

# Utjecaj metabolita mikroalgi *Pseudo-nitzschia* na parametre oksidacijskog stresa stanica krvi

---

**Kuralić, Melissa**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:568386>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-12**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Melissa Kuralić**

**Utjecaj metabolita mikroalgi *Pseudo-nitzschia* na  
parametre oksidacijskog stresa stanica krvi**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Stanična biologija s genetikom Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmaceutsku botaniku pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Mirte Smodlake Tanković iz Centra za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković u Rovinju i prof. dr. sc. Ane-Marije Domijan sa Zavoda za farmaceutsku botaniku Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Zahvaljujem mentorici Mirti Smodlaci Tanković na stručnome vodstvu u izradi ovog diplomskog rada.

Od sveg srca hvala mojoj dragoj prof. dr. sc. Ana-Mariji Domijan ne samo na pomoći pri izradi diplomskoga rada, već i na svim prekrasnim satima koje smo provele zajedno u laboratoriju i van njega. Hvala joj što je vjerovala u mene i kad ja nisam i što sam joj se u svako doba dana i noći mogla obratiti za pomoć koja mi je u najkraćem roku bila i pružena.

Zauvijek hvala.

Hvala mojim roditeljima, bratu i sestri što su mi bili podrška kako kroz cijelo školovanje, tako i kroz cijeli život.

Hvala svim mojim prijateljima na vremenu, energiji i uspomenama koje su mi poklonili.

Najveće hvala Franu, što je bio uz mene svaku minutu izrade ovoga rada. Hvala mu na svom razumijevanju koje je imao za mene i moje učenje i još više mu hvala za svako nerazumijevanje i traženju pažnje i za sebe. Hvala mu što mi je dao smisao.

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
1.1. DIJATOMEJE .....	2
1.1.1. <i>Pseudo-nitzschia</i> .....	2
1.1.2. Domoična kiselina.....	3
1.2. OKSIDACIJSKI STRES .....	5
1.2.1. Glutation .....	6
1.2.2. Lipidna peroksidacija.....	7
1.2.3. Oksidacijsko oštećenje proteina.....	9
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	10
3. MATERIJALI I METODE .....	12
3.1. KEMIKALIJE .....	13
3.2. OPREMA.....	13
3.2.1. UV-Vis spektrofotometar.....	14
3.3. BIOLOŠKI POKUS .....	15
3.4. METODE.....	17
3.4.1. Određivanje koncentracije GSH .....	17
3.4.2. Određivanje koncentracije MDA .....	19
3.4.3. Određivanje koncentracije proteinskih karbonila .....	21
3.5. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	23
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	24
4.1. GLUTATION .....	25
4.2. MALONDIALDEHID.....	27
4.3. PROTEINSKI KARBONILI.....	28
5. ZAKLJUČCI.....	31
6. POPIS KRATICA .....	33
7. LITERATURA.....	35
8. SAŽETAK / SUMMARY .....	40
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD	

# **1. UVOD**

## 1.1. DIJATOMEJE

Dijatomeje su fotosintetski aktivne jednostanične eukariotske mikroalge. Pripadaju odjelu Crysophyta, carstvo Protista. Sveprisutne su te se nalaze u kopnenim, slatkovodnim i morskim ekosustavima. Pripisuje im se oko 25 % svjetske primarne proizvodnje kisika (Smetacek, 1999).

Glavna karakteristika dijatomeja je da nemaju staničnu stjenku već je stanica obavijena staklenom ljušturicom, frustulom, građenom od silicijevog dioksida. Osim kremena, u frustuli se nalaze proteini, polisaharidi i lipidi. Frustula se sastoji od dvije polovice. Gornja, veća polovica naziva se epiteka, dok se donja i manja polovica zove hipoteka. S obzirom na simetriju stanice dijatomeje se dijele u dva reda:

- \* Centricae – radijalno su simetrične i uglavnom se nalaze u planktonu
- \* Pennales – bilateralno su simetrične i prevladavaju u bentosu.

Razmnožavaju se spolno i nesporno, a u nepovoljnim uvjetima imaju sposobnost stvaranja spora (Marić Pfannkuchen, 2013).

U istraživanjima koja su proveli Viličić i sur. (2009) i Godrijan i sur. (2013) pokazano je da su u sjevernom Jadranu glavni predstavnici zajednice dijatomeja rodovi: *Chaetoceros*, *Pseudo-nitzschia*, *Proboscia*, *Rhizosolenia*, *Pseudosolenia*, *Cerataulina*, *Leptocylindrus* i *Thalassionema*. Zabilježena je sezonska varijacija pojedinih vrsta ovisno o hranjivim tvarima i temperaturi mora (Marić i sur., 2012). U sjevernom Jadranu dijatomeje dominiraju u veljači, srpnju i rujnu, a njihova dominacija često je praćena pojavom sluzavih agregata koji se pojavljuju u kasno proljeće i početkom ljeta (Marić i sur., 2012; Totti i sur., 2000).

### 1.1.1. *Pseudo-nitzschia*

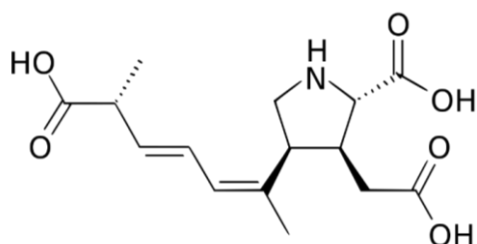
Vrste roda *Pseudo-nitzschia* nalaze se u gotovo svim morskim i estuarijskim ekosustavima. Trenutno je poznato 57 vrsta iz tog roda (Guiry i Guiry, 2022). U sjevernom Jadranu prisutne su tijekom čitave godine. Njihova najveća koncentracija zabilježena je u jesenskom razdoblju (Marić i sur., 2011; Godrijan i sur., 2013). Važan su primarni proizvođač kisika te su u bazi hranidbenoga lanca. Služe kao hrana različitim organizmima, od heterotrofnih dinoflagelata do riba i sisavaca koji se hrane planktonom (Marić Pfannkuchen, 2013).

*Pseudo-nitzschia* je potencijalno toksičan rod dijatomeja. Naime, u određenim uvjetima pojedine vrste roda *Pseudo-nitzschia* izlučuju domoičnu kiselinu (DK). Za 26 vrsta iz tog roda dokazana je mogućnost sinteze DK (Bates i sur., 2018). Vrste poznate u Jadranu su *P. calliantha*, *P. delicatissima*, *P. fraudulenta*, *P. mannii*, *P. pseudodelicatissima*, *P. pungens* i *P. subfraudulenta* i one su sve osim *P. mannii* potencijalno toksične jer proizvode DK (Marić Pfannkuchen, 2013; Bates i sur., 2018).

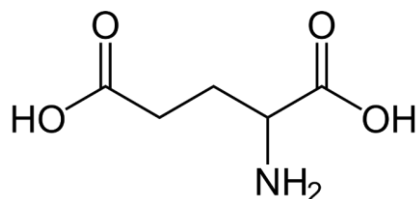
### 1.1.2. Domoična kiselina

DK je aminokiselina koja sadrži tri karboksilne skupine, pirolidinski prsten i (Z,E)-konjugirani dienski postranični lanac (Falk i sur., 1991; Maeno i sur., 2018). Topljiva je u vodi. Kemijska struktura DK prikazana je na slici 1a. Osim pojedinih vrsta roda *Pseudo-nitzschia* DK mogu proizvesti i neki drugi morski organizmi kao što su primjerice crvena alga *Chondria armata* (Pulido, 2008).

a)

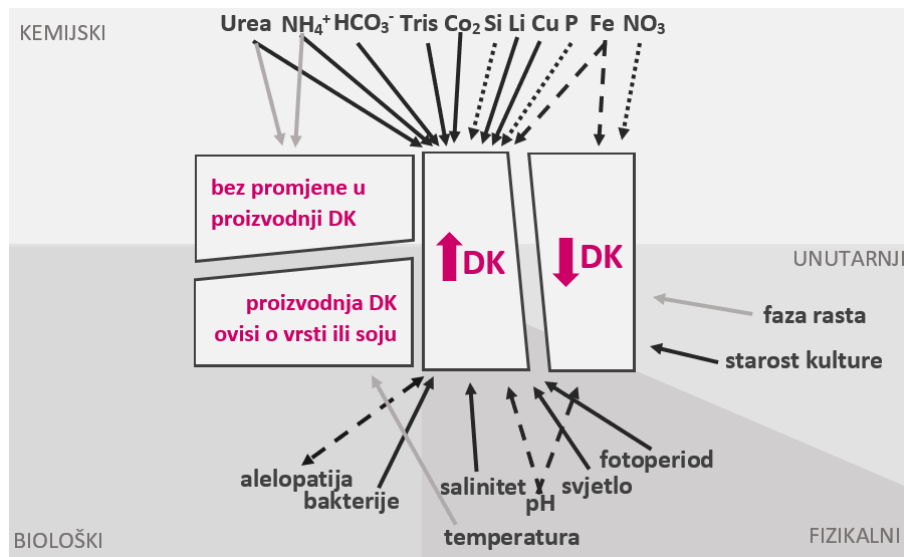


b)



**Slika 1.** Kemijska struktura: a) domoične kiseline; b) glutaminske kiseline (preuzeto s Wikipedije, uz dopuštenje izdavača)

Način na koji organizmi sintetiziraju DK još nije u potpunosti rasvijetljen. Provedena istraživanja dokazuju da je tijekom proizvodnje DK značajno usporen rast *Pseudo-nitzschia*, što potvrđuje da je za sintezu DK potrebna energija (Bates i sur., 1998; Bates i Trainer, 2006) te da biosinteza DK zahtijeva visoku razinu energije u stanici (Pan i sur., 1996). Utvrđeni su različiti biološki, kemijski i fizikalni čimbenici koji utječu na *Pseudo-nitzschia* i njihovu sposobnost sinteze DK (Slika 2).



**Slika 2.** Biološki, kemijski, fizikalni i unutarnji čimbenici koji djeluju na proizvodnju DK kod *Pseudo-nitzschia*. Crne strelice označavaju čimbenike koji potiču sintezu DK. Crne isprekidane strelice označavaju čimbenike koji smanjuju sintezu DK. Sive strelice označavaju čimbenike koji ovise o vrsti *Pseudo-nitzschia*. Točkasto isprekidane strelice označavaju čimbenike za koje postoje oprečni podatci u literaturi (autor Melissa Kuralić)

Potvrđeno je da toksične vrste iz roda *Pseudo-nitzschia* izlučuju DK tijekom cvjetanja. Životinje koje filtriraju morsku vodu, kao što su primjerice školjkaši, akumuliraju izlučenu DK koja se koncentrira u probavnom sustavu s minimalnim prijenosom na okolna tkiva. DK nije toksična za neke organizme poput školjkaša ili riba (Marić Pfannkuchen, 2013). DK se može nakupiti i u organizmima koji se ne hrane filtriranjem vode. Pronađena je i u tkivima organizama viših trofičkih razina te kod organizama koji se hrane detritusom i žive na dnu mora (Powell i sur., 2002). Pretpostavlja se da čestice zaostale nakon cvjetanja tonu na dno gdje se zadržavaju u duljem vremenskom razdoblju. Na taj se način organizmi koji žive pri dnu mora izlažu DK. Toksin se prenosi na višu kariku hranidbenog lanca kada su primarni potrošači koji u svom probavnom sustavu imaju DK pojedeni od viših potrošača (Marić Pfannkuchen, 2013).

DK je snažni neurotoksin iz skupine kainata (Lelong i sur., 2012; Clayden i sur., 2005). Analog je L-glutaminske kiseline (Slika 1b) (Solter i Beasley, 2013). Upravo zbog kemijske sličnosti s L-glutaminskom kiselinom, DK djeluje na živčani sustav kralježnjaka. Ulaskom u organizam kralježnjaka, DK preuzima ulogu L-glutaminske kiseline te se vezuje za N-metil-D-aspartat (NMDA) receptore u središnjem živčanom sustavu (SŽS) čak i do 100 puta brže od L-glutaminske kiseline (Lelong i sur., 2012). Za razliku od L-glutaminske kiseline, DK se trajno



veže za receptore na neuronima što produljuje depolarizaciju neurona i dolazi do nakupljanja kalcija u njihovoj neposrednoj blizini. Posljedično, dolazi do bubrenja neurona u hipotalamusu i amigdali, a potom i do njihova odumiranja. Kao rezultat toga, simptomi trovanja s DK u ljudi su glavobolja, smetenost i amnezija, zbog čega se trovanje i naziva amnezijsko trovanje školjkašima (engl. *Amnesic Shellfish Poisoning* - ASP).

U mnogim zemljama širom svijeta pa tako i u Hrvatskoj uzgajališta školjkaša su pod stalnim monitoringom zbog mogućeg trovanja toksinima iz školjkaša. Antidot zasad nije poznat.

## 1.2. OKSIDACIJSKI STRES

Ključni koraci u dobivanju energije za sve aerobne organizme odvijaju se pomoću oksidacije kisika iz atmosfere, popraćeni s višestrukim koracima redukcije. Stoga se može reći da se u svakoj stanici aerobnih organizama odvijaju oksido-redukcijske reakcije. Oksidacijski stres je poremećaj nastao pomicanjem ravnoteže oksido-redukcijskih reakcija u smjeru oksidacije, unatoč višestrukim regulacijskim mehanizmima. Kao adaptivni odgovor na uvjete koji bi mogli biti štetni za organizam razvio se anti-oksidacijski sustav koji omogućuje obranu od oksidacijskog stresa (Oliveira i sur., 2018). Stoga se oksidacijski stres može definirati i kao disbalans u koncentraciji između pro-oksidansa i anti-oksidansa u korist pro-oksidansa (Sies, 1997; Valko i sur., 2006).

Slobodni radikali su pro-oksidansi koji mogu nastati endogeno prilikom metaboličkih reakcija ili egzogeno, izazvani utjecajem nekih vanjskih čimbenika, kao što je primjerice dim cigarete. Najistaknutiji slobodni radikali su radikali kisika (Sies, 1997).

Organizam je razvio više razina za obranu od pro-oksidansa pa time i od oksidacijskog stresa. Jedna razina je sinteza proteina koji djeluju kao nosači te vežu metale koji su poznati pro-oksidansi. Takvi proteini su: albumin, feritin, transferin, mioglobin, metalotionin te ceruloplazmin. Također, organizam može sam sintetizirati anti-oksidanse, a moguće ih je i unijeti hranom. Takvi anti-oksidansi su: koenzim Q10 (ubikvinon) te vitamin A i E (retinol, tokoferol) i njihovi derivati (karoten, likopen). Oni su vodonetopljivi i važni su za obranu lipidnih dijelova stanica (Valko i sur., 2006). Vitamin C (askorbinska kiselina), glutation (GSH) te različiti polifenoli, flavonoidi i lipoična kiselina su vodotopljivi anti-oksidansi, smješteni u citosolu i izvanstaničnoj tekućini (Sies, 1997). Svi oni svojim elektrondonorskim ponašanjem neutraliziraju slobodne radikale (Vertuani i sur., 2004). Još jedan način prevencije

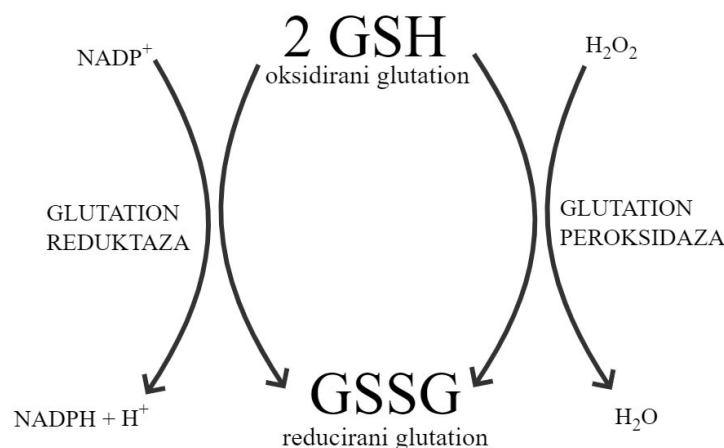
oksidacijskog stresa je pomoću enzima, među kojima su poznati primjeri glutation reduktaza, superoksid dismutaza, katalaza te peroksidaze (Sies, 1997).

Stanje oksidacijskog stresa potencijalno vodi do daljnjih oštećenja u stanici kao što su oštećenja strukture i funkcije makromolekula (lipidi, proteini, DNA). Zbog tih oštećenja dolazi do gubitka fluidnosti staničnih membrana, inaktiviranja membranskih enzima, poremećaja staničnih signalnih puteva, ubrzane proteolize te preranog starenja i smrti stanica (Dean i sur., 1997).

### 1.2.1. Glutation

GSH je tripeptid (L- $\gamma$ -glutamilcisteinilglicin) koji se nalazi u gotovo svakoj eukariotskoj stanici i najrašireniji je unutarstanični tiol. Uglavnom je prisutan u citosolu, a manjim se dijelom nalazi u mitohondrijima i endoplazmatskom retikulumu. U organizmu postoji u reduciranom (GSH) i oksidiranom (GSSG) obliku (Slika 3), a može biti i vezan za proteine. Svi oblici zajedno čine ukupni stanični glutacion pri čemu oksidirani disulfidni oblik (GSSG) kod zdravih osoba uglavnom ne prelazi 10 % od ukupne vrijednosti glutaciona u organizmu.

GSH se sintetizira u citosolu, pretežito u jetri, iz glutamata, cisteina i glicina pomoću citosolnih enzima  $\gamma$ -glutamilcistein-sintetaze ( $\gamma$ -GCS) i GSH-sintetaze uz utrošak energije iz ATP-a. Osim *de novo* sintezom, može se i regenerirati redukcijom oksidiranog GSSG u GSH uz NADPH u ulozi koenzima (Pizzorno, 2014).



**Slika 3.** Ravnoteža između reduciranog (GSH) i oksidiranog oblika glutaciona (GSSG) (autor Melisa Kuralić)

U organizmu je GSH reducens, anti-oksidans, služi kao izvor cisteina, štiti od lipidne peroksidacije te sudjeluje u detoksifikaciji endogenih i egzogenih tvari uključujući slobodne radikale i teške metale. Važan je za staničnu proliferaciju i u razvoju stanica zbog svoje uloge u sintezi nukleinskih kiselina, proteina, održavanja enzima u aktivnoj formi te čuvanja integriteta stanične membrane (Świergosz-Kowalewska i sur., 2006). GSH je važna komponenta različitih enzimskih sustava oksido-reduktaza, a za visoki redoks potencijal zaslužna je tiolna (-SH) skupina cisteina (Pastore i sur., 2003). Također, važnu ulogu ima i u regeneraciji vitamina C i E te u transportu žive izvan stanica i mozga (Pizzorno, 2014).

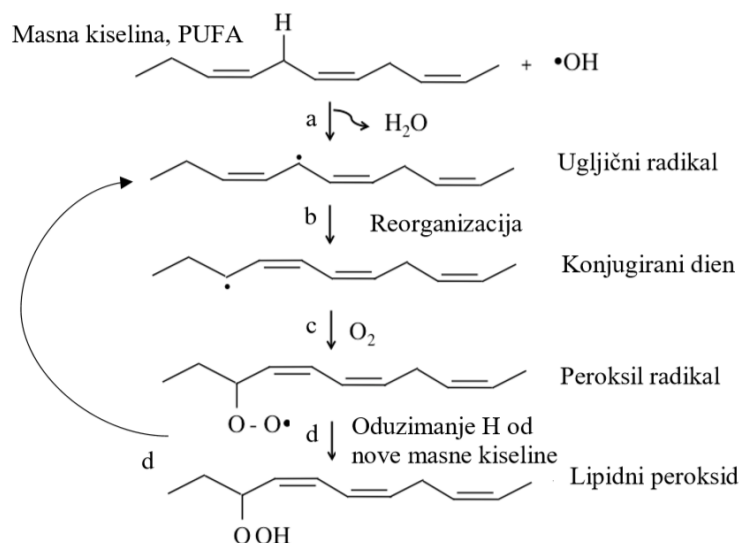
Dugotrajnim i kontinuiranim izlaganjem egzogenim uzročnicima stresa postupno se smanjuje količina GSH u organizmu, što uzrokuje i smanjenje učinkovitosti anti-oksidacijske zaštite, a povećava se vjerojatnost nastajanja oksidacijskog oštećenja. Iz tog se razloga snižena koncentracija GSH može smatrati dobrim pokazateljem izloženosti organizma oksidacijskom stresu (Pizzorno, 2014; Halliwell i Gutteridge, 2015).

### 1.2.2. Lipidna peroksidacija

Proces oksidacijskog oštećenja membranskih lipida, uglavnom polinezasićenih masnih kiselina (engl. *Polyunsaturated fatty acids* - PUFA) prisutnih u membranama, naziva se lipidna peroksidacija (Reuben, 1998). Zbog činjenice da su membranski fosfolipidi prva meta slobodnih radikala/oksidansa, lipidna peroksidacija je najbolje proučeni proces oksidacijskog stresa.

Lipidna peroksidacija odvija se u nekoliko koraka i postupno dovodi do degradacije lipida stanične membrane. Inicijacija je prvi korak lipidne peroksidacije i odvija se u prisutnosti slobodnih radikala, najčešće hidroksilnog radikala (OH•) ili hidroperoksilnog radikala (HO<sub>2</sub>•). Slobodni kisikov radikal iz PUFA-e oduzima ugljiku do dvostruke veze vodikov radikal (H•) kako bi spario svoje elektrone. Tako od masne kiseline nastaje ugljični radikal (R<sub>1</sub>-HC•-R<sub>2</sub>) (Slika 4a). Nastali radikali nastoje se stabilizirati reorganizacijom molekula, oblikujući konjugirane diene (Slika 4b). Potom slijedi propagacija koja je drugi korak lipidne peroksidacije. Ugljični radikal masne kiseline (R<sub>1</sub>-HC•-R<sub>2</sub>) reagira s kisikom (O<sub>2</sub>), koji se veže na njega i stvara lipidni peroksilni radikal (R<sub>1</sub>-HCOO•-R<sub>2</sub>) (Slika 4c). On, kao i ostali radikali, napada drugu PUFA kako bi sebe stabilizirao u lipidni peroksid (R<sub>1</sub>-HCOOH-R<sub>2</sub>) (Slika 4d), a od napadnute PUFA ponovno nastaje ugljični radikal (R<sub>1</sub>-HC•-R<sub>2</sub>). Reakcija je lančana jer svaki

put kad radikal napadne susjednu lipidnu molekulu nastaje novi radikal. Na taj se način proces lipidne peroksidacije širi po staničnoj membrani.



**Slika 4.** Lipidna peroksidacija PUFA-e u fazama inicijacije i propagacije (preuzeto i prilagođeno prema Jairam i sur., (2012) uz dopuštenje izdavača)

Taj se ciklus produkcije lipidnih peroksil radikala ( $\text{R}_1\text{-HCOO}\bullet\text{-R}_2$ ) nastavlja sve dok se ne akumulira dovoljna količina da dva takva radikala reagiraju međusobno sparivanjem svojih nesparenih elektrona, pritom stvarajući manje štetan organski peroksid ( $\text{R}_1\text{R}_2\text{HC-OO-CHR}_3\text{R}_4$ ) i molekulu kisika ( $\text{O}_2$ ) reakcijom terminacije. Neki od krajnjih produkata procesa lipidne peroksidacije različiti su srednjelančani i kratkolančani karbonili te aldehidi, među kojima je i malondialdehid (MDA). Ti finalni produkti su stabilniji od slobodnih radikala, ali su zbog prisutstva aldehidne skupine u strukturi i dalje reaktivni. Stoga se mogu širiti po stanici te je oštećuju na mjestima udaljenim od mjesta inicijalnog oštećenja membrane i nastanka radikala. Kratkolančani produkt MDA dovoljno je stabilan da u stanici može „preživjeti“ dovoljno dugo da ga se može detektirati. Zato služi kao biomarker lipidne peroksidacije i oksidacijskog stresa općenito. Lipidna peroksidacija i nastanak kratkolančanih aldehida i ketona uzrokuje smanjenje fluidnosti stanične membrane, remeti transport iona i izmjenu fosfolipida između dvosloja. U konačnici povećava se propusnost membrane za neke tvari, kao što je primjerice kalcij, koji pri povećanim koncentracijama aktivira nukleaze i degradira molekulu DNA. Kroz fragmentiranu membranu stanične sastavnice izlaze u međuprostor i aktiviraju imunski odgovor i upalu, a naposljetku stanica nekrotički umire uz oštećenje okolnog tkiva (Gill i Tuteja, 2010; Križanac, 2003; Dean i sur., 1997).

Anti-oksidansi kao što su vitamin E i C, GSH i anti-oksidacijski enzimi igraju vrlo važnu ulogu u „hvatanju“ lipidnih radikala u fazama inicijacije i propagacije prije nego što oni u većoj mjeri naštetite stanicima. U stanju oksidacijskog stresa anti-oksidansi su često kompromitirani, a razina produkata lipidne peroksidacije raste (Štefan i sur., 2007).

### **1.2.3. Oksidacijsko oštećenje proteina**

Proteini su također podložni oksidaciji od strane slobodnih radikala. Oksidacija proteina manifestira se stvaranjem proteinskih karbonila (PC) – ketona i aldehida na mjestima gdje prethodno nisu bili te stvaranjem mostova među aminokiselinskim ostacima proteina (Dalle-Donne i sur., 2003). Također, do nastanka oksidacijskog oštećenja proteina može doći i oksidacijskom fragmentacijom polipeptidnog lanca ili vezanjem aldehida nastalih u lipidnoj peroksidaciji kao i promjenom električnog naboja (Sharma i sur., 2012).

Konkretno PC nastaju vezanjem kisika na atom ugljika u primarnim ili sekundarnim modifikacijskim reakcijama. Primarna modifikacija podrazumijeva izravno mijenjanje originalne strukture aminokiselina kao posljedicu oksidacije potpomognute metalima kao katalizatorima, ozonom, zračenjem ili jakim oksidansima poput hipoklorne kiseline ili peroksnitrita. Metalni kationi poput bakra i željeza vežu se za specifična mjesta na proteinu te uz pomoć vodikovog peroksida ili kisika transformiraju bočne lance nekih aminokiselina na proteinu u karbonile. To se najčešće događa na lizinskim, argininskim i prolinskim ostacima. Sekundarna modifikacija nastaje kovalentnom reakcijom proteina i specifičnih reaktanata nakon koje na proteinima ostaju vezane karbonilne skupine. Takvi reaktanti su primjerice dim cigarete i različiti aldehidi.

Zbog nastanka PC sam protein gubi svoju konformaciju pa se mijenja i gubi svoju funkciju i povećano je podložan proteolizi. Sve to može biti uzrokom ubrzanog katabolizma i smanjenjem poluvijeka samog proteina, smanjene enzimske aktivnosti ili izmijenjene antigeničnosti (Dean i sur., 1997).

PC su stabilni pa su samim time i pogodni za detekciju te se praćenjem njihove koncentracije može pratiti i prisustvo oksidacijskog stresa (Castegna i sur., 2003).

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

*Pseudo-nitzschiae* su fotosintetski aktivne jednostanične eukariotske mikroalge. Nalaze se u gotovo svim morskim i estuarijskim ekosustavima te čine bazu hranidbenog lanca (Marić Pfannkuchen, 2013). U sjevernom Jadranu prisutne su tijekom čitave godine. Trenutno je poznato 57 vrsta mikroalgi iz roda *Pseudo-nitzschia*, a za 26 vrsta je potvrđeno da su potencijalno toksične za ljudsko zdravlje jer mogu (u određenim uvjetima temperature, saliniteta i pH) proizvoditi neurotoksin DK (Bates i sur., 2018). Nastala DK prehranbenim lancem dolazi i do čovjeka. Zbog svoje kemijske strukture kojom je nalik L-glutaminskoj kiselini, DK se u kralježnjaka veže za NMDA receptore SŽS čime se produljuje depolarizacija neurona, dolazi do bubrenja neurona te u konačnici i njihovog odumiranja (Lelong i sur., 2012). U ljudi, trovanje DK naziva se amnezijско trovanje školjkašima, a simptomi trovanja su glavobolja, smetenost i amnezija. Iako je mehanizam djelovanja DK na neurone (ciljne stanice) poznat, učinak DK na ostale stanice ljudskog organizma tzv. ne-ciljne stanice slabo je istražen. U zdravome organizmu održava se ravnoteža između pro-oksidansa i anti-oksidansa. Endogene promjene kao i izloženost vanjskim čimbenicima mogu dovesti do poremećaja te ravnoteže što se naziva oksidacijskim stresom. Oksidacijski stres povezuje se sa starenjem i s nastankom niza bolesti poput kardiovaskularnih, neurodegenerativnih bolesti te s nastankom raka (Sies, 1997; Oliveira i sur., 2018).

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati učinak metabolita *Pseudo-nitzschia* na parametre oksidacijskog stresa u ne-ciljnim ljudskim stanicama te utvrditi postoji li razlika u odgovoru između ispitivanih vrsta *Pseudo-nitzschia*. Kao ne-ciljne ljudske stanice korištene su lako dostupne stanice krvi.

U prvom dijelu istraživanja, uzgojene su tri vrste *Pseudo-nitzschia* koje obitavaju u Jadranu i za koje je utvrđeno da izlučuju DK: *P. delicatissima*, *P. pseudodelicatissima* i *P. calliantha* te je sakupljen medij u kojemu su rasle s pretpostavkom da se u njemu nalaze njihovi metaboliti koje one i inače izlučuju u svoj okoliš. Potom su uzorci krvi zdravih dobrovoljnih davatelja tretirani s medijem u kojem su rasle tri ispitivane vrste, *P. delicatissima*, *P. pseudodelicatissima* i *P. calliantha* kroz 4 i 24 sata. Nakon tretmana s medijem u kojem su rasle ispitivane vrste *Pseudo-nitzschia* u krvi su praćeni parametri oksidacijskog stresa: GSH, kao mjera anti-oksidacijske obrane, MDA, kao pokazatelj lipidne peroksidacije te PC, koji su pokazatelji oksidacijskog oštećenja proteina.

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



### 3.1. KEMIKALIJE

U istraživanju su korištene sljedeće kemikalije:

- kalijev dihidrogenfosfat,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Lach-Ner, Neratovice, Češka
- dikalijev hidrogenfosfat,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , Lach-Ner, Neratovice, Češka
- 2-tiobarbituratna kiselina, TBA, Sigma Chemical Co, St. Louis, SAD
- trikloroetena kiselina, TCA, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- 5, 5'-ditiobis-2-nitrobenzoat, DTNB, Sigma Chemical Co, St. Louis, SAD
- 2,4-dinitrofenilhidrazin 0,5mL  $\text{H}_2\text{O}/\text{g}$ , DNPH, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- kloridna kiselina 35 %, HCl, Lach-Ner, Neratovice, Češka
- etanol,  $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ , Kemika, Zagreb, Hrvatska
- etil-acetat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- urea, Lach-Ner, Neratovice, Češka.

Sve korištene kemikalije bile su *pro analysi* čistoće te je za pripremu otopina korištena destilirana voda.

### 3.2. OPREMA

U istraživanju je korištena sljedeća oprema:

- analitička vaga, PB 303, Mettler Toledo, Švicarska
- pH metar, HI 9025, Hana Instruments, Portugal
- miješalica, Vortex-Heidolph model REAX top, Heidolph Instruments, Schwabach, Njemačka
- centrifuga, Frontiers 5706, Ohaus, Greifensee, Švicarska
- centrifuga, Centurion, Centurion Scientific, Chichester, UK
- UV-Vis spektrofotometar, PG T70, PG Instruments, UK
- kiveta, Open-top UV-quartz cell, Agilent Technologies, CA, SAD
- magnetski miješać s grijačem MSH-A, Witeg, Wertheim, Njemačka
- termostat, TMA, Dugo Selo, Hrvatska
- inkubator za održavanje kontroliranih uvjeta od 37 °C i vlažne atmosfere s 5 %  $\text{CO}_2$  Heraeus Hera Cell 240 inkubator, Langenselbold, Njemačka.

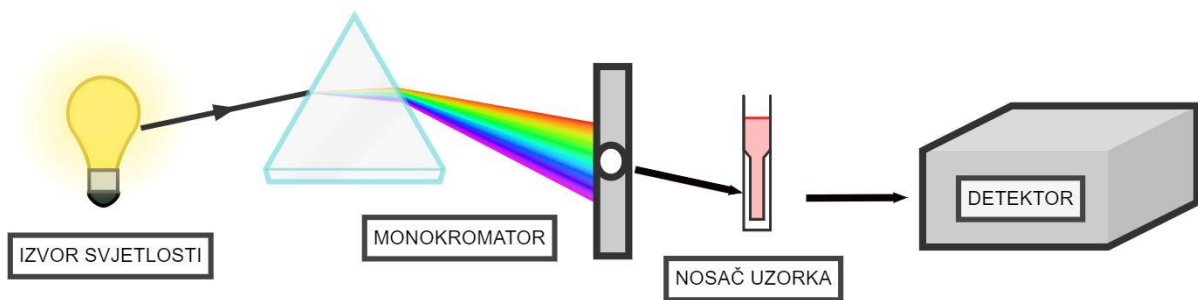
### 3.2.1. UV-Vis spektrofotometar

Koncentracije GSH, MDA i PC su određene pomoću UV-Vis spektrofotometara. UV-Vis spektrofotometar je uređaj koji analizira spektar elektromagnetskog zračenja. Sadrži optički sustav za stvaranje monokromatskog svjetla valne duljine od 190 do 800 nm i odgovarajući detektor za mjerenje apsorbancije (Nigović i sur., 2007).

Osnovni dijelovi UV-Vis spektrofotometra su:

- izvor zračenja: deuterijeva lampa za ultraljubičasto područje te živina, odnosno volframova lampa za vidljivo područje
- monokromator: optički instrument za izdvajanje zračenja uskoga područja spektra, tj. za dobivanje monokromatske svjetlosti; može biti prizma ili rešetka s ulaznom i izlaznom pukotinom
- nosač uzorka: najčešće kiveta (u UV području je važno koristiti kivetu od kvarcnog stakla)
- detektor zračenja (Watson, 1999).

Osnovni dijelovi UV-Vis spektrofotometra prikazani su na slici 5.



**Slika 5.** Shematski prikaz osnovnih dijelova UV-Vis spektrofotometra (autor Melissa Kuralić)

### Određivanje koncentracije iz očitane apsorbancije

UV-Vis spektrofotometar mjeri apsorpciju zračenja molekule u otopini. Mjera količine svjetla koju apsorbira uzorak je apsorbancija. Beer-Lambertov zakon dovodi u vezu apsorbanciju svjetla puštenog kroz otopinu određenog sastava s koncentracijom tvari ( $c$ ) u otopini i duljinom puta svjetlosti kroz otopinu ( $l$ ) i prikazuje se izrazom:

$$A = \varepsilon \times c \times l$$

pri čemu je  $\varepsilon$  - molarni apsorpcijski koeficijent (L/mol cm) konstantan za određenu tvar i valnu duljinu pri kojoj se mjeri;  $l$  - je izražen u cm, a  $c$  - u mol/L (Nigović i sur., 2007).

### **3.3. BIOLOŠKI POKUS**

#### Priprema uzoraka medija *Pseudo-nitzschia* za tretman krvi

U pokusu su korištene monoklonalne kulture morskih dijatomeja roda *Pseudo-nitzschia* iz zbirke Centra za istraživanje mora, Instituta Ruđer Bošković, Rovinj. Ispitivane vrste bile su: *P. delicatissima*, *P. pseudodelicatissima*, *P. calliantha*. Oznake ispitivanih vrsta navedene su u tablici 1.

**Tablica 1.** Vrste dijatomeja roda *Pseudo-nitzschia* ispitivane u ovom pokusu.

OZNAKA	VRSTA
PN1	CIM851 ( <i>P. delicatissima</i> )
PN2	CIM914 ( <i>P. pseudodelicatissima</i> )
PN3	CIM915 ( <i>P. calliantha</i> )

Za uzgoj morskih *Pseudo-nitzschia* (PN1, PN2 i PN3) korišten je obogaćeni medij F/2 pripremljen po Guillardu (1975). Medij se sastojao od sterilne morske vode, osnovnih hranjivih soli, metala u tragovima i vitamina. Morska voda korištena za izradu medija bila je stara najmanje 2 mjeseca i držana u mraku kako bi se reducirala aktivnost i broj živih organizama. Filtrirana je Millipore sustavom za filtraciju na membranskom filteru promjera pora 0,2  $\mu\text{m}$  kako bi se odstranile slobodne bakterije, a zatim je kuhana u mikrovalnoj pećnici 20 minuta na 100 °C. U 1 L morske vode dodano je 1 mL hranjivih soli ( $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ), mikronutrijenata (metali u tragovima) i 1 mL vitamina. Iz matične kulture ispitivanih *Pseudo-nitzschia* (PN1, PN2 i PN3) po 2 mL suspenzije stanica mikroalgi presađeno je u bočice s medijem (200 mL). Kulture *Pseudo-nitzschia* uzgajane su u komorama pod kontroliranim uvjetima s konstantnom temperaturom od 16 °C, s fotoperiodom od 12 h svjetla i 12 h tame i intenzitetom svjetlosti 4500 luxa. Svaki dan praćena je promjena stope rasta. U kasnoj eksponencijalnoj fazi rasta stanice *Pseudo-nitzschia* su uklonjene iz medija sterilnom filtracijom. Medij u kojem je uzgojena svaka pojedina vrsta je pohranjen na -80 °C do daljnje obrade.

#### Tretman krvi s uzorcima hranjivog medija u kojem su rasle *Pseudo-nitzschia*

Ispitivanje je provedeno prema OECD smjernicama (2014) na krvi dobrovoljnih davatelja koji su morali zadovoljavati potrebne preuvjete: da nisu pušači, da ne boluju ni od jedne kronične bolesti, da ne koriste nikakve lijekove i da nisu bili izloženi ionizirajućem zračenju, u dijagnostičke kao ni u terapijske svrhe, najmanje zadnjih godinu dana.

Za potrebe istraživanja dobrovoljnim je davateljima iz kubitalne vene izvađena venska krv u sterilne heparinizirane spremnike. Izvađena krv je alikvotirana po 990  $\mu\text{L}$  u Eppendorf epruvete te tretirana s 10  $\mu\text{L}$  pripremljenih uzoraka medija u kojem su rasle PN1, PN2 i PN3. U pokuse je uključen i uzorak krvi koji je tretiran morskom vodom te uzorak krvi tretiran morskom vodom i medijem u kojima rastu *Pseudo-nitzschia* koji su služili kao kontrolni uzorci (Tablica 2). Tretirani uzorci su potom pohranjeni u inkubatoru u kontroliranim uvjetima (37 °C i vlažna atmosfera s 5 %  $\text{CO}_2$ ) kroz 4 ili 24 sata. Nakon tretmana, uzorci krvi namijenjeni za određivanje koncentracije GSH i MDA pohranjeni su na -20 °C. Uzorci krvi namijenjeni mjerenju koncentracije PC nakon tretmana su centrifugirani na 5000 rpm u trajanju od 5 min te je plazma odvojena i pohranjena na -20 °C do analize. Sve analize provedene su unutar mjesec dana.

Svi pokusi provedeni su na uzorcima dvaju različitih dobrovoljnih davatelja, oba mlada zdrava muškarca. Dobrovoljni davatelji krvi potpisali su suglasnost za sudjelovanje u istraživanju te su upoznati s ciljevima istraživanja. Istraživanje je odobreno od strane Povjerenstva za etičnost eksperimentalnog rada Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada (IMI) i provedeno po načelima Helsinške deklaracije i IMI-ja.

**Tablica 2.** Prikaz tretmana krvi s uzorcima medija u kojima su rasle *Pseudo-nitzschia*.

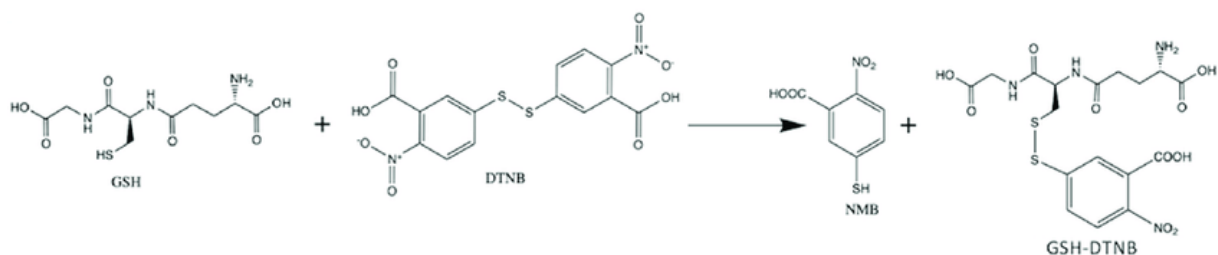
UZORAK	TRETMAN (4 sata)	UZORAK	TRETMAN (24 sata)
1	Kontrola (morska voda)	6	Kontrola (morska voda)
2	Kontrola (morska voda i medij)	7	Kontrola (morska voda i medij)
3	PN1	8	PN1
4	PN2	9	PN2
5	PN3	10	PN3

### 3.4. METODE

#### 3.4.1. Određivanje koncentracije GSH

##### 3.4.1.1. Princip metode

Pri neutralnom pH, tiolna skupina GSH reagira s DTNB te u reakciji nastaje 2-nitro-5-tiobenzoat (TNB) žutog obojenja (Slika 6). Intenzitet nastalog žutog obojenja može se izmjeriti pomoću UV-Vis spektrofotometra na valnoj duljini od 412 nm pri kojoj je apsorpcijski maksimum TNB-a, a on indirektno odgovara koncentraciji GSH u uzorku. Koncentracija GSH u uzorku se izračuna pomoću Beer-Lambertovog zakona i poznatog apsorpcijskog koeficijenta TNB (14150 L/mol cm).



**Slika 6.** Reakcija GSH i DTNB (preuzeto iz Jitčá i sur (2021) uz dopuštenje izdavača)

### 3.4.1.2. Priprema otopina

#### Priprema 5 % otopine TCA

Za pripremu 5 % TCA odvagano je 5 g TCA i prebačeno u odmjernu tikvicu od 100 mL. Nakon otapanja, odmjerna tikvica je nadopunjena s destiliranom vodom do oznake. 5 % TCA bila je potrebna za taloženje interferencija iz uzorka krvi koje bi ometale prilikom spektrofotometrijskog određivanja koncentracije GSH.

#### Priprema 0,3 mol/L K-fosfatnog pufera

0,3 mol/L K-fosfatni pufer pH 7,4 dobiven je miješanjem 0,3 mol/L  $K_2HPO_4$  i 0,3 mol/L  $KH_2PO_4$  do željenog pH. 0,3 mol/L  $K_2HPO_4$  pripremljen je tako da se odvagalo 5,226 g  $K_2HPO_4$  koji se kvantitativno prenio u odmjernu tikvicu od 100 mL, a odmjerna tikvica se nadopunila s destiliranom vodom do oznake. 0,3 mol/L  $KH_2PO_4$  pripremljen je tako da se odvagalo 4,08 g  $KH_2PO_4$  i prenijelo u odmjernu tikvicu od 100 mL koja se nadopunila s destiliranom vodom do oznake. Pripremljene otopine su se pomiješale, što se kontroliralo pH-metrom kako bi se osiguralo da dobivena otopina ima pH 7,4. 0,3 mol/L K-fosfatni pufer pH 7,4 služio je za održavanje neutralnog pH potrebnog za reakciju GSH i DTNB.

#### Priprema 0,1 mmol/L DTNB

1 mmol/L DTNB pripremljen je tako da se odvagalo 0,0396 g DTNB-a koji se prebacio u odmjernu tikvicu od 10 mL. Nakon otapanja DTNB-a u 0,3 molarnom K-fosfatnom puferu, odmjerna tikvica se nadopunila s istim puferom do oznake. Otopina se naknadno razrijedila 10 puta s 0,3 mol/L K-fosfatnog pufera pH 7,4 kako bi se dobila otopina DTNB koncentracije 0,1 mmol/L. DTNB je reagens koji služi za određivanje GSH.

### 3.4.1.3. Izvođenje pokusa

Uzorci krvi su prvo tretirani s 5 % TCA te centrifugirani 12 minuta na 5000 rpm kako bi se uklonile moguće interferencije, a koje bi ometale mjerenje. Potom je u 300  $\mu\text{L}$  dobivenog supernatanta dodano 600  $\mu\text{L}$  0,3 mol/L K-fosfatnog pufera pH 7,4 i 50  $\mu\text{L}$  0,1 mmol/L DTNB-a (Tablica 3). Reakcijska smjesa je potom promiješana te se nakon inkubacije u trajanju 5-10 minuta izmjerila apsorbanca. ApSORBANCA je izmjerena na UV-Vis spektrofotometru podešenom na valnu duljinu 412 nm. Koncentracija je izračunata pomoću apsorpcijskog koeficijenta 14150 L/mol cm te je izražena u  $\mu\text{mol/L}$ .

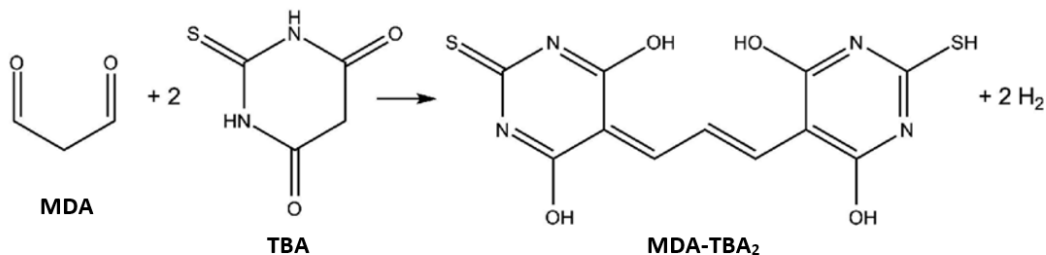
**Tablica 3.** Priprema uzoraka za određivanje koncentracije GSH pomoću UV-Vis spektrofotometra.

SLIJEPA PROBA	UZORAK
300 $\mu\text{L}$ de $\text{H}_2\text{O}$	300 $\mu\text{L}$ supernatant krvi
600 $\mu\text{L}$ 0,3 mol/L K-fosfatnog pufera, pH 7,4	600 $\mu\text{L}$ 0,3 mol/l K-fosfatnog pufera, pH 7,4
50 $\mu\text{L}$ DTNB-a	50 $\mu\text{L}$ DTNB-a

## 3.4.2. Određivanje koncentracije MDA

### 3.4.2.1. Princip metode

MDA je produkt lipidne peroksidacije. Molekula MDA reagira s TBA u omjeru 1:2 (Heath i Packer, 1968). Reakcija se odvija u kiselim uvjetima na visokoj temperaturi pri čemu nastaje crveni derivat  $\text{MDA}-(\text{TBA})_2$  čiji se intenzitet obojenja može izmjeriti spektrofotometrijski na 532 nm. Na slici 7 prikazana je reakcija MDA s dvije molekule TBA. Koncentracija MDA u uzorku može se izračunati pomoću apsorpcijskog koeficijenta koji iznosi 15600 L/mol cm.



**Slika 7.** Reakcija MDA s TBA (preuzeto i prilagođeno iz [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:MDA\\_TBA\\_reaction\\_01a.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:MDA_TBA_reaction_01a.svg))

### 3.4.2.2. Priprema otopina

#### Priprema 5 % otopine TCA

Za pripremu 5 % TCA odvagano je 5 g TCA i prebačeno u odmjernu tikvicu od 100 mL. Odmjerna tikvica je potom nadopunjena do oznake s destiliranom vodom. 5 % TCA bila je potrebna za taloženje interferencija uzorka krvi i za održavanje kiselog medija potrebnog za reakciju MDA i TBA.

#### Priprema 0,6 % otopine TBA

0,6 % otopina TBA dobivena je tako što je odvagano 0,6 g TBA te je kvantitativno prenešeno u odmjernu tikvicu od 100 mL. Nakon što je TBA otopljena u malo destilirane vode, odmjerna tikvica je nadopunjena s destiliranom vodom do oznake. S obzirom da se TBA teško otapa potrebno je lagano zagrijavati kako bi se ubrzalo otapanje. TBA je reagens koji reagira s MDA te se koristi za dokazivanje prisustva MDA.

### 3.4.2.3. Izvođenje pokusa

Uzorci krvi su prvo istaloženi s 5 % TCA te centrifugirani 10 minuta na 2300 rpm kako bi se uklonile moguće interferencije i dobio čisti supernatant. U 500  $\mu$ L dobivenog supernatanta dodano je 500  $\mu$ L 0,6 % TBA. Dobivena smjesa se promiješala te je inkubirana pola sata na 90 °C. Nakon inkubacije od pola sata, reakcijska smjesa se ohladila na ledu kako bi se zaustavila reakcija. Apsorbancija se izmjerila pomoću UV-Vis spektrofotometra podešenog na valnu duljinu 532 nm. Iz očitane apsorbancije koncentracija MDA se izračunala pomoću apsorpcijskog koeficijenta 15600 L/mol cm te je izražena u  $\mu$ mol/L.



### 3.4.3. Određivanje koncentracije proteinskih karbonila

#### 3.4.4.1. Princip metode

PC su određeni u reakciji s 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH). U reakciji se karbonilna skupina proteina supstituira s DNPH, a pritom kao produkt reakcije nastaje stabilni 2,4-dinitrofenilhidrazoni, kako je prikazano na slici 8. Intenzitet obojenja može se izmjeriti pomoću UV-Vis spektrofotometra na valnoj duljini od 370 nm (Dalle-Donne i sur., 2003). Koncentracija PC u uzorku izračuna se pomoću poznatog apsorpcijskog koeficijenta koji iznosi 22000 L/mol cm.



**Slika 8.** U prvom dijelu slike prikazano je kako u prisustvu pro-oksidansa (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i metala željeza) nastaje oksidacijsko oštećenje proteina, odnosno PC. U drugom dijelu slike prikazana je reakcija vezanja DNPH za karbonilnu skupinu oksidiranog proteina što omogućuje detekciju PC (autor Melissa Kuralić)

#### 3.4.4.2 Priprema otopina

##### 10 % TCA

10 % otopina TCA pripremljena je tako da se odvagalo 10 g TCA koja se potom prebacila u odmjernu tikvicu od 100 mL te otopila u destiliranoj vodi. Nakon toga je odmjerna tikvica nadopunjena s destiliranom vodom do oznake. Kod vaganja potrebno je obratiti pažnju jer TCA „navlači“ vodu na sebe. Otopina je korištena za taloženje proteina u uzorku plazme.

##### 2 mol/L HCl

2 mol/L otopina HCl pripremljena je iz 35 % HCl otopine razrjeđivanjem 17,61 mL HCl do 100 mL. Za to je korištena odmjerna tikvica od 100 mL. Pripremljena otopina upotrebljena je za pripravu reagensa 0,2 % 2,4-DNPH.

#### 0,2 % 2,4-DNPH u 2 N HCl

Za pripremu 0,2 % 2,4-DNPH odvagano je 0,2 g 2,4-DNPH i kvantitativno preneseno u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopunjeno do oznake s prethodno pripremljenim 2 mol/L HCl. Ova je otopina reagens za dokazivanje prisustva PC u uzorku.

#### etanol : etil-acetat (1:1)

Potrebni volumeni etanola i etilacetata, u omjeru 1:1 uzimaju se pomoću menzure. Primjerice, za dobivanje 100 mL otopine uzme se 50 mL etanola i 50 mL etil-acetata. Dobivena otopina je korištena za ispiranje taloga od suviška reagensa.

#### 8 mol/L urea u K-fosfatnom puferu pH 2,4

Prvo je izvagano 0,1361g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  te se kvantitativno prenijelo u odmjernu tikvicu od 50 mL. U odmjernu tikvicu dodano je samo 40 mL destilirane vode u kojoj je otopljen  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Potom je izvagano 24,03 g uree i prebaci u odmjernu tikvicu s otopinom  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  te se odmjerna tikvica nadopuni do 50 mL s destiliranom vodom. Otopina 8 mol/L uree u K-fosfatnom puferu pH 2,4 je korištena za otapanje proteinskog taloga.

#### *3.4.4.3. Izvođenje pokusa*

Prema protokolu svaki uzorak treba imati i slijepu probu. Stoga su, kako bi svaki uzorak bio napravljen u triplicatu, za svaki uzorak pripremljene četiri epruvete, jedna za slijepu probu te tri epruvete za uzorak u kojemu će se odvijati reakcija PC s reagensom. U epruvete je stavljeno po 100  $\mu\text{L}$  uzorka plazme, a proteini su istaloženi dodatkom 100  $\mu\text{L}$  10 % TCA. Sadržaj epruvete kratko je promiješan na miješalici, centrifugiran 12 minuta na 4500 rpm te dekantiran. Za sve četiri epruvete po uzorku plazme ponovljen je isti postupak. U dobiveni talog je, za slijepu probu dodano 300  $\mu\text{L}$  2 mol/L HCl, a u preostale tri epruvete s uzorcima isti volumen (300  $\mu\text{L}$ ) reagensa 0,2 % 2,4-DNPH. Reakcijska smjesa ostavljena je stajati sat vremena na sobnoj temperaturi u mraku, uz povremeno miješanje kako bi došlo do reakcije između 2,4-DNPH i PC. Nakon sat vremena reakcija je zaustavljena dodatkom 600  $\mu\text{L}$  10 % TCA u slijepu probu i u uzorke, što je dovelo do ponovnog taloženja. Smjesa je promiješana, centrifugirana 12 minuta na 4500 rpm i dekantirana. U uzorcima je višak reagensa ispran dodatkom 500  $\mu\text{L}$  smjese etanola i etil-acetata, nakon čega je slijedilo miješanje, centrifugiranje i dekantiranje. Postupak je ponovljen dva puta. S obzirom da u slijepu probu nije dodan reagens,

slijepu probu nije potrebno ispirati od viška reagensa. Kako bi se otopio talog, u sve četiri epruvete (i slijepa proba i tri replike po uzorku) dodano je 1 mL 8 mol/L uree u K-fosfatnom puferu pH 2,4 te su epruvete promiješane. UV-Vis spektrofotometar je podešen na valnu duljinu 370 nm te je izmjerena apsorbancija svakog uzorka prema svojoj slijepoj probi. Koncentracija PC izračunata je pomoću Beer-Lambertovog zakona i poznatog apsorpcijskog koeficijenta.

### **3.5. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA**

Istraživanje je provedeno u dva neovisna pokusa, odnosno analize su napravljene na uzorcima krvi dvaju dobrovoljnih davaoca krvi. U svakome od pokusa parametri oksidacijskog stresa izmjereni su u dvije (GSH i MDA), odnosno tri replike (PC). Dobiveni rezultati prikazani su kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija rezultata iz oba neovisna pokusa. Za svaki pojedini parametar oksidacijskog stresa pojedini tretmani (PN1, PN2 i PN3) uspoređeni su s negativnom kontrolom, odnosno s tretmanom s medijem pomoću *t*-testa, u Excel programu Microsoft Office. Statistički značajna razlika postavljena je na  $p \leq 0,05$ .

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

Jednostanične mikroalge roda *Pseudo-nitzschie* prisutne su u gotovo svim morskim i estuarijskim ekosustavima te čine bazu hranidbenog lanca. Poznato je 57 vrsta tog roda, a za 26 vrsta *Pseudo-nitzschia* je pokazano da u određenim uvjetima (salinitet, temperatura i pH) izlučuju toksični metabolit DK. U ljudi koji konzumiraju hranu u kojoj se nakupila DK (školjke), dolazi do neurotoksičnog djelovanja DK i razvoja sindroma koji se naziva amnezijsko trovanje školjkašima. Amnezijsko trovanje školjkašima manifestira se glavoboljom, smetenošću i amnezijom. Mehanizam kojim DK djeluje na neurone je sljedeći: DK je strukturni analog L-glutaminske kiseline te se trajno veže na NMDA receptore na neuronima što dovodi do bubrenja neurona. Trenutno nije poznato djeluje li i na koji način DK na ostale (ne-ciljne) stanice u ljudi.

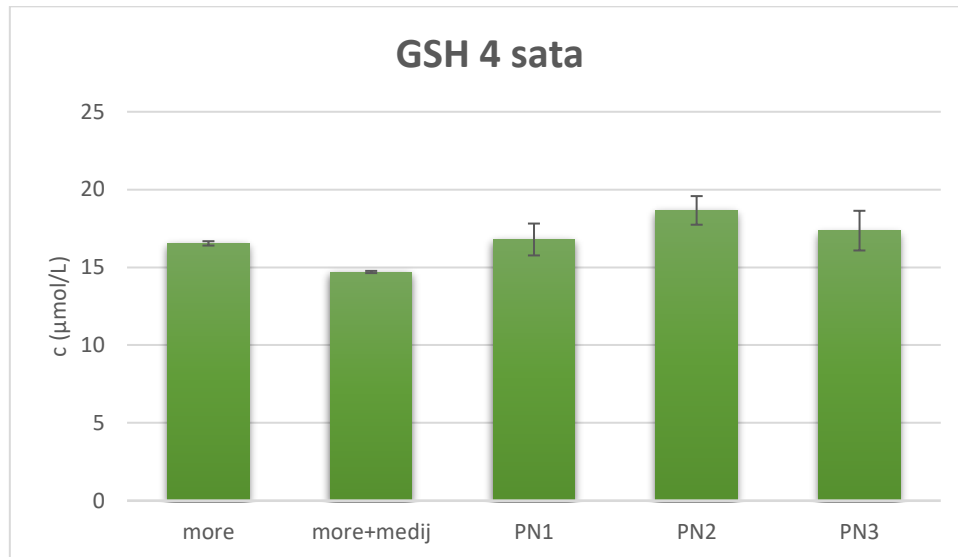
Iz tog je razloga ovo istraživanje provedeno na ljudskim stanicama krvi. Kako bi se što bolje imitirali okolišni uvjeti, stanice krvi su tretirane medijem u kojem su rasle *Pseudo-nitzschie* s pretpostavkom da su u njega izlučile svoje metabolite pa tako i DK. Stanice krvi bile su izložene 4 i 24 sata mediju u kojem su rasle tri vrste *Pseudo-nitzschie* (PN1, PN2 i PN3) te su nakon toga izmjereni parametri oksidacijskog stresa GSH, MDA i PC kako bi se utvrdilo je li u stanicama krvi oksidacijski stres mehanizam toksičnog djelovanja metabolita koje su ispitivane *Pseudo-nitzschie* izlučile u medij.

#### 4.1. GLUTATION

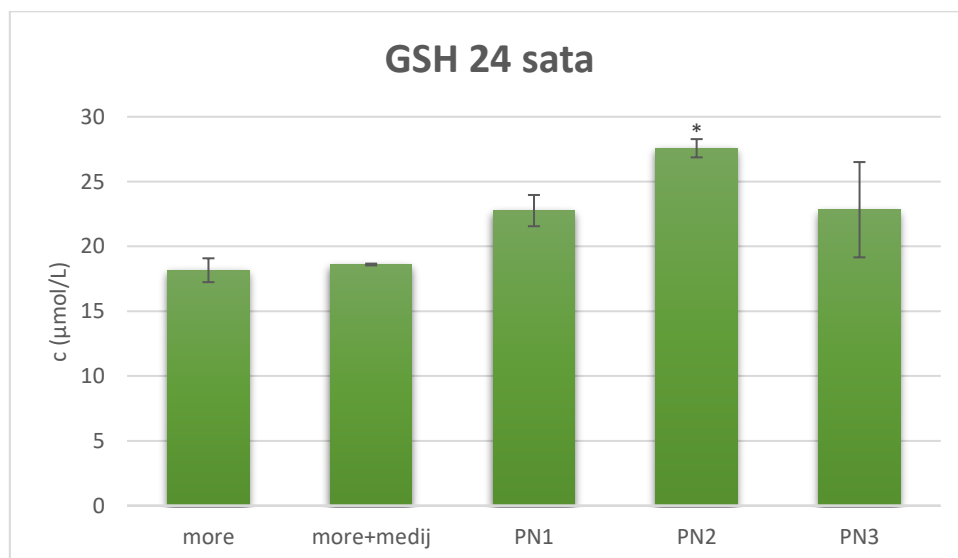
GSH je najvažniji anti-oksidans u stanici što potvrđuje i činjenica da se GSH u stanici nalazi u visokoj koncentraciji. Njegova uloga je sprečavanje oksidacijskog oštećenja makromolekula tako što neutralizira slobodne radikale. Osim neutraliziranja pro-oksidansa, GSH je uključen i u detoksifikaciju ksenobiotika (Pizzorno, 2014).

Rezultati ovoga istraživanja pokazuju da je tretman s medijem u kojem su rasle *Pseudo-nitzschie* doveo do porasta koncentracije GSH u krvi. Kod svih triju ispitanih vrsta (PN1, PN2 i PN3) i nakon 4 i nakon 24 sata zabilježen je porast koncentracije GSH (Slike 9 i 10). Najviša koncentracija GSH u krvi zabilježena je nakon 24-satnog tretmana s medijem u kojem je rasla vrsta *P. pseudodelicatissima* (PN2) te je zabilježen značajan porast koncentracije GSH u odnosu na kontrolu, tretman s medijem i morem ( $27,57 \pm 0,71 \mu\text{mol/L}$  vs.  $18,16 \pm 0,92 \mu\text{mol/L}$ ;  $p \leq 0,05$ ). Dobiveni rezultati govore da su ovi eksperimentalni uvjeti (duljina izloženosti mediju, koncentracija izlučenih metabolita *Pseudo-nitzschia*) potakli pojačanu sintezu GSH te da je došlo do adaptivnog odgovora organizma kao odgovor na izloženost vanjskim

čimbenicima (odgovor na stres). Poznato je da se mnogi organizmi mogu boriti s nepovoljnim okolišnim čimbenicima poput dehidracije ili hipoksije. To uzrokuje adaptivni fiziološki odgovor koji uključuje i pojačanu sintezu anti-oksidansa (Oliveira i sur., 2018).



**Slika 9.** Koncentracija GSH u stanicama krvi nakon 4-satnog tretmana s medijem u kojem su rasle PN1, PN2 i PN3 te kontrole (tretman s morem, i medij+more)

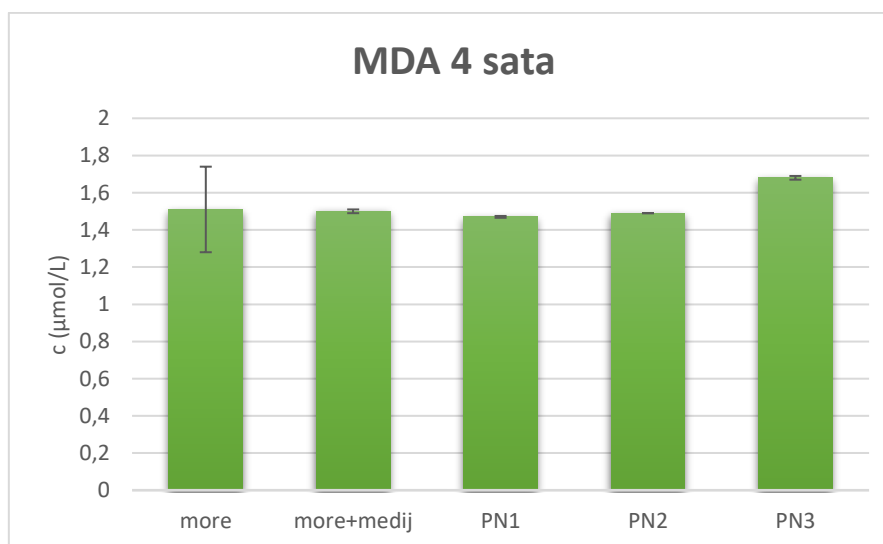


**Slika 10.** Koncentracija GSH u stanicama krvi nakon 24-satnog tretmana s medijem u kojem su rasle PN1, PN2 i PN3 te kontrole (tretman s morem i more+medij); \*  $p \leq 0,05$  (statistički značajno različito od kontrole; tretmana s more+medij)

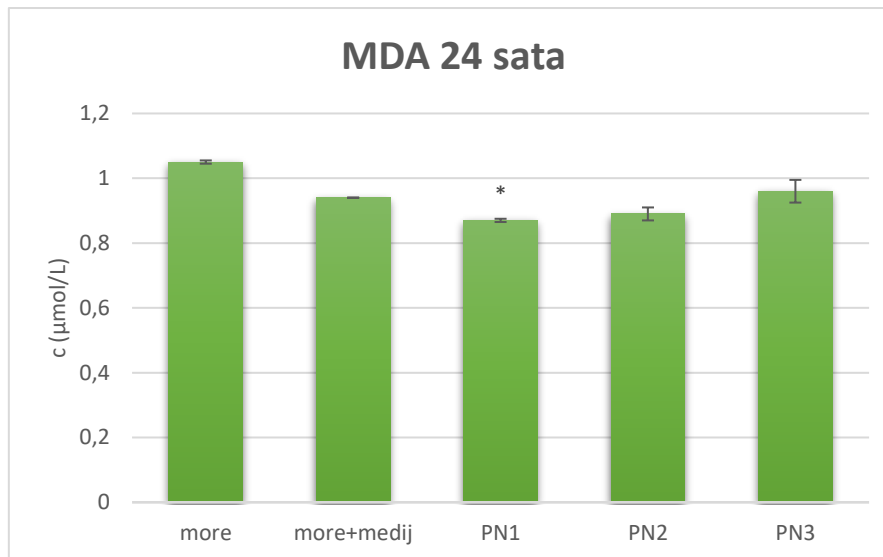
## 4.2. MALONDIALDEHID

Oksidativnim oštećenjem staničnih lipida nastaje MDA koji se smatra dobrim biomarkerom lipidne peroksidacije, ali i oksidacijskog stresa općenito. MDA je stabilna molekula, ali i vrlo toksična stoga što može reagirati s drugim molekulama i dovesti do njihovog oštećenja. MDA se može vezati na proteine i uzrokovati nastanak PC ili vezati na DNA što može dovesti do oštećenja DNA (Martínez-Blasco i sur., 1998; Balasubramanyam i sur., 2010).

Tretman krvi s medijem u kojem su rasle *Pseudo-nitzschie* PN1, PN2 i PN3 nije doveo do značajnog porasta koncentracije MDA već je kod dužeg tretmana (24 sata) zabilježen i pad koncentracije MDA u krvi. Nakon 4-satnog tretmana krvi s medijem u kojem su rasle *Pseudo-nitzschie* nije zabilježena značajnija razlika između kontrolnih uzoraka i onih koje su tretirani s medijem u kojem su rasle *Pseudo-nitzschie* (Slika 11). Međutim 24-satni tretmana s medijem u kojem je rasla vrsta *P. delicatissima* (PN1) doveo je do značajnog snižavanja koncentracije MDA u krvi u usporedbi s kontrolom ( $0,87 \pm 0,02 \mu\text{mol/L}$  vs.  $0,94 \pm 0,01 \mu\text{mol/L}$ ;  $p \leq 0,05$ ; Slika 12). Dobiveni rezultati mogu se objasniti izmjerenom povećanom koncentracijom GSH, odnosno povećanom sintezom GSH kao odgovor na stres kojega su izazvali metaboliti koje su *Pseudo-nitzschie* izlučile u mediju u kojem su rasle. Za pretpostaviti je da je povećana koncentracija GSH (i moguće i nekog drugog anti-oksிடansa) spriječila lipidnu peroksidaciju i povećano nastajanje MDA.



**Slika 11.** Koncentracija MDA u stanica krvi nakon 4-satnog tretmana s medijem u kojem su rasle PN1, PN2 i PN3 te kontrole (tretman s morem i more+medij)



**Slika 12.** Koncentracija MDA u stanicama krvi nakon 24-satnog tretmana s medijem u kojem su rasle PN1, PN2 i PN3 te kontrole (tretman s morem i more+medij); \*  $p \leq 0,05$  (statistički značajno različito od kontrole; tretmana s more+medij)

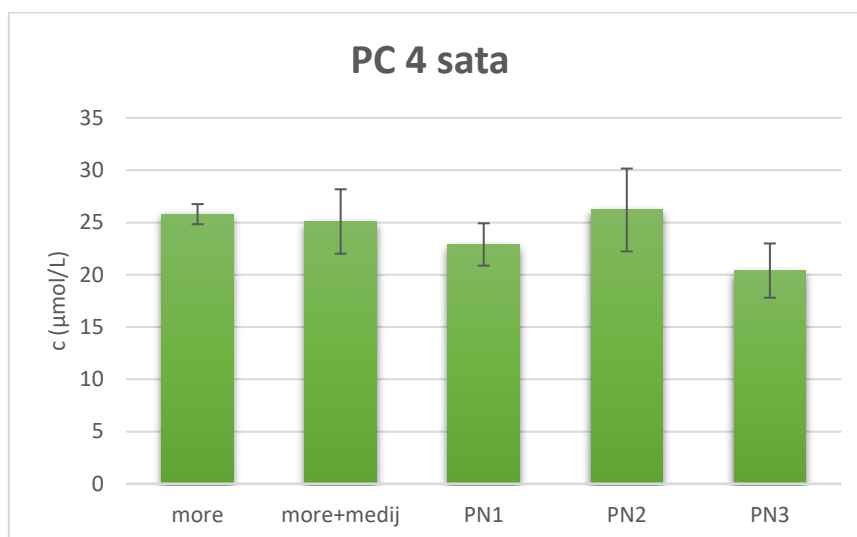
### 4.3. PROTEINSKI KARBONILI

Oksidacijsko oštećenje proteina događa se prvenstveno na pobočnim lancima aminokiselina pri čemu nastaju PC. PC je moguće izmjeriti te se stoga smatraju biomarkerom oksidacijskog oštećenja proteina. Karbonilacija pobočnih aminokiselina proteina uzrokuje gubitak identiteta aminokiselinskog bočnog lanca. Takva je promjena ireverzibilna pa karbonilacija proteina predstavlja najštetniji oblik oksidativnog oštećenja proteina. Karbonilirani proteini gube svoju strukturu, a samim time i ulogu u organizmu, npr. enzimsku aktivnost.

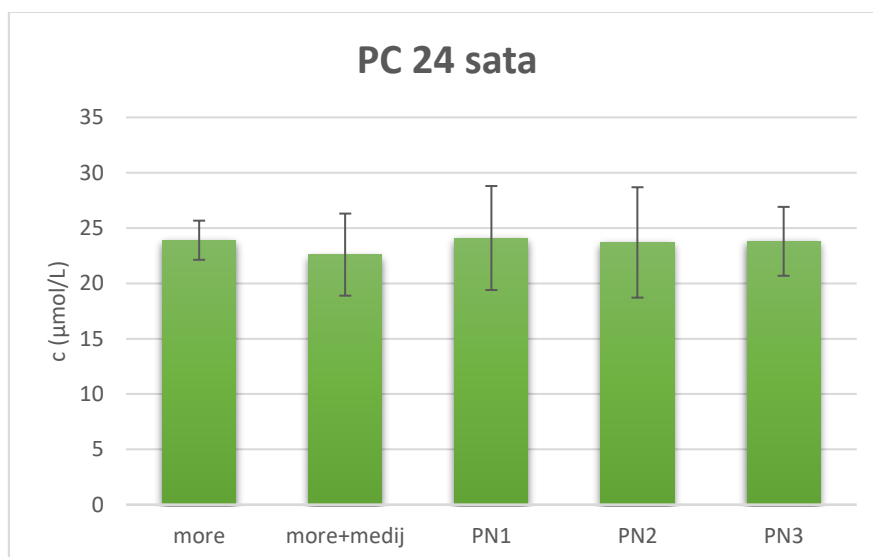
Tretman krvi s medijem u kojem su rasle *Pseudo-nitzschie* tijekom 4 sata i 24 sata nije doveo do značajnije promijene u koncentraciji PC u plazmi što govori da nije došlo do oksidacijskog oštećenja proteina (Slike 13 i 14). Ipak, može se primijetiti da je nakon 4-satne izloženosti tretman s medijem u kojem su rasle vrste *P. delicatissima* (PN1) i *P. calliantha* (PN3) doveo do blagog pada koncentracije PC u plazmi u usporedbi s kontrolnom. Nakon 4-satne izloženosti mediju u kojem je rasla *P. delicatissima* (PN1) koncentracija PC u plazmi bila je  $22.9 \pm 2,01 \mu\text{mol/L}$ , a nakon izloženosti mediju u kojem je rasla *P. calliantha* (PN3) koncentracija PC bila je  $20,04 \pm 2,5 \mu\text{mol/L}$  što je bila niže od kontrole (tretman samo s morem i medijem)  $25,1 \pm 1,9 \mu\text{mol/L}$ , iako ne značajno. Ti rezultati potvrđuju rezultate dobivene za



koncentraciju MDA u krvi. Vjerojatno je izloženost metabolitima koje su *Pseudo-nitzschie* izlučile u medij u stanica krvi inducirala povećanu sintezu anti-oksidansa, poput sinteze GSH te su GSH i drugi anti-oksidansi, primjerice enzim superoksid-dizmutaza, spriječili oksidacijsko oštećenje i lipida i proteina.



**Slika 13.** Koncentracija PC u stanicama krvi nakon 4-satnog tretmana s medijem u kojem su rasle PN1, PN2 i PN3 te kontrole (tretman s morem i more+medij)



**Slika 14.** Koncentracija PC u stanicama krvi nakon 24-satnog tretmana s medijem u kojem su rasle PN1, PN2 i PN3 te kontrole (tretman s morem i more+medij)

U ovom su istraživanju ispitane tri vrste mikroalgi roda *Pseudo-nitzschie*, *P. delicatissima* (PN1), *P. pseudodelicatissima* (PN2) i *P. calliantha* (PN3) koje se prisutne u Jadranu i za koje je utvrđeno da mogu proizvesti DK. Stoga se smatraju potencijalno toksičnima za ljudsko zdravlje. Kako bi se potvrdila njihova toksičnost, a kako bi se zadržali uvjeti što bliže okolišnim, za istraživanje je korišten medij u kojem su rasle *Pseudo-nitzschie*, s pretpostavkom da su *Pseudo-nitzschie* u medij izlučile svoje metabolite među kojima i DK. DK je neurotoksin te je njen mehanizam djelovanja na neurone, ciljne stanice poznat. Stoga je ovo ispitivanje provedeno na ljudskim stanicama krvi koje za DK nisu ciljne stanice.

Iz provedenog istraživanja vidljivo je da je tretman krvi s medijem u kojem su rasle ispitivane *Pseudo-nitzschie*: *P. delicatissima* (PN1), *P. pseudodelicatissima* (PN2) i *P. calliantha* (PN3) doveo do promjena u koncentraciji sva tri mjerena parametra oksidacijskog stresa, GSH, MDA i PC, iako je značajna promjena u odnosu na kontrolu zabilježena samo za koncentraciju GSH i MDA. Iz toga se može zaključiti da je oksidacijski stres mehanizam toksičnog djelovanja metabolita koje izlučuju ispitivane *Pseudo-nitzschie*. Ovi eksperimentalni uvjeti (duljina tretmana i koncentracija metabolita *Pseudo-nitzschie* prisutnih u mediju) doveli su do porasta koncentracije GSH, odnosno ti eksperimentalni uvjeti potakli su stanice krvi na pojačanu sintezu anti-oksிடansa GSH. Taj učinak bio je najbolje vidljiv kod *P. pseudodelicatissima* (PN2). To upućuje na mogućnost da je izloženost metabolitima ispitivanih *Pseudo-nitzschie* potaknuo sintezu GSH, ali i inducirao gene odgovorne za sintezu drugih anti-oksிடansa stanica krvi (Oliveira i sur., 2018). S obzirom da je u krvi zabilježen porast koncentracije GSH bilo je za očekivati sniženje koncentracije parametara pokazatelja oksidacijskog oštećenja lipida, MDA i oksidacijskog oštećenja proteina PC. Može se zaključiti da je neki od metabolita koje su izlučile *Pseudo-nitzschie* u medij u stanicama krvi potaknuo obranu od oksidacijskog stresa i tako narušio oksido-reduktivnu ravnotežu u krvi. Svakako bi u daljnjim istraživanjima trebalo utvrditi sastav medija u kojem su rasle ispitivane mikroalge. Također, trebalo bi ispitati i učinak metabolita istraživanih *Pseudo-nitzschie* pri duljem tretmanu stanica od 24 sata koji je korišten u ovom istraživanju.

## **5. ZAKLJUČCI**

Nakon provedenog istraživanja u kojem je krv tretirana 4 i 24 sata s hranjivim medijem u kojem su rasle mikroalge roda *Pseudo-nitzschie*, *P. delicatissima* (PN1), *P. pseudodelicatissima* (PN2) i *P. calliantha* (PN3) te su u krvi i plazmi izmjereni parametri oksidacijskog stresa može se zaključiti:

- I. Porast koncentracije GSH u krvi tretiranoj medijem u kojem su rasle PN1, PN2 i PN3 pokazuje da je došlo do aktivacije obrane od oksidacijskog stresa, odnosno da *Pseudo-nitzschie* u medij izlučuju metabolite koji su inducirali oksidacijski stres u stanicama krvi.
- II. Paralelno s porastom koncentracije GSH zabilježen je pad koncentracije MDA te neznatčan pad koncentracije PC što se može pripisati povećanoj sintezi GSH i aktivaciji anti-oksidacijske obrane metabolitima *Pseudo-nitzschie* prisutnim u mediju s kojim je tretirana krv.
- III. Moguće je da vrsta *P. pseudodelicatissima* proizvodi toksičnije metabolite od drugih dviju ispitivanih vrsta iz razloga što je tretman krvi s medijem u kojem je rasla ta vrsta *Pseudo-nitzsche* uzrokovao značajnije promjene u koncentraciji GSH u stanicama krvi.

Iz dobivenih rezultata u ovome istraživanju može se zaključiti da je tretman krvi s medijem u kojem su rasle *Pseudo-nitzschie* uzrokovao oksidacijski stres što je rezultiralo povećanom sintezom anti-oksidansa GSH. Povećana razina anti-oksidansa GSH spriječila je daljnja oštećenja lipida i proteina. Zabilježeni oksidacijski stres može se pripisati prisustvu DK u mediju, što se treba dokazati analizom medija u kojem su rasle *Pseudo-nitzsche* pomoću LC-MS/MS.

## **6. POPIS KRATICA**

ATP – adenzin-trifosfat

DK – domoična kiselina

DTNB – 5,5 -ditio-bis-(2-nitrobenzojeva kiselina)

GSH – glutation, reducirani oblik

GSSG – glutation, oksidirani oblik

MDA – malondialdehid

NADPH – nikotinamid dinukleotid fosfat

NMB – 2-nitro-5-merkaptobenzojeva kiselina

NMDA – N-metil-D-aspartat receptor

PC – proteinski karbonili

PN – *Pseudo-nitzschia*

$\gamma$ -GCS –  $\gamma$ -glutamilcistein-sintetaza

## **7. LITERATURA**

Balasubramanyam M, Adaikalakoteswari A, Sameermahmood Z, Mohan V. Biomarkers of oxidative stress: methods and measures of oxidative DNA damage (COMET assay) and telomere shortening. *Methods Mol Biol*, 2010, 610, 245-261.

Bates BB, Garrison DL, Horner RA. Bloom dynamics and physiology of domoic-acid-producing *Pseudo-nitzschia* species. U: *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*. Anderson DM, Cembella AD, Hallegraeff GM, urednici, Springer-Verlag, Berlin, 1998, str. 267-292.

Bates SS, Trainer JL. The ecology of harmful diatoms. U: *Ecology of Harmful Algae*. Granéli E, Trainer J, urednici, 2006, Springer-Verlag, Berlin, str. 81-88.

Castegna A, Drake J, Pocernich C, Butterfield DA, Protein carbonyl levels – An assessment of protein oxidation. U: *Methods in Pharmacology and Toxicology: Methods in Biological Oxidative Stress*. Hensley K, Floyd RA, urednici, 2003, Totowa, Humana Press Inc., str. 161-168.

Clayden J, Read B, Hebditch KR. Chemistry of domoic acid, isodomoic acids, and their analogues. *Tetrahedron*, 2005, 24 (61), 5713-5724.

Dalle-Donne I, Rossib R, Giustarinib D, Milzania A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta*, 2003, 329, 23-38.

Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J*, 1997, 324, 1–18.

Domoična kiselina, [https://en.wikipedia.org/wiki/Domoic\\_acid](https://en.wikipedia.org/wiki/Domoic_acid), pristupljeno 1.6.2022.

Falk M, Seto PF, Walter JA. Solubility of domoic acid in water and in nonaqueous solvents. *Can J Chem*, 1991, 69, 1740-1744.

Gill SS, Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem*, 2010, 48, 909-930.



Guillard RRR. Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. U: Culture of Marine Invertebrate Animals, 1975, Springer US, Boston, MA, pp. 29–60. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9_3)

Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol*, 2004, 142, 231-255.

Jairam V, Uchida K, Narayanaswami V. Patophysiology of Lipoprotein Oxidation, IntechOpen, New York, 2012, str. 393.

Jitcă G, Fogarasi E, Ósz B-E, Vari CE, Fülöp I, Croitoru MD, Rusz CM, Dogaru MT. Profiling the Concentration of Reduced and Oxidized Glutathione in Rat Brain Using HPLC/DAD Chromatographic System. *Molecules*, 2021, 26, 6590.

Križanac Š. Klinička patofiziologija: za studente Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta. U: Osnove patofiziologije, Kujundžić M, urednik, Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2003, str. 1-10.

Lelong A, Hégaret H, Soudant P, Bates SS. Pseudo-nitzschia (Bacillariophyceae) species, domoic acid and amnesic shellfish poisoning: Revisiting previous paradigms. *Phycologia*, 2018, 51, 168-216.

L-glutamat, <https://en.wikipedia.org/wiki/Glutamine>, pristupljeno 1.6.2022.

Guiry MD, Guiry GM 2022. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; pristupljeno 7.5.2022.

Maeno Y, Kotaki Y, Terada R. Six domoic acid related compounds from the red alga, *Chondria armata*, and domoic acid biosynthesis by the diatom, *Pseudo-nitzschia multiseriata*. *Sci Rep*, 2018, 8, 356.

Marić D, Kraus R, Godrijan J, Supić N, Đakovac T, Precali R. Phytoplankton response to climatic and anthropogenic influences in the north-eastern Adriatic during the last four decades. *Estuar Coast Shelf Sci*, 2012, 115, 98-112.

Marić D, Ljubešić Z, Godrijan J, Viličić D, Ujević I, Precali R. Blooms of the potentially toxic diatom *Pseudo-nitzschia calliantha* Lundholm, Moestrup & Hasle in coastal waters of the northern Adriatic Sea (Croatia). *Estuar Coast Shelf Sci*, 2011, 92, 323-331.

Marić Pfannkuchen D. Potencijalno toksične dijatomeje roda *Pseudo-nitzschia* u sjevernom Jadranu: ekološke, taksonomske i molekularne značajke. Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2013.

Martínez-Blasco A, Hermenegildo C, Bosch-Morell F, Romero FJ. Role of oxidative stress in experimentally-induced diabetic neuropathy and mechanisms involved. *Biofactors*, 1998, 8, 41-43.

Nigović B, Jurišić Grubešić R, Vuković J. Praktikum iz analitike lijekova I.dio, Ultraljubičasta i vidljiva apsorpcijska sprektofotometrija. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2007, 34-38.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). OECD guideline for testing the chemicals: in vitro mammalian cell micronucleus test. Test. Guidel. 487., OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. 2014. OECD Publishing.

Oliveira MF, Geihs MA, França TFA, Moreira DC, Hermes-Lima M. Is “Preparation for Oxidative Stress” a Case of Physiological Conditioning Hormesis? *Front Physiol*, 2018, 9, 1-6.

Pan Y, Durvasula VSR, Mann KH. Changes in domoic acid production and cellular chemical composition of the toxigenic diatom *Pseudo-nitzschia multiseries* under phosphate limitation. *J Phycol*, 1996, 32, 371-381.

Pizzorno J. Glutathione! *Integr Med*, 2014, 13, 8-12.

Pulido OM. Domoic acid toxicologic pathology: a review. *Mar drugs*, 2008, 6(2), 180–219.

Reakcija MDA-TBA,

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:MDA\\_TBA\\_reaction\\_01a.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:MDA_TBA_reaction_01a.svg), pristupljeno

1.6.2022.

- Reuben C. Opasni slobodni radikali. U: Antioksidansi. Zagreb, Izvori, 1998, str. 20-30.
- Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *J Bot*, 2012, Article ID 217037.
- Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*, 1997, 82, 291- 295.
- Smetacek V. Diatoms and the ocean carbon cycle. *Protist*, 1999, 150, 25-32.
- Solter PF, Beasley VR. Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology. Academic Press, Cambridge, 2013, str.1155-1186.
- Świergosz-Kowalewska R, Bednarska A, Kafel A. Glutathione levels and enzyme activity in the tissues of bank vole *Clethrionomys glareolus* chronically exposed to a mixture of metal contaminants. *Chemosphere*, 2006, 65, 963-974.
- Štefan L, Tepšić T, Zavidčić T, Urukalo M, Tota D, Domitrović K. Lipidna peroksidacija – uzroci i posljedice. *Medicina*, 2007, 43, 84-93.
- Totti C, Cvitarese G, Acri F, Barletta D, Candelari G, Paschini E, Solazzi A. Seasonal variability of phytoplankton populations in the middle Adriatic sub-basin. *J Plankton Res*, 2000, 22, 1735-1756.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biol Inter*, 2006, 160, 1–40.
- Viličić D, Djakovac T, Burić Z, Bosak S. Composition and annual cycle of phytoplankton assemblages in the northeastern Adriatic Sea. *Bot Mar*, 2009, 52, 291-305.
- Watson D. Pharmaceutical analysis. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1999, str. 75-94.

## **8. SAŽETAK / SUMMARY**

Mikroalge roda *Pseudo-nitzschia* prisutne su u gotovo svim morskim i estuarijskim ekosustavima te čine bazu hranidbenoga lanca. Pojedine vrste roda *Pseudo-nitzschia* izlučuju neurotoksin, domoičnu kiselinu (DK). Poremećaj koji se razvija u ljudi koji su hranom unijeli u organizam DK naziva se amnezijsko trovanje školjkašima. Oksidacijski stres predstavlja neravnotežu u oksido-redukcijskim reakcijama u organizmu te se povezuje s razvojem niza bolesti u ljudi. Cilj ovoga istraživanja bio je ispitati oksidacijski stres kao mehanizam toksičnosti metabolita pojedinih vrsta roda *Pseudo-nitzschia* u ljudskim stanicama krvi. Prvo su uzgojene tri vrste roda *Pseudo-nitzschie*, *P. delicatissima* (PN1), *P. pseudodelicatissima* (PN2) i *P. calliantha* (PN3) te je sakupljen hranjivi medij u kojem su rasle mikroalge. Potom su uzorci krvi zdravih dobrovoljnih davatelja tretirani medijem u kojem su rasle *Pseudo-nitzschia* PN1, PN2 i PN3 te morem i morem i medijem (kontrola) u razdoblju od 4 i 24 sata. Nakon tretmana u uzorcima krvi određene su koncentracije: glutationa (GSH), mjera anti-oxidacijske obrane, malondialdehida (MDA), pokazatelj lipidne peroksidacije te proteinskih karbonili (PC), pokazatelji oksidacijskog oštećenja proteina, spektrofotometrijski. Dobiveni rezultati statistički su obrađeni Studentovim *t*-testom (Excel, MS Office), a razina značajnosti postavljena je na  $p \leq 0,05$ .

Tretman krvi (4 i 24 sata) s medijem u kojem su rasle *Pseudo-nitzschie* PN1, PN2 i PN3 doveo je do porasta koncentracije GSH, ali je samo nakon 24-satnog tretmana s *P. pseudodelicatissima* (PN2) zabilježena značajno viša koncentracija GSH u odnosu na kontrolu ( $p \leq 0,05$ ). Tretman hranjivim medijem *Pseudo-nitzschie* snizio je koncentraciju MDA, a značajan pad koncentracije MDA u krvi u odnosu na kontrolnu skupinu zabilježen je nakon 24-satnog tretmana medijem u kojem je rasla *P. delicatissima* (PN1) ( $p \leq 0,05$ ). Tretman krvi medijem u kojem su rasle PN1, PN2 i PN3 doveo je do pada koncentracije PC, no taj pad nije bio značajan u odnosu na kontrolu. Zabilježeni porast koncentracije GSH nakon tretmana medijem u kojem su rasle *Pseudo-nitzschie* pokazuje da je došlo do aktivacije obrane od oksidacijskog stresa. Sniženje koncentracija MDA i PC može se povezati s povećanom koncentracijom GSH koja je spriječila oksidacijska oštećenja lipida i proteina. Konačno, može se zaključiti da ispitivane vrste *Pseudo-nitzschie* u hranjivi medij izlučuju metabolit(e) koji mogu izazvati oksidacijski stres u stanicama krvi.

Microalgae of the genus *Pseudo-nitzschia* are present in almost all marine and estuarine ecosystems and are the basis of the food chain. Some species of the genus *Pseudo-nitzschia* produce neurotoxin, domoic acid (DA). Individuals who have consumed food containing DA develop disorder called amnesic shellfish poisoning. Oxidative stress is result of an imbalance in oxido-reduction reactions in the body and in humans is associated with the development of numerous diseases. The aim of this study was to explore on human blood cells oxidative stress as a mechanism of toxicity of metabolites of some *Pseudo-nitzschia* species. In the first step of the study three species of the genus *Pseudo-nitzschie* were grown: *P. delicatissima* (PN1), *P. pseudodelicatissima* (PN2) and *P. calliantha* (PN3), and the nutrient medium in which the microalgae grew was collected. In the next step blood samples from healthy voluntary donors were treated with collected medium as well as with sea and sea and media (that served as controls) for 4 and 24 hours. After treatment, in blood samples glutathione (GSH) as marker of anti-oxidative defence, malondialdehyde (MDA) as marker of lipid peroxidation and protein carbonyls (PC) as marker of oxidative damage to proteins were determined spectrophotometrically. For statistical analysis Student t-test (Excel, MS Office) was used, and the significance level was set at  $p \leq 0.05$ .

In blood samples exposed for 4- and 24-hours to medium in which *Pseudo-nitzschie* PN1, PN2 and PN3 grew an increase in GSH level was observed. However, only in blood samples exposed for 24-hours to medium in which *P. pseudodelicatissima* (PN2) grew significantly higher GSH level in comparison to control is recorded ( $p \leq 0.05$ ). Exposure to medium in which *Pseudo-nitzschie* grew decreased MDA level in blood samples. After 24-hour exposure of blood cells to medium in which *P. delicatissima* (PN1) was grown, a significant decrease in MDA concentration compared to the control group was observed ( $p \leq 0.05$ ). 4- and 24-hour exposure of blood cells to medium in which PN1, PN2 and PN3 were grown led to a decrease in PC level, however, the decrease was not significant compared to control. The observed increase in GSH level in blood samples exposed to the medium in which *Pseudo-nitzschie* grew indicate that in blood cells activation of the defence against oxidative stress occurred. Decrease in MDA and PC level may be explained with increased GSH level that prevented oxidative damage to lipids and proteins. Therefore, it can be concluded that the tested *Pseudo-nitzschie* species into the nutrient medium secrete metabolite(s), which can induce oxidative stress in human blood cells.

**10. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA  
KARTICA / BASIC DOCUMENTATION  
CARD**

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za Farmaceutsku botaniku  
Schrottova ulica 39, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### UTJECAJ METABOLITA MIKROALGI *Pseudo-nitzschia* NA PARAMETRE OKSIDACIJSKOG STRESA STANICA KRVI

Melissa Kuralić

#### SAŽETAK

Mikroalge roda *Pseudo-nitzschia* prisutne su u gotovo svim morskim i estuarijskim ekosustavima te čine bazu hranidbenoga lanca. Pojedine vrste roda *Pseudo-nitzschia* izlučuju neurotoksin, domoičnu kiselinu (DK). Poremećaj koji se razvija u ljudi koji su hranom unijeli u organizam DK naziva se amnezijско trovanje školjkašima. Oksidacijski stres predstavlja neravnotežu u oksido-redukcijskim reakcijama u organizmu te se povezuje s razvojem niza bolesti u ljudi. Cilj ovoga istraživanja bio je ispitati oksidacijski stres kao mehanizam toksičnosti metabolita pojedinih vrsta roda *Pseudo-nitzschia* u ljudskim stanicama krvi. Prvo su uzgojene tri vrste roda *Pseudo-nitzschie*, *P. delicatissima* (PN1), *P. pseudodelicatissima* (PN2) i *P. calliantha* (PN3) te je sakupljen hranjivi medij u kojem su rasle mikroalge. Potom su uzorci krvi zdravih dobrovoljnih davatelja tretirani medijem u kojem su rasle *Pseudo-nitzschia* PN1, PN2 i PN3 te morem i morem i medijem (kontrola) u razdoblju od 4 i 24 sata. Nakon tretmana u uzorcima krvi određene su koncentracije: glutationa (GSH), mjera anti-oksidacijske obrane, malondialdehida (MDA), pokazatelj lipidne peroksidacije te proteinskih karbonili (PC), pokazatelji oksidacijskog oštećenja proteina, spektrofotometrijski. Dobiveni rezultati statistički su obrađeni Studentovim t-testom (Excel, MS Office), a razina značajnosti postavljena je na  $p \leq 0,05$ .

Tretman krvi (4 i 24 sata) s medijem u kojem su rasle *Pseudo-nitzschie* PN1, PN2 i PN3 doveo je do porasta koncentracije GSH, ali je samo nakon 24-satnog tretmana s *P. pseudodelicatissima* (PN2) zabilježena značajno viša koncentracija GSH u odnosu na kontrolu ( $p \leq 0,05$ ). Tretman hranjivim medijem *Pseudo-nitzschie* snizio je koncentraciju MDA, a značajan pad koncentracije MDA u krvi u odnosu na kontrolnu skupinu zabilježen je nakon 24-satnog tretmana medijem u kojem je rasla *P. delicatissima* (PN1) ( $p \leq 0,05$ ). Tretman krvi medijem u kojem su rasle PN1, PN2 i PN3 doveo je do pada koncentracije PC, no taj pad nije bio značajan u odnosu na kontrolu. Zabilježeni porast koncentracije GSH nakon tretmana medijem u kojem su rasle *Pseudo-nitzschie* pokazuje da je došlo do aktivacije obrane od oksidacijskog stresa. Sniženje koncentracija MDA i PC može se povezati s povećanom koncentracijom GSH koja je spriječila oksidacijska oštećenja lipida i proteina. Konačno, može se zaključiti da ispitivane vrste *Pseudo-nitzschie* u hranjivi medij izlučuju metabolit(e) koji mogu izazvati oksidacijski stres u stanicama krvi.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 42 stranice, 14 grafičkih prikaza, 3 tablice i 41 literaturni navod. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Pseudo-nitzschia*, domoična kiselina, oksidacijski stres, glutation, malondialdehid, proteinski karbonili

Mentori: **Dr. sc. Ana-Marija Domijan**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Mirta Smodlaka Tanković**, znanstvena suradnica, Institut Ruđer Bošković, Centar za istraživanje mora, Rovinj

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ana-Marija Domijan**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Mirta Smodlaka Tanković**, znanstvena suradnica, Institut Ruđer Bošković, Centar za istraživanje mora, Rovinj

**Dr. sc. Erim Bešić**, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: lipanj 2022.



## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Pharmaceutical Botany  
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### IMPACT OF MICROALGAE *Pseudo-nitzschia* METABOLITES ON OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IN BLOOD CELLS

Melissa Kuralić

#### SUMMARY

Microalgae of the genus *Pseudo-nitzschia* are present in almost all marine and estuarine ecosystems and are the basis of the food chain. Some species of the genus *Pseudo-nitzschia* produce neurotoxin, domoic acid (DA). Individuals who have consumed food containing DA develop disorder called amnesic shellfish poisoning. Oxidative stress is result of an imbalance in oxido-reduction reactions in the body and in humans is associated with the development of numerous diseases. The aim of this study was to explore on human blood cells oxidative stress as a mechanism of toxicity of metabolites of some *Pseudo-nitzschia* species. In the first step of the study three species of the genus *Pseudo-nitzschie* were grown: *P. delicatissima* (PN1), *P. pseudodelicatissima* (PN2) and *P. calliantha* (PN3), and the nutrient medium in which the microalgae grew was collected. In the next step blood samples from healthy voluntary donors were treated with collected medium as well as with sea and sea and media (that served as controls) for 4 and 24 hours. After treatment in blood samples glutathione (GSH) as marker of anti-oxidative defence, malondialdehyde (MDA) as marker of lipid peroxidation and protein carbonyls (PC) as marker of oxidative damage to proteins were determined spectrophotometrically. For statistical analysis Student t-test (Excel, MS Office) was used, and the significance level was set at  $p \leq 0.05$ . In blood samples exposed for 4- and 24-hours to medium in which *Pseudo-nitzschie* PN1, PN2 and PN3 grew an increase in GSH level was observed. However, only in blood samples exposed for 24-hours to medium in which *P. pseudodelicatissima* (PN2) grew significantly higher GSH level in comparison to control is recorded ( $p \leq 0.05$ ). Exposure to medium in which *Pseudo-nitzschie* grew decreased MDA level in blood samples. After 24-hour exposure of blood cells to medium in which *P. delicatissima* (PN1) was grown, a significant decrease in MDA concentration compared to the control group was observed ( $p \leq 0.05$ ). 4- and 24-hour exposure of blood cells to medium in which PN1, PN2 and PN3 were grown led to a decrease in PC level, however, the decrease was not significant compared to control. The observed increase in GSH level in blood samples exposed to the medium in which *Pseudo-nitzschie* grew indicate that in blood cells activation of the defence against oxidative stress occurred. Decrease in MDA and PC level may be explained with increased GSH level that prevented oxidative damage to lipids and proteins. Therefore, it can be concluded that the tested *Pseudo-nitzschie* species into the nutrient medium secrete metabolite(s), which can induce oxidative stress in human blood cells.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 42 pages, 14 figures, 3 tables and 41 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Pseudo-nitzschia*, oxidative stress, glutathione, malondialdehyde, protein carbonyls

Mentors: **Ana-Marija Domijan, Ph.D.**, Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Mirta Smodlaka Tanković, Ph.D.** Research Associate, Institute Ruđer Bošković, Center for Marine Research, Rovinj

Reviewers: **Ana-Marija Domijan, Ph.D.**, Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Mirta Smodlaka Tanković, Ph.D.** Research Associate, Institute Ruđer Bošković, Center for Marine Research, Rovinj  
**Erim Bešić, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2022.

