



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

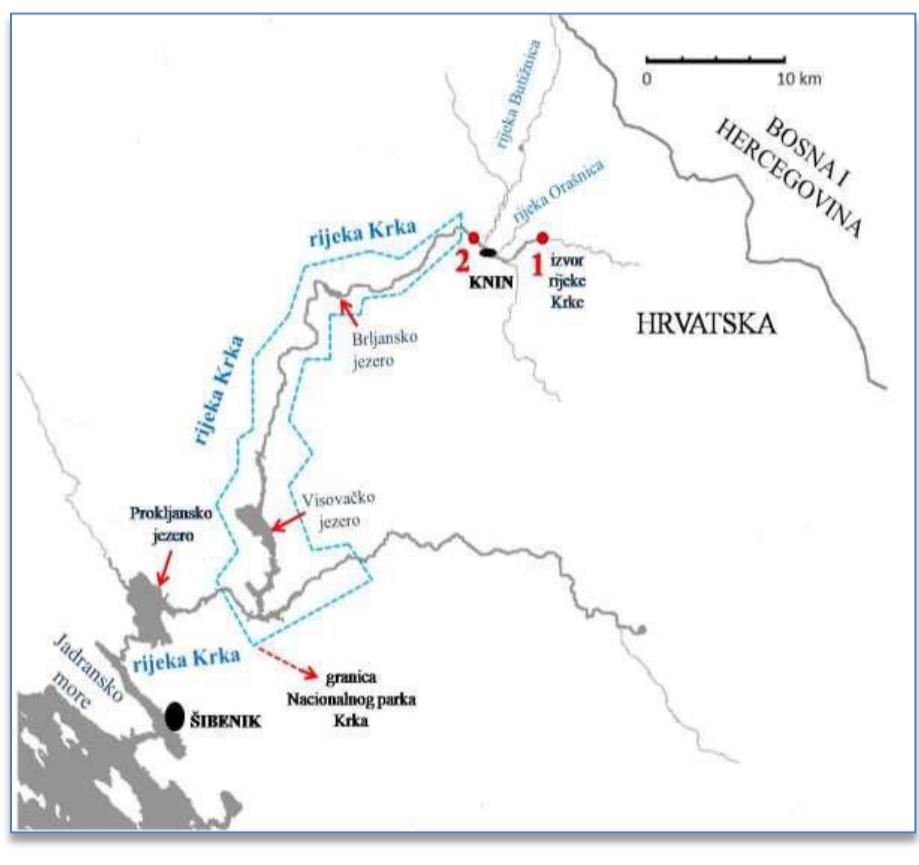
Nicol Kolar

Uvod

Onečišćenje prirodnih voda metalima predstavlja veliki okolišni problem, zbog njihovog ulaska u prehrabeni lanac, nakupljanja u živim organizmima i mogućeg toksičnog djelovanja, kako na životinje, tako i na ljudi. Procjena onečišćenja vodenog okoliša i njegovog utjecaja na akvatičke organizme u ovome je istraživanju provedena na rijeci Krki, u listopadu 2015. godine, primjenom sljedećih analiza:

- mjerjenjem koncentracija otopljenih metala i metaloida u riječnoj vodi;
- mjerjenjem ukupnih i citosolskih koncentracija metala i metaloida u ciljnem organu bioindikatorskog organizma;
- izučavanjem raspodjele metala i metaloida između topljive citosolske i netopljive stanične frakcije primjenom diferencijalnog centrifugiranja; te
- izučavanjem raspodjele metala i metaloida među citosolskim biomolekulama različitih molekulske masa.

Materijali i metode



Slika 1. Karta područja istraživanja s označenim mjestima uzorkovanja

Istraživanje je provedeno na dvije postaje na rijeci Krki:
1 – na izvoru rijeke Krke kao referentnoj postaji;
2 – lokaciji nizvodno od Knina kao onečišćenoj postaji (slika 1).

Odabrani bioindikatorski organizam bila je potočna pastrva (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) (slika 2), a kao ciljni organ za analize odabrana su jetra – glavni metabolički i detoksikacijski organ.



Istraživanjem je obuhvaćeno sedam esencijalnih (Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Se i Zn) i dva nesencijalna elementa (Cd i Tl). Za njihovo mjerjenje primijenjen je maseni spektrometar visokog razlučivanja s induktivno spregnutom plazmom (HR ICP-MS). Mjerjenje je provedeno u profiliranim uzorcima riječne vode (promjer pora 0,45 µm), u razgrađenim homogenatima jetrenog tkiva (ukupne koncentracije u jetrima) te u razgrađenim citosolima jetri, dobivenima centrifugiranjem homogenata na 50,000×g (citolske koncentracije u jetrima). Iz omjera citosolskih i ukupnih koncentracija metala i metaloida u jetrima pastrve izračunat je njihov postotni udio u netopljivoj, citosolskoj frakciji jetri.

Raspodjela metala i metaloida među citosolskim biomolekulama različitih molekulske masa analizirana je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s isključenjem po veličini (SEC-HPLC, kolona Superdex™ 200 10/300 GL) i HR ICP-MS-a.

Za izučavanje unutarstanične raspodjele metala u jetrima pastrve ciljano je odabran jedan, po tri sa svake postaje, na način da se koncentracije akumuliranih metala/metaloida u jetrima odabranih jedinki s različitim postajama što je moguće više međusobno razlikuju, kako bi bilo moguće odrediti razlike u unutarstaničnoj raspodjeli metala/metaloida pri različitim razinama njihove akumulacije u jetrima pastrva.

Rezultati i rasprava

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

Tablica 1. Koncentracije otopljenih metala/metaloida u vodi rijeke Krke na dvjema postajama uzorkovanja (n=3).

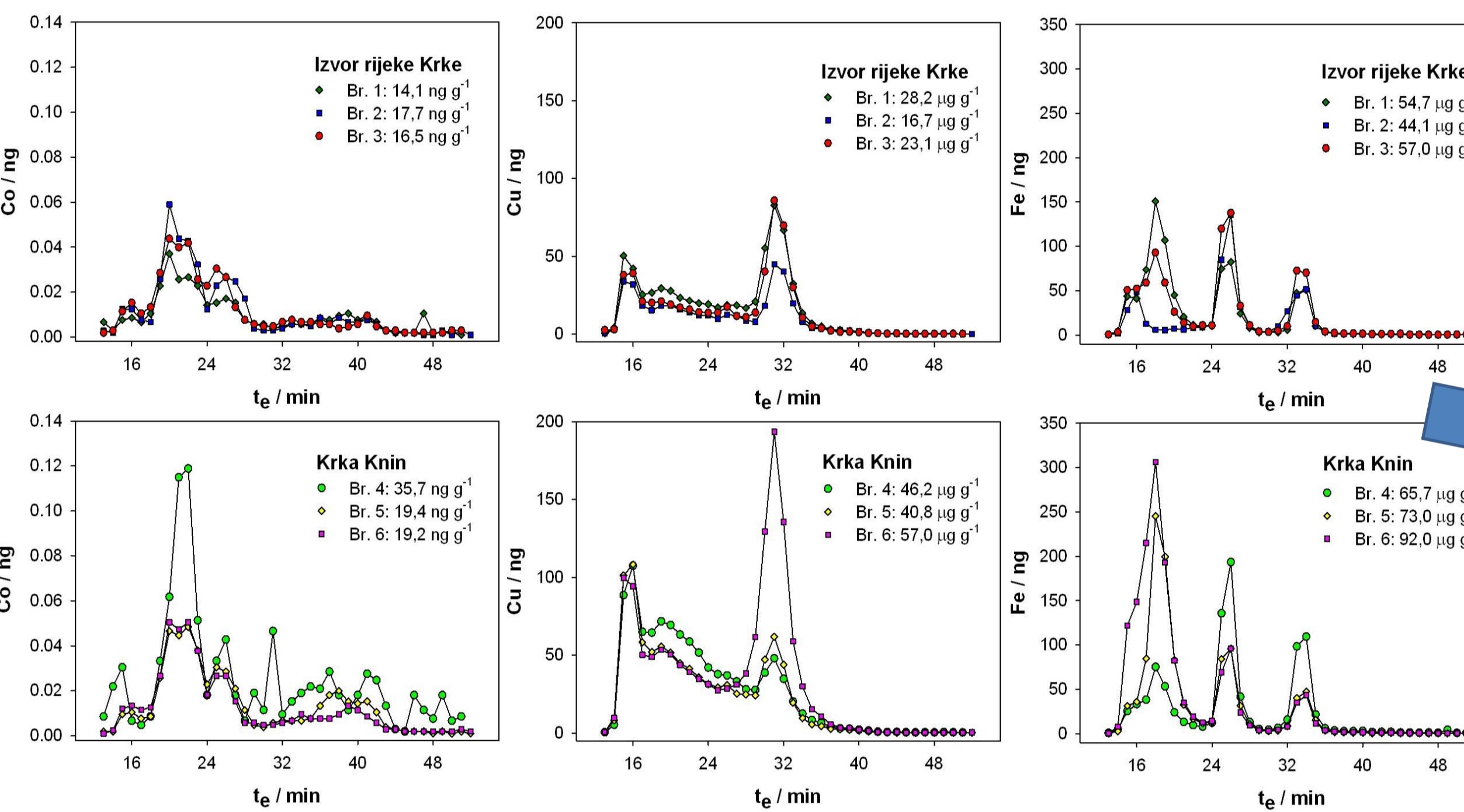
Analiza onečišćenja riječne vode ukazala je na umjereni povišene koncentracije otopljenih metala Co, Fe, Mn, Mo i Zn na postaji nizvodno od Knina, dok su ostali elementi bili usporedivi na objema postajama. Utvrđene razlike ukazuju na antropogeni utjecaj na rijeku Krku nizvodno od grada Knina, no u odnosu na druge rijeke u Hrvatskoj i na postojeću regulativu još uvijek se radi o vrlo blagom onečišćenju riječne vode.

Tablica 2. Postotna zastupljenost Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Se, Zn, Cd i Tl u topljivim frakcijama jetri pastrva ulovljениh na dvjema postajama uzorkovanja.

Element	Krka izvor / %	Krka Knin / %
Co	86,8±2,6	69,2±23,3
Cu	61,6±7,7	55,7±6,8
Fe	65,1±20,5	46,0±12,1
Mn	70,0±4,0	54,8±12,5
Mo	59,2±2,0	49,7±11,3
Se	82,0±12,5	71,3±5,7
Zn	65,6±2,5	67,4±3,4
Cd	93,5±3,1	88,2±9,0
Tl	63,6±13,3	49,6±7,4

Najveća zastupljenost u citosolskoj frakciji, koja sadrži razne biomolekule, lizosome i mikrosome, utvrđena je za Cd (>80%) te nešto manje za Co, Se, Zn, Cu i Mn (50-80%). Metali Tl, Fe i Mo u visokom su postoku (čak do 60%) zastupljeni u netopljivoj frakciji, koja sadrži stanične membrane, granule i mitohondrije.

Većini esencijalnih elemenata pri povećanoj akumulaciji u jetrima povećava se zastupljenost u netopljivoj frakciji kao znak njihove vjerojatne detoksikacije, dok je obrnuto u slučaju nesencijalnih elemenata Cd i Tl.

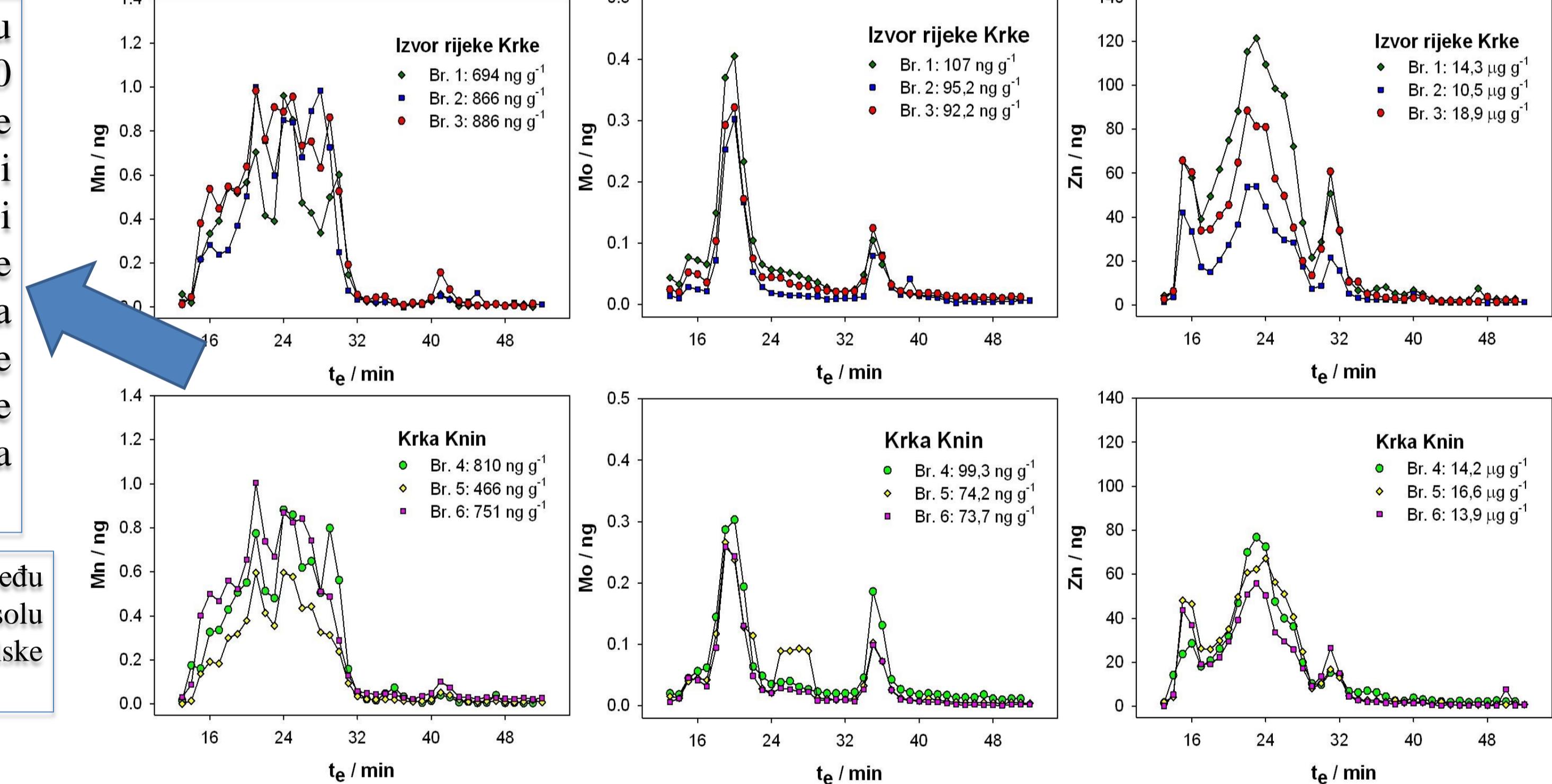


Analizom raspodjele metala/metaloida među citosolskim biomolekulama različitih molekulske masa potvrđeno je eluiranje kobalta u području biomolekula visokih molekulske masa (>100 kDa), eluiranje bakra u području biomolekula čija molekulska masa i retencijsko vrijeme odgovaraju metalotioneinima te eluiranje željeza u području biomolekula visokih molekulske masa, koje obuhvaća molekulske masu i retencijsko vrijeme feritina, proteina koji služi za pohranu željeza.

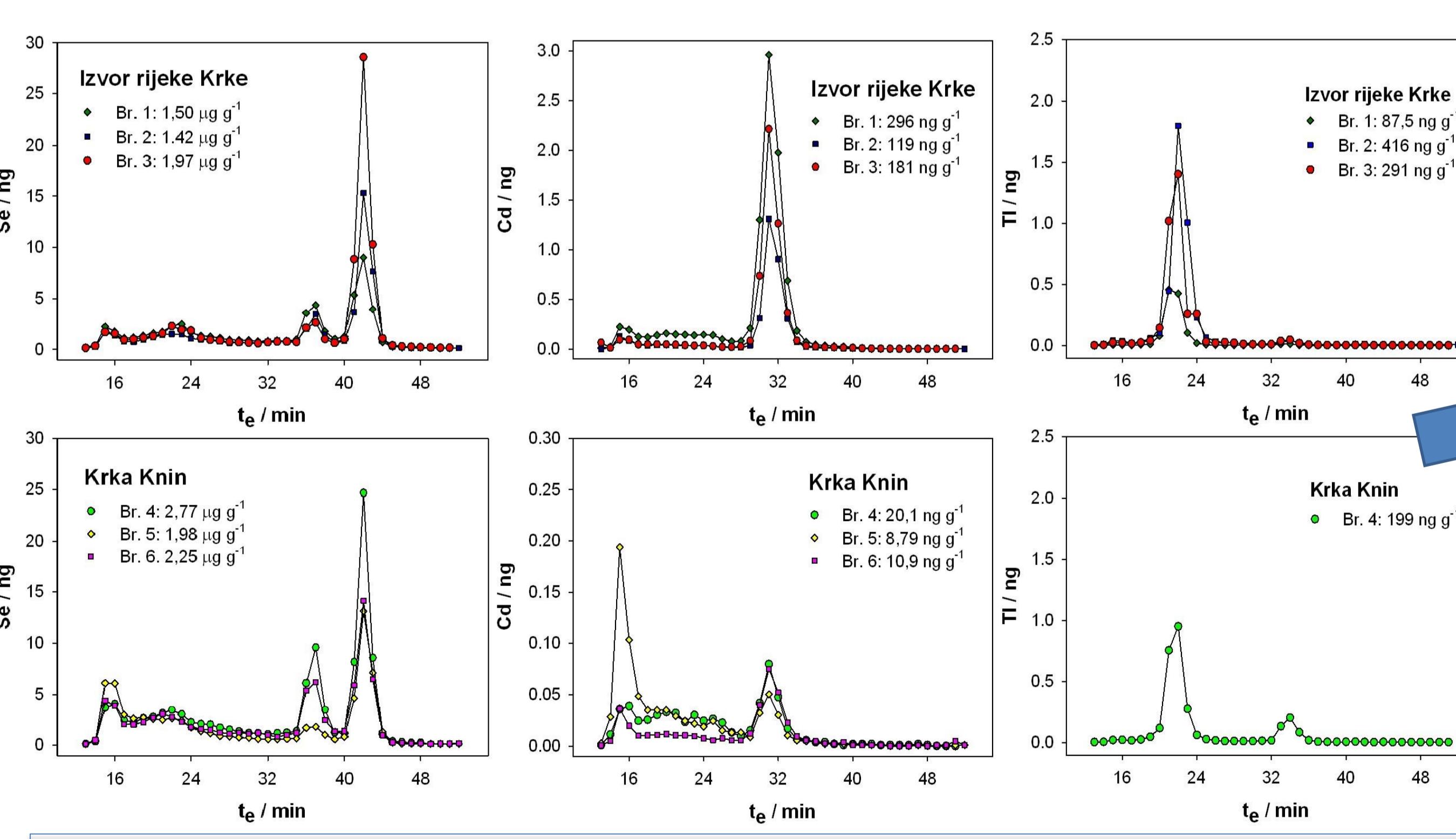
Slika 3. Profili raspodjele Co, Cu i Fe među biomolekulama različitih molekulske masa u citolu jetri pastrva. Na slikama su naznačene i citosolske koncentracije analiziranih elemenata (ng g⁻¹).

Potvrđeno je eluiranje mangana i cinka u širokom području molekulske mase od 10 do 1.000 kDa, koje obuhvaća molekulske mase transportnih proteina albumina i transferina te niza enzima u kojima ovi metali sudjeluju kao kofaktori, eluiranje cinka u području biomolekula čija molekulska masa i retencijsko vrijeme odgovaraju metalotioneinima te eluiranje molibdena u području biomolekula visokih molekulske mase (>100 kDa).

Slika 4. Profili raspodjele Mn, Mo i Zn među biomolekulama različitih molekulske mase u citolu jetri pastrva. Na slikama su naznačene i citosolske koncentracije analiziranih elemenata (ng g⁻¹).



Potvrđeno je eluiranje selema u području biomolekula jako niskih molekulske mase, ispod 5 kDa, koje obuhvaća molekulske mase poznatih selenoproteina, selenoneina i selenometionina, koji sudjeluju u obrani organizma od oksidativnog stresa, eluiranje kadmija u području biomolekula čije retencijsko vrijeme odgovara metalotioneinima te eluiranje talija u području biomolekula molekulske mase od 60 do 300 kDa.



Zaključak
Prikazani rezultati prvi su korak prema identifikaciji proteina i drugih biomolekula koje sudjeluju u metabolizmu i detoksikaciji metala i metaloida u jetrima pastrva i koje predstavljaju potencijalne biomarkere izloženosti i učinaka metala.