

Molekularna

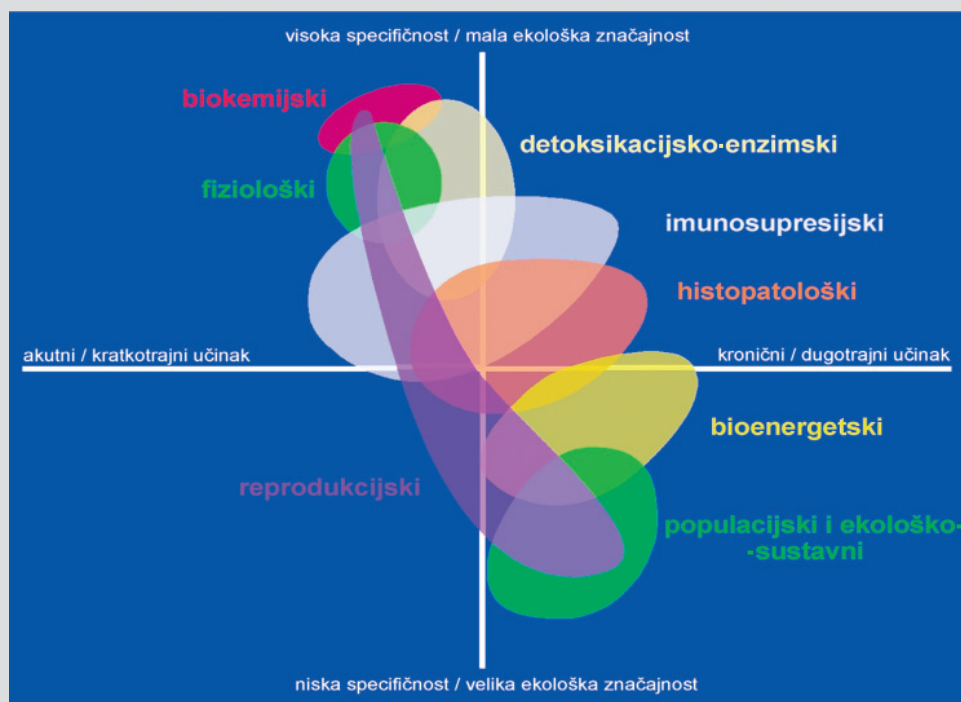
EKOTOKSIKOLOGIJA I BIOKEMIJA

Ivan MIHALJEVIĆ, Jovica LONČAR i Tvrtko SMITAL, Zagreb

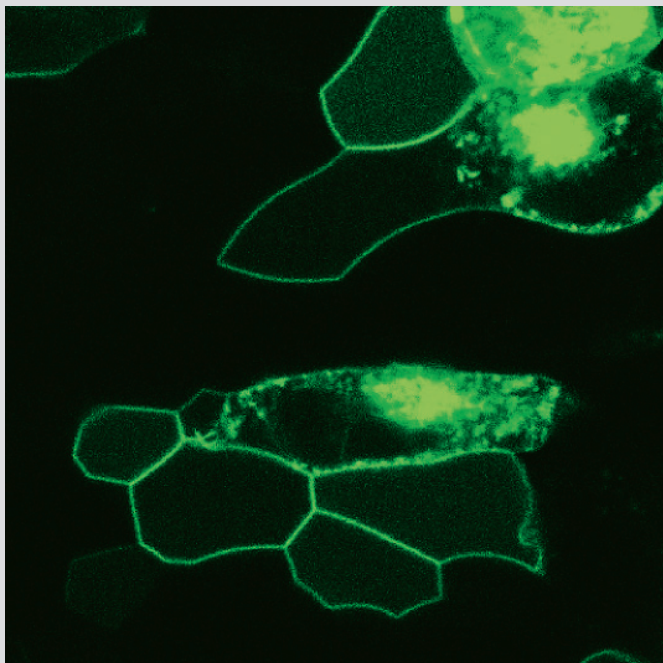
Okoliš je svakodnevno pod sve većim pritiskom čovjeka. Trenutno je u svijetu više od 120 milijuna registriranih kemijskih tvari, s dnevnim prirastom od 15 000 novih tvari. U svakodnevnoj komercijalnoj upotrebi u Europskoj uniji je oko 100 000 tvari pri čemu su toksikološki podaci raspoloživi za samo 9 %, a ekotoksikološki za 3 %. Ovi podatci naglašavaju nedostatak potrebnih informacija, neophodnih za uspješnu zaštitu okoliša od velikog broja štetnih tvari i veliku potrebu za intenzivnijim toksikološkim i ekotoksikološkim istraživanjima.

Znanost o okolišu može se definirati kao istraživanje tla, zraka, vode i bioloških staništa te učinaka tehnologije na sve navedeno. Toksikologija je pri tome jedna od najvažnijih disciplina, a glavni su joj ciljevi istraživanje, razumijevanje i predviđanje poremećaja fizioloških procesa koje uzrokuju štetne tvari. Uspjeh toksikoloških metoda ovisi o različitim disciplinama koje pripadaju području fiziologije kao što su biokemija, patofiziologija, neurofiziologija, endokrinologija, imunologija.

Toksikološka istraživanja u području znanosti o okolišu služe procjeni toksičkog rizika te se svrstavaju u disciplinu pod nazivom ekotoksikologija. Ekotoksikološka istraživanja tipično se provode korištenjem jedinki nekih vrsta koje su reprezentativ-



Slika 1. Važnost biokemijskih markera u procjeni okolišnog rizika. Biokemijski markeri pokazuju visoku specifičnost u odnosu na ostale markere, ali opisuju kratkotrajne (akutne) efekte pojedine tvari ili smjese tvari na organizam, koji ne moraju nužno imati veliki utjecaj na populaciju.



Slika 2. Lokalizacija proteinskih prijenosnika u staničnim membranama. Prijenosnici su kloniranjem specifično obilježeni s GFP (engl. *Green Fluorescent Protein*) proteinima, koji pri detekciji daju zeleni signal.

ne za okoliš kao što su ribe, školjke, ježinci, glodavci, ali i brojni beskralježnjaci. Međutim, kako bi se odredile maksimalne dopuštene koncentracije za pojedinu tvar, potrebno je dobro razumijevanje fizioloških i biokemijskih procesa na razini stanice, odnosno organizma u cjelini. Učinak toksične tvari ovisi o dva ključna čimbenika:

- (1) koncentraciji na mjestima unutar organizma na kojima toksična tvar može prouzročiti štetu, te
- (2) o urođenim svojstvima organizma na razini jedinke ili vrste (aktivnost i zastupljenost transportnih proteina, biotransformacijskih enzima, mehanizama popravka DNA itd.).

Sve je ovo važno radi pravilnog odabira vjerodostojnog biološkog pokazatelja (biomarkera), tj. molekularnog ili fiziološkog indikatora izloženosti štetnom djelovanju. Stoga su metode molekularne biologije i biokemije, kao i izučavanje relevantnih biokemijskih, biotransformacijskih i fizioloških procesa veoma važne u ekotoksikološkim studijama. Kako bi se mogao pratiti i ocijeniti učinak neke strane, potencijalno štetne tvari na živi organizam, nužno je razviti odgovarajuće biološke testove. Ovakva istraživanja obično podrazumijevaju uspostavljanje kulturâ stanica, izolaciju proteinâ, praćenje transkripcijskih i translacijskih procesa itd. Posljedični biokemijski pokazatelji u ekotoksikološkom smislu spadaju u skupinu visoko specifičnih markera i izuzetno su važni alati za procjenu okolišnog rizika, jer pomoću njih možemo otkriti utjecaj potencijalno štetne tvari u vrlo ranim fazama utjecaja na organizam i populaciju (sl.

1.). Biokemijske promjene u istraživanom organizmu dalje se mogu povezati s kaskadom potencijalnih promjena, od fizioloških i genotoksičnih događaja koji ne moraju nužno imati veliki utjecaj na populaciju, do reproduktivnih, bihevioralnih i razvojnih promjena, puno značajnijih na populacijskoj razini.

Djelovanje stranih tvari i razvoj testnih sustava

Ulasku strane tvari u stanicu, tkivo ili organizam u kojem će iskazati štetni učinak najčešće posreduju proteinski prijenosnici koji omogućuju prolaz tih tvari kroz staničnu membranu (sl. 2.). Membranski prijenosnici su važni jer je njihova uloga ključna za sudbinu štetne tvari, koja se može djelovanjem enzimskog detoksikacijskog sustava transformirati u nešto manje ili više toksično, izlučiti iz organizma ili djelovati štetno. Stoga membranski prijenosnici zajedno s enzimima detoksikacijskog sustava čine osnovu tzv. ADME-procesa: apsorpcije, distribucije, metabolizma i ekskrecije stranih tvari u organizmu.

Ispitivanje uloge membranskih prijenosnika kao i biotransformacijskih enzima zahtijeva razvoj prikladnih testova. Prvi korak u tom razvoju je odabir pogodnog modelnog organizma. Pri tome treba voditi računa na koji dio okoliša pojedina strana tvar ima najveći utjecaj, kako bi se primjerice odlučili između kopnenog ili vodenog organizma. Kako gotovo sve strane tvari unesene u okoliš na kraju ipak završe u vodama, ribe predstavljaju važne modelne organizme u ekotoksikološkim istraživanjima. Širom svijeta se u ekotoksikološkim istraživanjima koriste brojne modelne riblje vrste, a glavni kriteriji pri njihovom odabiru su njihove



Slika 3. Zebrica (*Danio rerio*) je jedan od najznačajnijih životinjskih modela u razvojnoj biologiji, biomedicini i ekotoksikologiji.

TKO SU AUTORI OVOG ČLANKA?

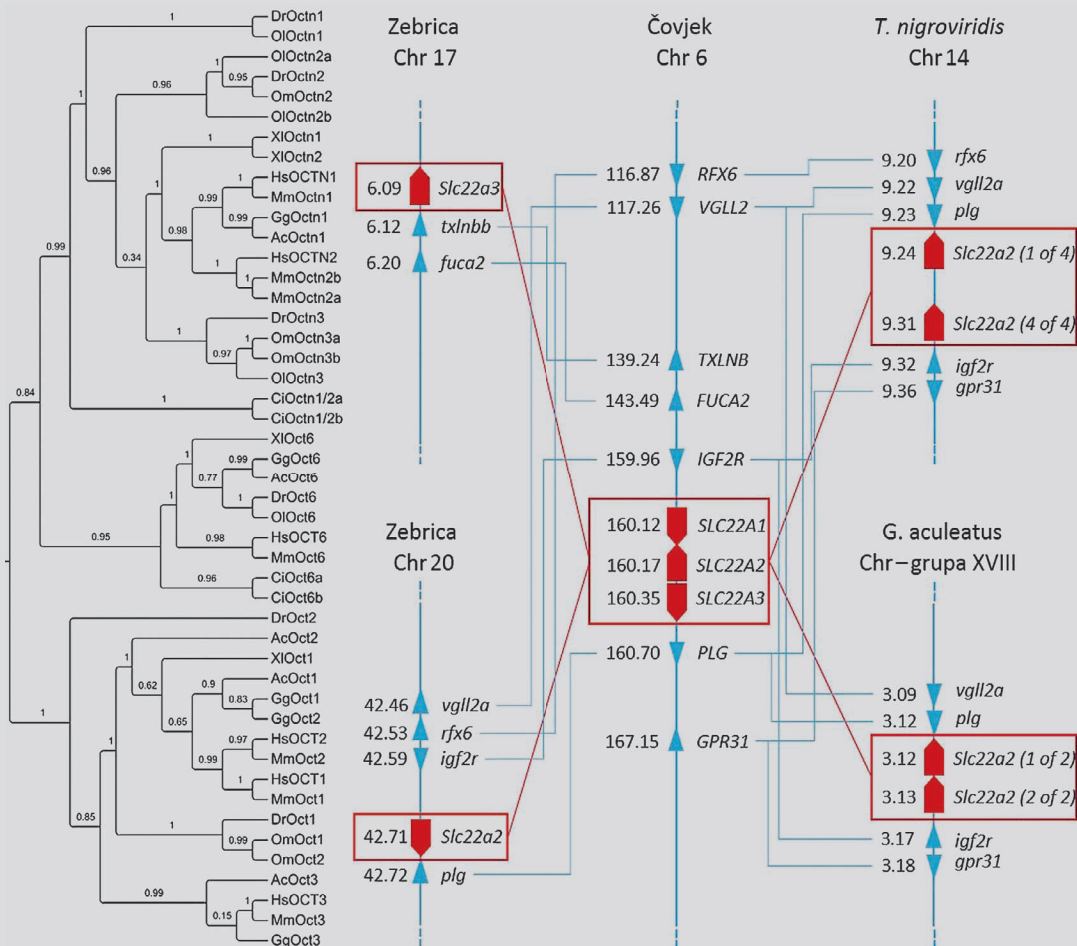
Dr. sc. Ivan Mihaljević zaposlen je na Institutu Ruđer Bošković kao poslijedoktorand u Laboratoriju za molekularnu ekotoksikologiju Zavoda za istraživanje mora i okoliša. Glavni fokus njegovog istraživanja je detaljna karakterizacija prijenosnika organskih kationa zebriće.

Dr. sc. Jovica Lončar zaposlen je na Institutu Ruđer Bošković kao stručni suradnik u Laboratoriju za molekularnu ekotoksikologiju Zavoda za istraživanje mora i okoliša. Istražuje mehanizme detoksikacije kod vodenih organizama.

Dr. sc. Tvrтко Smital zaposlen je na Institutu Ruđer Bošković kao znanstveni savjetnik. Voditelj je Laboratorija za molekularnu ekotoksikologiju Zavoda za istraživanje mora i okoliša. Glavni fokus njegova istraživanja je uloga membranskih transportnih proteina kao integralnog dijela staničnog obrambenog mehanizma vodenih organizama te identifikacija i prioritizacija organskih zagađivala u vodenom okolišu.

va staništa, rasprostranjenost i jednostavnost uzgoja u laboratorijskim uvjetima. U molekularnoj ekotoksikologiji i biokemiji važan dodatni čimbenik odabira modelnog organizma je detaljno poznavanje njegovog genoma. Potpuno sekvencirani genomi predstavljaju temelj istraživanja u molekularnoj biologiji. Bez po-

znate sekvencije gena i podataka o organizaciji na razini genoma gotovo je nemoguće provesti detaljna istraživanja vezana uz zastupljenost istraživanog gena i proteina koji kodira, i u konačnici njegove funkcije u organizmu. Počevši od 1976. godine, kada je sekvenciran prvi genom bakteriofaga MS2, preko prvog bakterijskog genoma 1986. i do prvog eukariotskog genoma pekarskog kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*), važnost poznavanja genoma u brojnim istraživanjima postajala je sve značajnija i vodila je u konačnici sekvenciranju ljudskog genoma 2001. godine. Usporedno s projektom sekvenciranja ljudskog genoma provedeni su i projekti sekvenciranja genoma brojnih modelnih životinja, pa je tako u razdoblju od 2001. do danas sekvenciran velik broj genoma, među kojima se ističu mišji te za naša istraživanja jako bitan genom ribe zebriće (*Danio rerio*). Danas je genom zebriće najbolje karakterizirani genom neke riblje vrste, koji je pokazao velike sličnosti s ljudskim genomom s kojim dijeli 70 % gena istog porijekla, što je jedna od važnih prednosti zebriće kao modelnog organizma (sl. 3.). Stoga se zebrića u zadnja dva desetljeća ističe kao jedan od najvažnijih modelnih organizama ne samo u ekotoksikološkim istraživanjima, već i u razvojnoj biologiji i biomedicini, gdje u mnogim aspektima posjeduje karakteristike koje



Slika 4. Rezultati filogenetske analize i analize sintenije (očuvanosti poretka gena u genomu) zebrićinih gena za prijenosnike organskih kationa (*Oct1* i *Oct2*), koji su dobiveni bioinformatičkom analizom baza genoma zebriće i ostalih kralježnjaka.

joj daju prednost pred glodavcima kao najzastupljenijim modelnim organizmima.

Naš pristup u ekotoksikološkim istraživanjima može se podijeliti u nekoliko standardnih koraka. Prvi korak je pretraga genoma organizma, s fokusom na zebriću, u kojem se želi istražiti određeni protein (sl. 4.). Nakon što je željeni gen detektiran pristupa se mjerenju prisutnosti u različitim tkivima na razini mRNA i proteina.

Ako se potvrdi da je protein prisutan u nekom od tkiva ili tipova stanica, sljedeći korak je izolacija tog proteina, odnosno razvoj prikladnog testnog sustava koji bi omogućio detaljno ispitivanje njegovog međudjelovanja s različitim stranim tvarima (lijekovima, industrijskim zagađivalima itd.). U ovom koraku posebna pozornost posvećuje se genima koji su pokazali visoku zastupljenost u toksikološki bitnim tkivima i organima, poput jetre, bubrega, crijeva, ili škrge kao organa koji je najizloženiji stranim tvarima u vodenom okolišu. Korištenjem osnovnih metoda molekularne biologije kao što su kloniranje, što uključuje izolaciju DNA, izdvajanje ili »hvatanje« želenog gena kao i njegovo umnažanje posredstvom posebnih sojeva bakterija te ekspresiju želenog gena i proteina u staničnim linijama (stanica izdvojenih iz tkiva te izmijenjenih tako da se mogu dijeliti), razvijamo testne sustave koji nam omogućuju detaljno ispitivanje funkcije proteina. Nakon testiranja većeg broja poznatih kemikalija i pronalaženja najboljih uvjeta uzgoja i procjene aktivnosti, spremni smo razvijeni modelni sustav isprobati na uzorcima otpadne ili površinske vode, tla, sedimenta ili tkivnih pripravaka. Potraga za najboljim uvjetima testnog sustava također znači i određivanje osnovnih biokemijskih parametara kao što su: afinitet vezanja, brzina otpuštanja i transport tvari proteinima, te konstante inhibicije transporta modelnih supstrata poznatim inhibitorima. Zaključno, detaljna molekularna karakterizacija ekotoksikološki važnih proteina i optimizacija testnih sustava u kojima oni mogu obavljati svoju funkciju čini bazu ekotoksikoloških istraživanja okolišnih uzoraka. Ovdje također treba naglasiti da se ovakvi testovi temelje na sustavima *in vitro*, gdje se utjecaj strane tvari na funkciju promatranog proteina promatra izvan organizma, u odabranim ili posebno razvijenim staničnim ili bakterijskim kulturama.

Važan korak naprijed u istraživanjima bio bi ulazak u *in vivo* svijet istraživanja na razini organizma, s naglaskom na funkcionalnoj genomici. Funkcionalna genomika kod zebrića zadnjih je godina znatno napredovala pa su razvijene brojne metode koje bi se mogle primijeniti i u ekotoksikološkim studijama. Ovdje najveći značaj imaju metode poput morfolina, TALEN i CRISPR-Cas9 tehnologije, koje omogućuju manipulaciju genima i pomoću kojih bi se mogli utišati ili potpuno izbrisati poje-

dini geni za potencijalno ekotoksikološki važne proteine te na živim ribama vidjeti koliki je njihov značaj u toksikološkoj obrani organizma od stranih tvari.

Testiranje okolišnih uzoraka

Prije opisa testiranja okolišnih uzoraka metodama molekularne ekotoksikologije treba razlikovati pojmove poput ksenobiotika, onečišćivača i zagađivala. Ksenobiotik je organizmu strana tvar koja ne predstavlja sastavni dio određenog biološkog sustava. Onečišćivač je pak tvar koja je utvrđena na nekom mjestu, u vremenu i koncentraciji u kojoj se ne pojavljuje u prirodnoj okolini, ali koja nije uzrokovala štetu niti u jednom dijelu okoline. Zagađivalo je tvar koja je nanijela štetu prirodnoj ili stvorenoj okolini.

Okolišni uzorci su kompleksne smjese koje mogu sadržavati velik broj, tipično tisuće različitih tvari što obično ovisi o izvoru zagađenja. Tako će, u pravilu, različiti spojevi biti prisutni u uzorcima vode, tla ili zraka koji su izloženi utjecaju naftne industrije u odnosu na one koji su pod utjecajem farmaceutske industrije. Kompleksnost okolišnih uzoraka očituje se i u tome što pojedini elementi uzorka mogu imati antagonističko ili sinergističko djelovanje na modelni sustav. Također, treba voditi računa i o metabolitima koji nastaju raspadom inicijalnih stranih tvari u okolišu, a koji također mogu imati utjecaj na istraživani protein. Ponekad nije potrebno tzv. antropogeno zagađenje da bi u okoliš dospjeli otrovni spojevi jer i sama priroda može biti uzročnik, primjerice kod »cvjetanja« algi. Primjerice, cijanobakterijsko »cvjetanje« predstavlja jedan od vrlo zanimljivih prirodnih događaja, koji s ekotoksikološkog aspekta još uvijek nije dovoljno istražen. Manjak informacija posljedica je kompleksnosti ovih uzoraka i nedovoljnog istraživanja na dovoljno razvijenim ekotoksikološkim modelima. Sirovi uzorak iz okoliša nužno je pripremiti za daljnju obradu (sušenje, mljevenje, uparivanje do suhog ostatka ili ekstrakcija na afinitetnim kolonama) odnosno za testiranje biološkim testovima. Nakon ovih zahtjevnih postupaka pripreme okolišnog uzorka konačno dolazimo u fazu za koju smo i razvijali testni sustav, s krajnjim ciljem utvrđivanja tvari koje štetno utječu na pojedine ključne elemente stanične obrane, primjerice transportne proteine ili detoksikacijske enzime. Da bi se došlo do identifikacije nužno je uz biološke testove primijeniti i metode kemijske analize kako bi se kompleksne smjese spojeva razdvojile i na taj način olakšalo utvrđivanje bioloških učinaka. Tu govorimo o suradnji okolišne kemije i ekotoksikologije, koja rezultira EDA (engl. *Effects-Directed Analysis*) studijama, tj. laboratorijskim postupcima pri kojima se složeni uzorci iz okoliša tretiraju različitim kemijskim i ekotoksikološkim metodama da bi se tako moglo identificirati dotično zagađivalo. Biološku bazu ovih studija čine opisani postupci detaljne karakterizacije ekotoksikološki važnih proteina.