Filipović Marijić V, Kapetanović D (2016) Histopathology investigation on the Vardar chub (*Squalius vardarensis*) populations captured from the rivers impacted by mining activities. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 129: 35–42.
- Jordanova M, Rebok K, Dragun Z, Ramani S, Ivanova L, Kostov V, Valić D, Krasnići N, Filipović Marijić V, Kapetanović D (2017) Effects of heavy metal pollution on pigmented macrophages in kidney of Vardar chub (*Squalius vardarensis* Karaman). *Microscopy Research and Technique* 80: 930–935.
- Ju YR, Chen WY, Singh S, Liao CM (2011) Trade-offs between elimination and detoxification in rainbow trout and common bivalve molluscs exposed to metal stressors. *Chemosphere* 85: 1048-1056.
- Jukola E, Hakkarainen J, Saloniemi H, Sankari S (1996) Blood selenium, vitamin E, vitamin A, and β -carotene concentrations and udder health, fertility treatments, and fertility. *Journal of Dairy Science* 79: 838- 45.
- Karas M, Hillenkamp F (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry* 60: 2299-2301.
- Kay J, Thomas DG, Brown MW, Cryer A, Shurben D, Solbe JF, Garvey JS (1986) Cadmium accumulation and protein binding patterns in tissues of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Environmental Health Perspectives* 65: 133-139.
- Kazazić S, Pečur S, Srzić D (1999) Matricom potpomognuta ionizacija desorpcijom laserskog zračenja. *Kemija u industriji* 48: 181-187.
- Kelleher NL (2004) Top-down proteomics. *Analytical Chemistry* 76: 196A–203A.
- Khalsa-Moyers G, McDonald WH (2006) Developments in mass spectrometry for the analysis of complex protein mixtures. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* 5: 98-111.
- Kirschbaum J (1981) Cyanocobalamin. U: Florey K (urednik) *Analytical profiles of drug substances*, Vol. 10. Academic, New York, str. 183–288.
- Kleinert P, Schmid M, Zurbriggen K, Speer O, Schmutz M, Roschitzki B, Durka SS, Leopold U, Kuster T, Heizmann CW, Frischknecht H, Troxler H (2008) Mass Spectrometry: A Tool for Enhanced Detection of Hemoglobin Variants. *Clinical Chemistry* 54: 69–76.

- Klotz L-O, Kröncke K-D, Buchczyk DP, Sies H (2003) Role of copper, zinc, selenium and tellurium in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress. *Journal of Nutrition* 133: 1448S–1451S.
- Kottelat M, Freyhof J (2007) Handbook of European freshwater fishes. Kottelat, Cornol, Switzerland and Freyhof, Berlin, Germany.
- Kraemer LD, Campbell PGC, Hare L (2005) Dynamics of Cu, Cd, and Zn accumulation in organs and sub-cellular fractions in field transplanted juvenile yellow perch (*Perca flavescens*). *Environmental Pollution* 138: 324–337.
- Kubrak OI, Rovenko BM, Husak VV, Vasylykiv OY, Storey KB, Storey JM, Lushchak VI (2011) Goldfish exposure to cobalt enhances hemoglobin level and triggers tissuespecific elevation of antioxidant defenses in gills, heart and spleen. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 155: 325–332.
- Kuckova S, Hynek R, Kodicek M (2007) Identification of proteinaceous binders used in artworks by MALDI-TOF mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 388: 201–206.
- Kurtović B, Kapetanović D, Matašin Ž (2007) Usporedba histoloških promjena u organima klena (*Squalius cephalus*) s brojem heterotrofnih i koliformnih bakterija u vodi rijeke Save. *Ribarstvo* 65: 127-140.
- Kurtović B, Teskeredžić E, Teskeredžić Z (2008) Histological comparison of spleen and kidney tissue from farmed and wild European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Acta Adriatica* 49: 147–154.
- Kwong RWM, Andrés JA, Niyogi S (2011) Effects of dietary cadmium exposure on tissue-specific cadmium accumulation, iron status and expression of iron-handling and stress-inducible genes in rainbow trout: influence of elevated dietary iron. *Aquatic Toxicology* 102: 1–9.
- Lacorn M, Lahrssen A, Rotzoll N, Simat T J, Steinhart H (2001) Quantification of metallothionein isoforms in fish liver and its implications for biomonitoring. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 140-145.
- Langston W, Zhou M (1987). Cadmium accumulation, distribution and metabolism in the gastropod *Littorina littorea*: The role of metal-binding proteins. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 67: 585-601.

- Landis WG, Yu M-H (1995) Introduction to environmental toxicology : impacts of chemicals upon ecological systems. Lewis Publishers, Boca Raton Fla.
- Larsson A (1973) Thioredoxin reductase from rat liver. *European Journal of Biochemistry* 35: 346–349.
- Lavradas RT, Chávez Rocha RC, Dillenburg Saint' Pierre T, Godoy JM, Hauser-Davis RA, (2016) Investigation of thermostable metalloproteins in *Perna perna* mussels from differentially contaminated areas in Southeastern Brazil by bioanalytical techniques. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 34: 70–78.
- Lehman LD, Klaassen CD (1986) Separation and quantitation of metallothioneins by high-performance liquid chromatography coupled with atomic absorption spectrophotometry. *Analytical Biochemistry* 153: 305-314.
- Li S, Yang Z, Cao J, Qiu B, Li H (2018) Determination of Metallothionein Isoforms in Fish by Cadmium Saturation Combined with Anion Exchange HPLC-ICP-MS. *Chromatographia* 81: 881–889.
- Libor S, Sundaram TK, Warwick R, Chapman JA, Grundy SMW (1979) Pyruvate carboxylase from a thermophilic *Bacillus*: some molecular characteristics. *Biochemistry* 18: 3647–3653.
- Liu N, Lo LS, Askary SH, Jones L, Kidane TZ, Trang T, Nguyen M, Goforth J, Chu Y-H, Vivas E, Tsai M, Westbrook T, Linder MC (2007) Transcuprein is a macroglobulin regulated by copper and iron availability. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 18: 597–608.
- Livingstone DR (1993) Biotechnology and Pollution Monitoring: Use of Molecular Biomarkers in the Aquatic Environment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 57: 195-211.
- Lobinski R, Marczenko Z (1997) Spectrochemical Trace Analysis for Metals and Metalloids, U: Weber SG (urednik) Wilson and Wilsons *Comprehensive Analytical Chemistry*, Vol. 30, 1 izd., Elsevier, Amsterdam.
- Lobinski R, Chassaing H, Szpunar J (1998) Analysis for metallothioneins using coupled techniques. *Talanta*. 46: 271-289.
- Loeschner K, Harrington CF, Kearney JL, Langton DJ, Larsen EH (2015) Feasibility of asymmetric flow field-flow fractionation coupled to ICP-MS for the characterization of wear metal particles and metalloproteins in biofluids from hip replacement patients.

- Analytical and Bioanalytical Chemistry 407: 4541.
- Luckey TD, Venuopal B, Hutcheson D (1975) Heavy metal Toxicity, Safety and Hormology. U: Coulston F, Korte F (urednici) Environmental Quality and Safety, Vol. 1. G. Thieme Publishers, Stuttgart/ Academic Press, New York, str.120.
- Maitland PS, Campbell RN (1992) Freshwater fishes of the British Isles. Harper Collins Publishers, London. 368 str.
- Majors RE (2003) A review of HPLC column packing technology. American laboratory 35: 46-54.
- Maltez HF, Tagle MV, Fernández de la Campa MR, Sanz-Medel A (2009). Metal metallothioneins like proteins investigation by heteroatom-tagged proteomics in two different snails as possible sentinel organisms of metal contamination in freshwater ecosystems. Analytica Chimica Acta 650: 234-240.
- Mager EM (2012) Lead. U: Wood CM, Farrell AP, Brauner CJ (urednici) Fish physiology: Homeostasis and toxicology of non-essential metals, vol. 31B. Elsevier Academic, London, str. 185–236.
- Manes NP, Nita-Lazar A (2018) Application of targeted mass spectrometry in bottom-up proteomics for systems biology research. Journal of Proteomics 189: 75-90.
- Maret W (2004) Exploring the zinc proteome. Journal of Analytical Atomic Spectrometry 19: 15–19.
- Maritim PK, Gachanja AN, Munyao TM (2016) Speciation of Trace Metals Pb, Zn, Cu and Cd in Surficial Sediment from Makupa Creek Mombasa, Coastal Kenya. Open Access Library Journal, 3: e2679
- Marr JCA, Hansen JA, Meyer JS, Cacela D, Podrabsky T, Lipton J, Bergman HL (1998) Toxicity of cobalt and copper to rainbow trout: application of a mechanistic model for predicting survival. Aquatic Toxicology 43: 225–238.
- Martin-Antonio B, Jimenez-Cantizano RM, Salas-Leiton E, Infante C, Manchado M (2009) Genomic characterization and gene expression analysis of four hepcidin genes in the red banded seabream (*Pagrus auriga*). Fish and Shellfish Immunology 26: 483–491.
- Mason AZ, Jenkins KD (1995) Metal detoxification in aquatic organisms. U: Tessier, A., Turner, D.R. (urednici), Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems. IUPAC, Wiley, New York, str. 479–608.
- Mason CF (2002) Biology of freshwater pollution. 4. izd. Essex University England, str. 387.

- Mason AZ, Perico N, Moeller R, Thrippleton K, Potter T, Lloyd D (2004) Metal donation and apo-metalloenzyme activation by stable isotopically labeled metallothionein. *Marine Environmental Research* 58: 371–375.
- Mason R, Heyes D, Sveinsdottir A (2006) Methylmercury concentrations in fish from tidal waters of the Chesapeake Bay. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51: 425–437.
- Mason RP (2013) Trace Metals in Aquatic Systems. U: Trace Metals in Aquatic Systems, Mason RP (urednik) Blackwell Publishing Ltd.
- Matz CJ, Krone PH (2007) Cell death, stress-responsive transgene activation, and deficits in the olfactory system of larval zebrafish following cadmium exposure. *Marine Environmental Research* 41: 5143–5148.
- McGeer JC, Niyogi S, Smith DS (2012) Cadmium. U: Wood CM, Farrell AP, Brauner CJ (urednici) *Fish physiology: Homeostasis and toxicology of non-essential metals*, Vol. 31B. Elsevier Academic, London, str. 125–184.
- McSheehy S, Szpunar J (2000) Speciation of arsenic in edible algae by bi-dimensional size-exclusion anion exchange HPLC with dual ICP-MS and electrospray MS/MS detection. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 15: 79-87.
- McSheehy S, Pohl P, Szpunar J, Potin-Gautiera M, Łobiński R (2001) Analysis for selenium speciation in selenized yeast extracts by two-dimensional liquid chromatography with ICP-MS and electrospray MS-MS detection. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 16: 68-73.
- Mestek O, Komínková J, Koplík R, Kodíček M, Zima T (2007) Quantification of trace elements in human serum fractions by liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Applied Organometallic Chemistry* 21: 5-14.
- Michalke B, Schramel P (2004) Manganese speciation in human milk using size exclusion chromatography combined with strong anion exchange chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry detection. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 19: 121–128.
- Michalke B, Nischwitz V (2010) Review on metal speciation analysis in cerebrospinal fluid-current methods and results: A review. *Analytica Chimica Acta* 682: 23–36.

- Midžić S, Silajdžić I (2005) Macedonia. U: Wolkersdorfer C, Bowell R (urednik) Contemporary reviews of mine water studies in Europe Part 2. Mine Water Environment 24: 2–37.
- Miller PA, Munkittrick KR, Dixon DG (1992) Relationship between concentrations of copper and zinc in water, sediment, benthic invertebrates, and tissues of white sucker (*Catostomus commersoni*) at metal contamination sites. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 49: 978-984.
- Mikac N, Roje V, Dautović J, Kniewald G, Cukrov N (2007) Raspodjela metala i metaloida u sedimentu i vodi ušća rijeke Krke. U: Marguš D (urednik) Zbornik radova sa Simpozija Rijeka Krka i Nacionalni park "Krka" Prirodna i kulturna baština, zaštita i održivi razvitak. Šibenik, Javna ustanova, str. 823-838.
- Mogobe O, Mosepele K, Masamba WRL (2015) Essential mineral content of common fish species in Chanoga, Okavango Delta, Botswana. African Journal of Food Science 9: 480-486.
- Montaser A (1998) Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, WILEY-VCH, poglavlja 1. i 4.
- Montes Bayoń M, Cabezuelo ABS, Gonzalez EB, Alonso JIG, Sanz-Medel A (1999) Capabilities of fast protein liquid chromatography coupled to a double focusing inductively coupled plasma mass spectrometer for trace metal speciation in human serum. Journal of Analytical Atomic Spectrometry 14: 947–951.
- Montes-Bayón M, DeNicola K, Caruso JA (2003) Liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. The Journal of Chromatography A 1000: 457–476.
- Mornar A, Sertić M, Nigović B (2013) Analitika u razvoju farmaceutskih proizvoda – praktikum. Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb
- Mounicou S, Szpunar J, Lobinski R (2009) Metallomics: the concept and methodology. Chemical Society Reviews 38: 1119-1138.
- Mukherjee S, Kaviraj A (2009). Evaluation of growth and bioaccumulation of cobalt in different tissues of common carp, *Cyprinus carpio* (Actinopterygii: Cypriniformes: Cyprinidae), fed cobalt supplemented diets. Acta Ichthyologica Et Piscatoria 39: 87–93.
- Mumtaz M (2002). Geochemical studies of heavy metals in the Seawater along Karachi Makran coast. Doktorski rad, Dept. Chemistry, Univ. Karachi. str. 434.

- Muniz CS, Gayon JMM, Alonso JIG, Sanz-Medel A (2001) Speciation of essential elements in human serum using anion-exchange chromatography coupled to post-column isotope dilution analysis with double focusing ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 16: 587–592.
- Murakami M, Hirano T (2008). Intracellular zinc homeostasis and zinc signaling. *Cancer Science* 99: 1515–1522.
- Nesvizhskii AI (2007) Protein identification by tandem mass spectrometry and sequence database searching. *Methods in Molecular Biology* 367: 87-119.
- Neves JV, Wilson JM, Rodrigues PNS (2009) Transferrin and ferritin response to bacterial infection: the role of the liver and brain in fish. *Developmental and Comparative Immunology* 33: 848–857.
- Nigović B (2015) Interna skripta za predavanja. Masena spektrometrija, Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, Spregnute tehnike.
- Noël-Lambot F, Gerday Ch, Disteche A (1978) Distribution of Cd, Zn and Cu in liver and gills of the eel *Anguilla anguilla* with special reference to metallothioneins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 61: 177-187.
- Olivieri G, Hess C, Savaskan E, Ly C, Meier F, Baysang G, Brockhaus M, Müller- Spahn F (2001) Melatonin protects SHSY5Y neuroblastoma cells from cobalt-induced oxidative stress, neurotoxicity and increased beta-amyloid secretion. *Developmental and Comparative Immunology* 31: 320–325.
- Outten CE, O'Halloran TV (2001) Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science* 292: 2488-2492.
- Ozeki Y, Omae M, Kitagawa S, Ohtan H (2019) Electrospray ionization-ion mobility spectrometry–high resolution tandem mass spectrometry with collision-induced charges tripping for the analysis of highly multiply charged intact polymers. 144: 3428-3435.
- Paliwal VK, Kholi KK, Sharma M, Nath R (1986) Purification and characterization of metallothionein from liver of cadmium exposed rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Molecular and Cellular Biochemistry* 71: 139–147.

- Papagiannis I, Kagalou I, Leonardos J, Petridis D, Kalfakakou V (2004) Copper and zinc in four freshwater fish species from Lake Pamvotis (Greece). *Environment International* 30: 357–362.
- Passerini A, Andreini C, Menchetti S, Rosato A, Frasconi P (2007) Predicting zinc binding at the proteome level. *BioMed Central bioinformatics* 8:39.
- Park JD, Liu Y, Klaassen CD (2001) Protective effect of metallothionein against the toxicity of cadmium and other metals. *Toxicology* 163: 93–100.
- Paustenbach D, Tvermoes B, Unice K, Finley B, Kerger B (2013) A review of the health hazards posed by cobalt: potential importance of free divalent cobalt ion equilibrium in understanding systemic toxicity in humans. *Critical Reviews in Toxicology* 43: 316–362.
- Pavičić J, Raspor B, Martinčić D (1993) Quantitative determination of metallothionein-like proteins in mussels. Methodological approach and field evaluation. *Marine Biology* 115: 435–444.
- Pedrero Z, Ouerdane L, Mounicou S, Lobinski R, Monperrus M, Amouroux D (2012) Identification of mercury and other metals complexes with metallothioneins in dolphin liver by hydrophilic interaction liquid chromatography with the parallel detection by ICP MS and electrospray hybrid linear/orbital trap MS/MS. *Metallomics* 4: 473–479.
- Permyakov EA (2009) Metalloproteomics. Uversky VN (urednik), Publisher John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Perutz MF, Rossmann MG, Cullins AF, Muirhead H, Will G, North ACT (1960) The structure of haemoglobin. A three dimensional Fourier synthesis at 5.5 Å resolution, obtained by X-ray analysis. *Nature* 185: 416-422.
- Phillips DJH, Rainbow PS (1993) *Biomonitoring of Trace Aquatic Contaminants*. Essex. Elsevier Science Publishers Ltd.
- Podrug M, Raspor B, Erk M, Dragun Z (2009) Protein and metal concentrations in two fractions of hepatic cytosol of the European chub (*Squalius cephalus* L.). *Chemosphere* 75: 843-849.
- Pomastowski P, Złoch M, Rodzik A, Ligor M, Kostrzewa M, Buszewski B (2019) Analysis of bacteria associated with honeys of different geographical and botanical origin using two different identification approaches: MALDI-TOF MS and 16S rDNA PCR technique. *PLoS ONE* 14(5): e0217078.

- Rahmanto AS, Davies M J (2012) Selenium-containing amino acids as direct and indirect antioxidants. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* 64: 863-871.
- Rainbow P (2018) *Trace Metals in the Environment and Living Organisms. U: Trace Metals in the Environment and Living Organisms: The British Isles as a Case Study (str. I-II)*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Ramani S, Dragun Z, Kapetanović D, Kostov V, Jordanova M, Erk M, Hajrulai-Musliu Z (2014) Surface water characterization of three rivers in the lead/zinc mining region of northeastern Macedonia. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 66: 514–528.
- Rambo RP (2017) Considerations for Sample Preparation Using Size-Exclusion Chromatography for Home and Synchrotron Sources. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1009: 31–45.
- Rashed MN (2001) Monitoring of environmental heavy metals in fish from Nasser lake. *Environment International* 27: 27–33.
- Rašković B, Poleksić V, Skorić S, Jovičić K, Spasić S, Hegediš A, Vasić N, Lenhardt M (2018) Effects of mine tailing and mixed contamination on metals, trace elements accumulation and histopathology of the chub (*Squalius cephalus*) tissues: evidence from three differently contaminated sites in Serbia. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 153: 238-247.
- Rathore D, Faustino A, Schiel J, Pang E, Boyne M, Rogstad S (2018) The role of mass spectrometry in the characterization of biologic protein products. *Expert Review of Proteomics* 15: 431-449.
- Reichert JF, Jarosik N, Herrick R, Andersen J (1979) Observation of electron spin resonance of negative ions in liquid ^3He . *Physical Review Letters* 42: 1359–1361.
- Reid S, McDonald D (1991) Metal binding activity of the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 48: 1061-1068.
- Reid SD (2002) Physiological impact of acute molybdenum exposure in juvenile kokanee salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 133: 355–367.
- Reid SD (2011) Molybdenum and chromium. U: Wood CM, Farrell AP, Brauner CJ (urednici) *Fish physiology: Homeostasis and toxicology of essential metals*, Vol. 31A.

- Academic, London, str. 375–415.
- Reinders J, Lewandrowski U, Moebius J, Wagner Y, Sickmann A (2004) Challenges in mass spectrometry-based proteomics. *Proteomics* 4: 3686-3703.
- Richardson JS, Thomas KA, Rubin BH, Richardson DC (1975) Crystal structure of bovine Cu, Zn superoxide dismutase at 3 Å resolution: chain tracing and metal ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72: 1349–1353.
- Richards JG, Playle RC (1998) Cobalt binding to gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): an equilibrium model. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Pharmacology, Toxicology & Endocrinology* 119: 185–197.
- Ricketts CD (2009) The effect of acute waterborne exposure of sublethal concentrations of molybdenum on the stress response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). , Magistarski rad, University of British Columbia, Okanagan.
- Roberts TM, Heppleston PB, Roberts RD (1976) Distribution of heavy metals in tissues of the common seal. *Marine Pollution Bulletin* 7: 194-196.
- Rodríguez-Cea A, Fernández dela Campa MDR, Blanco González E, Fernández BA, Sanz-Medel A (2003) Metal speciation analysis in eel (*Anguilla anguilla*) metallothioneins by anionic exchange-FPLC-isotope dilution-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 18: 1357–1364.
- Rodríguez-Cea A, Linde Arias AR, Fernández de la Campa MR, Costa Moreira J, Sanz-Medel A (2006) Metal speciation of metallothionein in white sea catfish, *Netuma barba*, and pearl cichlid, *Geophagus brasiliensis*, by orthogonal liquid chromatography coupled to ICP-MS detection. *Talanta* 69: 963-969.
- Roesijadi G, Kielland S, Klerks P (1989) Purification and properties of novel molluscan metallothioneins. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 273: 403-413.
- Roesijadi G (1992) Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquatic Toxicology* 22: 81–114.
- Roesijadi G, Robinson WE (1994) Metal regulation in aquatic animals: mechanisms of uptake, accumulation and release. U: Malins DC, Ostrand GK (urednici), *Aquatic Toxicology: Molecular. Biochemical and Cellular Perspectives*. Lewis Publishers, Boca Raton, str. 387–420.

- Romeo M, Siaub Y, Sidoumou Z, Gnassia-Baelli M (1999) Heavy metal distribution indifferent fish species from the Mauritania coast. *Science of the Total Environment* 232: 169-175.
- Rosabal M, Pierron F, Couture P, Baudrimont M, Hare L, Campbell PG (2015) Subcellular partitioning of non-essential trace metals (Ag, As, Cd, Ni, Pb, Tl) in livers of American (*Anguilla rostrata*) and European (*Anguilla anguilla*) yellow eels. *Aquatic Toxicology* 160: 128–141.
- Rosabal M, Mounicou S, Hare L, Campbell PGC (2016) Metal (Ag, Cd, Cu, Ni, Tl, Zn) binding to cytosolic biomolecules in field-collected larvae of the insect Chaoborus. *Environmental Science and Technology* 50: 3247-3255.
- Rosen BP (2005) Metals in biology: past, present, and future. U: Tamas M.J., Martinoia E. (urednici) *Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification. Topics in Current Genetics*, Vol. 14. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Rosenzweig AC (2002) Metallochaperones: bind and deliver. *Chemistry & Biology* 9: 673-677.
- Sadiq M (1992) *Toxic Metal Chemistry in Marine Environments*. Marcel Dekker, Inc., NY.
- Salekdeh GH, Siopongco J, Wade LJ, Ghareyazie B, Bennett J (2002) Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. *Proteomics* 2: 1131-1145.
- Sakulsak N (2012) Metallothionein: an overview on its metal homeostatic regulation in mammals. *International Journal of Morphology* 30: 1007-1012.
- Sanchez W, Palluel O, Meunier L, Coquery M, Porcher J-M, Aît-Aïssa S (2005) Copper-induced oxidative stress in the three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 19: 177–183.
- Sanz-Medel A, Montes-Bayon M, Fernandez Sanchez ML (2003) Trace element speciation by ICP-MS in large biomolecules and its potential for proteomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 377: 236–247.
- Sanz-Medel A (2005) From metalloproteomics to heteroatomtagged proteomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 381: 1–2.
- Sarkar A, Ravindran G, Krishnamurthy V (2013) A brief review on the effect of cadmium toxicity: from cellular to organ level. *International Journal of Bio-Technology and Research* 3: 17–36.

- Sattayasai N (2012) Protein Purification, Chemical Biology, Ekinci D (urednik), ISBN: 978-953-51-0049-2, In Tech
- Schäfer SG, Dawes RLF, Elsenhans B, Forth W, Schümamm K (1999) Metals. U: Marquardt H, Schäfer SG, McClellan RO, Welsch F (urednici) Toxicology. Academic Press, Dan Diego, str. 755-775.
- Schäfer U (2004) Manganese. U: Merian E, Anke M, Ihnat M, Stoeppler M (urednici) Elements and their compounds in the environment: occurrence, analysis and biological relevance, Vol. 2, Metals and their compounds. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim, str. 901–930.
- Sedak M, Bilandžić N, Čalopek B, Đokić M, Solomun Kolanović B, Varenina I, Božić, Đ, Varga I, Šimić B, Đuras M, Gomerčić T (2015) Toksični metali - bioindikatori zagađenja u morskom okolišu - I dio: kadmij i olovo. Veterinarska stanica: znanstveno-stručni veterinarski časopis 46: 467-480.
- Senko MW, McLafferty FW (1994) Mass Spectrometry of Macromolecules: Has Its Time Now Come? Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure 23: 763-785.
- Serafimovski T, Dolenc T, Tasev G, Dolenc M, Rogan N (2007) Acid mine drainage systems and metal pollution around the active polymetallic mines in the Eastern Macedonia. Geologica Macedonia 21: 69–73.
- Sertić M (2013) Nove kapilarno elektroforetske i kromatografske metode u analitici statina. Doktorski rad. Zagreb
- Skoog DA, West DM, Holler JJ (1999) Osnove analitičke kemije. Školska knjiga, Zagreb
- Shi W, Chance MR (2008) Metallomics and metalloproteomics. Cellular and Molecular Life Sciences 65: 3040–3048.
- Shulgin KK, Popova TN, Rakhmanova TI (2008) Isolation and purification of glutathione peroxidase. Applied Biochemistry and Microbiology 44: 247–250.
- Siddiqui MF (2010) Cadmium induced renal toxicity in male rats, *Rattus rattus*. Eastern journal of medicine 15: 93-99.
- Silva LFO, Izquierdo M, Querol X, Finkelman RB, Oliveira MLS, Wollenschlager M, Towler M, Pérez-López R, Macias F (2011a) Leaching of potential hazardous elements of coal cleaning rejects. Environmental Monitoring and Assessment 175: 109–126.
- Silva LFO, Querol X, da Boit KM, Fdez-Ortiz de Vallejuelo S, Madariaga JM (2011b) Brazilian coal mining residues and sulphide oxidation by Fenton's reaction: An

- accelerated weathering procedure to evaluate possible environmental impact. *Journal of Hazardous Materials* 186: 516–525.
- Silva LFO, Wollenschlager M, Oliveira MLS (2011c) A preliminary study of coal mining drainage and environmental health in the Santa Catarina region, Brazil. *Environmental Geochemistry and Health* 33: 55–65.
- Sigel A, Sigel H, Sigel RKO (2009) *Metallothioneins and related chelators*. Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- Simkiss K (1998) *Mechanisms of metal uptake. U: Metal metabolism in aquatic environments*, Langston WJ, Bebianno MJ (urednici), Chapman and Hall, London, str. 1-18.
- Singh RA, Singh SN (1990) Purification and properties of liver arginase from teleostean fish *Clarias batrachus* (L.). *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie*, 98: 411-419.
- Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Virdi JS (2015) MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis *Frontiers in Microbiology* 6: 791.
- Smith QR, Rabin O, Chikhale EG (1997) Delivery of metals to brain and the role of the blood–brain barrier. U: Connor JR (urednik) *Metals and oxidative damage in neurological disorders*. Plenum, New York, str. 113–130.
- Soldado Cabezuelo AB, Blanco Gonzalez E, Sanz Medel A (1997) Quantitative studies of aluminium binding species in human uremic serum by fast protein liquid chromatography coupled with electrothermal atomic absorption spectrometry. *Analyst* 122: 573-577.
- Solomon EI, Lowery MD (1993) Multi-Copper Oxidases. *Science* 259: 1575-1581.
- Souza IC, Duarte ID, Pimentel NQ, Rocha LD, Morozesk M, Bonomo MM, Azevedo VC, Pereira CDS, Monferrán MV, Milanez CRD, Matsumoto ST, Wunderlin DA, Fernandes MN (2013) Matching metal pollution with bioavailability, bioaccumulation and biomarkers response in fish (*Centropomus parallelus*) resident in neotropical estuaries. *Environmental Pollution* 180: 136–144.
- Spasovski O (2011) Heavy and toxic metals and nutrients in separate places in the river Bregalnica, (eastern Macedonia). *Annual of the University of Mining and Geology St. Ivan Rilski*, Vol. 54, dio II: Mining and mineral processing. str. 118–120.

- Spasovski O, Dambov R (2009) Heavy metals in the water of the river Kalnistanska and the vicinity. Balkanmine 2009 - 3rd Balkan Mining Congress. Izmir, str. 667–670.
- Stipaničev D, Dragun Z, Repec S, Rebok K, Jordanova M (2017) Broad spectrum screening of 463 organic contaminants in rivers in Macedonia. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 135: 48–59.
- Stuhlberger C (2010) Mining and environment in the Western Balkans. Zoë Environment Network, Geneva.
- Szpunar J, Łobiński R (1999) Species-selective analysis for metal biomacromolecular complexes using hyphenated techniques. *Pure and Applied Chemistry* 71: 899–918.
- Szpunar J (2000) Bio-inorganic speciation analysis by hyphenated techniques. *Analyst* 125: 963–988.
- Szpunar J, Łobiński R (2002) Multidimensional approaches in biochemical speciation analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 373: 404–411.
- Szpunar J (2004) Metallomics: A new frontier in analytical chemistry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378: 54-56.
- Szpunar J (2005) Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics. *Analyst* 130: 442-465.
- Swiatly A, Horala A, Hajduk J, Matysiak J, Nowak-Markwitz E, Zenon J (2017) MALDI-TOF-MS analysis in discovery and identification of serum proteomic patterns of ovarian cancer. *BMC Cancer* 17: 472.
- Switzar L, Giera M, Niessen WM (2013) Protein digestion: an overview of the available techniques and recent developments. *Journal of Proteome Research* 12: 1067-1077.
- Tainer JA, Roberts VA, Getzoff ED (1991) Metal-binding sites in proteins. *Current Opinion in Biotechnology* 2: 582-591.
- Talkington MT, Siuzdak G, Williamson JR (2005) An assembly landscape for the 30S ribosomal subunit. *Nature* 438: 628-632.
- Taylor JA, Johnson RS (2001) Implementation and uses of automated de novo peptide sequencing by tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 73: 2594-604.
- Teskeredžić E, Teskeredžić Z, Tomec M, Kurtović B, Raspor B, Kapetanović D, Dragun Z, Vardić I, Valić D, Strižak Ž, Španović B, Sotarić Vulić Z, Roman Z (2009) Programme for the monitoring of the freshwater fishery status in the year 2009 -

- Group D - Fishing area Sava; River Sutla. Zagreb, Ruđer Bošković Institute.
- Tessier A, Turner DR (1995) Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems, IUPAC Series on Analytical Chemistry of Environmental Systems. John Wiley and Sons.
- Thiele DJ, Gitlin JD (2008) Assembling the pieces. *Nature chemical biology* 4: 145-147.
- Thomas R (2013) Practical Guide to ICP-MS, A Tutorial for Beginners, 3 izd., Boca Raton, Imprint CRC Press.
- Torti FM, Torti SV (2002) Regulation of ferritin genes and protein. *Blood* 99: 3505–3516.
- Truglio JJ, Theis K, Leimkühler S, Rappa R, Rajagopalan KV, Kisker C (2002) Crystal structures of the active and alloxanthine inhibited forms of xanthine dehydrogenase from *Rhodobacter capsulatus*. *Structure* 10: 115–125.
- Uchida H, Kondo D, Yamashita A, Nagaosa Y, Sakurai T, Fujii Y, Fujishiro K, Aisaka K, Uwajima T (2003) Purification and characterization of an aldehyde oxidase from *Pseudomonas* sp. KY 4690. *FEMS Microbiology Letters* 229: 31–36.
- Urban PL (2016) Quantitative mass spectrometry: an overview. *Philosophical Transactions of the Royal Society A* 374: 20150382.
- Urien N, Jacob S, Couture P, Campbell PGC (2018) Cytosolic distribution of metals (Cd, Cu) and metalloids (As, Se) in livers and gonads of field-collected fish exposed to an environmental contamination gradient: an SEC-ICP-MS analysis. *Environments* 5, 102.
- USEPA (2002) National Recommended Water Quality Criteria: 2002. EPA-822-R-02-047. Washington, DC: Office of Science and Technology, US Environmental Protection Agency.
- Valaskovic GA, Kelleher NL, Little DP, Aaserud DJ, McLafferty FW (1995) Attomole-sensitivity electrospray source for large-molecule mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 67: 3802-3805.
- Vallee BL (1986) A synopsis of zinc biology and pathology. U: Gray H (urednik) *Zinc Enzymes* vol. 1, str. 1–15. Birkhäuser, Basel.
- Van Campenhout K, Goenaga Infante H, Adams F, Blust R (2004) Induction and binding of Cd, Cu and Zn to metallothionein in carp (*Cyprinus carpio*) using HPLC-ICP-TOFMS. *Toxicological Sciences* 80: 276–287.

- Van Campenhout K, Infante HG, Goemans G, Belpaire C, Adams F, Blust R, Bervoets L (2008) A field survey of metal binding to metallothionein and other cytosolic ligands in liver of eels using an on-line isotope dilution method in combination with size exclusion (SE) high pressure liquid chromatography (HPLC) coupled to Inductively Coupled Plasma time-of-flight Mass spectrometry (ICP-TOFMS). *Science of The Total Environment* 394: 379-389.
- Van Campenhout K, Goenaga Infante H, Hoff PT, Moens L, Goemans G, Belpaire C, Adams F, Blust R, Bervoets L (2010) Cytosolic distribution of Cd, Cu and Zn, and metallothionein levels in relation to physiological changes in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) from metal-impacted habitats. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73: 296–305.
- Webster J, Oxley D (2012) Protein identification by MALDI-TOF mass spectrometry. *Methods in molecular biology* 800: 227-40.
- Verma R, Dwivedi P (2013) Heavy metal water pollution- A case study. *Recent Research in Science and Technology* 5: 98-99.
- Viarengo A (1985) Biochemical effects of trace metals. *Marine Pollution Bulletin* 16: 153-158.
- Viarengo A, Nott JA (1993) Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. Mini-review. *Comparative Biochemistry and Physiology* 104C: 355-372.
- Vidal SM, Malo D, Vogan K, Skamene E, Gros P (1993) Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. *Cell* 73: 469–485.
- Vijeveer MG, Van Gestel CAM, Lanno RP, Van Straalen NM, Peijnenburg WJGM (2004) Internal metal sequestration and its ecotoxicological relevance: a review. *Environmental Science & Technology* 38: 4705-4712.
- Vostradovsky J (1973) *Freshwater fishes*. London: The Hamlyn Publishing Group Limited.
- Vukosav P, Marina M, Cukrov N, Kwokal Ž, Pižeta I, Pavlus N, Špoljarić I, Vurnek M, Brozinčević A, Omanović, D (2014) Heavy metal contents in water, sediment and fish in a karst aquatic ecosystem of the Plitvice Lakes National Park (Croatia). *Environmental Science and Pollution Research International* 5: 3826-3839.
- Vutukuru SS, Chintada S, Madhavi KR, Rao JV, Anjaneyulu Y (2006) Acute effects of copper on superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation in the freshwater

- teleost fish, *Esomus danricus*. *Fish Physiology and Biochemistry* 32: 221–229.
- Waalkes MP, Klaassen CD (1985) Concentration of metallothionein in major organs of rats after administration of various metals. *Fundamental and Applied Toxicology* 5: 473–477.
- Wallace WG, Lee B-G, Luoma SN (2003) Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I: Significance of metal sensitive fractions (MSF) and biologically detoxified metal (BDM). *Marine Ecology Progress Series* 249: 183–197.
- Wang XY, Yokoi I, Liu JK, Mori A (1993) Cobalt (II) and nickel (II) ions as promoters of free radicals in vivo: detected directly using electron spin resonance spectrometry in circulating blood in rats. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 306: 402–406.
- Wang J, Dreessen D, Wiederin DR, Houk RS (2001) Measurement of trace elements in proteins extracted from liver by size exclusion chromatography-inductively coupled plasma–mass spectrometry with amagnetic sector mass spectrometer. *Analytical Biochemistry* 288: 89–96.
- Wang WX, Rainbow PS (2006) Subcellular partitioning and the prediction of cadmium toxicity to aquatic organisms. *Environmental Chemistry* 3: 395–399.
- Watanabe T, Kiron V, Satoh S (1997) Trace minerals in fish nutrition. *Aquaculture* 151:185–207.
- Watson DG (1999) *Mass Spectrometry. U: Pharmaceutical Analysis: A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists*. Edinburgh, Elsevier, str. 168–193.
- Wilkinson DG, Nemer M (1987) Metallothionein genes MTa and MTb expressed under distinct quantitative and tissue-specific regulation in sea urchin embryos. *Molecular and Cellular Biology* 7: 48–58.
- Wojcieszek J, Ruzik L (2016) Operationally defined species characterization and bioaccessibility evaluation of cobalt, copper and selenium in Cape gooseberry (*Physalis Peruviana* L.) by SEC-ICP MS. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 34: 15–21.
- Wojtkowska M (2013) Migration and forms of metals in bottom sediments of Czerniakowskie Lake. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 90: 165–169.
- Wolf C, Wenda N, Richter A, Kyriakopoulos A (2007) Alteration of biological samples in speciation analysis of metalloproteins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389: 799–810.

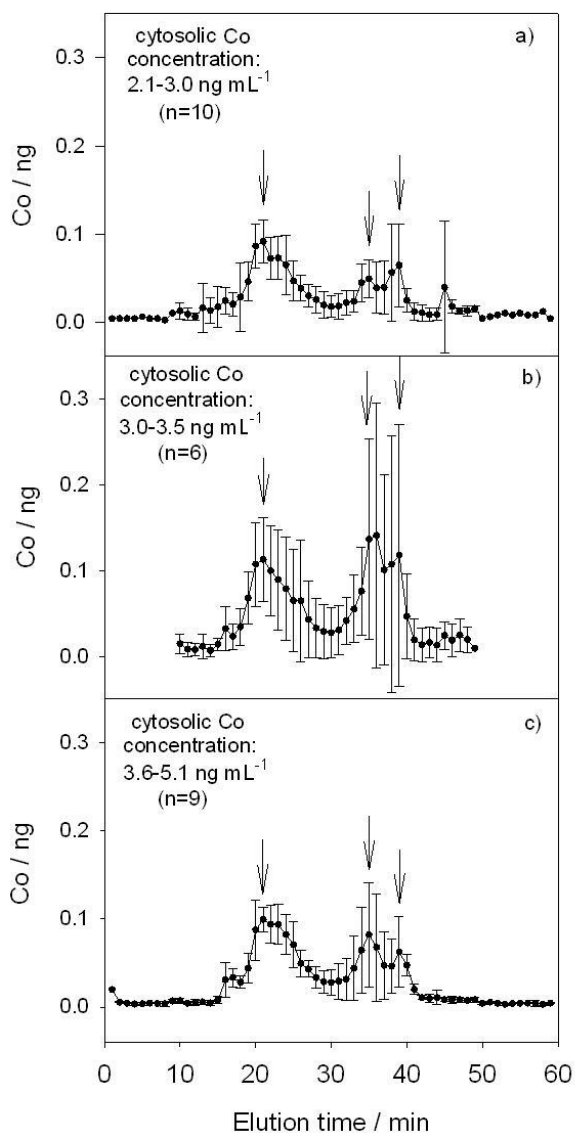
- Wrobel K, Blanco Gonzalez E, Wrobel K, Sanz Medel A (1995) Aluminium and silicon speciation in human serum by ion-exchange high-performance liquid chromatography–electrothermal atomic absorption spectrometry and gel electrophoresis. *Analyst* 120: 809-815.
- Wu SM, Weng CF, Yu MJ, Lin CC, Chen ST, Hwang J C, Hwang PP (1999) Cadmium-Inducible Metallothionein in Tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 62:758-768.
- Yamashita M, Fenn JB (1984) Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *The Journal of Physical Chemistry* 88: 4451-4459.
- Yamashita Y, Yamashita M (2010) Identification of a novel selenium containing compound, selenoneine, as the predominant chemical form of organic selenium in the blood of a bluefin tuna. *The Journal of Biological Chemistry* 285: 18134–18138.
- Yamashita Y, Yabu T, Touhata K, Yamashita M (2012) Purification and characterization of glutathione peroxidase 1 in the red muscle of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*. *Fisheries Science* 78: 407–413.
- Yu Z, Friso G, Miranda JJ, Patel MJ, Lo-Tseng T, Moore EG, Burlingame AL (1997) Structural characterization of human hemoglobin crosslinked by bis (3,5-dibromosalicyl) fumarate using mass spectrometric techniques. *Protein Science* 6: 568-257.

PRILOZI

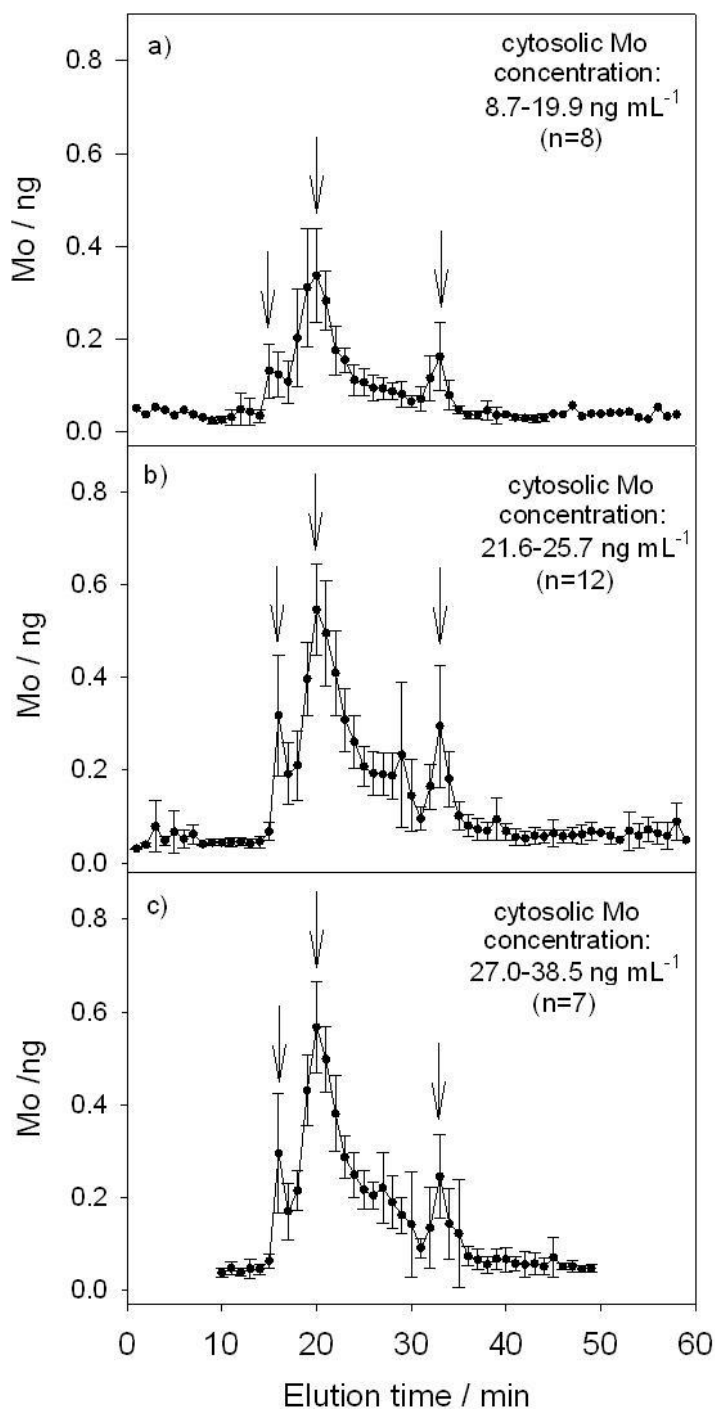
7. PRILOZI

7.1. Dodatne informacije uz rad:

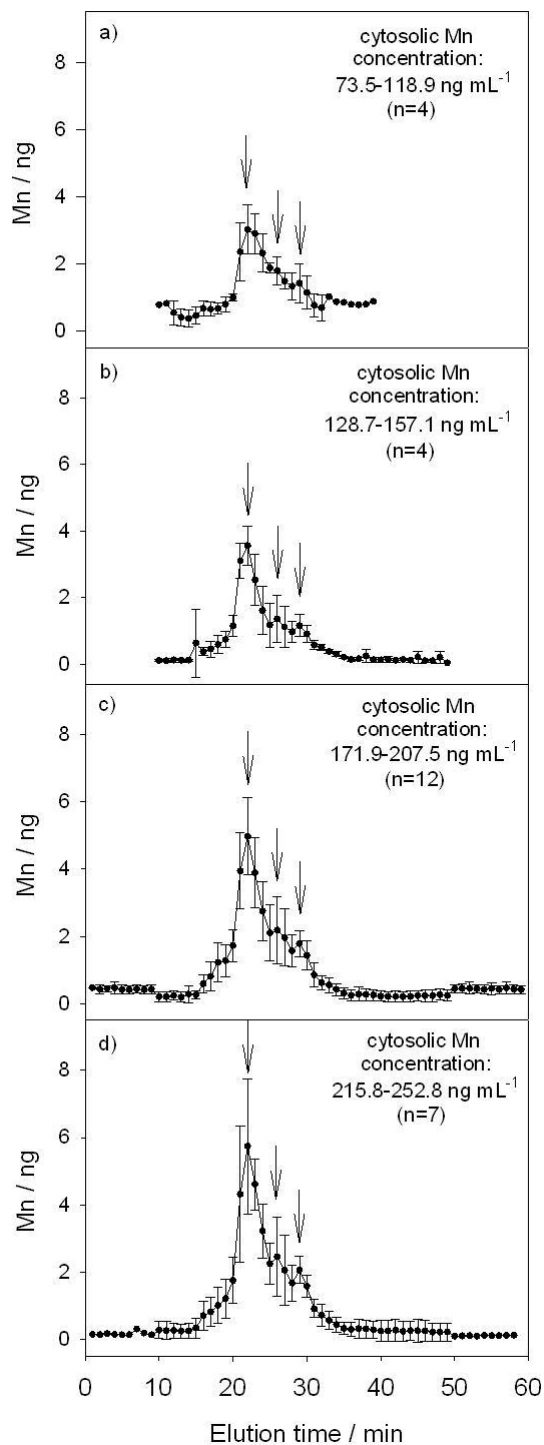
Krasnići N, Dragun Z, Erk M, Raspor B: Distribution of selected essential (Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Se, Zn) and nonessential (Cd, Pb) trace elements among protein fractions from hepatic cytosol of European chub (*Squalius cephalus* L.). Environmental Science and Pollution Research 20 (2013), 4: 2340-2351. doi:10.1007/s11356-012-1105-8



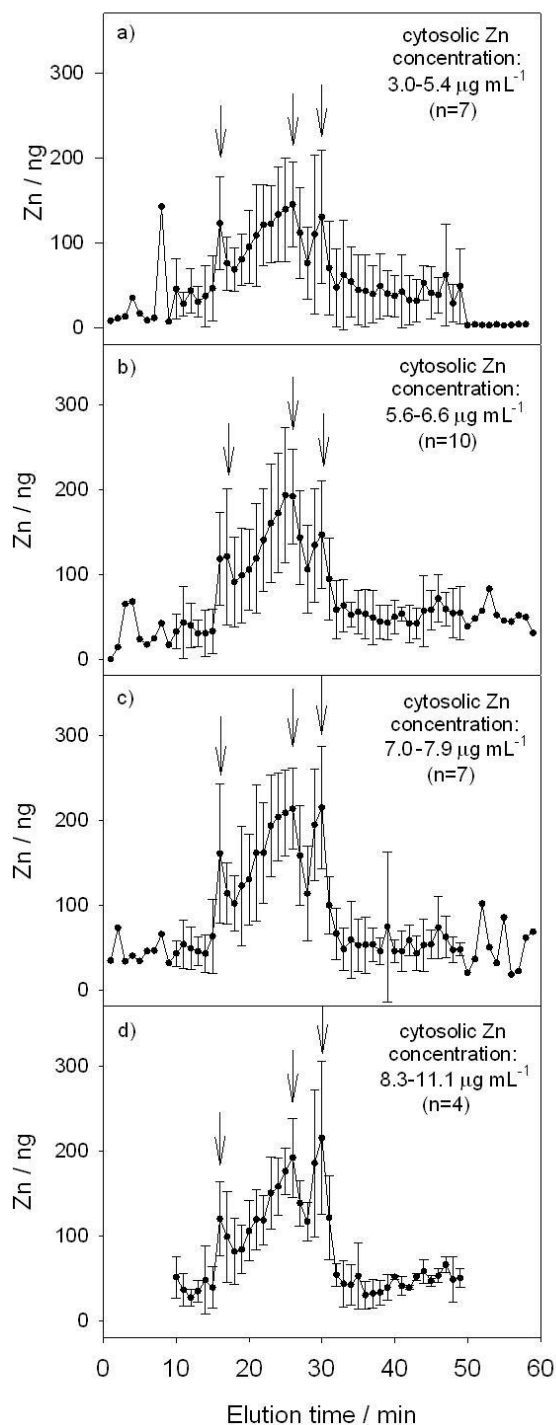
Slika 1. Raspodjele Co među biomolekulama različitih molekulskih masa u citosolima jetara klenova (*S. cephalus*) dobivene SEC-HPLC razdvajanjem na koloni SuperdexTM 200 10/300 GL i mjerenjem na HR ICP-MS-u. Analizirani uzorci su podijeljeni u tri skupine, prema citosolskim koncentracijama Co (ng mL⁻¹) u jetrima klenova. Oznaka slike u radu **ESI I**.



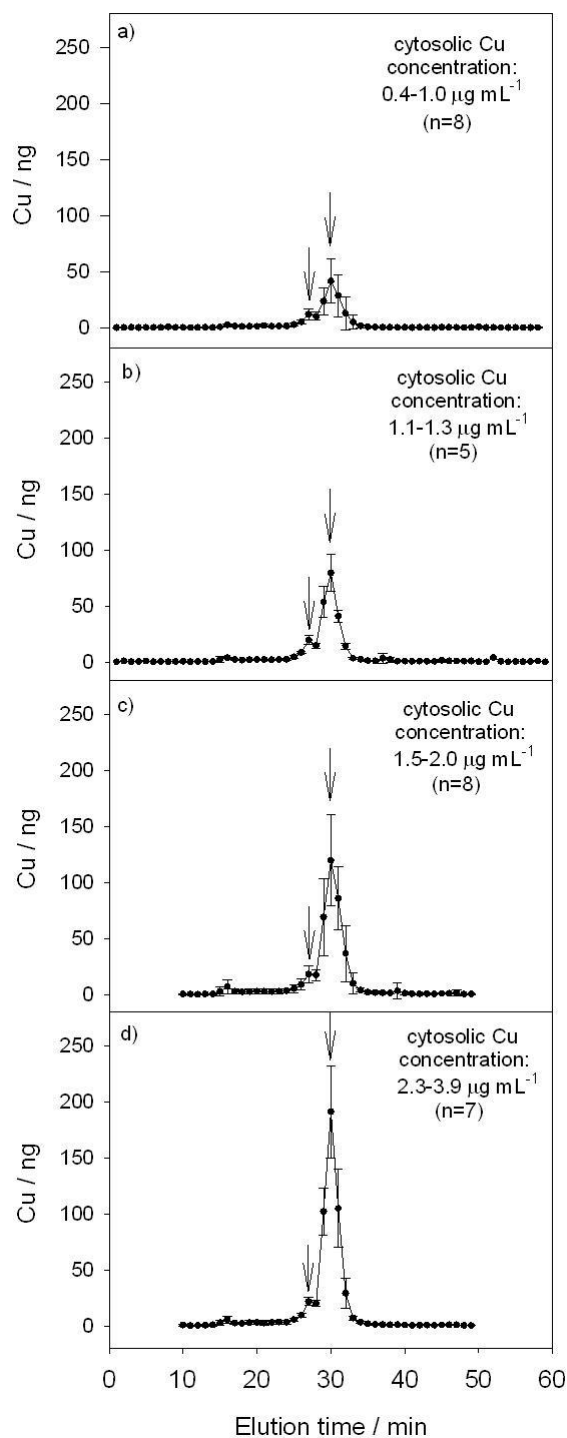
Slika 2. Raspodjele Mo među biomolekulama različitih molekulskih masa u citosolima jetara klenova (*S. cephalus*) dobivene SEC-HPLC razdvajanjem na koloni SuperdexTM 200 10/300 GL i mjerenjem na HR ICP-MS-u. Analizirani uzorci su podijeljeni u tri skupine, prema citosolskim koncentracijama Mo (ng mL⁻¹) u jetrima klenova. Oznaka slike u radu **ESI II**.



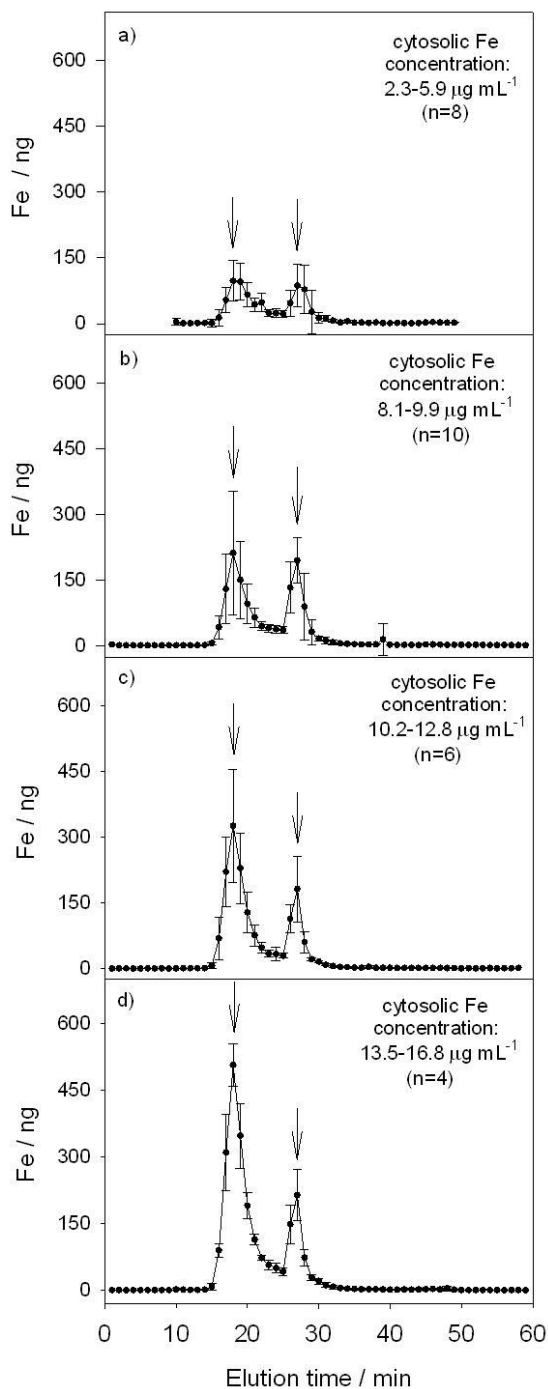
Slika 3. Raspodjele Mn među biomolekulama različitih molekulskih masa u citosolima jetara klenova (*S. cephalus*) dobivene SEC-HPLC razdvajanjem na koloni SuperdexTM 200 10/300 GL i mjerenjem na HR ICP-MS-u. Analizirani uzorci su podijeljeni u četiri skupine, prema citosolskim koncentracijama Mn (ng mL⁻¹) u jetrima klenova. Oznaka slike u radu **ESI III**.



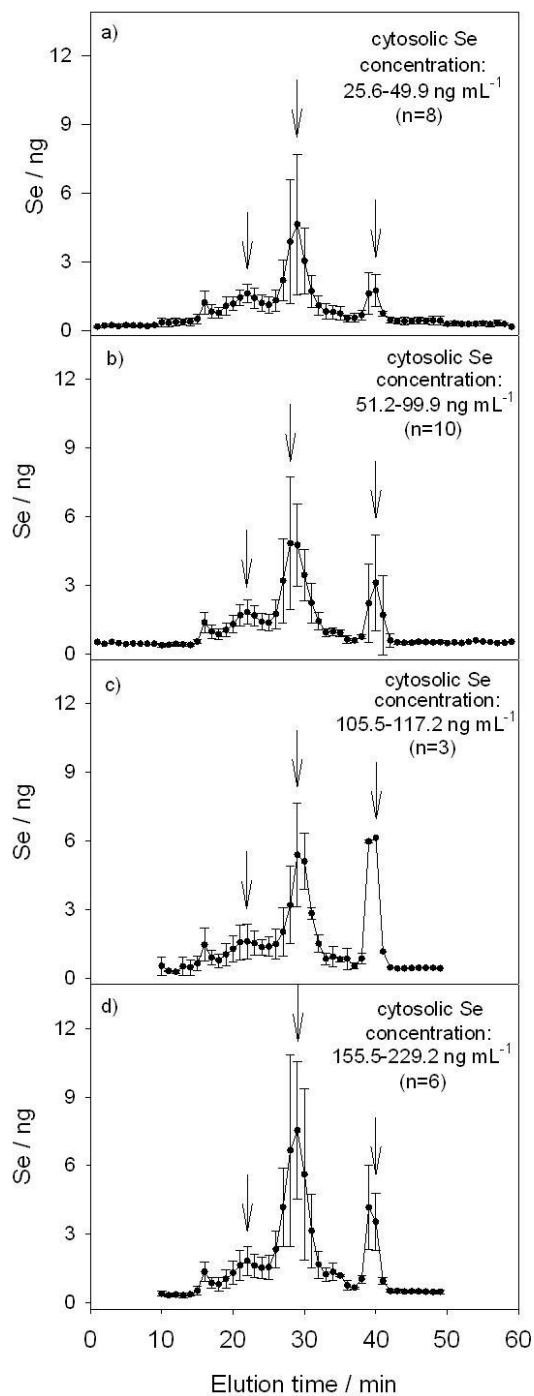
Slika 4. Raspodjele Zn među biomolekulama različitih molekulskih masa u citosolima jetara klenova (*S. cephalus*) dobivene SEC-HPLC razdvajanjem na koloni SuperdexTM 200 10/300 GL i mjerenjem na HR ICP-MS-u. Analizirani uzorci su podijeljeni u četiri skupine, prema citosolskim koncentracijama Zn ($\mu\text{g mL}^{-1}$) u jetrima klenova. Oznaka slike u radu **ESI IV**.



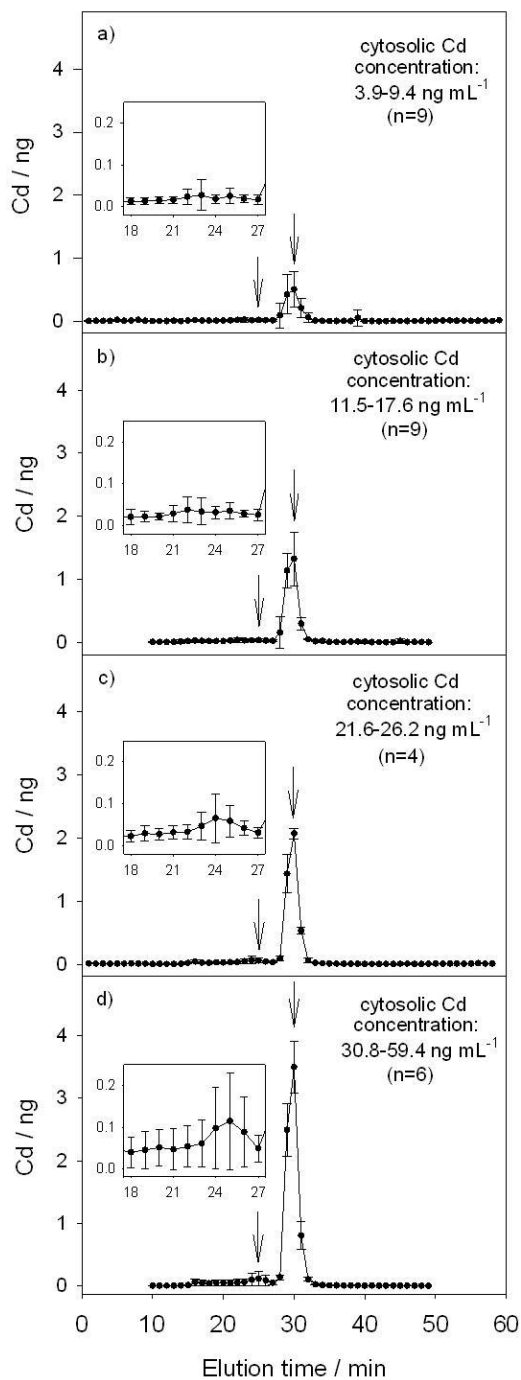
Slika 5. Raspodjele Cu među biomolekulama različitih molekulskih masa u citosolima jetara klenova (*S. cephalus*) dobivene SEC-HPLC razdvajanjem na koloni Superdex™ 200 10/300 GL i mjerenjem na HR ICP-MS-u. Analizirani uzorci su podijeljeni u četiri skupine, prema citosolskim koncentracijama Cu ($\mu\text{g mL}^{-1}$) u jetrima klenova. Oznaka slike u radu **ESI V**.



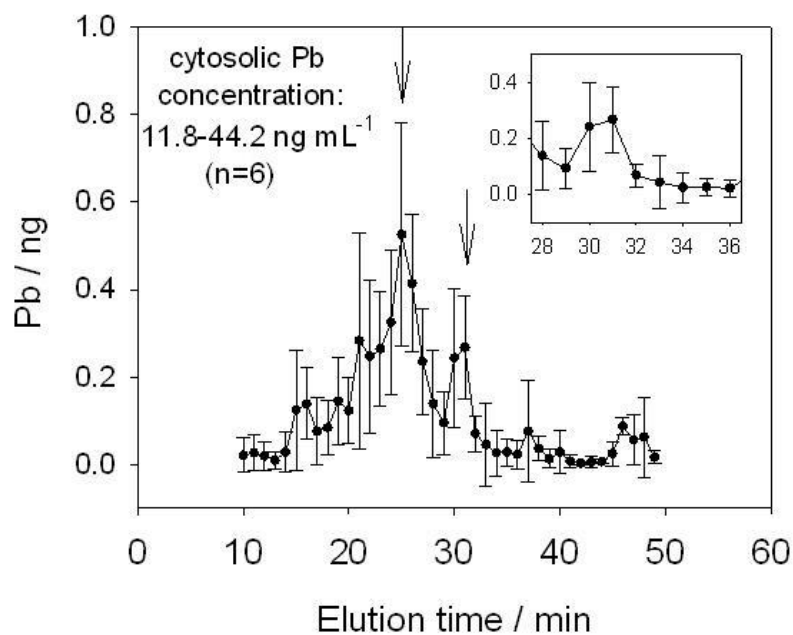
Slika 6. Raspodjele Fe među biomolekulama različitih molekulskih masa u citosolima jetara klenova (*S. cephalus*) dobivene SEC-HPLC razdvajanjem na koloni SuperdexTM 200 10/300 GL i mjerenjem na HR ICP-MS-u. Analizirani uzorci su podijeljeni u četiri skupine, prema citosolskim koncentracijama Fe ($\mu\text{g mL}^{-1}$) u jetrima klenova. Oznaka slike u radu **ESI VI**.



Slika 7. Raspodjele Se među biomolekulama različitih molekularnih masa u citosolima jetara klenova (*S. cephalus*) dobivene SEC-HPLC razdvajanjem na koloni SuperdexTM 200 10/300 GL i mjerenjem na HR ICP-MS-u. Analizirani uzorci su podijeljeni u četiri skupine, prema citosolskim koncentracijama Se (ng mL⁻¹) u jetrima klenova. Oznaka slike u radu **ESI VII**.



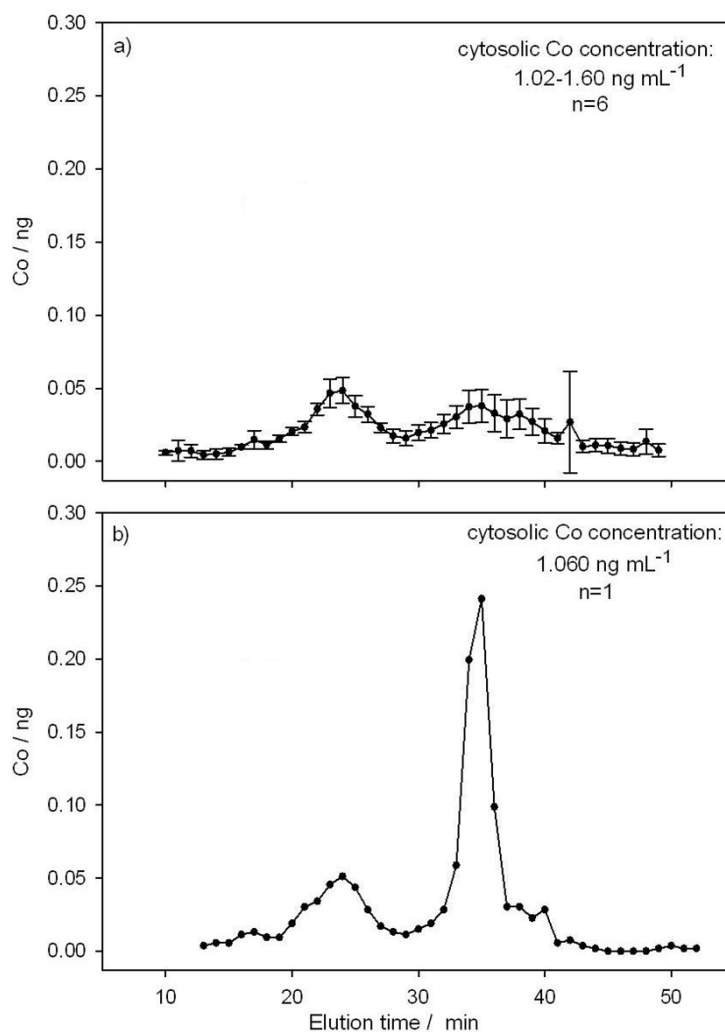
Slika 8. Raspodjele Cd među biomolekulama različitih molekulskih masa u citosolima jetara klenova (*S. cephalus*) dobivene SEC-HPLC razdvajanjem na koloni SuperdexTM 200 10/300 GL i mjerenjem na HR ICP-MS-u. Analizirani uzorci su podijeljeni u četiri skupine, prema citosolskim koncentracijama Cd (ng mL⁻¹) u jetrima klenova. Oznaka slike u radu **ESI VIII**.



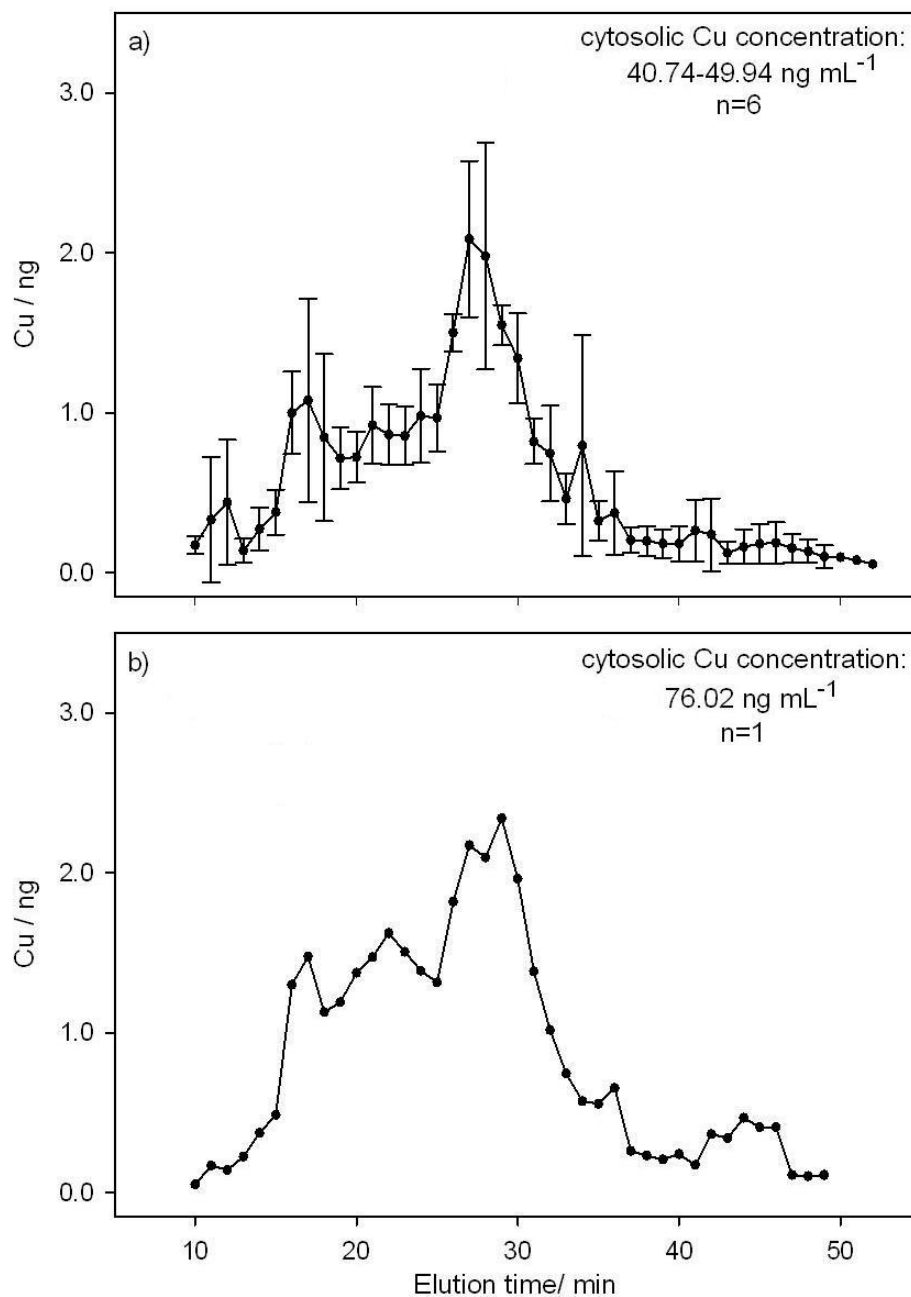
Slika 9. Raspodjele Pb među biomolekulama različitih molekulskih masa u citosolima jetara klenova (*S. cephalus*) dobivene SEC-HPLC razdvajanjem na koloni SuperdexTM 200 10/300 GL i mjerenjem na HR ICP-MS-u. Oznaka slike u radu **ESI IX**.

7.2. Dodatne informacije uz rad:

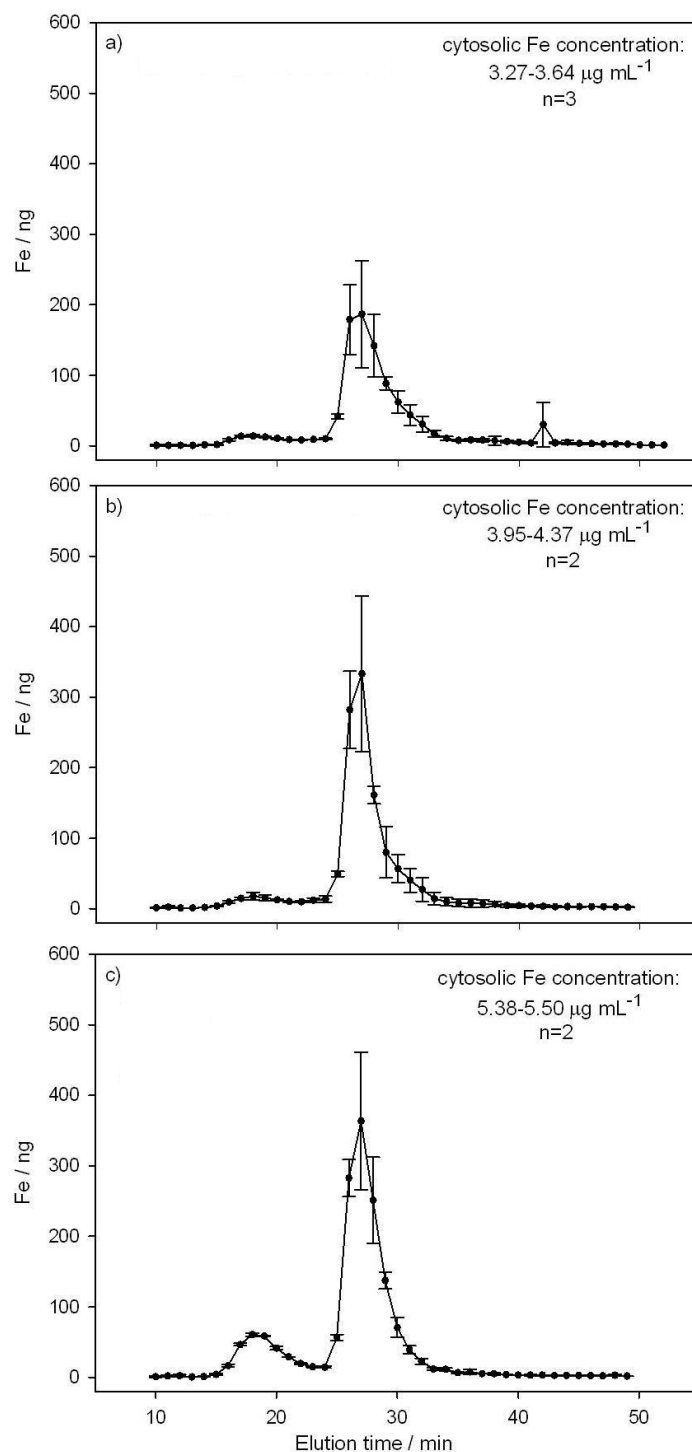
Krasnići N, Dragun Z, Erk M, Raspor B: Distribution of Co, Cu, Fe, Mn, Se, Zn and Cd among cytosolic proteins of different molecular masses in gills of European chub (*Squalius cephalus* L.). Environmental Science and Pollution Research 21 (2014), 23: 13512-13521. doi:10.1007/s11356-014-3274-0



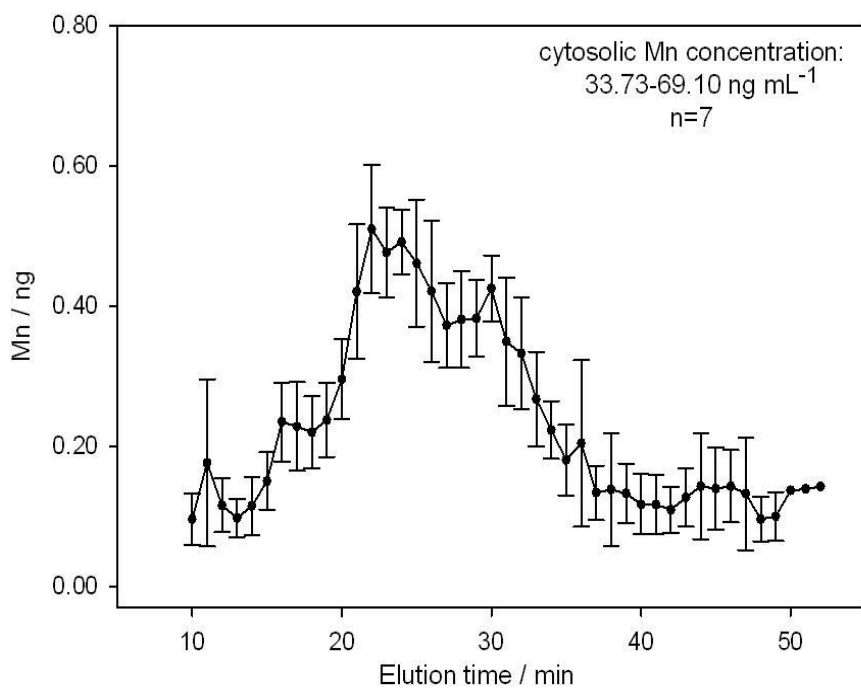
Slika 10. Profili raspodjele Co među biomolekulama različitih molekulskih masa u citosolima škrगा klenova (*S. cephalus*) dobiveni HPLC razdvajanjem na koloni SuperdexTM 200 10/300 GL i mjerenjem na HR ICP-MS-u. Analizirani uzorci su podijeljeni u dvije skupine, prema citosolskim koncentracijama Co (ng mL⁻¹) u škrगama klenova. Oznaka slike u radu **SI-1**.



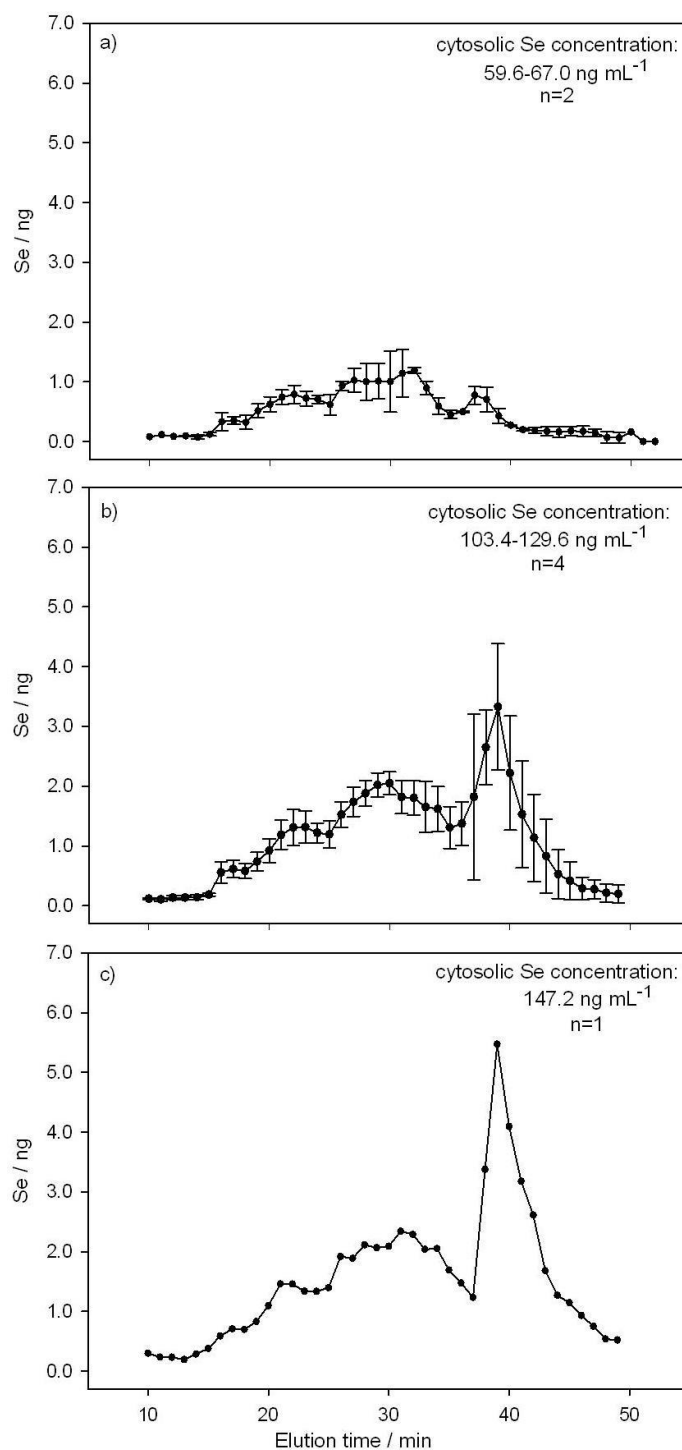
Slika 11. Profili raspodjele Cu među biomolekulama različitih molekulskih masa u citosolima škrga klenova (*S. cephalus*) dobiveni HPLC razdvajanjem na koloni SuperdexTM 200 10/300 GL i mjerenjem na HR ICP-MS-u. Analizirani uzorci su podijeljeni u dvije skupine, prema citosolskim koncentracijama Cu (ng mL⁻¹) u škrgama klenova. Oznaka slike u radu **SI-2**.



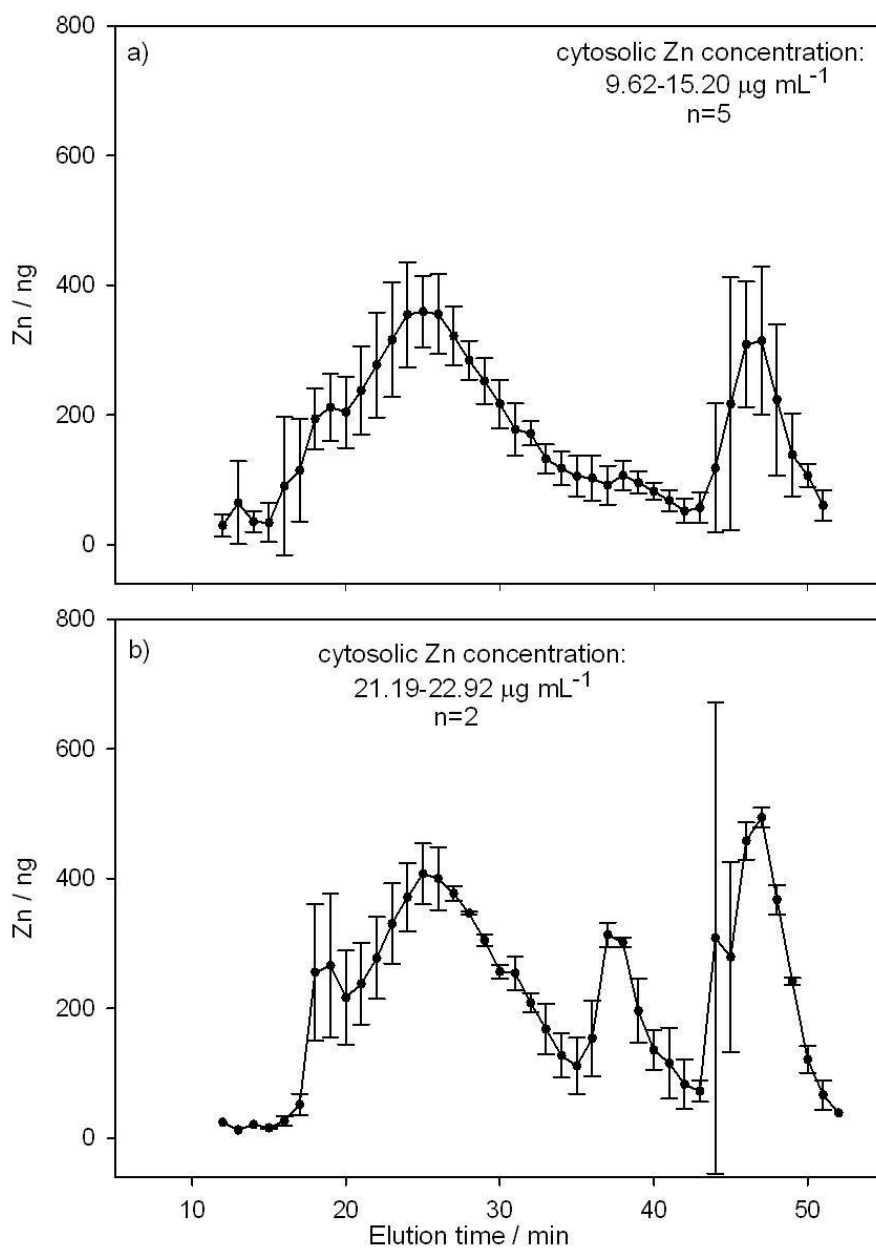
Slika 12. Profili raspodjele Fe među biomolekulama različitih molekulskih masa u citosolima škrga klenova (*S. cephalus*) dobiveni HPLC razdvajanjem na koloni Superdex™ 200 10/300 GL i mjerenjem na HR ICP-MS-u. Analizirani uzorci su podijeljeni u tri skupine, prema citosolskim koncentracijama Fe ($\mu\text{g mL}^{-1}$) u škragama klenova. Oznaka slike u radu **SI-3**.



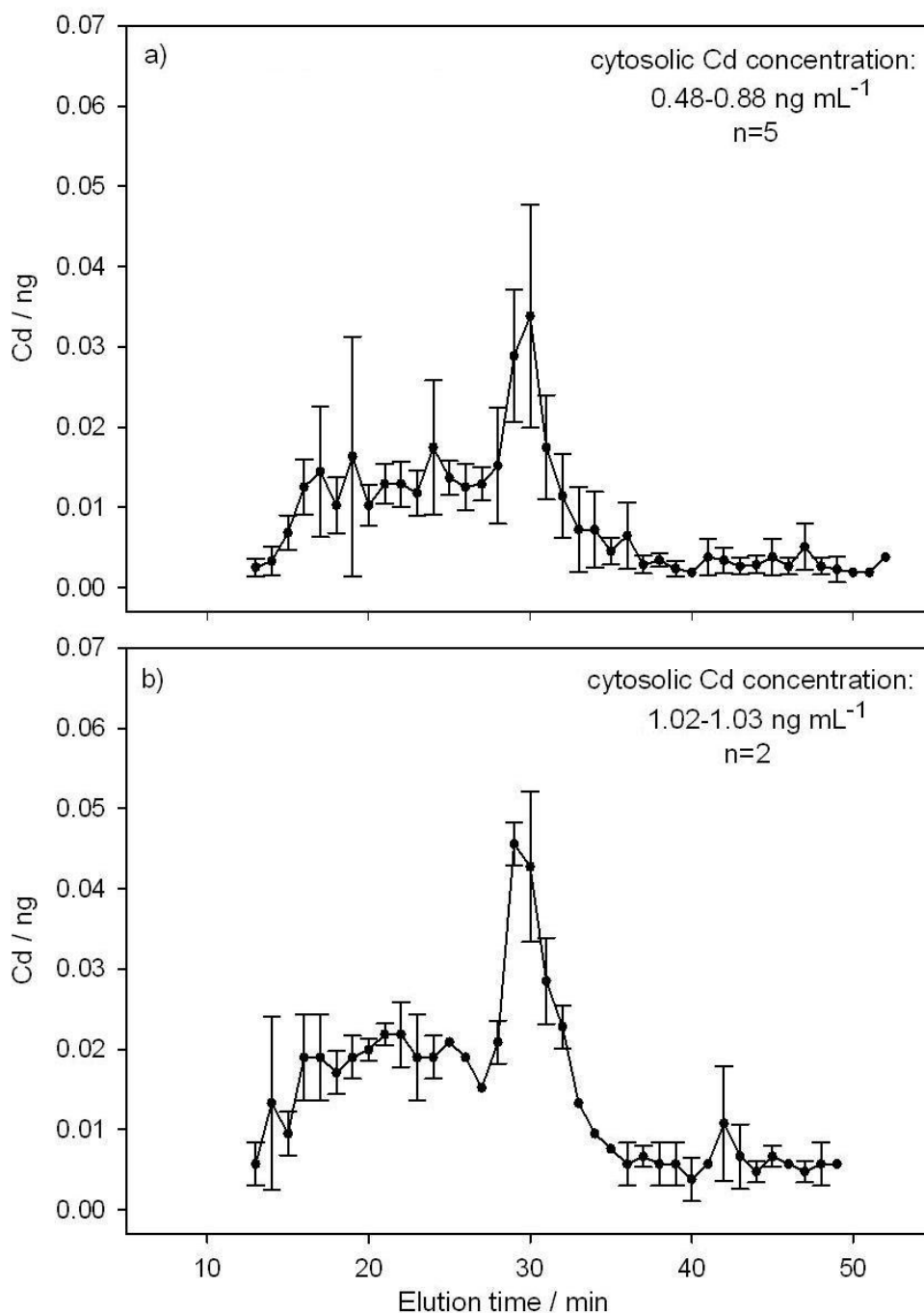
Slika 13. Profili raspodjele Mn među biomolekulama različitih molekularnih masa u citosolima škrga klenova (*S. cephalus*) dobiveni HPLC razdvajanjem na koloni Superdex™ 200 10/300 GL i mjerenjem na HR ICP-MS-u. Oznaka slike u radu **SI-4**.



Slika 14. Profili raspodjele Se među biomolekulama različitih molekularnih masa u citosolima škrga klenova (*S. cephalus*) dobiveni HPLC razdvajanjem na koloni SuperdexTM 200 10/300 GL i mjerenjem na HR ICP-MS-u. Analizirani uzorci su podijeljeni u tri skupine, prema citosolskim koncentracijama Se (ng mL⁻¹) u škrgama klenova. Oznaka slike u radu **SI-5**.



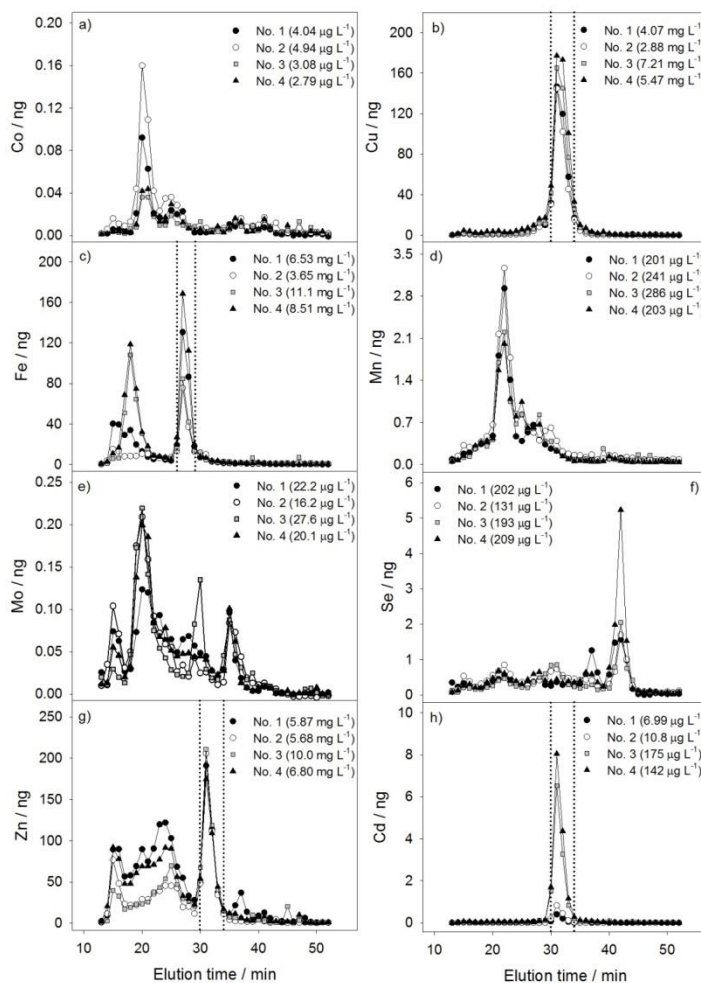
Slika 15. Profili raspodjele Zn među biomolekulama različitih molekulskih masa u citosolima škrga klenova (*S. cephalus*) dobiveni HPLC razdvajanjem na koloni SuperdexTM 200 10/300 GL i mjerenjem na HR ICP-MS-u. Analizirani uzorci su podijeljeni u dvije skupine, prema citosolskim koncentracijama Zn ($\mu\text{g mL}^{-1}$) u škrgama klenova. Oznaka slike u radu **SI-6**.



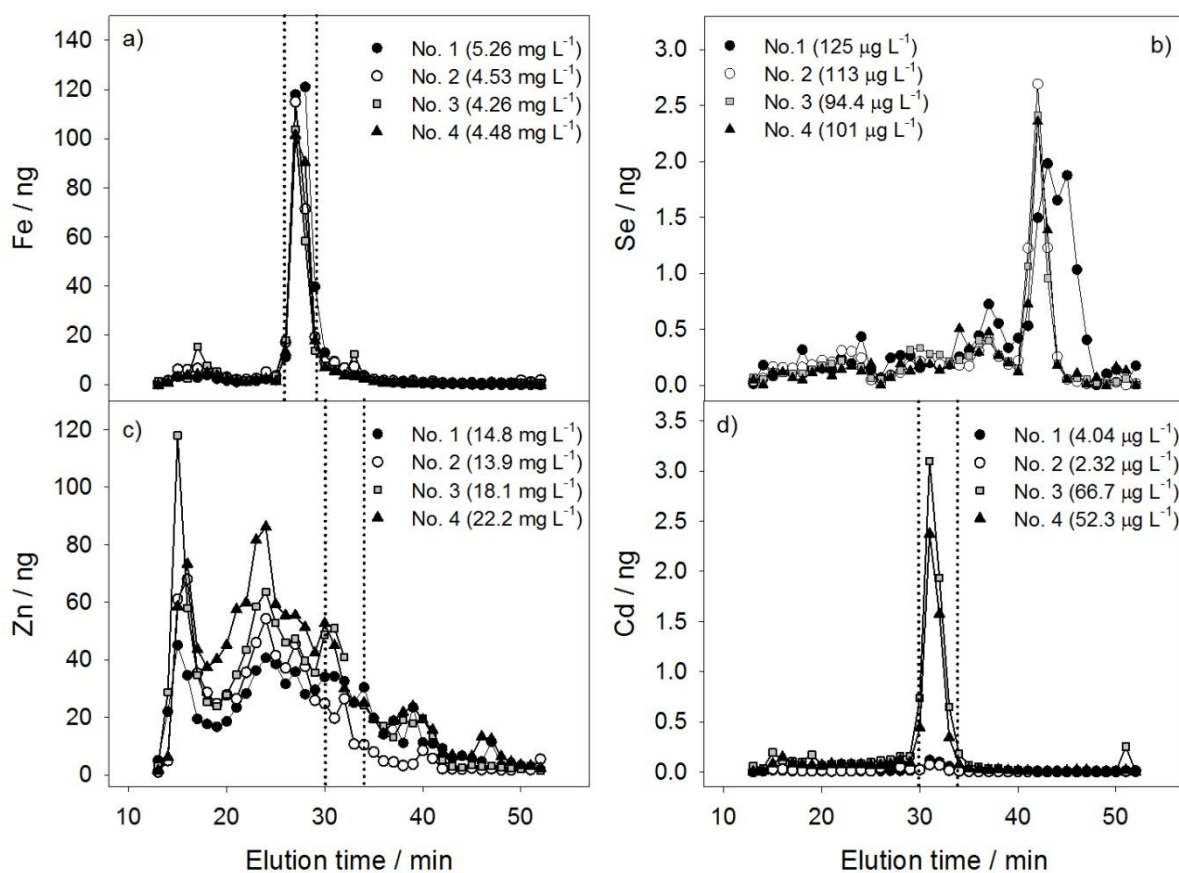
Slika 16. Profili raspodjele Cd među biomolekulama različitih molekularnih masa u citosolima škrga klenova (*S. cephalus*) dobiveni HPLC razdvajanjem na koloni SuperdexTM 200 10/300 GL i mjerenjem na HR ICP-MS-u. Analizirani uzorci su podijeljeni u dvije skupine, prema citosolskim koncentracijama Cd (ng mL⁻¹) u škrgama klenova. Oznaka slike u radu **SI-7**.

7.3. Dodatne informacije uz rad:

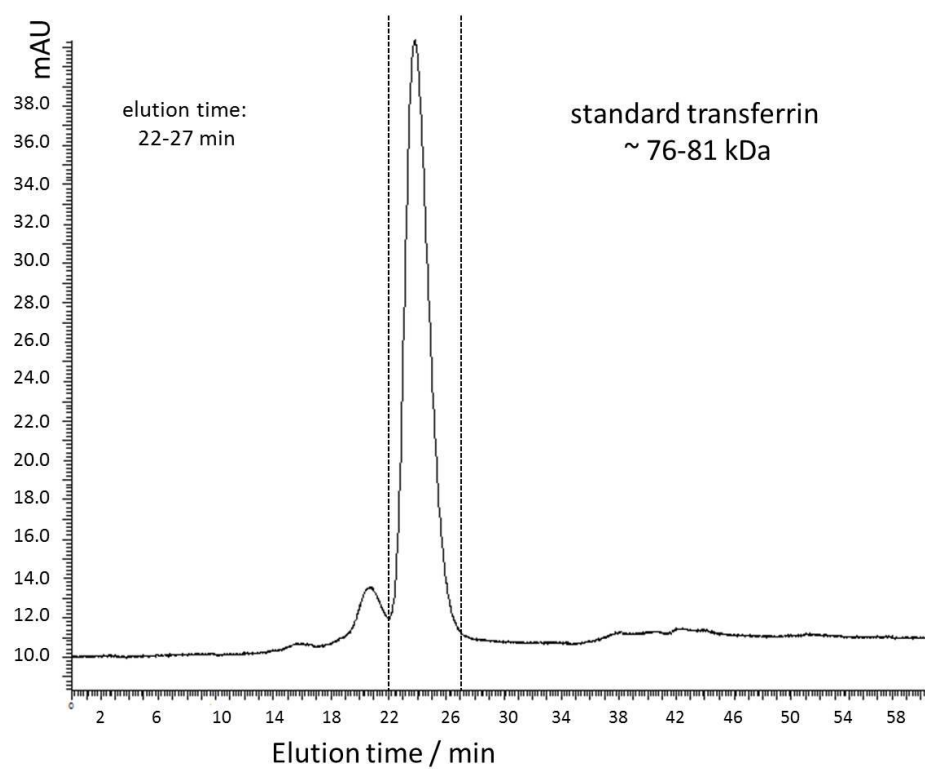
Krasnići N, Dragun Z, Kazazić S, Muharemović H, Erk M, Jordanova M, Rebok K, Kostov V: Characterization and identification of selected metal-binding biomolecules from hepatic and gill cytosols of Vardar chub (*Squalius vardarensis* Karaman, 1928) by various techniques of liquid chromatography and mass spectrometry. *Metallomics* (2019), 11: 1060-1078. doi:10.1039/C9MT00036D.



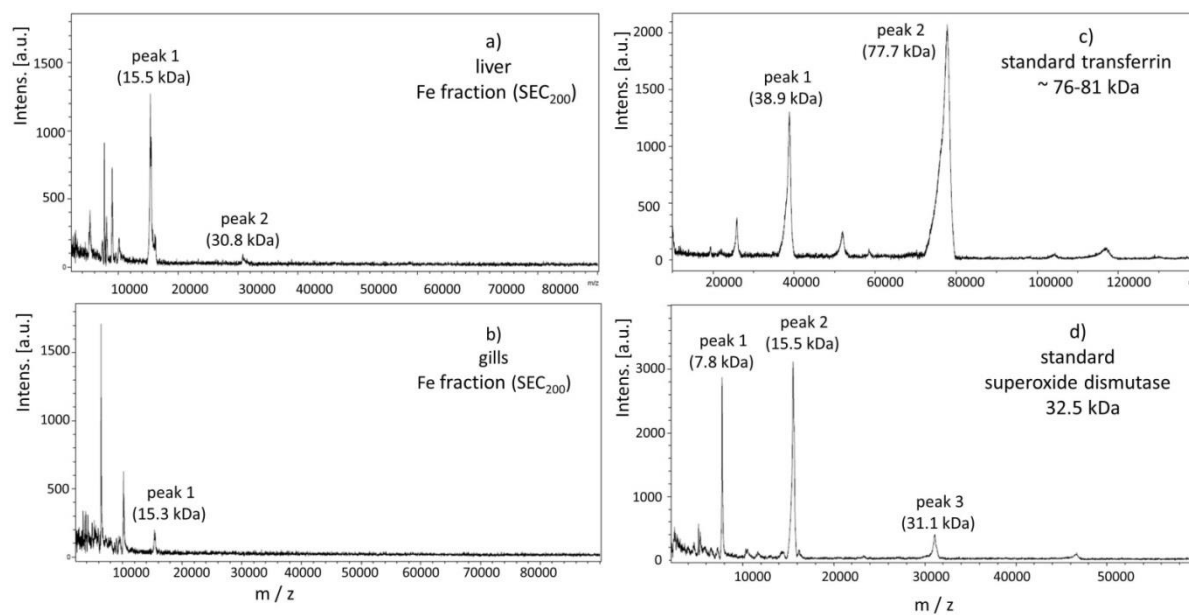
Slika 17. Raspodjele osam odabranih metala (a - Co, b - Cu, c - Fe, d - Mn, e - Mo, f - Se, g - Zn i h - Cd) među biomolekulama različitih molekulskih masa u citosolima jetara četiriju vardarskih klenova (*S. vardarensis*) uzorkovanih u dvjema makedonskim rijekama (Bregalnica i Zletovska) (uzorci br. 1, 2, 3 i 4). Profili su dobiveni HPLC razdvajanjem na koloni SuperdexTM 200 10/300 GL i mjerenjem na HR ICP-MS-u. SMM pikovi koji sadrže pretežno Fe (t_c 26-29 min) i NMM-pikovi koji sadrže pretežno Cd, Cu i Zn (t_c 30-34 min), a koji su označeni točkastim linijama, prikupljeni su za daljnje AEC-HPLC analize. Oznaka slike u radu **SI-1**.



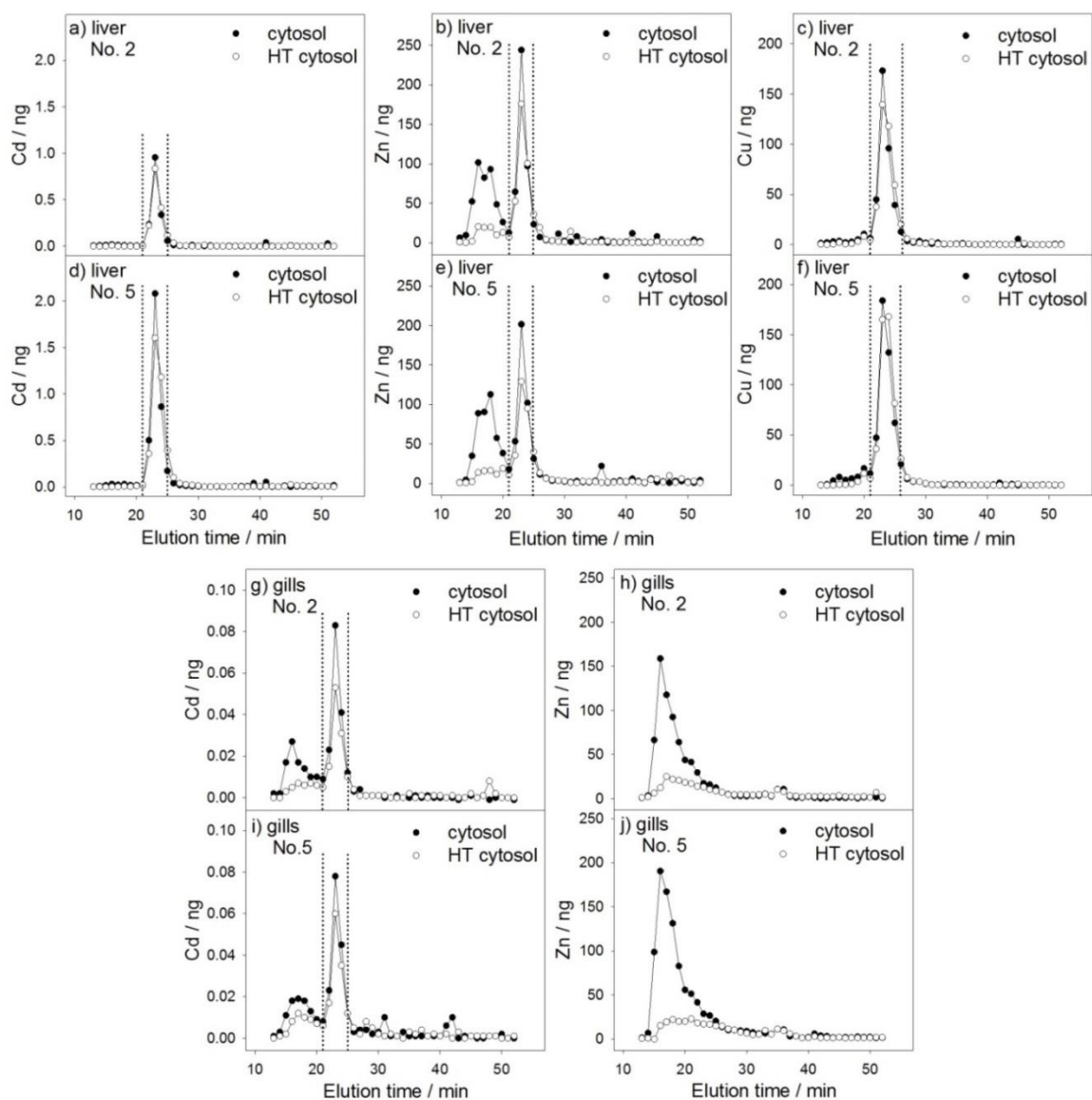
Slika 18. Raspodjele četiri odabrana elementa (a - Fe, b - Se, c - Zn, d - Cd) među biomolekulama različitih molekulskih masa u citosolima škriga četiriju vardarskih klenova (*S. vardarensis*) uzorkovanih u dvjema makedonskim rijekama (Bregalnica i Zletovska) (uzorci br. 1, 2, 3 i 4). Profili su dobiveni HPLC razdvajanjem na koloni SuperdexTM 200 10/300 GL i mjerenjem na HR ICP-MS-u. SMM pikovi koji sadrže pretežno Fe (t_e 26-29 min) i NMM-pikove koji sadrže pretežno Cd i Zn (t_e 30-34 min), a koji su označeni točkastim linijama, prikupljeni su za daljnje AEC-HPLC analize. Oznaka slike u radu **SI-2**.



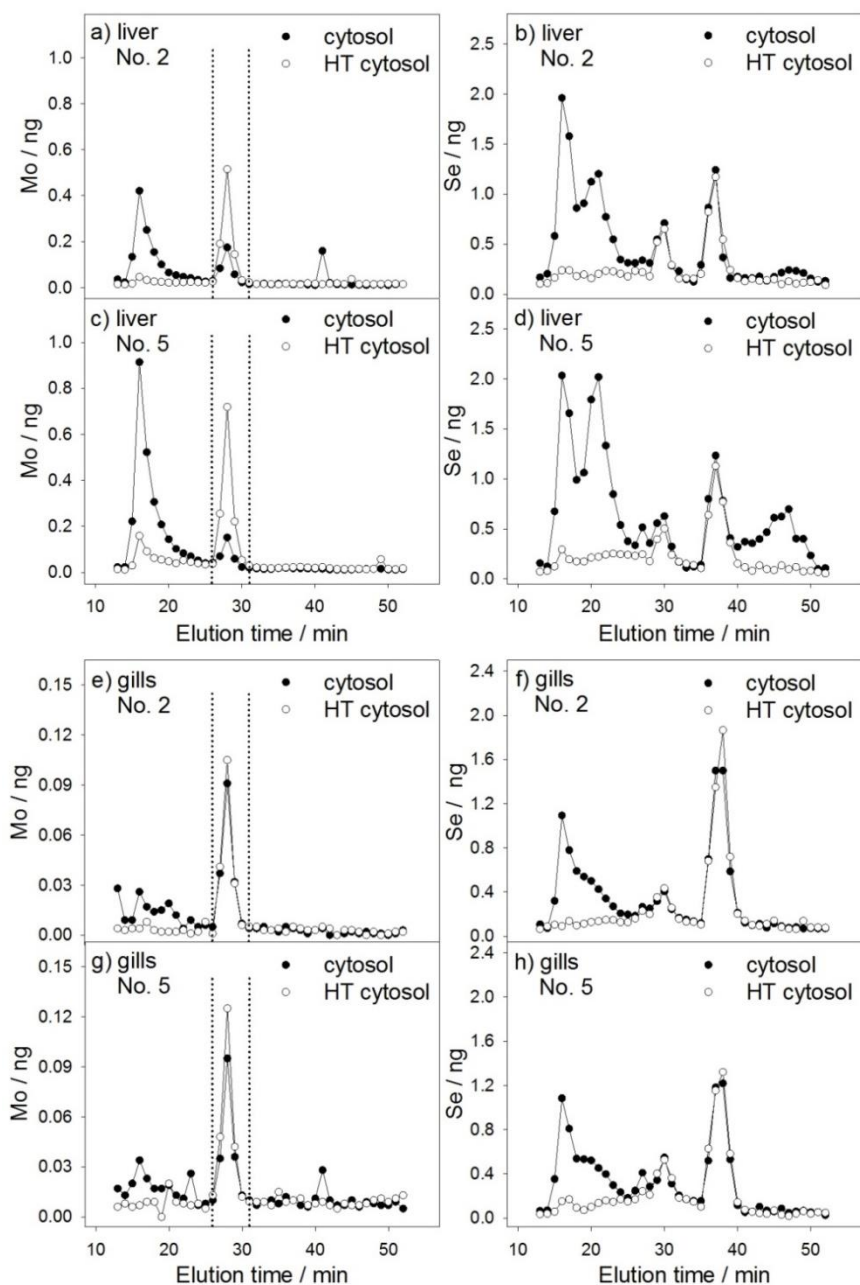
Slika 19. SEC₂₀₀-HPLC kromatografski profil standarda transferina (humani, koncentracija 2 mg mL⁻¹) dobiven snimanjem UV detektorom na 280 nm. Oznaka slike u radu **SI-3**.



Slika 20. Spektri masa dobiveni pomoću MALDI-TOF-MS-a za SMM biomolekule (~20-50 kDa) koje vežu Fe u citosolima jetara (a) i škrga (b) vardarskih klenova razdvojene pomoću SEC₂₀₀-HPLC-a, te spektri masa standarda proteina transferina (c) i standarda enzima superoksid dismutaze (d). Oznaka slike u radu **SI-4**.



Slika 21. Raspodjele Cd (a, d), Zn (b, e) i Cu (c, f) u jetrima te raspodjele Cd (g, i) i Zn (h, j) u škrgama među biomolekulama različitih molekulskih masa iz citosola i toplinski obrađenih citosola dvaju vardarskih klenova (*S. vardarensis*) uzorkovanih u dvjema makedonskim rijekama (Bregalnica i Zletovska) (uzorci br. 2 i 5). Profili su dobiveni HPLC razdvajanjem na koloni SuperdexTM 75 10/300 GL i mjerenjem na HR ICP-MS-u. NMM pikovi toplinski obrađenih jetrenih citosola (L-Cd-pikovi), koji su sadržavali Cd, Cu i Zn (t_e 21-25 min), a koji su označeni točkastim linijama, prikupljeni su za daljnje AEC-HPLC analize. NMM pikovi toplinski obrađenih citosola škrga (G-Cd-pikovi), koji su sadržavali Cd (t_e 21-25 min), a koji su označeni točkastim linijama, prikupljeni su za izravne MS analize. Oznaka slike u radu **SI-5**.



Slika 22. Raspodjele Mo (a, c) i Se (b, d) u jetrima te Mo (e, g) i Se (f, h) u škragama među biomolekulama različitih molekulskih masa iz citosola i toplinski obrađenih citosola dvaju vardarskih klenova (*S. vardarensis*) uzorkovanih u dvjema makedonskim rijekama (Bregalnica i Zletovska) (uzorci br. 2 i 5). Profili su dobiveni HPLC razdvajanjem na koloni Superdex™ 75 10/300 GL i mjerenjem na HR ICP-MS-u. JNMM pikovi toplinski obrađenih citosola jetara i škrगा (t_e 26-30 min), koji su sadržavali pretežno Mo (~5-10 kDa) te tragove Se, a koji su označeni točkastim linijama, prikupljeni su za izravne MS analize. Oznaka slike u radu **SI-6**.

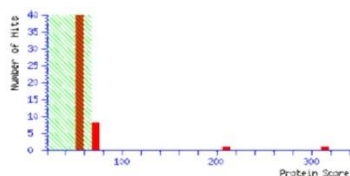
Electronic Supplementary Material (ESI) for Metallomics.
This journal is © The Royal Society of Chemistry 2019

Mascot Search Results

User : Hasan
 Email : hmuharem@irb.hr
 Search title : Fe-161-G_26102018
 MS data file : DATA.TXT
 Database 1 : NCBI nr 20150108 (54183042 sequences; 19531459180 residues)
 Database 2 : SwissProtNew 1 (551705 sequences; 197114987 residues)
 Timestamp : 31 Oct 2018 at 14:36:23 GMT
 Protein hits : 2::HBB1_DANRE Hemoglobin subunit beta-1 OS=Danio rerio GN=bal FE=1 SV=3
 1::gi|516023988 hypothetical protein [Herbaspirillum rubrisubalbicans]
 1::gi|448518684 hypothetical protein CORT_0B08280 [Candida orthopsilosis Co 90-125]
 1::gi|655034712 glutamate dehydrogenase [Omnitrophica bacterium SOGC AAA252-B19]
 1::gi|672894577 hypothetical protein CG50_10655 [Faenirhodobacter enshiensis]

Mascot Score Histogram

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 66 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$). Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Peptide Summary Report

Format As Peptide Summary [Help](#)
 Significance threshold $p < 0.05$ Max. number of hits AUTO
 Standard scoring MudPIT scoring Ions score or expect cut-off 0 Show sub-sets 0
 Show pop-ups Suppress pop-ups Sort unassigned Decreasing Score Require bold red

Select All Select None Search Selected Error tolerant Archive Report

1. 2::HBB1_DANRE Mass: 16606 Score: 313 Matches: 10(2) Sequences: 5(2) emPAI: 0.52
 Hemoglobin subunit beta-1 OS=Danio rerio GN=bal FE=1 SV=3

Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
<input type="checkbox"/> 182	479.6500	957.2854	957.5647	-0.2793	0	60	0.21	1	U	R.TAILGLWGR.L
<input type="checkbox"/> 183	479.6500	957.3054	957.5647	-0.2593	0	(53)	1.1	2	U	R.TAILGLWGR.L
<input type="checkbox"/> 299	668.2100	1334.4054	1334.6805	-0.2751	0	(47)	3.4	8	R	R.CLIVYFWTQR.Y
<input type="checkbox"/> 301	668.7000	1335.3854	1334.6805	0.7049	0	48	2.5	6	R	R.CLIVYFWTQR.Y
<input checked="" type="checkbox"/> 407	713.2600	1424.5054	1424.7623	-0.2569	0	(48)	2.2	1	U	K.LNIDEIGPQALS.R.C
<input type="checkbox"/> 408	713.2700	1424.5254	1424.7623	-0.2369	0	65	0.098	1	U	K.LNIDEIGPQALS.R.C
<input checked="" type="checkbox"/> 453	733.2300	1464.4454	1464.7139	-0.2684	0	(50)	1.5	1	R	R.LLADCIIVCAAMK.F
<input checked="" type="checkbox"/> 454	733.2700	1464.5254	1464.7139	-0.1884	0	72	0.0095	1	R	R.LLADCIIVCAAMK.F
<input checked="" type="checkbox"/> 457	733.7800	1465.5454	1464.7139	0.8316	0	(50)	1.4	1	R	R.LLADCIIVCAAMK.F
<input checked="" type="checkbox"/> 942	788.9900	2363.9482	2364.3165	-0.3683	1	68	0.014	1	U	R.TAILGLWKLINIDEIGPQALS.R.C

Proteins matching the same set of peptides:

2::HBB2_DANRE Mass: 16606 Score: 313 Matches: 10(2) Sequences: 5(2)
 Hemoglobin subunit beta-2 OS=Danio rerio GN=ba2 FE=1 SV=3
 1::gi|18858329 Mass: 16606 Score: 313 Matches: 10(2) Sequences: 5(2)
 hemoglobin subunit beta-1 [Danio rerio]
 1::gi|53749219 Mass: 16606 Score: 313 Matches: 10(2) Sequences: 5(2)
 hemoglobin subunit beta-2 [Danio rerio]
 1::gi|226358543 Mass: 16516 Score: 313 Matches: 10(2) Sequences: 5(2)
 bal globin [Hypophthalmichthys nobilis]
 1::gi|22135546 Mass: 16443 Score: 309 Matches: 10(2) Sequences: 5(2)
 beta globin [Ctenopharyngodon idella]

Slika 23. Rezultati pretraživanja Mascot baze: LC-MS/MS identifikacija SMM biomolekula koje vežu Fe u citosolu škrga vardarskog klena razdvojenih pomoću SEC₂₀₀-HPLC-a (~20-50 kDa) i pročišćenih pomoću AEC-HPLC-a.

Hemoglobin subunit beta-2 OS=Arctogadus glacialis GN=hbh2 FE=1 SV=2
 Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> 243	574.2100	1146.4054	1146.6761	-0.2707	0	85	5.9e-006	1	U	K.FLSVVVVALGR.Q
<input type="checkbox"/> 310	668.2200	1334.4254	1334.6805	-0.2551	0	29	2.4	8		R.CLIIVFWTGR.Y

Proteins matching the same set of peptides:
 HBB2_BORSA Mass: 16787 Score: 85 Matches: 2(1) Sequences: 2(1)
 Hemoglobin subunit beta-2 OS=Boreogadus saida GN=hbh2 FE=1 SV=3
 HBB2_GADMO Mass: 16796 Score: 85 Matches: 2(1) Sequences: 2(1)
 Hemoglobin subunit beta-2 OS=Gadus morhua GN=hbh2 FE=1 SV=2

4. HBA_CYPCA Mass: 15437 Score: 69 Matches: 4(2) Sequences: 2(1) emPAI: 0.49
 Hemoglobin subunit alpha OS=Cyprinus carpio GN=hba FE=1 SV=3
 Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> 242	573.6400	1145.2654	1145.6115	-0.3460	0	19	22	1	U	K.VIMGVGDVSK.I
<input checked="" type="checkbox"/> 684	934.8200	1867.6254	1868.0043	-0.3789	0	63	0.0012	1	U	K.IDDLVGGLAALSELHAFK.L
<input checked="" type="checkbox"/> 685	467.9200	1867.6509	1868.0043	-0.3535	0	(39)	0.15	1	U	K.IDDLVGGLAALSELHAFK.L
<input type="checkbox"/> 686	623.5700	1867.6882	1868.0043	-0.3162	0	(48)	0.019	2	U	K.IDDLVGGLAALSELHAFK.L

Mascot: <http://www.matrixscience.com/>

Slika 24 - nastavak. Rezultati pretraživanja Mascot baze: LC-MS/MS identifikacija SMM biomolekula koje vežu Fe u citosolu škrga vardarskog klana razdvojenih pomoću SEC₂₀₀-HPLC-a (~20-50 kDa) i pročišćenih pomoću AEC-HPLC-a.

Electronic Supplementary Material (ESI) for Metallomics.
This journal is © The Royal Society of Chemistry 2019

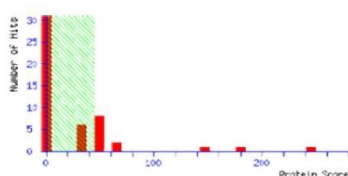
Mascot Search Results

User : Hasan
Email : hmuharem@irb.hr
Search title : L-161_08122017
MS data file : DATA.TXT
Database : SwissProtNew 1 (551705 sequences; 197114987 residues)
Timestamp : 8 Dec 2017 at 08:52:34 GMT
Protein hits :

- [HBB1_DANRE](#) Hemoglobin subunit beta-1 OS=Danio rerio GN=hba1 PE=1 SV=3
- [HBB_CARAU](#) Hemoglobin subunit beta OS=Carassius auratus GN=hbb FE=1 SV=1
- [HBB2_ARCGL](#) Hemoglobin subunit beta-2 OS=Arctogadus glacialis GN=hbb2 PE=1 SV=2
- [ADH1_GADMC](#) Alcohol dehydrogenase 1 OS=Gadus morhua subsp. callarias PE=1 SV=1
- [HBA_CYPCA](#) Hemoglobin subunit alpha OS=Cyprinus carpio GN=hba PE=1 SV=3
- [CTL5_HUMAN](#) Choline transporter-like protein 5 OS=Homo sapiens GN=SLC44A5 PE=2 SV=4
- [PRIM_BPT7](#) DNA primase/helicase OS=Enterobacteria phage T7 GN=4 PE=1 SV=1
- [SPIKE_CVHSA](#) Spike glycoprotein OS=Human SARS coronavirus GN=S PE=1 SV=1
- [MLR_DROME](#) Myosin regulatory light chain 2 OS=Drosophila melanogaster GN=Mlc2 PE=1 SV=2
- [5HT2A_DROME](#) 5-hydroxytryptamine receptor 2A OS=Drosophila melanogaster GN=5-HT1A PE=2 SV=2
- [FIBER_BPE15](#) Tail fiber protein OS=Salmonella phage epsilon15 PE=1 SV=1
- [NAS_SOLLC](#) Nicotianamine synthase OS=Solanum lycopersicum GN=CHLN FE=2 SV=1
- [SIR2_DROME](#) NAD-dependent histone deacetylase Sir2 OS=Drosophila melanogaster GN=Sir2 PE=1 SV=1
- [FMZD_DICNO](#) Probable minor fimbrial protein OS=Dichelobacter nodosus GN=fimZ PE=3 SV=1
- [PUR_ARATH](#) Transcription factor Pur-alpha 1 OS=Arabidopsis thaliana GN=PUR1A PE=1 SV=2
- [SELA_ACTP7](#) L-seryl-tRNA(Sec) selenium transferase OS=Actinobacillus pleuropneumoniae serotype 7 (strain AP76) GN=se1A PE=1 SV=1
- [CPRT_PMTVS](#) 91 kDa readthrough protein OS=Potato mop-top virus (isolate Potato/Sweden/Sw) GN=CP-CF2 PE=3 SV=1
- [FLGI_PELCD](#) Flagellar P-ring protein OS=Pelobacter carbinolicus (strain DSM 2380 / Gra Bd 1) GN=flgI PE=3 SV=1
- [INT3_PONAB](#) Integrator complex subunit 3 OS=Pongo abelii GN=INTS3 PE=2 SV=1

Mascot Score Histogram

Ions score is $-10 * \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 45 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$). Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Peptide Summary Report

Format As [Help](#)
 Significance threshold $p < 0.05$ Max. number of hits
 Standard scoring MudPIT scoring Ions score or expect cut-off Show sub-sets
 Show pop-ups Suppress pop-ups Sort unassigned Require bold red

Select All Select None Search Selected Error tolerant Archive Report

1. [HBB1_DANRE](#) Mass: 16606 Score: 244 Matches: 11(8) Sequences: 4(4) emPAI: 2.04
 Hemoglobin subunit beta-1 OS=Danio rerio GN=hba1 PE=1 SV=3
 Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> 142	479.6400	957.2654	957.5647	-0.2993	0	61	0.0018	1	U	R.TAILGLWGR.L
<input checked="" type="checkbox"/> 143	479.6500	957.2854	957.5647	-0.2793	0	(29)	2.7	1	U	R.TAILGLWGR.L
<input checked="" type="checkbox"/> 250	668.2100	1334.4054	1334.6805	-0.2751	0	53	0.0088	1	R	R.CLIVYPTQTR.Y
<input checked="" type="checkbox"/> 251	668.2200	1334.4254	1334.6805	-0.2551	0	(34)	0.73	4	R	R.CLIVYPTQTR.Y
<input checked="" type="checkbox"/> 297	713.2200	1424.4254	1424.7623	-0.3369	0	(38)	0.24	1	U	K.LNIDEIGPQALSR.C
<input checked="" type="checkbox"/> 298	713.2300	1424.4454	1424.7623	-0.3169	0	84	6.4e-006	1	U	K.LNIDEIGPQALSR.C
<input checked="" type="checkbox"/> 299	713.2400	1424.4654	1424.7623	-0.2969	0	(83)	8.1e-006	1	U	K.LNIDEIGPQALSR.C
<input checked="" type="checkbox"/> 300	713.2400	1424.4654	1424.7623	-0.2969	0	(77)	3.6e-005	1	U	K.LNIDEIGPQALSR.C
<input checked="" type="checkbox"/> 301	475.8300	1424.4682	1424.7623	-0.2941	0	(57)	0.0033	1	U	K.LNIDEIGPQALSR.C
<input checked="" type="checkbox"/> 329	733.2200	1464.4254	1464.7139	-0.2884	0	89	2e-006	1	R	R.LLADCITVCAAMK.F
<input checked="" type="checkbox"/> 339	741.2000	1480.3854	1480.7088	-0.3233	0	(46)	0.025	1	R	R.LLADCITVCAAMK.F + Oxidation (M)

Proteins matching the same set of peptides:
[HBB2_DANRE](#) Mass: 16606 Score: 244 Matches: 11(8) Sequences: 4(4)
 Hemoglobin subunit beta-2 OS=Danio rerio GN=hba2 PE=1 SV=3

2. [HBB_CARAU](#) Mass: 16427 Score: 181 Matches: 6(5) Sequences: 3(3) emPAI: 1.55

Slika 25. Rezultati pretraživanja Mascot baze: LC-MS/MS identifikacija SMM biomolekula koje vežu Fe u citosolu jetara vardarskog klena razdvojenih pomoću SEC₂₀₀-HPLC-a (~20-50 kDa) i pročišćenih pomoću AEC-HPLC-a.

Hemoglobin subunit beta OS=Carassius auratus GN=hbb FE=1 SV=1
 Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
250	668.2100	1334.4054	1334.6805	-0.2751	0	53	0.0088	1		R.CLIVYFWTQR.Y
251	668.2200	1334.4254	1334.6805	-0.2551	0	(34)	0.73	4		R.CLIVYFWTQR.Y
329	733.2200	1464.4254	1464.7139	-0.2884	0	89	2e-006	1		R.LLADCVCAAMK.F
339	741.2000	1480.3854	1480.7088	-0.3233	0	(46)	0.025	1		R.LLADCVCAAMK.F + Oxidation (M)
<input checked="" type="checkbox"/> 485	890.7200	1779.4254	1779.8217	-0.3962	0	109	2.8e-009	1	U	K.FGSPGFNADVQEAHQK.F
<input checked="" type="checkbox"/> 486	594.1500	1779.4282	1779.8217	-0.3935	0	(40)	0.028	1	U	K.FGSPGFNADVQEAHQK.F

3. [HBB2_AROGL](#) Mass: 16652 Score: 147 Matches: 5 (4) Sequences: 2 (2) emPAI: 0.45
Hemoglobin subunit beta-2 OS=Arctogadus glacialis GN=hbb2 FE=1 SV=2
 Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> 177	574.2100	1146.4054	1146.6761	-0.2707	0	(77)	3.7e-005	1	U	K.FLSVVVVSALGR.Q
<input checked="" type="checkbox"/> 178	574.2200	1146.4254	1146.6761	-0.2507	0	97	4.4e-007	1	U	K.FLSVVVVSALGR.Q
<input checked="" type="checkbox"/> 180	574.6800	1147.3454	1146.6761	0.6693	0	(59)	0.0053	1	U	K.FLSVVVVSALGR.Q
250	668.2100	1334.4054	1334.6805	-0.2751	0	53	0.0088	1		R.CLIVYFWTQR.Y
251	668.2200	1334.4254	1334.6805	-0.2551	0	(34)	0.73	4		R.CLIVYFWTQR.Y

Proteins matching the same set of peptides:
[HBB2_BORSA](#) Mass: 16787 Score: 147 Matches: 5 (4) Sequences: 2 (2)
Hemoglobin subunit beta-2 OS=Boreogadus saida GN=hbb2 FE=1 SV=3
[HBB2_GADMO](#) Mass: 16796 Score: 147 Matches: 5 (4) Sequences: 2 (2)
Hemoglobin subunit beta-2 OS=Gadus morhua GN=hbb2 FE=1 SV=2

Slika 25 - nastavak. Rezultati pretraživanja Mascot baze: LC-MS/MS identifikacija SMM biomolekula koje vežu Fe u citosolu jetara vardarskog klena razdvojenih pomoću SEC₂₀₀-HPLC-a (~20-50 kDa) i pročišćenih pomoću AEC-HPLC-a.

550 890.7200 1779.4254 1779.8217 -0.3962 0 106 5.4e-009 1 U K.FGPSGFNADVQEMQK.F

3. [HBB2_ARCGL](#) Mass: 16652 Score: 122 Matches: 4(2) Sequences: 2(1) emPAI: 0.20
 Hemoglobin subunit beta-2 OS=Arctogadus glacialis GN=hbb2 FE=1 SV=2
 Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> 226	574.2200	1146.4254	1146.6761	-0.2507	0	(81)	1.8e-005	1	U	K.FLSVVVVSALGR.Q
<input checked="" type="checkbox"/> 227	574.2400	1146.4654	1146.6761	-0.2107	0	87	4e-006	1	U	K.FLSVVVVSALGR.Q
291	668.2100	1334.4054	1334.6805	-0.2751	0	(34)	0.73	4		R.CLIIVFPWTQR.Y
292	668.2300	1334.4454	1334.6805	-0.2351	0	44	0.065	1		R.CLIIVFPWTQR.Y

Proteins matching the same set of peptides:
[HBB2_BORSA](#) Mass: 16787 Score: 122 Matches: 4(2) Sequences: 2(1)
 Hemoglobin subunit beta-2 OS=Boreogadus saida GN=hbb2 FE=1 SV=3
[HBB2_GADMO](#) Mass: 16796 Score: 122 Matches: 4(2) Sequences: 2(1)
 Hemoglobin subunit beta-2 OS=Gadus morhua GN=hbb2 FE=1 SV=2

Mascot: <http://www.matrixscience.com/>

Slika 26 - nastavak. Rezultati pretraživanja Mascot baze: LC-MS/MS identifikacija SMM biomolekula koje vežu Fe u citosolu jetara vardarskog klana razdvojenih pomoću SEC₂₀₀-HPLC-a (~20-50 kDa) i pročišćenih pomoću AEC-HPLC-a.

Electronic Supplementary Material (ESI) for Metallomics.
This journal is © The Royal Society of Chemistry 2019

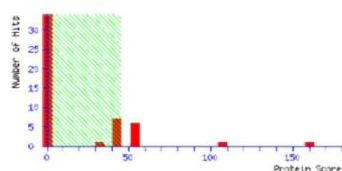
MASCOT Search Results

User : Hasan
Email : hmuharem@irb.hr
Search title : L-165_08122017
MS data file : DATA.TXT
Database : SwissProt 56.0 (547357 sequences; 194874700 residues)
Timestamp : 8 Dec 2017 at 11:08:08 GMT
Protein hits :

- [HBB1_DANRE](#) Hemoglobin subunit beta-1 OS=Danio rerio GN=hba1 PE=1 SV=3
- [HBB2_ARCGL](#) Hemoglobin subunit beta-2 OS=Arctogadus glacialis GN=hbb2 PE=1 SV=2
- [HXA2_BOVIN](#) Homeobox protein Hox-A2 OS=Bos taurus GN=HoxA2 PE=2 SV=1
- [FHUO_BACSU](#) Iron(3+)-hydroxamate-binding protein FhuD OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=fhuD PE=1 SV=1
- [RS20_BIFAA](#) 30S ribosomal protein S20 OS=Bifidobacterium adolescentis (strain ATCC 15703 / DSM 20083 / NCTC 11814 / E194a)
- [HBA_CYPCA](#) Hemoglobin subunit alpha OS=Cyprinus carpio GN=hba PE=1 SV=3
- [ACKA_CAM78](#) Acetate kinase OS=Campylobacter jejuni subsp. jejuni serotype O:6 (strain 81116 / NCTC 11828) GN=ackA PE=3 SV=5
- [MK33_MOUSE](#) Meckelin OS=Mus musculus GN=Mme67 PE=1 SV=2
- [SOCS1_HUMAN](#) Suppressor of cytokine signaling 1 OS=Homo sapiens GN=SOCS1 PE=1 SV=1
- [NMI11_ASPCL](#) Pro-apoptotic serine protease nmi11 OS=Aspergillus clavatus (strain ATCC 1007 / CBS 513.65 / DSM 816 / NCTC 3)
- [TADA3_MOUSE](#) Transcriptional adapter 3 OS=Mus musculus GN=Tada3 PE=1 SV=1
- [CH60_COX1](#) 60 kDa chaperonin OS=Coxiella burnetii (strain CbuK_Q154) GN=groL PE=3 SV=1
- [PYRD_RHOFI](#) Dihydroorotate dehydrogenase (quinone) OS=Rhodospirillum rubrum (strain ATCC BAA-621 / DSM 15236 / T118) GN=pyrD PE=3 SV=1
- [SYA_VIBPA](#) Alanine--tRNA ligase OS=Vibrio parahaemolyticus serotype O3:K6 (strain RIMD 2210633) GN=alaS PE=3 SV=1
- [UBP36_DROVI](#) Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 36 OS=Drosophila virilis GN=Usp36 PE=3 SV=1
- [CSLF4_ORYSJ](#) Mixed-linked glucan synthase 4 OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=CSLF4 PE=3 SV=1

Mascot Score Histogram

Ions score is $-10 \times \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 45 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$). Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Peptide Summary Report

Format As: Peptide Summary [Help](#)

Significance threshold $p < 0.05$ Max. number of hits: AUTO

Standard scoring: MudPIT scoring Ions score or expect cut-off: 0 Show sub-sets: 0

Show pop-ups: Suppress pop-ups: Sort unassigned: Decreasing Score Require bold red:

Select All Select None Search Selected Error tolerant Archive Report

1. [HBB1_DANRE](#) Mass: 16606 Score: 160 Matches: 5 (3) Sequences: 4 (3) emPAI: 0.74
Hemoglobin subunit beta-1 OS=Danio rerio GN=hba1 PE=1 SV=3
 Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
<input type="checkbox"/> 209	479.6700	957.3254	957.5647	-0.2393	0	45	0.069	1	U	R.TALLGLWGR.L
<input type="checkbox"/> 210	479.7000	957.3854	957.5647	-0.1793	0	(29)	2.8	6	U	R.TALLGLWGR.L
<input type="checkbox"/> 361	668.2100	1334.4054	1334.6805	-0.2751	0	53	0.0082	1		R.CLIVYPTQR.Y
<input type="checkbox"/> 427	713.2300	1424.4454	1424.7623	-0.3169	0	100	1.5e-007	1	U	K.LNIDVIGPQALSR.C
<input type="checkbox"/> 453	733.2000	1464.3854	1464.7139	-0.3284	0	95	4.3e-007	1		R.LLADCITVCAAMK.F

Proteins matching the same set of peptides:
[HBB2_DANRE](#) Mass: 16606 Score: 160 Matches: 5 (3) Sequences: 4 (3)
Hemoglobin subunit beta-2 OS=Danio rerio GN=hba2 PE=1 SV=3

2. [HBB2_ARCGL](#) Mass: 16652 Score: 106 Matches: 2 (2) Sequences: 2 (2) emPAI: 0.45
Hemoglobin subunit beta-2 OS=Arctogadus glacialis GN=hbb2 PE=1 SV=2
 Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
<input type="checkbox"/> 269	574.2300	1146.4454	1146.6761	-0.2307	0	98	3.5e-007	1	U	K.FLSVVVSALGR.Q
<input type="checkbox"/> 361	668.2100	1334.4054	1334.6805	-0.2751	0	53	0.0082	1		R.CLIVYPTQR.Y

Proteins matching the same set of peptides:
[HBB2_BORSA](#) Mass: 16787 Score: 106 Matches: 2 (2) Sequences: 2 (2)
Hemoglobin subunit beta-2 OS=Boreogadus saida GN=hbb2 PE=1 SV=3
[HBB2_GADMO](#) Mass: 16796 Score: 106 Matches: 2 (2) Sequences: 2 (2)
Hemoglobin subunit beta-2 OS=Gadus morhua GN=hbb2 PE=1 SV=2

Mascot: <http://www.matrixscience.com/>

Slika 27. Rezultati pretraživanja Mascot baze: LC-MS/MS identifikacija SMM biomolekula koje vežu Fe u citosolu jetara vardarskog klana razdvojenih pomoću SEC₂₀₀-HPLC-a (~20-50 kDa) i pročišćenih pomoću AEC-HPLC-a.

POPIS KORIŠTENIH KRATICA

AEC-HPLC	anionsko izmjenjivačka tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
HR ICP-MS	spektrometrija masa visoke rezolucije s induktivno spregnutom plazmom
JNMM	biomolekule jako niskih molekulskih masa (<10 kDa)
LC-MS/MS	tekućinska kromatografija - tandemna spektrometrija masa
MALDI-TOF-MS	spektrometrija masa s matricom potpomognutom ionizacijom desorpcijom laserskog zračenja s analizatorom masa s vremenom leta
MS	spektrometrija masa
MT	metalotionein
NMM	biomolekule niskih molekulskih masa (10-30 kDa)
SEC-HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s isključenjem po veličini
SMM	biomolekule srednjih molekulskih masa (30-100 kDa)
SOD	superoksid dismutaza
VMM	biomolekule visokih molekulskih masa (>100 kDa)

ŽIVOTOPIS

8. ŽIVOTOPIS

Nesrete Krasnići rođena je 11. studenog 1982. godine u mjestu Damjane na Kosovu, gdje je završila osnovnu školu. Nakon završene srednje škole u Zagrebu, 2008. godine je diplomirala na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, smjer prehrambeno inženjerstvo. Od 2009. godine do danas zaposlena je prvo kao stručna suradnica te zatim kao viša stručna suradnica u Laboratoriju za biološke učinke metala Zavoda za istraživanje mora i okoliša Instituta Ruđer Bošković. Njezin stručni i znanstveni rad obuhvaćaju analize raspodjele metala među citosolskim biomolekulama u organima bioindikatorskih organizama pomoću raznih tehnika tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i masene spektrometrije visoke rezolucije s induktivno spregnutom plazmom, zatim određivanje ukupnih proteina spektrofotometrijskom metodom kao i određivanje metalotioneina elektrokemijskom metodom (diferencijalna pulsna polarografija). U akademskoj godini 2013./2014. upisala je poslijediplomski sveučilišni doktorski studij biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Za znanstvene aktivnosti i dostignuća, dodijeljene su joj godišnje nagrade Instituta Ruđer Bošković za mlade znanstvenike bez doktorata za dva znanstvena rada objavljena u časopisima visokog čimbenika odjeka (2013. i 2014.). Dobitnica je stipendije Instituta Ruđer Bošković za kratkoročni boravak u Francuskoj (Bordeaux Imaging Center (BIC) u Bordeauxu i Université de Pau et des Pays de l'Adour/CNRS/Cameca u Pauu i Parizu) te stipendije ERASMUS+, radi tromjesečnog znanstveno-stručnog usavršavanja na Kemijskom fakultetu Sveučilišta u Oviedu u Španjolskoj. Dobitnica je i brojnih stipendija za sudjelovanje na znanstvenim skupovima u inozemstvu (u Sloveniji, Velikoj Britaniji i Estoniji). Sudjelovala je na brojnim domaćim i međunarodnim tečajevima i znanstvenim skupovima.

Do sada je autorica/suautorica 23 znanstvena rada, od čega je prva autorica na četiri znanstvena rada u časopisima citiranim u Web of Science (WoS) bazi podataka, te 46 sažetaka u zbornicima znanstvenih skupova.

Popis objavljenih znanstvenih radova

1. **Krasnići N.**, Dragun Z., Kazazić S., Muharemović H., Erk M., Jordanova M., Rebok K., Kostov, V: Characterization and identification of selected metal-binding biomolecules from hepatic and gill cytosols of Vardar chub (*Squalius vardarensis* Karaman, 1928) by various techniques of liquid chromatography and mass spectrometry. *Metallomics* 11 (2019), 1060-1078.
2. Dragun Z, Tepić N, Ramani S, **Krasnići N**, Filipović Marijić V, Valić D, Kapetanović D, Erk M, Rebok K, Kostov V, Jordanova, M: Mining waste as a cause of increased bioaccumulation of highly toxic metals in liver and gills of Vardar chub (*Squalius vardarensis* Karaman, 1928). *Environmental Pollution* 247 (2019), 564-576.
3. Mijošek T, Filipović Marijić V, Dragun Z, **Krasnići N**, Ivanković D, Erk M: Evaluation of multi-biomarker response in fish intestine as an initial indication of anthropogenic impact in the aquatic karst environment. *Science of the Total Environment* 660 (2019), 1079-1090.
4. Sertić Perić M, Matoničkin Kepčija R, Miliša M, Gottstein S, Lajtner J, Dragun Z, Filipović Marijić V, **Krasnići, N**, Ivanković D, Erk, M: Benthos-drift relationships as proxies for the detection of the most suitable bioindicator taxa in flowing waters – a pilot-study within a Mediterranean karst river. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 163 (2018), 125-135.
5. Barišić J, Filipović Marijić V, Mijošek T, Čož-Rakovac R, Dragun Z, **Krasnići N**, Ivanković, D, Kružlicová D, Erk M: Evaluation of architectural and histopathological biomarkers in the intestine of brown trout (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) challenged with environmental pollution. *Science of the Total Environment* 642 (2018), 656-664.
6. Dragun Z, **Krasnići N**, Kolar N, Filipović Marijić V, Ivanković D, Erk M: Cytosolic distributions of highly toxic metals Cd and Tl and several essential elements in the liver of brown trout (*Salmo trutta* L.) analyzed by size exclusion chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Chemosphere* 207 (2018), 162-173.

7. Filipović Marijić V, Kapetanović D, Dragun Z, Valić D, **Krasnići N**, Redžović Z, Grgić I, Žunić J, Kružlicová D, Nemeček P: Influence of technological and municipal wastewaters on vulnerable karst riverine system, Krka River in Croatia. *Environmental Science and Pollution Research* 25 (2018), 5; 4715-4727.
8. **Krasnići N**, Dragun Z, Erk M, Ramani S, Jordanova M, Rebok K, Kostov V: Size-exclusion HPLC analysis of trace element distributions in hepatic and gill cytosol of Vardar chub (*Squalius vardarensis* Karaman) from mining impacted rivers in north-eastern Macedonia. *Science of the Total Environment* 613/614 (2018), 1055-1068.
9. Dragun Z, Filipović Marijić V, **Krasnići N**, Ivanković D, Valić D, Žunić J, Kapetanović, D, Vardić Smrzlić I, Redžović Z, Grgić, I, Erk M: Total and cytosolic concentrations of twenty metals/metalloids in the liver of brown trout *Salmo trutta* (Linnaeus, 1758) from the karstic Croatian river Krka. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 147 (2018), 537-549.
10. Dragun Z, Filipović Marijić V, **Krasnići N**, Ramani S, Valić D, Rebok K, Kostov V, Jordanova M, Erk M: Malondialdehyde concentrations in the intestine and gills of Vardar chub (*Squalius vardarensis* Karaman) as indicator of lipid peroxidation . *Environmental Science and Pollution Research* 24 (2017), 20; 16917-16926.
11. Jordanova M, Rebok K, Dragun Z, Ramani S, Ivanova L, Kostov V, Valić D, **Krasnići N**, Filipović Marijić V, Kapetanović D: Effects of heavy metal pollution on pigmented macrophages in kidney of Vardar chub (*Squalius vardarensis* Karaman). *Microscopy Research and Technique* 80 (2017), 8; 930-935.
12. Dragun Z, Filipović Marijić V, **Krasnići N**, Ramani S, Valić D, Rebok K, Kostov V, Jordanova M, Erk M: Malondialdehyde concentrations in the intestine and gills of Vardar chub (*Squalius vardarensis* Karaman) as indicator of lipid peroxidation. *Environmental Science and Pollution Research* 24 (2017); 16917-16926.
13. Babić, S, Barišić J, Malev O, Klobučar G, Topić Popović N, Strunjak-Perović I, **Krasnići N**, Čož-Rakovac R, Sauerborn Klobučar R: Sewage sludge toxicity assessment using earthworm *Eisenia fetida*: Can biochemical and histopathological analysis provide fast and accurate insight? *Environmental Science and Pollution Research* 23 (2016), 12; 12150-12163.

14. Dragun Z, Tepić N, **Krasnići N**, Teskeredžić E: Accumulation of metals relevant for agricultural contamination in gills of European chub (*Squalius cephalus*). Environmental Science and Pollution Research 23 (2016), 16; 16802-16815.
15. Jordanova M, Rebok K, Dragun Z, Ramani S, Ivanova L, Kostov V, Valić D, **Krasnići N**, Filipović Marijić V, Kapetanović, D: Histopathology investigation on the Vardar chub (*Squalius vardarensis*) populations captured from the rivers impacted by mining activities. Ecotoxicology and Environmental Safety 129 (2016); 35-42.
16. Babić S, Dragun Z, Sauerborn Klobučar R, Ivanković D, Bačić N, Fiket Ž, Barišić J, **Krasnići N**, Strunjak-Perović I, Topić Popović N, Čož-Rakovac, R: Indication of metal homeostasis disturbance in earthworm *Eisenia fetida* after exposure to semi-solid depot sludge. Science of the Total Environment 526 (2015); 127-135.
17. Barišić J, Dragun Z, Ramani S, Filipović Marijić V, **Krasnići N**, Čož-Rakovac R, Kostov V, Rebok K, Jordanova M: Evaluation of histopathological alterations in the gills of Vardar chub (*Squalius vardarensis* Karaman) as an indicator of river pollution. Ecotoxicology and Environmental Safety 118 (2015); 158-166.
18. Tariba B, Živković T, **Krasnići N**, Filipović Marijić V, Erk M, Gamulin M, Grgić M, Pizent A: Serum metallothionein in patients with testicular cancer. Cancer chemotherapy and pharmacology 75 (2015), 4; 813-820.
19. **Krasnići N**, Dragun Z, Erk M, Raspor B: Distribution of Co, Cu, Fe, Mn, Se, Zn and Cd among cytosolic proteins of different molecular masses in gills of European chub (*Squalius cephalus* L.). Environmental Science and Pollution Research 21 (2014), 23; 13512-13521.
20. Dragun Z, Filipović Marijić V, Kapetanović D, Valić D, Vardić Smrzlić I, **Krasnići N**, Strižak Ž, Kurtović B, Teskeredžić E, Raspor B: Assessment of general condition of fish inhabiting a moderately contaminated aquatic environment. Environmental Science and Pollution Research 20 (2013), 7; 4954-4968.
21. **Krasnići N**, Dragun Z, Erk M, Raspor B: Distribution of selected essential (Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Se, Zn) and nonessential (Cd, Pb) trace elements among protein fractions from hepatic cytosol of European chub (*Squalius cephalus* L.). Environmental Science and Pollution Research 20 (2013), 4; 2340-2351.

22. Dragun Z, **Krasnići N**, Strižak, Ž, Raspor, B: Lead concentration increase in the hepatic and gill soluble fractions of European chub (*Squalius cephalus*) - an indicator of increased Pb exposure from the river water. *Environmental Science and Pollution Research* 19 (2012), 6; 2088-2095.
23. Levaj B, Dragović-Uzelac V, Bursać Kovačević D, **Krasnići, N**: Determination of flavonoids in pulp and peel of mandarin fruits. *Agriculturae Conspectus Scientificus*. 74 (2009), 3; 221-225.

Kongresna priopćenja:

1. **Krasnići N**, Dragun Z, Kazazić S, Muharemović H, Kazazić S, Jordanova M, Rebok, K, Kostov V, Erk M: Characterization and identification of cytosolic biomolecules that bind Cd, Zn and Mo in the gills of Vardar chub (*Squalius vardarensis* Karaman). *8th International Conference of Ecosystems*, Mankolli, Hysen; Dursun, Sukru; Zuchetti, Massimo; Kongoli, Cezar (ur.). Tirana: EHA, JIEAS, IJEES, 2018. str. 29-29 (poster).
2. **Krasnići N**, Dragun Z, Filipović Marijić V, Ivanković D, Erk M. Thallium accumulation in the hepatic and gill soluble fractions in brown trout (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) from from the Croatian river Krka. *Book of Abstracts of the Workshop on Technology Critical Elements in Ecosystem and Human Health*, Ospina-Alvarez, Natalia; Zimmermann, Sonja; Aruoja, Villem (ur.). Tallinn: NOTICE-COST action TD1407, 2018. str. 41-41 (poster).
3. **Krasnići N**, Dragun Z, Kolar N, Filipović Marijić V, Ivanković D, Erk M: Thallium bioaccumulation and cytosolic distribution among biomolecules of different molecular masses in the liver of brown trout (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) from the Croatian river Krka. *15th International Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography and Separation Technology* Langley, John (ur.). Cardiff: Royal Society of Chemistry, 2018. 297, 2 (poster).
4. **Krasnići N**, Dragun Z, Kazazić S, Muharemović H, Kazazić S, Jordanova M, Rebok, K, Kostov V, Erk M: Analysis of Fe distribution among cytosolic biomolecules and identification of Fe-binding compounds in the liver and gills of Vardar chub (*Squalius vardarensis* Karaman). *Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a - Knjiga*

- sažetaka*, Primožič, Ines (ur.). Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2018. str. 46-46 (poster).
5. **Krasnići N**, Montes-Bayón M, Dragun, Z, Alonso García F J, Corte Rodriguez M, Erk M, Ramani S, Jordanova M, Rebok K, Kostov V: Potvrđivanje vezanja Zn, Cu i Cd na metalotioneine u citosolu jetre vardarskog klena (*Squalius vardarensis* Karaman) korištenjem visoko djelotvorne tekućinske kromatografije i masene spektrometrije. Knjiga sažetaka (*Simpozij o biologiji slatkih voda*, USB) Gračan, Romana; Matoničkin Kepčija, Renata; Miliša, Marko; Ostojić, Ana (ur.). Zagreb: Hrvatsko udruženje slatkovodnih ekologa, 2017. 45-46 (poster).
 6. **Krasnići N**, Dragun Z, Filipović Marijić V, Erk M, Ramani S: Changes in cytosolic distribution of toxic metals Cd and Pb in liver, gills and intestine of Vardar chub (*Squalius vardarensis*) induced by exposure to mining effluents. Molecules of life: book of abstracts, *FEBS3+ Meeting and 11th Meeting of the Slovenian Biochemical Society*, Kos J, Poklar Ulrih N (ur.). Ljubljana: Slovenian Biochemical Society, 2015. str. 172-172 (poster).
 7. **Krasnići N**, Dragun Z, Filipović Marijić V, Erk M, Ramani S: Cytosolic distribution of Cd, Co, Cu, Fe, Pb, V and Zn in liver, gills and intestine of Vardar chub (*Squalius vardarensis*) from mining impacted rivers in Macedonia. *Influence of active mines on freshwater ecosystems* Dragun Z (ur.). Zagreb, Hrvatska: Institut Ruđer Bošković, 2014. str. 15-16 (predavanje).
 8. **Krasnići N**, Filipović Marijić V, Dragun Z, Vardić Smrzlić I, Raspor B: Can fish intestinal parasites Acanthocephalans protect the fish against metal accumulation? "*Hrvatska akvakultura u europskoj uniji- sadašnjost i budućnost*" Holik J i sur. (ur.). Vukovar: HGK, 2013. str. 15-15 (poster).
 9. **Krasnići N**, Dragun Z, Filipović Marijić V, Erk M: Distribution of Cu, Fe and Cd among SE-HPLC separated cytosolic proteins isolated from liver, gills and intestinal parasite of European chub (*Squalius cephalus* L.). 13th International Chromatography School: book of abstracts Ukić Š.; Bolanča T (ur.). Zagreb: University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology, 2012. str. 40-40 (poster).