

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
POSTDIPLOMSKI STUDIJ PRIRODNIH ZNANOSTI

KEMIJA

Željko Jakšić

INDUKCIJA CITOKROMA P-450 1A<sub>1</sub> U JETRI LUBINA

*Discentrarchus labrax* (L.) KSENOBIOTICIMA

MAGISTARSKI RAD

Rovinj, 1993.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**POSTDIPLOMSKI STUDIJ PRIRODNIH ZNANOSTI**  
**KEMIJA**

**ŽELJKO JAKŠIĆ**

**INDUKCIJA CITOKROMA P-450 1A1 U JETRI LUBINA**  
*Dicentrarchus labrax (L.)* KSENOBIOTICIMA

**MAGISTARSKI RAD**

**Rovinj, 1993**

Ovaj rad predan je Vijeću postdiplomskog studija prirodnih znanosti, područje kemije, Sveučilište u Zagrebu, u svrhu stjecanja znanstvenog stupnja magistra prirodnih znanosti iz područja kemija-oceanologija

Ovaj je magistarski rad izrađen u Laboratoriju za morsku molekularnu biologiju i Laboratoriju za ekofiziologiju i toksikologiju Centra za istraživanje mora Rovinj, Instituta "Ruđer Bošković" Zagreb, te na Institutu za fiziološku kemiju Sveučilišta "Johannes Gutenberg" u Mainzu, Njemačka.

Zahvaljujem voditelju dr Renatu Batelu na uvođenju u ovu problematiku i pomoći do konačnog oblikovanja rada. Posebno se zahvaljujem dr. Nevenki Bihari, i mr. Mileni Mičić na korisnim savjetima, diskusijama i kritičkom osvrtu na moj rad.

Kolegama, Valteru Krajcaru, mr. Siniši Petroviću, Željku Stipiću, dr. Mirjani Najdek, Nastjenjki Supić i mr. Ingrid Ivančić iz Centra za istraživanje mora Rovinj, najtoplije se zahvaljujem na uzorkovanju i pomoći tijekom obrade podataka na računalu, te kolegama sa Sveučilišta u Mainzu na prijateljskoj podršci i razumijevanju.

Rad je opremljen i izrađen sredstvima Ministarstva znanosti, tehnologije i informatike Republike Hrvatske, te sredstvima GKSS Forschungszentrum Geesthacht GmbH, Njemačka.

# SADRŽAJ

SVRHA RADA .....	1
1. UVOD .....	2
1.1. UPOTREBA BIOMARKERA KAO INDIKATORA ZAGAĐENJA ....	2
1.2. DEFINIRANJE ZAGAĐENOSTI ROVINJSKOG PRIOBALJA .....	7
1.3. CITOKROM P-450 MONOOKSIGENAZE .....	9
1.3.1. OSNOVNE KARAKTERISTIKE I MOLEKULSKA SVOJSTVA .....	9
1.3.2. MEHANIZAM ENZIMSKE REAKCIJE .....	15
1.3.3. MOLEKULSKA SVOJSTVA OSTALIH ENZIMA FAZE I I FAZE II .....	17
1.3.3.1. NADPH-citokrom P-450 reduktaza .....	17
1.3.3.2. Citokrom b <sub>5</sub> .....	18
1.3.3.3. NADH-citkrom b <sub>5</sub> reduktaza .....	18
1.3.3.4. Epoksid hidrolaza .....	18
1.3.3.5. UDP-glukuronil transferaze .....	19
1.3.3.6. Glutation S-transferaze .....	19
1.3.4. INDUKCIJA CITOKROMA P-450 .....	20
1.3.5. CITOKROM P-450 MONOOKSIGENAZE U RIBA I NJIHOVA ULOGA U BIOMONITORINGU .....	23
1.3.6. CITOKROM P-450 SUSTAV U LUBINA <i>Dicentrarchus                 labrax (L.)</i> .....	29
2. MATERIJALI .....	30
2.1 ORGANIZMI I NAČIN TRETIRANJA .....	30
2.2.KEMIKALIJE .....	31

3. METODE	33
3.1. PRIPREMA EKSTRAKATA MORSKE VODE	33
3.2. PRIPREMA I OTAPANJE MIKROSOMSKE FRAKCIJE	33
3.3. ODREĐIVANJE PROTEINA	34
3.4. ODREĐIVANJE DIFERENCIJALNOG SPEKTRA	
P-450 I P-420	34
3.5. ODREĐIVANJE EROD I PROD AKTIVNOSTI	34
3.6. SDS-PAGE	35
3.7. WESTERN BLOTTING	37
3.8. ELISA	38
3.9. IZOLACIJA PLAZMIDA pUC 18	39
3.10. RESTRIKCIJSKA ANALIZA	39
3.11. ELEKTROFOREZA DNA	40
3.12. REIZOLACIJA DNA	40
3.13. OBILJEŽAVANJE PLAZMIDNE DNA	41
3.14. IZOLACIJA RNA	41
3.15. DOT BLOTTING	42
3.16. HIBRIDIZACIJA m-RNA I DNA	42
3.17. DETEKCIJA HIBRIDIZIRANE DNA	
KEMOLUMINISCENCIJOM	43
3.18. PRIKAZ I OBRADA REZULTATA	43
4. REZULTATI	44
4.1. BIOKEMIJSKE KARAKTERISTIKE CITOKROMA P-450	
MIKROSOMSKE FRAKCIJE JETRE LUBINA	44
4.1.1. Diferencijalni spektri	44
4.1.2. Određivanje EROD aktivnosti	46
4.1.2.1. Ovisnost EROD aktivnosti o koncentraciji NADPH	46

4.1.2.2. Ovisnost EROD aktivnosti o koncentraciji supstrata	47
4.1.2.3. Ovisnost EROD aktivnosti o količini mikrosomske frakcije jetre lubina	48
4.1.2.4. Ovisnost EROD aktivnosti o vremenu inkubacije	49
4.1.2.5. Odabir optimalnih uvjeta za mjerenja EROD i PROD aktivnosti	50
4.1.3. Određivanje molekulske mase monomera CYP 1A1	50
4.2. ODREĐIVANJE EROD I PROD AKTIVNOSTI	54
4.3. ELISA	59
4.4. MEĐUSOBNI ODNOS REZULTATA EROD AKTIVNOSTI I KOLIČINE CYP 1A1 (ELISA)	63
4.5. ANALIZA <i>DE NOVO</i> SINTEZE CYP 1A1 m-RNA	66
5. DISKUSIJA	68
6. ZAKLJUČCI	74
7. SAŽETAK	76
8. SUMMARY	77
9. LITERATURA	78
10. DODACI	98
POPIS KRATICA	98
ŽIVOTOPIS	99
PODACI O MAGISTARSKOM RADU	100

## **SVRHA RADA**

Po preporuci FAO/IOC/UNEP komisije trebalo je razraditi metodu detekcije organskih zagađivala-inducera oksidaza miješanih funkcija u moru za potrebe monitoringa ksenobiotika. U tu je svrhu trebalo definirati pogodan sustav i metode za određivanje indukcije citokroma P-450 monooksigenaza u riba modelnim zagađivalima i ekstraktima morske vodei sa različitih lokacija rovinjskog priobalja.

Obuhvaćena je analiza EROD i PROD aktivnosti u jetri ribe *Dicentrarchus labrax*, kao i njihova korelacija sa količinom CYP 1A1 proteina i CYP 1A1 m-RNA. Posebno je trebalo pokazati da promjene u EROD aktivnosti uzrokovane modelnim ksenobioticima i zagađivalima sa prirodnih lokacija pozitivno prate promjene u količini CYP 1A1 i novonastale CYP 1A1 m-RNA. Te su se metode pokazale podesne za brzu i jednostavnu detekciju smjesa zagađivala-ksenobiotika u moru.



## **1. U V O D**

## 1.1. UPOTREBA BIOMARKERA KAO INDIKATORA ZAGAĐENJA

Velika količina kemijskih proizvoda koji su za prirodu i organizme u njoj strani (ksenobiotici) ispuštaju se u okolinu tijekom proizvodnje, skladištenja, prijevoza i upotrebe ili u obliku krajnjeg otpada. Najveći dio prirodnih i antropogenih tvari biva oborinskim i otpadnim vodama unešen u vodotokove i njima u more, gdje se zbog svoje slabe razgradnje bioakumuliraju u morskim organizmima i biomagnificiraju u lancu prehrane, čime se njihov štetan utjecaj na ekosistem povećava. Glavnina zagađenja ostaje u blizini mjesta ulaska, tako da su obale mora, a osobito djelovi u blizini ljudske djelatnosti primarni tzv. točkasti izvori zagađenja hranjivim solima (fosfor, dušik, silicij), specifičnim organskim tvarima (detergenti, fenoli, mineralna ulja, pesticidi, herbicidi, policiklički aromatski ugljikovodici), metalima (živa, olovo, krom, cink) i radionuklidima (UNEP/ECE/UNIDO/FAO/UNESCO/WHO/IAEA, 1984; Helmer, 1977). Tim kontinuiranim zagađivanjem mora kemijskim tvarima porasla je briga i za biološki učinak zagađivala na morske organizme.

Zbog velikog broja i raznolikosti umjetno sintetiziranih spojeva i spojeva nastalih prirodnim procesima, ne može se procijeniti stvaran utjecaj pojedinog kemijskog spoja na pojedinu biološku vrstu. U pravilu ti su kemijski spojevi nazočni u mješavinama, različito su dostupni organizmu i različitim se intenzitetom bioaktiviraju u krajnje, toksične produkte. Slično je i sa biološkim odgovorima koji su različiti, od onih najosjetljivijih koji se opažaju u promjeni ponašanja, preko anatomskih i citoloških abnormalnosti pa sve do letalnih. Stupanj do kojeg će neki morski organizam biti ugrožen zbog nazočnog zagađenja, razlikuje se od vrste do vrste. Općenito su najugroženije životne zajednice morskog dna, odnosno bentos (GESAMP, 1977). Glavni razlog tome jesu teško topljive supstance koje se adsorbiraju na suspendiranu tvar s kojom padaju na dno gdje se nakupljaju u sedimentu (Neff, 1978). Priroda ulaska zagađivala, njihovo nakupljanje i sudbina u organizmu je vrlo složena. Zagađivala adsorbirana na sediment ulaze u organizam na razne načine: putem intersticijske vode, hranjenjem sa površine

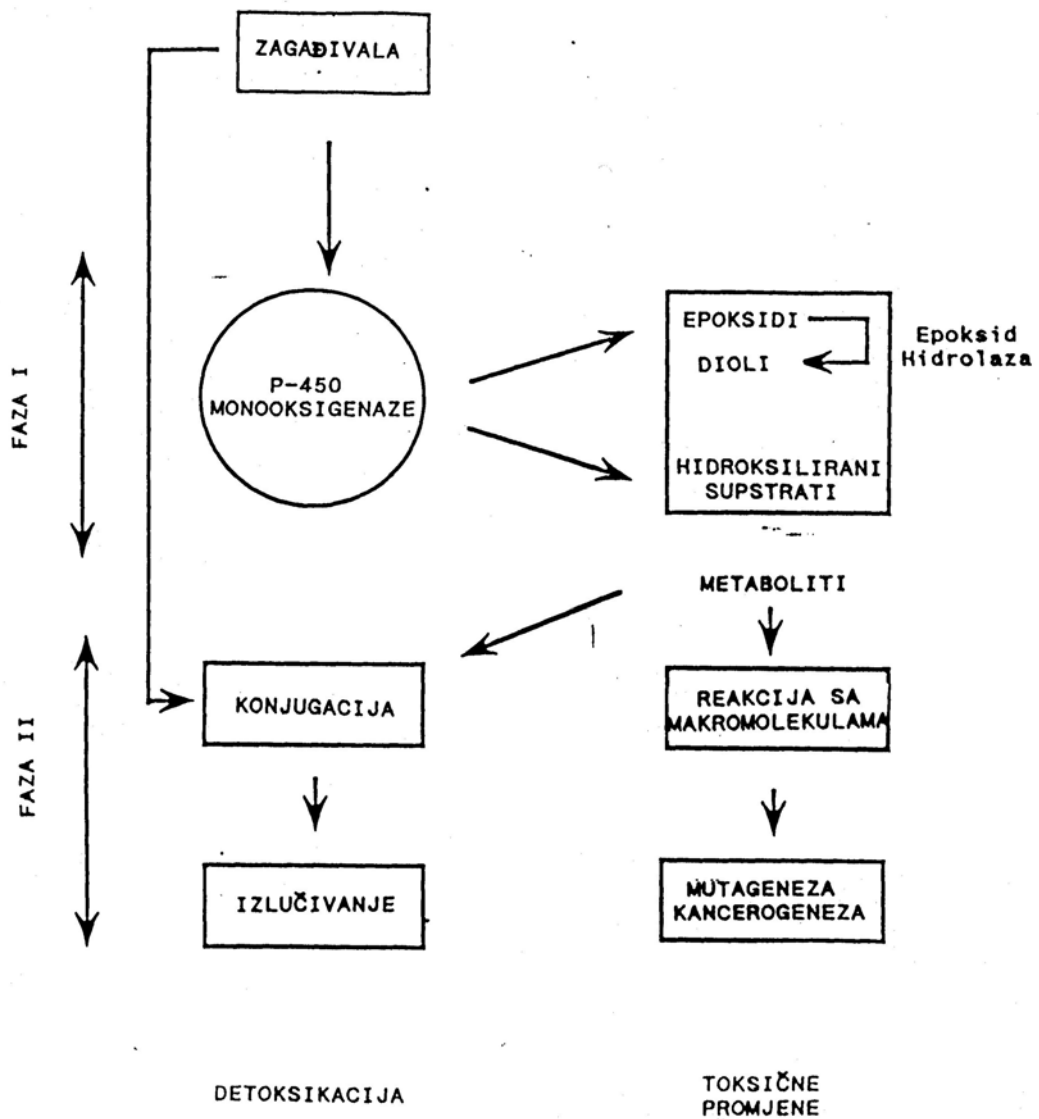
sedimenta i direktnim kontaktom sa sedimentom. Ulazak zagađivala i njihova akumulacija ovisi o nekoliko čimbenika, kao što su stanište i uloga pojedinog organizma u prehrambenom lancu, prisutnost i vrijeme zadržavanja zagađivala u vodi ili sedimentu, te njegova fizikalno-kemijska svojstva (molekularna težina, polarnost, hlapivost i sl.). Mehanizam ulaska zagađivala uključuje procese kao što su difuzija, aktivni transport i adsorpcija. Međusobnim djelovanjem različitih grupa zagađivala prisutnih u moru ti se procesi mogu značajno modulirati. Zato je značajno odrediti i mjeriti ugroženost ne samo jedinke, već i više stupnjeva integracije vrste, uključivši i stupanj ekosustava.

Kemijsko-analitički nalaz specifičnih zagađivala u tkivu organizma sam za sebe ne dokazuje i postojanje biološkog rizika u izloženih organizama. Nakon ulaska u organizam kroz škrge, kožu ili usta, zagađivala se nagomilavaju u tkivima i metaboliziraju. Posljedice nagomilavanja i metabolizma zagađivala, tj. njihov učinak na organizam, mogu se procijeniti na različitim razinama biološke organizacije, kao što su molekularni nivo, subcelularni, stanični nivo, tkivo, organ, organizam, nivo jedinke, populacije ili zajednice. Proučavanja svakog pojedinog nivoa daju informacije koje pomažu u razumijevanju i objašnjavanju odnosa između izloženosti zagađivalima i njihovog štetnog učinka. Promjene u biološkom sustavu uzrokovane prisutnošću i djelovanjem zagađivala ili grupe zagađivala smatraju se krajnjim točkama, biološkim markerima, biomarkerima, izloženosti organizma. Biomarkeri pokazuju da je zagađivalo ušlo u organizam, stiglo na mjesto toksičnog ili genotoksičnog djelovanja te izazvalo štetni učinak. Postoji više vrsta biomarkera. Oni se mogu podijeliti u skupine određene prirodom krajnjih točaka toksičnog ili genotoksičnog djelovanja. Anatomske i citološke abnormalnosti su najpoznatiji biomarker koji se dugo upotrebljavao kao pokazatelj pogubnog učinka zagađivala. Različiti tipovi adaptivnih biokemijskih i imunoloških promjena u organizmu su također korišteni kao biomarkeri. Tako su promjene u serumskim proteinima i lipidima, oštećenja lizosomalnih membrana i promjena u profilu amino-kiselina, korištena kao pokazatelj stresa. Kao indikator nazočnosti teških metala korištena je indukcija enzimskog detoksikacijskog sustava metalotioneina, a kao indikator zagađenja organskim

spojevima, indukcija enzimskog sustava citokrom P-450 oksidaza miješanih funkcija. Nakon ulaska u organizam kroz škrge, usni otvor ili površinu tijela lipofilni se spojevi akumuliraju u tkivima bogatim lipidima nakon čega slijedi njihova oksidacija u hidrofilne produkte koji se ili izlučuju iz organizma ili vežu na nukleofilna mjesta makromolekula (Gelboin, 1980). Primarno mjesto metabolizma ksenobiotika u riba je jetra, koja sadrži najvišu aktivnost OMF (citokrom P-450 monooksigenaze ili mikrosomske monooksigenaze) odgovornih za njihovu detoksikaciju. Prvi stupanj u biotransformaciji je, tzv. "faza I" (Williams, 1974), ugradnja jednog atoma molekularnog kisika u supstrat, a drugog u vodu, nakon čega slijedi "faza II" u kojoj dolazi do konjugacije u glutation, glukuronid ili sulfat konjugat pri čemu se ti lipofilni spojevi transformiraju u vodotopive produkte lako izlučive iz organizma putem žuči ili urina (slika 1.). Istovremeno, oksidacijom nekih lipofilnih tvari nastaju reaktivni intermedijeri koji mogu izazvati toksične učinke, uključujući i stvaranje neoplazija (Farber i Sarma, 1986).

Kao indikator nazočnosti genotoksičnih spojeva u moru, tj. onih spojeva koji utječu na strukturu i funkciju DNA, proučavani su različiti tipovi oštećenja DNA kao što su lomovi u DNA, stvaranje adukata, kromosomske aberacije i sl. Biomarkeri mjereni na molekularnoj i staničnoj razini organizma, kao što su oštećenja DNA i promjene u aktivnosti enzima, daju osjetljiv i specifičan odgovor na određeno zagađivalo ili grupu zagađivala. Ovi biomarkeri daju mjeru izloženosti organizma, te mogu dijagnosticirati vrstu ili grupu zagađivala kojim je organizam bio izložen. Međutim, biološki značaj za organizam, i najvažnije za strukturu i funkciju populacije ili ekosistema ostaje nerazjašnjen. Nasuprot tome, biomarkeri mjereni na visokoj razini biološke organizacije, kao što su brojnost i različitost vrsta u populaciji, od direktnog su ekološkog značenja, međutim ne dokazuju sami za sebe da li su izmjerene promjene uzrokovane zagađenjem ili prirodnim ekološkim čimbenicima (Adams i sur., 1989). S obzirom da biomarkeri na molekularnom i biokemijskom nivou odgovaraju brzo na promjene u okolini izazvane zagađivalima mogu poslužiti kao vrijedan i dragocijen indikator smjera promjena u okolini izazvanih zagađivalima te njihovog potencijalnog učinka na mjesto proučavanja.

Prema tome, biomarkeri se mogu smatrati ranim, upozoravajućim signalom izloženosti organizma zagađivalima, odnosno mogu poslužiti u svrhu procjene zagađenja okoline te biti uključeni u programe praćenja zagađenja mora. Za oživotvorenje upotrebe biomarkera za praćenje (monitoring) promjena u okolini uzrokovanih zagađivalima potrebno je istraživati one osnovne mehanizame kojima zagađivalo izaziva promjene u živih organizama i interpretirati podatke dobivene na mjestima izloženosti organizama ("in situ") te razvijati nove analitičke tehnike. Navedeni pristupi su važne i međusobno ovisne komponente uspješnih programa praćenja zagađenja.



Slika 1. Shematski prikaz metabolizma zagađivala

## 1.2. DEFINIRANJE ZAGAĐENOSTI ROVINJSKOG PRIOBALJA

Dio urbanog otpada grada Rovinja ispušta se u glavnu luku. Otpadne vode iz tvornice za preradu ribe "Mirna", opterećene su organskim tvarima i ispuštaju se u sjeverni dio luke, u uvalu Valdibora. Otpad Tvornice duhana Rovinj i "Istragrafike", opterećen teškim metalima, ispušta se u južni dio luke, u kojoj se nalazi i Marina-Rovinj. Linski kanal je relativno čisto područje i nalazi se 9 km sjeverno od Rovinja, a iskorištava se kao uzgajalište kamenica, dagnji i riba (UNEP, 1988).

Utjecaj zagađivala na organizme u priobalju Rovinja utvrđen je promjenama procesa degradacije životnih zajednica, što podrazumjeva iščeznuće vodećih vrsta i zamjenu originalne zajednice tolerantnijim vrstama (Zavodnik, 1977). U jetri riba sa tih zagađenih lokacija Kurelec i suradnici (1977, 1979) pronašli su povećane aktivnosti enzima benzo(a)piren monooksigenaza (BPMO), a Bihari i suradnici (1990) povećani potencijal aktivacije pre-mutagenih spojeva u mutagene produkte u SOS-umu testu. Nadalje, analiza jednostrukih i dvostrukih lomova DNA dagnje *Mytilus galloprovincialis* (Herbert i Zahn, 1989; Vukmirović 1992; Vukmirović i sur., 1993 u tisku) te mjerenja DNA adukata (Kurelec i sur., 1990) kao i mjerenjem učestalosti kromosomskih aberacija u lokalnim populacijama dagnji (Al-Sabti i Kurelec, 1985) pokazuju se da su pojedine lokacije rovinjskog priobalja opterećene ksenobioticima.

Stupanj zagađenja rovinjskog priobalja određen je i Ames testom upotrebom ekvivalenata aktivnosti benz(a)pirena (Zahn i sur., 1982) kao i Microtox-testom opće toksičnosti sedimenta i vode (Bihari i sur., 1989). Ames test mjeri broj povratnih mutacija koje izaziva mutageni spoj u specijalno konstruiranom soju bakterije *Salmonella typhimurium* (Ames i sur., 1975), a Microtox-test mjeri inhibitore oksidativne fosforilacije (Bulich i Isenberg, 1981).

Na osnovu vrijednosti za aktivnosti benz(a)piren monoooksigenaze u jetri ribe *Blennius pavo* koje iznose; 1.6 za područje Lima, 8.0 za područje Tvornice duhana i 36.7 pmol 3-OH BaP/mg/min za područje ispred tvornice za preradu ribe "Mirna" (Kurelec i sur., 1977), odnosno, u jetri cipla *Mugil auratus* 280 pmol 3-OH BaP/mg/min (Kurelec i sur., 1979) i 180 pmol 3-OH BaP/mg/min (Bihari i sur., 1990) ispred ispusta Mirne, može se zaključiti o opterećenosti tih lokacija ksenobioticima. O opterećenosti tih lokacija ksenobioticima kazuje i povećani potencijal aktivacije aflatoksina b<sub>1</sub> (Bihari i sur., 1990) postmitohondrijskom frakcijom jetre riba *Mugil auratus* uhvaćenih ispred ispusta Tvornice ribljih konzervi Mirna (Indukcijski omjer iznosi  $3.9 \pm 0.8$  u SOS-*umu* testu, za razliku od kontrolnih iz Lima kod kojih indukcijski omjer iznosi  $1.1 \pm 0.1$ ).

Praćenja jednostrukih i dvostrukih lomova DNA hemolimfe prirodne populacije dagnji *Mytilus galloprovincialis* sa područja rovinjskog priobalja, pokazala su veću učestalost oštećenja DNA u područjima pod utjecajem industrijskog i urbanog otpada u odnosu na dagnje iz Limskog kanala (Herbert i Zahn, 1989; Vukmirović, 1992; Vukmirović i sur. 1993 u tisku) čime se također pokazalo da je to područje opterećeno genotoksičnim ksenobioticima. Na osnovi studija o učestalosti kromosomskih aberacija u škrigama dagnji možemo zaključiti da zagađenje genotoksičnim ksenobioticima (genotoksinima) pada u nizu Mirna, Tvornica duhana, Lim na osnovu vrijednosti za učestalost kromosomskih aberacija koje iznose: 2.9 % za Lim, 5.3 % za TD i 9.6 % za Mirnu (Al Sabti i Kurelec, 1985).

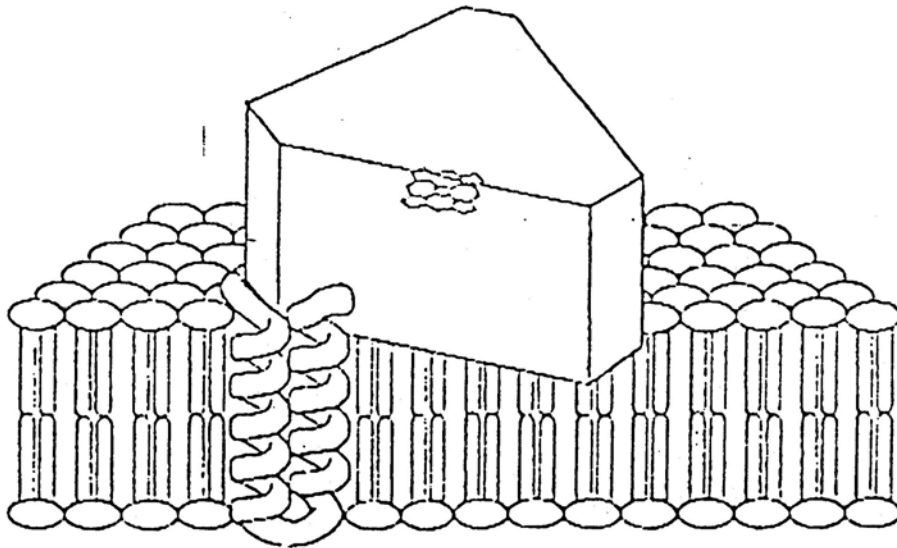


## 1.3. CITOKROM P-450 MONOOKSIGENAZE

### 1.3.1. OSNOVNE KARAKTERISTIKE I MOLEKULSKA SVOJSTVA

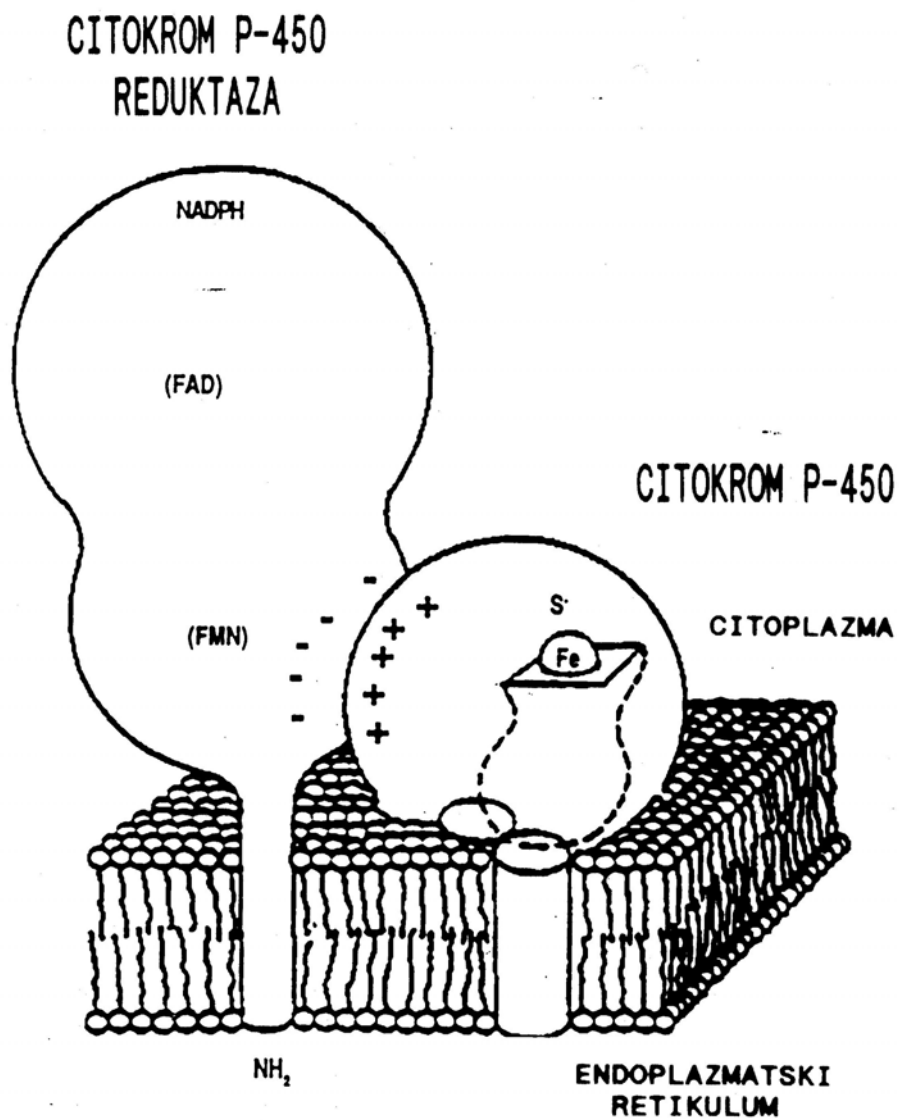
Sredinom pedesetih godina ovoga stoljeća proučavajući citokrom  $b_5$  došlo se do čudnog otkrića. U mikrosomskoj frakciji jetre izmjeren je maksimum absorbancije vidljivog svjetla na 450 nm nakon redukcije s  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  i ispiranja ugljičnim monoksidom. Kasnije se pokazalo da je zapravo otkriven do tada nepoznati pigment koji može biti reduciran s  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  ili s NADPH (Klingenberg, 1958; Garfinkel, 1958). Taj pigment je nazvan P-450 hemoprotein (Omura i Sato, 1962). U isto vrijeme raste i interes farmakologa za proučavanjem metabolizma različitih otrovnih supstanci u organizmu. Istraživanja mnogih autora ukazivala su na postojanje enzimskog sustava u endoplazmatskom retikulumu jetre koji sudjeluje u metabolizmu tih egzogenih supstanci. Pokazalo se da je citokrom P-450 (E.C. 1.14.14.1.) terminalna oksidaza tog enzimskog sustava uključenog u nekoliko važnih mono-oksigenaznih reakcija masnih kiselina, PAH-ova, steroida (Cooper, 1973), te da se na aktivno mjesto molekule citokroma P-450 vezuje supstrat koji se oksidira (Imai i Sato, 1966). Citokrom P-450 monooksigenaze uključene su u oksidativni metabolizam steroida, masnih kiselina, prostaglandina, leukotriena, biogenih amina i biljnih metabolita (Nebert i Gonzales, 1987). One metaboliziraju i veliki broj ksenobiotika, prekancerogena i mutagena pri čemu dolazi do njihove aktivacije. Sustav oksidaza miješanih funkcija je multienzimski kompleks u kojem je posljednji akceptor elektrona citokrom P-450 (Estabrook, 1978), a smješten je u endoplazmatskom retikulumu u lipidnom dvosloju koji pogoduje interakcijama s lipofilnim supstratima. Oko centralno postavljenog elektron transportnog flavoproteina NADPH-citokrom P-450 reduktaze (E.C. 1.6.2.4.) smješteno je 20-35 izoenzima citokroma P-450 sa okrenutim hidrofilnim regijama prema vani, tzv. funkcionalna rozeta (Estabrook i Werringloer, 1978). Nelson i Stabel (1988) predložili su nešto drugačiju topologiju citokroma P-450 (slika 2). Za nesmetano obavljanje svojih funkcija sustavu OMF trebaju uz pogodnu molekulu supstrata i molekule  $\text{O}_2$ , i donore elektrona NADPH ili NADH. U nekim

organizmima sastavni dio tog sustava je i flavoprotein adrenotoksin reduktaza i adrenotoksin (Fe-S protein) koji ima funkciju prijenosa elektrona na citokrom P-450 sa NADPH (Jefcoate, 1986). Sličan flavoprotein pronađen je i u bakterija, samo što je kod njih donor elektrona NADH (Sligar i Murray, 1986). Drugi tip elektron transportnog sustava pronađen je samo u endoplazmatskom retikulumu, a sastoji se od flavoproteina NADH-citokrom  $b_5$  reduktaze i citokroma  $b_5$ .



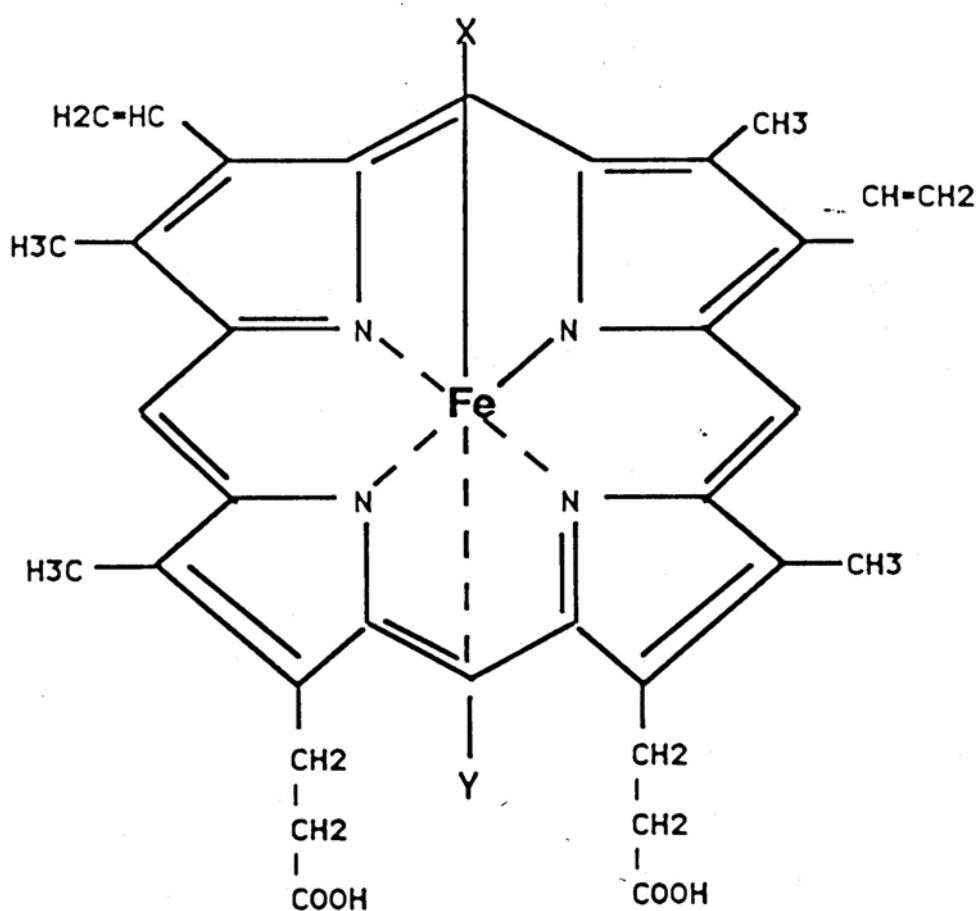
**Slika 2.** Topološki prikaz citokroma P-450 vezanog za endoplazmatski retikulum

Na slici 3 shematski je prikazan model interakcije citokroma P-450 i citokrom P-450 reduktaze.



**Slika 3.** Shematski model interakcije citokrom P-450 reduktaze i citokroma P-450

Molekulska težina citokrom P-450 izoenzima varira od 45000-60000 Da. Sastoji se od jednog polipeptidnog lanca, vezanim za željezo-protoporfirin IX (hem) preko tiolne grupe cisteinskog ostatka (slika 4.). Ta je struktura paralelna sa površinom membrane. Četiri koordinativne veze željeza usmjerene su u istoj ravnini ka atomima dušika protoporfirinskog prstena, a slobodna aksijalna koordinativna veza služi za vezivanje O<sub>2</sub>, CO, NO ili cijanida.



Slika 4. Željezo-protoporfirin IX (hem)

Polipeptidni lanac ima visokokonzervativne regije: signalnu i tzv. "halt-transfer" regiju za membransku ugradnju, te mnoge druge kojima je funkcija nepoznata npr. regija bogata prolinom na N-terminalnom kraju molekule (Gonzales, 1989). Izoenzimi P-450 se međusobno razlikuju po konformaciji aktivnog mjesta, a samim tim i po svojoj funkciji. Citokrom P-450 monooksigenaze su inducibilni enzimi ali neki od njih su trajno prisutni u tkivima u gotovo istim količinama. Osim u reakcijama katabolizma neki od njih važni su anabolički enzimi (npr. u mitohondrijima). Vezivanje supstrata ili inhibitora uzrokuje promjenu optičkih svojstava citokroma P-450 što je odlično iskorišteno u kvalitativnim i kvantitativnim analizama P-450 (Omura i Sato, 1964).

Citokrom P-450 monooksigenaze kataliziraju veliki broj različitih reakcija pri čemu ugrađuju jedan atom molekularnog kisika u supstrat, a drugi reduciraju u vodu. Te reakcije podijeljene su u nekoliko kategorija:

1. aromatske epoksidacije i hidroksilacije
2. alifatske hidroksilacije
3. N-hidroksilacije
4. N-, O-, S-dealkilacije
5. N-, S-, P-oksidacije
6. oksidativne deaminacije
7. oksidativne dehalogenacije
8. reduktivne dehalogenacije
9. nastajanje sulfoksida

Do danas je ukupno opisano 154 različita citokrom P-450 gena i 7 putativnih pseudogena (Nebert i sur., 1991). Ti geni pronađeni su u 23 eukariotska organizma, uključujući 9 sisavaca, jednu biljnu vrstu i 6 prokariotskih organizama. Usporedbom primarne strukture c-DNA i izoenzima, superfamilija citokroma P-450 podijeljena je u 27 genskih familija od kojih je 10 opisano u sisavaca. Za imenovanje citokrom P-450 gena (c-DNA) preporučuje se oznaka *CYP* (*Cyp* kod miševa) koja označava P-450

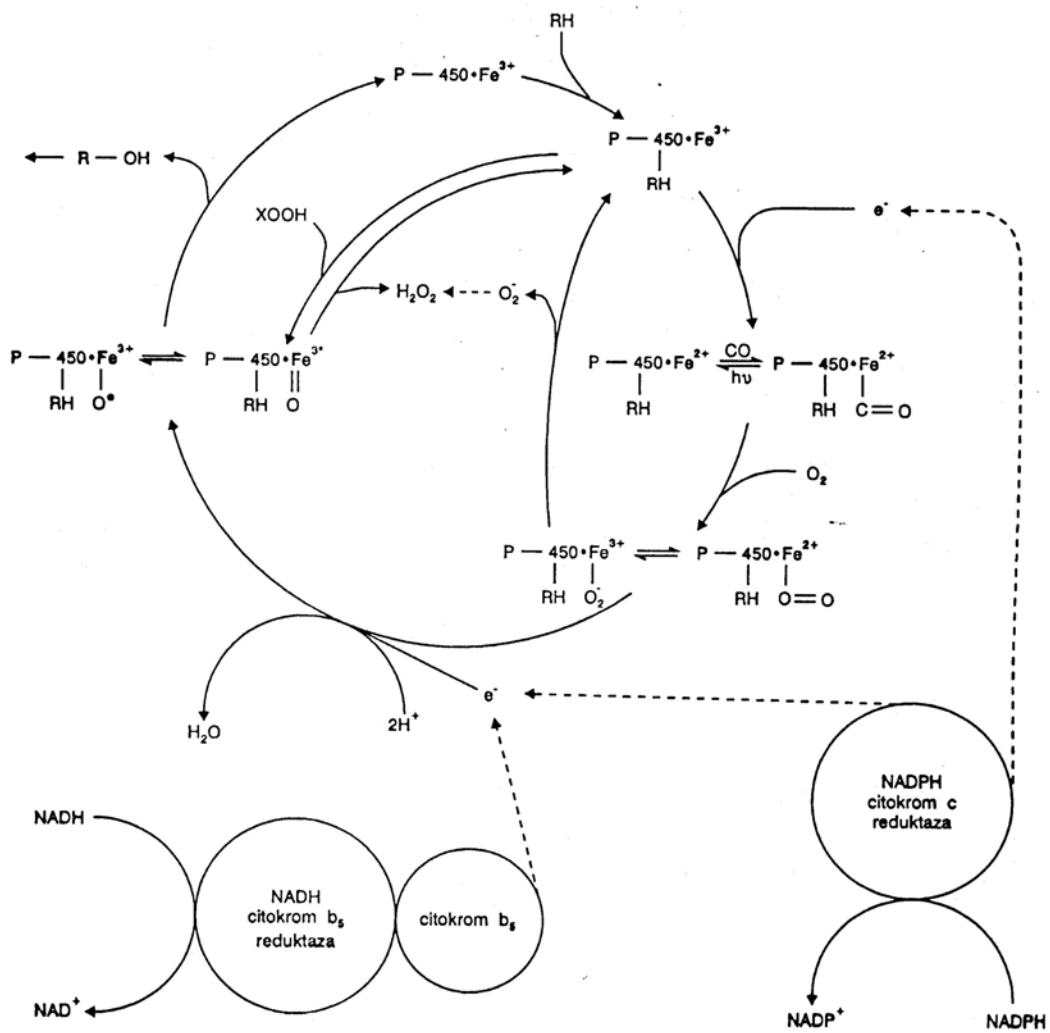
superfamiliju, nakon čega slijedi arapski broj za oznaku familije, veliko slovo koje označava subfamiliju te na kraju arapski broj za svaki individualni gen. Kod imenovanja genskih produkata (m-RNA, enzim) ne koristi se kurziv dok su ostala pravila jednaka. Termin P-450 može se upotrebljavati za izoenzime.

Sličnost u redosljedu aminokiselina pojedinih citokroma P-450 različitih familija maksimalno iznosi 40%. Citokromi P-450 iste familije imaju najmanje 40% sličan redosljed aminokiselina, a oni iz istih subfamilija i više od 59%.

OMF sustav prisutan je u svim ispitivanim eukariotskim i nekim prokariotskim organizmima pa se s pravom pretpostavlja da se razvio iz jednog prastarog gena. Razvojno stablo citokroma P-450 konstruirano je upravo na osnovi sličnosti i razlika u primarnoj strukturi pojedinih gena. Uzimajući u obzir i vrijeme divergencije pojedinih vrsta može se izračunati vrijeme potrebno za promjenu 1% primarne strukture gena citokroma P-450 tzv. "unit evolutionary period" koje iznosi od 80 do 1100 milijuna godina (Nebert i Gonzales, 1987).

### **1.3.2. MEHANIZAM ENZIMSKE REAKCIJE**

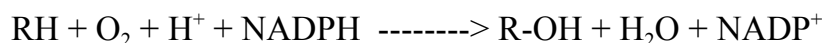
Mehanizam reakcije oksidacije supstrata može se opisati na slijedeći način (Estabrook, 1978) (slika 5.). Molekula supstrata hidrofobno se veže za citokrom P-450 (Fe III) te dolazi do redukcije dvije flavinske grupe NADPH-citokroma P-450 reduktaze s NADPH. Nakon toga prenosi se jedan elektron na citokrom P-450 koji se reducira (Fe III prelazi u Fe II). Zatim dolazi do vezivanja O<sub>2</sub> na tako reducirani citokrom P-450 te prijenosa drugog elektrona sa NADPH-citokroma P-450 reduktaze ili citokroma b<sub>5</sub> na taj kompleks i pucanja veze između atoma kisika pri čemu se jedan atom kisika ugrađuje u molekulu supstrata. Nakon disocijacije produkta citokrom P-450 ostaje u oksidiranom stanju (Fe III).



Slika 5. Mehanizam reakcije citokroma P-450 i prijenosa elektrona sa NADPH (NADH ili citokrom  $b_5$ ) oksidoreduktaze



Sumarna jednačba glasi:



U nedostatku elektron transportnog sustava, NADPH, O<sub>2</sub>, peroksidi i/ili neki drugi donori kisika služe citokromu P-450 kao izvori O<sub>2</sub>, odnosno citokrom P-450 se ponaša kao peroksidaza. Nadalje, citokrom P-450 može se ponašati kao i NADPH-ovisna oksidaza oslobađajući pri tom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Ortiz de Montellano, 1986).

### **1.3.3. MOLEKULSKA SVOJSTVA OSTALIH ENZIMA FAZE I I FAZE II**

#### **1.3.3.1. NADPH-citokrom P-450 reduktaza**

NADPH-citokrom P-450 reduktaza (EC 1.6.2.4.) najbolje je proučen elektron transportni enzim u sisavaca i riba. U prisustvu NADPH reducira citokrom c i citokrom P-450. To je flavoprotein, molekulske mase 74000-80000 Da i sadrži jednu molekulu FAD i FMN. Smješten je u lipidnom dvosloju u staničnoj membrani. Velika hidrofobna podjedinica može se odvojiti od ostatka molekule proteazama. Taj ostatak veličine 69000 Da, zadržava sposobnost redukcije citokroma c ali ne i citokroma P-450.

Flavinski dio molekule NADPH-citokrom P-450 reduktaze odgovoran je za katalitičku funkciju tog enzima, a drugi dio molekule služi za ugradnju molekule u staničnu membranu (Strobel i sur., 1980). NADPH-citokrom P-450 reduktaza izolirana je iz nekoliko vrsta riba (Pohl i sur., 1983; Klotz i sur., 1983; Williams i sur., 1983).

### **1.3.3.2. Citokrom b<sub>5</sub>**

Citokrom b<sub>5</sub> je hemoprotein koji se sastoji od jednog polipeptidnog lanca molekulske mase oko 17000 Da i jedne molekule željezo-protoporfirina IX. Smješten je u vanjskoj membrani mitohondrija i u endoplazmatskom retikulumu. Uz brojne fiziološke funkcije citokrom b<sub>5</sub> uključen je i u elektron transportni sustav citokroma P-450 tj. reducira citokrom P-450 (Oshino, 1982).

### **1.3.3.3. NADH-citokrom b<sub>5</sub> reduktaza**

NADH-citokrom b<sub>5</sub> reduktaza je flavoprotein (EC 1.6.2.2.) molekulske mase oko 33000 Da. Uključen je u mikrosomski lanac prijenosa elektrona sa NADH na citokrom b<sub>5</sub>. Smješten je u vanjskoj membrani mitohondrija i endoplazmatskom retikulumu uz citokrom b<sub>5</sub>.

### **1.3.3.4. Epoksid hidrolaza**

Epoksid hidrolaza (3.3.2.3) hidrolizira reaktivne epoksidge i aren oksidge nastale djelovanjem citokrom P-450 monooksigenaze. Tako nastaju manje reaktivni produkti, trans-dihidrodioli koji mogu izomerizirati u fenole i reagirati sa staničnim makromolekulama kao što su DNA, RNA, proteini stvarajući adukte. Epoksid hidrolaza može biti vezana za staničnu membranu ili slobodna u citosolu. Sastoji se od jednog polipeptidnog lanca molekulske težine oko 50000 Da.

Epoksid hidrolaza u riba ima visok temperaturni optimum *in vitro*, oko 50° C. Izmjerene su različite aktivnosti epoksid hidrolaze u riba (James i sur., 1979), s tim da su niže aktivnosti izmjerene u ženki u doba mrijesta.

### **1.3.3.5.UDP-glukuronil transferaze**

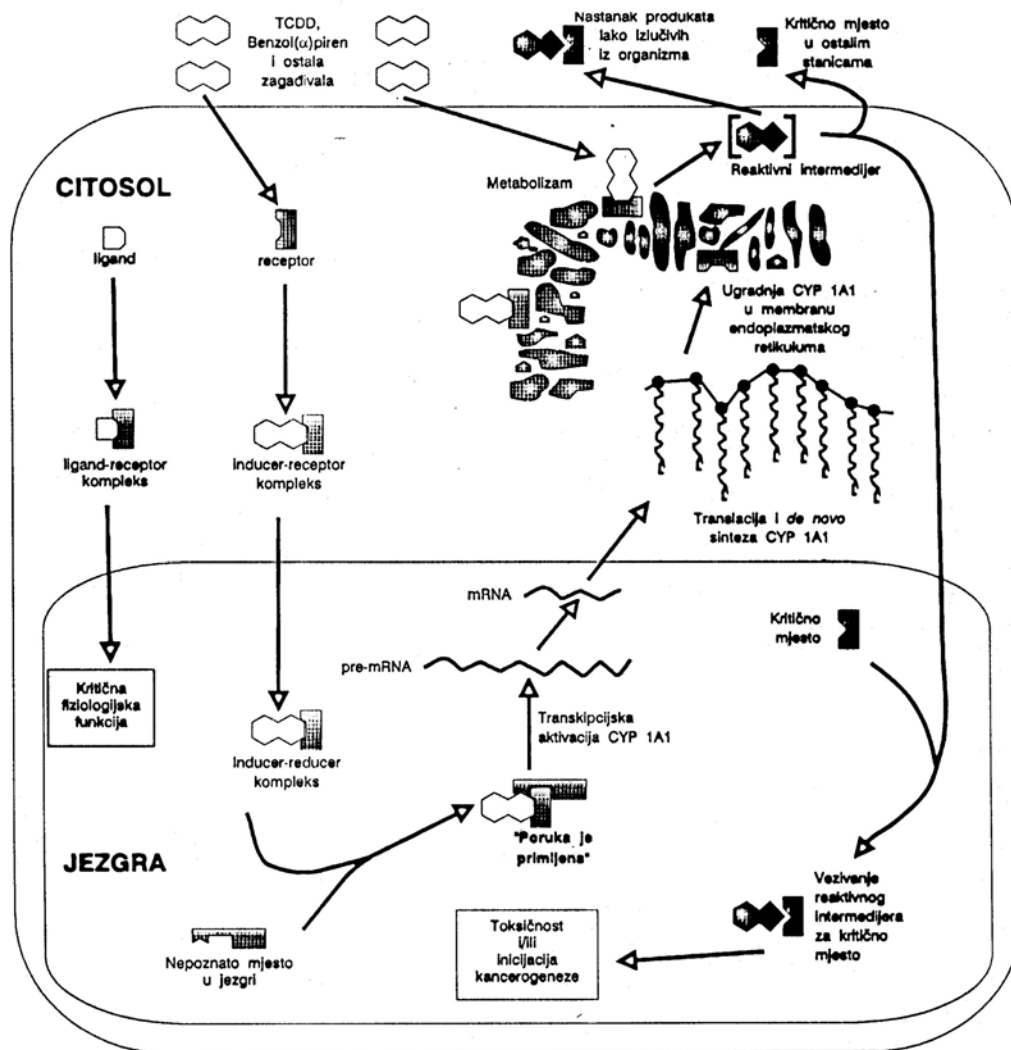
UDP-glukuronil transferaza (EC 2.4.1.17.) katalizira reakcije konjugacije oksigeniranih supstrata s glukuronskom kiselinom. Postoji više različitih izoenzima UDP-GT specifičnih za različite endogene i egzogene supstrate sa različitim načinom indukcije (Kasper i Henton, 1980; Burchell i sur., 1985; Matern i sur., 1985; Armstrong, 1987). UDP-GT je čvrsto vezana u membranskim mjehurićima, a njena aktivnost izmjerena je osim u endoplazmatskom retikulumu i u jezgri, Golgijevom tjelešcu i plazminoj membrani (Antonie i sur., 1985). Molekulska masa je oko 50000-56000 Da. Velika količina glukuronskih metabolita ksenobiotika nađena je u žuči riba (Varanasi i Gmur, 1981) i ekstraktu jetre i hepatocitima (Andersson i sur., 1983; Andersson i Koivusaari, 1986). Aktivnost UDP-GT može se u pastrve inducirati kemijskim spojevima kao što su  $\beta$ -NF ili PCB (Andersson i sur., 1985), a u šarana 2-acetilaminofluoranom (Kurelec i Krča, 1986).

### **1.3.3.6. Glutation S-transferaze**

GST (EC 2.5.1.18.) velika su grupa izoenzima molekulske mase oko 23000-30000 Da koja katalizira konjugaciju epoksida, slobodnih radikala, alifatskih i aromatskih elektrofilnih spojeva s glutationom. GST enzimi su smješteni u citosolu, a aktivnost im je izmjerena u mitohondrijima. Glutationski konjugati izlučuju se iz organizma putem žuči ili urina. Aktivnost GST izmjerena je u pastrmke nakon indukcije s  $\beta$ -NF ili PCB-om (Andersson i sur., 1985).

### 1.3.4. INDUKCIJA CITOKROMA P-450

Neke citokrom P-450 monooksigenaze su konstitutivni enzimi tj. prisutni su uvijek u određenoj količini u stanicama i tkivima, dok je ekspresija drugih regulirana hormonima ili drugim kemijskim agensima. Za njih kažemo da su inducibilni. Indukciju pojedinih izoenzima citokroma P-450 prati rast karakteristične monooksigenazne aktivnosti. Različite kemijske tvari mogu inducirati *de novo* sintezu P-450 proteina (Nebert i Gonzales, 1987; Nebert i sur., 1989). Indukcija je proces u kojem neka tvar stimulira transkripciju gena i dolazi do povišenja količine m-RNA i *de novo* sinteze citokroma P-450 koji se ugrađuje u staničnu membranu te pokazuje karakterističnu enzimsku aktivnost. Indukcija citokroma P-450 može se proučavati na sve tri opisane razine, m-RNA, protein, katalitička aktivnost, uporabom odgovarajućih proba kao što su c-DNA, antitijela i enzimski supstrati. Induceri CYP dijele se na dvije osnovne skupine inducera: PAH tip i PB tip inducera. Danas je opće poznato da različite tvari induciraju specifične CYP izoenzime. Te su tvari podijeljene u skupine ovisno o tome koju subfamiliju CYP induciraju (Nebert i sur., 1989). Stupanj indukcije CYP veći je od indukcije enzima faze II i govori o stupnju potencijalne toksičnosti inducera u odnosu na količinu reaktivnog inducera koji će se uz djelovanje enzima faze II biti inaktiviran i odstranjen iz organizma. Proces indukcije najviše je izučavan u CYP1A subfamiliji. On uključuje specifični *Ah* receptor (receptor aromatskih ugljikovodika), 90000 Da "heat shock" protein (Hsp 90), nuklearni translocirajući faktor (translokacija receptor kompleksa iz citoplazme u jezgru) i transkripcijsku aktivaciju gena (Nebert i Jones, 1989). Afinitet *Ah* receptora za tvari PAH ili MC tipa jako je visok:  $K_M < 10^{-9}$  M. Nakon što je formiran *Ah*-inducer kompleks on ulazi u jezgru i vezuje se za regulatornu regiju DNA. Dolazi do transkripcije strukturnih gena (za CYP 1A1, UDPGT i dr.) i sinteze proteina. Tako nastali aktivni CYP 1A1 sudjeluje u biotransformaciji inducera (slika 6.) (cf. Goksøyr, 1987).



Slika 6. Shematski prikaz indukcije citokroma P-450

Različite kemijske tvari djeluju na CYP kao inhibitori ili modulatori enzimske indukcije ili kao katalizatori aktivnosti sa različitim antagonističkim djelovanjem. Teški metali, npr. Cd, snizuju aktivnost CYP (Förlin i sur., 1986) i umanjuju mogućnost imunodetekcije CYP 1A1 (George, 1989), a mehanizam djelovanja nije poznat. Inhibitorski učinak na CYP može biti uzrokovan kompeticijom CYP i NADPH-citokrom P-450 monooksigenaze za elektron, zatim ireverzibilnim vezanjem (npr. CO) za CYP ili nedostatkom molekularnog O<sub>2</sub>.

Važnu ulogu u indukciji CYP zauzimaju i fiziološki faktori kao što su spol i spolna zrelost jedinki (steroidni hormoni) (Williams i sur., 1986), zatim razvojni stadij (Binder i Stegeman, 1980; 1983; 1984) i moguće sezonske varijacije. Osim toga različiti uvjeti u okolini u kojoj jedinka obitava utječu na indukciju CYP. To su temperatura, svjetlo, tlak, salinitet, buka, ionizirajuće zračenje itd. (Kurelec i sur., 1977; Kleinow i sur., 1989; Stegeman, 1979). Količina CYP u pravilu je veća u muških jedinki (Anderson, 1992). Sve su to problemi koje treba stalno imati na umu namjerava li se taj sustav koristiti u biomonitoringu ksenobiotika.

### 1.3.5.CITOKROM P-450 MONOOKSIGENAZE U RIBA I NJIHOVA ULOGA U BIOMONITORINGU

More zauzima oko 71% površine Zemlje i ima volumen oko 1350 milijuna km<sup>3</sup> (Turekian, 1976). Od svih vrsta kralješnjaka u moru, najzastupljenije su ribe kojih ima 21000-28000 vrsta (Moyle i Cech, 1988). Kao rezultat ljudske aktivnosti u more se unosi velika količina različitih kemijskih spojeva i zagađivala. Kvalitativno i kvantitativno proučavanje učinka tih kemijskih zagađivala započelo je prije 20-ak godina. Kod riblje populacije koja živi u jako zagađenim područjima uočene su npr. različite patološke promjene kao i nastanak neoplazija (Malins i sur., 1988; Murchelano i Wolke, 1985). Glavnu ulogu u tom proučavanju zauzimaju biokemijske karakteristike i funkcije enzima (citokrom P-450 monooksigenaza) zaduženih za biotransformaciju tih štetnih zagađivala u morskih organizama. Policiklički aromatski ugljikovodici i poliklorirani bifenili induciraju CYP 1A subfamiliju koja zato može poslužiti kao specifični biomarker zagađenja nekog područja. Indukcijom specifične familije *CYP* gena povećava se količina specifične m-RNA i *de novo* sinteze proteina te dolazi do povećanja specifične enzimske aktivnosti. Proučavanje biokemijskih karakteristika i funkcije enzima citokrom P-450 monooksigenaza u riba kao biomarkera, pruža odličan uvid u razvijenost tog sustava u riba te ukazuje na mogućnost prosudbe izloženosti riba različitim potencijalnim mutagenima, teratogenima i kancerogenima.

Do danas je u riba opisana samo jedna vrsta *CYP* gena i to *CYP 1A1* jetre pastrve *Oncorhynchus mykiss* (Heilman i sur., 1988). Usporedbom njegove strukture sa *CYP 1A1* sisavaca dovela je do spoznaje velike količine konzervativnih regija u njemu. Sličnost između njih iznosi 57-59%, pa se pretpostavlja da je došlo do duplikacije *CYP 1A1* nakon divergencije riba i sisavaca (Nebert i Gonzales, 1987).

Izolacija i karakterizacija citokroma P-450 enzima u riba započela je mnogo prije od izučavanja *CYP* gena, ali je do danas proučavan samo ograničen broj ribljih vrsta. Različiti oblici citokroma P-450 izolirani su iz jetre pastrve *Oncorhynchus mykiss* (Williams i Buhler, 1983; 1984; Williams i sur., 1984; Miranda i sur., 1989; 1990a; 1991; Celander i sur., 1989; Anderson, 1992), grgeča *Perca fluviatilis* (Zhang i sur., 1991), bakalara *Gadus mohura* (Goksøyr, 1985; Goksøyr i sur., 1986) vrste *Stenotomus chrysops* (Klotz i sur., 1983; 1986; Stegeman i sur., 1990) uz primjenu inducera kao što su  $\beta$ -NF ili MC, odnosno iz riba sa zagađenih područja. Više oblika citokroma P-450 izolirano je iz pastrva tretiranih s  $\beta$ -NF ili MC. Pet različitih oblika citokroma P-450 iz pastrva tretiranih  $\beta$ -NF: P-450LM1, P-450LM2, P-450LM3, P-450LM4a i P-450LM4b izolirali su Williams i Buhler (1984); odnosno Miranda i suradnici (1989): P-450LMC1, P-450LMC2, P-450LMC3, P-450LMC4 i P-450LMC5 iz netretiranih riba. Imunokemijskim metodama pokazalo se da P-450LM4a i P-450LM4b pripadaju CYP1A subfamiliji, a ostali izolirani oblici CYP2B subfamiliji, osim P-450LMC5 koji spada u CYP 3A subfamiliju. Celander i suradnici (1989) izolirali su i jednu konstitutivnu formu citokroma P-450, P-450com, molekulske težine 54000 Da. Kao i P-450LM2 veća količina tog enzima izolirana je iz spolno zrelih mužjaka i pripada CYP2 familiji što ukazuje na činjenicu da se zapravo radi o istim enzimima.

Andersson je (1992) iz bubrega spolno zrelih mužjaka pastrve izolirao dva oblika citokroma P-450; P-450KM1 i P-450KM2, molekulske masa 54000 i 52000 Da. Reakcijama sa specifičnim poliklonalnim antitijelima P-450KM2 nije pronađen niti u bubrezima mladih pastrmki niti u bubrezima odraslih ženki (Andersson, 1992).



Iz cijele P-450 superfamilije, CYP1A subfamilija najbolje je izučena. Ona je inducibilna različitim egzogenim inducerima kao što su  $\beta$ -NF, TCDD, PAH (Nebert i Gonzales, 1987; Nebert i Jones, 1989; Nebert i sur., 1989) i zauzima značajnu ulogu u metabolizmu i aktivaciji aromatskih kancerogena i drugih toksičnih tvari. U svih riba u kojima je do danas proučavan OMF sustav izoliran je samo jedan protein sličan CYP1A subfamiliji nađenoj u sisavaca. Te sličnosti odnose se na inducibilnost s  $\beta$ -NF i PAH, povišenje specifične aktivnosti izoenzima (EROD, AHH), te na rezultate dobivene imunokemijskim metodama. Veliku podudarnost sa CYP 1A1 sisavaca pokazuju P-450LM4b i P-450LM4a izolirani iz pastrve, P-450E iz vrste *Stenotomus chryspos*, P-450c iz bakalara i P-450V iz grgeča. Upotrebom antitijela priređenih od različitih ribljih P-450 1A1 proteina (Goksøyr i sur., 1987; 1988; Kloepper-Sams i sur., 1987; Park i sur., 1986; Van Veld i sur., 1990; Varanasi i sur., 1986) pokazalo se da se molekularna struktura P-450 vrlo malo mijenjala u riba tijekom njihove evolucije u zadnjih 350 milijuna godina (Goksøyr i sur., 1991a; 1991b). Nadalje, usporedbom redosljeda aminokiselina N-terminalnog kraja citokroma P-450 1A1 dobivenog indukcijom *CYP 1A1* (Heilmann i sur., 1988) sa redosljedom aminokiselina citokroma P-450E (Klotz i sur., 1983) dobiveni su rezultati koji ukazuju na veliku konzervativnost primarne strukture N-terminalne regije tih proteina (Stegeman, 1989) što govori u prilog činjenici da je ostala nepromijenjena signalna sekvenca za ugradnju proteina u lipidni dvosloj stanične membrane.

Istraživanja karakterističnih CYP1A1 enzimskih aktivnosti kao što su AHH, EROD i ECOD baziraju se na indukciji različitim tipovima inducera. Usporedbom rezultata dobivenih indukcijom s  $\beta$ -NF ili MC sa rezultatima dobivenih uporabom dizel ulja i izosafarola (Leaver i sur., 1988; Celander i Förlin, 1991) potaknuta je diskusija o eventualnom postojanju drugog inducibilnog CYP1A gena u riba (Buhler i Williams, 1989; Stegeman, 1989). Faktori koji sudjeluju u aktivaciji citokroma P-450 u riba nisu dovoljno istraženi. Brojna istraživanja pokazuju postojanje P-450 aktivnosti inducirane PAH tipom inducera (Kleinow i sur., 1987; Stegeman, 1981; Stegeman i Kloepper-Sams,

1987). Mjerenja AHH i EROD aktivnosti pokazala su se najosjetljivijim katalitičkim metodama za određivanje induksijskog odgovora u riba. Mnogi poznati inducери ribljih CYP (PAH, PCB/PBB, pesticidi, herbicidi) su dobro znana i proučena zagađivala mora što je u stvari i uvjetovalo razvitak israživanja CYP u riba. Rezultati dobiveni uporabom ekstrakta morskog sedimenta za indukciju CYP ukazuju na naročito velike količine potencijalnih inducera prisutnih u sedimentu i/ili na njihovu međusobnu sinergističku djelatnost (Collier i Varanasi, 1991). Različiti tipovi inducera na različiti način reguliraju katalitičku aktivnost. Neki inducери, posebno organoklorirani spojevi, mogu inhibirati katalitičku aktivnost induciranoga P-450 izoenzima (Gooch i sur., 1989; Miranda i sur., 1990b). Ona se može i izgubiti uslijed loših uvjeta čuvanja preparata ili je malena količina tkiva da bi se u njemu izmjerila katalitička aktivnost, dok su kod imunokemijskih metoda takvi nedostaci prevladani (Goksøyr, 1991).

Indukcija CYP u riba inducerima PB tipa nije nađena (Förlin, 1980; Goksøyr, 1987; Kleinow i sur., 1987; Lech i sur., 1988; Stegeman, 1981; Stegeman i Kloepper-Sams, 1987; Vodicanik i sur., 1981). Ne zna se da li ribe nemaju strukturni gen *CYP 2B* subfamilije ili im nedostaje regulatorni kontrolni mehanizam. Međutim u reakciji specifičnih antitijela i c-DNA proba sisavaca i CYP 2B proteina, odnosno gena, došlo se do otkrića da su u riba prisutni *CYP 2B* analogni geni koji nisu inducibilni tvarima PB tipa (Kleinow i sur., 1990; Stegeman i sur., 1990). Indukcijski odgovor enzima zaduženih za biotransformaciju zagađivala (ksenobiotika) u riba poslužio je kao osnova za uvođenje biokemijskih odgovara kao biomarkera u biomonitoringu zagađenja okoline (Payne, 1976; Kurelec i sur., 1977). Proučavanje molekularnih efekata kao što je indukcija biotransformirajućih enzima daje signal koji govori o određenom zagađivalu ili grupi zagađivala te daju mjeru izloženosti organizma. Osim toga na taj način može se dijagnosticirati vrsta ili grupa zagađivala kojim je organizam bio izložen. Brojna proučavanja unazad zadnjih 15-ak godina pokazala su da je CYP 1A1 posredovana aktivnost (EROD, AHH) u riba sa zagađenih područja povišena (Payne, 1984; Pyne i sur., 1987). Mjerenje EROD ili AHH monooksigenazne aktivnosti uvjetovane indukcijom

CYP 1A1 uključeno je u brojne monitoring programe u svijetu kao što su National Status & Trends Program in USA (Collier i sur., 1992) i North Sea Task Force Monitoring Master Plan of the North Sea Nations (Goksøyr i Förlin, 1992).

Imunokemijskim metodama kao što je Western blotting istraživana je odnos između količine CYP 1A1 u riba sa zagađenih i nezagađenih područja (Stegeman i sur., 1986, 1987, 1988; Elskus i sur., 1989; Varanasi i sur., 1986). Nadalje, primjena ELISA tehnike u određivanju CYP 1A1 (Goksøyr, 1991; Celander i Förlin, 1991) zauzima sve veći značaj. Određivanje katalitičke aktivnosti može biti otežano zbog lošeg uzorkovanja ili načina čuvanja uzorka pri čemu dolazi do denaturacije proteina (Förlin i Andersson, 1985) ali ne i do destrukcije epitopa samog antigena (Goksøyr, 1991) što daje prednost imunokemijskim metodama. Osim toga katalitička aktivnost može biti inhibirana različitim tvarima prisutnim u uzorku ili limitirana malom količinom uzorka.

Kada je sekvencioniran riblji CYP 1A1 (Heillman i sur., 1988) c-DNA proba se mogla upotrijebiti za detekciju CYP 1A1 transkripta. Brojna istraživanja (Kloepper-Sams i Stegeman, 1989; Pesonen i sur., 1992) pokazuju da se nakon kratkog vremena koncentracija m-RNA snizuje do kontrolnih vrijednosti za razliku od CYP 1A1 proteina koji je prisutan u stanici duži vremenski period (Haasch i sur., 1989; Kloepper-Sams i Stegeman, 1989). Stoga uporaba m-RNA kao pokazatelja indukcije CYP daje ograničeni odgovor o prisustvu inducera.

Mjerenje EROD aktivnosti u riba danas je konvencionalna metoda određivanja CYP 1A1 indukcije kao pokazatelja zagađenja okoline ali još uvijek nije standardizirana na internacionalnom nivou. Naime postoje razlike u primjeni metode: fluorimetrijsko (Burke i Mayer, 1974) ili spektrofotometrijsko mjerenje (Klotz i sur., 1984) nastalog produkta enzimske reakcije, zatim izbor molarnog ekstinkcijskog koeficijenta za resorufin ( 20,40 ili  $73 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), način pripreme uzorka te nestabilnost i niska čistoća resorufina. Stoga je svako novo otkriće u primjeni P-450 sustava jetre riba u biomonitoringu važan prilog u razrješavanju navedenih poteškoća.

### 1.3.6. CITOKROM P-450 SUSTAV U LUBINA *Dicentrarchus labrax* (L.)

Sustav citokrom P-450 monooksigenaza u lubina *Dicentrarchus labrax* (L.) do danas nije dovoljno istražen. Uz primjenu benz(a)pirena kao inducera Lemaire i suradnici (1989; 1990; 1991; 1992a; 1992b) opisali su benz(a)piren monooksigenazeaktivnost u mikrosomskoj frakciji jetre i probavila. Metabolizam benz(a)pirena u jetri lubina ovisi o koncentraciji NADPH (Michel i sur., 1992). Lubin, dakle, ima sposobnost metaboličke pretvorbe benz(a)pirena pri čemu nastaju reaktivni 9-10 i 7-8 epoksidi koji djelovanjem epoksid hidrolaze prelaze u diol derivate. Osim toga u mikrosomskim frakcijama jetre lubina tretiranih benz(a)pirenom dokazana je nazočnost i enzima faze II, kao što su glutation S-transferaza i UDP-glukuronil transferaza (Lemarie i sur., 1992b).

Nadalje, rezultati dobiveni mjerenjem specifične EROD aktivnosti u mikrosomskoj frakciji jetre lubina tretiranih benz(a)pirenom ukazuju da lubin ima sposobnost indukcije citokroma P-450 1A1 (Lemarie i sur., 1992b).

## **2. MATERI JALI**

## 2.1 ORGANIZMI I NAČIN TRETIRANJA

Eksperimentalni organizam lubin, brancin, *Dicentrarchus labrax Linnaeus, 1758*. (*Morone labrax, Labrax lupus, Serranidae*) rasprostranjena je vrsta bijele ribe u priobalnim vodama Mediterana, kao i u Atlantiku od Baltičkog mora do Maroka. To je priobalna vrsta koja migrira jedino zimi u sezoni mrijesta. Obitava od 0-50 m dubine ali se najčešće nalazi iznad 20 m. Nalazi se pretežno na kamenim i mješovito pjeskovito-muljevitim dnima ali i na pjeskovito-muljevitim dnima u područjima dotoka slatke vode. Lubin je predator kroz cijeli životni ciklus. Za pokuse je upotrebljavana riba iz uzgajališta u Lirskom kanalu prosječne težine 165 g i veličine 24 cm.

Ribe su držane u 1200 l bazenu sa protokom morske vode i dobrim prozračivanjem. Po petom danu adaptacije ribe su odvojene u zasebne manje 200 l bazene s protokom od 10 l/h, temperaturom vode 18°C i prozračivanjem. Nakon adaptacije ribe su injektirane i/p sa 300 µl otopine 1 mg/ml β-NF, PB, MC, ili Aroklora 1254 otopljenih u smjesi sezamovog ulja i DMSO 7:3 (1,8 mg/kg); odnosno sa ekstraktima morske vode sa različitih prirodnih lokacija (otok Figarola, ispust otpadnih voda tvornice ribljih konzervi Mirna i ispust otpadnih voda Tvornice duhana). Kontrolne ribe injektirane su samo sa 300 µl smjese sezamovog ulja i DMSO 3:7. Morska voda ekstrahirana je sa diklormetanom koji je zatim uparen do suha a upareni ostatak otopljen u DMSO. Ribe su žrtvovane dva dana po injektiranju polutanata.

## 2.2.KEMIKALIJE

U radu su upotrebljavane kemikalije isključivo analitičke čistoće kako slijedi:

Dimetilsulfoksid

SIGMA, St.Louis, SAD

Sezamovo ulje

$\beta$ -naftoflavon

20-metilholantren

fenobarbital

nikotinamid dinukleotidamin

resorufin

7-etoksiresorufin

7-pentoksiresorufin

4-kloro-1-naftol

1,2-diaminobenzol

natrijdodecil sulfat

antitijela kože na IgG kunića

ribonukleaza A (RNA-za A)

restriksijska endonukleaza ECO RI

proteinski standardi molekulskih težina

DNA standardi molekulskih težina

albumin goveđeg seruma

MERCK, Darmstat, Njemačka

natrij ditionit

agaroza A-2790

etidij bromid

gvanidin tiocijanat



N,N,N,N-tetrametiletilendiamin  
amonij peroksisulfat

SERVA, Heidelberg,  
Njemačka

avidin-alkalna fosfataza kompleks  
blokirajući reagens  
AMPPD reagens

TROPIX, Badford, SAD

fenilmetilsulfonil fluorid

Calbiochem, Boehringer Corp.,  
La Jolla, SAD

antitijela kunića na P-450 1A1 bakalara

Goksøyr A., Sveučilište u  
Bergenu, Norveška

pUC 18 sa *CYP 1A1* jetre štakora

Doehmer J., Sveučilište  
"Johannes Gutenberg" Mainz,  
Njemačka

### **3. METODE**

### **3.1. PRIPREMA EKSTRAKATA MORSKE VODE**

Morska voda (1.5 litra) ekstrahira se u lijevku za odjeljivanje sa 100 ml diklormetana. Ostatak vode se ukloni s bezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i upari do suha, a upareni ostatak otopi se u 500 µl DMSO.

### **3.2. PRIPREMA I OTAPANJE MIKROSOMSKE FRAKCIJE**

Riba je žrtvovana 48 sati po injektiranju modelnih zagađivala odnosno ekstrakata morske vode sa različitih lokacija rovinjskog priobalja. Nakon vaganja ribe izvađena je jetra pazeći da se ne ošteti žučna vrećica (žuč je bogata inhibitorima MFO) i izvagana. Nakon toga jetra je homogenizirana sa pet puta većim volumenom otopine za homogenizaciju (1,15% KCl, 3,6 mM fenilmetilsulfonil fluorid, PMSF ili 0,1 mM natrij-fosfatni pufer, 3,6 mM PMSF, pH 7,7) u Potter-Elvehjem homogenizatoru. Dobiveni homogenat centrifugiran je na 10000 g 20 minuta na 4°C da se odstrane dijelovi stanica i stanične organele. Gornji lipidni sloj supernatanta oprezno je odstranjen vakuum sisaljkom, a supernatant je dekantiran. Dekantirani supernatant je ponovo centrifugiran na 100000 g 60 minuta. Nastali talog mikrosomske frakcije otopljen je u puferu 0,1 M natrij-fosfata, pH 7,7 sa 20% glicerola tako da na 1g jetre ide 1 ml tog pufera. Cijeli postupak provodi se na temperaturi 4°C.

### **3.3. ODREĐIVANJE PROTEINA**

Proteini su određivani po metodi Lowry i sur. (1951), a kao standard koristi se albumin iz goveđeg seruma. Količina prisutnih proteina određivana je očitavanjem adsorbancije na 750 nm uz Folin reagens.

### **3.4. ODREĐIVANJE DIFERENCIJALNOG SPEKTRA P-450 I P-420**

Diferencijalni spektri mjereni su po metodi Omura i Sato (1964) u uzorcima koji sadrže 0,5-1 mg proteina/ml na spektrofotometru CECIL 6700. Kiveta sa uzorkom i referentna kiveta sadržavale su otopinu  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ -reduciranog citokroma P-450, a kiveta sa uzorkom tretirana je još sa CO kroz 20 sekundi. CO je proizveden ukapljavanjem koncentrirane HCOOH u koncentriranu  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , a pročišćen je strujanjem kroz otopinu NaOH. Ukupni sadržaj citokroma dobije se mjerenjem razlike adsorbancije na 490-450 nm, uz ekstinkcijski koeficijent  $92 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  ili izračunavanjem sume adsorbancije 450 i 420 nm uz ekstinkcijske koeficijente  $91 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  i  $111 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Stegeman i sur., 1979).

### **3.5. ODREĐIVANJE EROD I PROD AKTIVNOSTI**

Aktivnosti enzima etoksiresorufin-O-deetilaze (EROD) i pentoksiresorufin-O-deetilaze (PROD) određene su po metodi Burke i Mayer (1974) uz neznatne modifikacije, na spektrofluorimetru KONTRON SFM 25. U fluorimetrijsku kivetu stavi se 1 ml 0,1 M fosfatnog pufera ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) pH 7,7, NADPH do konačne koncentracije 200  $\mu\text{M}$  i supstrat (etoksiresorufin ili pentoksiresorufin) do konačne koncentracije 12,5  $\mu\text{M}$ . Zabilježi se fluorescencija pri ekscitaciji na 510 nm i emisiji 585 nm koja treba biti konstantna. Nakon jedne minute doda se enzimski preparat (resuspendirani mikrosomi)

i prati porast fluorescencije tokom dvije minute. Nakon toga u kivetu se dodaje poznata količina (0,585 pM) resorufina, finalnog produkta reakcije, i zabilježi nagli skok fluorescencije. Količina EROD/PROD aktivnosti izračuna se iz prosječne promjene fluorescencije u jednoj minuti u odnosu na promjenu fluorescencije nakon dodatka finalnog produkta.

### 3.6. SDS-PAGE

Elektroforeza u diskontinuiranim poliakrilamidnim gelovima u prisutnosti SDS izvršena je u vertikalnim gelovima (72\*100\*1 mm, BIO-RAD Mini protean 2-D cell) po metodi Laemmli (1970). Gornji sloj u gelu, tzv. koncentrirajući gel, duljine 1,5 cm, sadržavao je 3,75% ukupnog polimera i 2,67% umreživača, a separirajući gel duljine 5,7 cm sadržavao je 7,5% ukupnog polimera i 2,67% umreživača. Gelovi su pripremljeni na slijedeći način:

-Separirajući gel- U 2,5 ml 30%-tnog akrilamida (4,1 M akrilamid, 0,05 M Bis-akrilamid) doda se 5 ml deionizirane vode i 2,5 ml gel pufera pH 8,8 (1,5 M Trizma baza, 0,4% SDS). Nakon miješanja u otopinu se doda 33,3 µl svježe pripremljenog 10%-tnog amonij persulfata i 6,6 µl TEMED. Smjesa se ulije u pripremljeni aparat za elektroforezu (BIO-RAD Mini protean 2-D cell) tako da ostane do gornjeg ruba 1,5 cm i prekrije sa 2-3 kapi n-butanola. Polimerizacija je gotova za 20 minuta.

-Koncentrirajući gel- U 1,25 ml 30%-tnog akrilamida doda se 3,25 ml deionizirane vode i 0,5 ml tzv Stocking pufera pH 6,8 (0,5 M Trizma baza, 0,4% SDS). Nakon miješanja u otopinu se doda 15 µl svježe pripremljenog 10%-tnog amonij persulfata i 25 µl TEMED. Sa koncentrirajućeg gela ukloni se n-butanol i naliije separirajući gel. Polimerizacija se odvija na sobnoj temperaturi 30 minuta.

Uzorci mikrosomskih frakcija (oko 100  $\mu\text{g}$  proteina) pomiješani su sa 25  $\mu\text{l}$  pufera pH 6,8 (0,25 M Tris-HCl, 20% glicerol, 4% SDS, 0,05% bromfenol plavo) i 1,5  $\mu\text{l}$  merkaptoetanol, a nastala smjesa nadopunjena s deioniziranom vodom do ukupnog volumena 50  $\mu\text{l}$ . Nakon miješanja smjesa se zagrijava 3-4 minute na 95°C. Na isti način obrađena je i otopina proteinskih markera (molekulskih težina 66000 i 45000 g/mol). 15  $\mu\text{l}$  svakog uzorka pažljivo je nanoseno na gel. Pufer za elektroforezu je pH 8,3 (0,02 M Trizma baza, 0,2 M glicin, 1% SDS). Elektroforeza se odvija uz 200 V i traje 45 minuta. Nakon toga gel se fiksira u smjesi izopropanol/octena kiselina/voda u omjeru 2,5:1,0:6,5, uz prisutnost anionskih izmjenjivača 15-20 minuta, oboji se sa 0,1% otopinom Coomasie brilliant blue u smjesi metanol/octena kiselina/voda 4,5:1,0:4,5 kroz 15 minuta, a obezboji smjesom metanol/octena kiselina/voda 4,5:1,0:4,5. Gel se slika u prolaznom difuznom svjetlu, a slike su razvijene na fotografskom papiru radi dokumentacije.

### 3.7. WESTERN BLOTTING

Nakon završene elektroforeze gel se najprije ekvilibrira u puferu za transfer proteina na membranu (0,025 M Trizma baza, 0,2M glicin, 20% metanol, pH 8,3) 10 minuta. Zatim se gel prekrije sa nitroceluloznom membranom i zajedno pakiraju u kasetu sustava za prijenos proteina na membranu. Kasetu se stavi u kadu za elektrotransfer (BIO-RAD Mini trans-blot cell) i prelije puferom za transfer pH 8,3. Uz 100 V prijenos je gotov za 90 minuta. Membrana se izvadi iz sustava i uroni u TTBS pufer pH 7,5 (20 mM Trizma baza, 500 mM NaCl, 0,05% Twen 20) 5 minuta, te se nakon toga uroni u TTBS pufer sa 3% BSA i ostavi 30-45 minuta da bi se BSA vezao za sva slobodna mjesta na membrani. Membrana se zatim ispire 2\*5 minuta u TTBS puferu, te se nakon toga inkubira 2 sata u otopini s primarnim antitijelom (antitijela kunića na P-450 1A1 bakalara) i TTBS puferom sa 3% BSA u omjeru 1:300, nakon čega se ponovo ispire 2 puta po 5 minuta sa TTBS puferom. Sekundarno antitijelo (antitijela koze na IgG kunića s enzimom peroksidazom) razrijedi se sa TTBS puferom i 3% BSA u omjeru 1:3000, a membrana se inkubira u toj otopini 60 minuta na sobnoj temperaturi, zatim ispire 2 puta po 5 minuta u TTBS puferu i u deioniziranoj vodi (Goksøyr, 1992a, 1992b). Neposredno prije uporabe pripravi se otopina supstrata 4-kloro-1-naftola tako da se 30 mg 4-kloro-1-naftola otopi u 10 ml metanola i pomiješa s otopinom dobivenom miješanjem 50 ml TBS pufera pH 7,5 (20 mM Trizma baza, 500 mM NaCl) i 30  $\mu$ l 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Membrana se odmah uroni u otopinu koja mora biti zaštićena od svjetla. Obojene vrpce postaju vidljive na mjestima gdje je došlo do reakcije između vezanog enzima peroksidaze i supstrata 4-kloro-1-naftola. Reakcija razvijanja boje traje 5-30 minuta bez prisustva svjetla.

### 3.8. ELISA

Uzorci proteina otopljeni su u puferu pH 9,5 (50 mM Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub>) u koncentracijama od 10, 30 i 90 µg/ml. Po predhodno načinjenoj shemi u svaku jažicu na mikroploči nanosi se po 100 µl otopljenog uzorka ( 1, 3 ili 9 µg proteina) ili 100 µl pufera pH 9,5 u jažice bez uzoraka proteina. Mikroploča se zamota u aluminijsku foliju i ostavi preko noći na 4°C da bi se proteini adsorbirali na površinu jažica. Slijedećeg dana jažice se isperu tri puta s TTBS puferom tako što zadnje ispiranje traje 3-5 minuta. Zatim slijedi blokiranje jažica s 200 µl TBS pufera i 3% BSA (vezivanje proteina na sva eventualno slobodna mjesta) na sobnoj temperaturi 45 minuta. Jažice se ponovno ispiru tri puta s TTBS puferom te se u svaku dodaje 100 µl otopine primarnog antitijela (antitijela kunića na P-450 1A1 bakalara 1:300 u TBS puferu sa 3% BSA) (Goksøyr, 1992a, 1992b). Mikroploča se zamota u aluminijsku foliju i inkubira 2 sata na 37°C. Nakon inkubacije jažice se isperu tri puta s TTBS puferom. Zatim se u svaku jažicu stavlja 100 µl otopine sekundarnog antitijela (antitijela koze na IgG kunića na kojega je vezana peroksidaza, 1:3000 u TBS puferu sa 3% BSA). Mikroploča zamotana u foliju inkubira se 1 sat na 37°C. Nakon toga jažice se isperu pet puta sa TTBS puferom. Otopina supstrata 1,2-diaminobenzola pripravi se neposredno prije uporabe tako da se 15 mg 1,2-diaminobenzola otopi u 40 ml pufera pH 5,7 (150 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 mM Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>\*2H<sub>2</sub>O) i doda 15 µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. U svaku jažicu doda se 100 µl te otopine. Ovisno o količini vezanog specifičnog proteina dolazi do razvijanja boje u vremenu od 5-15 minuta. Reakcija se zaustavlja s 50 µl 4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Intenzitet boje mjeri se na Cecil spektrofotometru Ce 6700 pri 492 nm.



### 3.9. IZOLACIJA PLAZMIDA pUC 18

U 50 ml autoklavirane hranjive podloge tzv. bogati medij (1,2% Baktotripton, 2,4% kvašćevog ekstrakta) doda se 400 µl otopine ampicilina koncentracije 25 µg/ml i nacijepi s 25 µl bakterijske kulture *E. coli* HB 101, čuvane u tekućem dušiku, koja u sebi sadrži pUC 18 sa ili bez fragmenta *CYP 1A1* c-DNA jetre štakora. Eksponencijalnu fazu rasta bakterije dostignu kroz 18 sati inkubacije te se slijedeći dan izolira plazmidna DNA. Prekonoćna kultura bakterija se centrifugira na 16000 g, a nastali talog resuspendira u otopini 50 mM glukoze, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl, te ostavi na ledu 20 minuta. Nakon toga uzorcima se doda otopina za liziranje (0,2 M NaOH, 1% SDS), a uzorci miješaju invertiranjem tubica kroz 30 minuta na ledu. Zatim se liziranim stanicama dodaje acetatni pufer (11,5% ledena octena kiselina, 0,3 M CH<sub>3</sub>COONa), a otopina miješa invertiranjem tubica i drži na ledu 1 sat. Nakon toga uzorci se centrifugiraju na 16000 g pet minuta, a supernatantu se doda RNA-za A. Uzorci se ostave na sobnoj temperaturi 30-40 minuta. Iz tako dobivenog supernatanta izolira se plazmidna DNA naizmjeničnim ekstrakcijama s fenolom te kloroformom, da bi najzad bila istaložena u 50% izopropanolu. Talog se ispere u 70% etanolu i otopi u 20 µl H<sub>2</sub>O i čuva na -20°C (Maniatis i sur., 1982).

### 3.10. RESTRIKCIJSKA ANALIZA

Restriksijska analiza plazmida pUC 18 provodi se restriksijskom endonukleazom ECO RI u otopini 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 1 mM ditiotritol na 37°C u reakcijskom volumenu od 30 µl. Reakcija se zaustavlja dodatkom 15 µl otopine SB-1 pH 7,6 (0,25 M NaOH, 1% SDS) i 15 µl otopine SB-2 (37% saharoza, 0,5 mg/ml bromfenolplavo) (Maniatis i sur., 1982).

### **3.11. ELEKTROFOREZA DNA**

Nakon restrikcijske analize uzorci se podvrgavaju elektroforezi. Elektroforeza DNA u 0,8% agaroznom gelu (Agarose, wide range A-2790) odvija se pri naponu od 90 V i jakosti struje 60 mA tijekom 3 sata. Upotrebljen je pufer pH 8,3 (0,09 M Tris-HCl, 0,09 M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 2,5 mM EDTA). Gel je obojan u otopini etidij-bromida (4 µg /ml) kroz 20 minuta. Nastale vrpce vidljive su pod UV svjetlom (312 nm). Upotrebom standarda molekulskih težina DNA (Pharmacia MW marker) može se doći do informacije o molekulskoj težini fragmenata te ih se može izolirati. Gel se radi dokumentacije snimi na polaroid film (Maniatis i sur., 1982).

### **3.12. REIZOLACIJA DNA**

Željene vrpce DNA dobivene elektroforezom izrežu se iz gela i otope u 5 puta većem volumenu otopine (Tris-HCl, EDTA) pH 8,0 grijanjem na 65°C kroz 5 minuta. Nakon što se uzorci ohlade naizmjenično se ekstrahiraju fenolom, smjesom fenol/kloroform 1:1 i kloroformom te na kraju istalože u 70% etanolu na -20°C (Maniatis i sur., 1982).

### 3.13. OBILJEŽAVANJE PLAZMIDNE DNA

Plazmidna DNA, koja je nakon restrikcijske analize i reizolacije sa gela za elektroforezu ustvari linearizirani plazmid pUC 18 odnosno pUC 18 sa ubačenim fragmentom P-450 1A1 c-DNA štakora, obilježava se uporabom nasumičnih šesterosložnih klica (Feinberg i Vogelstain, 1983; 1984) kao promotora duplikacije DNA i DNA polimeraze I Klenovovog enzima. Plazmidna DNA se najprije zagrijava 3-5 minuta na 95° C, a zatim stavi na led. Za reakciju se uzme maksimalno 100 ng plazmidne DNA i doda u reakcijsku smjesu sa enzimom i ostalim dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dUTP) koji se vežu na komplementarne dezoksinukleozid trifosfate. Reakcija elongacije započinje sa 3'-OH slobodnog kraja molekule plazmidne DNA ka 5'-OH kraju. Važno je naglasiti da je na dUTP vezan biotin. Enzimska reakcija teče 1 sat na sobnoj temperaturi u mraku. Reakcija se zaustavlja dodatkom 0.2 M otopine EDTA pH 8.0 i zagrije na 65°C.

### 3.14. IZOLACIJA RNA

Izolacija RNA rađena je metodom koju su opisali Chomczynski i Sacchi (1987). Jetra (cca 1 g) se homogenizira u 10 puta većem volumenu otopine za homogenizaciju (4 M gvanidiniumtiocijanat, 25 mM  $C_6H_5O_7Na_3$ , 0,5% N-laurinsarkosin, 0.1 M merkaptoetanol). U homogenat se doda 2 ml 2 M natrijacetata, 10 ml fenola pH 4 i 4 ml otopine kloroforma i izoamilnog alkohola 49:1 te ponovo homogenizira. Homogenat se centrifugira na 10000 g 20 minuta na 4°C. U dekantirani supernatant doda se isti volumen izopropanola i ostavi na -20°C najmanje 1 sat. Uzorci se ponovno centrifugiraju na 10000 g 20 minuta, a talog se otopi u otopini za homogenizaciju. Tako pripremljeni uzorci raspodijele se u manje alikvote uz dodatak jednakog volumena izopropanola i čuvani su 16 sati na -20°C. Nakon centrifugiranja na 16000 g 1 minutu bijeli talog ispere se u 70% etanolu i otopi u vodi.

### **3.15. DOT BLOTTING**

-Priprava membrane- Za nanošenje uzoraka koristi se uređaj MILIPORE MilliBlot-D spojen na vakuum pumpu. Uzorci RNA nanoseni su na membranu po zadanoj shemi u zadanim koncentracijama. Nakon toga membrana se suši u vakuumu na 80°C 2 sata nakon čega se ostavi u vakuumu 16 sati na sobnoj temperaturi.

### **3.16. HIBRIDIZACIJA m-RNA I DNA**

Membrana sa uzorcima RNA (DOT BLOT) se najprije namoči u SSC pufer. Nakon toga membrana se prehibridizira s hibridizacijskim puferom (0,5% PVP, 5% dekstran sulfat, 2,0% SDS, 0,2% heparin, 1 mM EDTA, 1 M NaCl, 50 mM Tris-Hcl) 3 sata na 65°C. Biotinizirane probe (pUC 18 kao kontrola i pUC 18 s fragmentom za CYP 1A1) se zagriju na 95°C i dodaju u svježe pripravljen hibridizacijski pufer zagrijan na 65°C te dodaju u posebne najlon vrećice sa membranom. Hibridizacija se provodi 16 sati na 65°C pri čemu se specifična sekvenca DNA koja kodira za izoenzim citokrom P-450 1A1 veže za specifičnu m-RNA, a sam pUC 18 služi kao negativna kontrola. Hibridizirana membrana ispiru se sa posthibridizacijskim puferom i SSC puferom na 65°C (Bronstein i Voyta, 1989).

### **3.17. DETEKCIJA HIBRIDIZIRANE DNA KEMOLUMINISCENCIJOM**

Membrana je isprana te inkubirana 60 minuta u blokirajućem puferu (0,2% I-Light Blocking Reagent, 58 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 17 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 68 mM NaCl, 0,1% Tween-20). Nakon toga membrana je inkubirana 30 minuta na sobnoj temperaturi u konjugacijskom puferu (0,2% I-Light Blocking Reagent, 58 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 17 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 68 mM NaCl) sa otopljenim avidin-alkalna fosfataza kompleksom. Membrana se zatim ispiru s blokirajućim puferom, puferom za ispiranje (58 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 17 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 68 mM NaCl, 0,3% Tween 20), te u 0,1 M otopini dietanolamina i 1 mM MgCl<sub>2</sub> sa 0,02% natrij-azida. Nakon toga membrana se inkubira 5 minuta na sobnoj temperaturi u otopini AMPPD supstrata, nakon čega se membrana odvoji od otopine sa supstratom i postavi u direktan kontakt s röntgen filmom. Nakon 2 sata ekspozicije film se razvije a dobivena točkasta zasjenjenja govore o prisutnosti specifične m-RNA u uzorku (Bronstein i Voyta, 1989). Točkasta zasjenjenja kvantiziraju se denzitometrijski na Cecil spektrofotometru CE 6700.

### **3.18. PRIKAZ I OBRADA REZULTATA**

Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom i brojem uzoraka u zagradi. Za statističku obradu podataka korišten je Welsch-P2 test (Welsch, 1977). Statistički značajnom razlikom uzeta je ona za koju je  $p < 0.05$ .

## **4. R E Z U L T A T I**

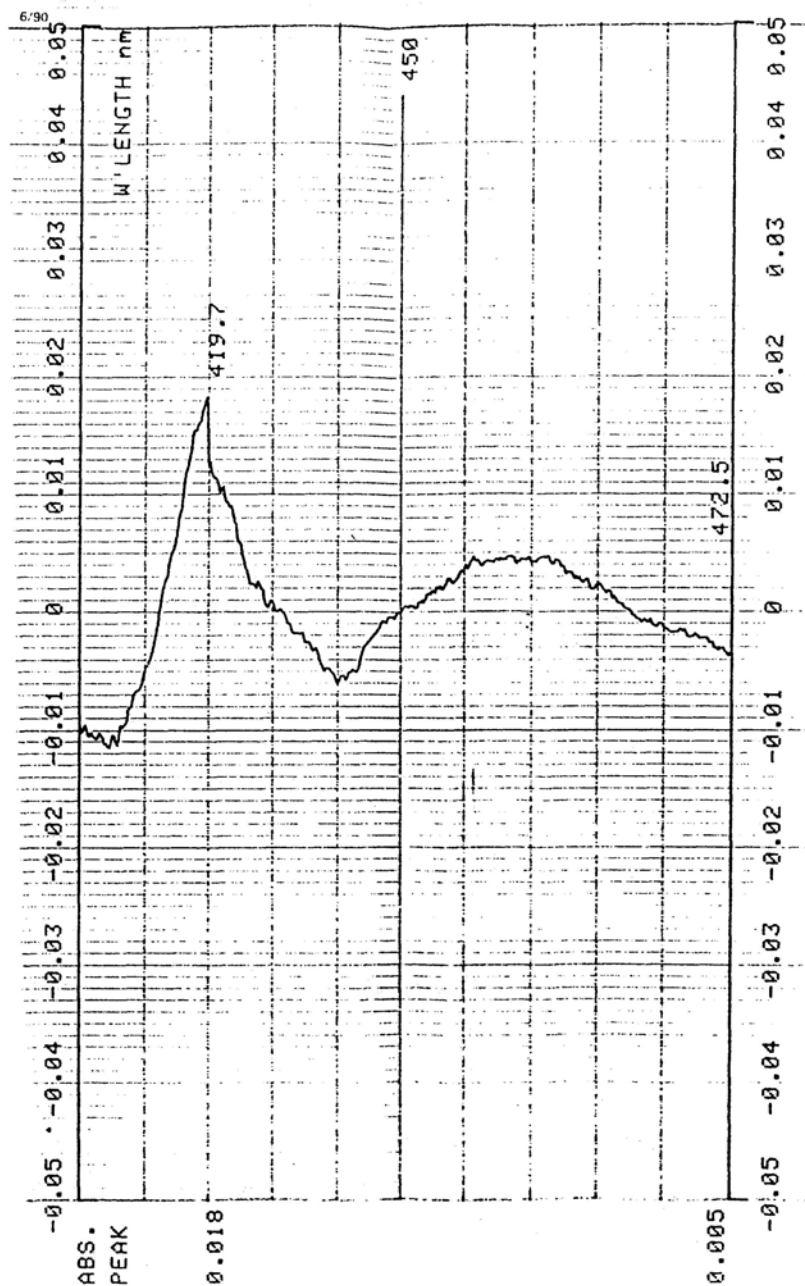
## **4.1. BIOKEMIJSKE KARAKTERISTIKE CITOKROMA P-450 MIKROSOMSKE FRAKCIJE JETRE LUBINA**

### **4.1.1. Diferencijalni spektri**

Nazočnost citokroma P-450 u preparatima mikrosomskih frakcija jetre lubina određivali smo metodom Omura i Sato (1964). Za mjerenje diferencijalnog spektra citokroma P-450 uzorci mikrosomskih frakcija razrijeđeni su do 1 mg proteina/ml i u njih je dodano nekoliko zrnaca natrij ditionita. Tako pripremljeni uzorak podijeljen je u dvije kivete od kojih je jedna tretirana s CO. Izraziti maksimum na 450 nm zabilježen je međutim samo u nekih uzoraka.

Jedan primjer mjerenja diferencijalnog spektra citokroma P-450 prikazan je na slici 7. Iz dobivenog rezultata proizlazi da je maksimum diferencijalneapsorbancije na 420 nm, međutim ponavljanjem pokusa taj rezultat nije bio ponovljiv nego se taj maksimum pojavio na drugim valnim duljinama ili uopće nije izmjeren. Prema literaturnim podacima maksimum bi trebao biti na 450 nm, što nije izmjereno niti u jednom pokusu, pa stoga nije bilo moguće izračunati količinu ukupnog P-450 metodom koju su opisali Omura i Sato (1964).

Poznato je da do denaturacije citokroma P-450 i prelaska u P-420 oblik dolazi zbog ekspozicije ksenobioticima, sezonskih varijacija (Livingstone i sur., 1989) te što je vrlo važno, uslijed utjecaja onih zagađivala koja uzrokuju destrukciju nativnog enzima te inhibiraju enzimsku aktivnost kako su to opisali Fent i Stegeman (1991; 1993) za organokositrene spojeve. U svim tim činjenicama treba potražiti uzrok neponovljivosti naših mjerenja diferencijalnih spektara.



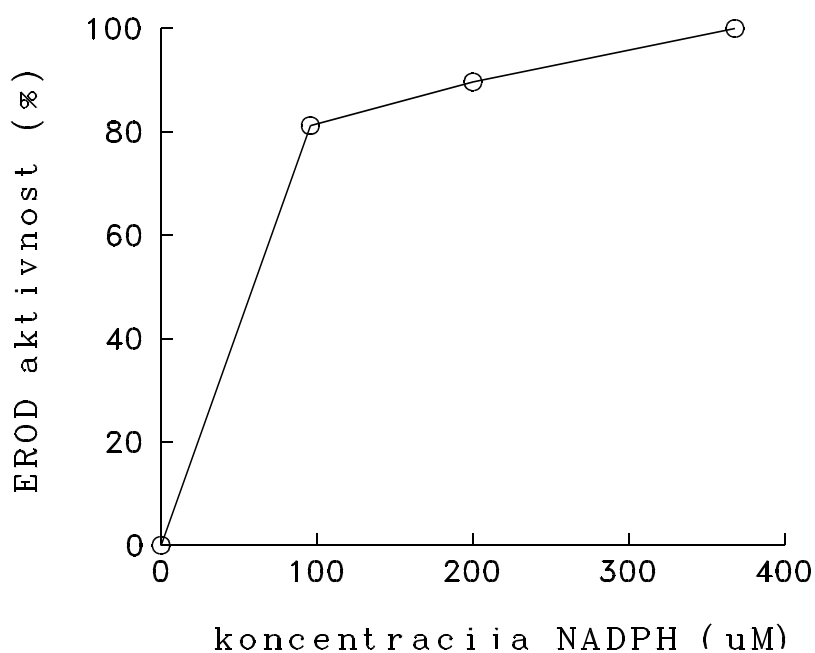
**Slika 7.** Diferencijalni spektar citokroma P-450 mikrosomske frakcije jetre lubina tretiranog sa 1.8 mg  $\beta$ -NF/kg tjelesne težine nakon 48 sati inkubacije. Uzorak je sadržavao 1 mg/ml proteina.



## 4.1.2. Određivanje EROD aktivnosti

### 4.1.2.1. Ovisnost EROD aktivnosti o koncentraciji NADPH

Ovisnost EROD aktivnosti o koncentraciji NADPH prikazana je na slici 8. Količina nastalog produkta resorufina mjerena je nakon 3 minute enzimske reakcije uz koncentraciju supstrata od  $12,5 \mu\text{M}$  i  $50 \mu\text{l}$  mikrosomske frakcije jetre kontrolnih lubina.



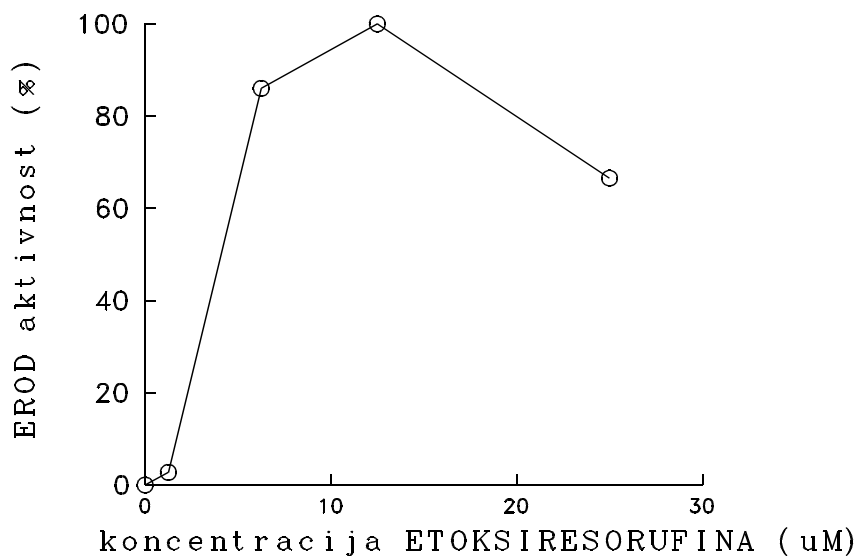
**Slika 8.** Ovisnost EROD aktivnosti o koncentraciji NADPH

Prikazane su srednje vrijednosti 2-3 mjerenja na mikrosomskim frakcijama jetre jednog lubina.

Enzimska aktivnost EROD povećava se s porastom koncentracije kofaktora NADPH. Pri koncentracijama NADPH  $> 100 \mu\text{M}$  povećanje EROD aktivnosti je manje u odnosu na porast enzimatske aktivnosti kod nižih koncentracija NADPH, tj. u tim je uvjetima enzim zasićen kofaktorom.

#### 4.1.2.2. Ovisnost EROD aktivnosti o koncentraciji supstrata

Ovisnost EROD aktivnosti o koncentraciji supstrata etoksiresorufina prikazana je na slici 9. Količina nastalog produkta resorufina mjerena je nakon 3 minute enzimske reakcije uz koncentraciju NADPH od 200  $\mu$ M i 50  $\mu$ l mikrosomske frakcije jetre kontrolnih lubina.

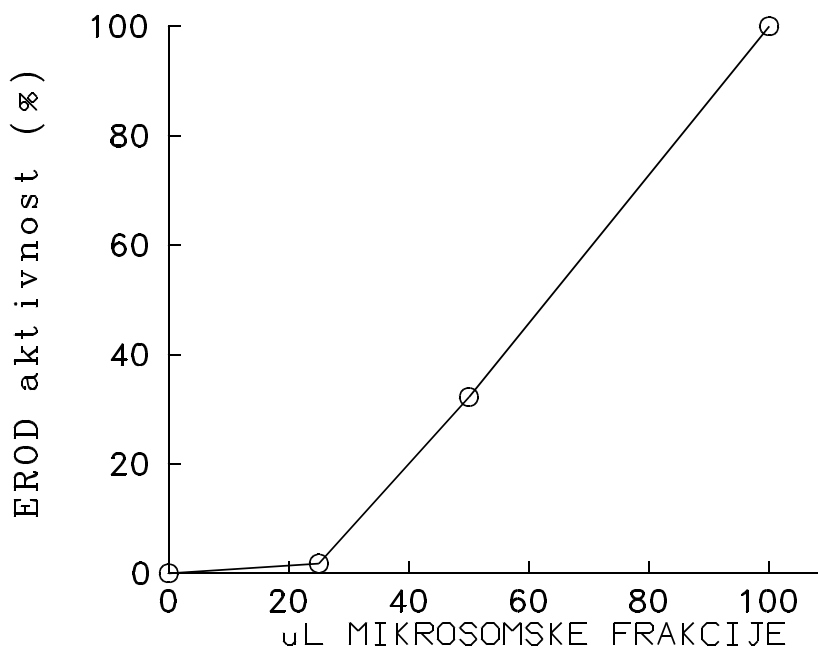


**Slika 9.** Ovisnost EROD aktivnosti o koncentraciji supstrata. Prikazane su srednje vrijednosti 2-3 mjerenja na mikrosomskim frakcijama jetre jednog lubina.

Najbolji rezultati, tj. najveća enzimaska aktivnost postiže se pri koncentraciji supstrata od 12.5  $\mu$ M. Daljnjim povećavanjem koncentracije supstrata enzimaska aktivnost opada. Moguće objašnjenje je inhibicija enzimske reakcije povećanom količinom supstrata.

#### 4.1.2.3. Ovisnost EROD aktivnosti o količini mikrosomske frakcije jetre lubina

Ovisnost EROD aktivnosti o količini mikrosomske frakcije jetre lubina (koncentraciji enzima) prikazana je na slici 10. Količina nastalog produkta resorufina mjerena je nakon 3 minute enzimske reakcije uz koncentraciju NADPH od 200  $\mu$ M i 12,5  $\mu$ l supstrata.

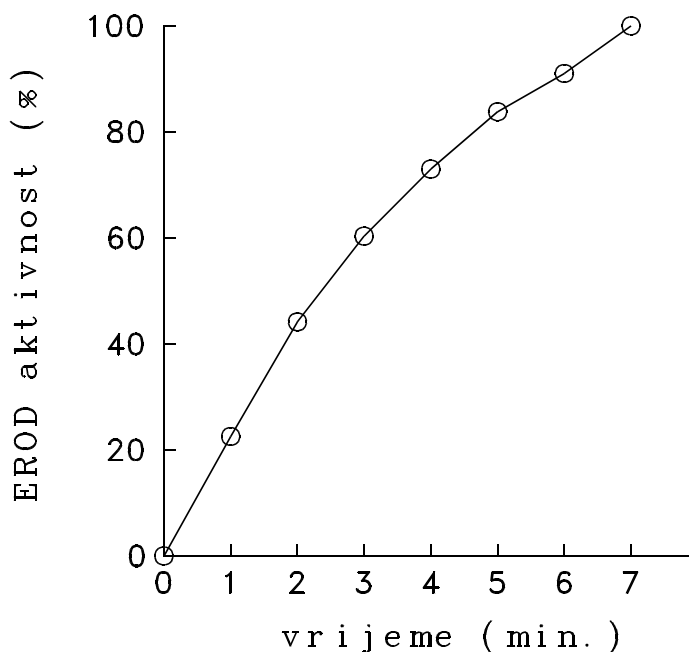


**Slika 10.** Ovisnost EROD aktivnosti o količini mikrosomskefrakcije jetre lubina. Prikazane su srednje vrijednosti 2-3 mjerenja na mikrosomskim frakcijama jetre jednog lubina.

Povećanjem količine mikrosomske frakcije jetre lubina, odnosno koncentracije enzima, EROD aktivnost povećava se linearno u rasponu od 25-100  $\mu$ l mikrosomske frakcije, što odgovara količini proteina od 0.25-1.25 mg. Pravac koji povezuje EROD aktivnost sa količinom proteina u mikrosomskoj frakciji jetre lubina ne prolazi ishodištem. Pri izračunavanju EROD aktivnosti nije provedena korekcija u pomaku pravca iz ishodišta.

#### 4.1.2.4. Ovisnost EROD aktivnosti o vremenu reakcije

Ovisnost EROD aktivnosti o vremenu prikazana je na slici 11. Količina nastalog produkta resorufina mjerena svakih 60 sekundi kroz 7 minuta enzimske reakcije uz koncentraciju NADPH od 200  $\mu$ M, 12,5  $\mu$ l supstrata i 50  $\mu$ l mikrosomske frakcije jetre kontrolnih lubina.



**Slika 11.** Ovisnost EROD aktivnosti o vremenu reakcije.

Prikazane su srednje vrijednosti 2-3 mjerenja na mikrosomskim frakcijama jetre jednog lubina.

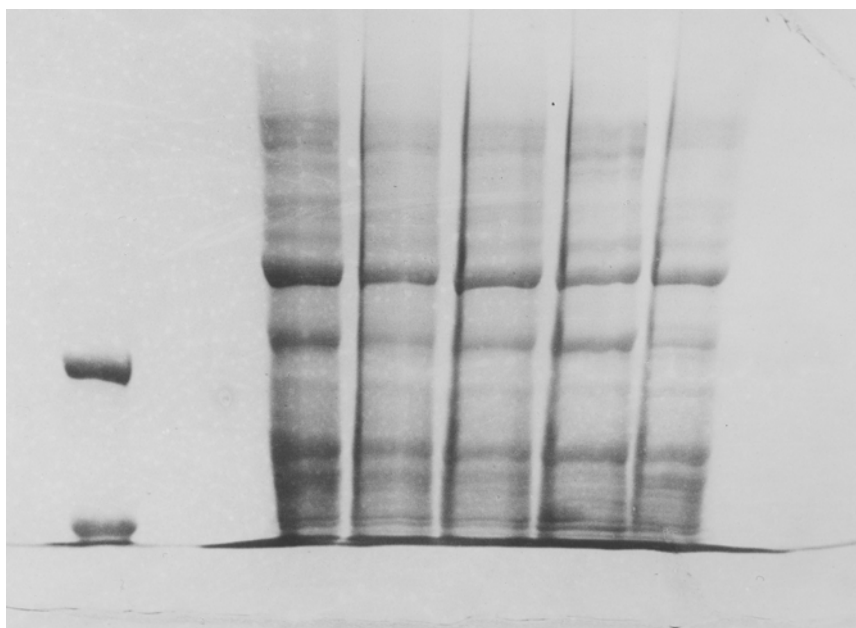
Praćenjem enzimske reakcije kroz duži vremenski period povećava se i količina novonastalog produkta etoksiresorufina. Taj je prirast linearan u prve tri minute enzimske reakcije nakon čega se postepeno smanjuje.

#### **4.1.2.5. Odabir optimalnih uvjeta za mjerenja EROD i PROD aktivnosti**

Na osnovu ovih rezultata utvrđeni su optimalni uvjeti rada za mjerenje EROD i PROD aktivnosti u mikrosomskim frakcijama jetre lubina, a to su koncentracija NADPH 200  $\mu\text{M}$ , koncentracija supstrata 12.5  $\mu\text{M}$ , količina homogenata 50  $\mu\text{l}$  (0.5-1 mg proteina) te vrijeme praćenja enzimatske reakcije 3 minute.

#### **4.1.3. Određivanje molekulske mase monomera CYP 1A1**

30  $\mu\text{g}$  proteina mikrosomske frakcije jetre lubina injektiranih s 300  $\mu\text{l}$  smjese DMSO i sezamova ulja 3:7 (kontrola), zatim lubina injektiranih s 300  $\mu\text{l}$  otopine  $\beta\text{NF}$  u smjesi DMSO/sezamovo ulje 3:7 (1 mg/ml), te lubina injektiranih ekstraktima morske vode sa tri različite prirodne lokacije (Tvornica Duhana, Mirna, Figarola) analizirano je SDS poliakril amid gel elektroforezom. Za određivanje molekulskih masa proteinskih vrpce korišteni su markeri poznate molekulske mase (Sigma Chemical Company), ovalbumin molekulske mase 45000 Da i albumin iz goveđe plazme molekulske mase 66000 Da. Elektroforeza proteina mikrosomske frakcije u diskontinuiranom gelu snimljena je na fotografski papir i prikazana na slici 12.



**Slika 12.** Elektroforeza proteina mikrosomskih frakcija jetre lubina u diskontinuiranom poliakril amidnom gelu sa SD.

1 - Standardi molekulskih težina (ovalbumin 45 kDa;  
albumin iz goveđe plazme 66 kDa)

2 - kontrola

3 -  $\beta$ -naftoflavon

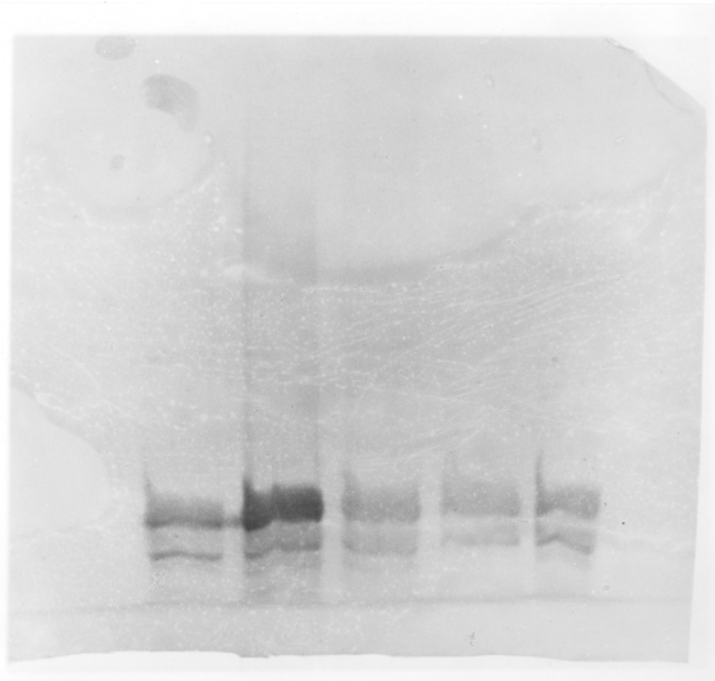
4 - Figarola

5 - Mirna

6 - Tvornica Duhana

U uzorcima je uočljivo nekoliko jasno odijeljenih elektroforetskih vrpca molekulskih težina 81000; 67600; 54300 i 52500 Da.

Nakon elektroforeze proteinske vrpce su sa gela prenešene na nitroceluloznu membranu. Reakcijom sa poliklonalnim antitijelima (antitijela kunića na P-450 1A1 bakalara) te vezivanjem sekundarnog antitijela na ta specifično vezana primarna antitijela, koja za sebe imaju kovalentno vezan enzim peroksidazu, membrana se, u prisustvu peroksidaznog supstrata, specifično oboji na mjestima onih proteinskih vrpce koje odgovaraju CYP 1A1 (Western blot) (slika 13).



**Slika 13.** Nitrocelulozna membrana sa vidljivo obojenim proteinskim vrpcama CYP 1A1.

- 1 - kontrola
- 2 -  $\beta$ -naftoflavon
- 3 - Figarola
- 4 - Mirna
- 5 - Tvornica Duhana

Usporedbom obojenih proteinskih vrpca na nitroceluloznoj membrani sa proteinskim vrpca nastalim na poliakril amidnom gelu i vrpca standarda molekulskih težina, određene su pripadne molekulske težine CYP 1A1 od 54300 i 52500 Da za sve uzorke. Vidljivo je da su CYP 1A1 vrpce najintenzivnije u uzorku izoliranom iz  $\beta$ NF injektiranih lubina. Obzirom da je u svakom uzorku bila nanesena ista količina mikrosomskih proteina pripravci  $\beta$ -NF tretiranih lubina sadržavali su najveću količinu CYP 1A1. Kontrolne vrpce bez antitijela nisu dale nikakav signal. To se slaže sa literaturnim podacima (Stegeman i Kloepper-Sams, 1987; Goksøyr, 1987) koji su potvrđeni i u ovom radu te govore u prilog činjenici da je  $\beta$ -NF najučinkovitiji inducer CYP 1A1 u riba.



## 4.2. ODREĐIVANJE EROD I PROD AKTIVNOSTI

EROD i PROD aktivnosti mikrosomskih frakcija određivani su odmah po pripravi uzoraka metodom po Burku i Mayeru (1974) uz optimalne uvjete koncentracije NADPH od 200  $\mu$ M, supstrata etoksiresorufina 12.5  $\mu$ M i 50  $\mu$ l mikrosomske frakcije jetre lubina u 0.1 M fosfatnom puferu pH 7.7. Porast fluorescencije praćen je kroz 5 minuta. Dobiveni rezultati izraženi su u pmol resorufina po mg proteina i minuti te prikazani u tablici 1. Najviša EROD aktivnost zabilježena je nakon indukcije riba tretiranih  $\beta$ -NF i viša je 8.24 puta u odnosu na kontrole. Indukcija EROD aktivnosti modelnim spojevima opada u nizu  $\beta$ -NF, MC, Aro, PB. Uzorci dobiveni izolacijom jetre lubina koji su injektirani ekstraktima morske vode sa različitih lokacija ne pokazuju značajan porast EROD aktivnosti u odnosu na kontrolne uzorke. Štoviše, ribe injektirane ekstraktima vode sa ispusta tvornice ribljih konzervi Mirna pokazuju nižu EROD aktivnost od kontrolnog uzorka. Razlog tomu može biti ekstrakcija zagađivala iz premale količine morske vode ili pak sastav ekstrahirane grupe zagađivala. Naime, poznato je da su prirodni uzorci morske vode, pa tako i njihovi ekstrakti, često opterećeni supresorima P-450 monooksigenaza koji mogu potisnuti sintezu P-450 proteina i tako inhibirati njegovu katalitičku aktivnost (Stebbing, 1992; Goksøyr i Förlin, 1992). Naši nalazi količine P-450 1A1 proteina govore u prilog ovoj tvrdnji (slika 17.).

**Tablica 1.** Rezultati mjerenja EROD i PROD aktivnosti u mikrosomskim frakcijama jetre kontrolnih lubina odnosno lubina injektiranih modelnim inducerima i ekstraktima morske vode sa različitih lokacija. Svaki broj je srednja vrijednost ( $\pm$  standardna devijacija) dobivena mjerenjem u mikrosomskim frakcijama jetre u tri različita lubina.

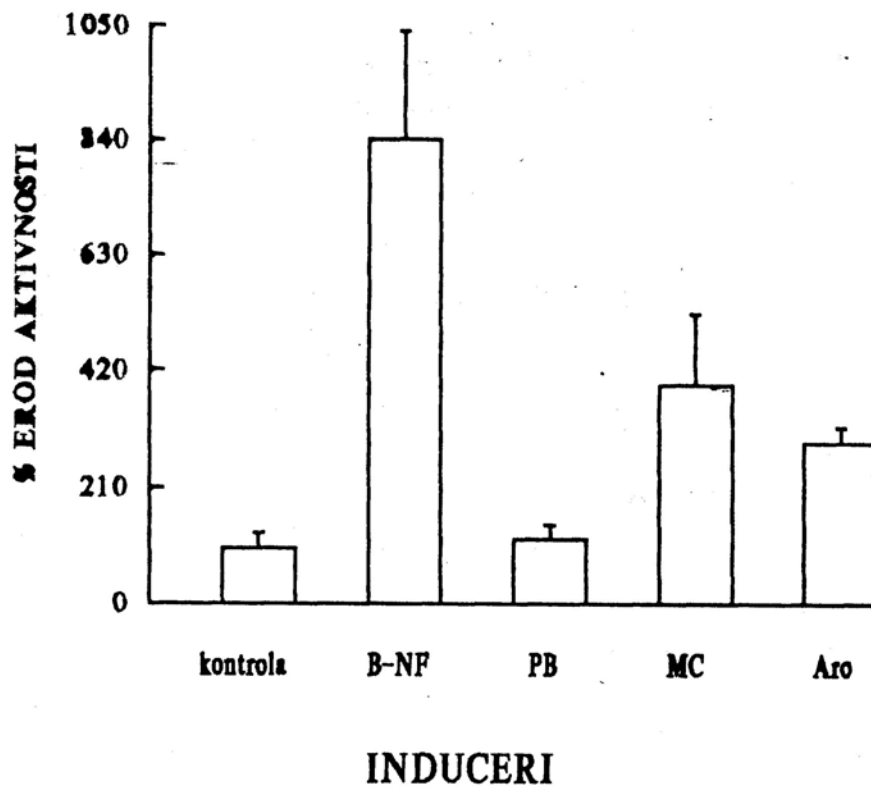
	EROD pmol resorufina/mg*min	PROD pmol resorufina/mg*min
kontrola	20.9 $\pm$ 5.6 (3)	0.8 $\pm$ 0.4 (3)
$\beta$ NF	176 $\pm$ 42 (3) *	6.2 $\pm$ 1.9 (3) *
PB	24.3 $\pm$ 5.4 (3)	3.2 $\pm$ 0.2 (3) *
MC	82 $\pm$ 27 (3) *	1.5 $\pm$ 0.5 (3)
Aro	61.3 $\pm$ 5.7 (3) *	2.7 $\pm$ 0.5 (3) *
TD	21.3 $\pm$ 3.5 (3)	0.2 $\pm$ 0.0 (3)
Mirna	7.9 $\pm$ 3.7 (3)	3.2 $\pm$ 0.4 (3) *
Figarola	20.3 $\pm$ 5.4 (3)	0.90 $\pm$ 0.05 (3)

Rezultati označeni zvjezdicom (\*) pokazuju značajnu statističku razliku u odnosu na kontrolu izračunatu Welsch-P2 testom ( $p < 0.05$ ).

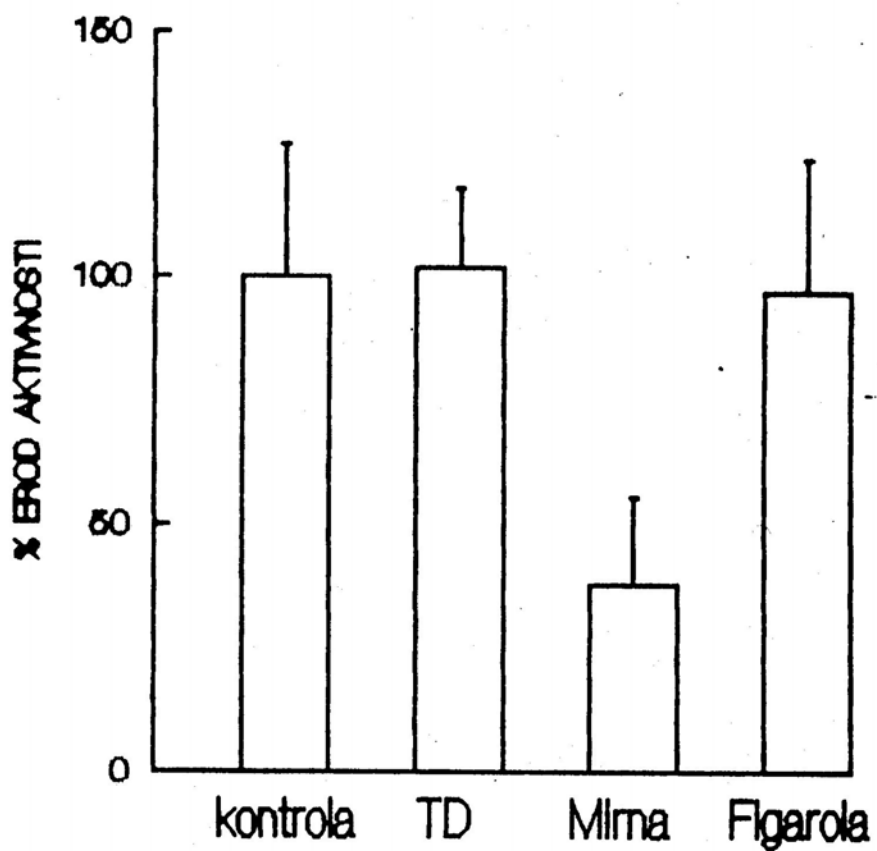
Iz tablice 1. proizlazi da je PROD aktivnost znatno manja od EROD aktivnosti i u kontrolnim uzorcima i u u uzorcima lubina injektiranih inducerima odnosno ekstraktima morske vode. Obzirom da su PROD aktivnosti teže mjerljive od EROD aktivnosti standardne devijacije PROD aktivnosti izražene su na jednu, a EROD aktivnosti na dvije znamenke.

U pogledu povećanja aktivnosti enzima u odnosu na kontrolu proizlazi da postoje razlike između EROD i PROD enzima. Ekstrakti morske vodenisu povećali aktivnost EROD dočim je jedan ekstrakt sa lokacije Mirna povećao aktivnost PROD. Nadalje, PB je uzrokovao povećanje PROD aktivnosti ali nema utjecaj na EROD, dok je suprotni efekt nađen za MC.

Promjene EROD aktivnosti prikazane su u relativnim odnosima prema vrijednosti kontrole (slike 14. i 15.).



**Slika 14.** EROD aktivnosti mikrosomskih frakcijama jetre lubina injektiranih modelnim inducerima prema EROD aktivnosti kontrolnog uzorka.  
 B-NF -  $\beta$ -naftoflavon  
 PB - fenobarbital  
 MC - metilholantren  
 Aro - Aroklor 1254



**Slika 15.** EROD aktivnosti mikrosomskih frakcijama jetre lubina injektiraniheksraktima morske vode sa različitim lokacija (Tvornica Duhana, Mirna, Figarola) prema EROD aktivnosti kontrolnog uzorka.

### 4.3. ELISA

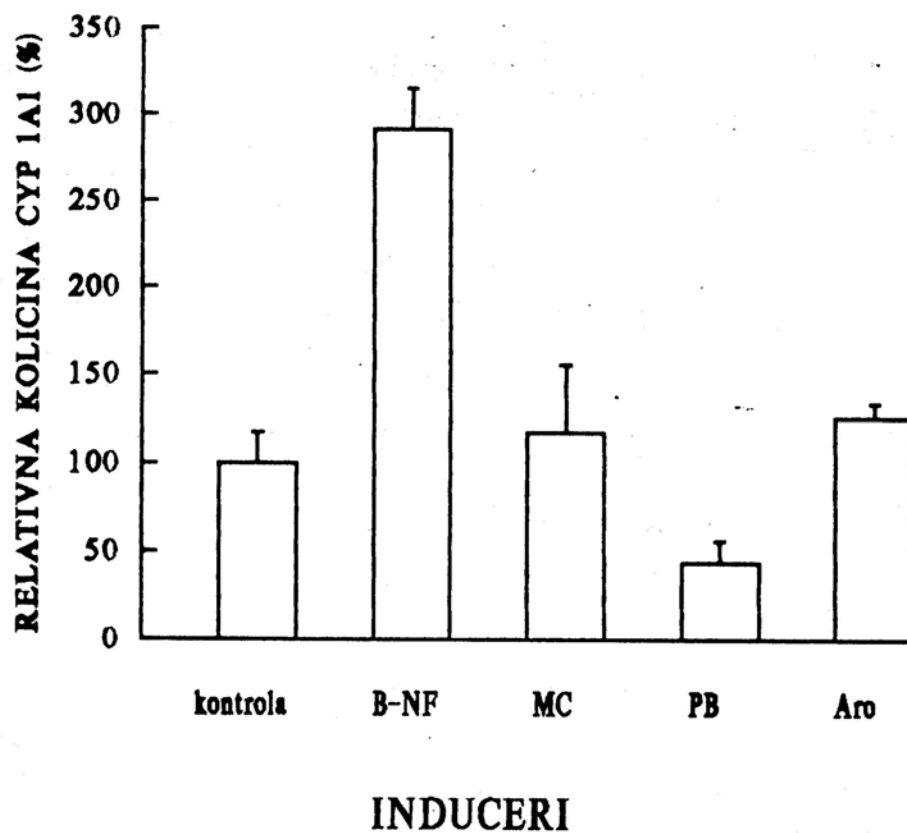
Rezultati dobiveni ELISA tehnikom, mjerenjem apsorbancije na 492 nm, prikazani su u tablici 2. te na slikama 16 i 17.

Na slici 16 prikazana je relativna količina količina CYP 1A1 mikrosomskih frakcija jetre lubina injektiranih modelnim spojevima. Najviša količina CYP 1A1 izmjerena je u uzorku riba tretiranih  $\beta$ -NF koja je 2,9 puta veća u odnosu na kontrolu. U uzorcima riba tretiranih Aroklorom 1254 i MC također je zabilježena nešto veća količina CYP 1A1 u odnosu na kontrolni uzorak i iznosi 1.26 puta za Aroklor 1254 odnosno 1.17 za MC., dok je u uzorku riba tretiranih PB količina CYP 1A1 niža u odnosu na kontrolu za 2.3 puta.

Na slici 17 prikazana je relativna količina CYP 1A1 u riba injektiranih ekstraktima morske vode s raličitih lokacija (Tvornica Duhana, Mirna, Figarola) u odnosu na količinu CYP 1A1 kontrolnog uzorka. Veće količine CYP 1A1 izmjerene su u uzorcima kontrolnih riba, a količina CYP 1A1 riba tretiranih ekstraktima morske vode opada u nizu Tvornica Duhana, Figarola, Mirna, što jasno pkazuje inhibitorno djelovanje zagađivala injektiranih ekstraktima morske vode sa tih lokacija. Drugo bi objašnjenje moglo biti da neke tvari prisutne u jetrama tretiranih riba mogu utjecati na interakciju antitijelo-antigen, što je manje vjerojatno.

**Tablica 2.** Rezultati mjerenja CYP 1A1 u mikrosomskim frakcijama jetre kontrolnih lubina odnosno lubina injektiranih inducerima te ekstraktima morske vode sa različitih lokacija. Svaki broj je srednja vrijednost ( $\pm$  standardna devijacija) dobivena mjerenjem u mikrosomskim frakcijama jetre u tri različita lubina.

	CYP 1A1 jedinice apsorbancije/mg proteina
kontrola	0.19 $\pm$ 0.03 (3)
$\beta$ -NF	0.56 $\pm$ 0.04 (3)
PB	0.08 $\pm$ 0.02 (3)
MC	0.22 $\pm$ 0.07 (3)
Aro	0.24 $\pm$ 0.01 (3)
TD	0.12 $\pm$ 0.01 (3)
Mirna	0.08 $\pm$ 0.01 (3)
Figarola	0.10 $\pm$ 0.01 (3)



**Slika 16.** Relativna količina CYP 1A1 u mikrosomskim frakcijama jetre  
 lubina injektiranih modelnim inducerima u odnosu na kontrolu.

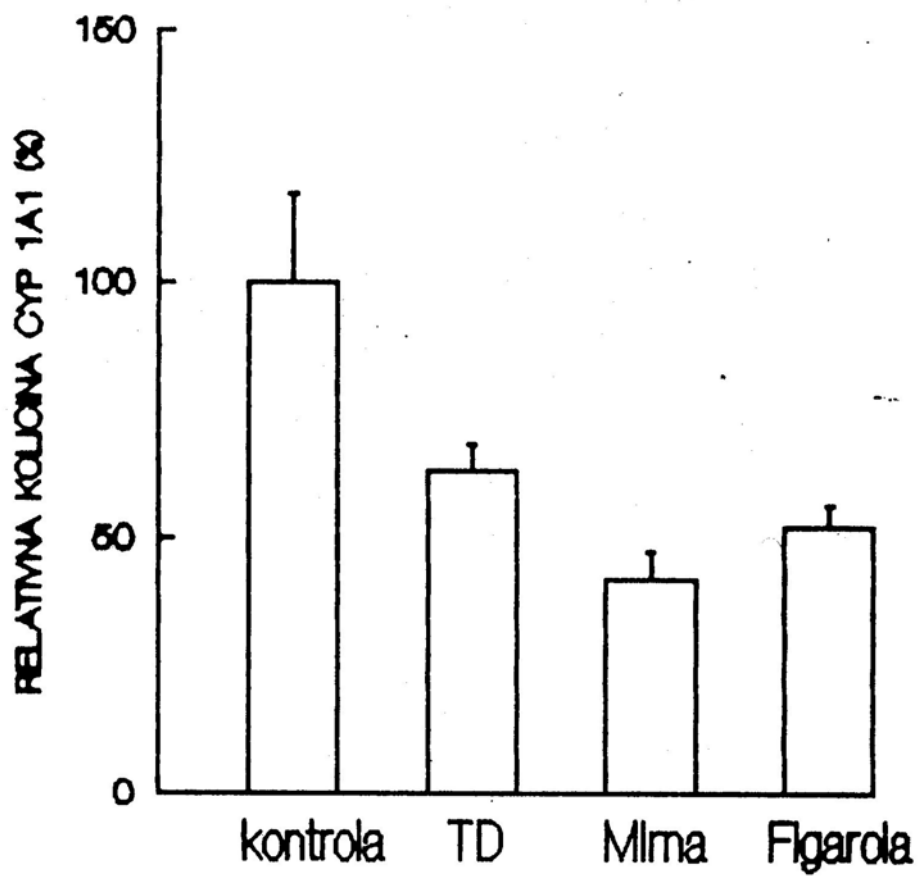
B-NF -  $\beta$ -naftoflavon

MC - metilholantren

PB - fenobarbital

Aro - Aroklor 1254





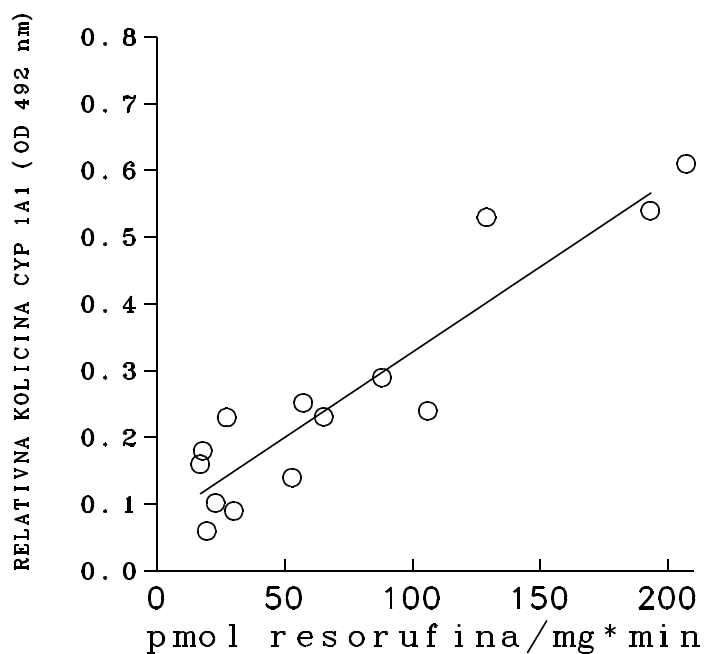
**Slika 17.** Relativna količina CYP 1A1 u mikrosomskim frakcijama jetre riba injektiranih ekstraktima morske vode sa različitih lokacija (Tvornica Duhana, Mirna, Figarola) prema količini CYP 1A1 u kontrolnom uzorku.

#### 4.4. MEĐUSOBNI ODNOS REZULTATA EROD AKTIVNOSTI I KOLIČINE CYP 1A1 (ELISA)

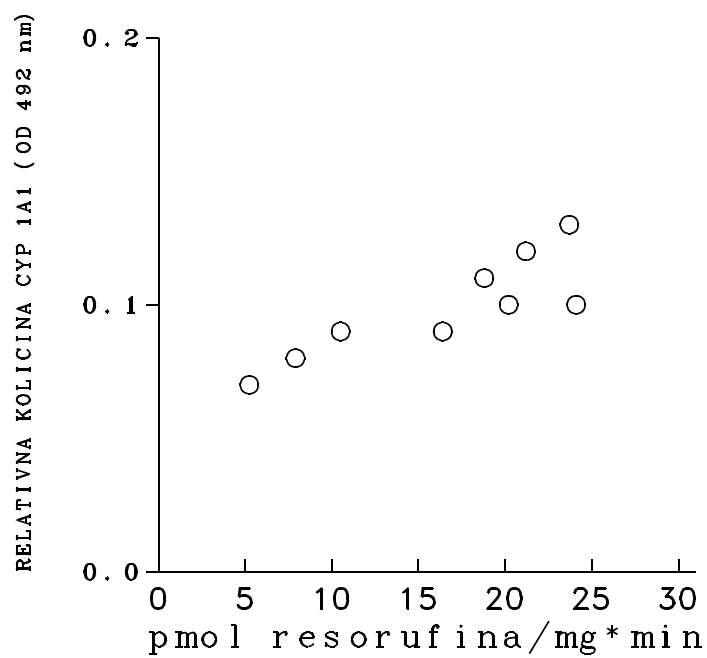
Međusobni odnos rezultata dobivenih mjerenjem količine CYP 1A1 (ELISA) i katalitičke aktivnosti (EROD) za uzorke mikrosomskih frakcija jetre lubina injektiranih modelnim inducerima prikazan je na slici 18. Povećanje katalitičke aktivnosti proporcionalno je povećanju količine CYP 1A1. Ta funkcija opisana je jednadžbom pravca  $Y = 2.56 \cdot 10^{-3}X + 0.072$  ( $n=15$ ;  $r=0.91$ ), gdje X predstavlja količinu nastalog produkta enzimske reakcije resorufina u pmol, a Y relativnu količinu CYP 1A1. Najveće povećanje EROD aktivnosti i relativne količine CYP 1A1 uzrokuje  $\beta$ -NF, a gotovo nikakvo PB. Relativno povećanje CYP 1A1 bilo je gotovo jednako kod uzoraka tretiranih sa MC i Aroklorom 1254, međutim EROD aktivnost je kod uzoraka tretiranih Aroklorom 1254 manje povećana nego u uzorcima tretiranih s MC. Uzrok tome je vjerojatno denaturacija CYP 1A1 *in vitro* ili inhibicija enzimske aktivnosti, obzirom da su poliklorirani bifenili poznati induceri CYP 1A1 (Gooch i sur., 1989; Miranda i sur., 1990b).

Na slici 19. prikazan je odnos rezultata dobivenih mjerenjem količine CYP 1A1 (ELISA) i katalitičke aktivnosti (EROD) za uzorke mikrosomskih frakcija jetre lubina injektiranih s ekstraktima morske vode s različitih lokacija (Tvornica Duhana, Figarola, Mirna). Iz slike 19. proizlazi da su u svim uzorcima relativne količine CYP 1A1 približno jednake dok EROD aktivnost varira u rasponu od 5-25 pmola resorufina. Prema tome usporedbom tih odnosa ne može se procijeniti količina CYP 1A1 na osnovi katalitičke aktivnosti ili obrnuto: povećanjem EROD aktivnosti procijeniti količina CYP 1A1.

Te razlike možemo objasniti nepoznatim utjecajem smjese zagađivala iz ekstrakta morske vode na nativni protein ili njegovu biosintezu.



**Slika 18.** Međusobna ovisnost relative količine CYP 1A1 i količine produkta EROD aktivnosti za uzorke injektirane modelnim spojevima. Na slici su prikazani pojedinačni rezultai iz tablica 1. i 2.

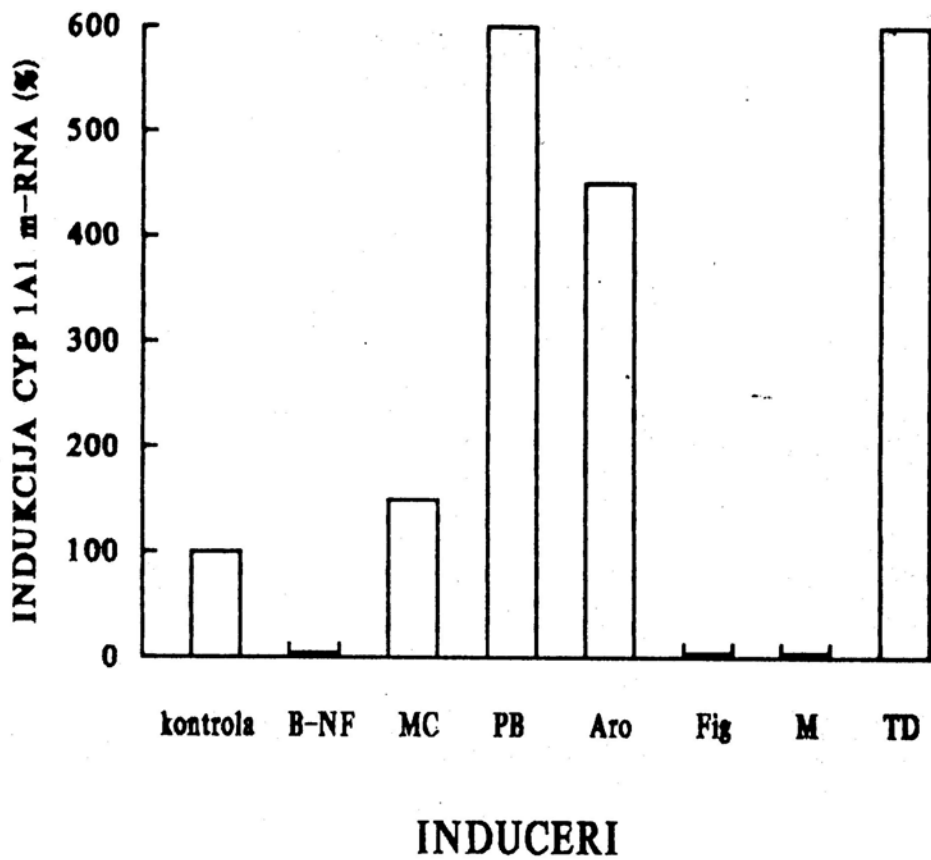


**Slika 19.** Međusobna ovisnost količine CYP 1A1 i količine produkta enzimske reakcije za uzorke injektirane ekstraktima morsk voe sa različith lokacija (Tvornica Duhana, Figarola, Mirna). Na slici su prikazani pojedinačni rezultai iz tablica 1. i 2.

#### **4.5. ANALIZA *DE NOVO* SINTEZE CYP 1A1 m-RNA**

Na slici 20. prikazane su relativne količine CYP 1A1 m-RNA u u uzorcima riba injektiranih modelnim spojevima i ekstraktima morske vode sa prirodnih lokacija (Tvornica Duhana, Figarola, Mirna). Intenzitet vrpce nastalih hibridizacijom m-RNA i plazmidne DNA izražen je jedinicama absorbancije kod valne duljine 600 nm. Vidljivo je da postoje ekstremne razlike u indukciji pripadajućih m-RNA. U uzorku u kojem smo izmjerili najveću katalitičku aktivnost i najveću količinu CYP 1A1 nismo uspjeli izmjeriti i najveću količinu m-RNA.

Na osnovu dobivenih rezultata nemoguće je procijeniti inducibilnost *CYP 1A1* mjerenjem količine pripadajuće m-RNA ili *de novo* sinteze tih proteina.



**Slika 20.** Relativna količina CYP 1A1 m-RNA u uzorcima injektiranim modelnim inducerima:  $\beta$ -naftoflavon (B-NF), metilholantren (MC), fenobarbital (PB), Aroklor 1254 (Aro) te ekstraktima morske vode sa prirodnih lokacija (Figarola, Mirna, Tvornica Duhana) u odnosu na kontrolni uzorak.

## **5. DISKUSIJA**

Obzirom da kemijsko-analitički nalaz specifičnih zagađivala sam za sebe ne dokazuje i postojanje biološkog rizika u izloženih organizama njihov se učinak na organizam može procijeniti mjerenjem njihovih efekata na različitim nivoima biološke organizacije, kao što su molekularni nivo, stanični nivo, nivo jedinke, populacije ili zajednice. Promjene u biološkom sustavu uzrokovane prisutnošću i djelovanjem zagađivala ili grupe zagađivala nazivaju se krajnjim točkama (tzv. end-point), biološkim markerima, biomarkerima, izloženosti organizma. Kao indikator zagađenja rovinjskog priobalja organskim spojevima proučavana je BPMO aktivnost u jetri riba (Kurelec i sur., 1977; 1979) te sposobnost pretvorbe postmitohondrijske frakcije jetre riba *Mugil auratus* premutagenih spojeva u mutagene produkte u SOS-umu testu (Bihari i sur., 1990). Indukcija enzimskog sustava citokrom P-450 oksidaza miješanih funkcija te njihova specifična katalitička aktivnost (AHH, EROD, ECOD, PROD, BROD) danas je diljem svijeta prihvaćeni biomarker koji se primjenjuje u biomonitoringu ksenobiotika. U ovom se radu pokušalo odrediti odnos indukcije enzimske aktivnosti (EROD, PROD) u riba sa količine CYP 1A1 proteina (ELISA) i CYP 1A1 m-RNA.

Mjerenje EROD ili AHH monooksigenazne aktivnosti uvjetovane indukcijom CYP 1A1 već je uključeno u brojne monitoring programe u svijetu kao što su National Status & Trends Program in USA (Collier i sur., 1992) i North Sea Task Force Monitoring Master Plan of the North Sea Nations (Goksøyr i Förlin, 1992).

Primarno mjesto metabolizma ksenobiotika u riba je jetra, koja sadrži najvišu aktivnost citokrom P-450 monooksigenaza. Mjerenjem količine CYP 1A1 te specifične katalitičke aktivnosti EROD dobija se osjetljiv i specifičan odgovor na određeno zagađivalo ili grupu zagađivala, ali biološki značaj za sam organizam, pa onda i za strukturu i funkciju populacije ili ekosistema ostaje nepoznat. Međutim, utjecaj ksenobiotika (od kojih su mnogi genotoksični) može se najjednostavnije objasniti pojmom "Genotoxic Disease Syndrome" (Kurelec, 1993) koji podrazumijeva skupinu različitih pojava u organizmima izloženih djelovanju ksenobiotika, kao što su: slabljenje imunološkog sustava, inhibicija rasta i



razvoja organa, degenerativne promjene i atrofija organa, arterioskleroza, ubrzano starenje, smanjenje fizičke kondicije, povećana frekvencija nastanka bolesti i neoplazija, slabljenje sposobnosti reprodukcije, pojava nekroze i na kraju smrti organizma. Usprkos tome, mjerenje citokrom P-450 monooksigenaza kao biomarkera zagađenja ksenobioticima vrijedan je i dragocjen indikator samih promjena u okolini izazvanih zagađivalima na mjestu proučavanja. Tako izmjerene aktivnosti mogu poslužiti u svrhu procjene zagađenja okoline i mogu biti uključene u programe praćenja zagađenja mora.

Lubin, *Dicentrarchus labrax* (L.), rasprostranjena je vrsta bijele ribe pa smo ga istraživali kao potencijalno dobru biološku indikatorsku vrstu zagađenja mora. Uz to, praćenje indukcije citokroma P-450 1A1 u lubina kao pokazatelja zagađenja mora ksenobioticima omogućava ne samo uvid u prirodu tog sustava u jedne neistražene ribe, nego i njegovu usporedbu s CYP 1A1 u drugih vrsta riba.

Ta proučavanja trebaju pokazati da li jetra lubina posjeduje potencijal indukcije P-450 sustava koji se može koristiti u biomonitoringu ksenobiotika. Da bismo odredili katalitičku aktivnost enzima CYP 1A1 bilo je potrebno optimirati i prilagoditi metodu mjerenja EROD aktivnosti (Burk i Mayer, 1974) u riba i specifičnim laboratorijskim uvjetima. Za mjerenje EROD i PROD aktivnosti u mikrosomskim frakcijama jetre lubina utvrđeni su optimalni uvjeti rada, a to su pH 7.7, koncentracija NADPH 200  $\mu$ M, 0.5-1 mg proteina te koncentracija supstrata etoksi- ili pentoksiresorufina od 12.5  $\mu$ M. Dobiveni rezultati nedvojbeno pokazuju da zagađivala  $\beta$ -NF, MC i Aroklor 1254 značajno induciraju EROD aktivnost u odnosu na kontrolni uzorak, za razliku od PB koji je tipičan inducer PROD aktivnosti koja je u riba praktički nemjerljiva što odgovara i literaturnim izvorima za druge vrste riba, kao što su pastrva *Salmo gairdneri* (Förlin, 1980; Vodicanik i sur., 1981; Goksøyr i sur., 1987), i bakalar *Godus mohura* (Goksøyr i sur., 1987). Lubini tretirani  $\beta$ -NF pokazuju čak 8.24 puta veću EROD aktivnost od kontrole, a oni tretirani sa MC i Aroklorom 1254 povećavaju EROD aktivnosti 3.93 odnosno 2.93 puta.

Rezultati dobiveni mjerenjem PROD aktivnosti potvrđuju dosadašnje rezultate drugih autora sa drugim ribama, tj. da do inducije PROD aktivnosti u riba (i CYP 2B1 proteina) ne dolazi tvarima tipa PB (Förlin, 1980; Goksøyr, 1987; Kleinow i sur., 1987; Lech i sur., 1988; Stegeman, 1981; Stegeman i Kloepper-Sams, 1987; Vodicanik i sur., 1981) kao ni onim zagađivalima koja su uzrokovala povećanje EROD aktivnosti ( $\beta$ -NF, MC, Aro). Ribe injektirane ekstraktima morske vode sa različitih lokacija (Tvornica Duhana, Mirna, Figarola) ne pokazuju značajno povećanje EROD niti PROD aktivnosti od kontrolnog uzorka. Nešto niže EROD vrijednosti izmjerene su u riba injektiranih ekstraktima morske vode sa ispusta tvornice ribljih konzervi Mirna, u odnosu na kontrolne ribe, a uzrok tome je, vrlo vjerojatno, prisustvo inhibitora ili supresora sinteze P-450 proteina u ekstraktima zagađivala. Naime, kao što su to opisali George (1989), Stebbing (1989), Goksøyr i Förlin (1992), te Boon i suradnici (1992) do smanjenja katalitičke aktivnosti može doći zbog injektiranih zagađivala koji ili denaturiraju P-450 proteine in vivo ili inhibiraju njegovu indukciju. Tome u prilog govore i naši nalazi o relativnim količinama CYP 1A1 u jetri riba tretiranih istim ekstraktima.

Mjerenjem absorbancije na 492 nm u uzorcima mikrosomskih frakcija jetre riba koji su bili izloženi reakciji sa antitijelima (ELISA) odredili smo količinu CYP 1A1. Najveća količina CYP 1A1 izmjerena je u uzorcima riba tretiranih  $\beta$ -NF, Aroklorom 1254 i MC.

U uzorcima riba injektiranih ekstraktima morske vode izmjerene vrijednosti pokazuju da do indukcije CYP 1A1 proteina ne dolazi ili je ona čak i potisnuta, a to jasno ukazuje da u ekstraktima postoje zagađivala koja to mogu učiniti.

Kod riba tretiranih modelnim zagađivalima postoji pozitivan linearni odnos između EROD aktivnosti i količine CYP 1A1 proteina, što znači da je povećanje EROD aktivnosti i količine CYP 1A1 proteina uzrokovano *de novo* sintezom CYP 1A1 proteina.

Usporedbom dobivenih rezultata EROD aktivnosti i količine CYP 1A1 pojedinih uzoraka primjetili smo da je omjer značajno niži u uzorku riba tretiranih Aroklorom 1254 i iznosi 2.5, a u ostalim je uzorcima veći: 2.9 za  $\beta$ -NF, 3.3 za MC i 2.7 za PB. To se slaže sa literaturnim podacima u kojima je pokazano da Aroklor 1254 ima inhibitorno djelovanje na enzimsku aktivnost (Gooch i sur., 1989; Miranda, 1990b).

Linearan odnos EROD aktivnosti i količine CYP 1A1 postoji i između uzoraka riba injektiranih ekstraktima morske vode, ali u ovom slučaju se ne može procijeniti kolika će biti EROD aktivnost u uzorku poznate količine CYP 1A1 proteina i obrnuto. Uzrok tomu je zasigurno prisustvo nekih inhibitora enzimske aktivnosti u uzorcima, jer su za gotovo iste količine CYP 1A1, koje su veće od kontrole, izmjerene različite EROD aktivnosti.

Analiza *de novo* sinteze CYP 1A1 m-RNA nije dala rezultate koji bi bili sukladni sa rezultatima dobivenim mjerenjem enzimske aktivnosti i količine CYP 1A1. Naime, u uzorku u kojem smo izmjerili najveću enzimsku aktivnost i količinu CYP 1A1 količina izmjerene *de novo* sintetizirane CYP 1A1 m-RNA bila je vrlo niska, a najviša u uzorku injektiranom sa ekstraktom morske vode sa lokacije Tvornica duhana. Dobiveni rezultati potpuno su nelogični, a razlog tomu može biti loše rukovanje uzorcima ili ubrzano sniženje količine m-RNA na početnu vrijednost po indukciji (Kloepper-Sams i Stegeman, 1989) tj. njena destrukcija *in vivo*, pa je i primjena ove metode u biomonitoringu, zbog visoke degradibilnosti uzorka m-RNA, ograničena (Haasch i sur., 1989).

Primjenom SDS PAGE i Western blot tehnike odredili smo da u lubina postoje dva monomera CYP 1A1 molekulskih masa 54,3 i 52,5 kDa. U riba tretiranih modelnim zagađivalima tipa MC dolazi do povećanja njihove količine, s time da je najbolji inducer CYP 1A1  $\beta$ -NF. Ti se nalazi slažu s dostupnim literaturnim podacima (Goksøyr, 1985) u kojima je temeljem imunokemijskih metoda utvrđena sličnost CYP 1A1 bakalara i lubina. Jetra lubina dakle posjeduje potencijal pretvorbe ksenobiotika i indukcije CYP 1A1 koji se može koristiti kao biomarker u monitoringu ksenobiotika. To smo pokazali mjerenjem indukcije EROD aktivnosti ksenobioticima, kao i promjenama u količini CYP 1A1 proteina u riba tretiranih modelnim spojevima.

Mjerenje EROD aktivnosti u mikrosomskim frakcijama jetre kao i CYP 1A1 proteina ELISA tehnikom u lubina pokazuje se kao potencijalno valjan biomarker nazočnosti ksenobiotika u moru, a lubin kao potencijalno dobar indikatorski organizam.

Dosadašnja iskustva biomonitoringa ksenobiotika pokazuju da je za proučavanje biološkog učinka zagađivala na P-450 sustav lubina potrebno koristiti ribe sakupljene direktno sa njihovih prirodnih staništa gdje će biti izložene zagađivalima, vodeći računa o složenosti djelovanja smjese zagađivala i različitim utjecajima na pojedine jedinke (Collier i sur., 1992; Goksøyr i Förlin, 1992). Za biomonitoring zagađivala bolje je zagađivala ekstrahirati i primjeniti ih direktno npr. injektiranjem intraperitonealno, čime se svode na najmanju moguću mjeru vanjske prirodne i individualne razlike u izloženosti zagađivalima. Najbolje bi bilo izdvojiti iz ekstrakata onu grupu zagađivala koji potencijalno mogu inducirati sustav P-450 monooksigenaza (npr. PAH-ove ekstrakcijama na XAD kolonama). Time bi se smanjili na najmanju moguću mjeru i utjecaji svih onih zagađivala koja mogu smanjiti EROD aktivnost i količinu CYP 1A1 proteina čineći tako rezultate monitoringa ksenobiotika lažno niskima.

## **6. ZAKLJUČCI**

1. CYP 1A1 proteini mikrosomske frakcije jetre lubina *Discentrarchus labrax* inducibilni su inducerima tipa policikličkih aromatskih ugljikovodika (metilholantren,  $\beta$ -naftoflavon) te inducerima miješanog tipa (Aroklor 1254). Ne induciraju ga tvari tipa fenobarbitala.
2. Indukciju MC,  $\beta$ -NF i Aroklorom 1254 u jetri lubina prati povećanje ukupnog sadržaja CYP 1A1 te povećana EROD aktivnost.
3. CYP 1A1 proteini mikrosomske frakcije jetre lubina reagiraju s poliklonalnim antitijelima na P450 1A1 jetre bakalara, a SDS poliakrilamid elektroforeza i Western blot analiza ukazuju na postojanje dva oblika CYP 1A1, u lubina molekulskih težina 54.3 i 52.5 kDa.
4. Signifikantno povećanje EROD aktivnost u riba tretiranih modelnim zagađivalima u odnosu na kontrolu ustanovljeno je u lubina tretiranih sa  $\beta$ -NF, MC, Aroklorom 1254. Povećana EROD aktivnost u uzorcima tretiranim Aroklorom 1254, koji je poznati inhibitor katalitičke aktivnosti in vitro, nije bila linearno proporcionalna količini CYP 1A1.
5. U riba injektiranih s ekstraktima morske vode sa tri prirodne lokacije nije izmjerena značajno veća EROD aktivnost ni povećanje količine CYP 1A1.

6. PROD aktivnosti su u svim istraženim uzorcima znatno niže od EROD aktivnosti.  
Premda je u uzorcima tretiranim sa MC, PB i Aroklorom 1254 izmjerena povećana PROD aktivnost u odnosu na kontrolni uzorak ona je vrlo niska što potvrđuje činjenicu da ribe ne mogu inducirati CYP proteine inducerima tipa fenobarbitala, premda su CYP 2B produkti u riba potvrđeni i imunokemijskim metodama.
  
7. U riba injektiranih s ekstraktima morske vode sa lokacije Mirna također je izmjerena povećana PROD aktivnost u odnosu na kontrolu, međutim to povećanje nije opaženo u uzorcima riba injektiranih ekstraktima morske vodom sa druge dvije istražene lokacije.
  
8. Količina CYP 1A1 nije značajno povećana u uzorcima riba injektiranih ekstraktima morske vode sa istraživanih prirodnih lokacija.
  
9. Analiza *de novo* sinteze CYP 1A1 m-RNA nije praktična za primjenu u biomonitoringu.



## **7. SAŽETAK**

**INDUKCIJA CITOKROMA P-450 1A1 U JETRI LUBINA**  
***Dicentrarchus labrax (L.)* KSENOBIOTICIMA**

*Željko Jakšić*

Institut "Ruđer Bošković", Centar za istraživanje mora Rovinj,  
Rovinj, Republika Hrvatska

Analizirana je količina citokrom P-450 1A1 proteina (CYP 1A1) i njegova specifična katalitička aktivnost etoksiresorufin-O-deetilaza (EROD), te novonastala citokrom P-450 1A1 m-RNA (CYP 1A1 m-RNA) u jetri lubina. Katalitička aktivnost i *de novo* sinteza proteina CYP 1A1 ne povećava se značajno u mikrosomskim frakcijama jetre lubina *Dicentrarchus labrax (L.)* tretiranih fenobarbitalom. Lubini tretirani  $\beta$ -naftoflavonom pokazuju 8.2, metilholantrenom 3.9, a Aroklorom 1254 2.9 puta veću katalitičku aktivnost od kontrolnog uzorka. U uzorcima tretiranim  $\beta$ -naftoflavonom izmjerena je 2.9, metilholantrenom 1.3, te Aroklorom 1254 1.2 puta veća količina proteina CYP 1A1 od one izmjerene u kontrolnih riba. Mjerenja katalitičke aktivnosti i *de novo* sinteze proteina CYP 1A1 u mikrosomskim frakcijama jetre lubina injektiranih ekstraktima morske vode sa prirodnih lokacija (otok Figarola, tvornica ribljih konzervi Mirna, Tvornica duhana) ne pokazuju značajno povećanje od kontrolnog uzorka. Analiza *de novo* sinteze CYP 1A1 m-RNA u jetri lubina nije dala rezultate sukladne s rezultatima dobivenim mjerenjem enzimske aktivnosti i količine citokroma P-450 1A1.

(101 stranica, 20 slika, 2 tablice, 142 literaturna podataka, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u knjižnici Centra za istraživanje mora Rovinj Instituta "Ruđer Bošković"

Ključne riječi: lubin, jetra, citokrom P-450 1A1, ksenobiotici, etoksiresorufin-O-deetilaza,

Mentor: dr Renato Batel, znan.suradnik  
Ocjenjivači: dr Renato Batel, znan. suradnik  
prof. dr Branko Kurelec, znan. savjetnik  
prof. dr Elsa Reiner, znan. savjetnik  
dr Smiljana Britvić, znan. suradnik

Tema rada prihvaćena: 13. rujan 1993.

## **8. S U M M A R Y**

**INDUCTION OF CYTOCHROME P-450 1A1 IN SEA BASS LIVER**  
***Dicentrarchus labrax (L.)* WITH XENOBIOTICS**

*Željko Jakšić*

"Ruđer Bošković" Institute, Center for Marine Research Rovinj,  
Rovinj, Republic of Croatia

The cytochrome P-450 1A1 protein (CYP 1A1), the catalytic activity of ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) in liver microsomes and the cytochrome P-450 1A1 m-RNA (CYP 1A1 m-RNA) from *Dicentrarchus labrax (L.)* liver were studied. Fish treated with phenobarbital did not enhance the *de novo* synthesis of CYP 1A1 and the catalytic activity. Sea basses treated with  $\beta$ -naphthoflavone, methylcholantrene and Aroclor 1254 did enhance the catalytic activity 8.2, 3.9 and 2.9 fold, and the *de novo* synthesis of CYP 1A1 2.9, 1.3 and 1.2 fold respectively. The results of catalytic activity and *de novo* synthesis of CYP 1A1 protein in liver microsomal fractions of sea bass injected with sea water extracts from different locations (Figarola Island, Fish cannery "Mirna", "Tobacco Factory") showed that there is no significant induction of CYP 1A1. The CYP 1A1 m-RNA *de novo* synthesis did not correlate with the enzymatic activity and *de novo* synthesis of cytochrome P-450 1A1.

(101 pages, 20 figures, 2 tables, 142 references, original in Croatian)

Thesis deposited in the library of the Center for Marine Research Rovinj, "Ruđer Bošković" Institute

Key words: Sea Bass, liver, cytochrome P-450 1A1, xenobiotics, ethoxyresorufin-O-deethylase

Supervisor: Dr. Renato Batel

Reviewers: Dr. Renato Batel

Prof. Dr. Branko Kurelec

Prof. Dr. Elsa Reiner

Dr. Smilja Britvić

Thesis subject accepted: September 13, 1993

## **9. L I T E R A T U R A**

- Adams, S. M., Shepard, K. L., Greeley Jr., M. S., Jimenez, B. D., Ryon, M. G., Shugart, L. R., McCharthy, J. F., Hinton, D. E. (1989). The use of bioindicators for assessing effects of pollutant stress on fish. *Mar. Env. Res.* 28: 459-464
- Al Sabti, K., Kurelec, B. (1985). Induction of chromosomal aberrations in the mussel *Mytilus galloprovincialis* watch. *Bull. Envir. Contam. Toxicol.* 35: 660-665
- Ames, B. N., Mc Cann, E., Yamasaki, E. (1975). Methods for detecting carcinogens and mutagens with the salmonella/mammalian microsome mutagenicity test. *Mutation Res.* 31: 347-464
- Andersson, T., Förlin, L., Hansson, T. (1983). Biotransformation of 7-ethoxycoumarin in isolated perfused rainbow trout liver. *Drug. Metab. Dispos.* 11: 494-498
- Andersson, T., Pesonen, M., Johansson, C. (1985). Differential induction of cytochrome P-450-dependent monooxygenase, epoxide hydrolase, glutathione transferase and UDP glucuronosyltransferase activities in the liver of the rainbow trout by  $\beta$ -naphthoflavone or Clophed A50. *Biochem. Pharmacol.* 34: 3309-3314
- Andersson, T., Koivusaari, U. (1986). Oxydative and conjugative metabolism of xenobiotics in isolated liver cells from thermally acclimated rainbow trout. *Aquat. Toxicol.* 8: 85-92
- Andersson, T. (1992). Purification, characterization and regulation of a male-specific cytochrome P-450 in the rainbow trout kidney. *Mar. Environ. Res.* 34: 109-113
- Antoine, B., Siest, G., Magdalou, J. (1985). UDP-glucuronosyltransferase specificity and subcellular localization. In: *Advances in glucuronide conjugation.*, edited by Matern S., Bock B. W., Gerok W., MTP Press Ltd., Lancaster, pp. 133-143

- Armstrong, R. N. (1987). Enzyme-catalyzed detoxication reactions: Mechanisms and stereochemistry. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 22: 39-88
- Bihari, N., Najdek, M., Floris, R., Batel, R., Zahn, R. K. (1989). Sediment toxicity assesment using bacterial bioluminiscence: effect of an unusual phytoplankton bloom. *Mar. Ecol. Progress Ser.* 57: 307-310
- Bihari, N., Vukmirović, M., Batel, R., Zahn, R. K. (1990). Application of the SOS-umu test in the detection of the pollution using fish liver S9 fraction. *Comp. Biochem. Physiol.* 95C: 15-18
- Binder, R. L., Stegeman, J. J. (1980). Induction of aryl hydroxylase in embryos of an estuarine fish. *Biochem. Pharmacol.* 29: 949-951
- Binder, R. L., Stegeman, J. J. (1983). Basal levels and induction of hepatic aryl hydrocarbon hydroxylase activity during the embryonic period of of development in brook trout. *Biochem. Pharmacol.* 32: 1324-1327
- Binder, R. L., Stegeman, J. J. (1984). Microsomal electron transport and xenobiotic monooxygenase activities during the embryonic period of development in the killifish, *Fundulus heteroclitus*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 73: 432-443
- Boon, J.P., Everaarts J. M., Hilebrand, M. T. J., Eggens, M. L., Pijnenburg, J., Goksøyr, A. (1992). Changes in levels of hepatic biotransformation enzymes and haemoglobin levels in female plaice (*Pleuronectes platessa*) after oral administration of a technical PCB mixture (Clophen A40). *Sci. Tot. Environ.* 114: 113-133
- Bronstein, I., Voyta, J. C. (1989). Chemiluminiscent detection of Herpes simplexvirus I DNA in blot and in-situ hybridization assays. 35: 1441-1446

- Buhler, D. R., Williams, D. E. (1989). Enzymes involved in metabolism of PAH by fishes and other aquatic animals: oxidative enzymes (or phase I enzymes). In: Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment, edited by U. Varanasi, CRC press, Boca Raton, Florida, pp. 151-184
- Burchell, B., Jackson, M. R., Kennedy, S. M. E., McCarthy, L., Barr, G. C. (1985). Characterization and regulation of hepatic UDP-glucuronyl-transferase. In: Microsomes and Drug Oxidations. Edited by Boobis, A. R., Caldwell, J., DeMatteis, F., Elcombe, C. R., Taylor and Francis, London, pp. 212-220
- Bulichn, A. A., Isenberg, D. L. (1981). Use of the luminiscent bacterial system for the rapid assessment of aquatic toxicity. Trans. Am. Instrument Soc. 20: 29-33
- Burke, M. D., Mayer, R. T. (1974). Ethoxyresorufin direct fluorimetric assay of microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholantrene. Drug Metab. Disp: 2: 583-588
- Celander, M., Förlin, L., Andersson, T. (1989). Cytochrome P-450 mediated O-dealkylation of 7-alkoxycoumarins in liver microsomes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Fish. Physiol. Biochem. 6: 199-205
- Celander, M., Förlin, L. (1991). Catalytic activity and immunochemical quantification of hepatic cytochrome P-450 in  $\beta$ -naphthoflavone and isosafarole treated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish. Physiol. Biochem. 9: 189-197
- Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analyt. Biochem. 162: 156-159



- Collier, T. K., Varnasi, U. (1991). Hepatic activities of xenobiotics metabolizing enzymes and biliary levels of xenobiotics in English sole (*Parophrys vetulus*) exposed to organic contaminants. Arch. Environ. Contam. 20: 462-473
- Collier, T. K., Connor, D., Eberhart, B. -T. L., Anulacion, B. F., Goksøyr, A., Varanasi, U. (1992). Using cytochrome P-450 to monitor the aquatic environment: results from regional and national surveys. Marine. Envir. Res. 34: 195-199
- Cooper, D. Y. (1973). Discovery of the function of heme protein P-450: A systematic approach to scientific research. Life Sci. 13: 1151-1116
- Elskus, A. A., Stegeman, J.J., Sunjai, J. C., Bleck, D., Pruel, R. J., Fluck, S. J. (1989). Polychlorinated biphenyls concentration and cytochrome P-450E expression in winter flounder from contaminated environments. Mar. Environn.Res. 28: 25-30
- Estabrook, R. W. (1978). Microsomal electron-transport reactions: an overview. In: Methods in Enzymology, edited by Fleishers S. and Packer L., Academic Press, 52C, pp. 43-47
- Estabrook, R. W., Werringloer, J. (1978). The measurement of difference spectra: application to the cytochrome of microsomes. In Methods in Enzymology, edited by Fleisher S. et Packer L., Academic Pres, 52C, pp. 212-220
- Farber, E., Sarma, D. S. R.(1986). Chemical cancerogenesis: the liver as a model. Phatol. Immunophatol. Rev. 5: 1-28

- Feinberg, A. P., Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analyt. Biochem.* 132: 6-13
- Feinberg, A. P., Vogelstein, B. (1984). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. ADDENDUM. *Analyt. Biochem.* 137: 266-267
- Fent, K., Stegeman, J. J. (1990). Effects of tributyltin in vitro on the hepatic microsomal monooxygenase system in the fish *Stenotomus chrysops*. *Aquatic Toxicol.* 20: 159-168
- Fent, K., Stegeman, J. J. (1993). Effects of tributyltin in vivo on hepatic cytochrome P-450 forms in marine fish. *Aquatic Toxicol.* 24: 219-240
- Förlin, L. (1980). Effects of Clophen A50, 3-methylcholantrene, pregnenolone-16 $\alpha$ -carbonitrile, and phenobarbital on the hepatic microsomal cytochrome P-450-dependent monooxygenase system in rainbow trout, *Salmo gairdneri*, of different age and sex. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 54: 420-430
- Förlin, L., Andersson, T. (1985). Storage conditions of rainbow trout liver cytochrome P-450 and conjugating enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.* 80B: 569-572
- Förlin, L., Haux, C., Karlsson-Norrgren, L., Runn, P., Larsson, Å. (1986). Biotransformation enzyme activities histopathology in rainbow trout, *Salmo gairdneri*, treated with cadmium. *Aquatic Toxicol.* 8: 51-64
- Garfinkel, D. (1958). Studies on pig liver microsomes. I. Enzymatic and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch. Bio-chem. Biophys.* 77: 493-509

- Gelboin, H. V. (1980). Benzo(a)pyrene metabolism, activation and carcinogenesis: Role and regulation of mixed function oxygenase and related enzymes. *Physiol. Rev.* 60: 1107-1166
- George, S.G. (1989). Cadmium effects on plaice liver xenobiotic and metal detoxication systems: dose-response. *Aquatic Toxicol.* 15: 303-310
- GESAMP, (1977). Impact of oil on the marine environment. IMPCO/FAO/UNESCO/WMO/WHO/IAEA/UNEP, joint group of experts on the scientific aspects of the marine pollution. *Rep. Stud. GESAMP* 6: 1-250
- Goksøyr, A. (1985). Purification of hepatic microsomal cytochrome P-450 from  $\beta$ -naphthoflavone-treated Atlantic cod (*Godus mohura*), a marine teleost fish. *Biochem Biophys. Acta* 840: 409-417
- Goksøyr, A., Solbakken, J. E., Klungsøyr, J. (1986). Regioselctive metabolism of phenatrene in Atlantic cod (*Godus mohura*): studies on the effects of monooxygenase inducers and role of cytochromes P-450. *Chem. -Biol. Interact.* 60: 247-263
- Goksøyr, A., Andersson, T., Hansson, T., Klungsøyr, J., Zhang, Y., Förlin, L. (1987). Species characteristic of the hepatic xenobiotic and steroid biotransformation systems of two teleost fish Atlantic cod (*Godus mohura*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 89: 347-360
- Goksøyr, A. (1987). Characterization of the cytochrome P-450 mono-oxygenase system in fish liver. Metabolism and effects of organic xenobiotics. Ph.D. Thesis, Department of Biochemistry, University of Bergen, Norway.

- Goksøyr, A., Serigstad, B., Soldberg, T. S., Stegeman, J. J. (1988). Response of cod (*Godus mohura*) larvae and juvenils to oil exposure detected with anti-cod cytochrome P-450c IgG and anti-scup cytochrome P-450 MAb 1-12-3. Mar. Environ. Res. 72: 31-36
- Goksøyr, A., Andersson, T., Buhler, D. R., Stegeman, J. J., Williams, D. E., Förlin, L. (1991a). Immunochemical cross-reactivity of  $\beta$ -naphthoflavone-inducibile cytochrome P-450 (P4501A) in liver microsomes from different fish species and rat. Fish. Physiol. Biochem. 9: 1-13
- Goksøyr, A., Solberg, T. S., Serigstad, B. (1991b). Immunochemical detection of cytochrome P-450 1A1 induction in cod (*Gadus morhua*) larvae and juveniles exposed to a water soluble fraction of North Sea crude oil. Mar. Poll. Bull. 22: 122-129
- Goksøyr, A. (1991). A semi-qantitative cytochrome P-450 IA1 ELISA: A simple method for studying the monooxygenase induction response in environmental monitoring and ecotoxicological testing of fish. Sci. Tot. Env. 101: 255-262
- Goksøyr A., Förlin, L. (1992). The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. Aquatic Toxicol. 22: 287-312
- Goksøyr, A. (1992a). Immunoasays for CYP 1A1 induction in fish: newanswers with Western blotting, ELISA and immunohistochemistry. Report of the FAO/IOC/UNEP training workshop on the tectniques for monitoring biological effects of pollutants in marine organisms, Nice, France, 14-25 September

- Goksøyr, A. (1992b). Practical notes on immunodetection of cytochrome P450 1A1 induction in fish after B-naphtoflavone treatment. Report of the FAO/IOC/UNEP training workshop on the techniques for monitoring biological effects of pollutants in marine organisms, Nice, France, 14-25 September
- Gonzales, F. J. (1989). The molecular biology of cytochrome P-450s. *Pharmacol. Rev.* 40: 243-288
- Goodfellow, J. W., Elskus, A. A., Kloepper-Sams, P. J., Hahn, M. E., Stegeman, J. J. (1989). Effects of ortho- and non-ortho-substituted polychlorinated biphenyl congeners on the hepatic monooxygenase system in scup (*Stenotomus chrysops*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 98: 422-433
- Haasch, M. L., Wejksnora, P. J., Stegeman, J. J., Lech, J. J. (1989). Cloned rainbow trout liver P<sub>1</sub>450 complementary DNA as a potential environmental monitor. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 98: 362-368
- Helmer, R. (1977). Pollutants from land-based sources in the Mediteranea. *Ambio* 6: 312-316
- Herbert, A., Zahn, R. K. (1989). Monitoring DNA damage in *Mytilus galloprovincialis* and other aquatic animals. *Angew. Zoologie* 77: 13-33
- Heilmann, L. J., Sheen, Y. -Y., Bigelow, S. W., Nebert, D. W. (1988). Trout P-450 IA1 c-DNA and deduced protein sequence, expression in liver, and evolutionary significance. *DNA* 7: 379-387
- Imai, Y., Sato, R. (1966). Substrate interaction with hydroxylase system in liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 22: 620-626

- Jefcoate, C. R. (1986). Cytochrome P-450 enzymes in sterol biosynthesis and metabolism. In: Cytochrome P-450. Structure, mechanism, and biochemistry, edited by Ortiz de Montellano P. R., Plenum Press, New York, pp. 387-428
- James, M. O., Browen, E. R., Dansette, P. M., Bend, J. R. (1979). Epoxide hydrase and glutatione S-transferase activities with selected alkane and arene oxides in several marine species. Chem.-Biol. Interact. 25: 321-334
- Kasper, C. B., Henton, D. (1980). Glucuronidation. In: Enzymatic Basis of detoxication, ed. Jakoby W. B., Academic Press, New York, vol II, pp. 4-36
- Kleinow, K. M., Melancon, M. J., Lech, J.J. (1987). Biotransformation and induction: Implications for toxicity, bioaccumulation and polyclonal antibodies against cytochrome P-450E of the marine fish scup. Environ. Helth Persp. 71: 105-119
- Kleinow, K. M., Haasch, M. L., Williams, D. E., Lech, J.J. (1990). A comparison of hepatic P-450 induction in rat and trout (*Oncorhynchus mykiss*): delineation of the site of resistance of fish to phenobarbital-type inducers. Comp. Biochem. Physiol. 96C: 259-270
- Klingenberg, M. (1958). Pigments of rat liver microsomes. Arch. Biochem. Biophys. 75: 376-386
- Klopper-Sams, P. J. , Park, S. S., Gelboin, H. V., Stegeman, J. J. (1987). Specificity and cross-reactivity of monoclonal and polyclonal antibodies against cytochrome P-450E of the marine fish scup. Arch. Biochem. Biophys. 253: 268-278
- Klopper-Sams, P. J. , Stegeman, J. J. (1989). The temporal relationships between P-450 protein content, catalitic activity, and mRNA levels in telost *Fundulus heteroclitus* following treatment with  $\beta$ -naphthoflavone. Arch. Biochem. Biophys. 268: 525-535

- Klotz, A. V., Stegeman, J.J., Walsh, C. (1983). An aryl hydrocarbon hydroxylating hepatic cytochrome P-450 from the marine fish *Stenotomus chrysops*. Arch. Biochem. Biophys. 226: 578-592
- Klotz, A. V., Stegeman, J.J., Walsh, C. (1984). An alternative 7-ethoxyresorufin O-deethylase activity assay: a continuous visible spectrophotometric method for measurement of cytochrome P-450 monooxygenase activity. Analyt. Biochem. 140: 138-145
- Klotz, A. V., Stegeman, J.J., Woodin, B. R., Snowberger E. A., Thomas P. E., Walsh C. (1986). Cytochrome P-450 isozymes from the marine teleost *Stenotomus chrysops*: their roles in steroid hydroxylation and the influence of cytochrome b<sub>5</sub>. Arch. Biochem. Biophys. 249: 326-338
- Kurelec, B., Britvić, S., Rijavec, M., Muller, W. E. G., Zahn, R.K. (1977). Benzo(a)pyrene monooxygenase induction in marine fish molecular response to oil pollution. Mar. Biol. 44: 211-216
- Kurelec, B., Matijašević, B. Z., Rijavec, M., Alačević, M., Britvić, S., Muller, W. E. G., Zahn, R. K. (1979). Induction of benzo(a)pyrene monooxygenase in fish and Salmonella test as a tool for detecting mutagenic/carcinogenic xenobiotic in the aquatic environment. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 21: 799-807
- Kurelec, B., Krča, S. (1987). Metabolic activation of 2-aminofluorene, 2-acetylaminofluorene and N-hydroxy-acetylaminofluorene to bacterial mutagens with mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and carp (*Cyprinus carpio*) subcellular preparations. Comp. Biochem. Physiol. 88C: 171-177

- Kurelec, B., Grag, A., Krča, S., Chanko, M., Gupta, R. C. (1990). DNA adducts in marine mussel *Mytilus galloprovincialis* living in polluted and unpolluted environments. In: Biomarkers of environmental contamination, (eds. J. F. McCarthy, L. R. Shugart) Lewis, Chelsea, MI, pp. 217-222
- Kurelec, B. (1993). The genotoxic disease syndrome. *Mar. Environ. Res.* 35: 341-348
- Laemlli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Leaver, M. J., Burke, M. D., George, S. G., Davise, J. M., Raffaelli, D. (1988). Induction of cytochrome P-450 monooxygenase activities in plaice by "model" inducers and drilling muds. *Mar. Environ. Res.* 24: 27-30
- Lech, J. J., Vodcnik, M. J., Elcombe, C. R. (1988). Induction of monooxygenase activity in fish. In: *Aquatic toxicology*, edited by L. J. Weber, Raven Press, New York, pp. 107-148
- Lemaire, P., Mathieu, A., Carriere, S., Giudicelli, J., Lafaurie, M. (1989). Metabolism of <sup>14</sup>C benzo(a)pyrene with different intoxication path in sea-bass (*Dicentrarchus labrax*). *Mar. Environ. Res.* 28: 148-149
- Lemaire, P., Mathieu, A., Carriere, S., Drai, P., Giudicelli, J., Lafaurie, M. (1990). The uptake metabolism and biological half-life of benzo(a)pyrene in different tissues of sea-bass, *Dicentrarchus labrax*. *Ecotox. Environ. Safety* 20: 223-233
- Lemaire, P., Mathieu, A., Giudicelli, J., Lafaurie, M. (1991). Effect of benzo(a)pyrene on hepatic biotransformation activities: time course of induction in aqua culture European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Polycyclic. Arom. Comp.* 2: 263-273



- Lemaire, P., Lemaire-Gony, S., Berhaut, J., Lafaurie, M. (1992a). The uptake, metabolism and biological half-life of benzo(a)pyrene administered by force feeding in sea-bass (*Dicentrarchus labrax*). *Ecotox. Environ. Safety* 23: 244-251
- Lemaire, P., Mathieu, A., Carriere, S., Narbonne, J. F., Lafaurie, M., Giudicelli, J. (1992b). Hepatic biotransformation enzymes in aquaculture European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): kinetic parameters and induction with benzo(a)pyrene. *Comp. Biochem. Physiol.* 103B: 847-853
- Livingstone, D. R., Kirchin, M. A., Wiseman, A. (1989). Cytochrome P-450 and oxidative metabolism in molluscs *Xenobiotica* 19 (10): 1041-1063
- Lowry, O. H., Rosenberg, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275
- Matern, S., Bock, K. W., Gerok, W. (1985). *Advances in Glucuronide Conjugation*. Falk Symposium 40, edited by Gerok W., MTP Press Ltd., Lancaster
- Malins, D. C., Mc Cain, B. B., Landahl, J. T., Myers, M. S., Krahn, M. M., Brown, D. W. et al (1988). Neoplastic and other diseases in fish in relation to toxic chemicals: an overview. *Aquatic Toxicol.* 11: 43-67
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring, New York
- Michel, X. R., Cassand, P.M., Ribera, D. G., Narbone, J.-F. (1992). Metabolism and mutagenic activation of benzo(a)pyrene by subcellular reactions from mussel (*Mytilus galloprovincialis*) digestive gland and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) liver. *Comp. Biochem. Physiol.* 103C: 43-51

- Miranda, C. L., Wang, J. L., Henderson, M.C., Buhler, D.R. (1989). Purification and characterization of hepatic steroid hydroxylase from untreated rainbow trout. *Arch. Biochem. Biophys.* 268: 227-238
- Miranda, C. L., Wang, J. L., Henderson, M.C., Buhler, D.R. (1990a). Immunological characterization of constitutive isozymes of cytochrome P-450 from rainbow trout. Evidence for homology with phenobarbital-induced rat P-450s. *Biochem. Biophys. Acta* 1037: 155-160
- Miranda, C. L., Wang, J. L., Chang, H. -S., Buhler, D.R. (1990b). Multiple effects of 3,4,5,3',4',5'-hexachlorobiphenyl administration on hepatic cytochrome P-450 isoenzymes and associated mixed-function oxidase activities in rainbow trout. *Biochem. Pharmacol.* 40: 387-390
- Miranda, C. L., Wang, J. L., Henderson, M.C., Zhao, X., Guengerich, F. P., Buhler, D.R. (1991). Comparison of rainbow trout and mammalian cytochrome P-450 enzymes. Evidence for structural similarity between trout P-450 LMC5 and human P-450 IIIA4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176: 558-563
- Moyle, P. B., Cech Jr., J. J. (1988). *Fishes. An introduction to ichthyology.* London, Prentice-Hall Inc.
- Murchelano, R. A., Wolke, R. E. (1985). Epizootic carcinoma in the winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. *Science* 228: 587-589
- Nebert, D. W., Gonzales, F. J. (1987). P450 Genes: structure, evolution, and regulation. *Ann. Rev. Biochem.* 56: 945-993

- Nebert, D. W., Jones, J. E. (1989). Regulation of the mammalian cytochrome P-450 (CYP 1A1) gene. *Int. J. Biochem.* 21: 243-252
- Nebert, D. W., Nelson, D. R., Feyereisen, R. (1989). Evolution of the cytochrome P-450 genes. *Xenobiotica* 19: 1149-1160
- Nebert, D. W., Nelson, R. D., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Feyereisen, R., Fujii-Kuriyama, Y., Gonzales, F. J., Guengerich, F. P., Gunsalus, I. C., Johnson, E. F., Loper, J. C., Sato, R., Waterman, M. R., Waxman, D. J. (1991). The P-450 Superfamily: Update on New Sequences, Gene Mapping, and Recommended Nomenclature. *DNA Cell Biol.* 10: 1-14
- Neff, J. M. (1978). Accumulation and release of polycyclic aromatic hydrocarbons from water, food and sediment by marine animals. Symposium on carcinogenic polynuclear aromatic hydrocarbons in marine environment, August 14-18, Pensacola, Florida
- Nelson, D. R., Strobel, H. V. (1988). On the membrane topology of vertebrate cytochrome P-450 proteins. *J. Biol. Chem.* 263: (13) 6038-6050
- Omura, T., Sato, R. (1962). A new cytochrome in liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 237: 1375-1376
- Omura, T., Sato, R. (1964). The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* 239: 2370-2378
- Ortiz de Montellano, P. R. (1986). *Cytochrome P-450. Structure, mechanism, and biochemistry.* edited by Ortiz de Montellano, Plenum Press, New York

- Oshino, N. (1982). Cytochrome b<sub>5</sub> and its physiological significance. In: Hepatic Cytochrome P-450 Monooxygenase System, Int. encycl. pharmac. ther., eds. Schenkman, J. B. and Kupfer, D., Pergamon Press, Oxford, section 108, pp. 407-447
- Park, S. S., Miller, H., Klotz, A. V., Kloepper-Sams, P. J., Stegeman, J. J., Gelboin, H.V. (1986). Monoclonal antibodies to liver microsomal cytochrome P-450 of the marine fish *Stenotomus chrysops* (scup): cross reactivity with 3-methylcholantrene induced rat cytochrome P-450. Arch. Biochem. Biophys. 249: 339-350
- Payne, J. F. (1976). Field evaluation of bezopyrene hydroxylase induction as a monitor for marine pollution. Science 191: 945-946
- Payne, J. F. (1984). Mixed function oxygenases in biological monitoring programs: review of potential usage in different phyla of aquatic animals. In: Ecotoxicological testing for the marine environment, edited by G. Prsoone, E. Jaspers and C. Claus. Belgium, pp.625-655
- Payne, J. F., Fancey, L.L., Rahimtula, A. D., Porter, E. L. (1987). Review and perspective on the use of mixed-function oxygenase enzymes in biological monitoring. Comp. Biochem. Physiol. 86C: 233-245
- Pesonen, M. A., Goksøyr, A., Andersson, T. (1992). Expression of cytochrome P-450 1A1 in a primary structure of rainbow trout hepatocytes exposed to  $\beta$ -naphthoflavone or 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Arch. Biochem. Biophys. 292: 228-233
- Pohl, R. J., Serabjit-Singh, C.J., Slaughter, S. R., Albro, P. V., Fetus, J. R., Philpot, R. M. (1983). Hepatic microsomal NADPH-cytochrome reductase from little skate, *Raja erinacea*. Comparison of thermolability and other molecular properties with mammalian enzyme. Chem.-Biol. Interact. 45: 283-294

- Sligar, S. R., Murray, R. I. (1986). Cytochrome P-450cam and other bacterial P-450 enzymes. In: Cytochrome P-450. Structure, mechanism, and biochemistry, edited by Ortiz de Montellano P. R., Plenum Press, New York, pp. 429-503
- Stebbing, A. R. D. (1989). Monitoring the North Sea; Biological techniques in an integrated strategy: Distress Signals, signals from the environment in policy and decision-making. Proceedings, 3rd North Sea seminar 1989. Rotterdam, the Netherlands, Werkgroep Noordzee, Amsterdam, pp. 61-68
- Stegeman, J. J. (1979). Temperature influence on basal activity in *Fundulus heteroclitus*. J. Fish. Res. Board Can. 36: 1400-1405
- Stegeman, J. J., Binder, R. L., Orren, A. (1979). Hepatic and extrahepatic microsomal components and mixed-function oxygenases in the marine fish *Stenotomus versicolor*. Biochem. Pharmacol. 28: 3431-3439
- Stegeman, J. J. (1981). Polynuclear aromatic hydrocarbons and their metabolism in the marine environment. In: Polycyclic hydrocarbons and cancer , edited by P.O.P.Tszo., Academic Press, New York, pp. 1-60
- Stegeman, J. J., Kloepper-Sams, P. J., Farrington, J. F. (1986). Monooxygenase induction and chlorobiphenils in the deep-sea fish *Coryphaenoides armatus*. Science 231: 1287-1289
- Stegeman, J. J., Kloepper-Sams, P. J. (1987). Cytochrome P-450 isoenzymes and monooxygenase activity in aquatic animals. Environ. Health. Perspect. 71: 87-95

- Stegeman, J. J., Teng, F. Y., Snowberger, E. A. (1987). Induced cytochrome P-450 in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) from coastal Massachusetts evaluated by catalytic and monoclonal antibody probes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 44: 1270-1277
- Stegeman, J. J., Woodin, B. R., Goksøyr, A. (1988). Apparent cytochrome P-450 induction as an indication of exposure to environmental chemicals in the flatfish *Platichthys flesus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 46: 55-60
- Stegeman, J. J. (1989). Cytochrome P-450 forms in fish: catalytic, immunological and sequence similarities. *Xenobiotics* 19: 1093-1110
- Stegeman, J. J., Woodin, B. R., Smolowitz, R. M. (1990). Structure, function and regulation of cytochrome P-450 forms in fish. *Biochem. Soc. Trans.* 18: 19-21
- Strobel, H. V., Dignam, J. D., Gum, J. R. (1980). NADPH cytochrome P-450 reductase and its role the mixed function oxygenase reaction. *Pharmac. Ther.* 8: 525-537
- Turekian, K. K. (1976). *Oceans*. Englewood Cliffs, New Jersey, Prentice-Hall Inc.
- UNEP, (1988). National monitoring programme of Yugoslavia, report for 1983-1986. MAP technical reports Series 23, Athens, 223.
- UNEP/ECE/FAO/UNESCO/WHO/IAEA. (1984). Pollutants from land-based sources in the Mediterranean. UNEP regional seas reports and studies, Athens, 32.

- Van Veld, P.A., Westbrook, D. J., Woodin, B. R., Hale, R. C., Smith, C. L., Huggett, R. J. (1990). Induced cytochrome P-450 in intestine and liver of spot (*Leiostomus xanthurus*) from a polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated environment. *Aquatic Toxicol.* 17: 119-132
- Varanasi, U., Gmur, D. J. In vivo metabolism of naphthalene and benzo(a)pyrene by flatfish. In: *Chemical analysis and biological fate: Polynuclear aromatic hydrocarbons.*, edited by Cooke, M. W. and Dennis, A. J., pp. 367-376, Battelle Press, Columbus, 1981
- Varanasi, U., Collier, T. K., Williams, D. E., Buhler, D. R. (1986). Hepatic cytochrome P-450 isoenzymes and aryl hydrocarbon hydroxylase in English sole (*Parophrys vetulus*). *Biochem. Pharmacol.* 35: 2967-2971
- Vodicnik, M. J., Elcombe, C. R., Lech, J. J. (1981). The effect of various types of inducing agents on hepatic microsomal monooxygenase activity in rainbow trout. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 59: 364-374
- Vukmirović, M. Praćenje oštećenja DNA dagnje *Mytilus galloprovincialis* genotoksičnim agensima iz mora. Magistarski rad, Rovinj 1992
- Vukmirović, M., Bihari, N., Batel, R., Zahn, R. K., Müller, W. E. G. (1993. u tisku). DNA damage in marine mussel *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of environmental contamination. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*
- Welsch, R. E. Stepwise multiple comparison procedures. (1977). *J. Amer. Stat. Assoc.* 72: 566-575

- Williams, D. E., Buhler, D. R. (1983). Purified form of cytochrome P-450 from rainbow trout with high activity toward conversion of aflatoxin B1 to aflatoxin B1-2,3-epoxide. *Cancer Res.* 43: 4752-4756
- Williams, D.E., Masters, B. S. S., Lech, J. J., Buhler, D. R. (1986). Sex differences in cytochrome P-450 isozyme composition and activity in microsomes of mature rainbow trout. *Biochem. Pharmacol.* 35: 2017-2023
- Williams, D. E., Becker, R. R., Potter, D. W., Guengerich F. P., Buhler D. R. (1983). Purification and comparative properties of NADPH-cytochrome P-450 reductase from rat and rainbow trout: Differences in temperature optima between reconstituted and microsomal trout enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* 225: 55-65
- Williams, D. E., Buhler, D. R. (1984). Benzo(a)pyrene-hydroxylase catalysed by purified isozymes of cytochrome P-450 from  $\beta$ -naphthoflavone-fed rainbow trout. *Biochem. Pharmacol.* 33: 3743-3753
- Williams, D. E., Okita, R. T., Buhler, D. R., Masters, M. S. S. (1984). Regiospecific hydroxylation of lauric acid at the ( $\omega$ -1) position by hepatic and kidney microsomal cytochromes P-450 rainbow trout. *Arch. Biochem. Biophys.* 231: 503-510
- Williams, R. T. (1974). Inter-species variations in the metabolism of xenobiotics. *Biochem. Soc. Trans.* 2: 359-377
- Zahn, R. K., Kurelec, B., Zahn-Daimler, G., Müller, W. E. G., Rijavec, M., Batel, R., Given, R., Pondeljsek, V., Beyer, R. (1982). The effect of benzo(a)pyrene on sponges as a model organisms in marine pollution. *Chem.-Biol. Interactions* 39: 205-220



Zavodnik, D. (1977). Bentic communities in the Adriatic Sea: reflects on pollution.  
Thalasia Jugoslavica 13: 211-436

Zhang, Y. S., Goksøyr, A., Andersson, T., Frölin, L. (1991) Initial purification and characterization of hepatic microsomal cytochrome P-450 from BNF-treated perch (*Perca fluviatilis*). Comp. Biochem. Physiol. 98B: 97-103

## **10. D O D A C I**

## POPIS KRATICA

Ah	aromatski ugljikovodik
AHH	hidroksilaza aromatskih ugljikovodika
AMPPD	adamantil-1,2-dioksetan fosfat
Aro	aroklor 1254
BSA	albumin iz goveđeg seruma
$\beta$ -NF	$\beta$ -naftoflavon
CYP 1A1	citokrom P-450 1A1
Da	dalton
DMSO	dimetil sulfoksid
EDTA	etilendinitrotetraoctenakiselina
EROD	etoksiresorufin-O-deetilaza
MC	metilholantren
OMF (MFO)	oksidaze miješanih funkcija
PAGE	poliakrilamid gel elektroforeza
PAH	policiklički aromatski ugljikovodici
PB	fenobarbital
PCB	poliklorirani bifenili
PMSF	fenilmetilsulfonil fluorid
PROD	pentoksiresorufin-O-deetilaza
PVP	polivinilpirolidon
SDS	natrij dodecil sulfat
SSC	natrij klorid i citrat
TBS	tris(hidroksimetil)aminometan baza i natrij klorid
TCDD	2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-oksin
TEMED	N',N',N',N'tetrametiletildiamid
Tris-HCl	tris(hidroksimetil)aminometan
TTBS	Twen-20 i TBS

## ŽIVOTOPIS

Rođen sam 27. 12. 1966. godine u Puli, gdje sam završio osnovnu školu i srednju medicinsku školu. Godine 1986. započeo sam sa studijem na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu, smjer biokemijsko inženjerstvo. Diplomski rad, iz područja organske kemije, "Priprava i reakcije ferocenilmetilamonijevih soli" obranio sam 19.12.1990. Od 1.3.1991. zaposlen sam u Institutu "Ruđer Bošković", Centar za istraživanje mora Rovinj, Laboratorij za morsku molekularnu biologiju. U jesen 1991. godine upisao sam postdiplomski studij iz područja oceanologije, smjer kemija, na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom 1991. godine boravio sam mjesec dana u Institutu za fiziološku kemiju, Sveučilišta u Mainzu, Njemačka, na temelju znanstvene suradnje na projektu "Utjecaj zagađenja na programirane sinteze".

## PODACI O MAGISTARSKOM RADU

---

### AUTOR

---

Ime i prezime: Željko Jakšić  
Datum i mjesto rođenja: 27.12.1966., Pula  
Ime oca i majke: Jerko i Evelina  
Naziv mjesto i godina  
završene srednje škole: COUO"Branko Semelić", Pula, 1985  
Naziv fakulteta i godina  
završene nastave II i III: Prehrambeno-biotehnološki Fakultet, 1990.  
Zajednički studij prirodnih znanosti iz područja  
oceanologija, smjer kemija, 1993.  
Sadašnje zaposlenje: Asistent početnik, Institut  
i adresa ustanove: "Ruđer Bošković", CIM Rovinj, G.Paliage 5, Rovinj

---

### MAGISTARSKI RAD

---

Naslov: Indukcija citokroma P-450 1A1 u jetri lubina  
*Discentrarchus labrax (L.)* ksenobioticima  
Broj stranica: 101  
    tablica: 2  
    slika: 20  
    literaturnih citata: 142  
Ustanova i mjesto  
gdje je rad izrađen: Institut "Ruđer Bošković" CIM Rovinj  
Znanstvena disciplina iz koje  
je postignut akademski stupanj: Kemija (Oceanologija)  
Voditelj rada: Dr Renato Batel  
Znanstvena ustanova u kojoj  
kojoj je magisteri obranjen: Institut "Ruđer Bošković" Zagreb

---

## **OCJENA I OBRANA**

---

Datum prijave teme: 10. travnja 1993.  
Datum predaje rada:  
Datum sjednice na kojoj  
je rad prihvaćen:  
Datum obrane rada:  
Sastav komisije pred  
kojom je rad obranjen: Dr Branko Kurelec  
Dr Renato Batel  
Dr Elsa Reiner  
Dr Smiljana Britvić